



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA SOBRE LA LIBERACIÓN
DE FSH Y LH POR LAS CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS EN CULTIVO.
INFLUENCIA DEL DÍA DEL CICLO ESTRAL Y DE LOS
ESTEROIDES SEXUALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

CLAUDIA CIPACTLI ORTEGA RODRÍGUEZ

Directora de tesis
Dra. Patricia Rosas Saucedo



México, D.F.

Octubre del 2007



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

* ZARAGOZA *

CARRERA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE
FSH Y LH POR LAS CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS EN CULTIVO.
INFLUENCIA DEL DÍA DEL CICLO ESTRAL Y DE LOS
ESTEROIDES SEXUALES

Tesis presentada por: Claudia Cipactli Ortega Rodríguez

Directora de tesis: Dra. Patricia Rosas Saucedo

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

Durante la realización de esta tesis se contó con el
apoyo de la DGAPA-PAPIIT clave IN228005 y el
CONACYT-2002-C01-40300/A-1

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y mi más profundo respeto:

A Hunyeli por que siempre has estado a mi lado en los momentos más felices y más difíciles de mí vida

A mi mamá por todos los valores que de ti he aprendido, por, tu paciencia, tu temple, pero sobretodo porque me enseñaste lo que es el cariño

A mi papá porque eres un gran amigo y por todo el apoyo que me has brindado en todo momento

¡Lo logramos!

Agradecimientos

A la Dra. Paty Rosas por los conocimientos que me ha compartido, su infinito apoyo y su gran amistad

A la Dra. Lorena Hinojosa Baca por su asesoría y consejos

A los miembros del jurado:

*Dra. Patricia Rosas Saucedo
Biol. Carlos Martínez Montoya
Biol. Cristina Alvarado Domínguez
Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. María Elena Ayala Escobar*

Por su colaboración y sus importantes aportaciones durante la revisión de esta tesis

Al Laboratorio de Hormonas Esteroides y Hormonas Proteicas del Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”, al Biol. Mario Cárdenas León y al Biol. Roberto Chavira por su colaboración para la cuantificación de las hormonas por radioinmunoanálisis.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano, de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología, por el apoyo para la realización de los cultivos.

A la MVZ Adriana Altamirano y al personal técnico del Bioterio de la FES-Zaragoza por la asistencia a las ratas que fueron utilizadas en esta investigación.

Al Dr. Isaias Hazarmabeth Salgado Ugarte por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

A mi mamá que me apoyo en cada momento.

A hunyeli por todo el respaldo que me dio a lo largo de la realización de la tesis y durante todos los trámites

A mis hermanas y a mis tías.

A mi mejor amiga Adriana Ibarra y a Sergio por todos los momentos que hemos compartido, sus consejos y apoyo.

A cada uno de mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción: Adriana, Bárbara, Lore Hinojosa, Lore García, Juanita, Eloyr y a Naham (por su colaboración en los cultivos).

ÍNDICE	Página
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
I. Conexiones hipotálamo-hipofisarias	1
II. Estructura y función del ovario	6
III. Ciclo estral de la rata	17
IV. Características morfofuncionales del timo	18
V. Timulina	22
VI. Relaciones funcionales entre el timo y el sistema reproductor .	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	34
1. Liberación basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.	34
2. Respuesta de las células de adenohipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral a la estimulación con GnRH sobre la liberación de FSH y LH	34
3. Efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis en cultivo, obtenidas de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral	37
4. Efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células adenohipofisarias pretratadas con progesterona y testosterona en las concentraciones características de los machos	39
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

El timo participa en la regulación del eje-hipotálamo-hipofisis-gonada por medio de las hormonas que sintetiza, entre ellas la timulina. Diversos estudios *in vitro* realizados con células adenohipofisarias, señalan que la timulina es capaz de estimular la liberación de una o ambas gonadotropinas. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la liberación de FSH y LH en respuesta a la timulina en presencia o no de GnRH, es diferente si las células adenohipofisarias provienen de ratas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral (D1, D2, P, E) e incubadas durante tiempos cortos. Por otra parte hemos mostrado que la timulina modifica la liberación de las gonadotropinas dependiendo de la exposición previa a los esteroides sexuales. Por lo anterior, se decidió analizar si las diferencias en los efectos de la timulina a lo largo del ciclo estral de la rata se mantienen después de un período prolongado de preincubación y si las concentraciones de esteroides sexuales, características de los machos, regulan de manera diferencial la sensibilidad de las células adenohipofisarias a la acción de la timulina.

En todos los experimentos se evaluaron en el medio de cultivo las concentraciones de FSH y LH (ng/ml) por RIA. Los datos se expresaron como $\text{media} \pm \text{e.e.m.}$ de 3 experimentos por triplicado y una $p < 0.05$.

Días del ciclo estral: Se utilizaron células de adenohipofisis obtenidas de ratas en D1, D2, P o E y preincubadas por 48 h, se realizó un cambio de medio y se incubaron por 3 h con Timulina (100 ng/ml), GnRH (10^{-9} M), GnRH+Timulina y sin tratamiento. Los resultados mostraron que la FSH presentó una secreción basal mayor en P que en D1 (88 ± 2 vs 58 ± 6). La

respuesta a GnRH fue mayor en D2 y E respecto a D1 (100 ± 4 , 104 ± 6 vs 62 ± 8). La adición de timulina incrementó la secreción basal en D2 (107 ± 4 vs 65 ± 8) y en el mismo día potenció la acción de GnRH (118 ± 4 vs 100 ± 4). Para LH se observó un aumento en la secreción basal en P y E respecto a D1 (76 ± 10 , 81 ± 16 vs 25 ± 2), mientras que timulina la estimuló en D1 (45 ± 5 vs 25 ± 2). Con GnRH no se observaron cambios significativos.

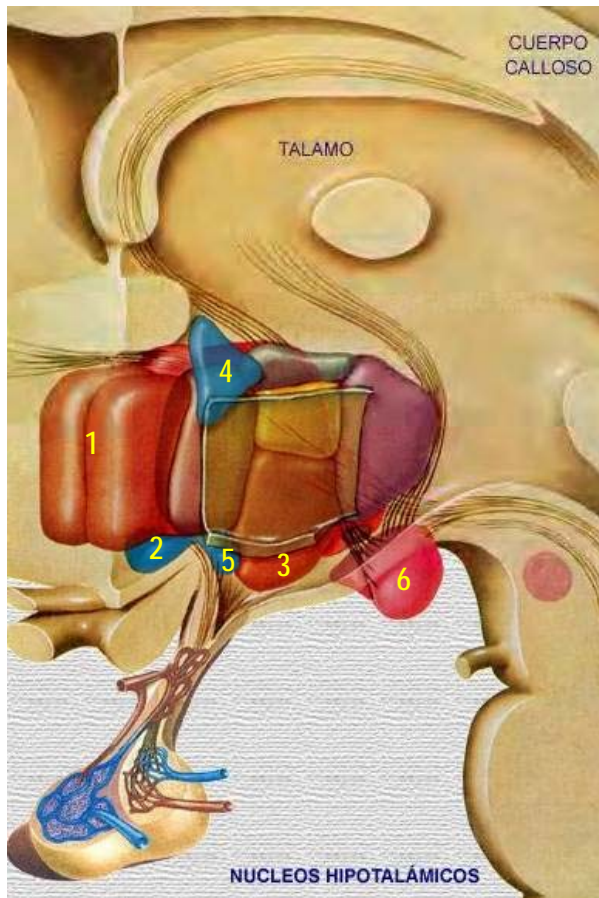
Esteroides sexuales: Las células se preincubaron con P_4 (2 ng/ml) o T (3 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Se realizó el cambio de medio por medio fresco. Las células de adenohipófisis se trataron o no con Timulina, GnRH (10^{-9}M) o GnRH+Timulina durante 3 h. El pretratamiento con P_4 incrementó la liberación basal y estimulada de FSH (7 ± 0.2 vs 5 ± 0.3 , 21 ± 0.2 vs 13 ± 0.5), mientras que inhibió la liberación basal de LH (22 ± 1 vs 27 ± 1), respuesta que no modificó la adición de timulina. En los cultivos preincubados con testosterona se incrementó la secreción basal y estimulada sólo de FSH (8 ± 0.3 vs 5 ± 0.3 , 20 ± 0.4 vs 13 ± 0.5), sin embargo el tratamiento con timulina aumentó la liberación basal de ambas gonadotropinas (10 ± 0.4 vs 8 ± 0.3 , 25 ± 0.7 vs 22 ± 1). En conclusión, la capacidad de respuesta de las células adenohipofisarias a timulina depende del tiempo de incubación de los cultivos, de la presencia o no de GnRH y de la sensibilidad que le confiere el esteroide al gonadotropo.

INTRODUCCIÓN

I. Conexiones hipotálamo-hipofisarias.

El hipotálamo es la parte del diencéfalo que se extiende desde la región del quiasma óptico hasta el borde caudal de los cuerpos mamilares. Se ubica en el centro del sistema límbico, por debajo del surco hipotalámico sobre la pared lateral del tercer ventrículo. Esta estructura está constituida por un complejo conjunto de grupos celulares y haces de fibras nerviosas distribuidas en tres regiones: anterior, media y posterior, en las cuales se encuentran varios núcleos entre ellos preóptico, supraquiasmático, ventromedial, paraventricular, supraóptico, infundibular y cuerpos mamilares. Estos núcleos están conectados mediante fibras aferentes o eferentes, con la corteza cerebral, la hipófisis, el tálamo y con el tronco encefálico (Iversen y col., 2001) (Fig. 1.).

En el hipotálamo anterior se encuentra el área preóptica, caudalmente se fusiona con el tegumento del mesencéfalo. Por arriba se ubica el tálamo y por debajo y lateralmente la región subtalámica. Además se relaciona con el infundíbulo que está constituido por las prolongaciones de las células nerviosas que forman algunos de los núcleos hipotalámicos. En el infundíbulo convergen y divergen numerosas vías endócrinas razón por la cual puede controlar e integrar funciones del sistema nervioso autónomo, actuando sobre las respuestas somáticas y el sistema endócrino por acción directa sobre la hipófisis (Carpenter, 1998; Page, 1999; Iversen y col., 2001; Snell, 2001; Ira, 2003).



1. Núcleo preóptico
2. Núcleo supraquiasmático
3. Núcleo ventromedial
4. Núcleo paraventricular
5. Núcleo supraóptico
6. Cuerpos mamilares

Fig. 1. Esquema que muestra la ubicación de los núcleos hipotalámicos (tomado de Iversen y col., 2001).

La hipófisis se encuentra inmediatamente por debajo del hipotálamo y está alojada en la fosa hipofisaria del hueso esfenoidal llamada silla turca e incluida en la duramadre que cierra el compartimento de la silla turca por medio del diafragma de la misma. Esta membrana está perforada en el centro para dar paso al infundíbulo que une a la hipófisis con el *tuber cinereum* del hipotálamo (Geneser, 2000; Ira, 2003).

La hipófisis está dividida estructural y funcionalmente en dos lóbulos, la adenohipófisis constituida por un parénquima glandular rojizo de consistencia blanda y un lóbulo más pequeño, blanco y más firme denominado neurohipófisis. Ambas partes tienen orígenes embrionarios diferentes. La adenohipófisis procede de una invaginación del tejido epitelial (la bolsa de Rathke) que migra hacia arriba de la cavidad bucal embrionaria, mientras que la neurohipófisis se forma del diencéfalo como una prolongación del tejido cerebral (Geneser, 2000; Ira, 2003).

A su vez la adenohipófisis está constituida por dos partes, la parte distal que representa la zona de la glándula con mayor carácter endócrino y la parte tuberal que es una extensión delgada en contacto con el infundíbulo. En el feto existe la parte intermedia que es una banda que queda entre la adenohipófisis y la neurohipófisis; durante el desarrollo fetal, sus células se mezclan con la adenohipófisis de manera que ya no constituyen una estructura separada (Geneser, 2000; Ira, 2003).

Estudios de inmunocitoquímica han permitido identificar en la parte distal de la adenohipófisis cinco tipos celulares funcionales:

- Somatotropas. Son las más comunes y constituyen aproximadamente el 50% de las células de la adenohipófisis. Son células ovales que sintetizan somatotropina u hormona del crecimiento (GH). La regulación de la liberación de la GH está a cargo de dos hormonas hipotalámicas, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento GHRH y la somatostatina que inhibe la liberación de la GH.

- Lactotropas. Constituyen del 15 al 20% de las células parenquimatosas de la adenohipófisis. Estas células producen prolactina (PRL) cuya síntesis y liberación está bajo el control inhibitor de la dopamina, el estimulante de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y el péptido inhibitor vasoactivo (VIP).

- Corticotropas. También componen del 15 al 20% de la adenohipófisis. Estas células producen la hormona adenocorticotrópica o adenocorticotropina (ACTH), cuya liberación es regulada por la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) secretada por el hipotálamo.

- Gonadotropas. Constituyen alrededor del 10% de las células de la adenohipófisis. Estas células sintetizan tanto a la hormona estimulante del folículo (FSH) como a la hormona luteinizante (LH). Muchas de las células gonadotropas son capaces de producir ambas, sin embargo estudios inmunocitoquímicos indican que algunos gonadotropos secretan o una u otra gonadotropina. La liberación de FSH y LH es regulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que es sintetizada por el hipotálamo.

- Tirotropas. Constituyen más o menos el 5% de las células y sintetizan la hormona tirotrópica o tirotrópina (TSH). La liberación de la TSH se encuentra bajo el control hipotalámico de la TRH. La TSH actúa sobre la tiroides y estimula la producción de la tiroglobulina y de las hormonas tiroideas (Ross y col., 2005).

La neurohipófisis es la parte nerviosa de la hipófisis y está en contacto con la adenohipófisis y el infundíbulo. En la neurohipófisis se almacenan y liberan dos hormonas que se sintetizan en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, la hormona antidiurética o vasopresina y la oxitocina respectivamente (Geneser, 2000; Ira, 2003).

Las vías que permiten al hipotálamo influir sobre la hipófisis son dos: los axones de las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular que viajan por el tallo hipofisario hacia la neurohipófisis y los vasos sanguíneos del sistema porta hipotálamo-hipofisario que conectan sinusoides en la eminencia media y el infundíbulo con plexos capilares en la adenohipófisis, donde las sustancias liberadas por el hipotálamo estimulan o inhiben la secreción de alguna hormona hipofisaria (Carpenter, 1998; Snell, 2001) (Fig. 2).

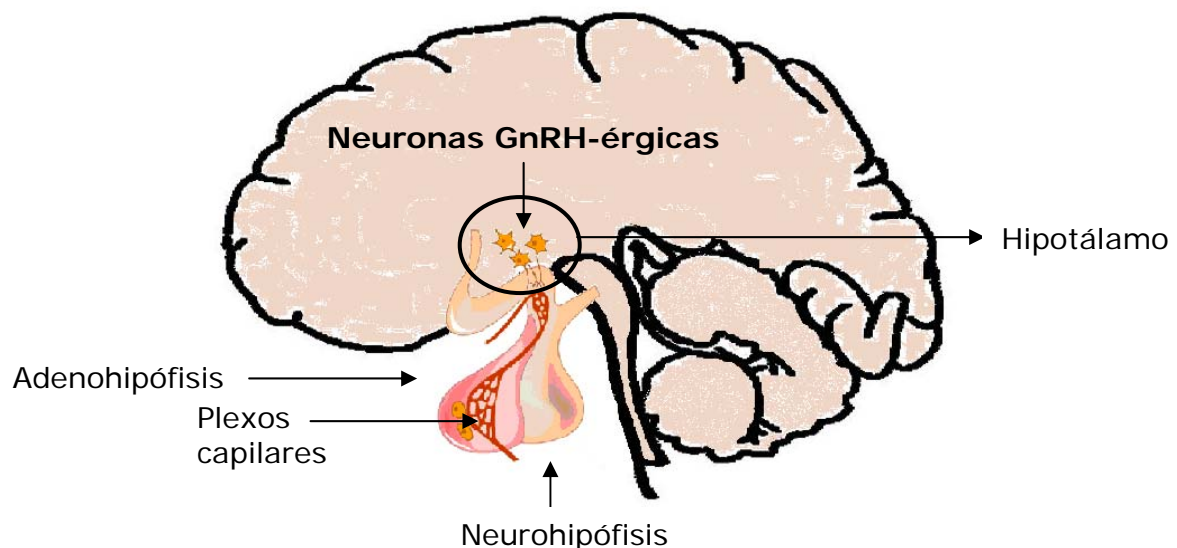


Fig. 2. Esquema que representa la ubicación anatómica de la hipófisis con respecto al hipotálamo. Se muestran las neuronas GnRH-érgicas y los plexos capilares de la adenohipófisis (modificado de Audesirk y Audesirk, 1997).

