



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA SOBRE LA  
SECRECIÓN *in vitro* DE LAS GONADOTROPINAS EN  
CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA MACHO.  
PAPEL DE LOS ESTEROIDES SEXUALES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G A**

PRESENTA

**NAHAM ORTEGA FLORENCIO**

Directora de tesis  
Dra. Patricia Rosas Saucedo



México, D.F.

Marzo del 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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  
SECRECIÓN *in vitro* DE LAS GONADOTROPINAS EN  
CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA MACHO.  
PAPEL DE LOS ESTEROIDES SEXUALES**

Tesis presentada por: Naham Ortega Florencio

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*

---

---

A mí Mamá, no solo por su amistad, amor, protección y cuidados que me ha dado durante tantos años, sino también por ser el cimiento de mi vida sin el cual, no estaría hasta donde he llegado ¡GRACIAS!

A mí hermano Luis, por su comprensión, cariño, apoyo, pero sobre todo por ser mi amigo y consejero, te quiero mucho manito.

A mí Keilani, por darme una razón más por la cual seguir adelante.

A Tomás, por aparecer en mi vida justo cuando más lo necesitaba, porque en todos estos años además de amor, comprensión y apoyo en los buenos y malos momentos, me dio lo más bello de mi vida: mi hija, te amo.

A mi hermana Sarai y sus bebés (Yohana y Luis), por el cariño que me han dado, los quiero mucho.

A mí Papá por su cariño y apoyo durante mi estancia en la escuela.

¡Por fin!

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Patricia por ser parte fundamental en mi formación profesional, por la amistad incondicional que me ha brindado y por todo el apoyo que me ha dado en todo momento.

A la Dra. Lorena Hinojosa Baca, por sus enseñanzas con lo relacionado a los cultivos, por su amistad y buenos consejos.

A los miembros del jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en C. Raúl Zavala Chavero

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dra. Leticia Morales Ledesma

por su colaboración y certeras opiniones durante la revisión de esta tesis.

Al Biol. Mario Cárdenas León y al Biol. Roberto Chavira por su apoyo para realizar la determinación de gonadotropinas por radioinmunoanálisis; al personal de los Laboratorios de Hormonas Esteroides y de Hormonas Protéicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

A la MVZ. Adriana Altamirano y al personal del bioterio por todas las facilidades otorgadas para la adquisición y mantenimiento de los animales de experimentación utilizados en este estudio.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano responsable de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental por la ayuda prestada para la realización de los cultivos.

Al Dr. Isaías H. Salgado Ugarte, por la asesoría para el análisis estadístico de los resultados.

A mi familia en general por haberme brindado cariño y comprensión en los malos momentos que pasé.

A mis amigas Ivette, Selene, Claudia y Adriana porque me apoyaron y aguantaron en el momento más difícil de mi vida.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción: Las Lores, Juanita, Eloir, Adriana, Bárbara y Claudia (por su colaboración en la realización de los cultivos).

---

---

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> . . . . .	i
<b>INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> . . . . .	2
I. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo . . . . .	2
II. Esteroidogénesis . . . . .	8
III. Características morfofuncionales del timo . . . . .	10
IV. Timulina . . . . .	15
V. Relaciones neuroendócrinas entre el timo y el sistema reproductor . . . . .	16
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> . . . . .	19
<b>HIPÓTESIS</b> . . . . .	20
<b>OBJETIVOS</b> . . . . .	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> . . . . .	21
<b>RESULTADOS</b> . . . . .	27
1. Concentración de GnRH con la que se obtiene la máxima respuesta en la liberación de FSH y LH . . . . .	27
2. Efectos de la timulina sobre la liberación basal y estimulada de FSH y LH . . . . .	28
3. Efectos de la timulina y los esteroides sexuales sobre la liberación basal y estimulada de las gonadotropinas . . . . .	30
<b>DISCUSIÓN</b> . . . . .	36
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	43
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> . . . . .	44



## RESUMEN

La timulina es un péptido sintetizado exclusivamente en el timo y regula la función del eje hipotálamo-hipofisario, ya que adicionada a cultivos de hipófisis de rata hembra o macho, incrementa la liberación de FSH y LH. Sin embargo en células de hipófisis obtenidas de ratas en diferente día del ciclo estral, la timulina estimula o inhibe la liberación de ambas gonadotropinas. Lo anterior lleva a cuestionar el papel que juegan los esteroides sexuales en dichos efectos, por lo que en este estudio se analizó la participación de la timulina en la liberación de FSH y LH tanto basal como estimulada por GnRH en células de adenohipófisis de rata macho pretratadas o no con esteroides sexuales en las concentraciones más altas presentes a lo largo del ciclo estral de la rata hembra.

Se utilizaron cultivos en monocapa de células de adenohipófisis de rata macho adulta. Las células se sometieron a diferentes tratamientos hormonales durante tres horas. En el medio de cultivo se determinaron las concentraciones de FSH y LH por radioinmunoanálisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en ng/ml y como media  $\pm$  e.e.m.

