



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FES ZARAGOZA

Estudio de los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis sobre las funciones del ovario del ratón prepúber tratado con eCG.

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**LORENA GARCÍA MEZA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

A las siguientes instituciones por el apoyo financiero

**CONACYT**- beca de Doctorado

**UNAM-DGEP**- beca complementaria de Doctorado

**UNAM-PAEP**-proyecto 201331

**UNAM-DGAPA-PAPPIT**-proyectos IN217301, IN228005

A los miembros del Comité Tutoral por todas sus aportaciones y sugerencias

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dra. María Luisa Fanjul Peña

A los miembros del Jurado del examen por su empeño en la revisión de la Tesis y sus sugerencias para mejorarla.

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Dra. Margarita Virginia González del Pliego Olivares

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. José Alonso Fernández Guasti

Dra. Patricia Rosas Saucedo

*A mis padres Juana e Isaías por brindarme  
su amor y enseñarme el valor de la familia,  
la honestidad y el espíritu de superación*

*A mis hermanos Nora,  
Edú, Janet y Overath  
porque sé que siempre  
puedo contar con ellos*

*A mis sobrinos Alberto,  
David, Jennifer, Jorge,  
Saúl y Ricardo por su  
alegría e inocencia*

*A mi tía Gloria por su cariño y apoyo*

*A Carolina, Lorena, Ubaldo  
y Juanita por los momentos  
inolvidables que hemos compartido*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá y la Dra. Patricia Rosas Saucedo por todas sus enseñanzas y ser pilares en mi formación profesional.

A la Técnico María Luisa Illescas y a Diana Velázquez por su apoyo en el estudio histológico de los ovarios.

A la MVZ. Adriana Altamirano por todas las facilidades obtenidas para trabajar con los ratones en el Bioterio y al personal del bioterio por el mantenimiento a los animales utilizados en esta investigación.

Al Biol. Roberto Chavira, del Laboratorio de Hormonas Esteroides del INCMN "Salvador Zubirán", por su colaboración en la técnica de Radioinmunoanálisis.

A mis compañeros del Laboratorio de Neuroimmuno-endocrinología Lorena, Bárbara, Adriana, Claudia, Naham, Silvia, Dulce, Karina y Daniel.

A cada uno de los integrantes de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

---



---

**ÍNDICE**

	Página
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
<b>I. EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO</b> .....	<b>6</b>
Hipotálamo.....	6
Hipófisis.....	9
Ovario y crecimiento folicular.....	10
<b>II. INTERACCIÓN TIMO-REPRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
Características del timo.....	16
Las timosinas en la diferenciación de linfocitos en el timo.....	18
Alteraciones reproductoras de los ratones atímicos e hipotímicos.....	20
La timectomía neonatal e infantil sobre el desarrollo del ovario.....	21
Papel de las timosinas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.....	22
<b>III. EFECTOS MODULADORES DE LA TIMULINA</b> .....	<b>24</b>
Características moleculares y bioquímicas de la timulina.....	24
Regulación de la secreción de la timulina.....	26
Interacción bidireccional de la timulina con otras hormonas.....	29
Efectos de la timulina sobre el Sistema Nervioso.....	33
Efectos de la timulina sobre la secreción de FSH y LH.....	35
Efectos sobre las gónadas.....	36
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>38</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>

---

<b>RESULTADOS</b> .....	50
1. Análisis del peso corporal de los ratones prepúberes sometidos a diferentes tratamientos hormonales por vía sistémica e intracerebral.....	51
2. Efectos de diversas dosis de eCG sobre la ovulación en ratones prepúberes de 20 días de edad.....	52
3. Efectos de la anestesia con hidrato de cloral o con éter sobre la respuesta ovulatoria inducida con 2.5 u.i. de eCG en el ratón prepúber.....	54
4. Efectos de la administración de GnRH o hCG sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter y tratados con 2.5 u.i. de eCG.....	56
5. Efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo anterior o medio sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter y tratados con eCG.....	60
6. Efectos del reemplazo de GnRH en ratones anestesiados con hidrato de cloral y con microinyección de timulina en el hipotálamo medio, sobre la respuesta ovulatoria.....	65
7. Efectos de la microinyección de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en los ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter y tratados con eCG.....	66
8. Efectos de la microinyección de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en los ratones anestesiados con hidrato de cloral y tratados con eCG más GnRH.....	70
9. Efectos de la microinyección bilateral de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral y tratados con eCG.....	72
10. Efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis sobre la dinámica en el crecimiento folicular en los ratones anestesiados con éter y tratados con eCG.....	73
<b>DISCUSIÓN</b> .....	78
<b>CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	90
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	91
<b>PUBLICACIONES</b> .....	109

---

## GLOSARIO

**ACTH:** hormona adrenocorticotrópica

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AMPC:** adenosin monofosfato ciclico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**Chl:** hidrato de cloral

**CRF:** factor liberador de corticotropina

**DA:** dopamina

**eCG:** gonadotropina coriónica equina (antes PMSG)

**FSH:** hormona estimulante del folículo

**GH:** hormona de crecimiento

**GHRH:** hormona liberadora de la GH

**GMPc:** guanosin monofosfato ciclico

**GnRH:** hormona liberadora de las gonadotropinas

**HA:** hipotálamo anterior

**hCG:** gonadotropina coriónica humana

**HM:** hipotálamo medio

**IGF-I:** factor de crecimiento parecido a la insulina I

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$

**LH:** hormona luteinizante

**MDA:** malonaldehído

**NA:** noradrenalina

**NIH:** National Institute of Health

**NGF:** factor de crecimiento neural

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub>

**PMSG:** gonadotropina del suero de la yegua preñada (actualmente eCG)

**PRL:** prolactina

**SNC:** sistema nervioso central

**SOD:** superóxido dismutasa

**T<sub>3</sub>:** triyodotironina

**T<sub>4</sub>:** tirosina

**TF5:** timosina fracción 5

**TGF:** factor de crecimiento transformante

**TRH:** hormona liberadora de la TSH

**TSH:** hormona estimulante de la tiroides



---

## RESUMEN

Las funciones de los ovarios son reguladas por una red de señales neuroendócrinas, algunas de las cuales provienen del timo. La timulina, hormona que se sintetiza exclusivamente en las células retículo-epiteliales del timo, favorece la ovulación en ratones prepúberes tratados con eCG. Con el fin de analizar si el efecto estimulante de la timulina sobre la ovulación se debe a su acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario, en este estudio se analizaron los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) o en la hipófisis (HF) sobre la respuesta ovulatoria en ratones prepúberes tratados con eCG.

Para ello ratones hembra de 19 días de edad fueron inyectados con solución salina (SS) o timulina en el HA, HM o la HF. Al día siguiente a los animales se les inyectó eCG y fueron sacrificados 72 h después del tratamiento con eCG. Los resultados de la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados fueron comparados con grupos de animales inyectados sólo con eCG y ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter y tratados con eCG.

Todos los ratones inyectados con eCG a los 20 días de edad ovularon. En la mayoría de los ratones la anestesia con hidrato de cloral o éter bloqueó la ovulación inducida. Los ratones anestesiados con éter y tratados con eCG presentaron un mayor número de folículos atrésicos grandes que los inyectados sólo con eCG, pero esta diferencia no fue significativa.

El tratamiento con GnRH o hCG restableció la ovulación de los ratones anestesiados, lo que indica que el bloqueo producido por la anestesia afecta la liberación preovulatoria de GnRH y por ende la de LH.

La inyección de SS en el HA, HM o en la HF no modificó el bloqueo de la ovulación inducido por la anestesia. La inyección de timulina en el HA, HM o en la HF no restableció la ovulación en los ratones anestesiados con hidrato de cloral. En cambio, en ratones anestesiados con éter, la inyección de timulina en el HM o en la HF restableció la ovulación. El porcentaje de folículos atrésicos grandes de los animales inyectados con timulina en el HM o en la HF fue menor que en los inyectados con SS. Estos efectos no se observaron cuando la timulina se inyectó en el HA.

El número de ovocitos liberados por los animales con inyección de timulina en la HF fue mayor que en los inyectados en el HM, mientras que fue menor el porcentaje de folículos atrésicos grandes.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio sugerimos que el efecto estimulante de la timulina sobre la ovulación es el resultado de su acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario. En el hipotálamo medio al estimular la liberación de la GnRH y en la hipófisis al facilitar la liberación de las gonadotropinas o la respuesta de los gonadotropos a la GnRH o ambas.

---

## ABSTRACT

The ovarian functions are regulated by complex neuroendocrine signals some of them are originated in the thymus. When prepubertal mice are treated with thymulin, eCG injection stimulates ovulation, suggesting that thymulin could be acting at the hypothalamus-pituitary axis level. The present study was designed to analyze the effects of microinjection of thymulin into the anterior (AH) or medial hypothalamus (MH) or pituitary (PY) on ovulatory response in prepubertal mice treated with eCG.

Nineteen-day old female mice were anesthetized with ether and injected with saline solution (SS) or thymulin into the AH, MH or the PY and treated, on day 20 of age, with eCG. The animals were killed 72 h after eCG treatment. The results of ovulation rate and number of ova shed were compared with groups of mice injected only with eCG and mice anesthetized with chloral hydrate or ether and injected with eCG.

All mice injected with eCG on day 20 ovulated, while ovulation was absent in almost all animals anesthetized with chloral hydrate or ether and injected with eCG on day 20 of age. The blockade on ovulation induced by ether anesthesia was accompanied for increase in the number of large follicles present in the ovaries, most of them were atretic.

The GnRH or hCG injection to mice anesthetized with chloral hydrate or ether and treated with eCG, ovulated, suggesting that the blockade of ovulation induced by chloral hydrate hydrate or ether anesthesia affect the preovulatory GnRH release, affecting in consequence, LH secretion.

Injecting SS into the AH or MH or the PY did not modify the blocking of induced ovulation provoked by chloral hydrate or ether anesthesia.

Thymulin injection into the AH or MH or the PY did not reestablished ovulation in mice anesthetized with chloral hydrate, while injecting thymulin into the MH or PY of ether-anesthetized mice restored ovulation and decreased the incidence of atresia in large follicles. These effects were not observed when thymulin was injected into anterior hypothalamus.

Thymulin microinjection into the PY resulted in a higher number of ova shed and lower incidence of follicular atresia than those observed in mice injected with thymulin into the MH.

Present results suggest that thymulin stimulatory effects on eCG-induced ovulation are produced on the hypothalamus-pituitary axis. At the medial hypothalamus level facilitating the release of GnRH, and at the pituitary level regulating gonadotrophins release and/or the response of gonadotropes to GnRH effects.

---

## INTRODUCCIÓN

Actualmente las conexiones recíprocas entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico son generalmente reconocidas y bien documentadas. Del establecimiento de la red de conexiones neuroinmuno-endócrinas y su eficiencia depende la homeostasis de los seres vivos. Las alteraciones que se producen en uno o varios de los componentes de cada sistema resulta en patologías, de ahí la importancia de conocer los mecanismos implicados en la regulación de esta red de comunicación (Goya, 1991; McCann, 1998). La búsqueda de respuestas a este tipo de interrogantes no sólo contribuye al conocimiento científico básico, sino también da sustento a la investigación aplicada para generar alternativas que permitan resolver problemas de salud, que en el caso particular de la reproducción puede comprometer la fertilidad de las especies, entre ellas la humana.

Una de las etapas de particular interés en la reproducción de los mamíferos es el inicio de la pubertad y la primera ovulación, ya que marca el paso de la inmadurez a la madurez sexual. Este proceso depende de la integración y coordinación de una serie de eventos neuroendocrinos que suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Ramírez, 1973; Ojeda y Urbanski, 1994). Existen evidencias que muestran que las señales que participan en la regulación de este eje también provienen de otros órganos como el timo, órgano primario del sistema inmunológico en el cual se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos T (Ross y col., 1992).

Al parecer la comunicación entre el timo y el sistema reproductor se establece por medio de las hormonas que secreta esta glándula entre ellas la timulina. Algunos estudios realizados *in vitro* con células de adenohipófisis han mostrado que la timulina facilita la liberación de las gonadotropinas (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997; Brown y col., 2000), en células de la granulosa de ovario estimula la secreción de hormonas esteroideas (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). En modelos *in vivo* como el ratón prepúber inyectado con eCG, la

---

administración sistémica de timulina estimula la esteroidogénesis y favorece la ovulación (Hinojosa y col., 1999) y en el ratón con timectomía infantil, el reemplazo de la timulina restablece las alteraciones reproductivas que ocasiona la falta del órgano (García y col., 2000).

Dado que la timulina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Bach y Dardenne, 1984), no es posible distinguir en los modelos *in vivo* antes mencionados, si sus efectos sobre la respuesta del ovario son el resultado de su acción en uno o más de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Por ello el presente estudio está orientado a analizar el papel que tiene la timulina en la función hipotálamo-hipofisaria, administrándola directamente en las áreas hipotalámicas involucradas con la síntesis y liberación de la GnRH, o en la adenohipófisis para evaluar su participación en la secreción de las gonadotropinas. En ambos casos, sus efectos se verán reflejados en la respuesta ovulatoria del animal prepúber tratado con eCG.

## MARCO TEÓRICO

### I. EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

La producción de ovocitos viables para ser fecundados es un proceso clave en la reproducción de las especies. Las señales que modulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos provienen de diversos componentes del Sistema Nervioso Central como el hipotálamo y la hipófisis, así como del mismo ovario (Fink, 1986, 1988).

#### **Hipotálamo**

El hipotálamo es una estructura bilateral que se localiza en la base del diencefalo, forma las paredes laterales y el piso del tercer ventrículo (eminencia media). El hipotálamo se extiende desde la región del quiasma óptico en la porción rostral hasta los cuerpos mamilares en el límite caudal, lateralmente está rodeado por el subtálamo, ventralmente por la lámina terminal y en la parte dorsal por la comisura anterior (Silverman y col., 1994).

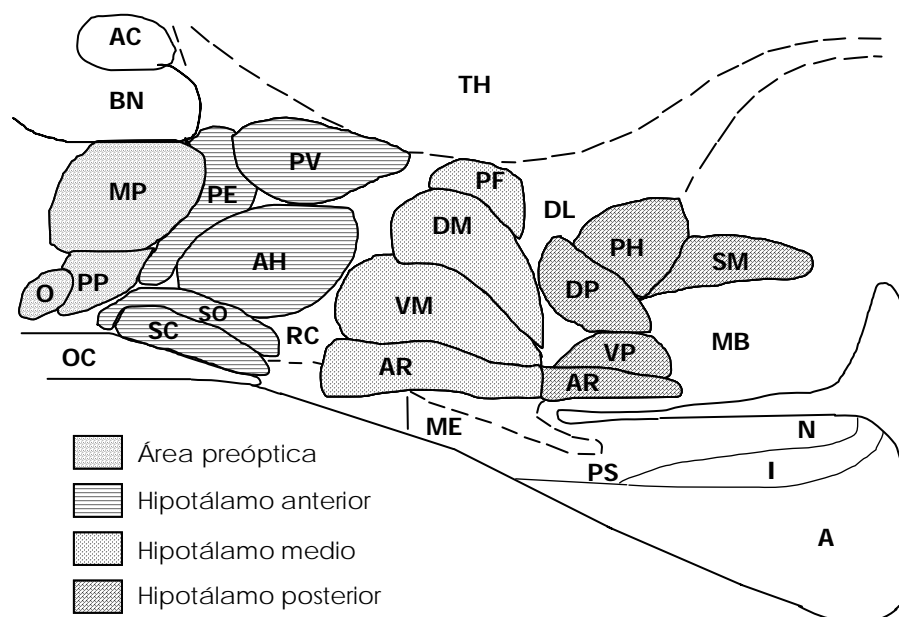
En el hipotálamo las neuronas forman agrupaciones que reciben el nombre de núcleos. Tomando como referencia la distribución de estos, el hipotálamo se divide en cuatro regiones: área preóptica, hipotálamo anterior, medio y posterior (Figura 1). Cada una de estas áreas puede ser dividida a su vez en medial y lateral (Palkovits, 2000).

**Área preóptica.** Funcionalmente se le considera parte del hipotálamo aunque su origen embriológico es diferente; en la rata esta área ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo e incluye el núcleo preóptico medial, el núcleo preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.

**Hipotálamo anterior:** Es una continuación del área preóptica. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamico anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico.

**Hipotálamo medio:** En el hipotálamo medio se reconocen tres zonas: medial-basal, dorsal y lateral. La zona medial-basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato (parte I, II y III) y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; al borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.

**Hipotálamo posterior:** Representa una pequeña parte del hipotálamo y también se le conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotalámico posterior y núcleo arcuato (parte IV y V).



**Figura 1.** Esquema que muestra la distribución topográfica de los núcleos del hipotálamo y de otras áreas en una vista sagital. **A**-Hipófisis anterior, **AC**-comisura anterior, **AH**-núcleo hipotalámico anterior, **AR**-núcleo arcuato, **BN**-base del núcleo de la estria terminal, **DL**-área hipotalámica dorso-lateral, **DM**-núcleo dorsomedial, **DP**-núcleo dorsal premamilar, **I**-Lóbulo intermedio de la hipófisis, **MB**-cuerpo mamilar, **ME**-eminencia media, **MP**-núcleo preóptico medial, **N**-hipófisis posterior, **O**-órgano vasculoso de la lámina terminal, **OC**-quiasma óptico, **PE**-núcleo hipotalámico periventricular, **PF**-núcleo perifornical, **PH**-núcleo hipotalámico posterior, **PP**-núcleo preóptico periventricular, **PS**-tallo hipofisario, **PV**-núcleo paraventricular, **RC**-área retroquiasmática, **SC**-núcleo supraquiasmático, **SM**-núcleo supramamilar, **SO**-núcleo supraóptico, **TH**-tálamo, **VM**-núcleo ventromedial, **VP**-núcleo ventral premamilar (Tomado de Palkovits, 2000).

La participación del hipotálamo en la función reproductiva es por intermedio del decapeptido GnRH (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) el cual regula la secreción de las gonadotropinas (FSH y LH) en la hipófisis (Fink, 1988).

Las neuronas que sintetizan GnRH (GnRHérgicas) no forman núcleos sino redes laxas y difusas, y a diferencia de otros sistemas neuronales su número es pequeño (aproximadamente 1500 en la rata). Las neuronas GnRHérgicas se ubican desde la Banda diagonal de Broca, en el área septal y la estría terminal, y en el hipotálamo en el área preóptica medial y lateral, en el núcleo hipotalámico anterior, núcleo periventricular y la zona retroquiasmática, además del hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Silverman y col., 1994; Palkovits, 2000).

Aproximadamente dos tercios del total de las neuronas GnRHérgicas proyectan sus fibras hacia la eminencia media donde liberan la GnRH en los capilares que conforman el sistema portal hipotálamo-hipofisiario, y de esta manera llega a la hipófisis (Figura 2) (Merchenthaler y col., 1989; King y Rubin, 1995).

Las células GnRHérgicas ubicadas en el área septal-preóptica también contribuyen a la inervación del órgano vasculoso de la lámina terminal, que es la segunda estructura más inervada en el SNC por terminales GnRHérgicas, y de estructuras extrahipotalámicas como la amígdala, el área tegmental ventral, cerebro medio, rafé, sustancia gris periacueductal (Silverman y col., 1994; Palkovits, 2000), hipocampo y bulbo olfatorio (Merchenthaler y col., 1989; Silverman y col., 1994; Palkovits, 2000).

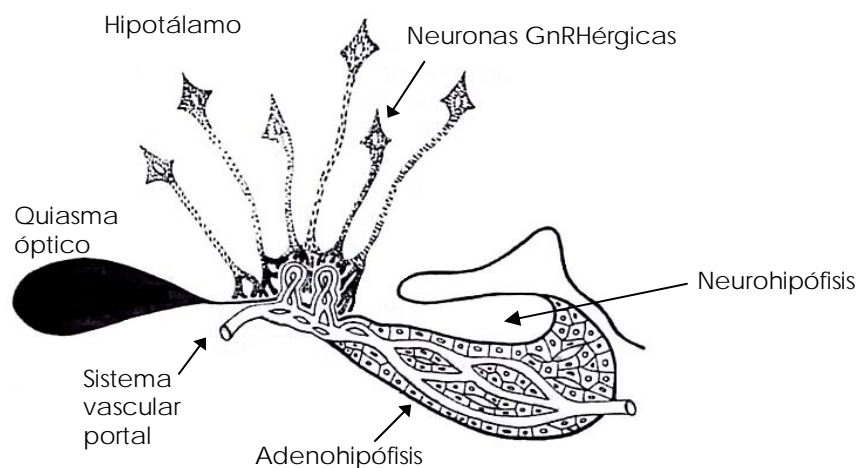
En el hipotálamo se localizan dos centros de regulación de la secreción de las gonadotropinas, el centro tónico formado por las neuronas GnRHérgicas que se localizan en los núcleos ventromedial y arcuato, y el centro fásico ubicado en el área preóptica, el núcleo supraquiasmático y en el hipotálamo anterior. El centro tónico mantiene la secreción basal de ambas hormonas, mientras que el centro fásico regula la liberación cíclica preovulatoria de las gonadotropinas que ocurre el día del proestro en la rata adulta (Fink, 1986, 1988; Palkovits, 2000).

## **Hipófisis**

La hipófisis es una glándula que se localiza en la base del cerebro en una depresión del hueso esfenoides llamada silla turca. La hipófisis comprende la neurohipófisis o lóbulo posterior y la adenohipófisis. La adenohipófisis de los mamíferos se divide en tres partes: distal, intermedia y tuberal. La parte distal es más comúnmente llamada lóbulo anterior y la parte intermedia lóbulo intermedio. En el humano no se distingue el lóbulo intermedio. La adenohipófisis se origina por una evaginación embrionaria del epitelio faríngeo (bolsa de Rathke) y está unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisario donde se encuentran los vasos sanguíneos que conforman el sistema portal-hipotálamo-hipofisario (Fink, 2000) (Figura 2).

En la adenohipófisis, la GnRH se une a receptores de membrana específicos que se localizan en los gonadotropos y estimula la síntesis y liberación de FSH y LH (Stojilkovic y col., 1994). La liberación preovulatoria de las gonadotropinas ocurre por el incremento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH al sistema portal, así como por el aumento progresivo de la sensibilización de los gonadotropos a este decapeptido, el cual es inducido por los estrógenos así como por la misma GnRH (Fink, 1986, 1988; Everett, 1994).





**Figura 2.** Esquema que muestra a la hipófisis y su conexión anatómica con el hipotálamo mediante el sistema portal de vasos sanguíneos, lugar donde se libera la GnRH que es sintetizada en el hipotálamo y de esta manera pasa a la hipófisis (Tomado de Hálasz, 2000).

En el ovario, la FSH y LH estimulan la diferenciación y el crecimiento de los folículos y la síntesis de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estrógenos) y peptídicas (activina, inhibina, factores de crecimiento). Bajo el estímulo de las gonadotropinas, la secreción de estrógenos por el ovario va en aumento hasta alcanzar la máxima concentración en la etapa preovulatoria, donde son esenciales para incrementar y mantener la respuesta de la hipófisis a la GnRH. En estas condiciones se da la liberación preovulatoria de LH, y al llegar al ovario induce la liberación del ovocito (ovulación) (Fink, 1986; Richards y Hedin, 1988).

### Ovario y crecimiento folicular

El ovario es el órgano primario del sistema reproductor cuyas funciones son producir gametos viables para la fecundación y la secreción de hormonas esteroides y polipeptídicas, las cuales regulan el desarrollo del mismo y de otras estructuras como el útero y la vagina. En los mamíferos, los ovarios son órganos pares de forma ovoide, ligeramente aplanados que se localizan en la pared lateral de la cavidad pélvica (Ross y col., 1992).

En la corteza del ovario se encuentran los folículos ováricos, que son la unidad anátomo-funcional del órgano, ya que a partir de éstos se forman los tres compartimentos del ovario (Ross y col., 1992; Audesirk y Audesirk, 1996).

1. El folicular, formado por folículos en todas las etapas de desarrollo como son primordiales, en crecimiento (primario, secundarios y terciarios) y preovulatorios.
2. El luteal o cuerpo lúteo, que se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito.
3. El intersticial o glándula intersticial, incluye tanto a las células tecointersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos, y representa la unidad productora de andrógenos.

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos primordiales y consiste en que los ovocitos desnudos son rodeados por una capa de células foliculares y de una membrana basal que los separa del resto del ovario. En los roedores como la rata y el ratón, este proceso comienza y culmina en la primera semana de vida postnatal (Peters, 1978; Hsueh y col., 1994). Los ovocitos de los folículos primordiales se encuentran detenidos en la primera profase de la división meiótica y sólo reinician la división justo antes de que ocurra la ovulación (Dominguez y col. 1991).

La diferenciación de los folículos primordiales a folículos primarios incluye: el crecimiento del ovocito, la transformación de las células aplanadas que rodean al ovocito a una forma cúbica (células de granulosa) y la proliferación de éstas células (Dominguez y col., 1991; Hsueh y col., 1994). En los folículos primarios las células de la granulosa comienzan a secretar glicoproteínas que forman un halo translúcido alrededor del ovocito que se conoce como zona pelúcida (Van-Voorhis, 1998).

La mitosis de las células de la granulosa ocurre por acción de la FSH y los estrógenos, que actúan de manera sinérgica. La FSH, a su vez, estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que su número se incremente conforme el folículo madura. La FSH también estimula la síntesis de los receptores de LH (Dominguez y col., 1991).

Los folículos que forman tres o cuatro capas de células de la granulosa alrededor del ovocito se les denominan folículos secundarios. En éstos folículos el ovocito continúa su crecimiento y comienza la diferenciación de las células de la teca a partir de las células del estroma del ovario, también se observa el desarrollo de una red de vasos sanguíneos por fuera de la membrana basal. En las células de la teca la LH estimula la síntesis de andrógenos, los cuales pasan a las células de la granulosa donde son convertidos a estrógenos por acción del complejo enzimático aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; McGee y col., 1997; Van-Voorhis, 1998).

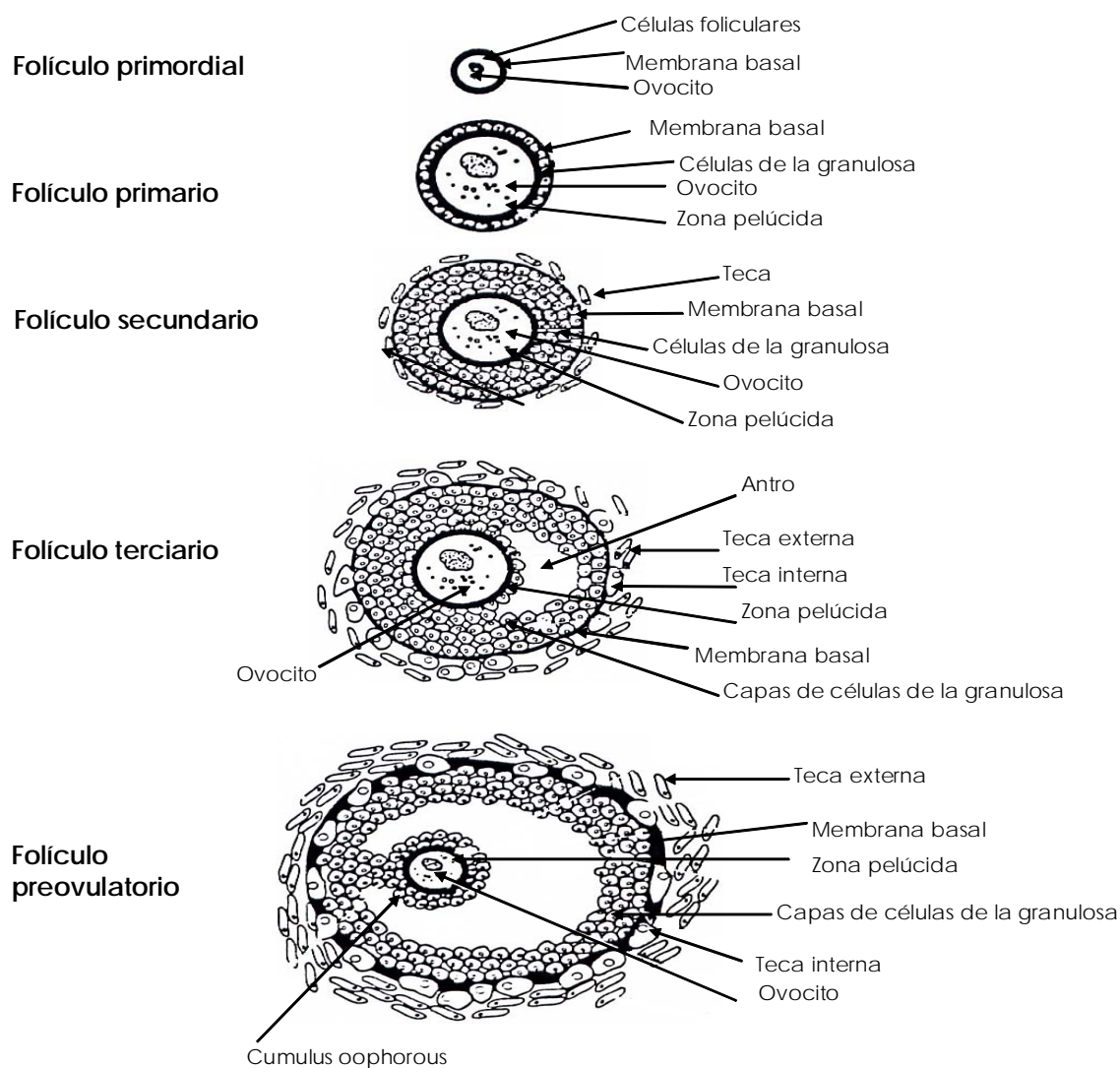
En los folículos con seis a doce capas de células de la granulosa alrededor del ovocito, comienza a acumularse líquido entre las células hasta formar una cavidad llamada antro folicular; los folículos en esta fase de desarrollo se les denominan terciarios o antrales (Dominguez y col., 1991; Hsueh y col., 1994) (Figura 3). En los folículos con antro el ovocito termina su crecimiento y se diferencian dos capas de células de la teca: la teca interna con capacidad esteroideogénica y la teca externa compuesta por colágeno, células de tejido conectivo, fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas (Dominguez y col., 1991).