II. Estructura y función del ovario.

Los ovarios son órganos pares, que se encuentran fijos a la superficie posterior del ligamento llamado mesovario. Los ovarios tienen dos funciones, la producción y maduración de ovocitos viables y la secreción de hormonas esteroideas y polipeptídicas. Cada ovario está compuesto por una corteza y una médula, la primera se compone de un estroma de tejido conectivo en el que se incluyen los folículos ováricos y la segunda está formada por tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos y fibras nerviosas (Ross, 1990; Geneser, 2000; Miller y Leavell, 2001).

El ovario consta de tres compartimentos, el folicular, el luteal y el intersticial (Yeh y Adashi, 2001) (Fig. 3).

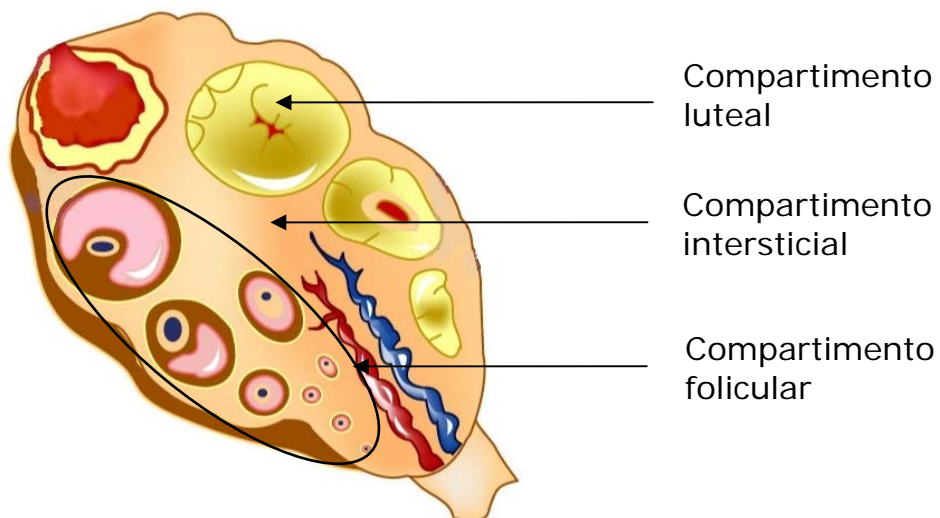


Fig. 3. Representación que muestra los tres compartimentos que conforman al ovario (modificado de Audesirk y Audesirk, 1997).

Folicular

El folículo es la unidad anatómica del ovario del que se derivan los otros compartimentos. Los folículos primordiales están formados por un ovocito rodeado de una capa de epitelio circundante o células foliculares (Ross, 1990; Geneser, 2000).

Los folículos primarios son aquellos que han comenzado su crecimiento al ser estimuladas las células foliculares por la FSH. El ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares adquieren un aspecto granular por lo que se les denomina células de la granulosa, mismas que proliferan por repetidas divisiones mitóticas. La capa de células de la granulosa se encuentra separada del tejido conectivo por una membrana basal. Durante el crecimiento del ovocito se forma una gruesa membrana, la zona pelúcida, que separa al ovocito de las células de la granulosa. El folículo se hunde en la corteza y las células del estroma forman la teca folicular (Ross, 1990; Geneser, 2000).

Cuando aparecen entre las capas de la granulosa zonas irregulares (vesículas) que aumentan de tamaño, el folículo es llamado secundario. Las zonas llenas de líquido se fusionan para dar origen a una sola cavidad llamada antro folicular (Ross, 1990; Geneser, 2000).

Los folículos terciarios son aquellos en los cuales la teca se diferencia en una teca interna y otra externa, la capa interna es relativamente celular y provista de muchos capilares y la capa externa es más fibrosa y no tan vascularizada (Ham, 1985; Geneser, 2000).

Durante los estados finales del desarrollo folicular aparecen los folículos preovulatorios cuya capa de la granulosa se convierte en una estructura altamente vascularizada horas antes de la ovulación (Van Voorhis, 1999) (Fig. 4).

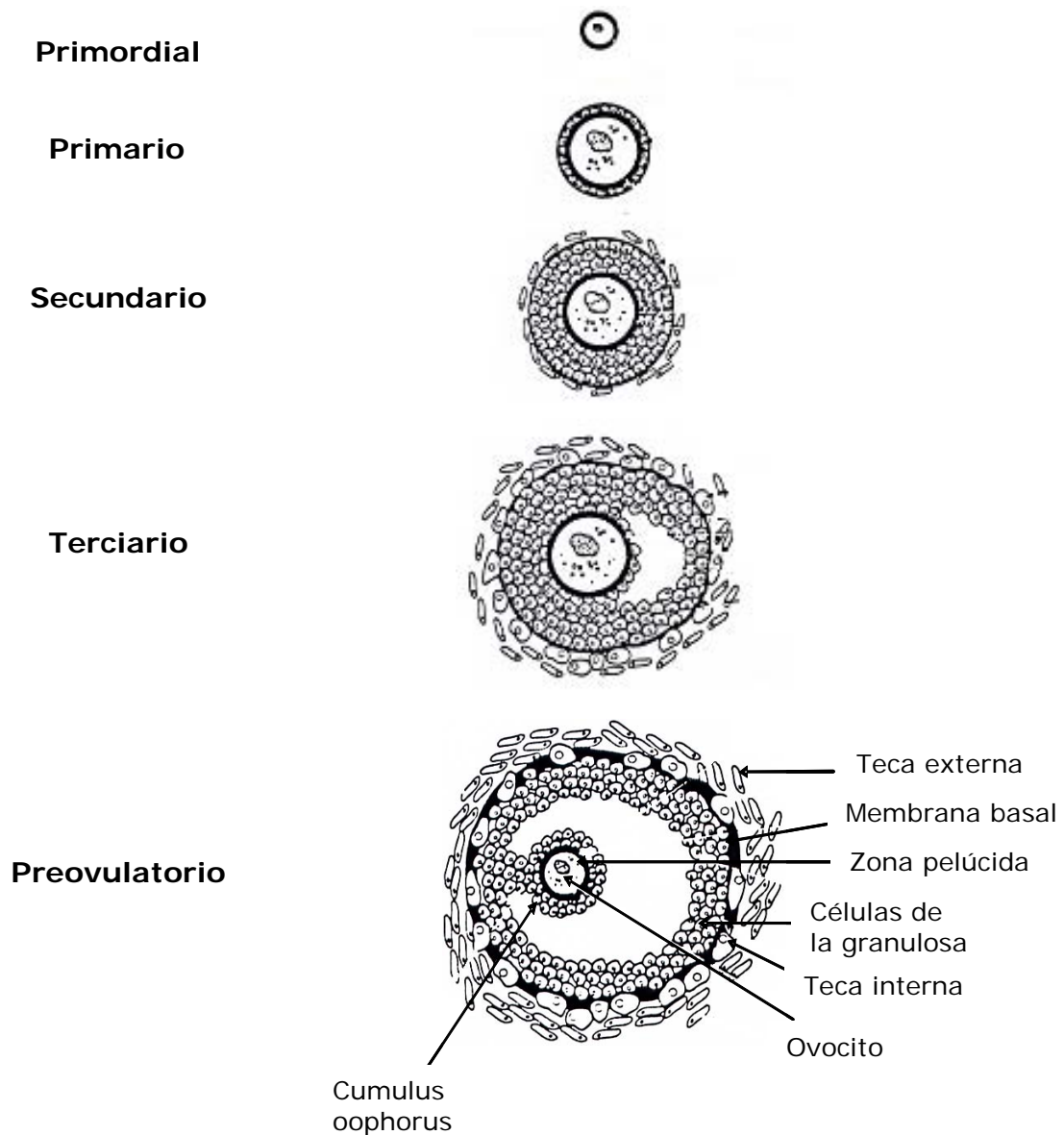


Fig. 4. Esquema que muestra los diferentes tipos de folículos durante el proceso de crecimiento folicular (tomado de Van Voorhis, 1999).

Luteal

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en el cuerpo lúteo. Después de la ruptura folicular los capilares y fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran en la membrana basal. Simultáneamente en las células de la granulosa se presentan cambios morfológicos colectivos conocidos como luteinización. Estas células, junto con las células tecointersticiales circundantes y la invasión por la vasculatura se entremezclan para originar el cuerpo lúteo. Esta glándula endócrina es la mayor fuente de hormonas esteroides sexuales secretadas por el ovario en la fase postovulatoria del ciclo (Yeh y Adashi, 2001).

Intersticial

El origen de las células que conforman el compartimento intersticial es heterogéneo. Se han identificado cuatro clases de células intersticiales (Yeh y Adashi, 2001).

- Intersticiales primarias: Es una población celular transitoria, se encuentran hasta la semana 20 en el compartimento medular del ovario fetal. Son morfológicamente similares a las células fetales de Leydig y carecen de capacidad esteroidogénica.
- Tecointersticiales: Presentes en todos los folículos en desarrollo, son responsables de la síntesis de andrógenos necesarios para el mantenimiento de los folículos en crecimiento y el proceso de atresia.
- Intersticiales secundarias: Células hipertrofiadas de la teca interna que sobreviven al proceso de atresia, se asientan en la región del folículo antiguo pero permanecen funcional y estructuralmente intactas.

- Hiliares-intersticiales: Situadas en el hilio ovárico en relación con estructuras vasculonerviosas, son indistinguibles de las células de Leydig. Poseen estructuras cristaloides hexagonales (*cristales de Reinke*) y alta capacidad secretora de andrógenos, que se manifiesta particularmente en la pubertad, embarazo y menopausia.

Las funciones ováricas, entre ellas la ovulación, dependen de una compleja sucesión de fenómenos endócrinos en los que participan el hipotálamo, la hipófisis y el propio ovario. En el hipotálamo se encuentran ubicadas las neuronas que secretan la GnRH, misma que al ser liberada hacia la hipófisis induce la síntesis y liberación de la FSH y la LH. La FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos en el ovario (Fawcett, 1995; Guyton y Hall, 1998).

A su vez los folículos en desarrollo secretan estrógenos por influencia de la FSH, ambas hormonas promueven la aparición de receptores a LH. La cantidad creciente de estrógenos, más el aumento de la LH, inducen en el folículo la proliferación de las células tecaes (Fawcett, 1995; Guyton y Hall, 1998).

Conforme el folículo crece, secreta cantidades cada vez mayores de estrógenos. Los estrógenos ejercen sus efectos a diferentes niveles. En el eje hipotálamo-hipofisario, las concentraciones elevadas de estrógeno a mitad del ciclo ovárico, estimulan la síntesis y liberación de FSH y LH mediante un efecto de retroalimentación positiva. En el ovario, promueve el desarrollo continuo del propio folículo y del ovocito primario que contiene (Fawcett, 1995; Audesirk y Audesirk, 1997; Guyton y Hall, 1998) (Fig. 5).

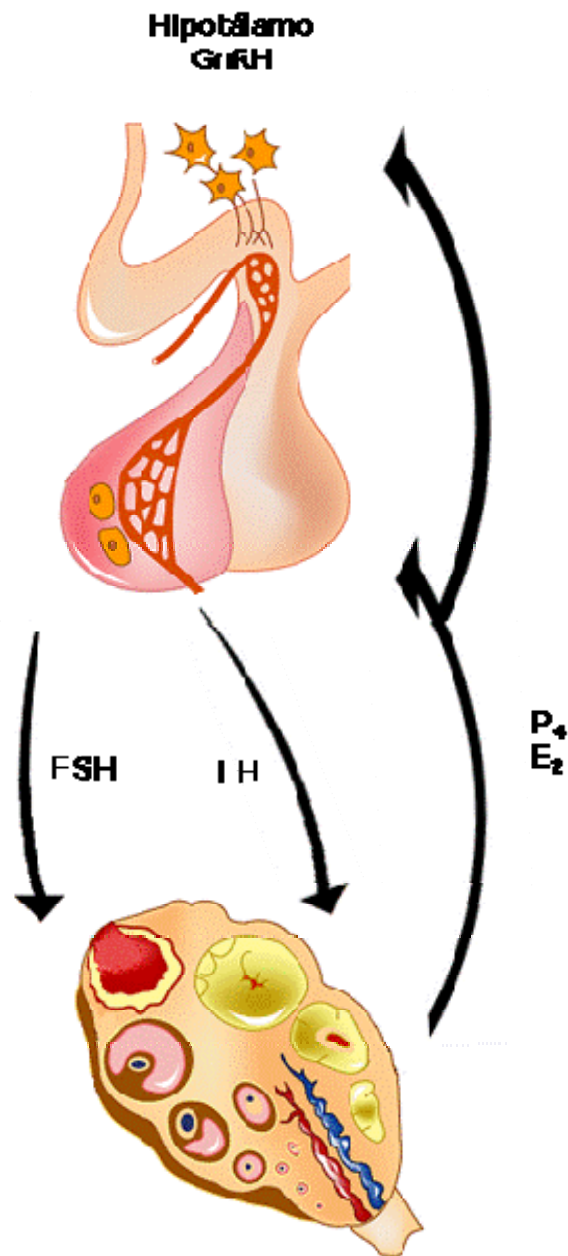


Fig. 5. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. P₄ (progesterona), E₂ (estradiol) (modificado de Audesirk y Audesirk, 1997).

El incremento en la secreción de LH promueve la maduración final del folículo e induce la ovulación. Tras la expulsión del ovocito las células de la granulosa y de la teca se convierten en células luteínicas o cuerpo lúteo, mismo que secreta tanto estrógenos como progesterona. La combinación de estas dos hormonas inhibe al hipotálamo y a la hipófisis desactivando la elevada liberación de FSH y LH, lo que impide el desarrollo de más folículos (Guyton y Hall, 1998; Fawcett, 1995) (Fig. 6).

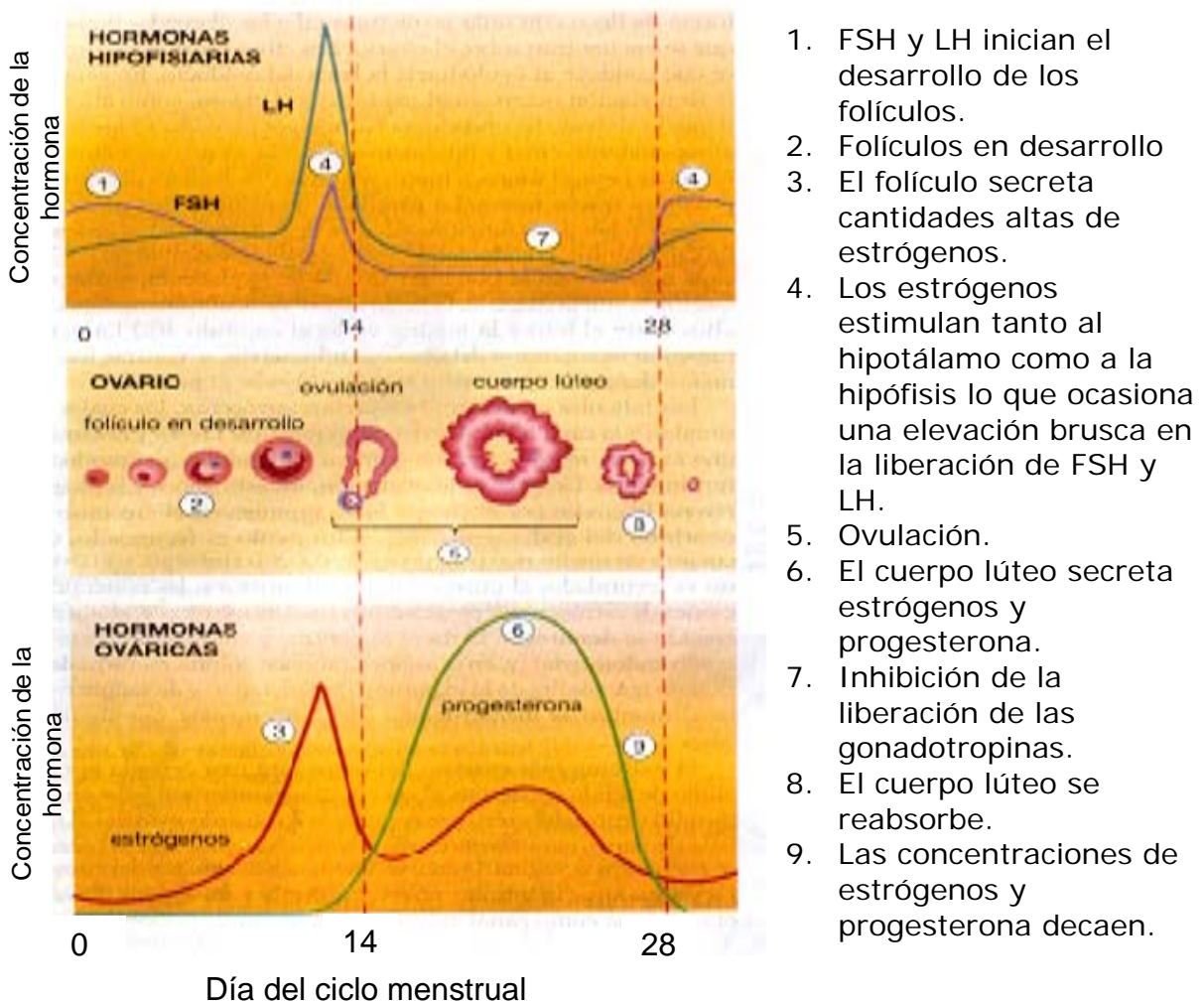


Fig. 6. Control hormonal del crecimiento folicular y la ovulación durante el ciclo menstrual (tomado de Audesirk y Audesirk, 1997).