Con el objeto de evaluar los efectos de la timulina sobre la liberación basal y estimulada por GnRH de ambas gonadotropinas, las células se trataron con timulina (100 ng/ml), o GnRH ( $10^{-10}$  M), o GnRH+timulina o sin tratamiento (basal). Los resultados muestran que la timulina incrementa la liberación basal de LH ( $80.5 \pm 6.6$  vs  $132.0 \pm 13.3$ ,  $p < 0.05$ ).

Otros cultivos fueron pretratados por 24 h con progesterona [ $P_4$ ] (50 ng/ml), testosterona [T] (100 ng/ml) o  $17\beta$ -estradiol [ $E_2$ ] (100 pg/ml). Los esteroides se eliminaron al cambio de medio por medio fresco y los cultivos pretratados con cada uno de ellos se trataron con timulina o GnRH o GnRH+timulina o sin tratamiento. La adición de timulina provocó que las células adenohipofisarias pretratadas con  $P_4$  disminuyeran la liberación de LH respecto a las que sólo estuvieron en presencia del esteroide ( $121.5 \pm 16.5$  vs  $164.6 \pm 15.3$ ,  $p < 0.05$ ). Cuando a las células de adenohipófisis pretratadas con  $P_4$  o  $E_2$ , se les adicionó timulina y GnRH incrementaron la liberación de LH ( $P_4$ :  $127.0 \pm 10.1$  vs  $189.5 \pm 20.7$ ;  $E_2$ :  $139.8 \pm 9.1$  vs  $175.0 \pm 15.7$ ,  $p < 0.05$ ).

Ninguno de los tratamientos realizados con timulina en las células de adenohipófisis de macho, modificó la liberación de FSH.

En conclusión la timulina muestra actividad hipofisiotrópica, regula de manera diferencial la liberación de FSH y LH, su acción depende de la presencia de GnRH y de la sensibilidad que el esteroide le confiere al gonadotropo.

## **INTRODUCCIÓN**

Las funciones del sistema reproductivo requieren de la integración funcional entre elementos neurales, hormonales y neurohormonales secretados por los diferentes componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El timo es necesario para el funcionamiento de dicho eje, ya que la falta o atrofia de este órgano está relacionada con diversos desordenes reproductivos. Algunos estudios se han centrado en caracterizar la naturaleza química y biológica de los péptidos secretados por el timo (Bach y col., 1984; Cruise y Lewis, 1995; Pléau y col., 1981; Rebar y col., 1981c; Yen y col., 2001).

A la fecha se ha descrito un gran número de péptidos tímicos, de los cuales algunos ejercen su actividad hormonal sobre la función reproductiva. La timulina es uno de estos péptidos, pero a diferencia de otros, tiene la particularidad de ser sintetizado exclusivamente por las células retículo-epiteliales del timo (Hall y col., 1992).

Estudios realizados *in vivo*, muestran que la timulina regula la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada interactuando con uno o más de sus componentes (García y col., 2000, 2005). La acción de la timulina sobre la liberación de las gonadotropinas en cultivo de hipófisis de rata depende del ambiente hormonal del donador (Zaidi y col., 1988; Hinojosa y col., 2004). Dentro de este contexto, se analizaron los efectos de la timulina sobre las funciones de la adenohipófisis de la rata macho y el papel que juegan los esteroides sexuales en la regulación de estos efectos.

## **MARCO TEÓRICO**

### **I. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo**

#### ***Hipotálamo***

El hipotálamo forma parte del diencefalo, se localiza en la base del cerebro por debajo del tálamo, directamente sobre la hipófisis y medialmente limita al tercer ventrículo. Para su estudio al hipotálamo se le divide longitudinalmente en tres regiones: anterior, medio y posterior. La parte anterior está superpuesta al quiasma óptico y comprende al núcleo supraquiasmático y el área preóptica anterior. El tercio medio del hipotálamo superpuesto al tallo hipofisario, contiene los núcleos ventromedial, paraventricular, supraóptico e infundibular. Finalmente, el tercio posterior del hipotálamo comprende los cuerpos mamilares y el área hipotalámica posterior (Noback, 1980; Nolte, 1994; Iversen y col., 2001) (Fig. 1).