Conforme los folículos antrales siguen creciendo continúan acumulando líquido hasta llegar a la etapa de preovulatorios. En el ovario de la rata, los folículos llegan a este estadio de desarrollo 17 a 19 días después de haber iniciado el crecimiento. En los folículos preovulatorios las células de la granulosa que rodean al ovocito I o primario, forman el cumulus oophorus (Figura 3). Estas células acompañan al ovocito cuando es expulsado

durante la ovulación y difieren en función al resto de células de la granulosa ya que por ejemplo poseen una menor capacidad esteroidogénica que las que rodean a la membrana basal (Van-Voorhis, 1998).

En los folículos preovulatorios la ovulación ocurre en respuesta al incremento brusco de la concentración en plasma de las gonadotropinas. La FSH y LH estimulan la secreción de enzimas proteolíticas como el activador del plasminógeno (Tsafriri y Reich, 1999; Timossi y col., 2000). La LH también estimula otras enzimas proteolíticas como la plasmina y metaloproteinasas, las cuales contribuyen a la degradación de la matriz perifolicular y principalmente de las fibras de colágeno que forman la pared folicular. Estos cambios se acompañan del incremento en el flujo sanguíneo (hiperemia), en la permeabilidad vascular y en el volumen folicular. Los cambios vasculares y en la actividad proteolítica son estimulados, además de la LH, por mediadores locales como: factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 1, eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), factor activador de plaquetas y óxido nítrico (Tsafriri, 1995; Tsafriri y Reich, 1999).

El ovocito expulsado es un ovocito II o secundario ya que justo antes de salir culmina la primera fase de la meiosis e inicia la segunda división meiótica que se detiene en metafase. La segunda meiosis se reinicia sólo si el ovocito es fecundado (Ross y col., 1992; Espey y Lipner, 1994).



**Figura 3.** Esquema que muestra los diferentes tipos de folículos durante el crecimiento folicular en el ovario (Tomado de Van-Voorhis, 1998).

A lo largo del desarrollo folicular la mayoría de los folículos ováricos (70-99.9%) entran en un proceso de degeneración llamado atresia. El mecanismo molecular fundamental de la atresia es la apoptosis o muerte celular programada la cual inicia con la activación de endonucleasas y culmina en la fragmentación del ADN. Se han relacionado varios cambios morfológicos y bioquímicos con la atresia (Tabla 1) (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994).

Tabla 1. Cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con la atresia folicular	
Células de la Granulosa	<p>Núcleos picnóticos</p> <p>Disminución de la síntesis de ADN y en la tasa de proliferación</p> <p>Disminución de la síntesis de estrógenos</p> <p>Incremento de la síntesis de progesterona (disminución de la enzima 17<math>\alpha</math>-hidroxilasa)</p> <p>Disminución en el ARNm que codifica la aromatasasa</p> <p>Disminución en el número de receptores y la respuesta a las gonadotropinas</p> <p>Disminución en la expresión de proteínas que participan en las uniones estrechas como la conexina-43 (provoca descamación de células)</p> <p>Fragmentación de la membrana basal</p>
Células de la teca	<p>Hipertrofia de las células</p> <p>Incremento de la síntesis de andrógenos</p>
Ovocito	<p>Alteraciones en la zona pelúcida</p> <p>Disminución en las uniones estrechas entre el ovocito y las células de la granulosa que le rodean (cumulus oophorus)</p> <p>Cambios parecidos a la división celular como alineación de los cromosomas en metafase</p>

## II. INTERACCIÓN TIMO-REPRODUCCIÓN

En 1898 Calzolari aportó la primera evidencia de una interacción entre el sistema reproductor y el timo al observar que la castración en el conejo macho ocasionaba hipertrofia del timo. Varias décadas después esta relación ha sido apoyada por resultados obtenidos en diversos modelos biológicos como el ratón congénitamente atímico (nu/nu), el ratón alopécico-hipotímico y los obtenidos en el modelo del ratón timectomizado en la etapa neonatal y en la etapa infantil (Flanagan, 1966; Nishizuka y Sakakura, 1969; Rosas y col., 1987; García y col., 2000).

Paralelamente a los estudios con diversos modelos biológicos, se iniciaron aquellos donde se analizó al timo como glándula y se observó que sus productos de secreción no sólo tenían efectos en procesos inmunológicos sino también reproductivos. Estos resultados llevaron a sugerir que la comunicación entre el timo y el sistema reproductor ocurre por intermedio de las hormonas que sintetiza el órgano (Goldstein y col., 1981).

### **Características del timo.**

El timo es un órgano linfoepitelial primario del sistema inmunológico. En él ocurre la diferenciación y la maduración de los linfocitos inmunocompetentes o linfocitos T cuya función es mediar la inmunidad celular (Roitt y col., 1993).

En los mamíferos, el timo es un órgano de forma triangular que consta de dos lóbulos de color rosáceo. Está ubicado en el tórax por debajo de la parte superior del esternón, entre los pulmones y con la base apoyada en el pericardio. Cada lóbulo del timo está formado por una matriz de células epiteliales dispuestas en forma de red, por lo que se les denomina retículo-epiteliales y entre las cuales se depositan los linfocitos. La densidad de células retículo-epiteliales y de linfocitos en el timo no es homogénea ya que se puede distinguir una corteza y una médula. A diferencia de la corteza, en la médula hay una menor proporción de células retículo-epiteliales y de linfocitos; algunas células epiteliales están dispuestas de manera concéntrica y forman los corpúsculos de Hassall que son estructuras de forma ovoide o esférica características del timo (Roitt y col., 1993; Fawcett, 1995; Bergman y col., 1998).

El timo es un órgano que crece desde el nacimiento hasta la pubertad. A partir de esta etapa comienza un proceso de involución que se le denomina "involución fisiológica". El inicio de este proceso ha sido atribuido al incremento en las concentraciones de las hormonas sexuales en el plasma característico de esta etapa. Diversas evidencias apoyan

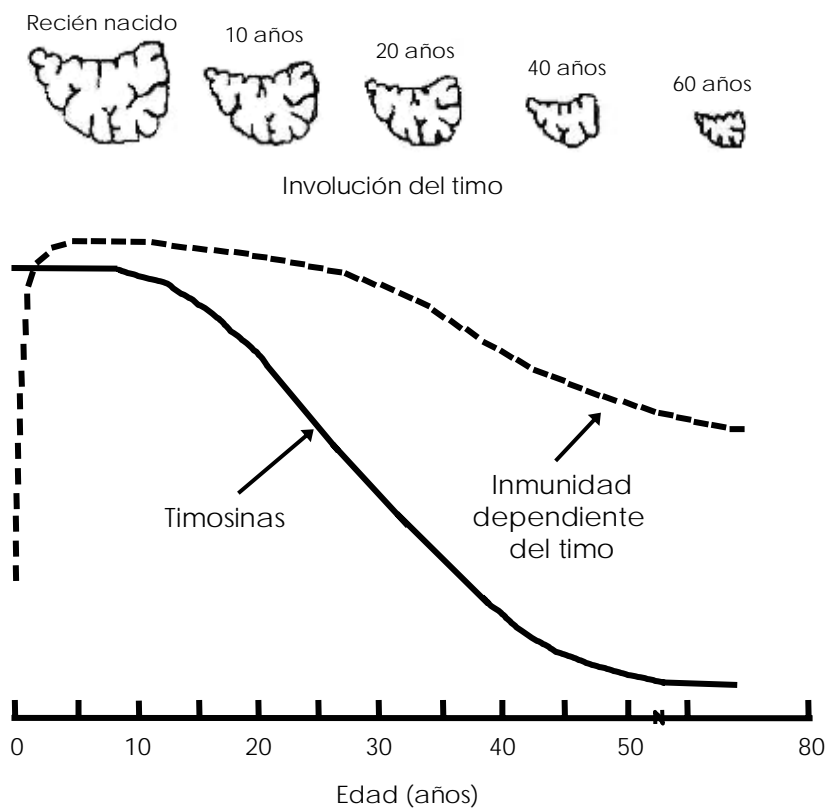
la idea que la involución del timo depende del aumento en la concentración de las hormonas esteroides en la sangre.

- La administración de progesterona, estrógenos o testosterona aceleran la involución del timo (Grossman, 1984; Fitzpatrick y col., 1985; Aboussaouira y col., 1989).
- Durante la preñez, las concentraciones de progesterona y corticosterona en plasma se incrementan y la involución del timo se acelera (Carter, 1976; Chambers y Clarke, 1979; Grossman, 1984).
- La castración antes de la pubertad retarda el proceso de involución del timo, mientras que en la etapa adulta la extirpación de las gónadas induce la hipertrofia del órgano (Janardana-Sarma y Sirsi, 1961; Grossman, 1984, 1985; Fitzpatrick y col., 1985; Rosas y col., 1992).
- Las células retículo-epiteliales del timo poseen receptores específicos a las hormonas esteroides y por ende son blanco de estas hormonas (Sholiton y col., 1980; Grossman, 1984; Morgan y Grossman, 1985; Marchetti y col., 1989).

Las células retículo-epiteliales del timo sintetizan polipéptidos a los cuales se les ha llamado timosinas. La TF5 es un extracto tímico que consta de 40-50 polipéptidos, varios de los cuales se han aislado y caracterizado. Su clasificación se ha hecho con base en su punto isoeléctrico (pI) en timosinas  $\alpha$  (pI por debajo de 5), timosinas  $\beta$  (pI 5.0-7.0) y timosinas  $\gamma$  (pI por arriba de 7). Del timo se han aislado otros polipéptidos como el factor tímico humoral, la timoestimulina, la timopoiétina y la timulina (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

La concentración de las timosinas en la sangre, al igual que la inmunidad dependiente del timo, disminuye con la edad de los individuos paralelamente al proceso de involución del órgano (Figura 4).





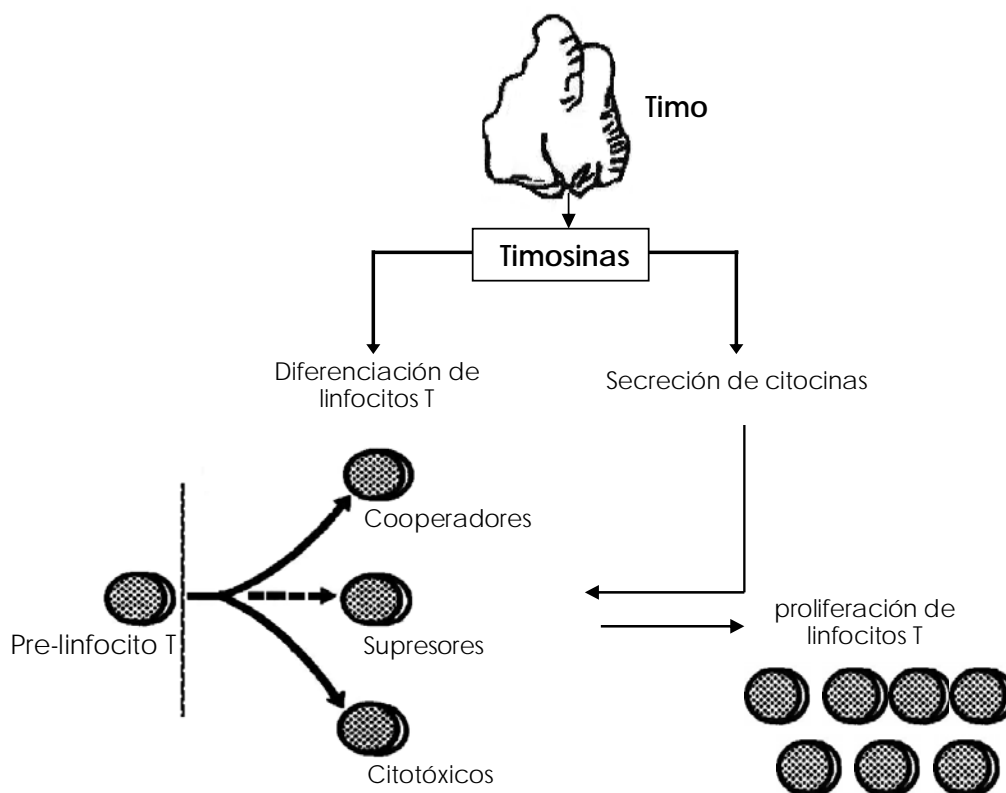
**Figura 4.** Esquema que muestra el proceso de involución del timo en el humano el cual se acompaña de la disminución en la concentración de timosinas en el plasma y la disminución de la inmunidad dependiente del timo (Modificado de Bellanti, 1986).

#### Las timosinas en la diferenciación de los linfocitos en el timo.

Una de las funciones de las hormonas que sintetiza el timo es su participación en la generación de linfocitos T a partir de células indiferenciadas, producidas en la médula ósea (pre-linfocitos T), que ingresan al órgano. El proceso de diferenciación de linfocitos en el timo es complejo e incluye la expresión secuencial de una variedad de receptores de membrana, así como el re-arreglo de genes que codifican para el receptor de células T (TCR). Este proceso se encuentra bajo la influencia del micro ambiente tímico, en el cual las células retículo-epiteliales son el componente principal y participan de dos maneras en los eventos tempranos de la diferenciación linfocítica (Dardenne y Savino, 1994).

- La secreción de una variedad de polipéptidos como las timosinas y citocinas
- En la formación de contactos entre ellas y los linfocitos a través de moléculas clásicas de adhesión y por receptores específicos que poseen las células reticulo-epiteliales.

La mayoría de las hormonas tímicas como la timulina, timosina  $\alpha$ 1, timosina  $\beta$ 4, timopoiatina y el factor tímico humoral  $\gamma$ 2, además de inducir la expresión de marcadores de membrana como el Thy-1, modulan la actividad de linfocitos ya diferenciados como los T citotóxicos y los T cooperadores lo cual resulta en cambios en la secreción de citocinas y en la proliferación de estos linfocitos (Figura 5) (Low y Goldstein, 1984; Dardenne y Savino, 1994).



**Figura 5.** Esquema que muestra los efectos de las timosinas sobre la diferenciación y proliferación de linfocitos T (Modificado de Low y Goldstein, 1984).

### **Alteraciones reproductivas de los ratones atímicos e hipotímicos.**

Los ratones nu/nu son mutantes que se caracterizan por ser atímicos y alopécicos, presentan retraso en el inicio de la pubertad y la primera ovulación (Besedovsky y Sorkin, 1974), fertilidad reducida (Flanagan, 1966; Rebar y col., 1981b), menor número de folículos en crecimiento, incremento de la atresia folicular y envejecimiento prematuro del ovario (Lintern-Moore y Pantelouris, 1975;1976a; Lintern-Moore y col., 1976), en la etapa prepuberal presentan menor concentración de FSH y LH en el plasma y en la hipófisis, y en los animales adultos hay menor concentración de estrógenos en el plasma (Rebar y col., 1981b).

Cuando los ratones atímicos reciben un trasplante de timo al nacimiento la concentración de gonadotropinas en la hipófisis se normaliza (Rebar y col., 1980); el trasplante de tejido proveniente del timo previene el incremento de la atresia folicular (Pierpaoli y Besedovsky, 1975) y la administración de gonadotropinas normaliza el crecimiento folicular (Lintern-Moore y Pantelouris, 1976b).

Los ratones mutantes hipotímicos se caracterizan porque el peso de su timo es 50% menor que el de un animal adulto normal y, al igual que los nu/nu, son alopécicos (Rosas y col., 1987, 1989; Rosas 1990). También presentan alteraciones en el sistema reproductor como: retardo en la pubertad, menor peso de los ovarios y menor respuesta ovulatoria al tratamiento con gonadotropinas (Hinojosa y col., 1999); sin embargo, su fertilidad es normal pero decrece prematuramente (Rosas y col., 1987, 1989; Rosas 1990).

En los ratones hipotímicos el número de folículos ováricos es menor que el del ratón normal, el tratamiento con gonadotropinas estimula el crecimiento folicular, aunque el 75% de los folículos son atrésicos (Rosas e Hinojosa, 1993). El injerto de un timo normal en ratones et/et recién nacidos no previene el retardo en el inicio de la pubertad (Hinojosa y Rosas, 1994).

### **La timectomía neonatal e infantil sobre el desarrollo del ovario.**

Los ratones timectomizados en la etapa neonatal entre los 2 y 4 días de edad, y no después, presentan retraso en el inicio de la pubertad, menor peso de los ovarios y del útero e infertilidad (Nishizuka y Sakakura 1969, 1971; Sakakura y Nishizuka, 1972; Nishizuka y col, 1973). Estas alteraciones se acompañan de menores concentraciones de FSH, LH, GH, PRL (Michael y col.,1980), progesterona y estrógenos en el plasma (Michael y col.,1981).

La timectomía neonatal provoca en el animal adulto disgénesis ovárica que se caracteriza por la infiltración de linfocitos en el ovario, disminución en el número de folículos, hipertrofia e hiperplasia de las células intersticiales, proliferación de tejido conectivo, ausencia de cuerpos lúteos y presencia de quistes (Nishizuka y Sakakura, 1969; Michael y col., 1990; Kosiewicz y Michael, 1990). La disgénesis ovárica se previene por el injerto de timo, del bazo o por la inyección de células en suspensión obtenidas del bazo o nudos linfáticos (Sakakura y Nishizuka, 1972). La disgénesis ovárica es de origen autoinmune, ya que hay producción de anticuerpos en contra de los ovocitos (Taguchi y col 1980; Kosiewicz y Michael, 1990). En la rata hembra, la timectomía neonatal provoca alteraciones semejantes a las observadas en el ratón sobre el desarrollo del ovario (Lintern-Moore, 1972; Hattori y Brandon, 1979).

La disminución en el número de folículos en los ovarios de los ratones timectomizados en la etapa neonatal ocurre desde los 5 días de edad, es decir mucho antes de la aparición de anticuerpos en la sangre e infiltración de linfocitos en los folículos (25 días de edad), por eso se ha propuesto que el timo tiene un efecto bifásico en el desarrollo del ovario: uno de tipo hormonal, directo o indirecto, que afecta a los folículos primordiales y en crecimiento (efecto temprano) y uno de tipo inmunológico que resulta en una respuesta auto inmune que se evidencia después de los 25 días (efecto tardío) (Kosiewicz y Michael, 1990).

Con base en la idea anterior, utilizamos el modelo del ratón timectomizado a los diez días (Tx-10) con el fin de evitar el desarrollo de la respuesta autoinmune y así poder analizar los efectos de la falta de las hormonas provenientes del timo sobre el desarrollo del ovario. Observamos que en la pubertad los ovarios de los ratones Tx-10 no muestran signos de disgénesis, pero presentan retardo en la edad de la apertura vaginal, menor número de folículos en crecimiento (en particular de los folículos pequeños) y menor respuesta ovulatoria cuando se les administra gonadotropinas (García y col., 2000). Estos resultados apoyan lo propuesto por Kosiewicz y Michael (1990) que el timo participa en la regulación del crecimiento folicular por una vía hormonal, la cual ocurre en etapas tempranas de este proceso.

### **Papel de las timosinas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas**

Uno de los primeros estudios *in vitro* que se realizaron para analizar los efectos de las timosinas sobre la liberación de hormonas que regulan la reproducción son los de Rebar y col., (1981a), quienes mostraron que la administración de TF5 a un sistema de perfusión de hipotálamo e hipófisis aumenta la liberación de LH. Cuando esta fracción se adiciona sólo a la hipófisis en cultivo no se modifica la liberación de LH y cuando se adiciona a explantes de hipotálamo se incrementa la liberación de GnRH al medio. Resultados similares obtienen al probar en el mismo sistema la timosina  $\beta_4$ , uno de las hormonas que forman parte de la TF5. Lo que indica que esta timosina es la que regula la secreción de la LH al incidir sobre el hipotálamo e inducir la liberación de GnRH (Rebar y col., 1981a). La administración de timosina  $\beta_4$  en el tercer ventrículo del cerebro del ratón adulto resulta en un incremento en la concentración de LH en el plasma (Hall y col., 1985).

En cultivo de células de adenohipófisis, la TF5 incrementa la liberación de prolactina y de GH (Spangelo y col., 1987). Este efecto se debe a una fracción llamada MB-35 que forma parte de la TF5, ya que esta fracción tiene un efecto semejante a la TF5 sobre la

liberación de prolactina y GH. La fracción MB-35 también potencia los efectos del TRH sobre la liberación de prolactina y del GHRH sobre la secreción de GH (Badamchian y col., 1991). La administración de TF5 en ratones prepúberes aumenta la concentración de estradiol en el plasma y adelanta la edad de la pubertad (Dardenne y Bach, 1981; Michael, 1983).

La adición del medio condicionado, obtenido de células retículo epiteliales, al cultivo de células de adenohipófisis aumenta la liberación de FSH y LH y potencia el efecto de la GnRH sobre la liberación de ambas gonadotropinas (Mendoza y col., 1995).

En el cultivo de células de la granulosa de rata, la adición de los polipéptidos tímicos liberados *in vitro* por las células retículo-epiteliales, estimula la secreción basal de progesterona (Uzumcu y col., 1992; Uzumcu y Lin, 1994) y estradiol (Uzumcu y Lin, 1994) e incrementa la liberación de ambos esteroides estimulada por la FSH. Los péptidos tímicos también incrementan la actividad aromatasa, tanto la basal como la estimulada por la FSH (Uzumcu y Lin, 1994).

En cerdas, la concentración en plasma de timosina  $\beta_4$  varía durante el ciclo estral; aumenta en la fase folicular y disminuye en la luteal en forma paralela con la concentración de progesterona en el plasma (Ford y col., 1990). En mujeres posmenopáusicas u ovariectomizadas, la concentración de timosina  $\beta_4$  en el plasma es menor que en mujeres normales (Golsteyn y Fritzler, 1987). En vacas, la concentración de timosina  $\beta_4$  se incrementa gradualmente con el aumento preovulatorio de LH; el bloqueo en el incremento de LH por el implante de norgestomet (progestina sintética) provoca disminución en la concentración de timosina  $\beta_4$  en el plasma (Wise y Maurer, 1991).

La timosina  $\alpha_1$  aumenta la tasa de penetración de espermatozoides a los ovocitos e incrementa la reacción acrosomal y la liberación de acrosina por los espermatozoides. En

hombres infértiles, la concentración de timosina  $\alpha 1$  en el plasma seminal es menor que un individuo normal (Naz y col., 1992).

En células foliculares de ovario la adición de un factor de 28 KDa aislado del timo disminuye la liberación de progesterona, testosterona y estradiol estimulada por la adición de hCG (Aguilera y Romano, 1989) así como la liberación de testosterona en células de Leydig del testículo en cultivo (Reyes-Esparza y Romano, 1989). Al parecer, el efecto inhibitorio de este factor sobre la esteroidogénesis se debe a que compite con el receptor a la hCG (Hiriart y Romano, 1986; Pedernera y col., 1986).

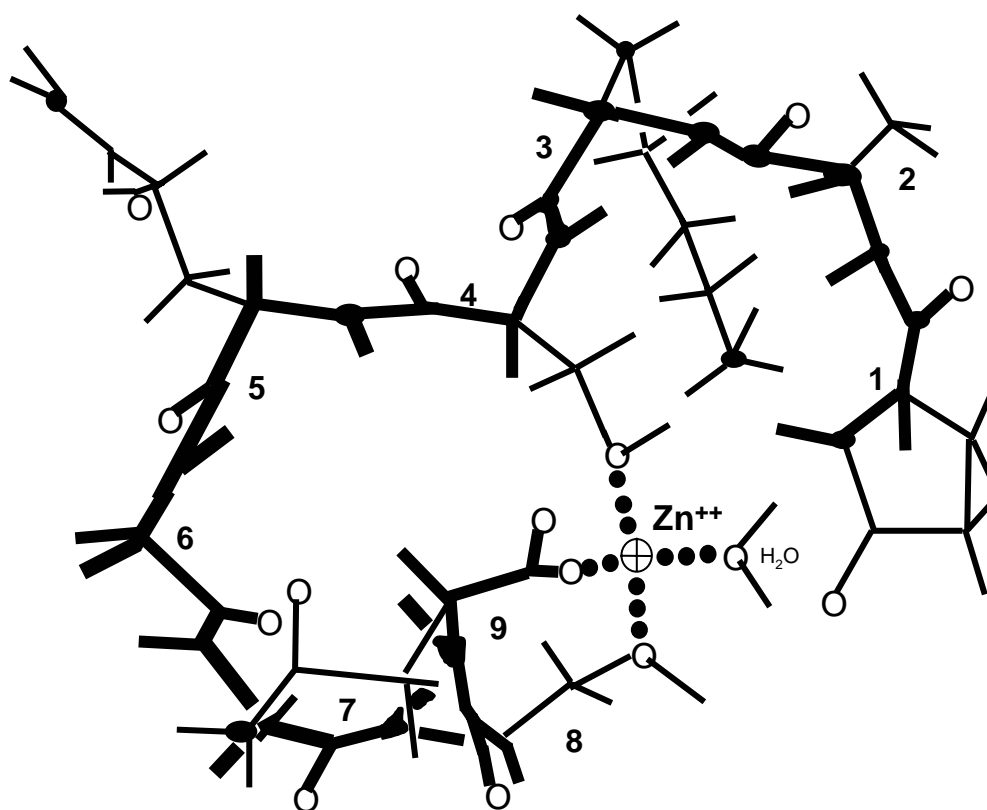
## **II. EFECTOS MODULADORES DE LA TIMULINA**

### **Características moleculares y bioquímicas de la timulina**

La timulina es un péptido que consta de nueve aminoácidos: pyro-Glu<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>-Lys<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Gln<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>-Asn<sup>9</sup>-OH, su peso molecular es de 900 daltones y su punto isoeléctrico de 7.5 (Bach y col., 1977; Goldstein y col., 1981). Inicialmente fue aislada del suero de cerdo y se le llamó Factor Timico del Suero (Pléau y col., 1977). La timulina es una metaloproteína ya que necesita de la interacción con el Zn<sup>+2</sup> para adquirir la conformación espacial que determina su actividad biológica e incrementa su vida media en el plasma (Imaizumi y col., 1981; Dardenne y col., 1982, 1984, 1985; Bach y Dardenne, 1984; Gastinel y col., 1984). Con base en la relación estequiométrica que guarda el metal con la hormona la unión de la timulina con el Zn<sup>+2</sup> se pueden formar los complejos 1:1 y 1:2. Estudios realizados con resonancia magnética han revelado que en el complejo 1:1, una molécula de Zn se une a una de timulina y el enlace ocurre mediante el grupo OH de la porción carboxilo terminal de la Ser<sup>4,8</sup> y la Asn<sup>9</sup>, el cuarto ligando probablemente es una molécula de H<sub>2</sub>O (Figura 6). En el complejo 1:2 el Zn<sup>+2</sup> se une a dos moléculas de timulina mediante

la Ser<sup>4</sup> y la Asn<sup>9</sup> de cada molécula (Gastinel y col., 1984, Dardenne y col., 1985; Cung y col., 1988).