Cuando el óvulo no es fecundado, el cuerpo lúteo involuciona y a falta de éste, las concentraciones de progesterona, estrógenos e inhibina declinan dejando de ejercer su efecto inhibitorio sobre el hipotálamo y la hipófisis y por tanto la liberación de GnRH, FSH y LH se incrementa, lo que promueve el desarrollo de un nuevo conjunto de folículos e inicia un nuevo ciclo ovárico (Fawcett, 1995; Audesirk y Audesirk, 1997; Miller y Leavell, 2001; Vander y col., 2001).

En el ovario ocurre un proceso normal de degeneración folicular llamado atresia, en el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que, habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no llegan a ovular (Domínguez y col., 1991). La integridad del complejo folicular depende del ovocito intacto. A medida que el ovocito degenera muestra cambios en su morfología, los demás componentes foliculares también degeneran. En estados iniciales se observa un núcleo picnótico en algunas células de la granulosa, especialmente en las que están en contacto con el antro. Las células de la teca que están afuera de la membrana basal de los folículos atrésicos se hipertrofian, lo que se conoce también como luteinización tecal. Se cree que estas células forman parte de la población de las células intersticiales y son morfológicamente indiferenciables de otras células del estroma (Oliver y col., 1999; Yeh y Adashi, 2001).

Si bien los mecanismos exactos involucrados en la atresia de los folículos son aún inciertos, se han descrito varios factores promotores de este proceso como son la GnRH, la interleucina 6 y el factor de necrosis

tumoral- α , entre otros. No obstante la mayoría de la información implica a los andrógenos derivados de las células tecointersticiales (Yeh y Adashi, 2001). Por este mecanismo la cantidad finita de ovocitos decae a lo largo de la vida. Se ha descrito en el ovario de los mamíferos que más del 99% de los folículos se vuelven atrésicos por lo que solo el 1% de los folículos ovulan (Oliver y col., 1999).

En el ovario se lleva a cabo la síntesis de esteroides a partir del colesterol extracelular. El primer paso en esta biosíntesis es la conversión de colesterol a pregnenolona que se desencadena, en las células de la teca, por la unión de la LH a su receptor y por la activación de la enzima citocromo P₄₅₀sc_c. En los folículos la pregnenolona es el intermediario común en la producción de todas las clases de hormonas esteroides. A partir de este paso la esteroidogénesis puede seguir dos esquemas biosintéticos. La vía Δ^5 , es la principal ruta de síntesis de estrógenos y se lleva a cabo predominantemente en los folículos terciarios. La otra vía es la comúnmente llamada Δ^4 y ocurre en el cuerpo lúteo (Felig y col., 1981; Domínguez y col., 1991).

En la vía Δ^5 la pregnenolona es modificada por la enzima 17 α -hidroxilasa y transformada a 17-hidroxipregnenolona, ésta por acción de la enzima 17-20 desmolasa se convierte en dihidroepiandrosterona (DHEA) que a su vez es transformada en androstenediona por acción de las enzimas 3 β -hidroxiesteriode deshidrogenasa y Δ^4 -5 isomerasa (Felig y col., 1981; O'Malley y Strott, 2001).

En la ruta Δ^4 la pregnenolona se convierte en progesterona mediante las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Δ^4 -5 isomerasa. La progesterona por la acción de la 17α -hidroxilasa es transformada en 17 -hidroxiprogestero que a su vez, es convertida en androstenediona por la 17 - 20 desmolasa (Felig y col., 1981; O'Malley y Strott, 2001).

Las células de la teca de los folículos secundarios poseen receptores a LH. En este tipo celular, se lleva a cabo la biosíntesis de esteroides desde colesterol hasta androstenediona la cual se difunde a las células de la granulosa y ahí la androstenediona es convertida a estrona por la intervención del complejo enzimático aromatasa y posteriormente a estradiol bajo la influencia de la FSH y de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Felig y col., 1981; O'Malley y Strott, 2001) (Fig. 7).

Finalmente, ambas rutas culminan con la síntesis de estrógenos, la androstenediona es convertida a testosterona por la 17 -ceto-reductasa o a estrona por el complejo P_{450} aromatasa. Tanto la testosterona como la estrona pueden convertirse en 17β -estradiol por intermedio de las enzimas aromatasa y la 17 -ceto-reductasa respectivamente (O'Malley y Strott, 2001).

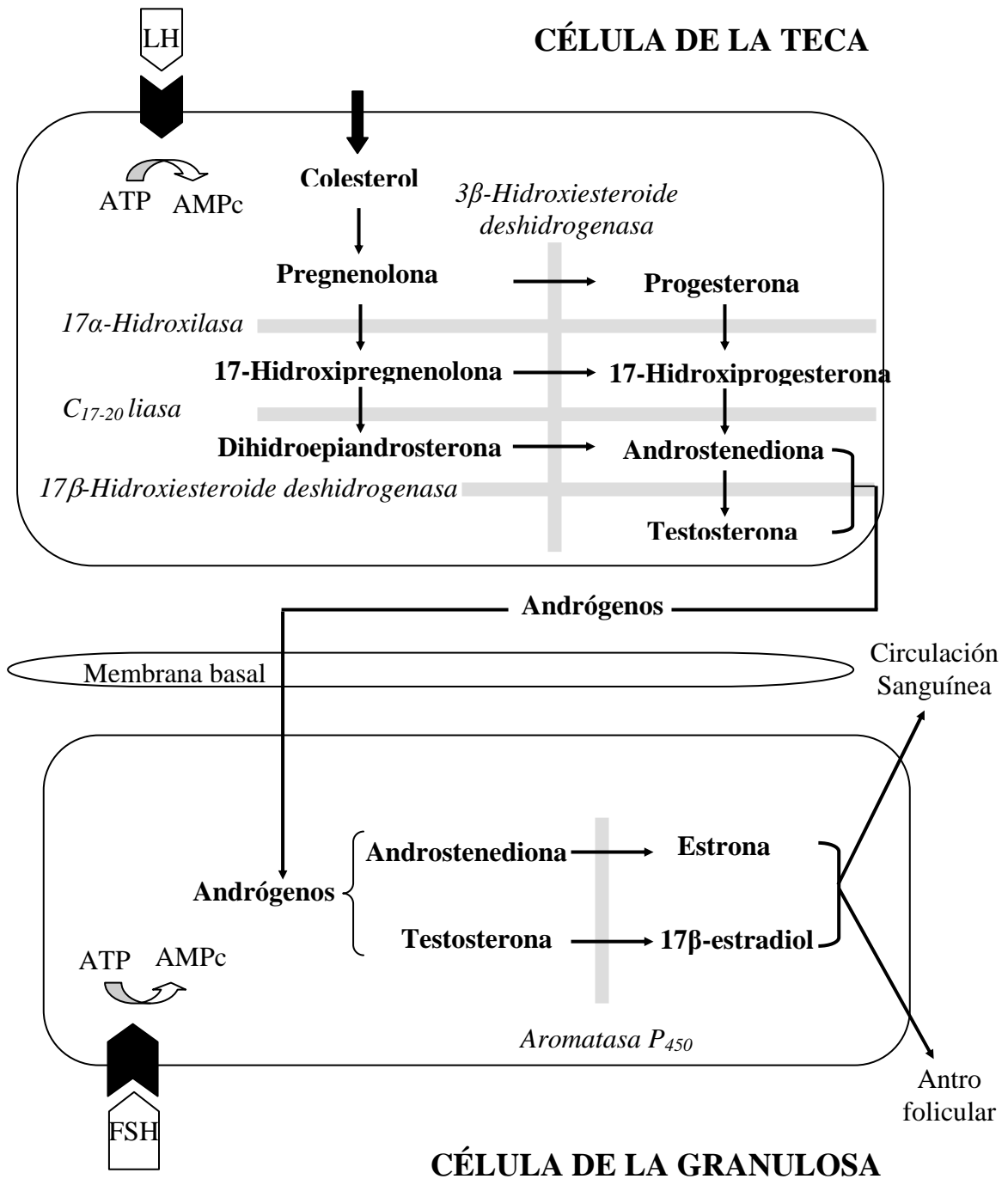


Fig. 7. Esquema que muestra la biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario (modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

III. Ciclo estral de la rata.

La palabra *estro* significa calor, celo, estímulo o frenesí y define al período de máxima receptividad en la hembra. Los prefijos *an*, *pro*, *di* y *meta* son utilizados en el sufijo *estro* para describir los diferentes eventos que ocurren entre *estro* y *estro* de cada ciclo, de ahí el nombre de ciclo estral. En la rata, el ciclo estral tiene una duración de cuatro o cinco días. Las fases en que se divide son (Freeman, 1994):

- Anestro describe el período de no-reproducción o período de descanso en los mamíferos.
- Proestro, está caracterizado como el tiempo en el cual el animal se aproxima al celo, dura aproximadamente de 12 a 14 horas. La vagina presenta una predominancia de células epiteliales redondeadas y nucleadas. Ocasionalmente se encuentran unas pocas células escamadas en las cuales no es observable el núcleo.
- Estro, período en el cual la hembra es receptiva al macho y tiene una duración aproximada de 25 a 27 horas. Las células dominantes son anucleadas en forma de escamas.
- Metaestro o también llamado diestro, dura de seis a ocho horas. La citología vaginal presenta numerosos leucocitos que aparecen con un número significativo de células nucleadas.
- Diestro, es la fase más larga del ciclo con una duración de alrededor de 55 a 57 horas. El tipo de células que predominan en un frotis vaginal son en su mayoría leucocitos. En este período se prepara el tracto reproductivo para recibir al óvulo, si éste no es fertilizado, el ciclo se inicia nuevamente.

IV. Características morfofuncionales del timo.

El timo de los mamíferos es un órgano constituido por dos lóbulos que se encuentran unidos en la parte media por tejido conectivo, se localiza en la parte superior de la cavidad torácica, detrás del esternón por encima del corazón y de los grandes vasos sanguíneos. El timo es el órgano linfoide primario donde se producen y maduran los linfocitos T por intermedio de las diversas hormonas que sintetiza (Fawcett, 1995; Geneser, 2000, Roitt y col., 2000) (Fig. 8).

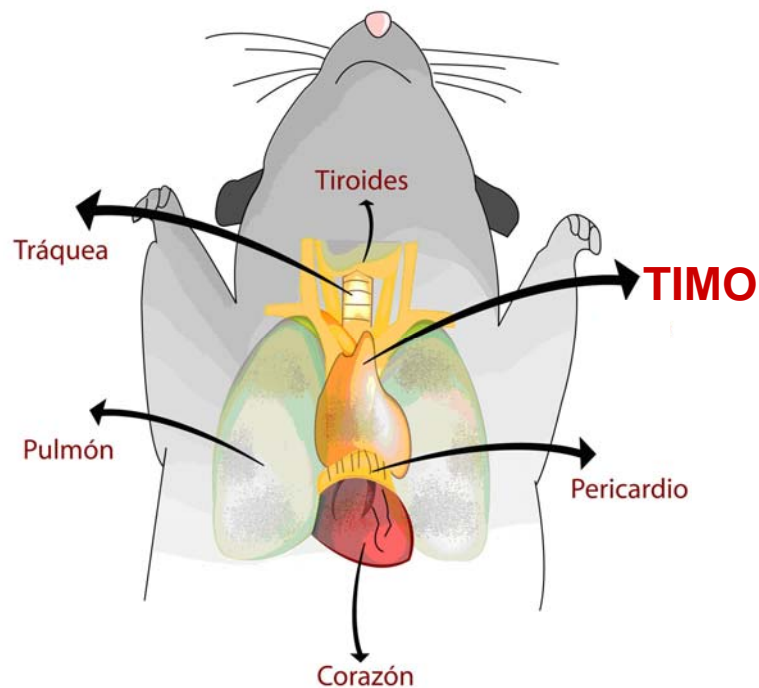


Fig. 8. Esquema que muestra la localización anatómica del timo en la rata.

El timo se origina a partir del tercer par de bolsas faríngeas como primordios pares a cada lado de la línea media. Los esbozos tímicos después de crecer en longitud y medialmente adquieren una envoltura mesenquimatosa común. Ambos lóbulos del timo están rodeados por una delgada cápsula de tejido conectivo que está subdividido en numerosos tabiques que se extienden desde la cápsula hacia el interior del órgano y dividen cada uno de los lóbulos en numerosos lobulillos (Fawcett, 1995; Geneser, 2000).

Cada lóbulo se divide en una zona oscura llamada corteza, rica en células provenientes de la médula ósea llamadas prelinfocitos o timocitos (linfocitos T inmaduros) y una zona más clara o médula con una menor población de timocitos. La corteza y la médula están entreteljadas por un estroma laxo compuesto por células epiteliales dispuestas en forma de red por lo que se les denomina retículo-epiteliales, su aspecto es muy variable ya que en la corteza presentan grandes prolongaciones en forma de estrella, mientras que en la médula hay una mayor densidad celular con prolongaciones más pequeñas. En la médula se encuentran también células epiteliales ordenadas concéntricamente formando los corpúsculos de Hassall (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 9).

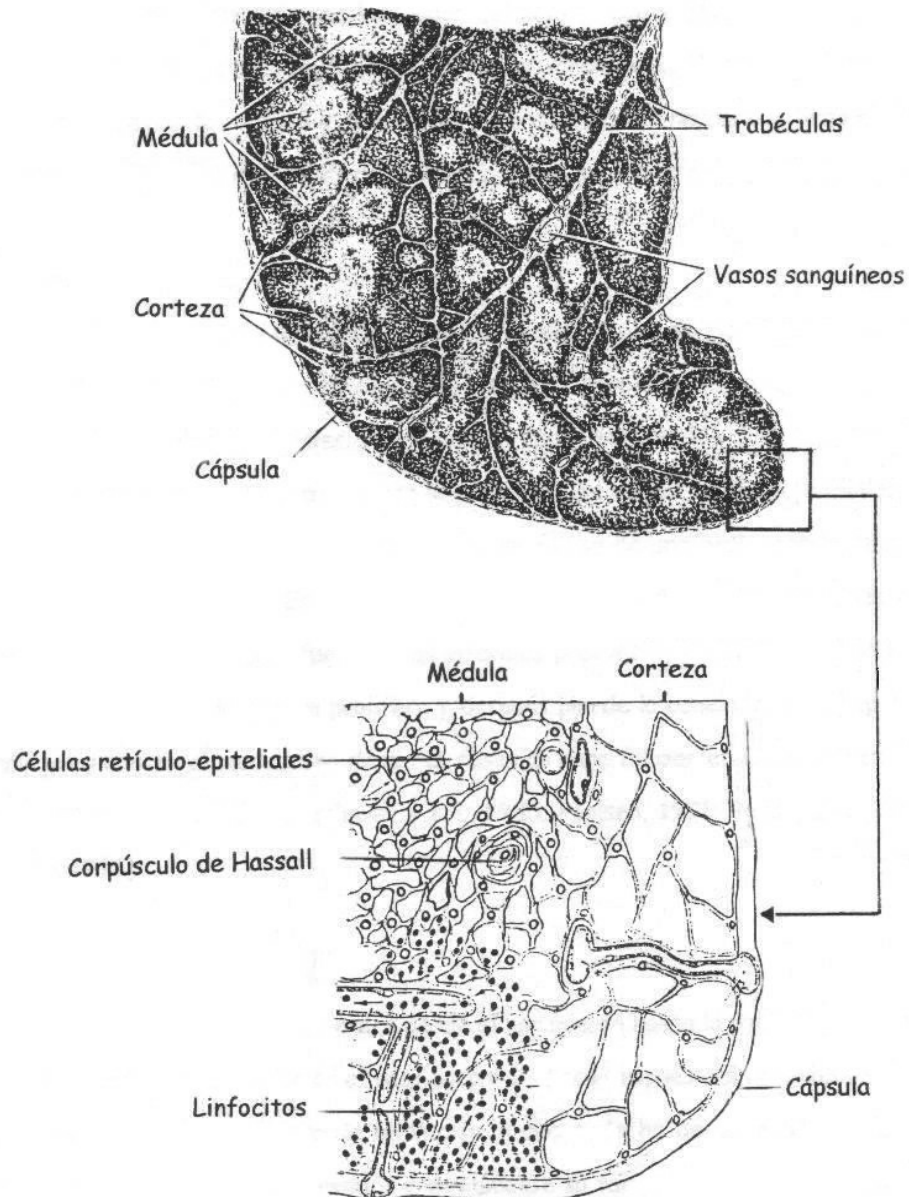


Fig. 9. Esquema que muestra la histología del timo y su organización cortico-medular (tomado de Bellanti, 1987).