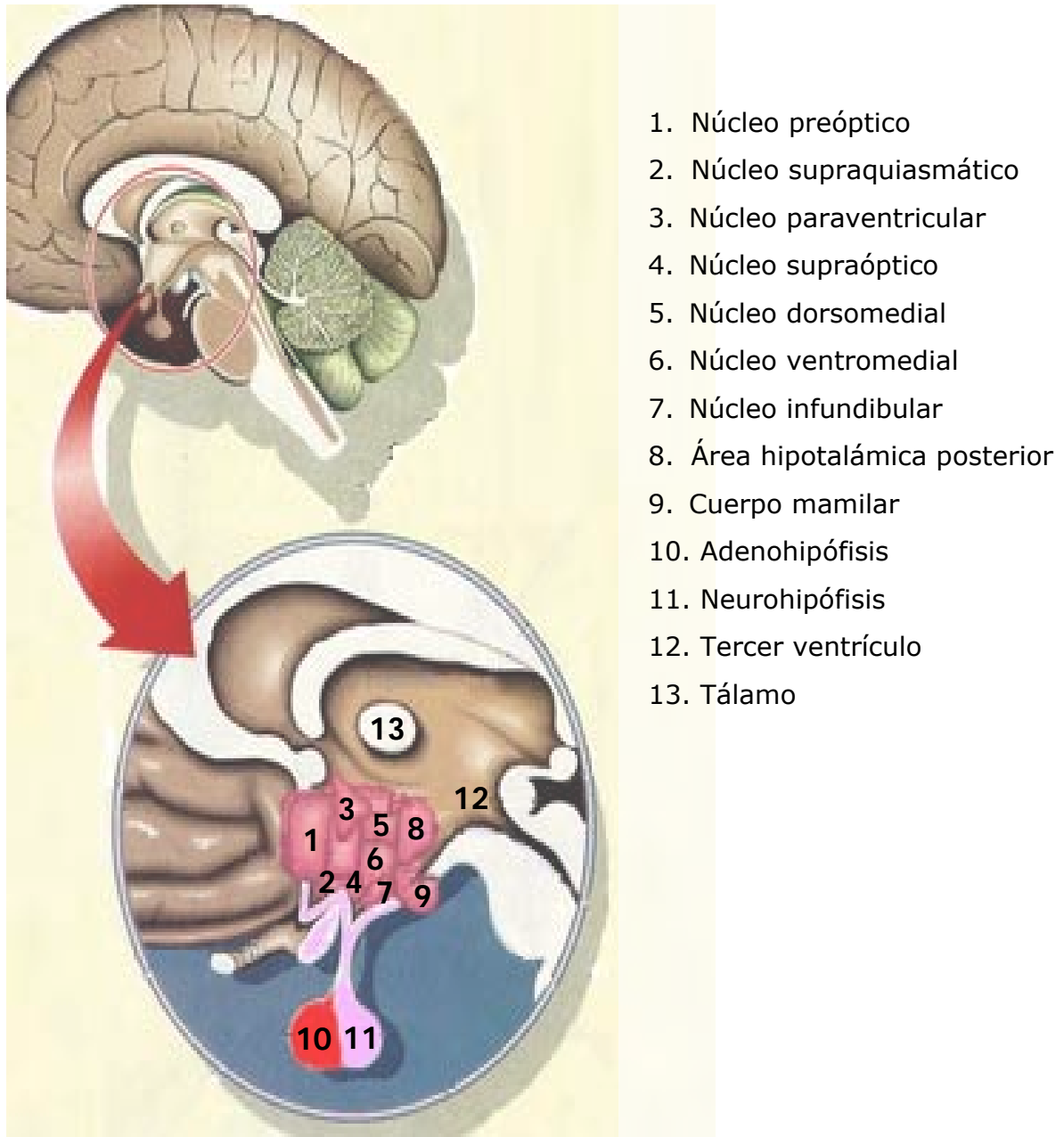
El hipotálamo es el área de control central especializada en la regulación homeostática. Algunas neuronas del hipotálamo sintetizan factores liberadores llamados neurohormonas, las cuales son transportadas por los axones desde los cuerpos celulares hasta la eminencia media. De ahí las neurohormonas pasan al sistema porta hipotálamo-hipofisario y son llevadas hacia la hipófisis. Los productos de secreción hipotalámicos son: la hormona liberadora de la somatotropina (GRH), hormona inhibidora de la hormona del crecimiento (GIH), el factor liberador de la prolactina (PRF), la hormona inhibidora de la liberación de prolactina (PIH), el factor liberador de la tirotrópina (TRF), la hormona liberadora

de la corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Nolte, 1994; Iversen y col., 2001; Vander y col., 2001).

### **Hipófisis**

La hipófisis se ubica por debajo del hipotálamo en una cavidad del hueso esfenoides llamada silla turca. En la parte superior, la duramadre se extiende sobre la silla y forma un diafragma sobre la misma, que presenta un orificio en la parte media por el que pasa el tallo hipofisario. La hipófisis sintetiza varias hormonas vinculadas con la regulación del metabolismo, el crecimiento y la reproducción. Tiene conexiones nerviosas y vasculares con el cerebro, lo cual le proporciona un papel clave en la interacción de los sistemas nervioso y endócrino (Fawcett, 2000; Geneser, 2000) (Fig. 1).

La hipófisis está conformada por dos regiones, la adenohipófisis constituida por un parénquima glandular rojizo de consistencia blanda y otra más pequeña o neurohipófisis de coloración blanca y más firme (Fig. 1). La adenohipófisis se divide en tres porciones: la *pars tuberalis*, la *pars distalis* y la *pars intermedia*. Las células glandulares de la *pars distalis* se clasifican en células cromófilas y cromófobas en función de su avidéz o falta de afinidad por los colorantes. En la hipófisis del humano se han identificado cinco tipos de células cromófilas, mediante pruebas inmunohistoquímicas y microscopia electrónica (Geneser, 2000; Ganong, 2004).



**Figura 1.** Esquema que muestra la ubicación anatómica de la hipófisis y el hipotálamo con sus diferentes núcleos (tomado y modificado de Iversen y col., 2001).