La conformación del complejo 1:1 es la única que es reconocida por los anticuerpos monoclonales específicos para la timulina, ya que ni el complejo 1:2 ni la timulina que se encuentra en forma libre se unen a éstos. En la interacción de la timulina con el Zn, la Asn<sup>9</sup> parece ser el aminoácido más afectado dado que la eliminación o sustitución de este aminoácido en la molécula de la timulina, se traduce en una pérdida de la actividad biológica. La relación estequiométrica 1:1 del Zn con la timulina es la que muestra la mayor actividad biológica (Imaizumi y col., 1981; Dardenne y col., 1982).



**Figura 6.** Representación esquemática del complejo 1:1 timulina-zinc donde se muestran los sitios de coordinación del ión con la Ser<sup>4</sup>-OH, Ser<sup>8</sup>-OH y la Asn<sup>9</sup>-CO<sub>2</sub> del nanopéptido (Tomado de Cung y col., 1988).



La molécula de timulina también forma complejos con otros metales como el Al, Ga y Cu de manera similar a como lo hace con el Zn. Sin embargo estos complejos aunque presentan cierta actividad biológica (Dardenne y col., 1982), no son reconocidos por los anticuerpos monoclonales específicos para la timulina. Estos resultados han llevado a sugerir que sólo la unión con el Zn determina la adquisición de la antigenicidad en la molécula y esta característica está dada por la Ser<sup>4</sup> (Dardenne y col., 1985).

Existe poca información sobre las características moleculares y bioquímicas de los receptores a timulina. Los linfocitos T presentan receptores a la timulina pero los linfocitos B no los tienen. En los linfocitos T se han descrito dos tipos de receptores y la unión de la timulina a cada uno de ellos es reversible, específica y saturable. La constante de disociación (Kd) para cada uno de los receptores es de  $0.516 \pm 0.2$  nM y  $110 \pm 27.8$  nM respectivamente. La concentración de cada uno de los receptores es de  $0.186 \pm 0.045$  pmol y  $2.026 \pm 0.367$  pmol/mg de membrana y se ha calculado que su número es de  $5 \times 10^4$  y  $8 \times 10^4$  receptores por célula para cada tipo (Pléau y col., 1980; Gastinel y col., 1982).

### **Regulación de la secreción de la timulina**

A diferencia de otras timosinas que son sintetizadas en órganos como el bazo, hígado, pulmón y Sistema Nervioso Central (Dalakas y col., 1984; Horecker, 1984), la timulina se sintetiza exclusivamente en las células retículo-epiteliales del timo tanto de la corteza como de la médula, incluyendo los corpúsculos de Hassall. Esta aseveración se basa en los siguientes hechos.

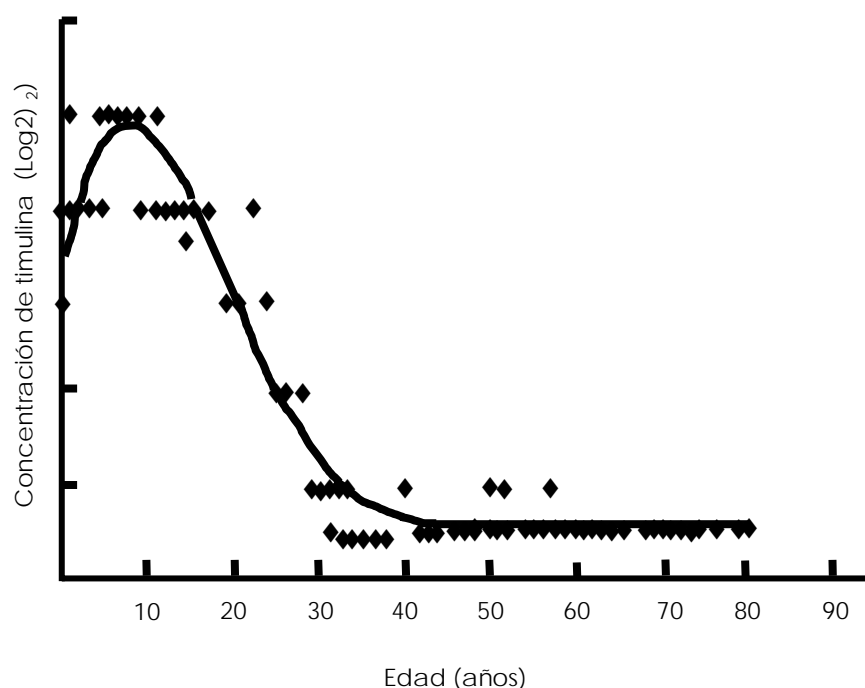
- En los animales timentomizados, la timulina desaparece de la circulación sanguínea poco tiempo después de realizar la operación. En el ratón congénitamente atímico nu/nu dicho péptido está ausente (Safieh y col., 1990). En ambos modelos experimentales, cuando se realiza un injerto de timo o de células epiteliales tímicas, la timulina se detecta en el suero (Dardenne y Bach, 1981).

- Con estudios de inmunofluorescencia se ha mostrado que el timo es el único órgano que presenta inmureactividad a la timulina (Dardenne y col., 1974; Savino y col., 1982).

La timulina está presente desde el desarrollo embrionario, se ha detectado en el plasma de fetos de ratón de 14 días de gestación y en el feto de humano a partir de la sexta semana de vida intrauterina (Dardenne y Bach, 1981). En el cordón umbilical de niños recién nacidos, la concentración de timulina es de aproximadamente 2000 fentogramos por ml. (fg/ml) de suero (Safieh y col., 1990). En el ratón la concentración de timulina en el plasma se mantiene estable hasta los 5 ó 7 meses de edad (Dardenne y Bach, 1981) y en el humano hasta los 15 ó 20 años de edad (Dardenne y Bach, 1981; Consolini y col., 2000) y posteriormente disminuye. Por ejemplo, en hombres jóvenes de 20 años la concentración de timulina en el suero es de 1500 fg/ml y en adultos disminuye hasta 370 fg/ml. En la rata y el ratón adulto la concentración es de aproximadamente 600 fg/ml (Safieh y col., 1990).

A partir de la pubertad la concentración de timulina en el plasma disminuye progresivamente conforme avanza la edad de los individuos (Dardenne y Bach, 1981) y al igual como sucede con otras timosinas, este decremento es paralelo a la involución del timo. Se ha mostrado que esta disminución en la concentración de timulina se debe a una menor síntesis del péptido y a la presencia de moléculas que inhiben a la timulina en la sangre (Dardenne y Bach, 1981; Jambon y col., 1981; Consolini y col., 2000).

En el humano, la concentración mínima de timulina llega a los 80 años de edad (Consolini y col., 2000) (Figura 7). La timulina aún se detecta en el plasma de ratones de 24 meses de edad y en humanos de más de 90 años (Mocchegiani y Fabris, 1995).



**Figura 7.** Gráfica que muestra la concentración de timulina en el plasma de humanos a lo largo de la vida. Se observa una disminución brusca a partir de la pubertad y un decremento progresivo conforme avanza la edad de los individuos (Tomado de Consolini y col., 2000).

La timulina presenta un ritmo de secreción circádico, donde la liberación máxima ocurre durante la noche (Moliner y col., 2000). Diversas hormonas participan en la regulación de la secreción de la timulina, como son la  $\beta$ -endorfina y la Leu-encefalina las que estimulan la secreción de timulina por las células retículo-epiteliales en cultivo (Savino y col., 1990). Incluso la misma timulina participa en esta regulación, puesto que en el ratón adulto la inyección de un anticuerpo monoclonal contra la timulina aumenta el número de células retículo epiteliales que la contienen, lo cual se acompaña de una disminución de la concentración de timulina en el suero, mientras que la administración sistémica de timulina provoca un decremento del número de células epiteliales que la contienen (Savino y col., 1983).

La concentración de Zn en la sangre también está relacionada con los mecanismos que participan en la secreción de la timulina ya que en animales desnutridos o con deficiencias en Zn, así como en ratones viejos de 15 y 18 meses de edad, la concentración de timulina en el plasma es baja. El suplemento con Zn a la dieta de estos animales restaura la concentración de la timulina (Boukaiba y col., 1993; Dardenne y col., 1993).

### **Interacción bidireccional de la timulina con otras hormonas**

Diversas evidencias experimentales han mostrado que la timulina mantiene una interacción bidireccional con el sistema endócrino ya que esta timosina participa en la regulación de la secreción de varias hormonas como la GH, la PRL, las hormonas tiroideas: T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, la TSH, ACTH y también mantiene una estrecha relación con la glándula adrenal.

### **Timulina-GH**

La adición de timulina a un sistema de perfusión de hipófisis o a los cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembras provoca un incremento en la liberación de la GH (Goya y col., 1994; Brown y col., 1999). Además, la timulina tiene un efecto sinérgico con la GHRH en la liberación de GH, efecto que varía con la edad del animal (Brown y col., 1999). Hadley y col. (1997) no observan cambios en la liberación de la GH por la administración de timulina al tejido adenohipofisario mantenido en cultivo.

Niños con deficiencias congénitas en la secreción de GH presentan menor concentración de timulina en el suero; cuando estos niños reciben tratamiento con GH se restaura la concentración de timulina la cual llega a valores normales (Mocchegiani y col., 1990,1996). En perros jóvenes y adultos la administración de GH provoca un incremento en la concentración de timulina, efecto que no se observa cuando la inyección de GH se realiza en animales viejos (Goff y col., 1987).

La administración de GH o del IGF-I al cultivo de células retículo epiteliales de timo de rata o de humano induce un incremento en la concentración de timulina. El efecto estimulante de la GH sobre la secreción de timulina se inhibe por la adición de un anticuerpo para el IGF-I o un anticuerpo para su receptor, lo cual significa que el efecto de la GH puede estar mediado por el IGF-I secretado dentro del timo (Timsit y col., 1992).

Las células retículo epiteliales del timo poseen receptores a la GH (Ban y col., 1991). En personas con acromegalia, las cuales presentan hipersecreción de GH, las concentraciones de timulina e IGF-I en el plasma son mayores en comparación a las de los individuos sanos (Timsit y col., 1990).

### **Timulina-PRL**

El tratamiento con timulina a hipófisis o adenohipófisis en cultivo estimula la liberación de PRL (Goya y col., 1994; Brown y col., 1998), la cual es mayor en células de adenohipófisis obtenidas de animales jóvenes (Brown y col., 1998). Por el contrario, Hadley y col. (1997) observan que la administración de timulina en células de adenohipófisis inhibe la liberación de PRL.

La administración repetida de PRL induce un incremento en la concentración de timulina en el suero de ratones jóvenes y viejos, mientras que el tratamiento con bromocriptina, un agonista de los receptores dopaminérgicos (induce una disminución en la síntesis de PRL), provoca un decremento en la concentración de timulina (Dardenne y col., 1989). Pacientes con hiperprolactinemia producida por tumores hipofisarios, también presentan altas concentraciones de timulina en sangre (Timsit y col., 1990). Este efecto se explica por la acción de la PRL en las células epiteliales del timo, ya que éstas poseen receptores a la PRL (Dardenne y col., 1991) y porque la adición de PRL a cultivos de células

retículo epiteliales de timo de humano o rata estimula la liberación de timulina, y dicho efecto es inhibido por la administración de anticuerpos a la PRL (Dardenne y col., 1989).

### **Timulina-TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>**

La adición de timulina a un sistema de perfusión de hipófisis de rata, estimula la liberación de TSH (Goya y col., 1994; Brown y col., 1998). La administración de timulina al cultivo de células de adenohipófisis también aumenta la secreción de TSH de manera dependiente de la edad, dosis y tiempo. El tratamiento con timulina y con la TRH, resulta en un efecto sinérgico en la liberación de TSH en todas las edades (Brown y col., 1998).

En ratas jóvenes (4 meses), viejas (10 meses) y senescentes (29-33 meses) la administración de T<sub>4</sub> incrementa la concentración de timulina en el plasma (Goya y col., 1993), incluso en ratones viejos la concentración de timulina llega a valores similares a los observados en el ratón joven (Fabris y Mocchegiani, 1985). La inyección diaria de T<sub>3</sub> en ratones jóvenes también incrementa la concentración de timulina (Dardenne y col., 1988).

Ratones tiroidectomizados muestran reducción progresiva en la concentración de timulina la cual se normaliza después de administrar T<sub>4</sub>. Un efecto similar se ha observado en la rata después de la tiroidectomía ya que la reducción en la concentración de timulina en el plasma es máxima 6 meses después de la cirugía (Hrynevych y col., 2002,2003).

Personas con hipertiroidismo presentan altas concentraciones de timulina en suero, mientras que en las que padecen hipotiroidismo la concentración de esta hormona es baja (Fabris y col., 1986). El hipotiroidismo en la rata y el ratón, provoca disminución en la concentración de timulina en el suero y en el número de células retículo-epiteliales que la contienen. Si a estos animales se les administra T<sub>3</sub>, aumenta la concentración de timulina en el plasma (Savino y col., 1984). Una correlación positiva entre la concentración en el plasma de las hormonas tiroideas y la de timulina también se manifiesta en recién nacidos

prematuros ya que tienen una menor concentración de  $T_3$  y de timulina. Cuando a estos niños se les inyecta  $T_3$  la concentración de timulina aumenta (Fabris y col., 1987).

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la secreción de la timulina se debe a su efecto directo sobre las células epiteliales, ya que la adición de  $T_3$  o  $T_4$  a cultivos de células retículo epiteliales estimula la secreción de timulina (Villa-Verde y col., 1993) y debido a que después de la tiroidectomía en la rata, hay disminución en el peso absoluto o relativo del timo y del contenido celular (Hrynevych y col., 2002).

### **Timulina-CRF, ACTH y glucocorticoides y esteroides gonadales**

Hadley y col., (1997) mostraron en explantes de adenohipófisis de rata macho adulta que la administración de timulina induce un aumento significativo en la liberación de la ACTH. En la rata, estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la administración de ACTH estimula la secreción de timulina (Buckingham y col., 1991,1992; Safieh y col., 1991). Con estas evidencias podemos sugerir que la timulina al incidir sobre la secreción de ACTH estaría influyendo sobre la regulación de CRF y glucocorticoides.

Se ha planteado que en condiciones de estrés agudo la ACTH estimula la secreción de timulina, la cual actuaría como una hormona anti-estrés (Safieh y col., 1991). Al respecto, se ha mostrado que ratones viejos presentan disminución en la actividad de la enzima SOD e incremento en el contenido de MDA en el cerebro (Zhao y col., 1990). La SOD es una enzima antioxidante, mientras el MDA se ha utilizado como un indicador de estrés oxidativo (Marnett, 2002; Vertuani y col., 2004; Yazar y col., 2004). La administración subcutánea y diaria de timulina en estos animales incrementa la actividad de la SOD y disminuye el contenido de MDA en el cerebro (Zhao y col., 1990).

En el ratón hembra o macho adulto la adrenalectomía o gonadectomía inducen un decremento temporal en la concentración de timulina en plasma y aumento en el número de células que la contienen. Este efecto es mayor cuando la adrenalectomía y la castración se realizan juntas. La adrenalectomía o gonadectomía también provoca incremento temporal de los inhibidores de la timulina en el suero. El tratamiento con testosterona inmediatamente después de la adrenalectomía o gonadectomía previene: el decremento en la concentración timulina en el plasma, la aparición de inhibidores para la timulina y el incremento en el número de células epiteliales que producen la timulina (Dardenne y col., 1986; Savino y col., 1988). La incubación de células retículo-epiteliales con concentraciones fisiológicas de glucocorticoides o esteroides de origen gonadal (progesterona, estradiol y testosterona) incrementa la secreción de timulina en el medio de cultivo (Savino y col., 1988).

### **Efectos de la timulina sobre el Sistema Nervioso**

A diferencia de otras timosinas, que se sintetizan en diferentes órganos incluyendo el SNC (Dalakas y col., 1984; Horecker, 1984), la síntesis y liberación de la timulina es exclusiva de las células retículo-epiteliales del timo (Dardenne y col. 1974; Savino y col. 1982). Dada la capacidad de la timulina para atravesar la barrera hematoencefálica (Bach y Dardenne, 1984) no se puede descartar que esta hormona pueda tener efectos en estructuras cerebrales como se ha descrito para otras hormonas tímicas como la timosina  $\beta 4$  (Rebar y col., 1981a).

La secreción de GnRH, y por ende la de las gonadotropinas, está regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión como el noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, GABAérgico etc. (Kordon y col., 1994). Esta regulación se establece de manera directa debido a las sinapsis entre las neuronas que sintetizan estos neurotransmisores y las neuronas que sintetizan la GnRH (GnRHérgicas), o de manera



indirecta por la interacción de estos sistemas (Jennes y col., 1982,1983). Al respecto Vécsei y col., (1987) mostraron que en el ratón adulto la administración intracerebral de timulina, provoca una disminución en el contenido de noradrenalina y dopamina en el hipotálamo. Con base en estos resultados es posible pensar que la timulina participa en la regulación de la secreción de GnRH por una vía indirecta al modificar la secreción de estos neurotransmisores.

Existen evidencias que muestran que la timulina modula la sensibilidad al dolor, efecto que depende la dosis administrada. En el ratón, la inyección sistémica de dosis altas de timulina (0.2, 1, 5  $\mu$ g) reduce la hiperalgesia y la secreción de IL-1 $\beta$  y NGF inducidos por la inyección de una endotoxina (Safieh-Garabedian y col., 1996; Safieh-Garabedian, 1998). Un efecto similar se observa con la inyección intracerebral de timulina (0.1, 0.5, 1  $\mu$ g) antes de la administración de la endotoxina (Safieh-Garabedian y col., 2003). Mientras que la inyección sistémica de dosis menores de timulina (20-150 ng) induce hiperalgesia e incrementa la producción de IL-1 $\beta$ , NGF y de PGE<sub>2</sub> (Safieh-Garabedian y col., 1993,1997a,b, 2000). El aumento en la secreción de estos factores se inhibe cuando se administra meloxicam, un inhibidor de la ciclooxigenasa (enzima que participa en la síntesis de las prostaglandinas), y la inyección de antagonistas específicos para cada uno de los factores inhibe la hiperalgesia inducida por la timulina. Estos resultados indican que los efectos de la timulina sobre la hiperalgesia y el incremento de IL-1 $\beta$  y NGF son mediados por la PGE<sub>2</sub> (Safieh-Garabedian y col., 2000).

Algunas fibras sensoriales aferentes (pequeñas no mielinizadas) parecen estar involucradas en la hiperalgesia inducida por la timulina, ya que la inyección intraperitoneal de capsaicina, fármaco que destruye este tipo de inervación, bloquea dicho efecto (Saadé y col., 1998). Se ha descrito que neuronas de la médula espinal sensibles a la nocicepción también estarían mediando los efectos de la timulina, dado que la administración de ésta induce un incremento en las neuronas inmunoreactivas al gen c-fos,

un marcador de activación neuronal (Saadé y col., 1999). Estos resultados llevan a sugerir que la timulina puede afectar la función de neuronas del SNC directamente o indirectamente por medio de terminales nerviosas periféricas sensibles al dolor.

En la rata la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina al nacimiento provoca menor número de ovocitos liberados al primer estro vaginal, menor número de folículos e incremento en la atresia folicular. Si la denervación se realiza a los tres días de edad se observa disminución en la concentración de estradiol y progesterona en el suero al primer estro vaginal y decremento en la capacidad reproductiva en la etapa adulta (Morán y col., 2003).

Con base en las evidencias anteriores es posible especular que la timulina al interactuar con las neuronas sensoriales regula la fisiología de la reproducción.

### **Efectos de la timulina sobre la secreción de FSH y LH.**

En cultivo de fragmentos de hipófisis anterior de rata macho adulta, la administración de timulina, estimula la liberación de la LH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997) de manera semejante a la que se observa cuando se estimula con GnRH (Zaidi y col., 1988).

En el cultivo de células de hipófisis anterior, la adición de timulina aumenta la liberación de LH y FSH. Cuando se co-cultiva junto con GnRH en células de adenohipófisis, la timulina tiene un efecto sinérgico sobre la liberación estimulada de LH y un efecto aditivo sobre la de FSH (Brown y col., 2000). La acción de la timulina sobre la liberación de las gonadotropinas en las células de hipófisis anterior en cultivo, está mediada por diferentes segundos mensajeros, ya que se ha mostrado que aunado al incremento en la liberación de las gonadotropinas por la adición de timulina también se observa un aumento en la

secreción de GMPc (Hadley y col., 1997), AMPc (Hadley y col., 1997; Brown y col., 2000), calcio y los fosfatos de inositol (Brown y col., 2000).

### Efectos sobre las gónadas

Se ha mostrado que la timulina estimula la proliferación de las células germinales de ovarios y de testículos obtenidos de fetos de rata e incrementa la tasa de incorporación de timidina tritiada a los gonocitos en cultivo de testículos obtenidos de rata de dos o seis días de edad (Prépin, 1991, 1993; Prépin y col., 1994).

La administración de timulina al cultivo de células de la granulosa de ovarios de cerda, incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasa. Cuando se adiciona timulina junto con FSH o con LH se observa un incremento en la secreción de progesterona, evento que no ocurre si sólo se adiciona timulina (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). Con estos resultados los autores sugieren que la timulina podría estimular la maduración de las células de la granulosa incrementando la actividad de la enzima aromatasa y su respuesta a la FSH y a la LH lo que da como resultado el aumento en la secreción de progesterona.

Wise (1998) mostró *in vitro* que la administración de concentraciones bajas de timulina en el medio de cultivo de células de Leydig de rata, incrementa la liberación de testosterona, mientras la adición de concentraciones altas disminuye la secreción de este esteroide. La inyección intravenosa de timulina en machos intactos disminuye la concentración de testosterona en suero. Si la timulina se administra a ratas hipofisectomizadas no se presenta ningún cambio, pero si estos animales son previamente estimulados con hCG, la inyección de timulina aumenta la concentración del esteroide en suero. Efectos similares se observan cuando la timulina se administra (*in vivo* e *in vitro*) en el jabalí (Wise y Ford, 1999). Estos resultados indican que el incremento en la esteroidogénesis

por el testículo provocados por la timulina depende de la presencia o la estimulación con LH.

En el ratón hembra timectomizado a los diez días de edad (Tx-10), que se caracteriza por presentar una disminución de más del 50% en la concentración de estradiol en el suero a la pubertad, el reemplazo diario con timulina iniciado inmediato a la timectomía, normaliza la concentración del esteroide (García y col., 2000). La administración diaria de timulina desde el nacimiento hasta el primer estro vaginal en el ratón intacto también induce un incremento en la concentración de estradiol en suero (Cerdeña y col., 1998).

El ratón Tx-10 también se caracteriza por una menor respuesta ovulatoria a la administración secuencial de eCG (hormona con efecto de FSH) y hCG (hormona con efecto de LH), la cual se restablece después de administrar diariamente timulina desde el momento de la timectomía hasta el sacrificio (García y col., 2000).

En ratones prepúberes de 20 días de edad la administración de eCG estimula el crecimiento folicular pero no induce la ovulación. Si a estos animales se les administra diariamente timulina desde el día anterior a la inyección de eCG hasta la edad del sacrificio (23 días), se observa que el 50% de las hembras ovulan y liberan una cuota tres veces mayor a la normal, lo cual se acompaña de incremento en el peso de los ovarios (Hinojosa y col., 1999).

En resumen, las evidencias que existen al momento muestran que la timulina puede regular las funciones del eje neuroendócrino de la reproducción actuando a tres niveles: en el hipotálamo, al incidir sobre la secreción de GnRH; en la hipófisis, estimulando la secreción de FSH, LH y otras hormonas hipofisarias o en el ovario, estimulando la esteroidogénesis y la proliferación celular, efectos que podrían traducirse en modificaciones en la maduración y crecimiento folicular y por lo tanto sobre la ovulación.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las funciones del ovario son reguladas por señales que provienen del eje hipotálamo-hipofisario y del propio ovario. Se ha mostrado que la timulina también participa en dicha regulación. Los estudios que apoyan esta aseveración se han realizado en modelos *in vitro*, en donde se ha observado que la timulina estimula la secreción de las gonadotropinas o la de hormonas esteroides sexuales y en modelos *in vivo* utilizando ratones prepúberes tratados con eCG donde la administración subcutánea de timulina favorece la ovulación, sin embargo no se conoce si este efecto está vinculado con su acción en el hipotálamo estimulando la secreción de GnRH, en la hipófisis favoreciendo la secreción de FSH y LH, en el ovario estimulando la esteroidogénesis y el crecimiento folicular, o a una combinación de estas vías. Dado que la timulina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, su administración sistémica no permite distinguir cual de estas posibilidades favorece la ovulación.

Es por esto que en el presente estudio se decidió analizar la participación de la timulina en la función hipotálamo-hipofisaria evaluando los efectos de su administración en el hipotálamo anterior (ubicación de la mayoría de los somas de las neuronas GnRHérgicas, que inervan a la eminencia media), hipotálamo medio (ubicación de la eminencia media, lugar donde se libera la GnRH) o en la hipófisis, de ratones prepúberes de 19 días de edad, sobre la ovulación inducida por la administración de eCG.

## **HIPÓTESIS**

En el ratón prepúber la administración sistémica de timulina modula de manera estimulante las funciones del ovario, probablemente por su acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario, por lo que la administración de timulina en el hipotálamo anterior o medio o en la hipófisis se reflejará en un incremento en el crecimiento folicular, la esteroidogénesis y la respuesta ovulatoria.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos de la administración de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis sobre las funciones del ovario de ratones prepúberes tratados con eCG.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar los efectos de la inyección de timulina en el hipotálamo anterior o medio o en la hipófisis de ratones de 19 días de edad, sobre la respuesta ovulatoria inducida por la administración de eCG.
2. Evaluar la concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero de ratones inyectados con timulina en el hipotálamo anterior o medio o en la hipófisis a los 19 días de edad y tratados con eCG.
3. Analizar la dinámica del crecimiento de la población folicular de los ovarios de ratones tratados con timulina en el hipotálamo anterior o medio o en la hipófisis a los 19 días de edad y tratados con eCG.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales**

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 mantenidos desde el nacimiento en fotoperiodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura de  $24 \pm 2$  °C y agua y alimento *ad libitum*. Las crías se distribuyeron en camadas de seis hembras por madre, con libre acceso a ella desde el nacimiento hasta el destete (21 días de edad). Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la guía del NIH (USA) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el comité de ética de la FES Zaragoza-UNAM.

### **Equipo y reactivos**

Las marcas y modelos del equipo utilizado en este estudio fueron las siguientes: aparato estereotáxico, David Kopf Instruments, modelo 900, USA; bomba de microinyección, Bioanalytical System, modelo CMA/100, USA; contador de centelleo gamma, Packard Instrument Co., USA; vibrátomo, Technical Products International, Inc. Serie 3000, St. Louis MO USA).

Las hormonas y reactivos fueron adquiridos con los siguientes proveedores: timulina, eCG, hCG y GnRH de Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA; solución salina (NaCl, 0.9 %) de Abbott Laboratories de México S.A. de C.V.; hidrato de cloral de Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México; éter de EM Science, NJ USA An Associate of Merck KgaA, Darmstadt, Germany; estuches comerciales para medir  $17\beta$ -estradiol de Coat-A-Count, Los Angeles, California, USA).

### **Aplicación de la anestesia**

La anestesia con hidrato de cloral (400 mg/Kg) se realizó por vía intra-peritoneal. La anestesia con éter se realizó inicialmente en una cámara saturada con vapores de éter y

ya montado el animal en el aparato estereotáxico se mantuvo cerca de la nariz un algodón con éter hasta finalizar la cirugía. La sedación con hidrato de cloral duró aproximadamente 2 h, la anestesia con los vapores de éter fue durante 15 minutos.