El timo experimenta una involución a lo largo del tiempo. La atrofia comienza en el momento de la pubertad y prosigue a lo largo de la vida del individuo. La involución se inicia en la corteza, que puede llegar a desaparecer totalmente, aunque persistan restos medulares (Fig. 10). La atrofia de la corteza está involucrada con la sensibilidad de los timocitos a los esteroides (Roitt y col., 2000).

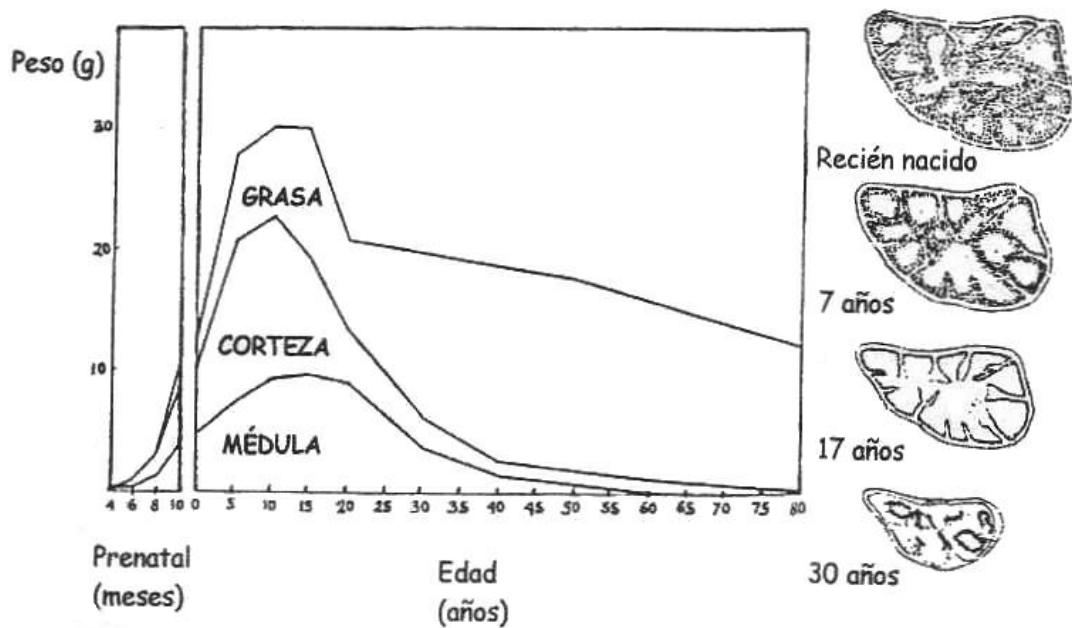


Fig. 10. Gráfico que representa los cambios que ocurren en el timo durante su involución (tomado de Bellanti, 1987).

El timo es una glándula endócrina. Relegado antes a una estructura de poca importancia, ahora se sabe que es el órgano primario de la hematopoyesis y cuya función endócrina, dentro del sistema inmunitario es esencial (Anthony y Thibodeau, 1987; Guyton y Hall, 1998).

Las células retículo-epiteliales del timo secretan una serie de hormonas polipeptídicas denominadas timosinas: la timosina fracción 5 que es una familia de péptidos con actividad biológica, la timopoyetina, el factor tímico humoral y la timulina entre otras (Goldstein y col., 1981).

V. Timulina.

La timulina o factor tímico del suero es un nonapéptido (pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH) con un peso aproximado de 857 g/mol que a diferencia de otras timosinas es sintetizada exclusivamente por las células retículo-epiteliales del timo. Tiene una gran variedad de efectos sobre los linfocitos T, incidiendo principalmente en su maduración, diferenciación y función (Bach y col., 1977; Pléau y col., 1977; Jambon y col., 1981; Pléau y col., 1981).

La función biológica de la timulina depende de su asociación con el ión Zn. Diferentes estudios han mostrado que la timulina participa en el control de enfermedades autoinmunes, tal es el caso de los pacientes con lupus eritematoso, donde el tratamiento con timulina es capaz de modular la liberación de citosinas por células mononucleares en sangre periférica. Además, la timulina ayuda a la maduración de los linfocitos T circulantes activando segundos mensajeros como el monofosfato de adenosin cíclico (AMPc) y el monofosfato de guanosin cíclico (GMPc) y en linfocitos maduros estimula la síntesis de prostaglandina E2 (Rinaldi-Garaci y col., 1985; Safieh-Garaberian y col., 1993).

VI. Relaciones funcionales entre el timo y el sistema reproductor.

En diversos estudios se ha mostrado la existencia de una relación funcional bidireccional entre el timo y el sistema reproductor. En el ratón, la timectomía realizada a los tres días de edad (Tx-3) resulta en disgénesis ovárica en la etapa adulta, condición caracterizada por la ausencia de folículos y cuerpos lúteos, infiltración de linfocitos en el ovario e infertilidad (Nishizuka y Sakakura, 1969; Michael, 1983). En estos ratones, el injerto de timo previene la disgénesis ovárica, normalizando la función endócrina de los ovarios (Sakakura y Nishizuka, 1972).

Se ha descrito que el ratón mutante congénitamente atímico y alopecico (nude), presenta reducción en la población folicular y en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y esteroides sexuales, aunado a un retraso en el inicio de la pubertad e infertilidad (Lintern-Moore y Pantelouris, 1975; Rebar y col., 1981). Rebar y col. (1980) mostraron en este mutante que el trasplante de timo al nacimiento previene las bajas concentraciones de gonadotropinas.

Hinojosa (1994) observa en los ratones desnudos–hipotímicos que se caracterizan por presentar menor crecimiento de los ovarios durante el desarrollo prepuberal, que el injerto de un timo normal al nacimiento estimula el crecimiento de los ovarios.

En el ratón, la timectomía realizada al día diez de edad provoca un retraso en la edad de la apertura vaginal, aunado a bajas concentraciones de estradiol en suero. La inyección diaria de timulina inmediatamente después de la timectomía, restablece las concentraciones de estradiol y el inicio de

la pubertad, por lo que la presencia del timo después del período neonatal es necesaria en el desarrollo y funcionamiento normal del ovario (García y col., 2000).

Por otra parte se ha mencionado que las células retículo-epiteliales del timo producen un factor peptídico que inhibe la esteroidogénesis estimulada por la gonadotropina coriónica humana (hCG) en los cultivos de células del ovario de rata. También se ha mostrado que este péptido potencia los efectos de la GnRH sobre la secreción de gonadotropinas por la hipófisis de rata (Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y col., 1995).

Estudios en los que se utiliza el cultivo de adenohipófisis de rata macho, muestran que la timulina es capaz de estimular la secreción espontánea de LH, a concentraciones similares a las provocadas por GnRH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997). Análogo a estos efectos pero con adenohipófisis de rata hembra, la timulina también estimula la secreción de ambas gonadotropinas y al estar presente GnRH el efecto se potencia (Brown y col., 2000).

En estudios realizados en nuestro laboratorio mostramos que la timulina adicionada al cultivo de células de adenohipófisis de rata hembra, modifica la liberación de gonadotropinas en función del día del ciclo estral (Hinojosa y col., 2004) y que este efecto es modulado por los esteroides sexuales (Hinojosa y col., 2003).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos autores señalan en estudios realizados con células adenohipofisarias en cultivo, que la timulina es capaz de estimular la liberación de una o ambas gonadotropinas. Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que la liberación de FSH y LH en respuesta a la timulina en presencia o no de la GnRH, es diferente si las células adenohipofisarias provienen de ratas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral e incubadas durante tiempos cortos, lo que indica que esta respuesta depende del ambiente hormonal del donador. Con base en lo anterior se decidió analizar si las diferencias en los efectos de la timulina a lo largo del ciclo estral de la rata se mantienen después de un período prolongado de preincubación y si las concentraciones de esteroides sexuales, características de los machos, regulan de manera diferencial la sensibilidad de las células adenohipofisarias a la acción de la timulina.

HIPÓTESIS

En las células adenohipofisarias de la rata hembra cultivadas por tiempos cortos, la timulina modula la liberación de las gonadotropinas dependiendo del día del ciclo estral, por lo que dichos efectos se mantendrán independientemente del tiempo de incubación. El cambio en el ambiente hormonal de las células de la hembra por el predeterminado por los esteroides sexuales de la rata macho también modificará los efectos de la timulina.

OBJETIVOS

- Analizar si la liberación basal y estimulada por GnRH de las células adenohipofisarias está en función del tiempo de incubación.

- Estudiar la acción de la timulina en las células adenohipofisarias en cada día del ciclo estral sobre la liberación de FSH y LH.

- Analizar si la respuesta de las células adenohipofisarias a timulina sobre la liberación de FSH y LH es modificada por las concentraciones de esteroides sexuales características de los machos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembra adultas (tres meses de edad) de la cepa Wistar obtenidas del bioterio de la FES Zaragoza, UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C), humedad (43-47%), fotoperíodo de 14 h luz-10 h oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento. El ciclo estral de los animales fue monitoreado mediante la toma diaria de frotis vaginales. Sólo las ratas que mostraron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración se utilizaron en aquellos experimentos que así lo indiquen.

Cultivo en monocapa de células de adenohipófisis

Los animales se sacrificaron por decapitación entre las 9:00 y 10:00 h. Inmediatamente después, las hipófisis se extrajeron bajo condiciones asépticas y se colocaron en un matraz que contenía solución salina (NaCl 0.9%) libre de Ca^{++} y Mg^{++} . Posteriormente las hipófisis se llevaron a la campana de flujo laminar, donde se realizaron nueve lavados con solución salina (por cada tres lavados se utilizó un matraz estéril). Todas las hipófisis se depositaron en una caja de Petri para separar la adenohipófisis de la neurohipófisis, dividiendo a la primera en pequeños fragmentos. Los segmentos de hipófisis anterior se depositaron en un matraz con tripsina al 0.25% (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) y se incubaron durante 15 min a 37 °C en baño María con agitación moderada. Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de tripsina.

El tejido se resuspendió en medio de cultivo Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO), suplementado con suero fetal de bovino al 10% v/v (GIBCO), antibiótico al 1% v/v (penicilina 10,000 U/ml y estreptomycin 10 mg/ml, GIBCO), glucosa al 0.1%, carbón activado (Merk, México) y ajustando el pH a 7.6. La disgregación celular se realizó deslizando repetidas veces los fragmentos de adenohipófisis a lo largo de una pipeta de 10 ml. Se efectuó el conteo celular para llevar el medio-células a un volumen final que contenía 1×10^6 células/ml. Las células se sembraron en cajas de cultivo, calidad cultivo de tejidos (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA). Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% de CO₂. Estas condiciones se mantuvieron por 24 h tras las cuales se realizó un cambio de medio por medio fresco y los cultivos se reincubaron por 24 h más. Finalizado este tiempo se realizó otro cambio de medio por medio fresco. Completando así 48 h de preincubación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Estudio de la liberación basal y estimulada de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.

Para conocer si las diferencias observadas a lo largo del ciclo estral en la respuesta *in vitro* de las células de adenohipófisis en la liberación basal y estimulada con GnRH de FSH y LH, se conservan después de 48 h de incubación, se utilizaron animales que fueron sacrificados en diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E). Las células adenohipofisarias de todos los grupos experimentales, se preincubaron por 48 h y al cambio de medio por medio fresco se trataron o no con GnRH (10^{-9} M) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) y se incubaron por tres horas, tras lo cuales se colectó el medio y se almacenó a -20 °C (Fig. 11).

Efectos de la timulina, GnRH o timulina y GnRH sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.

Con el objeto de analizar si los efectos diferenciales que tiene la timulina en cada día del ciclo estral, sobre la liberación de FSH y LH se conservan después de un tiempo prolongado de incubación, se utilizaron grupos de animales que se sacrificaron en D1, D2, P o E. Las células adenohipofisarias de todos los grupos experimentales, se preincubaron

por 48 h y al cambio de medio por medio fresco se trataron con GnRH (10^{-9} M) o con timulina (100 ng/ml) (Sigma) o con GnRH+timulina. Las células se incubaron por tres horas más, tras lo cuales se colectó el medio y se almacenó a -20 °C (Fig. 11).

Efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células adenohipofisarias pretratadas con progesterona y testosterona en las concentraciones características de los machos.

Con la finalidad de analizar la participación de los esteroides sexuales y del sexo del donador sobre los efectos de la timulina en la liberación de gonadotropinas por las células de adenohipófisis, se decidió utilizar células adenohipofisarias de animales en cualquier día del ciclo estral las cuales se preincubarán por 24 h y posteriormente, los cultivos se dividieron en grupo basal, al cual no se le adicionó nada y en grupos tratados con progesterona (2 ng/ml) (Sigma) o testosterona (3 μ g/ml) (Sigma) (Hinojosa, 2006). Además se contó con un grupo al cual se le adicionó alcohol etílico (EtOH) al 1% (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) por ser el vehículo en el que se disuelven los esteroides. Estos cultivos se reincubaron por 24 h, al termino de las cuales se cambiará el medio por medio fresco y cada grupo se sometió a los siguientes tratamientos: testigo, GnRH (10^{-9} M), timulina (100 ng/ml) y GnRH+timulina los que se incubaron por 3 h. Finalizado este tiempo, se colectó el medio y se almacenó a -20 °C (Fig. 12).

Para cada experimento se realizaron tres ensayos por triplicado.