1. Somatotropas. Son el tipo celular más abundante del lóbulo anterior (50%), secretan la hormona del crecimiento (GH) bajo el estímulo de la GHRH. Su secreción es suprimida por la GIH.
2. Mamotropas. Representan el 15% del total de las células de la adenohipófisis. Tienden a distribuirse en el lóbulo anterior. Bajo el estímulo del PRF, secretan la hormona lactógena llamada prolactina (PRL). Esta última es inhibida por la PIH
3. Tirotropas. Se encuentran por lo general en la porción anteromedial del lóbulo anterior y constituyen alrededor del 10 al 15% de las células de la adenohipófisis. Secretan la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH), bajo el estímulo del TRF.
4. Corticotropas. Representan del 15% del total de las células de la adenohipófisis y están ampliamente distribuidas en la región anteromedial de la *pars distalis* y unas pocas pueden invadir el lóbulo posterior. Secretan adrenocorticotropina (ACTH) por estimulación de la CRH.
5. Gonadotropas. Componen alrededor del 10% de las células de la hipófisis anterior. Son células redondeadas que se sitúan generalmente junto a los sinusoides. Bajo el estímulo de la GnRH, secretan la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que regulan la maduración de los gametos y la secreción de los esteroides sexuales, las que a su vez regulan la liberación de ambas gonadotropinas mediante un mecanismo de retroalimentación inhibitorio (Audesirk y Audesirk, 1997; Fawcett, 2000; Geneser, 2000; Vander y col., 2001; Ganong, 2004).