### **Procedimiento de la microinyección de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis**

Ratones de 19 días de edad se anestesiaron con hidrato de cloral o con éter según se indica en cada experimento. Cada ratón se montó en un aparato estereotáxico (Figura 8A) y se realizó una incisión en la piel para dejar al descubierto el cráneo. Tomando bregma como punto de referencia (Figura 8C) se ajustaron las coordenadas determinadas previamente para llegar al hipotálamo anterior, medio o a la hipófisis del animal prepúber (Tabla 2), tomando como base el atlas del cerebro de ratón adulto (Franklin y Paxinos, 1997). Se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una cánula (aguja del N° 29) conectada a una jeringa Hamilton de 50  $\mu$ l, acoplada a una bomba de microinyección calibrada a 0.15  $\mu$ l/min. La inyección de timulina (1 pg/0.3  $\mu$ l/2 min) o solución salina (NaCl 0.9 %) (0.3  $\mu$ l/2 min) se realizó en ambos lados del hipotálamo anterior o medio (Figuras 9 y 10). En la hipófisis se hizo una sola inyección o se arribó por ambos lados del cerebro (Figura 11) según se indica en cada experimento. Al terminar el procedimiento de microinyección, la piel se suturó y desinfectó con alcohol yodado.



**Tabla 2.** Coordenadas estereotáxicas (mm) utilizadas para la inyección de timulina o solución salina en el cerebro de ratones prepúberes de 19 días de edad. Se tomó Bregma=0 como punto de referencia.

Área/ coordenadas	Antero posterior	Lateral	Ventral
Hipotálamo anterior	+1.4	± 0.4	5.8
Hipotálamo medio	+0.4	± 0.4	5.8
Hipófisis	-0.9	0.2	7.0

### **Administración de hormonas**

La inyección de las hormonas se realizó por vía subcutánea. La administración de eCG (0.5, 1.0, 2.0 ó 2.5 u.i.) se realizó a los 20 días de edad, la de hCG (3.0 u.i.) 54 h después del tratamiento con eCG y la de GnRH (7.4 µg/Kg) 48 h después de la inyección de eCG.

### **Procedimiento de sacrificio y autopsia**

Los animales se sacrificaron por decapitación 72 h después de la administración de eCG, entre las 9:00 y 11:00 h. Se colectó la sangre del tronco la cual se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente y después se centrifugó a 3000 rpm. El suero fue almacenado a -20 °C hasta la medición de 17β-estradiol. A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en una balanza de precisión. En los oviductos se buscó la presencia de ovocitos y en cuyo caso se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

### **Análisis histológico y morfométrico**

Los ovarios de todos los ratones en los que no se observaron ovocitos en los oviductos se fijaron en solución de Bouin, se deshidrataron gradualmente en alcohol (70°, 100°), se pasaron a cloroformo y posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron

cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Se revisaron todos los cortes al microscopio para buscar cuerpos lúteos recién formados los cuales fueron contados y el número de éstos fue considerado como número de ovocitos liberados e incorporado a los resultados.

El análisis morfométrico de la población folicular se realizó en ambos ovarios de tres animales tomados al azar de los grupos que no presentaron ovulación (presencia de ovocitos en oviductos o cuerpos lúteos). En todos los cortes de cada ovario se contaron los folículos que presentaron ovocito con núcleo y nucléolo. Con la ayuda de un ocular micrométrico y siguiendo la metodología previamente descrita (García y col., 2000), en estos folículos se midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste para obtener el diámetro folicular promedio (Figura 12). Sólo se consideraron los folículos con diámetro promedio igual o mayor a 100  $\mu\text{m}$ . Los folículos se agruparon en dos rangos: pequeños con diámetro de 100  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$  y grandes con diámetro mayor de 300  $\mu\text{m}$ , que a su vez se clasificaron en normales y atrésicos. De acuerdo a los parámetros descritos por Hsueh y col. (1994) un folículo se consideró atrésico cuando presentó por lo menos una de las siguientes características: picnosis en las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa, alteraciones en el ovocito o engrosamiento de las capas de las tecas.

Para corroborar que la timulina o la solución salina se administraron en el hipotálamo, los cerebros de los ratones tratados fueron fijados en formol al 9% por 24 horas y cortados en un vibrátomo. Los cortes se revisaron en un microscopio estereoscopio y se analizó la trayectoria de la aguja. Sólo se consideraron los datos de los animales en los cuales la punta de la aguja cayó dentro del área correspondiente a cada región del hipotálamo (Figuras 9 y 10). Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se evidenció la inyección en la hipófisis por la presencia de un pequeño orificio en la duramadre como muestra de que la aguja penetró a la glándula (Weick y col., 1971).

### **Radioinmunoanálisis**

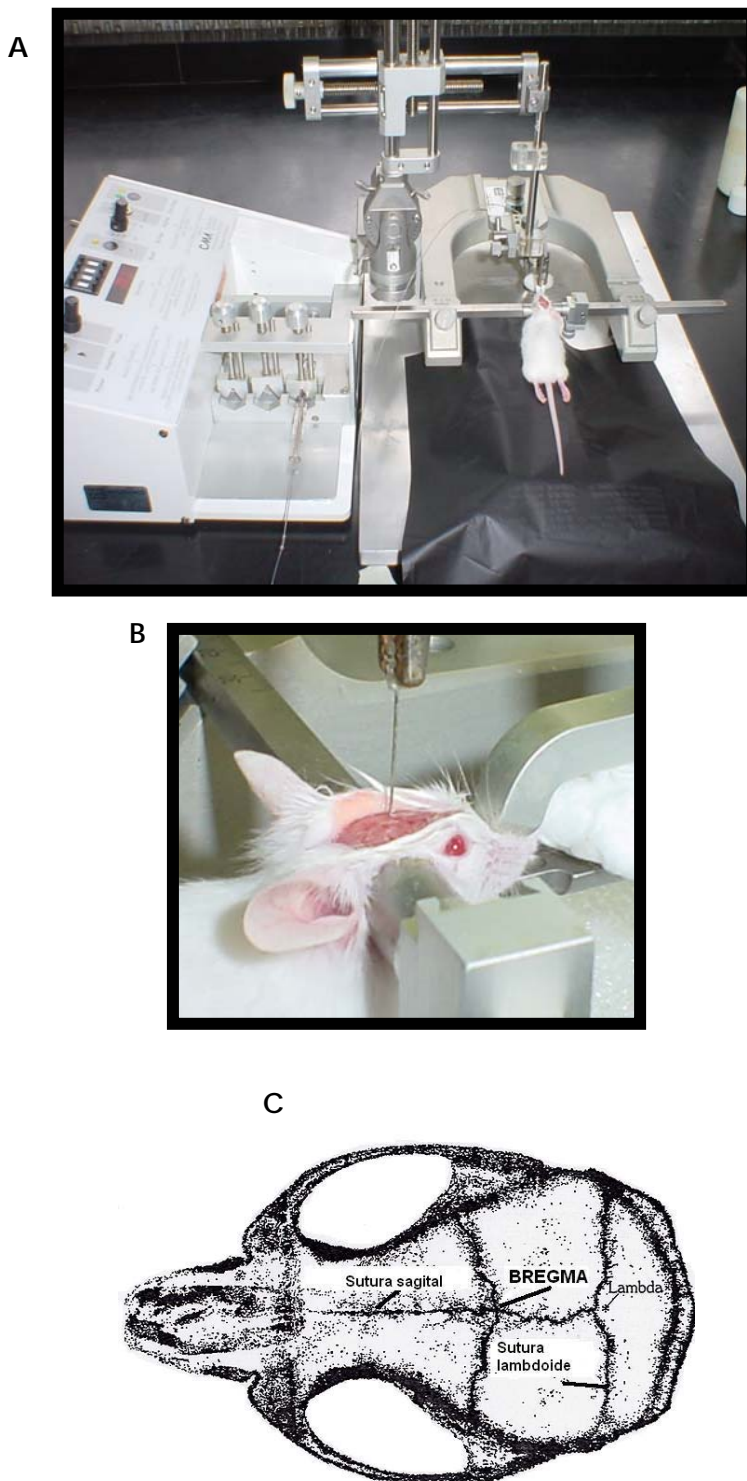
La concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero se midió por radioinmunoanálisis de fase sólida. Se utilizó un estuche comercial Coat-A-Count, el cual incluye tubos de polipropileno que contienen el anticuerpo específico para el esteroide, obtenido en de coneja, la hormona radiomarcada con  $^{125}\text{I}$  y estándares para realizar la curva patrón. En cada tubo se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de suero y 1000  $\mu\text{l}$  de la hormona marcada, se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantó el sobrenadante y las paredes de los tubos se secaron a temperatura ambiente. La medición de las cuentas por minuto se realizó en un contador de centelleo gamma. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 6.9 y 10.8, respectivamente. El límite de detección para el  $17\beta$ -estradiol fue 5 pg/ml.

### **Análisis estadístico**

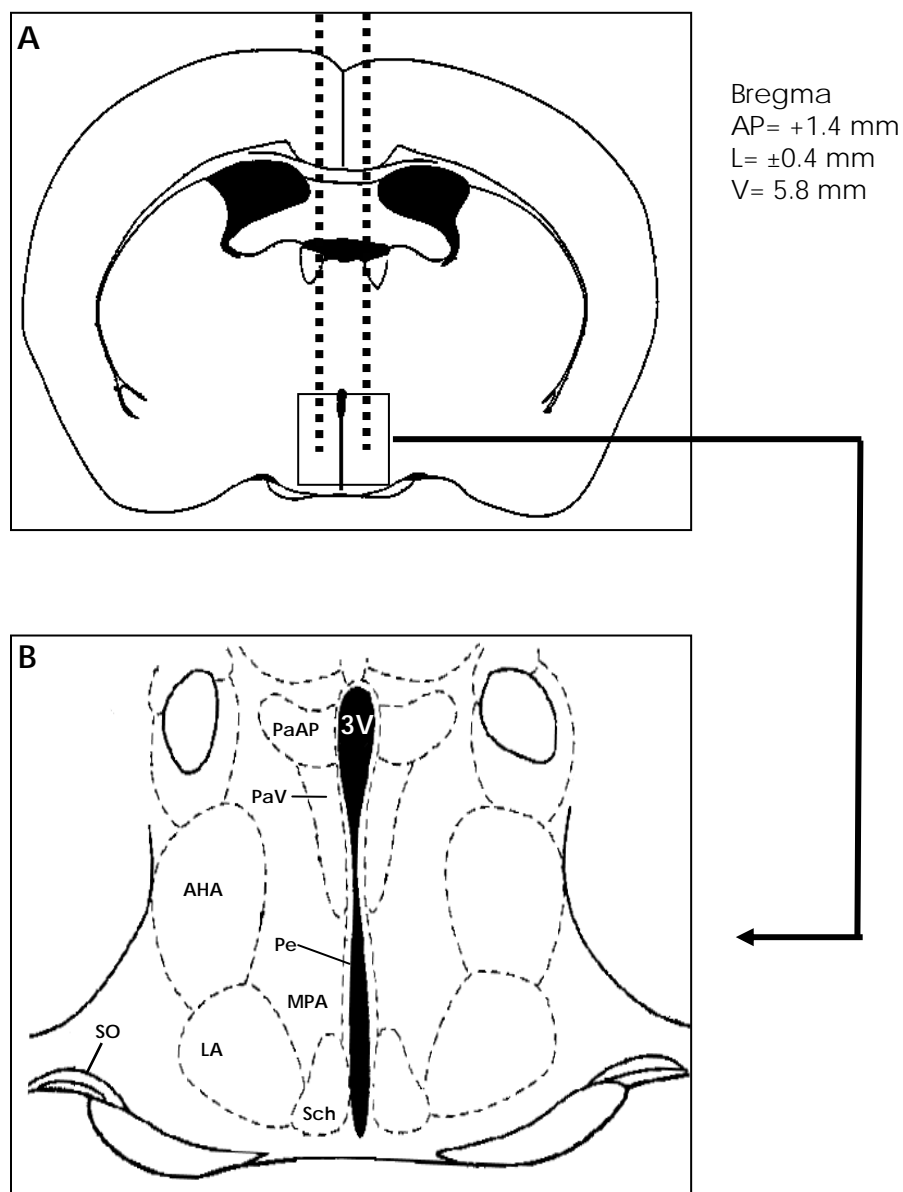
Los datos del peso corporal, del peso de los ovarios y el útero, el número de ovocitos liberados por animal que ovuló, la concentración de  $17\beta$ -estradiol y el número de folículos se analizaron con la prueba de  $t$  de Student (comparación entre dos grupos) o con la prueba de Análisis de Varianza, seguida de la de Tukey (comparación entre más de dos grupos). Los resultados de la tasa de animales ovulantes (TAO= Número de ratones que ovularon/ Número total de ratones tratados) se compararon con la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. El porcentaje de folículos atrésicos se analizó con la prueba de ji cuadrada. En todos los casos sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

### **Diseño experimental**

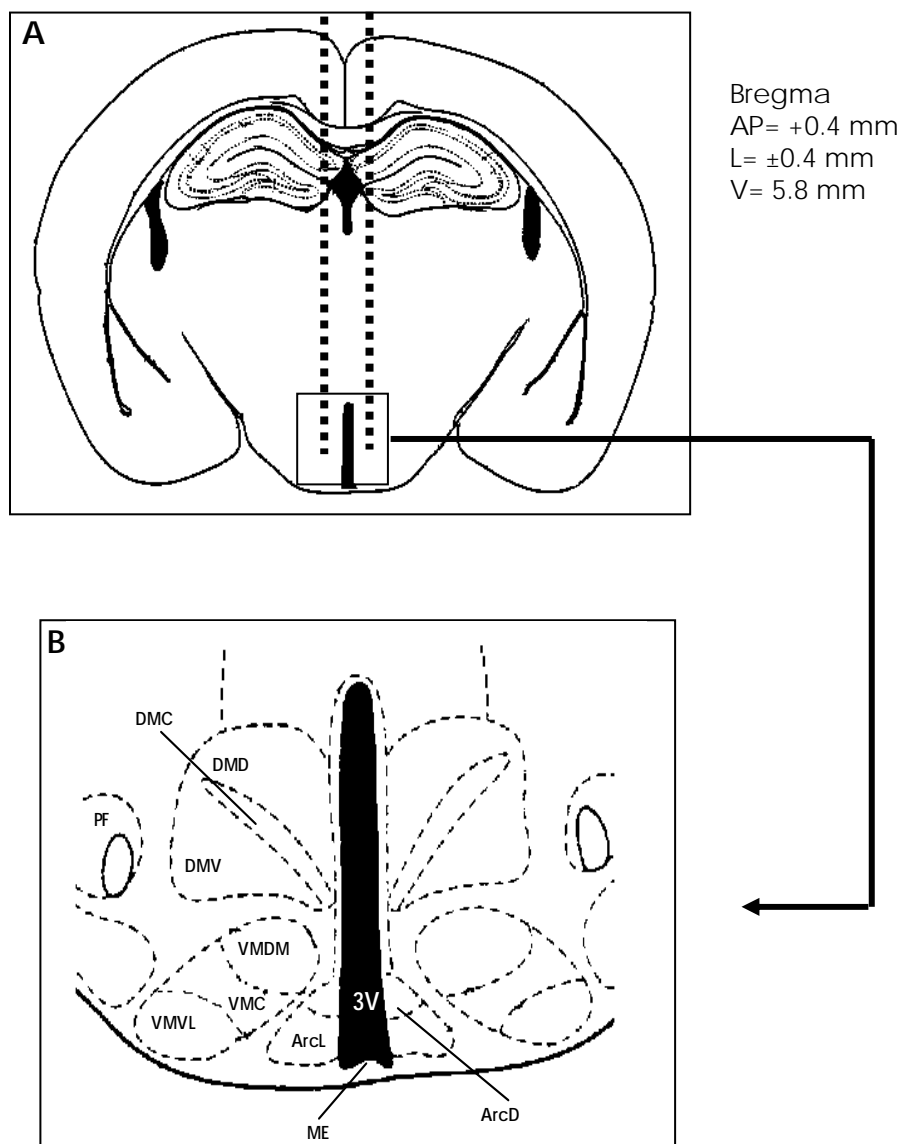
El diseño experimental se incluyó en la descripción de los resultados.



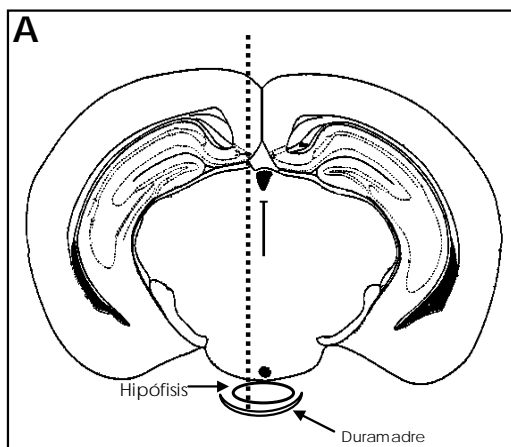
**Figura 8.** Fotografías que ilustran la metodología de la inyección intracerebral. A. Aparato estereotáxico y sistema de microinyección. B. Ratón montado en el aparato estereotáxico. C. Vista dorsal del cráneo donde se indica el punto de referencia Bregma (Franklin y Paxinos, 1997).



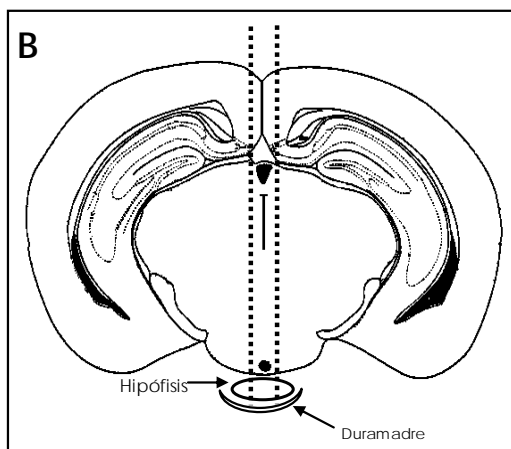
**Figura 9.** A. Esquema que muestra un corte coronal de cerebro de ratón donde se observa la trayectoria de la aguja hasta el área que corresponde al hipotálamo anterior. B. Áreas involucradas en la zona de la microinyección: hipotalámica anterior (AHA), preóptica medial (MPA), núcleos anterior lateral (LA), paraventricular anterior (PaAP), paraventricular ventral (PaV), periventricular (Pe), supraquiasmático (Sch), supraóptico (SO) y el tercer ventrículo (3V).



**Figura 10.** A. Esquema que muestra un corte coronal de cerebro de ratón donde se observa la trayectoria de la aguja hasta el área que corresponde al hipotálamo medio. B. Núcleos hipotalámicos involucrados en la zona de microinyección: dorsomedial compacto (DMC), dorsomedial difuso (DMD), dorsomedial ventral (DMV), ventromedial central (VMC), ventromedial dorsomedial (VMDM), ventromedial ventrolateral (VMVL), arcuato dorsal (AchD), arcuato lateral (AchL), perifornical (PF); la eminencia media (ME) y el tercer ventrículo (3V).

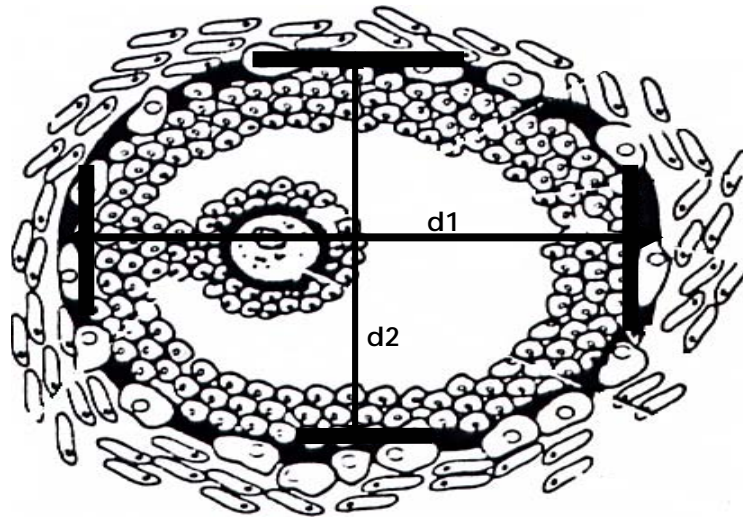


Bregma  
AP= -0.9 mm  
L= -0.2mm  
V= 7 mm



Bregma  
AP= -0.9 mm  
L=  $\pm 0.2$ mm  
V= 7 mm

**Figura 11.** A. Esquema que muestra un corte coronal de cerebro de ratón donde se observa la trayectoria de la aguja hasta la hipófisis cuando la inyección se realizó arribando por un lado del cerebro (unilateral). B. Se muestra cuando la inyección a la hipófisis se realizó arribando por ambos lados del cerebro (bilateral).



$$\text{Diámetro folicular promedio} = \frac{d1+d2}{2}$$

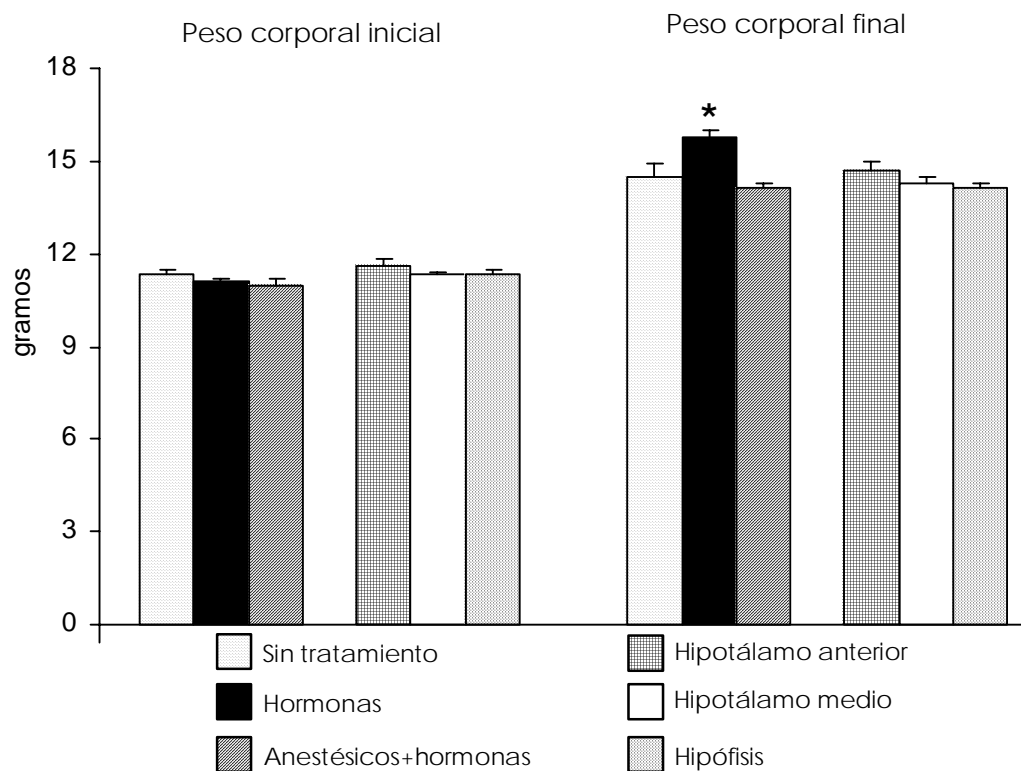
**Figura 12.** Esquema que muestra el diámetro mayor (d1) y el perpendicular a éste (d2) en un folículo preovulatorio.



## RESULTADOS

### 1. Análisis del peso corporal de los ratones prepúberes sometidos a diferentes tratamientos hormonales por vía sistémica e intracerebral.

En la figura 13 se muestra el peso corporal inicial y final de los ratones prepúberes de la cepa CD1 tratados con hormonas (GnRH o gonadotropinas), anestesiados (hidrato de cloral o éter) + hormonas, anestesiados que fueron inyectados con solución salina o timulina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis + hormonas, y sin tratamiento. El peso corporal inicial fue similar en todos los grupos experimentales. El peso final de los animales tratados únicamente con hormonas por vía sistémica alcanzaron un peso significativamente mayor.



**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal inicial y final de los ratones prepúberes sin tratamiento, tratados con hormonas, anestesiados y tratados con hormonas, o con inyección intracerebral (solución salina o timulina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis). \*  $p < 0.05$  vs. grupos sin tratamiento y con anestésicos más hormonas (ANDEVA seguida de Tukey).

## **2. Efectos de diversas dosis de eCG sobre la ovulación en ratones prepúberes de 20 días de edad.**

El ratón de la cepa CD1 presenta la apertura vaginal espontánea alrededor de los 25 días de edad y el primer estro vaginal no se acompaña de ovulación. En estos ratones el inicio de la pubertad y la primera ovulación se pueden adelantar por el tratamiento con gonadotropinas (García y col., 2000). Por ello se decidió analizar la respuesta ovulatoria de ratones prepúberes de 20 días ante la administración de diferentes concentraciones de eCG. Para evaluar los cambios en el peso de los ovarios y el útero se utilizaron ratones intactos sacrificados a la misma edad que los tratados con eCG (23 días).

### **Resultados**

Los ratones prepúberes sin tratamiento sacrificados a la edad de 23 días no presentaron apertura vaginal y no ovularon. En los grupos inyectados con eCG a los 20 días de edad, la apertura vaginal se observó a las 48 horas después del tratamiento y el primer estro vaginal 24-48 h después. Los animales inyectados con 0.5 u.i. de eCG no ovularon, mientras que los tratados con 1.0 ó 2.0 u.i. de eCG la ovulación se produjo en el 50 y 66 % de los ratones inyectados, respectivamente. Todas las hembras que recibieron 2.5 u.i. de eCG ovularon. El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue similar entre los grupos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal, del primer estro vaginal y del número de ovocitos liberados de ratones tratados con diferentes dosis de eCG a los 20 días de edad sacrificados el día del primer estro vaginal y de ratones sin tratamiento sacrificados a los 23 días de edad.

Dosis de eCG	n	Apertura vaginal	Primer estro vaginal ♣	TAO	Número de ovocitos
0	15	---	---	0/15	0
0.5	12	22.1 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	0/12	0
1.0	12	22.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	6/12*	9.0 $\pm$ 1.4
2.0	6	22.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	4/6 *	7.8 $\pm$ 2.3
2.5	12	22.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	12/12*	11.9 $\pm$ 0.7

♣ días posteriores a la apertura vaginal

\*  $p < 0.05$  vs. Sin tratamiento y 0.5 u.i. eCG (prueba exacta de Fisher para proporciones)

El peso de los ovarios de los ratones inyectados con 1.0 y 2.0 u.i. de eCG fue mayor al de los tratados con 0.5 u.i. de eCG y el peso de los ovarios de los ratones inyectados con 2.5 u.i. fue mayor al del grupo sin tratamiento y al de los tratados con 0.5 u.i. de eCG. El peso del útero de los animales inyectados con la hormona fue significativamente mayor que el de los ratones sin tratamiento (Tabla 4).

La concentración de  $17\beta$ -estradiol en suero de los ratones tratados con 0.5 y 1.0 u.i. de eCG fue similar a la de los ratones sin tratamiento, mientras que la de los animales inyectados con 2.0 o 2.5 u.i de eCG fue mayor, aunque esta diferencia no fue significativa debido a la dispersión de los datos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones tratados con diferentes dosis de eCG a los 20 días de edad sacrificados el día del primer estro vaginal y de ratones sin tratamiento, sacrificados a los 23 días de edad.