Radioinmunoanálisis

La cuantificación de las concentraciones de FSH y LH se realizó en todas las muestras de medio de cultivo por la técnica de RIA de doble anticuerpo. Las evaluaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 8% y 10.6 para FSH y de 5.1% y 12% para LH y la sensibilidad fue de 0.1ng/ml. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado y los resultados se expresaron como los estándares internacionales de referencia NIADDK RP-2 para FSH y RP-3 para LH.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm e.e.m. Las comparaciones de los grupos experimentales se realizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En los casos en los que se compararon pares de datos se utilizó la prueba de "U" de Mann-Whitney. Sólo se consideraron como significativos los resultados cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

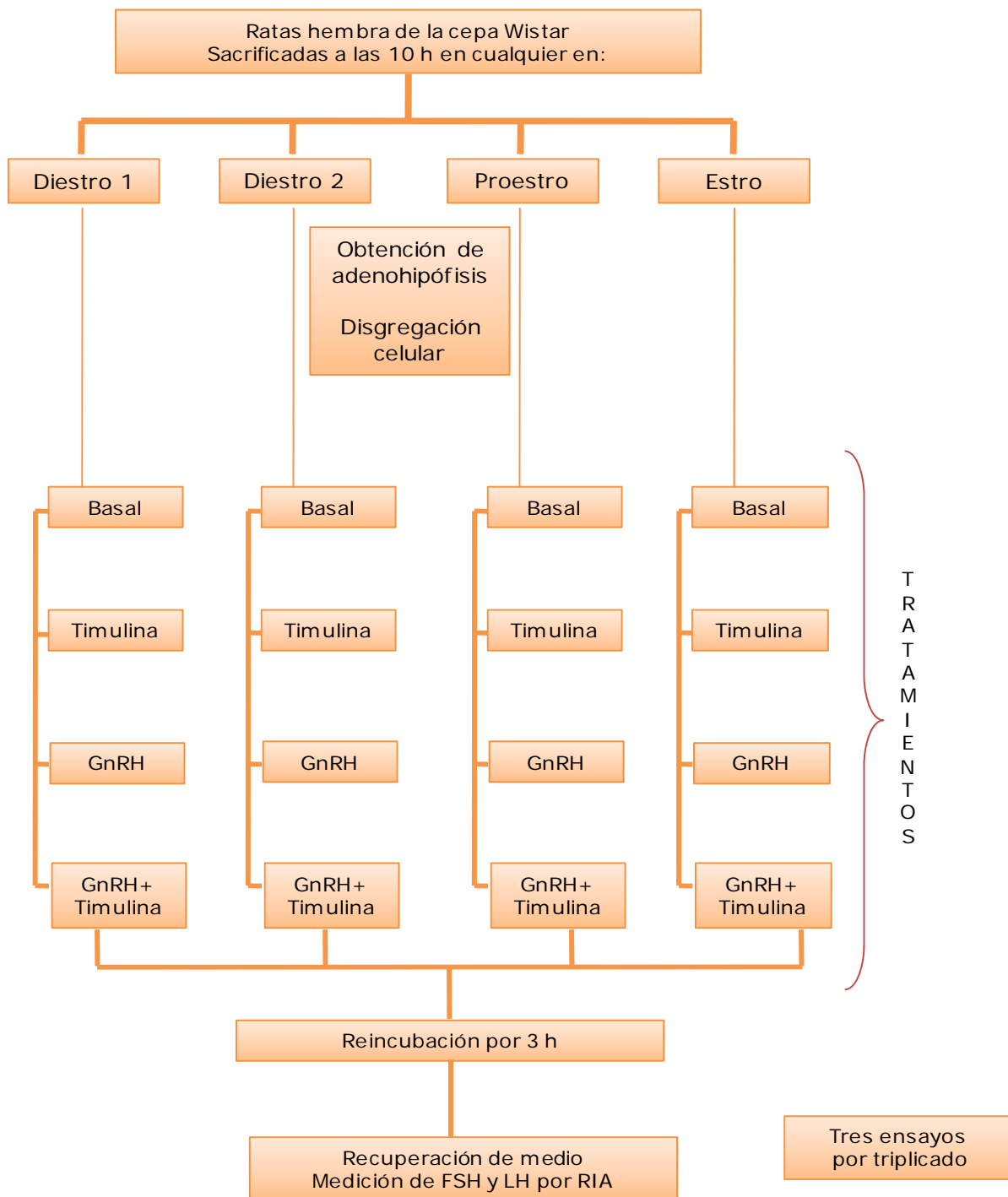


Fig. 11. Diagrama de los grupos experimentales en los que se utilizaron ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.

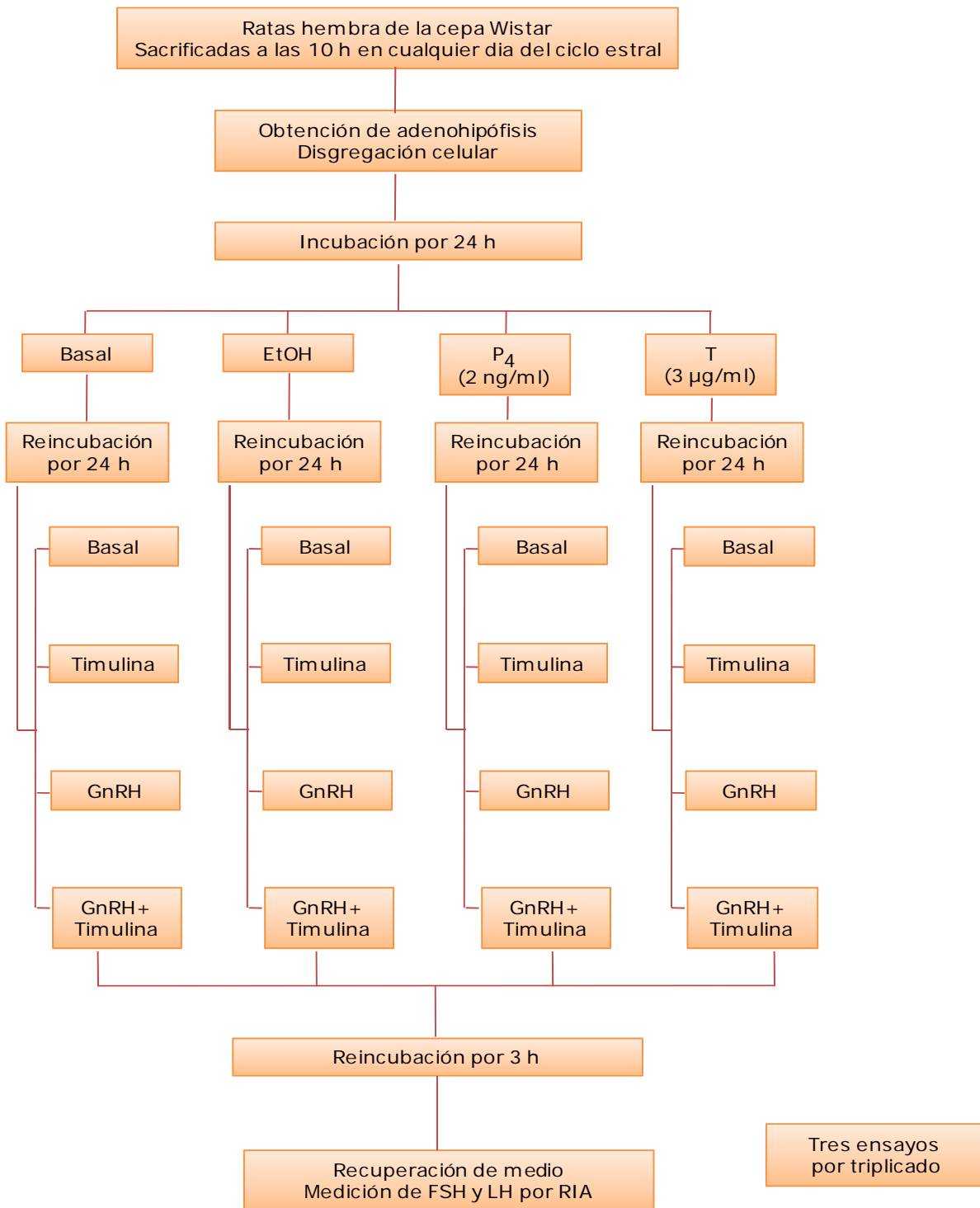


Fig. 12. Diagrama de los grupos experimentales pretratados con esteroides sexuales.

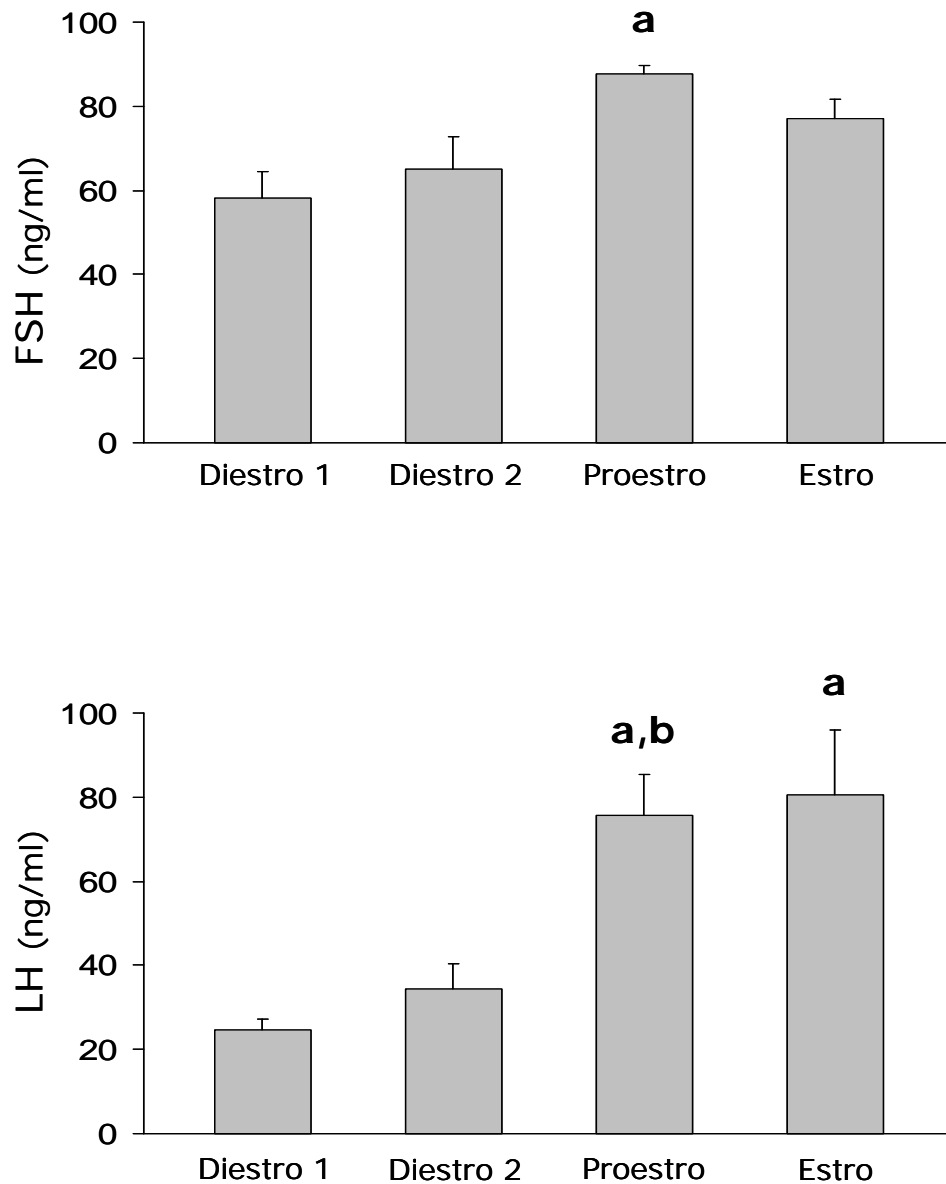
RESULTADOS

1. Liberación basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.

En los cultivos de adenohipófisis de rata hembra que se sacrificaron en el día del proestro, se observó que la liberación basal de FSH fue significativamente mayor que la del diestro 1 y la liberación basal de LH se incrementó de manera significativa respecto al diestro 1 y 2. En los animales sacrificados en estro, sólo se presentó un incremento en las concentraciones de LH respecto al diestro 1 (Fig. 13).

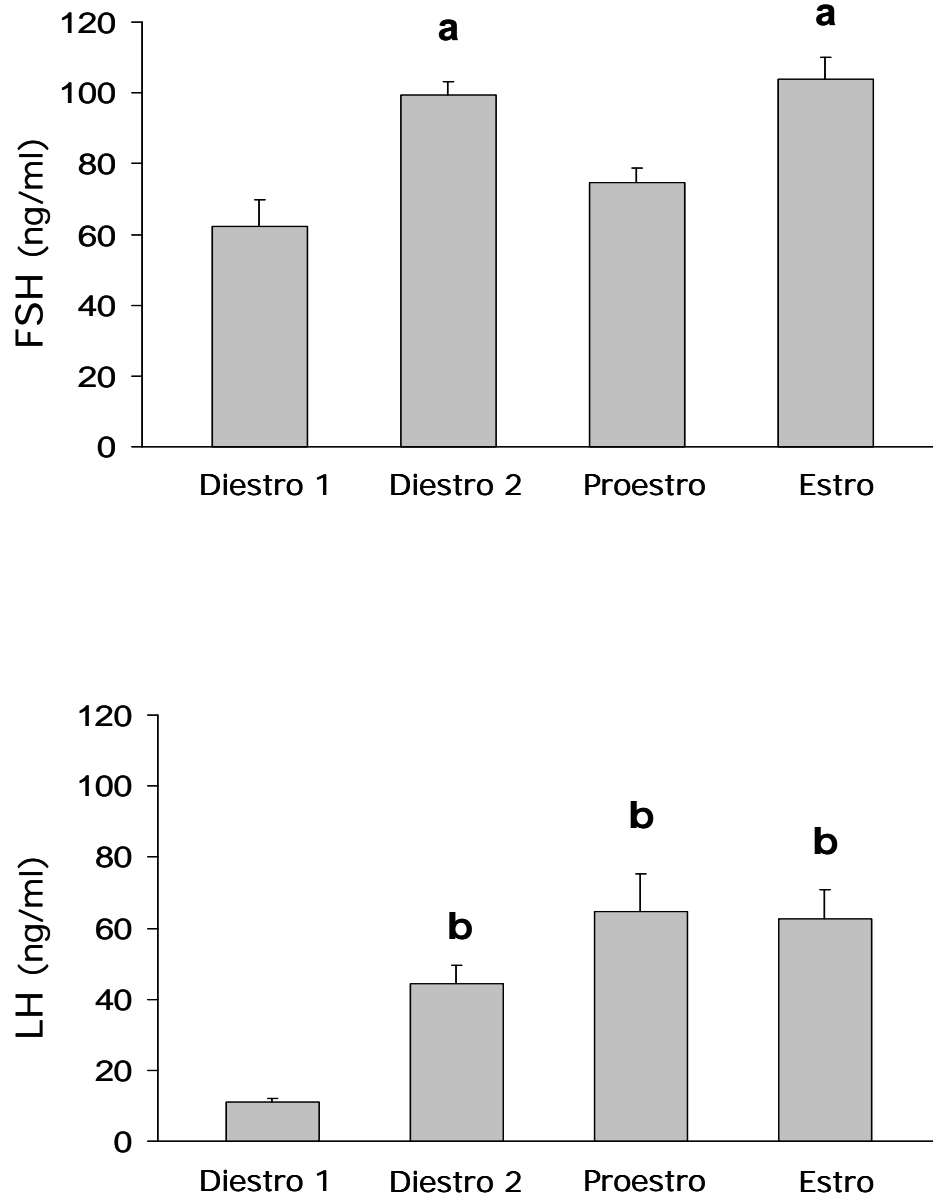
2. Respuesta de las células de adenohipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral a la estimulación con GnRH sobre la liberación de FSH y LH.

En las células de adenohipófisis provenientes de ratas en diestro 2 o estro se observó un incremento significativo en la liberación basal de FSH en respuesta al tratamiento con GnRH, comparado con el diestro 1. En cuanto a la liberación de LH, el tratamiento con GnRH resultó en un aumento significativo en todos los días del ciclo estral respecto al diestro 1 (Fig. 14).



a, $p < 0.05$ vs. Diestro 1 (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn)
b, $p < 0.05$ vs. Diestro 2 (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn)

Fig. 13. Liberación basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas en diestro 1, diestro 2, proestro o estro e incubadas por un total de 51 horas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.



a, $p < 0.05$ vs. Diestro 1 y Proestro (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn)

b, $p < 0.05$ vs. Diestro 1 (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn)

Fig. 14. Liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas en diestro 1, diestro 2, proestro o estro e incubadas por 48 horas y posteriormente tratadas con GnRH (10^{-9} M) por tres horas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.

En la tabla 1 se muestra el análisis comparativo de la liberación basal y estimulada con GnRH de gonadotropinas en las células de adenohipófisis. Para FSH, el tratamiento con GnRH resultó en un aumento significativo en el diestro 2 y en el estro en comparación con su respectiva concentración basal, en estos mismos días la liberación de LH no mostró cambios en respuesta a la adición de GnRH y se observó una disminución en diestro 1 respecto a su basal.