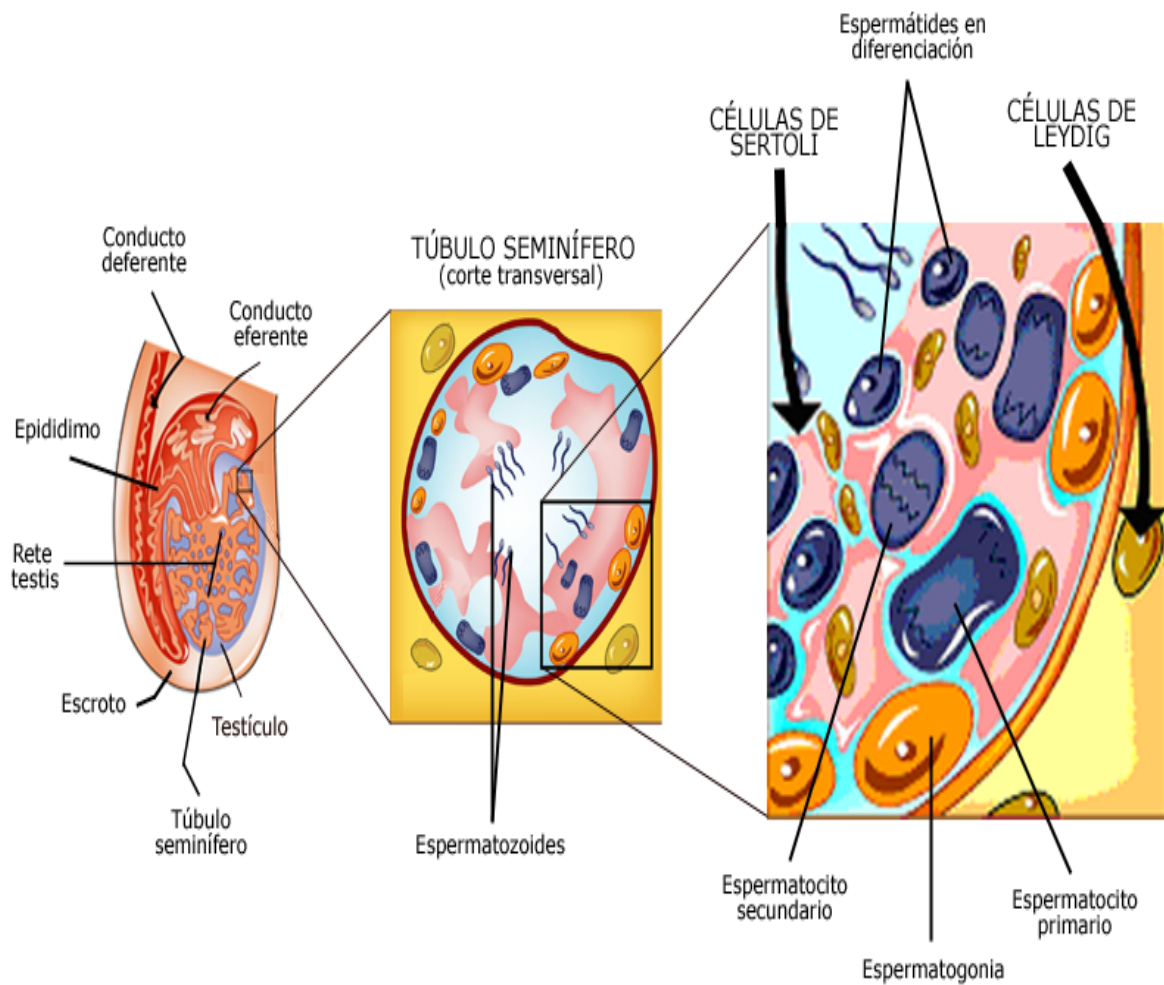
### **Testículo**

El testículo es la gónada de los machos. Sus funciones son la producción de gametos viables (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas sexuales (esteroidogénesis). Es un órgano glandular y pareado que se halla situado en la bolsa testicular o escroto. Está delimitado por una cápsula formada por tres capas: la túnica vaginal, que es la más externa y está constituida de tejido epitelial; la túnica albugínea o capa intermedia constituida de fibroblastos, haces de colágeno y células del músculo liso y la túnica vascular o capa interna, que en realidad es una extensión del tejido intersticial formada de vasos sanguíneos y algunas células de Leydig embebidas en tejido conjuntivo laxo. Estas últimas son células grandes, poligonales, con un gran núcleo redondo, se encuentran en grupos pequeños muy irrigados por capilares y sintetizan testosterona (Ninomiya y col., 1995; Geneser, 2000; Miller y Leavell, 2001; Yen y col., 2001) (Fig. 2).

De la túnica albugínea parten tabiques hacia la porción central del testículo que lo dividen en cavidades comunicadas entre sí. En estas cavidades se encuentran los túbulos seminíferos donde se lleva a cabo la producción de espermatozoides y contienen dos tipos de células: las germinales y las de Sertoli. Estos túbulos se entretajan y se unen en una red de conductos pequeños denominada red testicular (*rete testis*) (Ninomiya y col., 1995; Miller y Leavell, 2001) (Fig. 2).

El control de las funciones de los testículos se efectúa mediante un sistema de retroalimentación inhibitoria entre las hormonas producidas por los testículos y las secretadas por el hipotálamo y la adenohipófisis.





**Figura 2.** Esquema que muestra la histología del testículo y del túbulo seminífero (tomado y modificado de Audesirk y Audesirk, 1997).

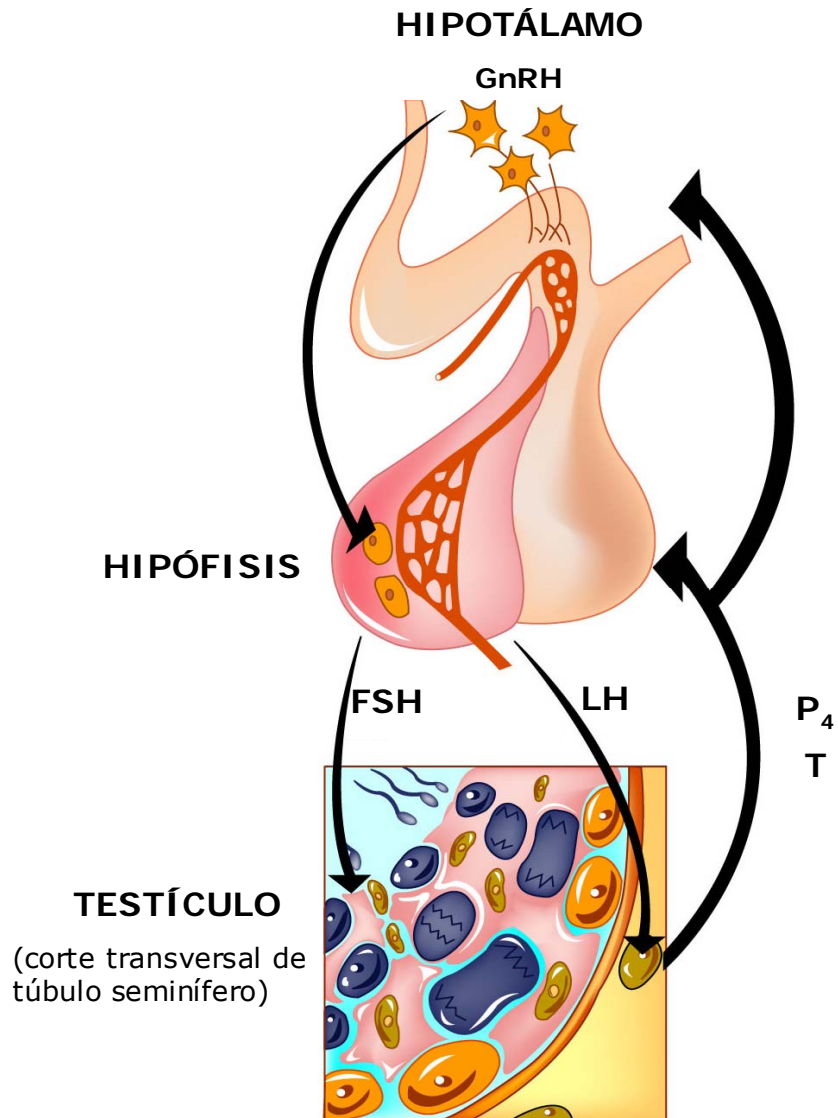
El hipotálamo sintetiza la GnRH y la secreta de manera pulsátil hacia la hipófisis, que en respuesta a este estímulo secreta FSH y LH. En el testículo la LH actúa sobre las células de Leydig y estimula la secreción de tres tipos de andrógenos, testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona. El sistema se cierra cuando la testosterona inhibe la secreción de LH en la adenohipófisis y la de GnRH en el hipotálamo (Schumm, 1989; Ninomiya y col., 1995; Ganong, 2000, 2004) (Fig. 3).