Dosis de eCG (u.i.)	n	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
0	15	10.0 $\pm$ 0.4	26.9 $\pm$ 1.6	3.9 $\pm$ 0.7
0.5	12	9.3 $\pm$ 0.6	41.3 $\pm$ 1.5 a	4.4 $\pm$ 1.3
1.0	12	11.5 $\pm$ 1.0 b	92.6 $\pm$ 5.8 a,b	5.6 $\pm$ 0.4
2.0	6	12.1 $\pm$ 0.6 b	82.2 $\pm$ 10.7 a,b	9.2 $\pm$ 1.3
2.5	12	13.9 $\pm$ 0.7 a,b	96.5 $\pm$ 2.3 a,b	11.2 $\pm$ 4.6

a,  $p < 0.05$  vs. sin eCG (ANDEVA, seguida de Tukey)

b,  $p < 0.05$  vs. 0.5 u.i. eCG (ANDEVA, seguida de Tukey)

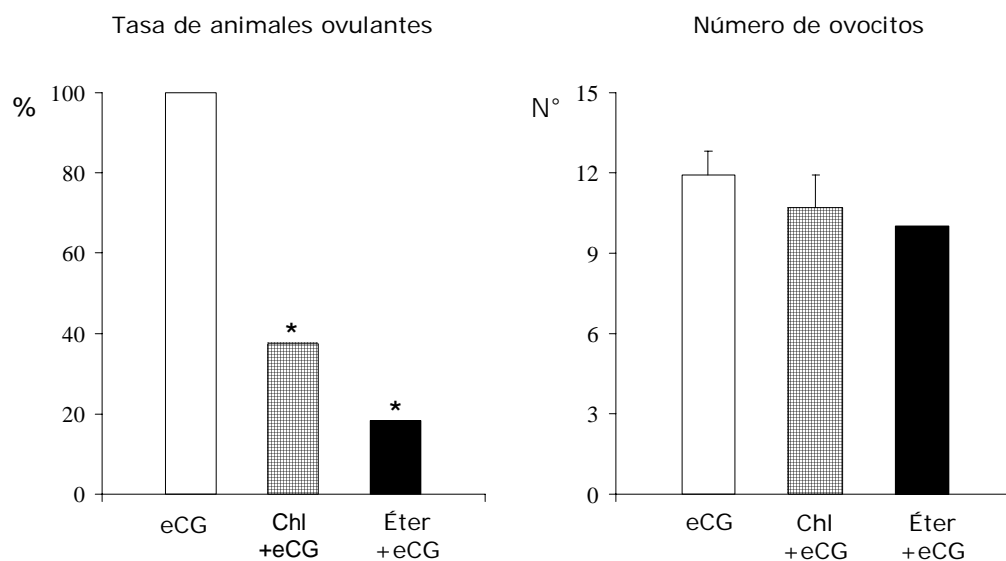
Para analizar si los ratones tratados con 0.5 u.i. de eCG no ovularon por la falta del incremento preovulatorio de LH, ratones inyectados con 0.5 u.i. de eCG se les administraron 3 u.i de hCG 54 horas después de la inyección de eCG y se sacrificaron 18 horas más tarde. Todos los ratones inyectados con eCG+hCG ovularon (5/5) y liberaron un promedio de cuatro ovocitos ( $4.4 \pm 1.4$ ). El peso de los ovarios y el útero fue significativamente mayor que el de los animales que sólo recibieron la eCG (ovarios  $12.4 \pm 0.5$  vs.  $9.3 \pm 0.6$ ; útero  $50.6 \pm 2.9$  vs.  $41.3 \pm 1.5$ , mg  $p < 0.05$ ), la concentración de  $17\beta$ -estradiol no mostró diferencia significativa en ambos grupos ( $6.8 \pm 1.9$  vs.  $4.4 \pm 1.3$ , pg/ml).

### **3. Efectos de la anestesia con hidrato de cloral o con éter sobre la respuesta ovulatoria inducida con 2.5 u.i. de eCG en el ratón prepúber.**

Para realizar la inyección de timulina en el cerebro se requirió que los ratones fueran anestesiados. En la bibliografía está bien documentado que el pentobarbital sódico, uno de los anestésicos generales más utilizados, bloquea el incremento preovulatorio de LH (Kim y col. 1994; Kimura y Sano, 1995) y la ovulación en ratas adultas (Dominguez y Smith, 1974; Kim y col. 1994), así como en ratas prepúberes tratadas con eCG (Sorrentino, 1979). Sin embargo, poco se sabe de los efectos que ejercen otro tipo de anestésicos sobre la ovulación inducida en animales prepúberes. Por eso se decidió analizar el efecto que tienen el hidrato de cloral y el éter, dos anestésicos ampliamente utilizados en este tipo de manipulaciones quirúrgicas, sobre la ovulación inducida con 2.5 u.i. de eCG (concentración de gonadotropina que induce la ovulación en el 100% de los animales) en el ratón prepúber. Para ello, ratones hembra de 19 días de edad fueron anestesiados con hidrato de cloral o con éter y al día siguiente recibieron 2.5 u.i. de eCG. Se sacrificaron 72 h después de administrar la gonadotropina.

#### **Resultados**

La anestesia con hidrato de cloral o con éter bloqueó significativamente la ovulación inducida con eCG. No se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados por los animales anestesiados que llegaron a ovular (Figura 14).



**Figura 14.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl, 400 mg/Kg) o con éter y tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días y de ratones inyectados sólo con eCG.

\*  $p < 0.05$  vs. eCG (Prueba exacta de Fisher para proporciones).

En la tabla 5 se muestran los resultados del peso de los ovarios y el útero y la concentración de estradiol de los animales anestesiados con hidrato de cloral o éter, e inyectados con 2.5 u.i. de eCG. El peso de los ovarios de los animales anestesiados con hidrato de cloral o con éter no mostró diferencias significativas. Los ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter un día antes de la administración de eCG presentaron menor peso del útero. La concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero de las hembras anestesiadas con éter e inyectadas con eCG fue mayor que el de las anestesiadas con hidrato de cloral.

**Tabla 5.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o éter a los 19 días de edad y tratados a los 20 días con 2.5 u.i. de eCG y de ratones inyectados sólo con eCG.

Grupos	n	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
eCG	12	13.9 $\pm$ 0.7	96.5 $\pm$ 2.3	11.2 $\pm$ 4.6
Chl+eCG	16	12.2 $\pm$ 0.4	71.2 $\pm$ 3.5 a	6.8 $\pm$ 0.7
Éter+eCG	11	13.1 $\pm$ 0.7	82.5 $\pm$ 4.5 a	16.5 $\pm$ 2.6 b

a,  $p < 0.05$  vs. eCG (prueba de *t* de Student)

b,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG (prueba de *t* de Student)

#### 4. Efectos de la administración de GnRH o hCG sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter y tratados con 2.5 u.i. de eCG.

En ratas prepúberes tratadas con eCG el pentobarbital sódico inhibe la liberación de LH y la ovulación, la cual se restablece por la inyección de GnRH (Sorrentino, 1979). Con el objeto de analizar si la falta de ovulación en los animales anestesiados con hidrato de cloral o éter y tratados con eCG se debe a un bloqueo en la secreción preovulatoria de GnRH o a la falta de respuesta del ovario a las gonadotropinas, ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter fueron inyectados con GnRH (7.4  $\mu$ g/Kg) 48 h después de la administración de eCG o hCG (3 u.i.) 54 h después de la eCG. Como grupos de comparación se utilizaron ratones inyectados con eCG+GnRH o eCG+hCG. Los animales se sacrificaron 72 h después de la inyección de eCG.

#### Resultados

En la tabla 6 se muestran los resultados de la inyección de GnRH o hCG en los animales sin anestésico y tratados con eCG. El tratamiento con GnRH o hCG no modificó la tasa de animales ovulantes. El número de ovocitos liberados fue similar al de los animales

que sólo recibieron eCG. El peso de los ovarios de los ratones tratados con eCG+GnRH o con eCG+hCG fue similar al de los tratados con eCG, mientras que el peso del útero de los ratones inyectados con GnRH o con hCG fue menor al de los ratones inyectados sólo con eCG. La concentración de 17 $\beta$ -estradiol en el suero de los ratones inyectados con eCG+GnRH o eCG+hCG no mostró diferencia significativa al de los tratados sólo con eCG. La concentración 17 $\beta$ -estradiol en el suero de los animales inyectados con eCG+hCG fue menor que en los inyectados con GnRH.

**Tabla 6.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones intactos tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad y de ratones tratados con eCG más GnRH (7.4  $\mu$ g/kg) o hCG (3 u.i.) 48 y 54 h después de administrar la gonadotropina, respectivamente.

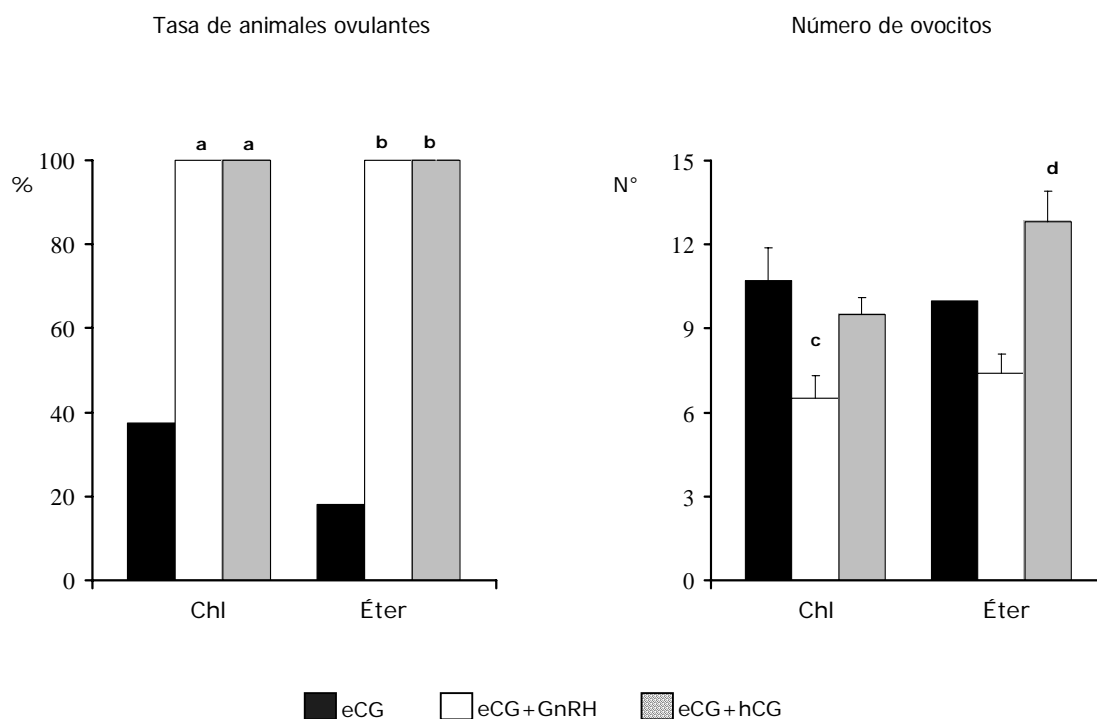
Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	17 $\beta$ -estradiol
eCG	12	12/12	11.9 $\pm$ 0.7	13.9 $\pm$ 0.7	96.5 $\pm$ 2.3	11.2 $\pm$ 4.6
eCG+GnRH	6	5/6	11.0 $\pm$ 1.4	13.8 $\pm$ 0.8	62.5 $\pm$ 4.2 a	11.6 $\pm$ 1.6
eCG+hCG	9	9/9	11.5 $\pm$ 1.0	13.9 $\pm$ 0.5	63.9 $\pm$ 4.2 a	5.3 $\pm$ 0.8 b

a,  $p < 0.05$  vs. eCG (prueba de  $t$  de Student)

b,  $p < 0.05$  vs. eCG+GnRH (prueba de  $t$  de Student)

Cuando los animales se anestesiaron con hidrato de cloral o con éter 24 h antes del tratamiento con eCG, la administración de GnRH o hCG restableció la ovulación. El número de ovocitos liberados por los animales anestesiados con hidrato de cloral e inyectados con GnRH fue significativamente menor que en el grupo tratado con eCG. En los ratones anestesiados con éter y tratados con hCG el número de ovocitos liberados fue mayor que en los inyectados con GnRH (Figura 15).





**Figura 15.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl, 400 mg/Kg ) o con éter y tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días o con eCG+GnRH (7.4  $\mu$ g/Kg) o eCG+hCG (3 u.i.). **a**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG, **b**,  $p < 0.05$  vs. Éter+eCG (prueba exacta de Fisher para proporciones), **c**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG, **d**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG+GnRH (prueba de *t* de Student).

El peso de los ovarios de los ratones anestesiados con hidrato de cloral y tratados con eCG+GnRH o eCG+hCG fue similar al de los anestesiados y tratados con eCG. El peso del útero de los ratones tratados con eCG+GnRH fue menor al de los tratados con Chl+eCG. El peso del útero de las hembras que recibieron eCG+hCG fue mayor al de los tratados sólo con eCG o con eCG+nRH. La concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero de los animales inyectados con eCG+GnRH o eCG+hCG no mostró diferencias significativas (Tabla 7).

En los animales anestesiados con éter el peso de los ovarios de los animales inyectados con eCG+GnRH fue menor al de los tratados con eCG o eCG+hCG. El peso del útero de los animales tratados con eCG+hCG fue menor al de los tratados con eCG. La concentración 17 $\beta$ -estradiol en el suero de los animales que recibieron eCG+hCG fue menor al de los tratados con eCG y eCG+GnRH (Tabla 7).

**Tabla 7.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o con éter a los 19 días de edad e inyectados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad, y tratados o no con GnRH (7.4  $\mu$ g/kg) o hCG (3 u.i.).

Grupos	n	Peso de los ovarios	Peso del útero	17 $\beta$ -estradiol
<b>Chl+eCG</b>	16	12.2 $\pm$ 0.4	71.2 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 0.7
<b>Chl+eCG+GnRH</b>	6	11.0 $\pm$ 0.7	51.3 $\pm$ 1.8 <b>a</b>	10.0 $\pm$ 2.0
<b>Chl+eCG+hCG</b>	6	10.9 $\pm$ 0.5	90.0 $\pm$ 4.4 <b>a,b</b>	6.5 $\pm$ 1.1
<b>Éter+eCG</b>	11	13.1 $\pm$ 0.7	82.5 $\pm$ 4.5	16.5 $\pm$ 2.6
<b>Éter+eCG +GnRH</b>	5	8.2 $\pm$ 0.5 <b>c</b>	69.1 $\pm$ 2.6	12.8 $\pm$ 2.0
<b>Éter+eCG +hCG</b>	9	12.3 $\pm$ 0.9 <b>d</b>	63.8 $\pm$ 3.3 <b>c</b>	5.6 $\pm$ 0.5 <b>c,d</b>

**a**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG (prueba de  $t$  de Student)

**b**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG+GnRH (prueba de  $t$  de Student)

**c**,  $p < 0.05$  vs. Éter+eCG (prueba de  $t$  de Student)

**d**,  $p < 0.05$  vs. Éter+eCG+GnRH (prueba de  $t$  de Student)

Estos resultados indican que el bloqueo en la ovulación observado por la anestesia con hidrato de cloral o éter se debe a la falta del incremento preovulatorio de GnRH y como consecuencia el de LH. La anestesia con hidrato de cloral o éter al parecer no afecta la respuesta de la hipófisis a la GnRH ni la del ovario a las gonadotropinas.

**5. Efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo anterior o medio sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter y tratados con eCG.**

Con el fin de analizar si la timulina incide sobre la ovulación por su acción a nivel hipotalámico, se utilizaron ratones hembras de 19 días de edad que fueron anestesiados con hidrato de cloral o con éter y se les inyectó timulina o solución salina en el hipotálamo anterior o medio. En el día 20 todos los animales recibieron 2.5 u.i. de eCG. Los animales se sacrificaron 72 h después de la inyección de la gonadotropina.

**Resultados**

La inyección de solución salina en el hipotálamo anterior o medio no modificó el bloqueo de la ovulación observada en los ratones anestesiados con hidrato de cloral (Tabla 8).

El peso de los ovarios de los ratones inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior o medio fue menor al de los animales sólo anestesiados. El peso del útero de los ratones inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior fue mayor al de los anestesiados; mientras que en los animales inyectados en el hipotálamo medio fue menor al de los anestesiados y al de los ratones tratados en el hipotálamo anterior. La inyección de solución salina en el hipotálamo anterior o medio no modificó la concentración de estradiol en suero (Tabla 8).

**Tabla 8.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) e inyectados o no con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo anterior (HA) o medio (HM), tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG.

Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
<b>Chl+eCG</b>	16	6/16	10.7 $\pm$ 1.2	12.2 $\pm$ 0.4	71.2 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 0.7
<b>Chl+SS<sup>(HA)</sup>+eCG</b>	4	0/4	0	8.9 $\pm$ 0.2 a	95.2 $\pm$ 5.5 a	6.6 $\pm$ 1.4
<b>Chl+SS<sup>(HM)</sup>+eCG</b>	9	0/9	0	10.1 $\pm$ 0.8 a	59.0 $\pm$ 4.2 a,b	5.2 $\pm$ 0.1

a,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG (prueba de *t* de Student)

b,  $p < 0.05$  vs. Chl+SS(HA)+eCG (prueba de *t* de Student)

La inyección de solución salina en el hipotálamo anterior o medio no modificó el bloqueo de la ovulación observada en los ratones anestesiados con éter (Tabla 9).

El peso de los ovarios de los animales inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior fue menor al de los anestesiados con éter y al de los inyectados con solución salina en el hipotálamo medio. El peso del útero de los animales inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior o medio fue similar al del grupo anestesiado. En los animales inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior se observó una menor concentración de estradiol que en el grupo de animales anestesiados (Tabla 9).

**Tabla 9.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con éter e inyectados o no con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo anterior (HA) o medio (HM), tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG.

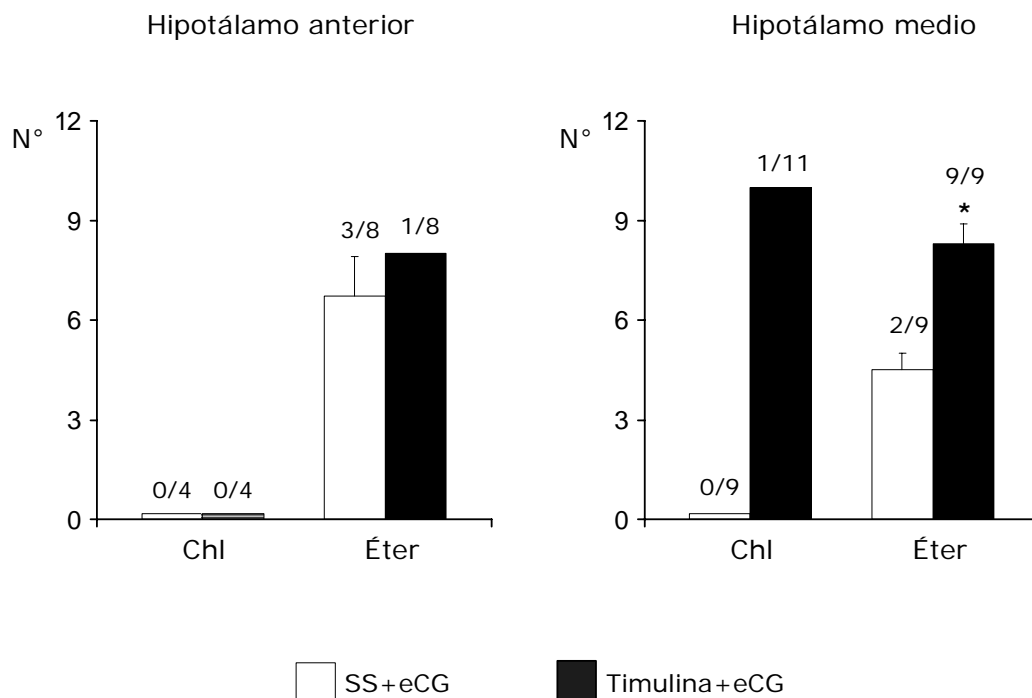
Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
Éter+eCG	11	2/11	10, 10	13.1 $\pm$ 0.7	82.5 $\pm$ 4.5	16.5 $\pm$ 2.6
Éter+SS <sup>(HA)</sup> +eCG	8	3/8	6.7 $\pm$ 1.2	10.1 $\pm$ 0.7 <b>a</b>	89.2 $\pm$ 7.4	10.6 $\pm$ 0.7 <b>a</b>
Éter+SS <sup>(HM)</sup> +eCG	9	2/9	4.5 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 1.2 <b>b</b>	82.5 $\pm$ 5.5	11.6 $\pm$ 1.1

**a,**  $p < 0.05$  vs. Éter+eCG (prueba de *t* de Student)

**b,**  $p < 0.05$  vs. Éter+SS<sup>(HA)</sup>+eCG (prueba de *t* de Student)

La inyección de timulina en el hipotálamo anterior no modificó el bloqueo de la ovulación producida por la anestesia con hidrato de cloral o éter (Figura 16).

En los ratones que fueron anestesiados con hidrato de cloral, la inyección de timulina en el hipotálamo medio no modificó el bloqueo en la ovulación. En cambio, en los ratones anestesiados con éter la inyección de timulina en el hipotálamo medio restableció la ovulación en todos los animales (9/9 vs. 2/9,  $p < 0.05$ ) y el número de ovocitos que liberaron fue mayor que los tratados con solución salina (Figura 16).



**Figura 16.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o éter e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) o con timulina (1 pg/0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo anterior o medio y tratados con 2.5 u.i. de eCG, los ratones fueron sacrificados 72 h después de la administración de eCG. \*  $p < 0.05$  vs. Éter+SS+eCG (prueba de  $t$  de Student).

El peso de los ovarios y del útero y la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en el suero de los ratones que recibieron timulina en el hipotálamo anterior fueron similares al de los que se les inyectó solución salina, tanto los anestesiados con hidrato de cloral o éter (Tabla 10).

En comparación al tratamiento con solución salina, la inyección de timulina en el hipotálamo medio no indujo cambios en el peso corporal o de los ovarios ni en la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en el suero, independientemente del anestésico utilizado. Sólo el peso del útero de los animales inyectados con timulina en el hipotálamo medio, anestesiados con hidrato de cloral, fue mayor al de los ratones inyectados con solución salina (Tabla 10).

**Tabla 10.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o con éter e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) o timulina (1pg/0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo medio y tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG.

Grupos	n	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
<i>Hipotálamo anterior</i>				
<b>Chl+SS+eCG</b>	4	8.9 $\pm$ 0.2	95.2 $\pm$ 5.5	6.6 $\pm$ 1.4
<b>Chl+Timulina +eCG</b>	4	8.2 $\pm$ 0.8	01.9 $\pm$ 6.9	5.8 $\pm$ 0.8
<b>Éter+SS+eCG</b>	8	10.1 $\pm$ 0.7	89.2 $\pm$ 7.4	10.7 $\pm$ 0.8
<b>Éter+Timulina +eCG</b>	8	8.5 $\pm$ 0.3	90.0 $\pm$ 4.4	7.9 $\pm$ 1.0
<i>Hipotálamo medio</i>				
<b>Chl+SS+eCG</b>	9	10.1 $\pm$ 0.8	59.0 $\pm$ 4.2	5.2 $\pm$ 0.1
<b>Chl+Timulina +eCG</b>	11	10.5 $\pm$ 0.8	82.5 $\pm$ 3.5 *	6.2 $\pm$ 1.4
<b>Éter+SS+eCG</b>	9	13.5 $\pm$ 1.2	82.5 $\pm$ 5.5	11.6 $\pm$ 1.1
<b>Éter+Timulina +eCG</b>	9	13.2 $\pm$ 0.9	76.5 $\pm$ 3.2	10.2 $\pm$ 1.7

\*  $p < 0.05$  vs. Chl+SS+eCG (prueba de  $t$  de Student)

Los resultados anteriores nos permiten sugerir que:

- La inyección de timulina en el hipotálamo medio de los animales anestesiados con éter provocó la liberación de GnRH y por ello la ovulación, lo que significa que timulina participa en los mecanismos que regulan la liberación de la GnRH pero no en aquellos que estimulan su síntesis.
- Los efectos de la timulina sobre la respuesta ovulatoria son enmascarados por el hidrato de cloral pero no así por el éter.

**6. Efectos del reemplazo de GnRH en ratones anestesiados con hidrato de cloral y con microinyección de timulina en el hipotálamo medio, sobre la respuesta ovulatoria.**

Dado que en los ratones anestesiados con hidrato de cloral la inyección de timulina en el hipotálamo medio no restablece la ovulación se decidió analizar los efectos del reemplazo de la señal hipotalámica (GnRH) en estos animales, sobre la respuesta ovulatoria. Para ello ratones anestesiados con hidrato de cloral e inyectados con solución salina o timulina en el hipotálamo medio se les inyectó GnRH (7.4 µg/Kg) 48 h después de la administración de eCG (2.5 u.i; 20 días de edad). Los animales se sacrificaron 24 h después del tratamiento con GnRH.

**Resultados**

No se observaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes entre los ratones inyectados con solución salina o timulina en el hipotálamo medio, pero el número de ovocitos liberados fue mayor en los ratones inyectados con timulina. El peso de los ovarios y del útero así como la concentración de 17β-estradiol, fueron mayores en los animales inyectados con timulina que en los tratados con solución salina (Tabla 11).



**Tabla 11.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones intactos de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) o timulina (1 pg/0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo medio y tratados con eCG (2.5. u.i.) + GnRH (7.4  $\mu$ g/Kg).

Grupos	Chl+SS +eCG+GnRH	Chl+Timulina +eCG+GnRH
<b>Número de animales</b>	7	8
<b>Tasa de animales ovulantes</b>	6/7	7/8
<b>Número de ovocitos</b>	6.2 $\pm$ 1.0	10.4 $\pm$ 0.6 *
<b>Peso de los ovarios</b>	9.8 $\pm$ 0.8	14.2 $\pm$ 0.7 *
<b>Peso del útero</b>	53.1 $\pm$ 1.5	70.0 $\pm$ 6.2 *
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	7.3 $\pm$ 1.1	13.4 $\pm$ 0.1 *

\*  $p < 0.05$  (prueba de  $t$  de Student)

A partir de estos resultados sugerimos que la presencia de timulina en el hipotálamo medio desde los 19 días de edad estimuló la secreción tónica de FSH lo que favorece que un mayor número de folículos alcancen la etapa preovulatoria y ovulen en respuesta a la inyección de GnRH. Otra posibilidad es que la timulina potencie el efecto de la GnRH en la hipófisis.

### 7. Efectos de la microinyección de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en los ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter y tratados con eCG.

Existen evidencias experimentales en modelos *in vitro* que muestran que la timulina tiene un efecto estimulante sobre la secreción de gonadotropinas (Zaidi et al., 1988, Hadley et al., 1997, Brown et al., 2000, Hinojosa et al., 2004). Para analizar si timulina actúa en la hipófisis como se propuso anteriormente, a ratones hembras de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral o éter, se les inyectó timulina o solución salina en la

hipófisis (unilateral). En el día 20 los animales fueron tratados con 2.5 u.i. de eCG y sacrificaron 72 horas después de administrar la gonadotropina.

## Resultados

La inyección de solución salina en la hipófisis no modificó el bloqueo de la ovulación observado por la anestesia con hidrato de cloral o éter (Tabla 12).

En los ratones anestesiados con hidrato de cloral e inyectados con solución salina en la hipófisis el peso de los ovarios fue mayor y el del útero menor que el de los animales que sólo fueron anestesiados, mientras que la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en el suero fue similar (Tabla 12).

El peso de los ovarios y la concentración de 17 $\beta$ -estradiol de los ratones inyectados con solución salina en la hipófisis fueron menores que en los anestesiados con éter, en cambio el peso del útero fue similar (Tabla 12).

**Tabla 12.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl) o con éter a los 19 días de edad e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l/) o timulina (1pg/0.3 $\mu$ l/) en la hipófisis, tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG y sacrificados 72 h después del estímulo gonadotrópico.