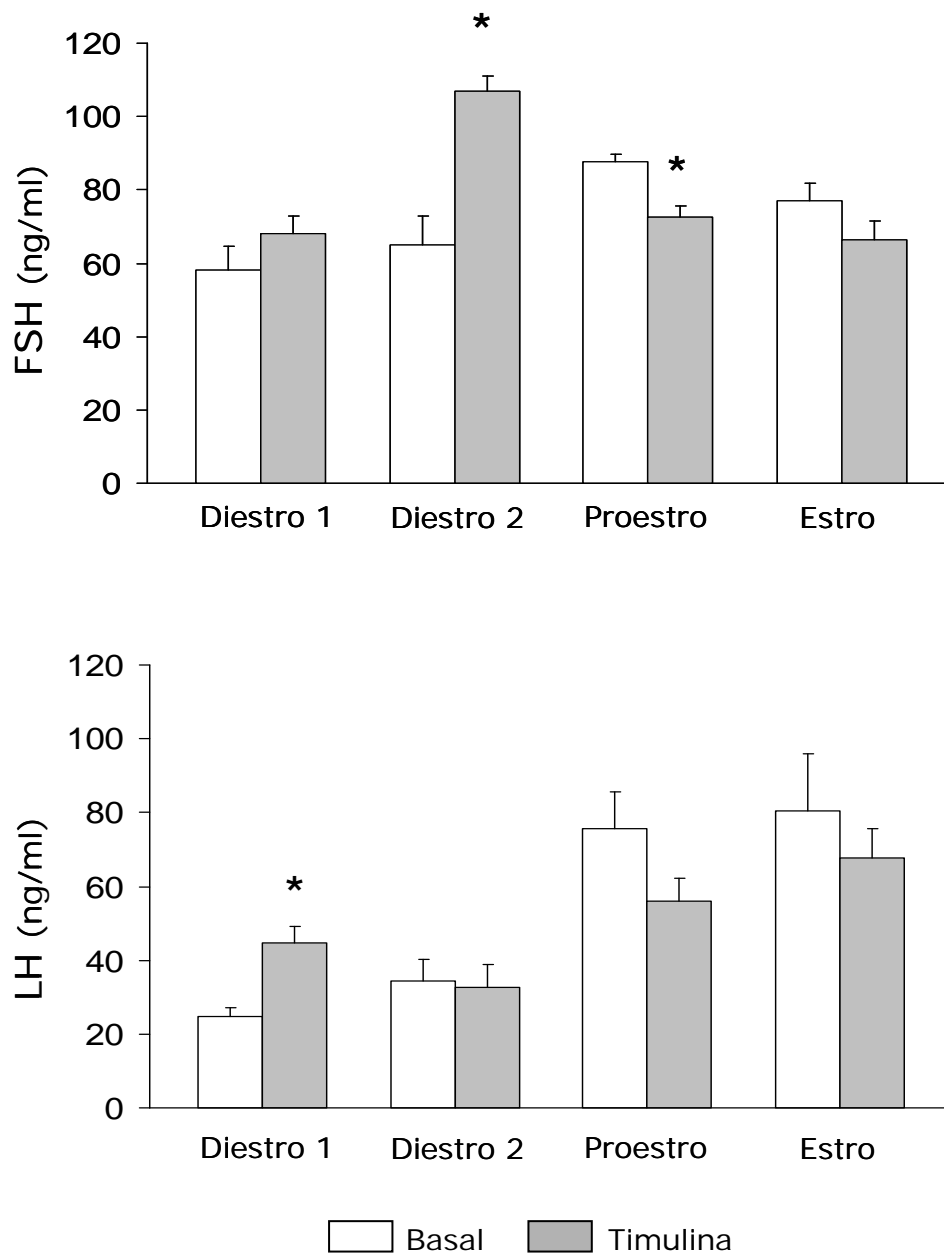
Tabla 1. Media \pm e.e.m. de la liberación basal de FSH y LH (ng/ml) por las células de adenohipófisis de rata hembra adulta sacrificadas en diestro 1, diestro 2, proestro o estro, incubadas por 48 horas y posteriormente tratadas o no con GnRH (10^{-9} M) por tres horas.

Grupos	FSH (ng/ml)		LH (ng/ml)	
	Basal	GnRH	Basal	GnRH
Diestro 1	58.1 \pm 6.4	62.1 \pm 7.6	24.7 \pm 2.4	11.1 \pm 1.1 *
Diestro 2	64.9 \pm 7.9	99.5 \pm 3.6 *	34.4 \pm 6.0	44.5 \pm 5.0
Proestro	87.6 \pm 2.1	74.5 \pm 4.4 *	75.6 \pm 9.9	64.7 \pm 10.6
Estro	77.1 \pm 4.6	103.9 \pm 6.0 *	80.6 \pm 15.5	62.6 \pm 8.1

* $p < 0.01$ vs. Basal correspondiente (Prueba de "U" de Mann-Whitney)

3. Efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis en cultivo, obtenidas de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral.

La adición de timulina a los cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas sacrificadas en el día del diestro 2 resultó en un aumento significativo de la liberación basal de FSH, mientras que en el día del proestro se observó un decremento. En las células adenohipofisarias de ratas en diestro 1 la adición de timulina sólo provocó un aumento significativo en la liberación basal de LH (Fig. 15).



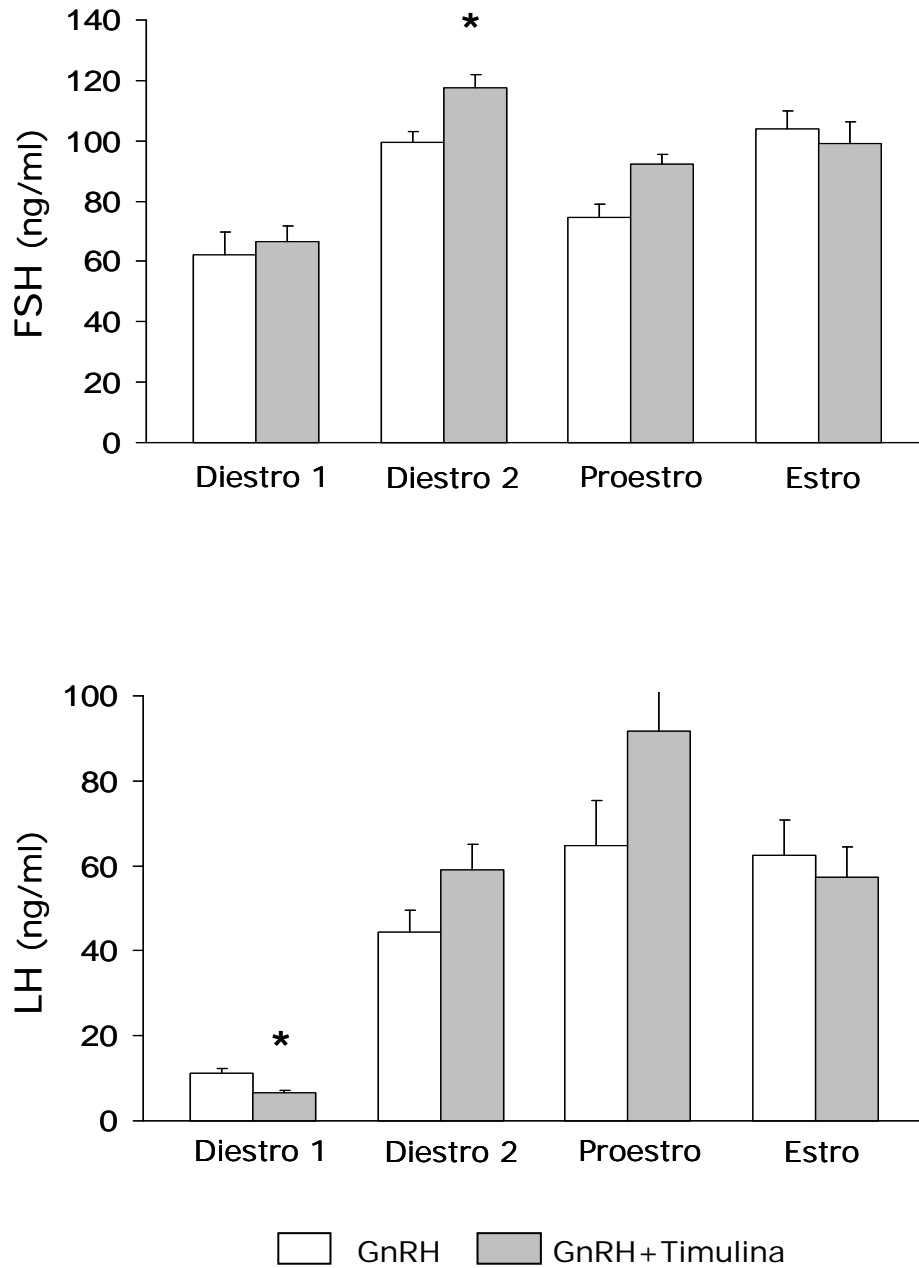
* $p < 0.05$ vs. Basal (Prueba de "U" de Mann Whitney)

Fig. 15. Liberación basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas en diestro 1, diestro 2, proestro o estro e incubadas por 48 horas y posteriormente tratadas o no con timulina (100 ng/ml) por tres horas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.

Cuando las células adenohipofisarias de ratas en diestro 2 se trataron con GnRH+Timulina se observó un incremento significativo en la liberación de FSH al medio, respecto a las células que solo recibieron GnRH. En las células provenientes de ratas en diestro 1, la adición de GnRH+Timulina disminuyó significativamente la liberación de LH (Fig. 16).

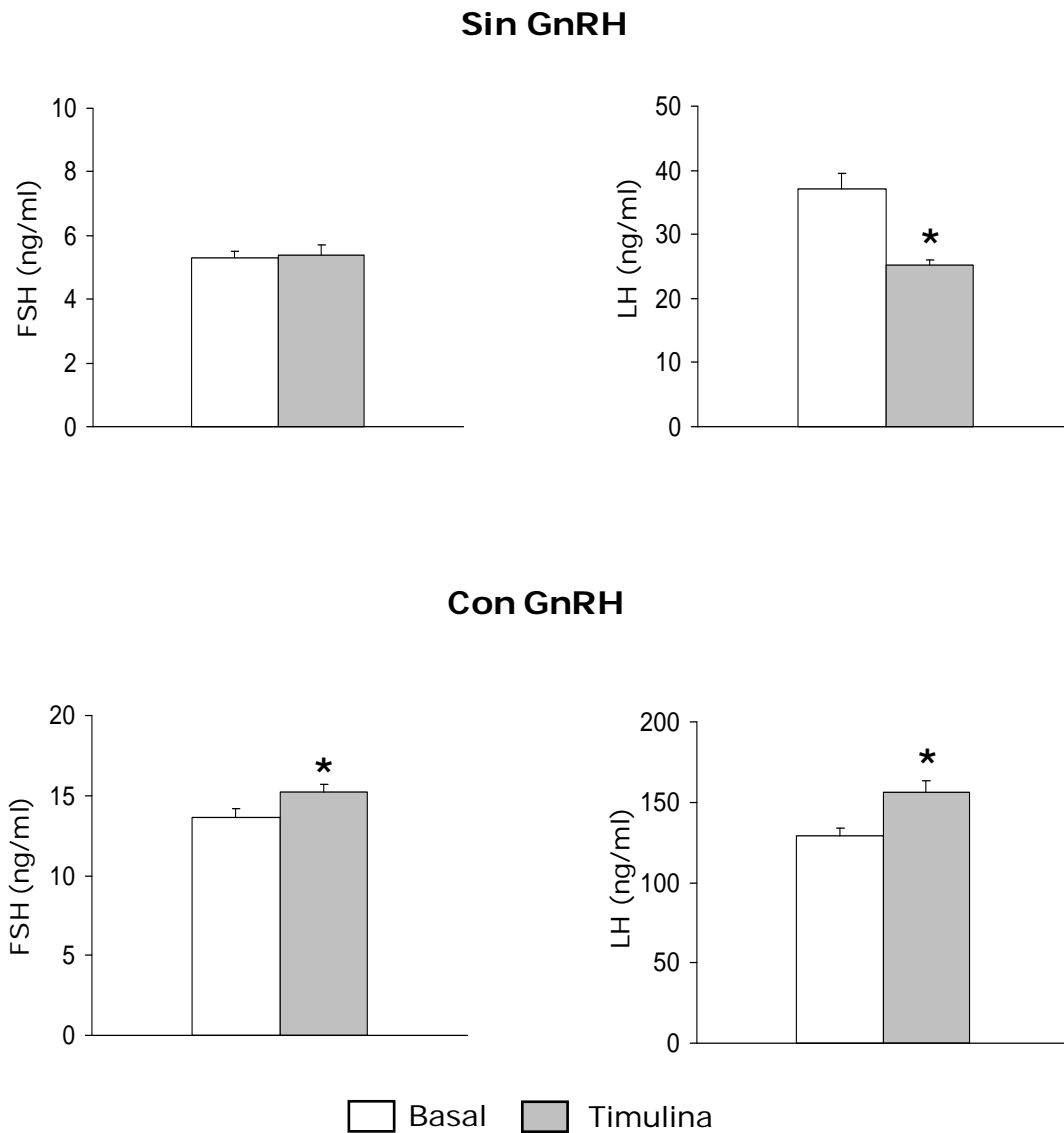
4. Efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células adenohipofisarias pretratadas con progesterona y testosterona en las concentraciones características de los machos.

Con el objeto de analizar si la timulina es capaz de modificar la liberación basal y estimulada de gonadotropinas por las células adenohipofisarias, se utilizaron cultivos de adenohipófisis de ratas hembra sacrificadas en cualquier día del ciclo estral, en los que se observó que la adición de timulina no modificó la secreción basal de FSH, mientras que la de LH la disminuyó. El tratamiento con GnRH+Timulina incrementó la liberación de ambas gonadotropinas en comparación con las células estimuladas solo con GnRH (Fig. 17).



* $p < 0.05$ vs. GnRH (Prueba de "U" de Mann Whitney).

Fig. 16. Liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas en diestro 1, diestro 2, proestro o estro e incubadas por 48 horas y posteriormente tratadas con GnRH (10^{-9} M) o GnRH+Timulina por tres horas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.



* $p < 0.05$ vs. Basal (Prueba de "U" de Mann Whitney)

Fig. 17. Efecto de la timulina (100 ng/ml) sobre la liberación basal y estimulada por GnRH de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas independientemente del día del ciclo estral. Cada barra representa la media \pm e.e.m.

En los cultivos, la administración de GnRH incrementó de manera significativa la liberación basal de ambas gonadotropinas. Dado que el etanol es el vehículo de los esteroides, se analizó si este disolvente podría tener efectos sobre la secreción de gonadotropinas. En los cultivos de células de adenohipófisis pretratadas con etanol se observó que la liberación basal de LH se inhibió de manera significativa, lo que no ocurrió con la liberación de FSH, mientras que la adición de etanol no interfirió con la liberación estimulada por GnRH en ambas gonadotropinas (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas sacrificadas independientemente del día del ciclo estral, preincubadas por 24 horas en presencia o ausencia de etanol (EtOH 1%) y tratadas o no a las 48 horas con GnRH (10^{-9} M) durante tres horas.