La FSH actúa sobre las células de Sertoli manteniendo un ritmo constante en la producción y maduración de los espermatozoides, proceso en el cual la testosterona es necesaria. La FSH también promueve la producción de proteína fijadora de andrógeno (ABP) y la secreción de inhibina, que actúa directamente sobre la hipófisis para inhibir la secreción de la FSH (Ninomiya y col., 1995; Guyton 1997; Ganong 2000, 2004) (Fig. 3).

## II. Esteroidogénesis

Existen dos vías para la síntesis de esteroides:

1. Vía de la pregnenolona. En las células de Leydig, los ésteres de colesterol captados del plasma y los que son sintetizados *in situ* son hidrolizados y transformados por una colesterasa a la forma de colesterol libre. Posteriormente la enzima 20-22-desmolasa ( $P_{450}$ ) produce una ruptura en su cadena lateral convirtiéndolo en pregnenolona, la cual es transformada inmediatamente a  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona por medio de la  $17\alpha$ -hidroxilasa ( $P-450_{C17}$ ). La  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona sufre una ruptura de la cadena lateral del C-18



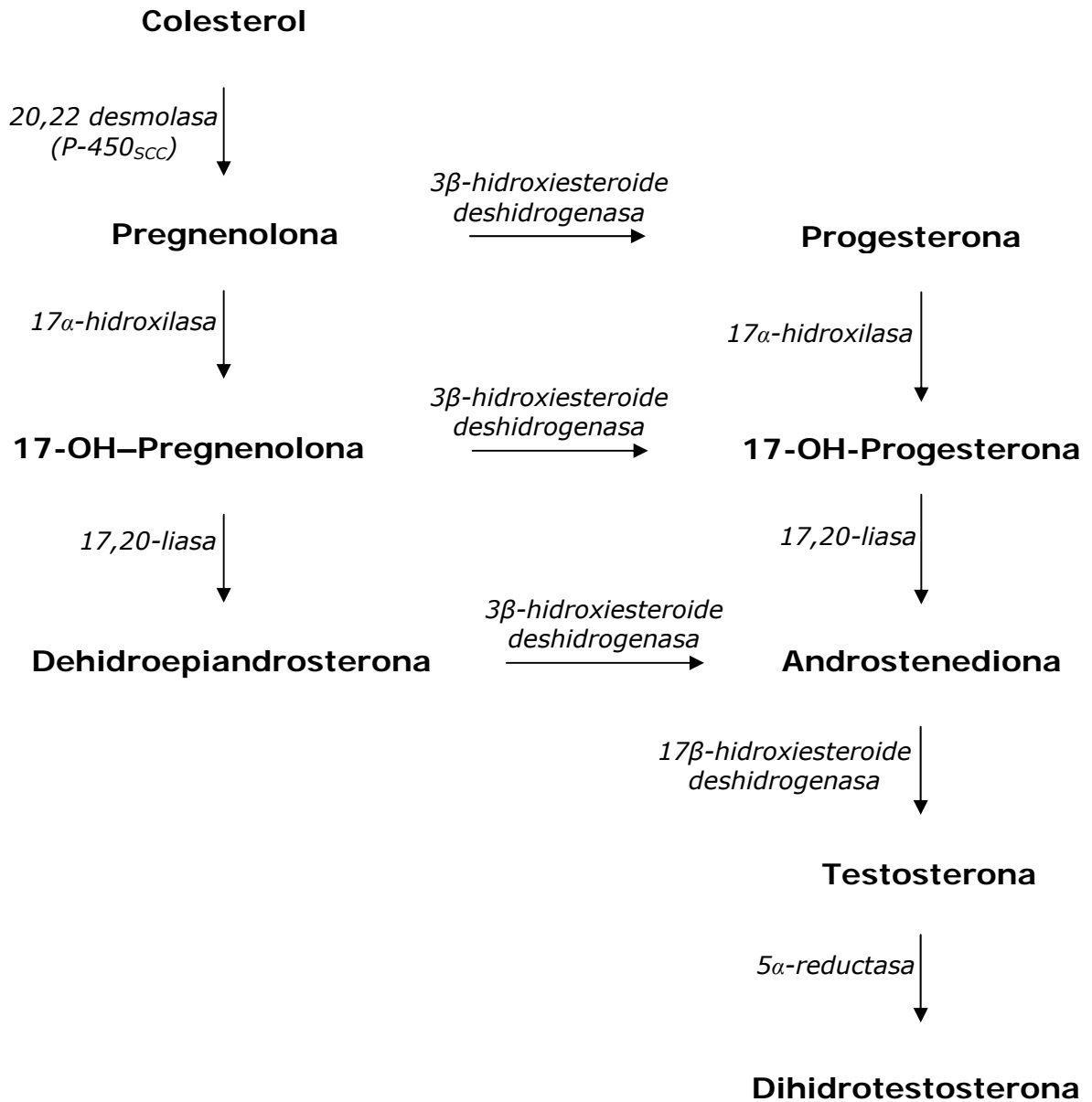
**Figura 3.** Esquema que representa la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (tomado y modificado de Audesirk y Audesirk 1997).

mediante la 17,20-liasa formando dehidroepiandrosterona. Esta última por acción de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^4$ -isomerasa, se convierte en androstenediona que a su vez y por intervención de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, da lugar a la testosterona (Schumm, 1989; Ungar, 1989; Berne y Levy, 1992 a,b; Yen y col., 2001).