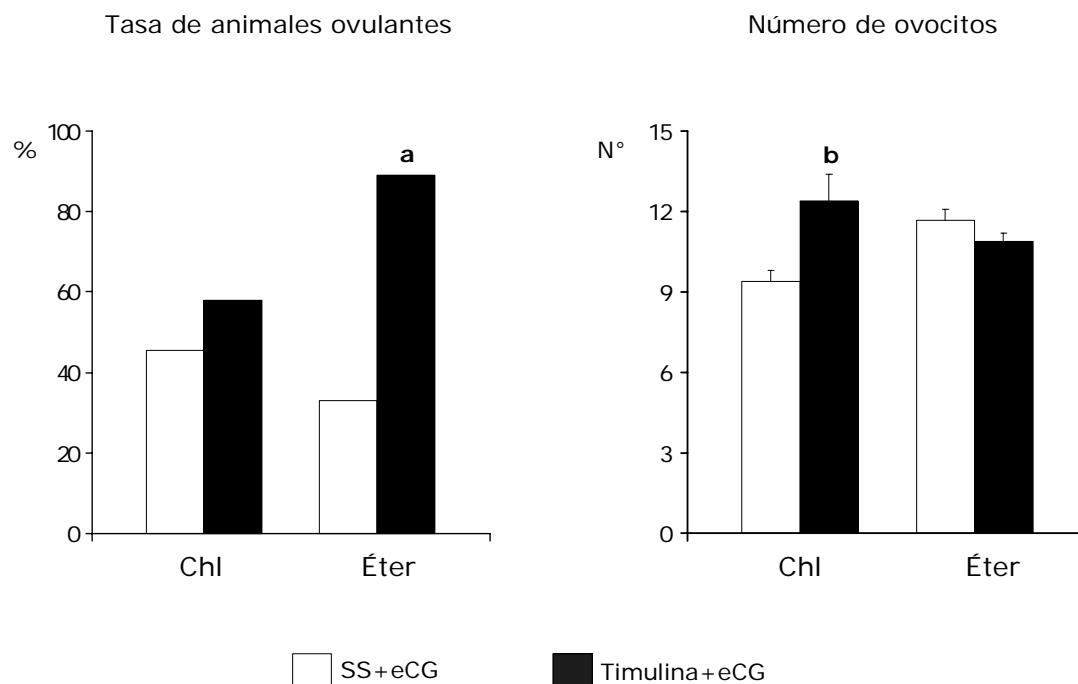
Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	17 $\beta$ -estradiol
Chl+eCG	16	6/16	10.7 $\pm$ 1.2	12.2 $\pm$ 0.4	71.2 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 0.7
Chl+SS+eCG	11	5/11	9.4 $\pm$ 0.4	13.5 $\pm$ 0.4 <b>a</b>	59.0 $\pm$ 4.2 <b>a</b>	7.8 $\pm$ 1.8
Éter+eCG	11	2/11	10,10	13.1 $\pm$ 0.7	82.5 $\pm$ 4.5	16.5 $\pm$ 2.6
Éter+SS+eCG	9	3/9	11.7 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.4 <b>b</b>	87.7 $\pm$ 2.7	8.9 $\pm$ 0.9 <b>b</b>

**a**,  $p < 0.05$  vs. Chl+eCG (prueba de *t* de Student)

**b**,  $p < 0.05$  vs. Éter+eCG (prueba de *t* de Student)

El 58% de animales anestesiados con hidrato de cloral e inyectados con timulina en la hipófisis ovularon, respuesta similar a los inyectados con solución salina. Sin embargo, el número de ovocitos liberados por los animales inyectados con timulina fue mayor que los inyectados con solución salina (Figura 17).

La mayoría de los ratones anestesiados con éter e inyectados con timulina en la hipófisis, ovularon y esta respuesta fue significativamente mayor a la observada en las hembras tratadas con solución salina. El número de ovocitos liberados fue similar en ambos grupos (Figura 17).



**Figura 17.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o con éter e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) o timulina (1pg/0.3 $\mu$ l) en la hipófisis y tratados con 2.5 u.i. de eCG, los ratones fueron sacrificados 72h después de la administración de eCG.

**a,**  $p < 0.05$  vs. SS+eCG correspondiente (prueba exacta de Fisher para proporciones).

**b,**  $p < 0.05$  vs. SS+eCG correspondiente (prueba de  $t$  de Student).

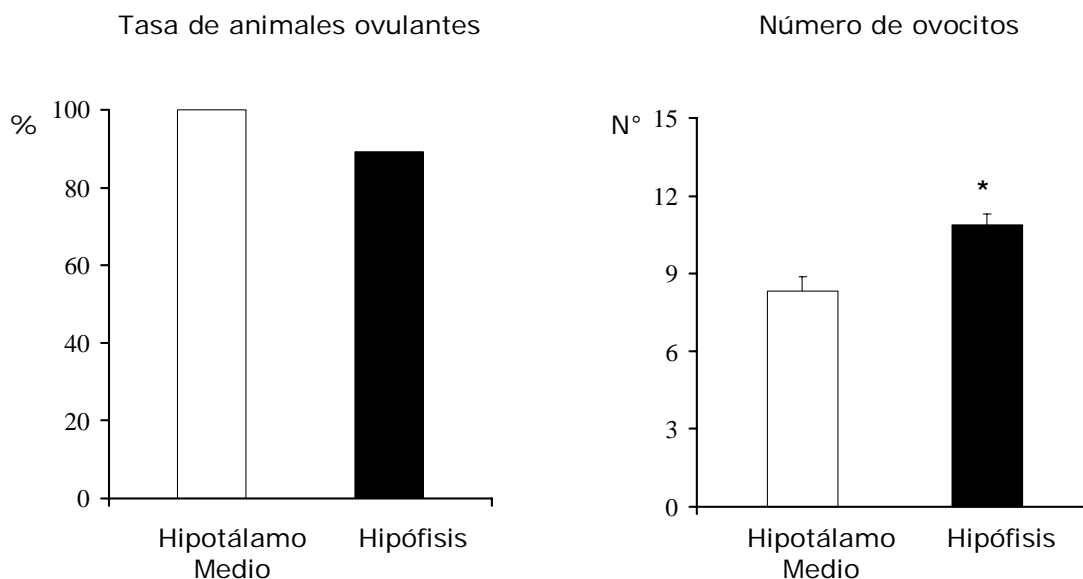
En comparación con el grupo anestesiado con hidrato de cloral que recibió solución salina en la hipófisis, en los ratones inyectados con timulina el peso del útero fue mayor y el de los ovarios menor. En los animales anestesiados con éter y tratados con timulina estos parámetros fueron similares al de los inyectados con solución salina. En los ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter, la concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero no se modificó por la inyección de timulina en la hipófisis (Tabla 13).

**Tabla 13.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) o con éter a los 19 días de edad e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l/) o timulina (1pg/0.3 $\mu$ l/) en la hipófisis, tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG.

Grupos	n	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
<b>Chl+SS+eCG</b>	11	13.5 $\pm$ 0.4	59.0 $\pm$ 4.2	7.8 $\pm$ 1.8
<b>Chl+Timulina +eCG</b>	12	12.3 $\pm$ 0.4 *	85.6 $\pm$ 3.8 *	8.8 $\pm$ 2.6
<b>Éter+SS+eCG</b>	9	8.7 $\pm$ 0.4	87.7 $\pm$ 2.7	8.9 $\pm$ 0.9
<b>Éter+Timulina +eCG</b>	9	9.5 $\pm$ 0.4	81.7 $\pm$ 4.4	9.9 $\pm$ 0.4

\*  $p < 0.05$  vs. Chl+SS+eCG (prueba de t de Student)

El análisis comparativo del efecto que tiene la administración de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis en ratones anestesiados con éter, mostró que en ambos casos la timulina es capaz de revertir el bloqueo en la ovulación ejercido por el anestésico ya que el número de animales que ovularon fue similar en ambos grupos experimentales (9/9 vs. 8/9), sin embargo las hembras que recibieron timulina en la hipófisis liberaron un mayor número de ovocitos (Figura 18).



**Figura 18.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones anestesiados con éter e inyectados con timulina (1pg/0.3 $\mu$ l) en el hipotálamo medio o en la hipófisis y tratados con 2.5 u.i. de eCG. \*  $p < 0.05$  (prueba de  $t$  de Student)

Lo anterior nos indica que la timulina además de ser necesaria en el hipotálamo para inducir la secreción preovulatoria de GnRH, también es importante que actúe directamente en la hipófisis donde podría estimular la secreción tónica de FSH y LH necesarias para inducir una cuota ovulatoria normal como sucede al inyectar sólo eCG.

#### 8. Efectos de la microinyección de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en los ratones anestesiados con hidrato de cloral y tratados con eCG más GnRH.

Puesto que en ratones anestesiados con hidrato de cloral la administración de timulina en la hipófisis no modificó el bloqueo en la ovulación provocado por el anestésico, se decidió analizar el efecto de la inyección de timulina en la hipófisis en presencia de GnRH. Para ello ratones anestesiados con hidrato de cloral a los 19 días de edad e inyectados con solución salina o timulina en la hipófisis se trataron con eCG a los 20 días de edad y 48 h después recibieron GnRH (7.4  $\mu$ g/Kg). Los animales fueron sacrificados 24 h después de la administración de GnRH.

## Resultados

En los ratones inyectados con solución salina en la hipófisis, la administración de GnRH no modificó el bloqueo de la ovulación. Un efecto similar se observó cuando la GnRH se inyectó en ratones tratados con timulina (Tabla 14).

El peso de los ovarios y del útero así como la concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero de los ratones inyectados con timulina en la hipófisis y tratados con eCG y GnRH fue similar que el de los inyectados con solución salina (Tabla 14).

**Tabla 14.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en el suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l/) o timulina (1pg/0.3 $\mu$ l/) en la hipófisis y tratados con eCG (2.5. u.i.) + GnRH (7.4  $\mu$ g/Kg).

Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
<b>Chl+SS+ eCG+GnRH</b>	5	1/5	2	13.5 $\pm$ 0.4	68.0 $\pm$ 2.3	5.3 $\pm$ 0.5
<b>Chl+Timulina +eCG+GnRH</b>	5	1/5	11	12.9 $\pm$ 0.7	69.8 $\pm$ 3.1	9.7 $\pm$ 1.8

Estos resultados indican que en ratones anestesiados con hidrato de cloral la presencia de timulina en la hipófisis no es suficiente para estimular la secreción óptima de gonadotropinas para que los folículos puedan ovular en respuesta a la GnRH, como si sucede cuando la timulina se administra en el hipotálamo medio.

### 9. Efectos de la microinyección bilateral de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en ratones anestesiados con hidrato de cloral y tratados con eCG.

Debido a que en los animales anestesiados con hidrato de cloral la inyección de 1 pg de timulina en la hipófisis no modificó el bloqueo en la ovulación ejercida por el anestésico, se decidió inyectar el doble de la dosis de timulina como se hizo en el hipotálamo medio, con el fin de analizar si la falta de ovulación se debe a que la concentración de timulina fue insuficiente para estimular la ovulación. Hembras de 19 días de edad se anestesiaron con hidrato de cloral y se les inyectó timulina o solución salina en la hipófisis (bilateral). A los 20 días recibieron 2.5 u.i. de eCG y se sacrificaron 72 horas después de administrar la gonadotropina.

#### Resultados

En los ratones anestesiados con hidrato de cloral la inyección bilateral de solución salina en la hipófisis no modificó el bloqueo en la ovulación ejercido por el anestésico, tampoco se observaron cambios en el resto de los parámetros evaluados (Tabla 15).

**Tabla 15.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de 17 $\beta$ -estradiol (pg/ml) en el suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l) en la hipófisis y tratados con eCG o de ratones anestesiados y tratados con eCG.

Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	17 $\beta$ -estradiol
Chl+eCG	16	6/16	10.7 $\pm$ 1.2	12.2 $\pm$ 0.4	71.2 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 0.7
Chl+SS+eCG	13	5/13	10.8 $\pm$ 1.1	12.2 $\pm$ 0.8	78.3 $\pm$ 5.0	8.0 $\pm$ 1.2

La inyección bilateral de timulina en la hipófisis, no modificó el bloqueo en la ovulación que se observó en los animales inyectados con solución salina. En los animales inyectados con timulina el peso del útero fue mayor que los que recibieron solución salina. El peso de los ovarios y la concentración de  $17\beta$ -estradiol en el suero fueron similares en ambos grupos (Tabla 16).

**Tabla 16.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero (mg) y de la concentración de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en suero de ratones de 19 días de edad anestesiados con hidrato de cloral (Chl; 400 mg/Kg) e inyectados con solución salina (SS; 0.3 $\mu$ l/) o timulina (Tim; 1pg/0.3 $\mu$ l/) en la hipófisis (bilateral), tratados a los 20 días de edad con 2.5 u.i. de eCG.

Grupos	n	TAO	Número de ovocitos	Peso de los ovarios	Peso del útero	$17\beta$ -estradiol
Chl+SS+eCG	13	5/13	10.8 $\pm$ 1.1	12.2 $\pm$ 0.8	78.3 $\pm$ 5.0	8.0 $\pm$ 1.2
Éter+Tim+eCG	12	1/12	9	11.1 $\pm$ 0.5	90.4 $\pm$ 5.7*	7.6 $\pm$ 1.0

\*  $p < 0.05$  (prueba de  $t$  de Student)

#### 10. Efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis sobre la dinámica en el crecimiento folicular en los ratones anestesiados con éter y tratados con eCG.

Con el fin de analizar si las diferencias en la respuesta ovulatoria al administrar timulina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis, en ratones anestesiados con éter, se debe a modificaciones en la dinámica de crecimiento folicular, se realizó el análisis morfométrico de la población folicular en los ovarios de estos ratones.

#### Resultados

En los ratones anestesiados con éter e inyectados con eCG el número total de folículos medidos en los ovarios fue similar al de los animales tratados sólo con eCG, aunque el número de folículos grandes fue mayor en los ratones anestesiados (Tabla 17).



**Tabla 17.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos y por rango de ratones anestesiados con éter a los 19 días de edad y tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad y de ratones inyectados sólo con eCG.

Grupos	Folículos Totales	Distribución por rango	
		< 300 $\mu$ m	> 300 $\mu$ m
eCG	371.3 $\pm$ 9.4	368.0 $\pm$ 10.3	3.3 $\pm$ 1.3
Éter+eCG	454.3 $\pm$ 64.6	444.3 $\pm$ 63.3	10.0 $\pm$ 1.5*

\*  $p < 0.05$  (prueba de  $t$  de Student)

En los animales anestesiados con éter el número de folículos normales o atrésicos fue similar que el de los ratones inyectados sólo con eCG (Tabla 18).

**Tabla 18.** Media  $\pm$  e.e.m. del número de folículos normales o atrésicos por rango de ratones anestesiados con éter a los 19 días de edad y tratados con eCG (2.5 u.i.) a los 20 días de edad y de ratones inyectados sólo con eCG.

Grupos	Folículos <300 $\mu$ m		Folículos >300 $\mu$ m	
	Normales	Atrésicos	Normales	Atrésicos
eCG	15.0 $\pm$ 4.0	356.3 $\pm$ 13.4	0	3.3 $\pm$ 1.3
Éter+eCG	31.0 $\pm$ 9.0	423.3 $\pm$ 63.8	3.0 $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 1.2

En los animales tratados con solución salina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis el número total de folículos así como la distribución de folículos por rango fue similar al de los anestesiados (Tabla 19).

**Tabla 19.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos y del número de folículos por rango de ratones anestesiados con éter e inyectados con solución salina (SS) en el hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM) o en la hipófisis (HF) a los 19 días de edad y tratados con eCG (2.5 u.i.) a los 20 días de edad y de ratones anestesiados con éter y tratados con eCG.

Grupos	Folículos Totales	Distribución por rango	
		< 300 $\mu$ m	> 300 $\mu$ m
Éter+eCG	454.3 $\pm$ 64.6	444.3 $\pm$ 63.3	10.0 $\pm$ 1.5
Éter+SS(HA)+eCG	336.5 $\pm$ 15.5	325.0 $\pm$ 15.0	11.5 $\pm$ 0.5
Éter+SS(HM)+eCG	460.3 $\pm$ 70.1	447.0 $\pm$ 70.3	13.3 $\pm$ 1.5
Éter+SS(HF)+eCG	338.7 $\pm$ 35.5	325.7 $\pm$ 35.9	13.0 $\pm$ 2.1

El número de folículos atrésicos grandes de los ratones tratados con solución salina en el hipotálamo anterior, medio o en la hipófisis fue mayor al de los anestesiados, aunque dicha diferencia sólo fue estadísticamente significativa en los ratones inyectados en el hipotálamo medio (Tabla 20).

**Tabla 20.** Media  $\pm$  e.e.m. del número folículos normales o atrésicos por rango de ratones anestesiados con éter e inyectados con solución salina (SS) en el hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM) o en la hipófisis (HF) a los 19 días de edad y tratados con eCG (2.5 u.i.) a los 20 días de edad y de ratones anestesiados con éter e inyectados con eCG y de tratados sólo con eCG.

Grupos	Folículos <300 $\mu$ m		Folículos >300 $\mu$ m	
	Normales	Atrésicos	Normales	Atrésicos
Éter+eCG	28.0 $\pm$ 8.0	416.3 $\pm$ 62.6	3.0 $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 1.2
Éter+SS(HA)+eCG	8.5 $\pm$ 0.5	316.5 $\pm$ 15.5	0	11.5 $\pm$ 0.5
Éter+SS(HM)+eCG	19.0 $\pm$ 7.9	428.0 $\pm$ 66.5	0.7 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 1.5 *
Éter+SS(HF)+eCG	10.0 $\pm$ 2.9	315.7 $\pm$ 33.3	0.3 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 2.0

\*  $p < 0.05$  vs. eCG (prueba de  $t$  de Student)

Estos resultados nos llevan a sugerir que la falta de ovulación observada en los ratones anestesiados con éter e inyectados con solución salina en el hipotálamo anterior o medio, o en la hipófisis se debe al incremento en la atresia folicular de los folículos grandes.

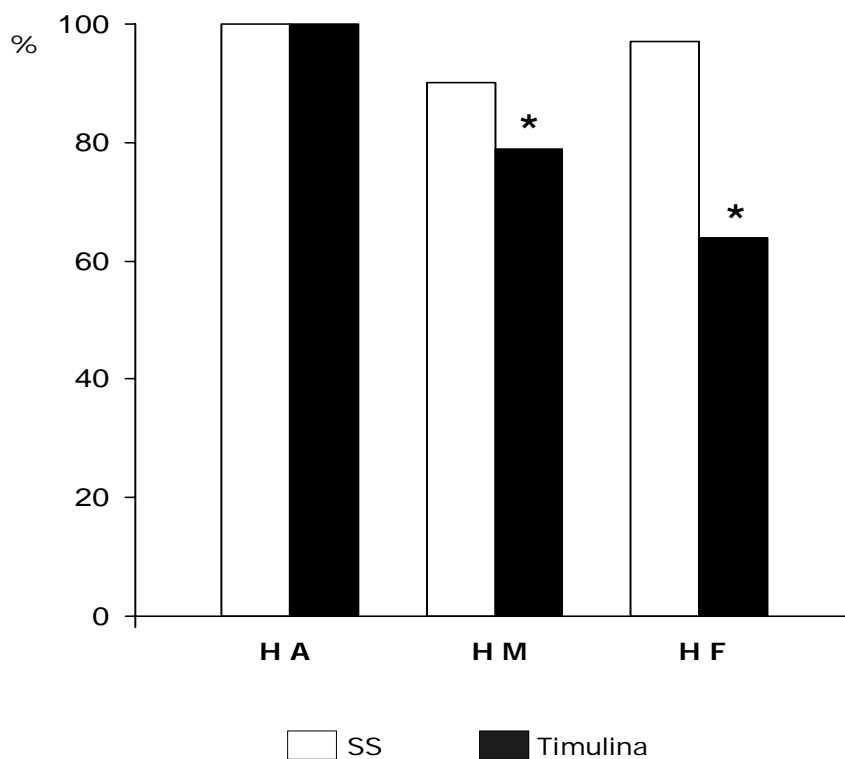
El número de folículos totales medidos en los ovarios de los ratones inyectados con timulina en el hipotálamo anterior o medio o en la hipófisis fue similar al de los tratados con solución salina. Un efecto similar se observó en la distribución de folículos por rango, sólo en los ratones inyectados con timulina en la hipófisis el número de folículos >300 µm de diámetro fue menor al de los inyectados con solución salina (Tabla 21).

**Tabla 21.** Media ± e.e.m. del número total de folículos y del número de folículos por rango de ratones anestesiados con éter e inyectados con solución salina (SS) o timulina en el hipotálamo anterior o medio, o en la hipófisis a los 19 días de edad e inyectados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad.

Grupos	Folículos Totales	Distribución por rango	
		< 300 µm	> 300 µm
<b>Hipotálamo anterior</b>			
Éter+SS +eCG	341.7 ± 10.3	330.0 ± 10.0	11.7 ± 0.3
Éter+Timulina+eCG	321.3 ± 9.4	311.0 ± 11.5	10.3 ± 3.0
<b>Hipotálamo medio</b>			
Éter+SS +eCG	460.3 ± 70.1	447.0 ± 70.3	13.3 ± 1.5
Éter+Timulina+eCG	434.7 ± 71.1	425.3 ± 68.3	9.2 ± 3.2
<b>Hipófisis</b>			
Éter+SS +eCG	338.7 ± 35.5	325.7 ± 35.9	13.0 ± 2.1
Éter+Timulina+eCG	350.0 ± 38.6	345.3 ± 36.4	4.7 ± 2.4 *

\* p<0.05 vs. Éter+SS+eCG correspondiente (prueba de ji cuadrada)

El porcentaje de folículos atrésicos  $>300 \mu\text{m}$  de los ratones inyectados con timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis fue menor que el de los inyectados con solución salina. Esta diferencia no se observó en las hembras inyectadas en el hipotálamo anterior (Figura 19).



**Figura 19.** Porcentaje de folículos atrésicos grandes ( $> 300 \mu\text{m}$  de diámetro) de ratones anestesiados con éter a los 19 días de edad e inyectados con solución salina (SS;  $0.3 \mu\text{l}$ ) o timulina ( $1 \text{ pg}/0.3 \mu\text{l}$ ) en el hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM) o en la hipófisis (HF) e inyectados con eCG ( $2.5 \text{ u.i.}$ ) a los 20 días de edad. Sacrificados 72 h después del estímulo gonadotrópico. \*  $p < 0.05$  vs. solución salina (SS) respectiva.

Estos resultados indican que la inyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis rescata a los folículos grandes de la atresia, probablemente al mantener la secreción tónica de gonadotropinas necesaria para el desarrollo normal de los folículos hasta la etapa de preovulatorios, lo cual permite que los animales sean capaces de ovular.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que en el ratón prepúber tratado con eCG, el efecto estimulante de la timulina en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, se debe a su acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario: en el hipotálamo probablemente estimula la liberación de la GnRH y en la hipófisis facilita la secreción de las gonadotropinas, la respuesta de los gonadotropos a la GnRH o ambas.

El ratón de la cepa CD1 utilizado en este estudio no presenta ovulación el día del primer estro vaginal (García y col., 2000), a diferencia de lo que sucede en la rata (Ojeda y col., 1994). La ovulación en animales prepúberes se puede inducir por la administración de gonadotropinas y la magnitud de la respuesta ovulatoria depende de la dosis administrada de gonadotropina y de la edad de los animales (Argüello, 1987; Villavicencio y col., 1993). La presencia de ovulación en los ratones de la cepa CD1 tratados con 2.0 y 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad indica que a esta edad el sistema hipotálamo-hipofisario es capaz de responder al incremento en la secreción de estradiol que resulta del estímulo gonadotrópico (Kaneko y col., 1992; Kogo y col., 1993; Cooke y col., 1999) que culmina en la secreción preovulatoria de la LH (Fink, 1986,1988). El aumento en el peso de los ovarios en estos animales probablemente es el resultado del crecimiento y maduración de los folículos ováricos (Greenwald y Roy, 1994; Jiang y col., 2003; Liu y col., 2003).

En el gato adulto la anestesia con hidrato de cloral resulta en la disminución rápida de la concentración de LH en plasma (Johnson y Gay, 1981). Recientemente Kumru y col., (2001) describieron que en la rata adulta en proestro el hidrato de cloral interfiere con la secreción preovulatoria de LH. Además se ha mostrado que en la rata adulta cíclica la exposición a los vapores con éter en el día del proestro disminuye la concentración de LH en el plasma y bloquea la ovulación (Kim y col., 1994), mientras que en el macho adulto

disminuye la concentración de LH y FSH en el plasma (Tohei y col., 1997). La menor concentración de LH en plasma provocado por la exposición a los vapores con éter, se acompaña de un incremento de la concentración de esta hormona en la hipófisis, lo que significa que el éter bloquea la liberación de LH (Kim y col., 1996). Con base en estas evidencias podemos sugerir que el bloqueo de la ovulación observada en los ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter y tratados con eCG puede ser explicado por las alteraciones en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, al parecer principalmente sobre la de LH.

En ratas prepúberes tratadas con eCG, la inyección de pentobarbital sódico inhibe la liberación de LH y la ovulación, la cual se restablece por la inyección de GnRH dos horas después de inyectar el anestésico (Sorrentino, 1979). En nuestro estudio el tratamiento con GnRH o hCG en los ratones anestesiados con hidrato de cloral o éter e inyectados con eCG, restableció la ovulación, lo cual nos permite sugerir que la falta de ovulación en estos animales se debe al bloqueo en la secreción preovulatoria de GnRH y como consecuencia la de LH. Estos resultados también nos indican que la respuesta de la hipófisis o de los ovarios no se modifica por la aplicación de ninguno de los dos anestésicos.

Aún cuando el bloqueo de la ovulación provocado por la anestesia con hidrato de cloral o éter tiene su origen en el bloqueo en la secreción preovulatoria de GnRH y las gonadotropinas, el mecanismo por el cual actúa cada uno de ellos al parecer es diferente. Esta idea es apoyada parcialmente por el hecho que sólo en los ratones anestesiados con éter la inyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis restablece la ovulación y no en aquellos que recibieron hidrato de cloral.

El mecanismo por el cual el éter produce el bloqueo de la secreción de las gonadotropinas y por ende al bloqueo en la ovulación, implica cuando menos dos vías. Una de ellas sería la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal ya que la disminución en la concentración en plasma de LH y FSH provocado por la exposición a los vapores de éter se acompaña de un incremento en la concentración de ACTH y corticosterona en el plasma que al parecer se origina por una hipersecreción de CRH en el hipotálamo (Tohei y col., 1997), que es uno de los factores principales que inhiben la secreción de GnRH (Makara y Kovacs, 1997). La anestesia con éter también se manifiesta con un incremento en la concentración en suero de progesterona de origen adrenal (Flores y col., 2004).

No podemos descartar que el bloqueo en la ovulación provocado por la exposición a los vapores del éter sea el resultado del incremento en la secreción de prolactina, como ha sido ampliamente documentado (Reis y col., 1994; Yogev y col., 1994; Feki y col., 1997; Pinilla y col., 1998; Bodosi 2000; Caldeira y Franci, 2000). En apoyo a esta idea se ha mostrado que un 30% de mujeres con síndrome de ovario poliquístico que no ovulan muestran hiperprolactinemia (Coremblum y Taylor 1982; Isik y col., 1997). Además, el tratamiento con prolactina a ratas hembra prepúberes estimuladas con gonadotropinas (para inducir superovulación) provoca un incremento en la expresión de beta endorfina en los folículos terciarios antrales (Reis y col., 2004), la cual inhibe la ovulación por un mecanismo central y al parecer por actuar directamente en el ovario (Spremovic-Radjenovic y col., 1997; Reis y col., 2004).

La señal que estimularía el cambio en la concentración de prolactina por la anestesia con éter se origina en el SNC, puesto que el incremento de prolactina en el plasma se acompaña de un decremento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas en la eminencia media (Yamada y col., 2005) y la dopamina regula de manera inhibitoria la secreción de prolactina (Leadem y col., 1988; Stoker y col., 1999; Papaleo y col., 2001).

Otra posibilidad es que el bloqueo de la ovulación provocado por el éter sea el reflejo de su acción sobre receptores GABA<sub>A</sub> o a glicina. Los receptores GABA<sub>A</sub> y a glicina representan la mayoría de los receptores inhibitorios en el SNC de los vertebrados (Krasowski y Harrison, 1999). Se ha mostrado que algunos anestésicos volátiles activan receptores GABA<sub>A</sub> al parecer actuando como un agonista débil (Jones y Harrison, 1993; Wu y col., 1996) o incrementando la sensibilidad de este tipo de receptores a los efectos de GABA (Banks y Pearce, 1999). Particularmente para el éter sus efectos inhibitorios parecen estar mediados por receptores GABA<sub>A</sub> (Jones y col., 1992; Krasowski y Harrison, 2000) y receptores a glicina sensibles a esticnina (Krasowski y Harrison, 2000).