Grupos	FSH (ng/ml)		LH (ng/ml)	
	Sin EtOH	Con EtOH	Sin EtOH	Con EtOH
Basal	5.3 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	37.0 \pm 2.5	26.9 \pm 1.0 b
GnRH	13.6 \pm 0.6 a	13.1 \pm 0.5 a	128.8 \pm 5.1 a	117.1 \pm 8.1 a

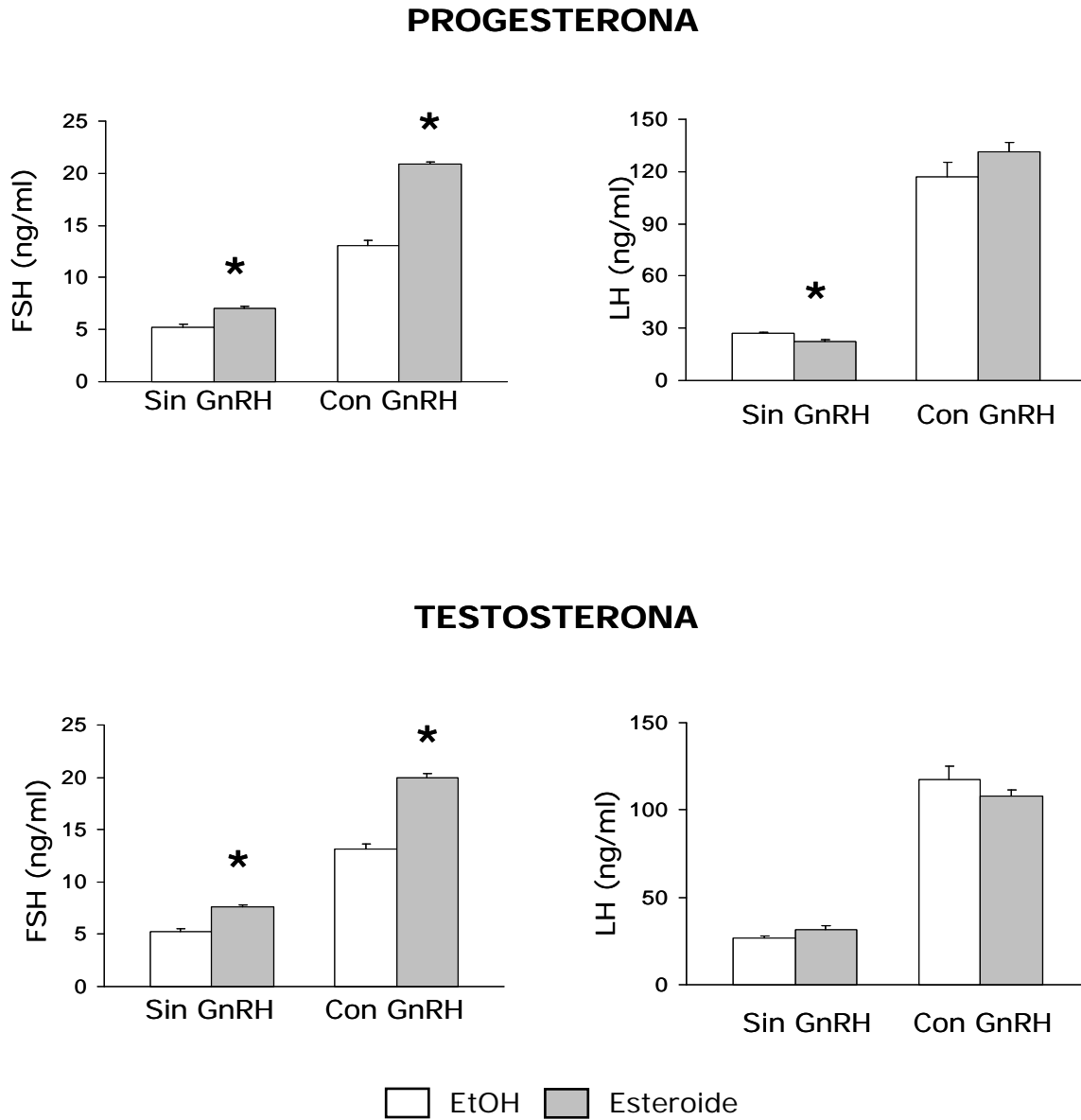
a, $p < 0.05$ vs. Basal correspondiente (Prueba de "U" de Mann Whitney)

b, $p < 0.05$ vs. Basal sin EtOH (Prueba de "U" de Mann Whitney)

Tomando en consideración los resultados anteriores, se decidió utilizar los cultivos tratados con etanol como grupo de comparación para analizar la participación de los esteroides sexuales sobre los efectos de la timulina en la liberación de gonadotropinas por las células de adenohipófisis.

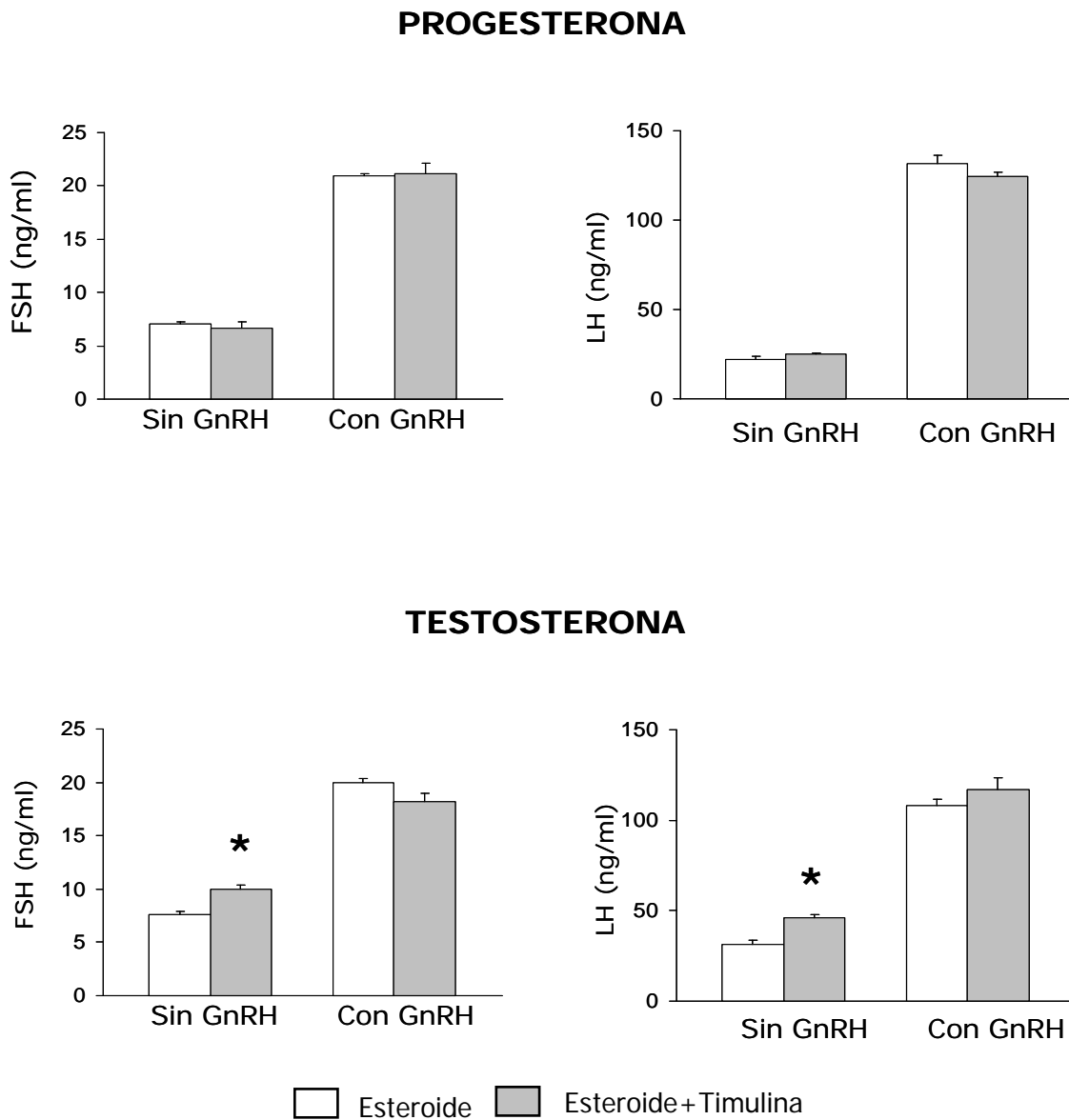
En las células de adenohipófisis pretratadas con progesterona y tratadas o no con GnRH, se observó un incremento significativo en la liberación de FSH respecto al grupo con etanol. En cuanto a la liberación de LH, sólo se presentó una disminución en las células pretratadas con progesterona. Resultados similares se observaron en las células pretratadas con testosterona para la liberación de FSH, pero no así para la liberación de LH (Fig. 18).

La administración de timulina a las células adenohipofisarias que fueron pretratadas con progesterona no modificó la liberación de FSH y LH en presencia o no de GnRH. En los cultivos de adenohipófisis que fueron pretratados con testosterona, se presentó un incremento en la liberación de ambas gonadotropinas al adicionar timulina, efecto que no se observó con los cultivos tratados con GnRH+Timulina (Fig. 19).



* $p < 0.05$ vs. EtOH (Prueba de "U" de Mann Whitney)

Fig. 18. Efecto del pretratamiento con progesterona (2 ng/ml) o testosterona (3 $\mu\text{g/ml}$) sobre la liberación basal y estimulada por GnRH (10^{-9} M) de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra adultas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.



* $p < 0.05$ vs. Esteroides (Prueba de "U" de Mann Whitney).

Fig. 19. Efectos de la adición de timulina (100 ng/ml) sobre la liberación basal y estimulada por GnRH (10^{-9} M) de FSH y LH por las células de hipófisis anterior pretratadas por 24 h con progesterona (2 ng/ml) o testosterona (3 μ g/ml) de ratas hembra adultas. Cada barra representa la media \pm e.e.m.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que la timulina tiene un efecto dual sobre la liberación de gonadotropinas por las células de adenohipófisis aún en tiempos largos de incubación y que depende del día del ciclo estral en el que las ratas fueron sacrificadas. Además los esteroides sexuales, en las concentraciones características de la rata macho, son capaces de modular los efectos de la timulina sobre la respuesta de las gonadotropos.

En estudios previos mostramos que las células de adenohipófisis cultivadas en suspensión por una hora, presentan diferencias en la liberación basal de FSH y LH dependiendo del día del ciclo estral en el que fueron sacrificadas las ratas (Hinojosa y col., 2004). Diversos autores han descrito el patrón de secreción de la FSH y LH en el suero de la rata a lo largo del ciclo estral, en general la concentración de ambas gonadotropinas es relativamente baja en el día del diestro 1 y diestro 2, comienza a incrementarse hacia la mañana del proestro y para la tarde de éste la secreción de ambas gonadotropinas alcanza su punto más alto. Finalmente a la mañana del estro la concentración de LH comienza a decrecer y la de FSH muestra una nueva elevación que declina hacia la tarde del estro (Savoy-Moore y Schwartz, 1980; Freeman, 1994; Domínguez-González y col., 1998). Los resultados de este trabajo confirman que la liberación de las gonadotropinas por las células incubadas por tiempos largos, semeja en parte el patrón de secreción descrito anteriormente.

Cuando las células de adenohipófisis en cultivo se estimularon con GnRH,

solo se observó un patrón de secreción similar al que ocurre *in vivo* durante el ciclo estral para LH y no así para FSH. Como se sabe, la secreción de las gonadotropinas depende de la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, sin embargo se ha descrito que la liberación de GnRH es muy similar en todos los días del ciclo estral excepto en el proestro, donde se observa un incremento en la amplitud de los pulsos (Liu y Jackson, 1984; Fox y Smith, 1985; Park y Ramírez, 1989). Es probable que las diferencias observadas en la liberación estimulada de ambas gonadotropinas sea el resultado de la adición de un solo pulso de GnRH durante las tres horas de tratamiento. Otra posible explicación sería que las variaciones en el número de receptores a GnRH que modulan la respuesta de la hipófisis a lo largo del ciclo estral (Clayton y col., 1980; Savoy-Moore y Schwartz, 1980), también estén involucradas en la respuesta *in vitro* de las células de adenohipófisis de animales sacrificados en cada día del ciclo estral.

Se ha mostrado que la administración *in vivo* de GnRH puede inducir incrementos de ambas gonadotropinas en la tarde del D2 (Sarkar y Fink, 1979). En este caso se observó una respuesta similar en la secreción de FSH y LH al adicionar un pulso de GnRH en animales en D2, lo que sugiere que los receptores a GnRH en ese momento son funcionales (Sarkar y Fink, 1979; Savoy-Moore y Schwartz, 1980). La inhibición en la liberación de LH en células de animales en D1 en respuesta a GnRH podría estar relacionada con el bajo número de receptores y la menor capacidad de unión al decapeptido que caracterizan este día del ciclo estral (Savoy-Moore y Schwartz, 1980).

Por otra parte existen evidencias que indican que la GnRH es capaz de regular sus propios receptores. Bajas concentraciones de GnRH pueden incrementar el número de sus receptores, así como altas concentraciones pueden reducirlo (Knobil, 1981). La concentración de GnRH utilizada en este trabajo además de ser la DE_{50} , también es la recomendada para evaluar eventos fisiológicos (Liu y Jackson, 1984), lo que nos permite sugerir que las diferencias observadas en la secreción estimulada de gonadotropinas, se debe a las condiciones intrínsecas de las células más que a la concentración de GnRH utilizada.

Si los receptores a GnRH están involucrados en las diferencias observadas en cada día del ciclo estral, es posible que la disminución en la respuesta de las células de adenohipófisis de animales sacrificados en proestro se deba a la brusca disminución de receptores en este día, esto basado en el hecho que el número de receptores a GnRH parece mantener una relación inversamente proporcional a la concentración de gonadotropinas en suero a lo largo del ciclo estral (Savoy-Moore y Schwartz, 1980).

Estudios recientes basados en técnicas de inmunohistoquímica han mostrado la existencia de grupos de gonadotropos bihormonales y monohormonales en la hipófisis de rata, algunos contienen tanto FSH como LH, mientras que otros solo una de estas hormonas. Los más pequeños producen FSH o LH, mientras que los más grandes secretan ambas gonadotropinas o solo FSH. En la hipófisis de la rata macho adulta, alrededor del 70% de los gonadotropos contienen ambas gonadotropinas, el 15% contiene solo FSH y el 15% contiene exclusivamente LH. La distribución de estas dos poblaciones no es fija, por el contrario, se observan cambios dinámicos en el número y la proporción de los

gonadotropos bihormonales y monohormonales luego de la castración, después de la administración de GnRH y durante el estro de la rata. A la fecha no se sabe si estos cambios reflejan la presencia de una reserva de precursores de gonadotropos o la plasticidad de estas células (Halvorson y Chin, 2001). No podemos descartar que esta variabilidad morfofuncional de las células de la adenohipófisis hace más compleja la interpretación de los factores tanto estimulantes como inhibitorios involucrados con la regulación de sus funciones donde la timulina parece no ser la excepción.

No obstante los cambios inherentes a las células de adenohipófisis como son las subpoblaciones de gonadotropos y a los que se evidencian a lo largo del ciclo estral, la acción de la timulina sobre los cultivos muestra tanto efectos estimulantes como inhibitorios sobre la liberación basal de gonadotropinas, lo que indica que la timulina tiene un efecto dual que depende del día del ciclo estral. El hecho que la respuesta de los gonadotropos a timulina en algunos casos fue similar a la observada cuando se tratan con GnRH, coincide con otros autores que describen que esta timosina posee actividad liberadora de gonadotropinas sobre las células de adenohipófisis *in vitro*, ya sea bajo condiciones dinámicas o estacionarias (Brown y col., 2000; Hinojosa y col., 2004).

El incremento observado en la liberación de FSH en el diestro 2 en respuesta a la combinación de GnRH+Timulina, muestra que la timulina tiene un efecto aditivo a los efectos estimulantes de GnRH como ya ha sido descrito por Brown y col. (2000). Sin embargo nuestros resultados muestran que la interacción entre ambos péptidos depende del día del ciclo estral en el que se encontraban los animales al momento del sacrificio. Esta interacción también se observó en la liberación de LH en el

D1 donde al parecer la timulina es capaz de regular la respuesta de las células de adenohipófisis a la GnRH, probablemente acentuando la baja capacidad de unión a su receptor que se presenta durante las primeras 12 h de este día (Savoy-Moore y Schwartz, 1980)

Los resultados presentados en este trabajo al igual que los de Hadley y col. (1997), Zaidi y col. (1988) y Brown y col. (2000) nos permiten sugerir la existencia de receptores a timulina en la hipófisis. Sin embargo, el hecho que timulina module de manera diferencial la respuesta de los gonadotropos en función del día del ciclo estral y de la presencia de GnRH, hace pensar que la timulina y GnRH utilizan la misma señal de transducción (segundos mensajeros tales como el AMPc o GMPc) (Hadley y col., 1997; Brown y col., 2000) pero los pasos de la señalización de ambos péptidos serían diferentes.

Diversos autores han mostrado que la timulina es capaz de incrementar la liberación de gonadotropinas tanto en las células de adenohipófisis de hembra como de macho (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997; Brown y col., 2000), sin embargo estudios previos del laboratorio (Hinojosa y col., 2004; Hinojosa, 2006) indican que los efectos de timulina dependen del sexo del donador y de las condiciones hormonales que prevalecen al momento del sacrificio como es el día del ciclo estral. El aporte de nuestros resultados es la permanencia de las características inherentes al ciclo estral. Cabe destacar que uno de los factores en común en todos estos eventos, es la influencia de los esteroides sexuales.

Por lo anterior, se decidió manipular el ambiente hormonal de las células de adenohipófisis obtenidas de hembras adultas en cualquier día del ciclo

estral, modificando el medio de cultivo y analizando, por una parte la participación de la timulina sola o en combinación con GnRH y por otra si dichos efectos están en función de los esteroides sexuales en las concentraciones características de los machos.

Nuestros resultados muestran que la timulina decrece la secreción basal de LH de manera similar a lo observado en las adenohipófisis de animales en proestro, mientras que la secreción estimulada de ambas gonadotropinas se ve incrementada al adicionar timulina, efecto descrito previamente para diestro y proestro. El hecho que el promedio de los valores obtenidos en cada día del ciclo estral no sean similares a la respuesta obtenida en este modelo experimental, confirma la hipótesis de que los efectos de la timulina sobre la secreción de las gonadotropinas dependen del estado hormonal de los animales al momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con los descritos por diversos autores, que muestran que la progesterona estimula la liberación espontánea e inducida por GnRH de FSH (Lagacé y col., 1980; Drouin y Labrie, 1981). Sin embargo el efecto de la progesterona sobre la liberación basal de la LH resultó ser inhibitorio. Al respecto diversos trabajos muestran que la progesterona puede ejercer efectos tanto inhibitorios como estimulantes sobre la secreción *in vivo* de gonadotropinas, que indican que dependen de la presencia previa de estradiol y del día del ciclo estral del animal donador (Brownt-Grant y Naftolin, 1972).