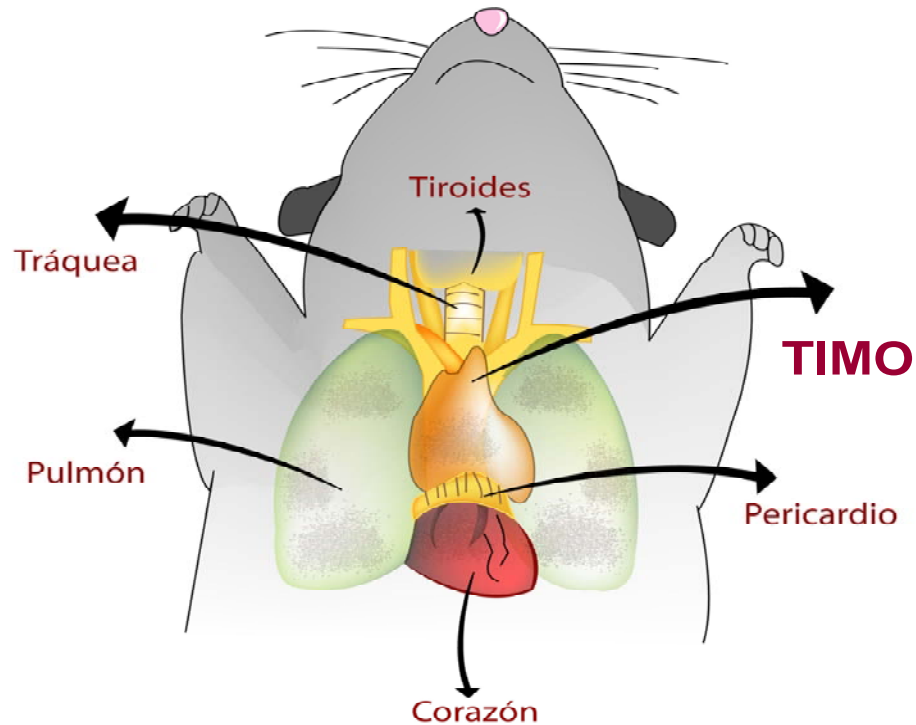
2. Vía de la progesterona. A partir de la pregnenolona se forma la progesterona mediante una reacción catalizada por la enzima  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Por medio de la 17-hidroxilasa/17,20 desmolasa la progesterona es transformada en 17-hidroxiprogesterona. Esta última es transformada a androstenediona por acción de la 17,20-liasa y finalmente la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa la transforma en testosterona (Ungar, 1989; Berne y Levy, 1992 a,b; Yen y col., 2001) (Fig. 4).

### **III. Características morfofuncionales del timo**

El timo es un órgano bilobulado localizado en la parte superior del tórax, por detrás del esternón, a lo largo de la tráquea y abajo de la salida de los grandes vasos del corazón. Se extiende desde la base del cuello hasta el saco pericárdico. Su vascularización procede de las arterias tiroideas superior e inferior (Fawcett, 2000; Geneser, 2000; Miller y Leavell, 2001) (Fig. 5).



**Figura 4.** Vías de síntesis de las hormonas sexuales en el testículo. (tomado y modificado Ganong 1996 y Guyton 1997).