En cultivo de neuronas de hipocampo se ha mostrado que el tricloroetanol, metabolito del hidrato de cloral que ejerce la acción anestésica, al actuar sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, incrementa la amplitud y prolonga las corrientes de Cl<sup>-</sup> activadas por GABA (Lovinger y col., 1993; Peoples y Weight, 1994). Resultados similares se han obtenido en ovocitos de *Xenopus* en cultivo (Pistis y col., 1997; Garret y Gan, 1998). Otros sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la secreción de GnRH podrían estar mediando los efectos del hidrato de cloral. Al respecto, en ovocitos de *Xenopus* se ha mostrado que el tricloroetanol incrementa las corrientes estimuladas por la glicina (Pistis y col., 1997) y en neuronas u ovocitos de *Xenopus* aumenta las corrientes mediadas por receptores 5-HT<sub>3</sub> (Lovinger y Zhou, 1993; Downie y col., 1995). El tricloroetanol también inhibe las corrientes excitatorias sobre receptores a glutamato sensibles a NMDA o al kainato (Peoples y Weight, 1998). Lo anterior puede contribuir a los efectos depresores del hidrato de cloral sobre el SNC (Pistis y col., 1997; Peoples y Weight, 1998) y probablemente sobre la inhibición en la liberación de la GnRH.



La vida media de los metabolitos del hidrato de cloral como el tricloroetanol y el ácido tricloroacético varía según la especie, la dosis administrada y la etapa de la vida de los individuos. En general, la vida media de estos metabolitos es mayor en los individuos más jóvenes, en roedores puede ser de varias horas (Beland y col., 1998) o en humanos de varios días (Mayers y col., 1991; Zimmermann y col., 1998). Con base en estas evidencias no podemos descartar que la falta de ovulación por la inyección de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis en los animales anestesiados con hidrato de cloral se deba al efecto de estos metabolitos directamente en el ovario y que la timulina no sea capaz de prevenir. Se ha mostrado que el hidrato de cloral y sus metabolitos producen radicales libres en el hígado (Beland, 1999) y que éstos son factores inductores de atresia folicular (Tilly y Tilly, 1995; Kaipia y Hsueh, 1997). Esta sería una posibilidad que explicarían los cambios en la respuesta ovulatoria provocados por la anestesia con hidrato de cloral.

La GnRH es secretada por neuronas especializadas (GnRHérgicas) que se localizan en el SNC. El soma de las neuronas GnRHérgicas se localizan en el hipotálamo anterior y las terminales de estas células llegan al hipotálamo medio (eminencia media). En el soma de la neurona GnRHérgica se lleva a cabo la síntesis de la GnRH y en la terminal su liberación (Silverman y col., 1994). El hecho que sólo la inyección de timulina en el hipotálamo medio haya prevenido el bloqueo de la ovulación provocado por la anestesia con éter y no cuando se inyectó en el hipotálamo anterior, nos lleva a sugerir que la timulina participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan la liberación de GnRH. En apoyo a esta idea la respuesta ovulatoria de los ratones inyectados con timulina en el hipotálamo medio fue similar a la que se observó en los ratones anestesiados con éter y tratados con eCG más GnRH. Los resultados obtenidos al administrar timulina en el hipotálamo anterior no son claros, pero al parecer la timulina no participa en los mecanismos que regulan la síntesis de GnRH.

La timulina podría modular la liberación de GnRH por dos vías: actuando directamente sobre la terminal de la neurona GnRHérgica o interactuando con neurotransmisores que participan en esta regulación (Kordon y col., 1994). Al respecto, se ha mostrado que la administración de timulina en el tercer ventrículo de ratones adultos disminuye la liberación de DA y de NA en el hipotálamo (Vécsei y col., 1987), dos de los neurotransmisores que participan en la regulación de la liberación de GnRH (Kordon y col., 1994).

En estudios *in vitro* se ha mostrado que la timulina participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas por un efecto directo en la hipófisis. En cultivos de hipófisis obtenidas de rata, la timulina estimula la liberación de LH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997). En un sistema de perfusión con células de adenohipófisis obtenidas de rata hembra la timulina estimula la liberación de FSH y LH (Brown y col., 2000). Recientemente mostramos que los efectos de la timulina sobre la liberación de la FSH y la LH por células de adenohipófisis, depende del día del ciclo estral en la que se encuentran las ratas donadoras (Hinojosa y col., 2004). El hecho que la administración de timulina en la hipófisis revertió el bloqueo en la ovulación provocado por la anestesia con éter apoya la idea que la timulina estimula la liberación de gonadotropinas, tal y como muestran los resultados obtenidos *in vitro*. Para nuestro conocimiento este es el primer estudio *in vivo* donde se muestra que la timulina al actuar en el hipotálamo o la hipófisis modula la secreción de gonadotropinas que resulta en ovulación.

El crecimiento y la maduración folicular, así como la ovulación, son procesos que están regulados principalmente por la FSH y la LH (Greenwald y Roy, 1994). A lo largo del desarrollo folicular la mayoría de los folículos ováricos (70-99.9%) entran en un proceso de degeneración llamado atresia (Hsueh y col., 1994; Greenwald y Roy, 1994). En este sentido está bien documentado que las gonadotropinas son los principales factores de supervivencia folicular (Markström y col., 2002) ya que deficiencias en su secreción

favorecen la atresia folicular (Bill y Greenwald, 1981). El hecho que la inyección de timulina en el hipotálamo medio o la hipófisis haya disminuido la incidencia de atresia de los folículos grandes (>300  $\mu\text{m}$  diámetro) indica que la timulina revirtió la condición de atresia, lo cual apoya la idea que la timulina además de estimular el incremento preovulatorio de LH, también mantuvo la concentración tónica de FSH y LH que favoreció el crecimiento normal de los folículos hasta que alcanzaron la etapa preovulatoria. Durante el penúltimo estadio de desarrollo folicular la exposición a la FSH es crucial para evitar la atresia folicular y los folículos puedan continuar con su maduración hasta llegar a ovular (Hsueh y col., 1994; Markström y col., 2002). En apoyo a esta idea Villavicencio y Domínguez (1993) mostraron que el tratamiento con eCG a ratas prepúberes reduce el número de folículos atrésicos 48 y 72 h después de la administración de la gonadotropina. La presencia de un gran porcentaje de folículos grandes con características de atresia que se observaron en los ovarios de los animales inyectados con solución salina en el hipotálamo o la hipófisis, así como por los tratados con timulina en el hipotálamo anterior, explicaría la ausencia de ovulación en estos ratones.

Los resultados de este estudio muestran que el bloqueo de la ovulación observado en los ratones inyectados con solución salina en el hipotálamo o en la hipófisis se debe principalmente al efecto del anestésico. Sin embargo, el hecho que los animales anestesiados con hidrato de cloral y tratado con eCG y GnRH no hayan ovulado al inyectar solución salina en el hipotálamo medio o en la hipófisis, a diferencia de los que fueron tratados con Chl+eCG+GnRH, nos permite sugerir que el estrés provocado por la manipulación quirúrgica contribuye a la falta de respuesta a la GnRH. Una posible explicación para este hecho es que la cánula utilizada para la inyección de la timulina haya seccionado vías neurales que regulan la secreción de la GnRH o bien a un daño directo a los somas GnRHérgicos. Se ha descrito que el incremento en la formación de conexiones sinápticas en el hipotálamo y otras zonas del cerebro de la rata ocurre antes de la quinta semana de vida (Aghajanian y Bloom, 1967; Araki y col., 1975; Matsumoto y Arai,

1976; Wray y Hoffman, 1986; Witkin y Demasio, 1989) evento que posiblemente está ocurriendo en el ratón de 19 días de edad (edad de la intervención quirúrgica). La diferencia en el número de ovocitos liberados al inyectar timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis en ratones anestesiados con éter puede estar relacionada con la sección de diferentes vías que resulta en diferencias en la secreción de gonadotropinas.

Dado que los ratones anestesiados con hidrato de cloral e inyectados con timulina en el hipotálamo medio ovularon ante la administración de GnRH, lo cual no ocurrió en los inyectados en la hipófisis, estos resultados apoyan la idea que la presencia de timulina en el hipotálamo es indispensable para revertir el efecto inhibitorio que ejerce el hidrato de cloral sobre la ovulación, de tal manera que al inyectar GnRH (estímulo preovulatorio) estimula la secreción brusca de FSH y LH, lo cual resulta en que los folículos pudieran ovular.

Los estrógenos regulan el crecimiento del útero estimulando la división de las células epiteliales, el desarrollo del endometrio y el miometrio, la síntesis de proteínas, la permeabilidad, así como la acumulación de agua en la luz del mismo (Steinetz, 1978; Montes y Luque, 1988; Linzey y Korach, 1999). El aumento en el peso del útero de los ratones tratados con eCG, es el reflejo del incremento de la secreción de estrógenos que se observó en estos animales en particular los que fueron inyectados con las dos concentraciones mayores de eCG, donde el incremento de estradiol fue mayor.

El menor número de ovocitos liberados por los animales que fueron anestesiados con hidrato de cloral o éter y que recibieron eCG+GnRH puede estar relacionado con un efecto inhibitorio de la GnRH en el ovario, ya que el tratamiento con agonistas de la GnRH inhibe la esteroidogénesis folicular (Mori y col., 1994; Yago, 1994; Srivastava y col., 1995; Irusta y col., 2003), el crecimiento folicular (Srivastava y col., 1995), la luteinización (Andreu y col., 1998) y favorece la atresia folicular (Billig y col., 1994; Andreu y col., 1998; Parborell y col., 2002).

El menor peso del útero de los ratones intactos tratados con eCG después de la inyección de GnRH, que también se observó en el peso de los ovarios, puede estar relacionado con efectos inhibitorios locales del decapeptido en este órgano. El miometrio posee receptores a la GnRH (Chegini y col., 1996) y la terapia con análogos o agonistas de la GnRH provocan disminución temporal en la síntesis de estrógenos y progesterona en el ovario (Adashi, 1995; Mangal y col., 1997) y disminución en la expresión de receptores a progesterona tanto los receptores tipo A (Wu y col., 2002) como los tipo B (Mangal y col., 1997; Nisolle y col., 1999; Wu y col., 2002). La GnRH también inhibe los efectos estimulantes del estradiol sobre la síntesis de ADN, la proliferación de células musculares lisas del miometrio, en la producción de TGF- $\beta$ 1 (Chegini y col., 1996) y en el número de receptores a IGF-I (Mangal y col., 1997). Así mismo, en mujeres con miomas en el útero el tratamiento con tibolona (un análogo de la GnRH) disminuye el volumen del útero (Di Lieto y col., 2005). Este tipo de terapia está asociada con una reducción directa o indirecta de la concentración de los factores de crecimiento (Vu y col., 1998; Di lieto y col., 2005), supresión de la proliferación celular (Vu y col., 1998), incremento de la apoptosis (Mizutani y col., 1998) y la aparición de cambios vasculares (Reinshc y col., 1994). Lo anterior también explicaría el menor peso del órgano que se hizo evidente al inyectar GnRH en los ratones anestesiados con hidrato de cloral o con éter y tratados con eCG.

En resumen los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a apoyar la idea de que el efecto estimulante de la timulina sobre la ovulación es por su acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario. En el hipotálamo al estimular la liberación de la GnRH y en la hipófisis al facilitar la liberación de las gonadotropinas, la respuesta de los gonadotropos a la GnRH o ambas.

**Figura 20.** Modelo de los posibles efectos de la timulina sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

La anestesia con hidrato de cloral (Chl) o con éter bloquea la ovulación inducida con eCG, probablemente por un efecto en el SNC. El bloqueo con Chl puede implicar la activación (+) de sistemas de neurotransmisión inhibitorios como el GABA y la glicina, además de la inhibición (-) de otros que son estimulantes como el glutamato. El efecto inhibitorio del éter puede ser debido a la inhibición en la secreción de DA que se traduce en un incremento en la secreción de PRL, o a la activación (+) de GABA, glicina, o del CRF; en todos los casos se impide el incremento en la secreción preovulatoria de GnRH y las gonadotropinas que normalmente ocurre en respuesta al estímulo con eCG, y por lo tanto hay bloqueo de la ovulación (línea discontinua).

La timulina regula la secreción de las gonadotropinas por alguno de los siguientes mecanismos:

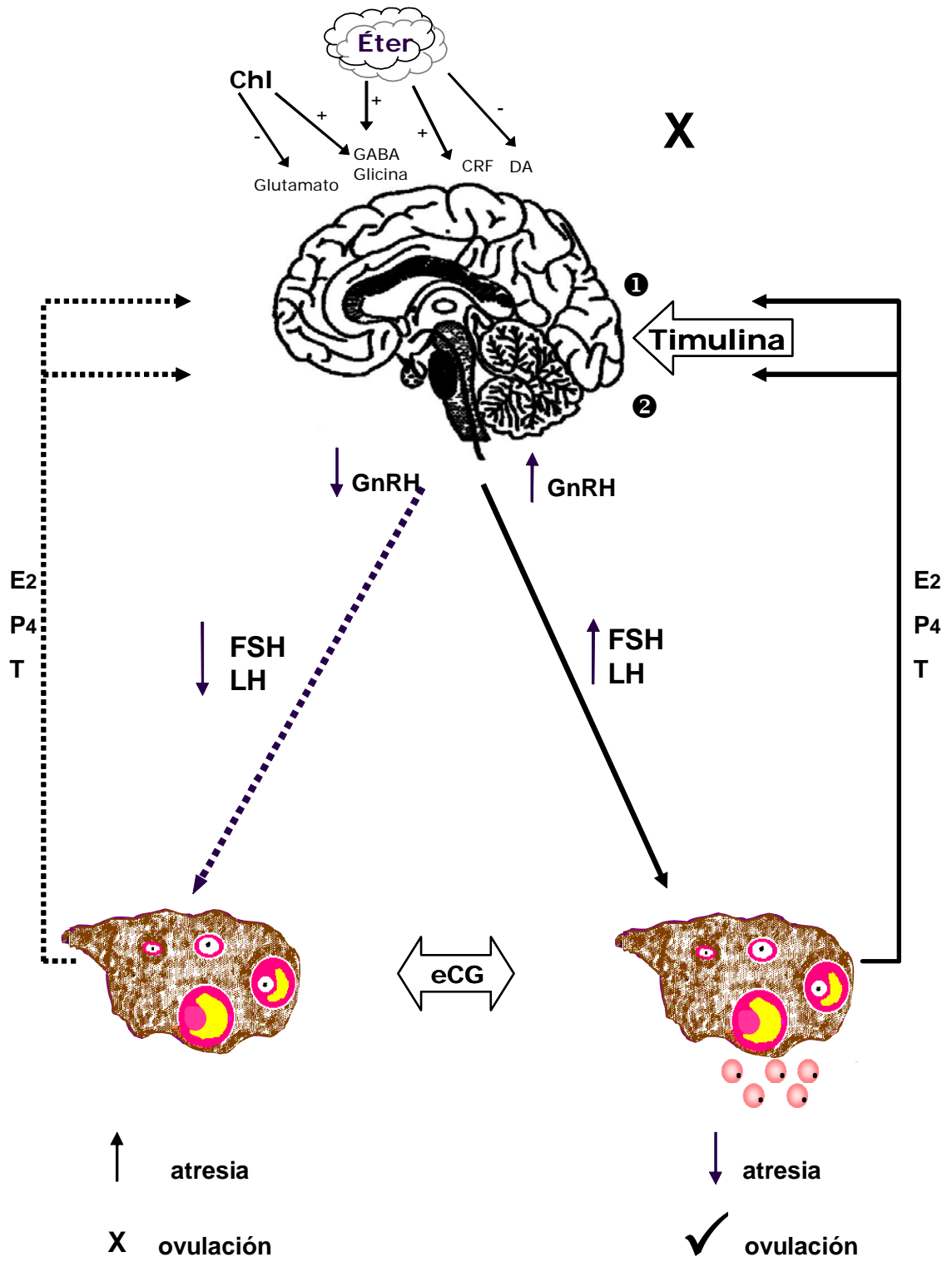
❶ En el hipotálamo medio estimula la liberación de GnRH, la cual al actuar en la hipófisis regula la liberación de FSH y LH, ambas gonadotropinas en el ovario estimulan el crecimiento normal de los folículos y la ovulación.

❷ En la hipófisis facilita la liberación de las gonadotropinas o modifica la sensibilidad de la hipófisis a los efectos de la GnRH o actúa como un factor similar a la GnRH como lo han propuesto Brown y col. (2000).

En ambos casos la timulina es capaz de eliminar el efecto inhibitorio ejercido por el éter sobre la ovulación (línea continua).

La **X** a nivel del cerebro significa la eliminación de los efectos inhibitorios ejercidos por la anestesia con éter cuando se administra timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis.

La **✓** significa presencia de ovulación.



## CONCLUSIONES

- Los mecanismos neuroendócrinos que se activan por la estimulación con eCG y que inducen la ovulación en el ratón prepúber, son bloqueados por la anestesia con hidrato de cloral o con éter, al parecer por mecanismos diferentes.
- La timulina modula de manera estimulante el proceso de ovulación inducido por el tratamiento con eCG en el ratón prepúber, al actuar sobre el hipotálamo medio, la hipófisis o en ambos lugares.



## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevan a proponer los siguientes problemas resolver.

- La falta de ovulación en los animales inyectados con timulina en el hipotálamo anterior, ¿se debe en realidad a que la timulina no participa en los mecanismos que regulan la síntesis de la GnRH o es que el modelo experimental no permite evidenciar un efecto a este nivel debido a el tiempo que requiere la síntesis de este decapeptido?
- Si la timulina participa en la liberación de GnRH ¿se debe a su efecto directo sobre la neurona GnRH o a su interacción con otras neuronas que participan en la liberación de este decapeptido?
- ¿El efecto estimulante que tiene la timulina en la hipófisis se debe a modificaciones en el número o en la afinidad de los receptores a la GnRH o a la misma timulina?
- ¿El efecto estimulante de la timulina en el hipotálamo medio, se debe exclusivamente a su acción sobre la liberación de GnRH o es un reflejo también de su efecto en la hipófisis? El modelo experimental utilizado no permite descartar por completo esta posibilidad.
- La diferencia en la respuesta ovulatoria al inyectar timulina en un ratón anestesiado con hidrato de cloral en comparación a uno anestesiado con éter ¿se debe a diferencias en los mecanismos de acción de estos anestésicos?

**BIBLIOGRAFÍA**

**Aboussaouira T, Moustafa Y y Idelman S** (1989). Image analysis of cell proliferation in rat thymus throughout development. *Thymus* **12**, 167-186.

**Adashi EY** (1995). Long-term gonadotropin-releasing hormone agonist therapy: the evolving issue of steroidal "add-back" paradigms. *Keio J Med* **44**, 124-132.

**Aghajanian GK y Bloom FE** (1967). The formation of synaptic junctions in developing rat brain. A quantitative electron microscopic study. *Brain Res* **6**, 716-727.

**Aguilera G y Romano M** (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J Endocrinol* **123**, 367-373.

**Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H y Tesone M** (1998). Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol Reprod Dev* **51**, 287-294.

**Araki S, Toran CD, Ferin M y Vande RL** (1975). Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during maturation in the rat: Ontogeny of regional Hypothalamic differences *Endocrinology* **97**, 693-697.

**Argüello MS** (1987). Influencia de la inervación noradrenérgica del ovario sobre la pubertad espontánea e inducida en el ratón normal y el hipotímico. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM, México. 33 pp.

**Audesirk T y Audesirk G** (1996). *Biology life on earth*. 4ª ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey USA. 772 p.

**Bach JF y Dardenne M** (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application*. Goldstein AL ed., New York: Plenum Press, 593-600.

**Bach JF, Dardenne M y Pleau JM** (1977). Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature* **266**, 55-57.

**Badamchian M, Spangelo BL, Damavandy T, MacLeod RM y Goldstein AL** (1991). Complete amino acid sequence analysis of a peptide isolated from the thymus that enhances release of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* **128**, 1580-1588.

**Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F y Dardenne M** (1991). Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci* **48**, 2141-2148.

**Banks MI y Pearce RA** (1999). Dual actions of volatile anesthetics on GABA<sub>A</sub> IPSCs: Dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology* **90**, 120-134.

**Beland FA** (1999). NTP technical report on the toxicity and metabolism studies of chloral hydrate (CAS No. 302-17-0). Administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep Ser* **59**, 1-66, A1-E7.

**Beland FA, Schmitt TC, Fullerton NF y Young JF** (1998). Metabolism of chloral hydrate in mice and rats after single and multiple doses. *J Toxicol Environ Health A* **54**, 209-226.

**Bellanti JA** (1986). *Inmunología*. 3a ed. Interamericana. México. 662 pp.

**Bergman RA, Afifi AK y Heideger PM Jr** (1998). *Histología*. McGraw-Hill Interamericana. México, 369 pp.

**Besedovsky HO y Sorkin E** (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.

**Bill CH y Greenwald GS** (1981). Acute gonadotropin deprivation. I. A model for the study of follicular atresia. *Biol Reprod* **24**, 913-921.

**Billig H, Furuta I y Hsueh AJ** (1994). Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* **134**, 245-252.

**Bodosi B, Obal F Jr, Gardi J, Komlodi J, Fang J y Krueger JM** (2000). An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**; R1590-1598.

**Boukaiba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A, Fusselier M, Dardenne M y Lemonnier D** (1993). A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am J Clin Nutr* **57**, 566-572.

**Brown OA, Sosa YE, Bolognani F y Goya RG** (1998). Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech Ageing Dev* **104**, 249-262

**Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM y Goya RG** (1999). Growth hormone-release activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* **69**, 20-27.

**Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM y Goya RG** (2000). Studies on the gonadotropin-release activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol Biol Sci* **55A**, B170-B176.

**Buckingham JC, Safieh B, Singh S y Kendall MD** (1991). Interactions of corticotrophin and glucocorticoids in the control of thymulin release in the rat. *Br J Pharmacol* **105**, 15 pp.

**Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover P y Kendall MD** (1992). Interactions between the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the thymus in the rat: a role for corticotrophin in the control of thymulin release. *J Neuroendocrinol* **4**, 295-301.

**Caldeira JC y Franci CR** (2000). Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. *Brain Res Bull* **52**, 483-499.

**Calzolari A** (1898). Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch Ital Biol Torino* **30**, 71-77.

**Carter J** (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J Reprod Fert* **46**, 211-216.

**Cerda A, Hinojosa L y Rosas P** (1998). Efectos de la administración de la timulina en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón sobre la ovulación. XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, O-22.

**Consolini R, Legitimo A, Calleri A y Milani M** (2000). Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clin Exp Immunol* **121**, 444-447.

**Cooke RG 3rd, Nothnick WB, Komar C, Burns P y Curry TE Jr** (1999). Collagenase and gelatinase messenger ribonucleic acid expression and activity during follicular development in the rat ovary. *Biol Reprod* **61**, 1309-1316.

**Coreblum B y Taylor PJ** (1982). The hyperprolactinemic polycystic ovary syndrome may not be an distinct entity. *Fert Steril* **38**, 549-552.

**Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF y Lausan JP** (1988). NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *J Biol Chem* **263**, 5574-5580.

**Chambers SP y Clarke AG** (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.

**Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S y Williams RS** (1996). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3215-3221.

**Dalakas MC, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever JL y Goldstein AL** (1984). Thymosin  $\beta_4$  is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application*. Goldstein AL ed., New York: Plenum Press, 119-125 pp.

**Dardenne M y Bach JF** (1981). Thymic hormones. En: *The thymus gland*. Kendall M. ed., London: Academic Press, 113-131 pp.

**Dardenne M y Savino W** (1994). Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol Today* **15**, 518-523.

**Dardenne M, Kelly PA, Bach JF y Savino W** (1991). Identification and functional activity on P1 receptors in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 9700-9704.

**Dardenne M, Papiernik M, Bach JF y Stutman O** (1974). Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. *Immunology* **27**, 299-304.

**Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J y Bach JF** (1982). Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci* **79**, 5370-5373.

**Dardenne M, Savino W y Bach JF** (1988). Modulation of thymic endocrine function by thyroid and steroid hormones. *Int J Neurosci*, **39**, 325-334.

- Dardenne M, Savino W, Berrih S y Bach JF** (1985). A zinc-dependent epitope on the molecule of thymulin, a thymic hormone. *Proc Natl Acad Sci* **82**, 7035-7038.
- Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J y Bach JF** (1986). Thymic hormone-containing cells. VII Adrenals and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J Immunol* **136**, 1303-1308.
- Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T y Bach JF** (1989). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates *in vivo* and *in vitro* the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* **125**, 3-12.
- Dardenne M, Savino W, Gastinel L y Bach JF** (1984). Thymulin. New biochemical aspects. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application*. Goldstein AL ed., New York: Plenum Press, 37-42 pp.
- Dardenne M, Boukaiba N, Gagnerault MC, Homo-Delarche F, Chappuis P, Lemonnier D y Savino W** (1993). Restoration of the thymus in aging mice by in vivo zinc supplementation. *Clin. Immunol. Immunopathol* **66**, 127-135.
- Di Lieto A, De Falco M, Mansueto G, De Rosa G, Pollio F y Staibano S** (2005). Preoperative administration of GnRHa plus tibolone to premenopausal women with uterine fibroids: evaluation of the clinical response, the immunohistochemical expression of PDGF, bFGF and VEGF and the vascular pattern. *Steroids* **70**, 95-102.
- Dominguez R, Chávez R y Cruz ME** (1991). La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: *Tópicos selectos en Biología de la Reproducción*. Domínguez R Ed. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 163-188 pp.
- Dominguez R y Smith ER** (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* **14**, 212-223.
- Downie DI, Hope AG, Bellelli D, Lambert JJ, Peters JA, Bentley KR, Steward IJ, Chen CY y Barnes NM** (1995). The interaction of trichloroethanol with murine recombinant 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol* **114**, 1641-1651.
- Espey LL y Lipner H** (1994). Ovulation. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD Eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 725-780 pp.
- Everett JW** (1994). Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 1509-1526 pp.
- Fabris N y Mocchegiani E** (1985). Endocrine control of thymic serum factor production in young-adult and old mice. *Cel Immunol* **91**, 325-335.
- Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Caramia G, Braccili T, Pacini F y Pinchera A** (1987). Thymulin deficiency and low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome in infants with low birth weight syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 247-252.
- Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F y Pinchera A** (1986). Thyroid function modulates thymic endocrine activity. *J Clin Endocrinol Metab* **62**, 474-478.

- Fawcett B** (1995). Histología. 12ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México, 1044 pp.
- Feki A, Hjaiej L, Zekri S, Jaafoura H y Kamoun A** (1997). Sequential and ultrastructural study of lactotroph response to stress in rats as a function of age. *Arch Physiol Biochem* **105**, 92-95.
- Fink G** (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci Prog Oxf* **70**, 403-423.
- Fink G** (1988). Gonadotrophin secretion and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD eds. 1ª ed. New York: Raven Press, 1349-1377 pp.
- Fink G** (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function: general principles. En: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Conn PM y Freeman ME eds. New Jersey: Human Press, 107-133 pp.
- Fitzpatrick FTA, Kendall MD, Wheeler MJ, Adcock IM y Greenstein BD** (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J Endocrinol* **106**, R17-R19.
- Flanagan SP** (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* **8**, 295-309.
- Flores A, Meléndez G, Rodríguez JO, Palafox MT, Barco AI, Chavira R, Domínguez R y Cruz ME** (2004). Efectos de la hemi-ovarectomía realizada durante el ciclo estral de la rata sobre la concentración plasmática de hormonas esteroides. XXIX Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción y IV Reunión de la Sociedad Mexicana de Biología de la Reproducción Humana. 121-137.
- 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.
- Franklin KBJ y Paxinos G** (1997). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, USA.
- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P** (2000). Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice. Role of thymulin. *J Endocrinol* **166**, 381-387.
- Garrett KM y Gan JP** (1998). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor activity by  $\alpha$ -chloralose. *J Pharm Exp Ther* **285**, 680-686.
- Gastinel LN, Dardenne M, Pléau JM y Bach JF** (1984). Studies on the zinc binding site to the serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* **797**, 147-155.
- Gastinel LN, Pleau JM, Dardenne M, Sasaki A, Bricas E, Morgat JL y Bach JF** (1982). High affinity sites on plasma membrane obtained from the lymphoblastoid cultured 1301 cell line for highly radioactive serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* **684**, 117-126.
- Goff BL, Roth JA, Arp LH y Incefy GS** (1987). Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* **68**, 580-587.

**Goldstein A, Low T, Thurman G, Zatz M, Hall N, Chen J, Hu SK, Naylor P y McClure J** (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog Horm Res* **37**, 369-415.

**Golsteyn EJ y Fritzier MJ** (1987). The role of the thymus-hypothalamus-pituitary-gonadal axis in normal immune processes and autoimmunity. *J Rheumatol* **14**, 982-990.