Se ha mostrado que la exposición previa de las células de adenohipófisis a progesterona las hace menos responsivas a GnRH en la liberación de LH

(Pérez y Apfelbaum, 1992), sin embargo mantienen una liberación relativamente constante (Janovick y Conn, 1996). Este efecto podría estar ocurriendo en nuestros cultivos, dada la semejanza en la liberación estimulada de LH de las células pretratadas o no con progesterona.

Otra posible explicación a la falta de respuesta a GnRH en la liberación de LH en los cultivos pretratados con progesterona, puede ser la ausencia de estradiol, debido a que este esteroide estimula los receptores a progesterona y en cuyo caso la respuesta es un incremento en la liberación de LH (Cheon y col., 2000).

La variabilidad de los métodos utilizados y por lo tanto de los resultados obtenidos en el estudio de los efectos de la progesterona llevan a conclusiones diversas entre las que destacan que depende de la concentración de la propia progesterona; de la presencia, concentración y tiempo de exposición al estradiol y de la concentración y tipo de estímulo con GnRH (pulsátil o agudo) (Lagacé y col., 1980; Drouin y Labrie, 1981). Pérez y Apfelbaum (1992) sugieren que el significado fisiológico de la acción estimulante de la progesterona sobre la síntesis y secreción de LH sería definir la magnitud de la oleada preovulatoria en el día del proestro y cuya inhibición ya estaría a cargo de la dihidrotestosterona.

Cabe resaltar que nuestros resultados muestran que la hipófisis obtenida de la rata hembra es capaz de responder a una concentración fisiológica de progesterona que es propia de la rata macho (2 ng/ml) y que es 25 veces menor a la que esta normalmente expuesta la hipófisis de la hembra (50 ng/ml) (Hinojosa, 2006).

En cuanto a la respuesta de las células de adenohipófisis a testosterona, Drouin y Labrie (1976) describen que el pretratamiento con este esteroide por un periodo de 40 h incrementa la secreción de FSH tanto basal como estimulada por GnRH, mientras que la secreción basal de LH no se modifica pero es marcadamente inhibida cuando se estimula a las células con GnRH. En nuestros cultivos, se observó una respuesta similar en la secreción de FSH pero no así para la LH en la que no se presentaron cambios en respuesta a GnRH. Los efectos de la testosterona sobre la secreción de las gonadotropinas parece ser específica, ya que no se presenta de la misma manera para FSH que para LH. Existen evidencias que indican que en esta acción diferencial están involucrados los mecanismos que regulan tanto la liberación como la síntesis de las gonadotropinas. Al respecto se ha descrito que la testosterona incrementa el contenido celular y la liberación de FSH, mientras que para la LH se inhibe la liberación aunado a un incremento del contenido celular (Drouin y Labrie, 1976).

Evaluaciones de la concentración de ARNm para las subunidades α y β de FSH y LH indican que la testosterona modula la biosíntesis de gonadotropinas regulando la expresión génica de estas subunidades, donde nuevamente se observan dos efectos opuestos de testosterona sobre el ARNm de la FSH β , un efecto estimulante independiente de GnRH y un efecto inhibitorio el cual está relacionado con la acción de GnRH (Winters y col., 1992). Estudios *in vivo* muestran que la testosterona prolonga la vida media del ARNm de la FSH β pero no del ARNm de la LH β o de la subunidad α (Paul y col., 1990). Retomando lo descrito por Pérez y Apfelbaum, (1992), al parecer el papel fisiológico de los andrógenos sobre la secreción de LH por la hipófisis de la hembra podría ser limitar la oleada

de LH en el día del proestro, hecho que permite sugerir que es la concentración de testosterona característica de los machos la responsable de no evidenciar tal efecto.

Nuestros resultados al igual que los de otros autores (Drouin y Labrie, 1976; Deneff y col., 1980) ratifican el hecho que la testosterona controla la secreción de FSH y LH al actuar directamente sobre la hipófisis y que dichos efectos son específicos para cada gonadotropina.

Cuando se les adicionó timulina a los cultivos previamente tratados con progesterona, los efectos descritos anteriormente para este esteroide (Lagacé y col., 1980; Pérez y Apfelbaum, 1992) se mantuvieron, lo que indica que la timulina no interfiere con dichos efectos. El hecho que la concentración de FSH haya sido similar entre los cultivos pretratados con progesterona y estimulados con GnRH sola o con timulina sugiere que el esteroide tampoco confiere condiciones que favorezcan la acción de la timulina sobre la secreción de gonadotropinas. Los resultados de este trabajo muestran que las concentraciones bajas de progesterona como las presentes en los machos, bloquean el efecto estimulante de la timulina en la secreción de LH estimulada por GnRH.

El pretratamiento con testosterona permite que se manifieste un efecto estimulante de la timulina sobre la liberación basal de ambas gonadotropinas. Sin embargo la concentración de FSH fue similar en los cultivos pretratados con testosterona y estimulados con GnRH sola o con timulina indicando que el esteroide no modifica la sensibilidad de los gonadotropos a timulina.

Hinojosa y col. (2003) mencionan que el pretratamiento con testosterona (100 pg/ml) no modifica la secreción basal de las gonadotropinas al adicionar timulina, sin embargo potencia el efecto sinérgico que tiene la timulina con la GnRH. Nuestros resultados indican que una concentración mayor de testosterona bloquea el efecto estimulante de la timulina.

En resumen, nuestros resultados muestran que los efectos de la timulina sobre la secreción de gonadotropinas por la hipófisis, así como la sensibilidad que le confiere el esteroide al gonadotropo son diferentes según las concentraciones que caracterizan a cada sexo.

CONCLUSIONES

- Las células de adenohipófisis obtenidas de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral mantienen un patrón de liberación de gonadotropinas similar a lo que ocurre *in vivo* aún después de tiempos largos de incubación.
- Los efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de ratas hembra dependen del estado hormonal de los animales al momento del sacrificio.
- La timulina potencia el efecto de GnRH sobre la liberación de FSH y LH por las células adenohipofisarias, dependiendo del día del ciclo estral o del ambiente hormonal preestablecido por los esteroides sexuales.
- El efecto de timulina es regulado por los esteroides sexuales debido a que sensibilizan de manera diferencial a los gonadotropos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera G y Romano MC. (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **123**, 367-373.
- Anthony CP y Thibodeau GA. (1987). Anatomía y Fisiología. 10ª edición. Iberoamericana. México. 344 p.p.
- Audesirk T y Audesirk G. (1997). Biología. La Vida en la Tierra. 4ª edición. Pearson. México. 765-775 p.p.
- Bach JF, Dardenne M y Pléau J-M. (1977). Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* **266**, 55-57.
- Bellanti JA. (1987). Inmunología. 3ª edición. Interamericana. México. 18-58 p.p.
- Brown OA, Sosa YE, Dardene, M Pléau JM y Goya RG. (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J. Gerontol.* **55A**, B170-B176.
- Brownt-Grant K y Naftolin F. (1972). Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone. *J. Endocrinol.* **53**, 37-46.
- Carpenter RHS. (1998). Neurofisiología. 2ª edición. El Manual Moderno. México. 298 p.p.
- Cheon M, Park D, Park Y, Kam K, Park SD y Ryu K. (2000). Progesterone together with estrogen attenuates homologous upregulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA in primary cultured rat pituitary cells. *Endocrine* **13**, 379-384.
- Clayton RN, Solano AR, Garcia-Vela A, Dufau ML y Catt KJ. (1980). Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **107**, 699-706.

- Deneff C, Hautekeer E, Dewals R y De Wolf A. (1980). Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by androgens in rat pituitary cells in culture: Functional diversity of subpopulations separated by unit gravity sedimentation. *Endocrinology* **106**, 724-729.
- Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991). Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Capítulo VII La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. Eds. R Domínguez. Grupo editorial Miguel Ángel Porrúa. México, 121-123.
- Domínguez-González A, Damián-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME y Domínguez R. (1998). Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and media basal hypothalamus in rats during the day of pro-oestrus and its relation to gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Med. Sci. Res.* **26**, 275-278.
- Drouin J y Labrie F. (1976). Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **98**, 1528-1534.
- Drouin J y Labrie F. (1981). Interactions between 17β -estradiol and progesterone in the control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **108**, 52-57.
- Fawcett DW. (1995). Tratado de Histología. 12^a edición. Interamericana-Mc Graw Hill. México. 522-532, 915 p.p.
- Felig P, Broadus AE y Frohman LA. (1981). Endocrinología y Metabolismo. McGraw Hill. México. 719-720.
- Fox SR y Smith MS. (1985). Changes in the pulsatile pattern of luteinizing hormone secretion during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **116**, 1485-1492.

- Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology*. 2ª edición. Eds. E Knobil y JD Neill. Raven Press. New York. 613-658.
- García ML, Hinojosa BL, Domínguez CR, Chavira R y Rosas SP. (2000). Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertad mice: role of thymulin. *J. Endocrinol.* **166**, 381-387.
- Geneser F. (2000). *Histología*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 421-425 y 617-621 p.p.
- Goldstein AL, Low TK, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu S, Naylor PB y Mc Clure JE. (1981). Current status of thymosin and others hormones of the thymus gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* **37**, 369-412.
- Gore-Langton RE y Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD. Raven Press. 2ª edición. New York. 571-627 p.p.
- Guyton AC y Hall JE. (1998). *Tratado de Fisiología Médica*. 6ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México. 651-655 p.p.
- Hadley AJ, Rantle CM y Buckingham JC. (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomod.* **4**, 62-69.
- Halvorson LM y Chin WW. (2001). Hormonas Gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acción. En: *Endocrinología de la Reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª edición. Eds. SSC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 86-117.
- Ham AW y Cormack HD. (1985). *Tratado de Histología*. 8ª edición. Interamericana. México. 794-796 p.p.

- Hinojosa L. (1994). Estudio de los efectos del injerto de timo sobre la pubertad espontánea e inducida en el ratón alopecico-hipotímico. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México. 17-40 p.p.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG y Rosas P. (2003). Sex differences on the effects of thymulin and GnRH on gonadotropin release by *in vitro* pituitary cells. XXVIII Reunión Anual de la AIBIR. 185-198 p.p.
- Hinojosa L. (2006). Estudio de la participación de la timulina en la regulación de la secreción de la FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata adulta. Tesis de doctorado. FES-Zaragoza, UNAM. México. 165 p.p.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, Castillo L y Rosas P. (2004). Effects of thymulin and GnRH on the reelease of gonadotropins by *in vitro* pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Science* **76**, 795-804.
- Ira SF. (2003). Fisiología Humana. 7ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. España. 205-207, 293, 306, 307 p.p.
- Iversen S, Iverse L y Saper CB. (2001). Sistema Nerviosos Autónomo e Hipotálamo. Eds. ER Kandel, JH Schwartz y TM Jessell, Principios de Neurociencia. 4ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. España. 960-981.
- Jambon B, Montagne P, Bene MC, Brayer MP, Faure G y Duheille J. (1981). Immunohistologic localization of "facteur thymique serique" (FTS) in human thymic epithelium. *J. Immunol.* **127**, 255-259.
- Janovick JA y Conn PM. (1996). Progesterone diminishes the sensitivity of gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone (LH) release and protects an LH pool from desensitization: Actions opposed by cholera toxin. *Endocrinology* **137**, 1823-1827.

- Knobil E. (1981). Patterns of hypophysiotropic signals and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Biol. Reprod.* **24**, 44.
- Lagacé L, Massicotte J y Labrie F. (1980). Acute stimulatory effects of progesterone on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **106**, 684-689.
- Lintern-Moore S y Pantelouris EM. (1975). Ovarian development in athymic nude mice. The size and composition of the follicle population. *Mech. Aging Dev.* **4**, 385-390.
- Liu T y Jackson GL. (1984). Long term superfusion of rat anterior pituitary cells: Effects of repeated pulses of gonadotropin-releasing hormone at different doses, durations, and frequencies. *Endocrinology* **115**, 605-613.
- Mendoza ME, Martin D, Candelaria PG y Romano MC. (1995). Evidence that secretory of the reticulo-epithelial cells of the rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *J. Repro. Immunol.* **28**, 203-215.
- Michael SD. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Eds. GS Greenwald y PF Terranova. Raven Press, New York, 445-464 p.p.
- Miller MA, y Leavell LC. (2001). *Manual de Anatomía y Fisiología*. 2ª edición. La Prensa Médica Mexicana. México. 748-754 p.p.
- Nishizuka Y y Sakakura T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad alter neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753-755 p.p.
- Oliver RH, Chem GD y Yeh J. (1999). Follicular Atresia. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. USA. 373 p.p.

- O'Malley BW y Strott CA. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. Eds. SSC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 118-143.
- Page RB.(1999). Anterior Pituitary. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 1. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. USA. 226 p.p.
- Park O y Ramírez VD. (1989). Spontaneous Changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measure with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology* **50**, 66-72.
- Paul SJ, Ortolano GA, Haisenleder DJ Stewart JM, Shupnick y Marsahl JC. (1990) Gonadotropin subunit messenger RNA concentrations after blockade of gonadotropin-releasing hormone action: testosterone selectively increases follicle-stimulating hormone β -unit messenger RNA by posttranscriptional mechanisms. *Mol. Endocrinol*, **4**, 1943-1955.
- Pérez GT y Apfelbaum ME. (1992). Modulatory effect of steroid hormones on GnRH-induced LH secretion by cultured rat pituitary. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**, 963-969.
- Pléau JM, Dardene M y Bach JF. (1981). The serum thymic factor (FTS). *Mol. Cell. Biochem.* **41**, 67-72.
- Pléau JM, Dardenne M, Blouquit Y y Bach JF. (1977). Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. *J. Biol Chem.* **252**, 8045-8047.
- Rebar RW, Morandini IC, Benirschke K y Petze JE. (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: Prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* **107**, 2130-2132.

- Rebar RW, Morandini IC, Erickson FG y Petze EJ. (1981). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* **108**, 120-126.
- Rinaldi-Garaci C, Jezzi T, Baldassarre AN, Dardenne M, Bach JF y Garaci E. (1985). Effect of thymulin on intracellular cyclic nucleotides and prostaglandins E₂ in peanut agglutinin-fractionated thymocytes. *J. Immunol.* **15**, 548-5523.
- Roitt I, Brostoff J, Male O. (2000). Inmunología. 5ª edición. ELSEVIER. España. 32-33 p.p.
- Ross GT. (1990). Follicular Development: The life cycle of the follicle and puberty. En: Control of the Onset of Puberty. Eds. MM Grumbach, PC Sizonenko y ML Aubert. Williams and Wilkins. USA. 376-377 p.p
- Ross MH, Kaye GI y Pawlina W. (2005) Histología texto y atlas de color con biología celular y molecular. 4ª edición. Médica Panamericana. Argentina.
- Safieh-Garabedian B, Ahmed K, Khamashta MA, Tabú NA y Hughes GRV. (1993). Thymulin modulates cytokine release by peripheral blood mononuclear cells: a comparison between healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **101**, 126-131.
- 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.
- Sarkar DK y Fink G. (1979). Effects of gonadal steroids on output of luteinizing hormone releasing factor into pituitary stalk blood in the female rat. *J. Endocrinol.* **80**, 303-313.
- Savoy-Moore RT y Schwartz NB. (1980). Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* **209**, 942-944.

- Snell RS. (2001). Neuroanatomía clínica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. España. 257, 482-485, 490 p.p.
- Van Voorhis BJ (1999). Follicular Development. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Eds. E Knobil y JD Neill. Academic Press. USA. 376 p.p.
- Vander A, Sherman J y Luciano D. (2001). Human Physiology. 8ª edición. The mechanisms of body function. McGraw Hill. USA. 241-215 p.p.
- Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P y Attardi B. (1992). Effects of testosterone on gonadotropin Subunit Messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **130**, 726-734.
- Yeh J y Adashi EY. (2001). El Ciclo Ovárico. En: Endocrinología de la Reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª edición. Eds. SSC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 164-202.
- Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT. (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfuse with thymic extracts. *Thymus*, **12**, 253-264.