**Goya RG** (1991). The immune-neuroendocrine homeostatic network and ageing. *Gerontology* **37**, 208-213.

**Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bvilacqua JA y Dardenne M** (1993). Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in aging rats. *Neuroendocrinology* **58**, 338-343

**Goya RG, Sosa YE, Brown OA y Dardenne M** (1994). *In vitro* studies on the thymus-pituitary axis in young and old rats. *Ann NY Acad Sci* **741**, 108-114.

**Gore-Langton RE y Armstrong DT** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. New York: Raven Press, 571-627 pp.

**Greenwald GS y Roy SK** (1994). Follicular development and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 629-721.

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

**Grossman CJ** (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.

**Hadley AJ, Rantle CM y Buckingham JC** (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* **4**, 62-69.

**Halász B** (2000). The hypothalamus as endocrine organ. En: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Conn PM y Freeman ME eds. Totowa, New Jersey: Human Press, 3-21 pp.

**Hall NR, McGillis JP, Spangelo BL, Healy DI, Chrousos GP, Schulte HM y Goldstein AL** (1985). Thymic hormones effects on the brain and neuroendocrine circuits. En: *Neural Modulation of immunity*. Guillemin R ed. New York: Raven Press, 179-193 pp.

**Hattori M y Brandon MR** (1979). Thymus and the endocrine system: Ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J Endocrinol* **83**, 101-111.

**Hinojosa L y Rosas P** (1994). Estudio de la respuesta del ratón hembra hipotímico al injerto de timo sobre la regulación de la pubertad espontánea. XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, O145.

**Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P** (1999). Effects of the thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* **163**, 255-260.

**Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura Pablo G, Castillo L, y Rosas P** (2004). Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by *in vitro* pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci* **76**, 795-804.

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

**Horecker BL** (1984). Thymosin. Distribution and Biosynthesis in vertebrate cell and tissues. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application*. Goldstein AL ed., New York: Plenum Press, 77-88 pp.

**Hrynevych Iula, Bendiuh HD, Iuhriova LH y Selez'nova TN** (2002). Endocrine function of the thymus in experimental hypothyroidism. *Fiziol Zh* **48**, 34-38.

**Hrynevych Iula, Bendiuh HD y Ostapenko OM** (2003). [Effect of thymostimulin on endocrine thymus function in thyroidectomized rats during suppressive hormone therapy] *Fiziol Zh* **49**, 43-46.

**Hsueh AJW, Billing H y Tsafiriri A** (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonal controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* **15**, 707-724.

**Imaizumi A, Gytoku J, Terada S y Kimoto E** (1981). Structural requirement for the biological activity of serum thymic factor. *FEBS Letters* **128**, 108-110.

**Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM, Tesone M** (2003). Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* **68**, 1577-1583.

**Isik AZ, Gulekli B, Zorlu CG, Ergin T y Gokmen O** (1997). Endocrinological and clinical analysis of hyperprolactinemic patients with and without ultrasonically diagnosed polycystic ovarian changes. *Gynecol Obstet Invest* **43**, 183-185.

**Jambon B, Montagne P, Bene M-C, Brayer M-P, Faure G y Duheille J** (1981). Immunohistologic localization of "facteur thymique serique" (FTS) in human thymic epithelium. *J Immunol* **127**, 2055-2059.

**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.

**Jennes L, Beckman WC, Stumph WE y Grzanna R** (1982). Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-system in the septo-hypothalamic area. *Exp Brain Res* **46**, 331-338.

**Jennes L, Beckman WC, Stumph WE y Grzanna R** (1983). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Exp Brain Res* **50**, 91-99.

**Jiang JY, Cheung CK, Wang Y y Tsang BK** (2003). Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* **8**, d222-237.

**Johnson LM y Gay VL** (1981). Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. *Endocrinology* **109**, 240-246.



- Jones MV, Brooks PA y Harrison NL** (1992). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid-activated Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *J Physiol* **449**, 279-293.
- Jones MV y Harrison NL** (1993). Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **70**, 1339-1349.
- Kaipia A y Hsueh A** (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Ann Rev Physiol Reprod* **59**, 349-363.
- Kaneko H, Watanabe G, Taya K y Sasamoto S** (1992). Changes in peripheral levels of bioactive and immunoreactive inhibin, estradiol-17 beta, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone associated with follicular development in cows induced to superovulate with equine chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* **47**, 76-82.
- Kim CY, Ryu JH, Maeyama K, Wakabayashi K, Watanabe T, Kim CY, Wakabayashi K y Nobunaga T** (1994). Time-dependent ovulation-blocking effect of ether anesthesia differs from pentobarbital in rats. *Tohoku J Exp Med* **172**, 237-242.
- Kim CY, Ryu JH, Maeyama K, Wakabayashi K, Watanabe T, Nobunaga T y Satoh H** (1996). The brain histamine (HA) and pituitary luteinizing hormone (LH) levels in female rats anesthetized with ether on proestrus. *Exp Anim* **45**, 175-177.
- Kimura F y Sano A** (1995). The effect of pentobarbital on the electrical activity of LHRH pulse generator in the ovariectomized rat with or without estrogen priming. *J Neuroendocrinol* **7**, 911-5.
- King JC y Rubin BS** (1995). Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cell Mol Neurobiol* **15**, 89-106.
- Kogo H, Takasaki K, Takeo S, Watanabe G, Taya K y Sasamoto S** (1993). Inhibition by indomethacin of the already accelerated secretion of inhibin and estradiol in equine chorionic gonadotropin-primed immature female rats. *Biol Pharm Bull* **16**, 483-485.
- Kordon C, Drouvas SV, Martínez de la EG y Weiner RI** (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press, 1621-1681.
- Kosiewicz MM y Michael SD** (1990). Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J Reprod Fert* **88**, 427-440.
- Krasowski MD y Harrison NL** (1999). General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1278-1303.
- Krasowski MD y Harrison NL** (2000). The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *Br J Pharmacol* **129**, 731-743.
- Kumru S, Simsek M, Yilmaz B, Sapmaz E, Kutlu S, Sandal S y Canpolat S** (2001). Differential regulation of preovulatory luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by opioids in the proestrous rat. *Physiol Res* **50**, 397-403.

**Leadem CA, Burns DM y Benson B** (1988). Possible involvement of the hypothalamic dopaminergic system in the prolactin-inhibitory effects of the pineal gland in blind-anosmic male rats. *Neuroendocrinology* **48**, 1-7.

**Ledwitz-Rigby F y Scheid PG** (1990). Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins in vitro. VIII. Ovarian Workshop. Regulatory process and gene expression in the ovary, 473-478.

**Lindzey J y Korach KS** (1999). Estrogen action on the female reproductive tract. En: *Encyclopedia of Reproduction Vol 2*, Knobil E y Neill J eds. USA: Academic Press, 79-86 pp.

**Lintern-Moore S** (1972). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol Reprod* **17**, 155-161.

**Lintern-Moore S, Moore GPM y Pantelouris EM** (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic "nude" mice. The result of gonadotropin insufficiency?. *Exp Cell Res* **97**, 430-432.

**Lintern-Moore S y Pantelouris EM** (1976a). Ovarian development in athymic nude mice. III. The effect of PMSG and oestradiol upon the size and composition of the ovarian follicle population. *Mech Ageing Dev* **5**, 33-38.

**Lintern-Moore S y Pantelouris EM** (1976b). Ovarian development in athymic nude mice. V. The effects of PMSG upon the numbers and growth of follicles in the early juvenile ovary. *Mech Ageing Dev* **5**, 259-265.

**Lintern-Moore S y Pantelouris EM** (1975). Ovarian in athymic nude mice. I. The size and composition of the follicle population. *Mech Ageing Dev* **4**, 385-390.

**Liu ZH, Yue KZ, Ma SF, SunXS y Tan JH** (2003). Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in the pig. *Theriogenology* **59**, 775-85.

**Lovinger DM y Zhou Q** (1993). Trichloroethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in nodose ganglion neurons from the adult rat. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 771-776.

**Lovinger DM, Zimmerman SA, Levitin M, Jones MV y Harrison NL** (1993). Trichloroethanol potentiates synaptic transmission mediated by  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors in hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **264**, 1097-1103.

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

**Makara GB y Kovacs KJ** (1997). Lesioning of the hypothalamic paraventricular nucleus inhibits ether-induced ACTH but not prolactin release. *Neurobiology (Bp)* **5**, 403-411.

**Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN y Weigel NL** (1997). Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Molec Biol* **63**, 195-202.

**Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Raiti F, Palumbo G, Farinella Z, Cordaro S y Scapagnini U** (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. *Endocrinology* **125**, 1037-1045.

**Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanger B y Billing H** (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* **123**, 23-30.

**Marnett LJ** (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* **181-182**, 219-222.

**Matsumoto A y Arai Y** (1976). Developmental changes in synaptic formation in the hypothalamic arcuate nucleus of female rat. *Cell Tissue Res* **169**, 143-146.

**Mayers DJ, Hindmarsh KW, Sankaran K, Gorecki DK y Kasian GF** (1991). Chloral hydrate disposition following single-dose administration to critically ill neonates and children. *Dev Pharmacol Ther* **16**, 71-77.

**McCann SM** (1998). Introduction. *Ann NY Acad Sci* **840**, XIII-XIV.

**McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiri A y Hsueh AJ** (1997). Follicle stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod* **57**, 990-998.

**Mendoza ME, Martin D, Candelaria PG y Romano MC** (1995). Evidence that secretory products of the reticuloepithelial cells of rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *J Reprod Immunol* **28**, 203-215.

**Merchenthaler I, Culler MD, Petrusz P, Flerko B y Negro-Vilar A** (1989). Immunocytochemical localization of the gonadotropin-releasing hormone-associated peptide portion of the LHRH precursor in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the rat central nervous system. *Cell Tissue Res* **255**, 5-14.

**Michael SD** (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Greenwald GS y Terranova PF Eds. New York: Raven Press, 445-464 pp.

**Michael SD, De Angelo L y Kaikis-Astaras A** (1990). Plasma protein and hormone profiles associated with autoimmune oophoritis and ovarian tumorigenesis in neonatally thymectomized mice. *Autoimmunity* **6**, 1-12.

**Michael SD, 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 SD, Taguchi O, Nishizuka Y, McClure JE, Goldstein AL y Barkley MS** (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*. Schwartz NB y Hunzicker-Dunn M Eds. New York: Raven Press, 279-284 pp.

**Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K y Terada N** (1998). Supresión of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1253-1255.

- Mocchegiani A y Fabris N** (1995). Age-related thymus involution: zinc reverses the thymulin secretion defect. *Int J Immunopharmacol* **17**, 745-749.
- Mocchegiani A, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E y Fabris N** (1990). Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* **33**, 7-14.
- Mocchegiani E, Sartorio A, Santarelli L, Ferrero S y Fabris N** (1996). Thymulin, zinc and insulin-like growth factor-I (IGF-I) activity before and during recombinant growth hormone (rec-GH) therapy in children and adults with GH deficiency. *J Endocrinol Invest* **19**, 630-637
- Moliner P, Soutto M, Benot, S, Hmadcha A y Guerreo JM** (2000). Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin  $\alpha$ 1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J Neuroimmunol* **103**, 180-188.
- Montes GS y Luque EH** (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* **133**, 192-199.
- Morán C, Morales L, Razo RS, Apolonio J, Quiróz U, Chavira R y Domínguez R** (2003). Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sci* **73**, 2113-2125.
- Morgan DD y Grossman CJ** (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* **7**, 279-286.
- Mori H, Ohkawa T, Takada S, Morita T, Yago N, Arakawa S y Okinaga S** (1994). Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on steroidogenesis in the rat ovary. *Horm Res* **41** Suppl 1, 14-21.
- Naz RK, Kaplan P y Goldstein AL** (1992). Thymosin alpha-1 enhances the fertilizing capacity of human sperm cell: implication in diagnosis and treatment of male infertility. *Biol Reprod* **47**, 1064-1072.
- 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. *Endocrinology* **89**, 886-893.
- Nishizuka Y, Sakakura T, Tsujimura T y Matsumoto K** (1973). Steroid biosynthesis in vitro by dysgenetic ovaries induced by neonatal thymectomy in mice. *Endocrinology* **93**, 786-792.
- Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M y Dones J** (1999). Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonatrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* **14**, 2844-2850.
- Ojeda SR y Urbanski HF** (1994). Puberty in the rat. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 363-409 pp.

- Palkovits M** (2000). Micro- and macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En: Neuroendocrinology in physiology and medicine. Conn PM y Freeman ME eds. Totowa, New Jersey: Human Press, 23-40 pp.
- Papaleo E, Doldi N, De Santis L, Marelli G, Marsiglio E, Rofena S y Ferrari A** (2001). Carbegoline influences ovarian stimulation in hyperprolactinaemic patients with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod **16**, 2263-2266.
- Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A y Tesone M** (2002). Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. Biol Reprod **6**, 481-486.
- Pedernera E, Diaz-Osuna J y Calcagno M** (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. Life Sci **38**, 779-787.
- Peoples RW y Weight FF** (1994). Trichloroethanol potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid-activated in mouse hippocampal neurones. Br J Pharmacol **113**, 555-563.
- Peoples RW y Weight FF** (1998). Inhibition of excitatory amino acid-activated currents by trichloroethanol and trifluoroethanol in mouse hippocampal neurones. Br J Pharmacol **124**, 1159-1164.
- Peters H** (1978). Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrate ovary. Comparative Biology. Jones RE Ed. New York: Plenum Press, 121-145.
- Pierpaoli W y Besedovsky HO** (1975). Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. Clin Exp Immunol **20**, 323-338.
- Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar R y Aguilar E** (1998). Effects of N-methyl-D-aspartic acid and kainic acid on prolactin secretion in hyper- and hypoprolactinaemic conditions. Eur J Endocrinol **138**, 460-466.
- Pistis M, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ** (1997). The interaction of general anaesthetics with recombinant GABA<sub>A</sub> and glycine receptors expressed in xenopus laevis oocytes: a comparative study. Br J Pharmacol **122**, 1707-1719.
- Pléau JM, Dardenne M, Blouqui Y y Bach JF** (1977). Structural study of circulating thymic factor: A peptide isolated from pig serum. J Biol Chem **252**, 845-847.
- Pléau JM, Fuentes V, Morgat JL y Bach JF** (1980). Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. Proc Natl Acad Sci **77**, 2861-2865.
- Prépin J** (1991). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire foetal de rat *in vitro*. CR Acad Sci Paris **313**, 407-411.
- Prépin J** (1993). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des gonocytes dans le testicule foetal de rat *in vitro*. CR Acad Sci Paris **316**, 451-454.
- Prépin J, Le Vigouroux P y Dadoune JP** (1994). Effects of thymulin on *in vitro* incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into gonocytes of newborn rat testes. Reprod Nutr Dev **34**, 289-294.

**Ramírez VD** (1973). Endocrinology of puberty. En: Handbook of physiology. American Physiological Society. Washington DC, 1-29 pp.

**Rebar RW, Miyake A, Low TLK y Goldstein AL** (1981a). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* **214**, 669-671.

**Rebar RW, Morandini IC, Benirschke K y Petze JE** (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: Prevention by athymic transplantation. *Endocrinology* **107**, 2130-2132.

**Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF y Petze JE** (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal female. *Endocrinology* **108**, 120-126.

**Reinshc RC, Murphy AA, Morales AJ y Yen SS** (1994). The effects of RU486 and leuprolide acetate on uterine artery blood flow in the fibroid uterus: a prospective, randomized study. *Am J Obstet Gynecol* **170**, 1623-1628.

**Reis FM, Polisseni F, Pereira VM, Cassali GD, Reis AM, Faletti AG y Camargos AF** (2004). Effect of pretreatment with prolactin on the distribution of immunoreactive beta-endorphin through different ovarian compartments in immature, superovulated rats. *J Mol Histol* **35**, 759-764.

**Reis FM, Santos MA, Reis AM y Coimbra CC** (1994). Effects of hyperprolactinemia on plasma glucose and prolactin in rats exposed to ether stress. *Physiol Behav* **56**, 495-499.

**Reyes-Esparza JA y Romano MC** (1989). An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *J Steroid Biochem* **34**, 541-545.

**Richards JS y Hedin L** (1988). Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* **50**, 441-63.

**Roitt I, Brostoff J y Male D** (1993). *Inmunology*. 3a ed. Editorial Consultant, Inglaterra, 3.1-3.6.

**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 de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM.

**Rosas P, Arguello MS y Domínguez 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 Domínguez 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, Hernández-Ehlers V, Quiróz U y Domínguez, 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 gonadotrópica sobre el crecimiento folicular en el ovario de ratones prepúberes normales e hipotímicos. XIII Reunión de la Asociación Latinoamericana en Reproducción Humana (ALIRH). Buenos Aires, Argentina. L 44.

**Ross MH, Reith EJ y Romrell LJ** (1992). Histología. 2a. edición. Editorial Panamericana. México, 623-633.

**Saadé NE, Lawand HF, Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Atweh SF y Jabbur SJ** (1999). Thymulin induces *c-fos* expression in the spinal cord of rats which is reversed by meloxicam and morphine. *J Neuroimmunol* **97**, 16-24.

**Saadé NE, Major SC, Jabbur SJ, Atweh SF, Kanaan SA y Safieh-Garabedian B** (1998). Involvement of capsaicin sensitive primary afferents in thymulin-induced hyperalgesia. *J Neuroimmunol* **91**, 171-179.

**Safieh B, Kendall MD, Norman JC, Metreau E, Dardenne M, Bach JF y Pléau JM** (1990). A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *J Immunol Meth* **127** 255-262.

**Safieh B, Venn GE, Ritter MA, Singh S, Buckingham JC y Kendall MD** (1991). Plasma thymulin concentrations in cardiac patients: involvement with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Physiol* **438**, 50 pp.

**Safieh-Garabedian B, Ahmed K, Khamashta MA, Taud NA y Hughes GR** (1993). Thymulin modulates cytokine release by peripheral blood mononuclear cells: a comparison between healthy volunteers and patient with systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* **101**, 126-131.

**Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Kanaan SA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE** (2000). The role of cytokines and prostaglandin-E(2) in thymulin induced hyperalgesia. *Neuropharmacol* **39**, 1653-1661.

**Safieh-Garabedian B, Jalakhian RH, Jabbur SJ, Saadé NE y Kanaan SA** (1998). Thymulin in high doses reduces endotoxin-induced hyperalgesia by reducing interleukin-1 $\beta$ , and nerve growth factor levels in the hind paw of rats. En: Pain mechanisms and management. Apkarian AV y Ayrapetian S eds. Amsterdam:IOS Press, 131-138 pp.

**Safieh-Garabedian B, Jalakhian RH, Saadé NE, Haddad JJ, Jabbur SJ y Kanaan SA** (1996). Thymulin reduces hyperalgesia induced by peripheral endotoxin injection in rats and mice. *Brain Res* **717**, 179-183.

**Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Jalakhian RH, Poole S, Jabbur SJ y Saadé NE** (1997a). Hyperalgesia induced by low doses of thymulin injections: possible involvement of prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Neuroimmunol* **73**, 162-168.

**Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Jalakhian RH, Poole S, Jabbur SJ y Saadé NE** (1997b). Involvement of interleukin-1 $\beta$ , nerve growth factor, and prostaglandin E<sub>2</sub> in the hyperalgesia induced by intraplantar injection of low doses of thymulin. *Brain Behav Immu* **11**, 185-200.

**Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad CA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE** (2003). Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience* **121**, 865-873.

**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.

**Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T y Dardenne M** (1988). Thymic hormone containing cells. IX. Steroid *in vitro* modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* **30**, 479-484.

**Savino W, Dardenne M y Bach JF** (1983). Thymic hormone containing cell. III. Evidence for a feedback regulation of the secretion of the serum thymic factor (FTS) by thymic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* **52**, 7-12.

**Savino W, Dardenne M, Papiernik M y Bach JF** (1982). Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *J Exp Med* **156**, 628-633.

**Savino W, Gagnerault M-CI, Bach JF y Dardenne M** (1990). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. *Life Sci* **46**, 1687-1697.

**Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S y Dardenne M** (1984). Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuation in the thyroid hormone levels *in vivo* can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* **55**, 629-635.

**Sholiton LJ, Grossman CJ y Taylor BB** (1980). Rat thymic homogenates convert testosterone to androgenic metabolites. *J Steroid Biochem.* **13**, 1365-1369.

**Silverman AJ, Livne I y Witkin JW** (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 1683-1709 pp.

**Sorrentino S Jr** (1979). Ovulation in PMS-treated rats with gonadotropin releasing hormone after pentobarbital and melatonin block. *Neuroendocrinology* **19**, 170-176.

**Spangelo BL, Judd AM, Ross PC, Login IS, Jarvis WD, Badamchian M, Goldstein AL y MacLeod RM** (1987). Thymosin fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* **121**, 2035-2043.

**Spremovic-Radjenovic S, Popovic V, Matijasevic S, Lazovic G y Petkovic S** (1997). Effect of opioids and gamma-aminobutyric acid on ovulation. *Srp Arc Celok Lek* **125**, 329-332.

**Srivastava RK, Krishna A y Sridaran R** (1995). Follicular development, steroidogenesis and gonadotrophin secretion in response to long-term treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist in the rat. *J Endocrinol* **146**, 349-57.



- Steinetz BG** (1978). Secretion and function of ovarian estrogen. En: Handbook of Physiology. Greep RO y Astwood E eds. American Physiological Society, Washington.439-466.
- Stojilkovic SS, Reinhart J y Catt KJ** (1994). Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Rev* **15**, 462-499.
- Stoker TE, Robinette CL, Britt BH, Laws SC y Cooper RL** (1999). Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat: effects on the adult prostate. *Biol Reprod* **61**, 1636-1643.
- Taguchi O, Nishizuka Y, Sakakura T y Kojima A** (1980). Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin Exp Immunol* **40**, 540-533
- Tilly JL y Tilly KL** (1995). Inhibitory of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to supress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* **136**, 242-252.
- Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, Gonzalez-Suarez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A** (2000). Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* **165**, 193-205
- Timsit J, Safieh B, Gagnerault MC, Savino W, Lubetziki J, Bach JF y Dardenne M** (1990). Increase of circulating levels of thymulin in hyperprolactinemia and acromegaly. *CR Acad Sci III* **310**, 7-13.
- Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF y Dardenne M** (1992). Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metabol* **75**, 183-188.
- Tohei A, Tomabechi T, Mamada M, Akai M, Watanabe G y Taya K** (1997). Effects of repeated ETHER stress on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J Vet Med Sci* **59**, 329-334.
- Tsafiriri A** (1995). Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* **377**, 121-40.
- Tsafiriri A y Reich R** (1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**, 1-11.
- Uzumcu M y Lin YC** (1994). Characterization of stimulatory actions of thymic factors (s) on basal and gonadotropin-induced steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* **105**, 209-216.
- Uzumcu M, Akira S y Lin YC** (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cell. *Life Sci* **51**, 1217-1228.
- Van-Voorhis BJ** (1998). Follicular development. En: *Encyclopedia of Reproduction Vol 2*, Knobil E y Neill JD Eds. USA: Academic Press, 376-389 pp.
- Vécsei L, Faludi M, Najbauer J** (1987). The effect of "Facteur Thymique Serique" (FTS) on catecholamine and serotonin neurotransmission in discrete brain regions of mice. *Acta Physiol Hun* **69**, 129-132.

- Vertuani S, Angusti A y Manfredini S** (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* **10**, 1677-1694.
- Villa-Verde DMS, De Mello-Coelho V, Farias-de-Oliveira DA, Dardenne M y Savino W** (1993). Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* **133**, 867-875.
- Villavicencio J y Domínguez R** (1993). Differences in follicular growth and atresia induced by gonadotrophin stimulation in pre-pubertal rats are age-dependent. *Med Sci Res* **21**, 361-362.
- Villavicencio J, Flores A y Domínguez R** (1993). Age dependence of the ovulatory response to gonadotropins in prepubertal rats. *Med Sci Res* **21**, 69-71.
- Vu K, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA y Kurkman RJ** (1998). Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol* **29**, 359-363.
- Weick RF, Smith ER, Dominguez R, Dhariwal APS y Davidson JM** (1971). Mechanism of the stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology* **88**, 293-301.
- Wise T** (1998). *In vitro* and *In vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* **66**, 129-135
- Wise T y Ford JJ** (1999). Effects of the thymic peptide thymulin on in vitro and in vivo testicular steroid concentrations in white composite and meishan boars. *J Anim Sci* **77**, 2240-2251.
- Wise T y Maurer RR** (1991). Characterization of thymosin alpha 1 and beta 4 during the bovine estrual period: effects of elevated estradiol and progestin. *Biol Reprod* **45**, 57-63.
- Witkin JW y Demasio KA** (1989). Density of synaptic input is identical to smooth-countoured an thorny GnRH neurons in the male rat. *Soc Neurosci Abstr* **15**, 1082.
- Wray S y Hoffman G** (1986). Catecholamine innervation of LH-RH neurons: A developmental study. *Brain Res* **399**, 327-331.
- Wu J, Harata N y Akaike N** (1996). Potentiation by sevoflurane of the gamma-aminobutyric acid-induced chloride current in acutely dissociated ca1 pyramidal neurones from rat hippocampus. *Br J Pharmacol* **119**, 1013-1021.
- Wu X, Wang H, Englund K, Blanck A, Lindblom B y Sahlin L** (2002). Expression of progesterone receptors A and B and insulin-like growth factor-I in human myometrium and fibroids after treatment with a gonadotropin-releasing hormone analogue. *Fertil Steril* **78**, 985-993.
- Yago N** (1994). The effects of GnRH agonist on steroidogenesis in the rat ovary. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* **70**, 543-54
- Yamada K, Mimaki Y y Sashida Y** (2005). Effects of inhaling the vapor of *Lavandula burnatii* super-derived essential oil and linalool on plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental menopausal female rats. *Biol Pharm Bull* **28**, 378-379.

**Yazar S, Kilic E, Saraymen R y Ozbilge H** (2004). Serum malonaldehyde levels in patients infected with Plasmodium vivax. *West Indian Med J* **53**, 147-149.

**Yogev L, Yavetz H, Gottreich A, Oppenheim D, Homonnai ZT y Paz G** (1994). Serum prolactin response to ether stress in diabetic rats:opiate system contribution. *Proc Soc Exp Biol Med* **205**, 248-252.

**Zaidi SA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT.** (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **89**, 253-264.

**Zhao XH, Awaya A, Kobayashi H, Ohnuki T, Tokumitsi Y y Nomura Y** (1990). Effects of repeated administrations of facteur thymique sérique (FTS) on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mouse (SAM). *Jn J Pharmacol* **53**, 311-319.

**Zimmermann T, Wehling M y Schulz HU** (1998). The relative bioavailability and pharmacokinetics of chloral hydrate and its metabolites. *Arzneimittelforschung* **48**, 5-12.

## PUBLICACIONES

1. **García L**, Hinojosa L, Olvera E, Domínguez R y Rosas P (2002). Effects of the injection of thymulin into the median hypothalamus (MH) on ovulatory response in prepubertal mice treated with equine chorionic gonadotrophin (eCG) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH). *Biology of Reproduction* **66**, Supp. 1, Abs 511. Baltimore, Maryland, USA., 28 al 31 de julio.
2. **García L**, Hinojosa L, Olvera E, Chavira R, Romano MC, Domínguez R y Rosas P (2002). La microinyección de timulina en el hipotálamo medio, modifica el bloqueo en la ovulación inducido por la anestesia con éter, en ratones prepúberes tratados con gonadotropinas. XLV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Colima, Col. 8-12 septiembre, O16.
3. **García L**, Hinojosa L, Domínguez R y Rosas P (2003). En el ratón prepúber tratado con eCG, la inyección de timulina en la hipófisis restablece la ovulación bloqueada por la anestesia con éter. XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas-ALACF. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 1-4 septiembre. PT04.072.
4. **García L**, Hinojosa L, Domínguez R y Rosas P (2004). Induced ovulation by thymulin injection into the medial hypothalamus or pituitary in prepubertal mice treated with equine chorionic gonadotrophin. XXIX Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción y la IV Reunión de la Sociedad Mexicana de Biología de la Reproducción Humana, A.C. Oaxaca, Oax. 27 al 29 de mayo. 178-186 pp.
5. Velázquez D, **García L** y Rosas P (2004). Análisis de la población folicular de los ovarios de ratones prepúberes inyectados con timulina en el hipotálamo y tratados con eCG. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.* **7**(2), 120.
6. **García L**, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P (2005). Effects of injecting thymulin into the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* **12**(5), 314-320.