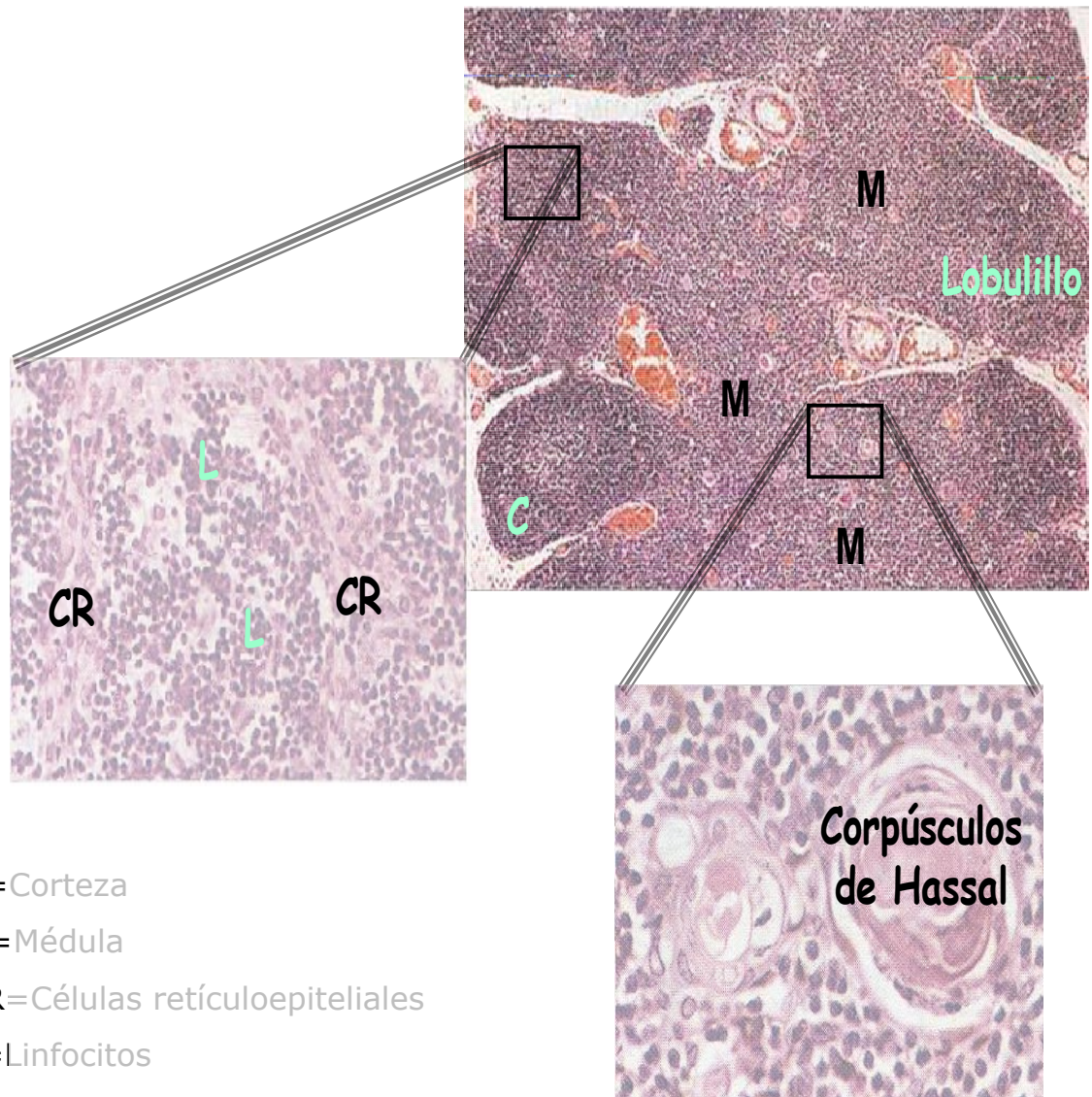
**Figura 5.** Ubicación anatómica del timo en la rata.

Embriológicamente el timo deriva del tercer par de bolsas faríngeas como un par de primordios, uno a cada lado de la línea media. Cada esbozo tímico da origen a un lóbulo que se une al otro por la parte media con tejido conjuntivo. Los dos lóbulos del timo están rodeados por una delgada cápsula de tejido conectivo que emite numerosos tabiques que se extienden desde la cápsula hacia el interior del órgano, dividiéndolo en lobulillos (Fawcett, 2000; Geneser, 2000).

Los lobulillos poseen una matriz formada por células epiteliales dispuestas en forma de red (células retículo-epiteliales). Cada lobulillo presenta una zona periférica o corteza y una zona central o médula. En la corteza las células epiteliales se unen por grandes proyecciones citoplasmáticas en cuyos espacios se deposita un gran número de linfocitos. La médula contiene una menor cantidad de linfocitos y un mayor número de células epiteliales con proyecciones de menor tamaño. Algunas de estas células se encuentran distribuidas en forma concéntrica originando los llamados corpúsculos de Hassall (Langman y Sadler, 1996; Fawcett, 2000; Geneser 2000; Miller y Leavell, 2001) (Fig. 6).

En la mayoría de los vertebrados, el timo alcanza su tamaño máximo al nacer o poco tiempo después (en relación al peso corporal). Su crecimiento continúa hasta el inicio de la pubertad, momento en el cual comienza un proceso gradual de involución debido al incremento en las concentraciones de esteroides sexuales en sangre. La atrofia del timo se manifiesta primero en la corteza que se vuelve más angosta, hasta que en el adulto el órgano es sustituido en su mayoría por tejido adiposo (Bach y col., 1984; Geneser, 2000).

Las células retículo-epiteliales del timo secretan una serie de hormonas peptídicas llamadas timosinas, que en su mayor parte promueven la aparición de marcadores necesarios para el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos T. Los precursores de estas células se originan en la médula ósea y al llegar al timo se denominan timocitos, que al madurar migran vía sanguínea y se depositan en tejidos linfoides periféricos (Bach y col., 1984; Bellanti y Kadlec, 1987; Rodríguez, 1996; Roitt y Delves, 2003).



**Figura 6.** Fotomicrografías de cortes histológicos del timo (tomado y modificado de Bellanti 1987).



Entre las hormonas que son secretadas por el timo se encuentran la timosina fracción 5 (timosina F-5) que es una familia de péptidos (timosina  $\alpha_1$ , timosina  $\alpha_5$ , timosina  $\alpha_7$ , polipéptido  $\beta_1$ , timosina  $\beta_3$ , timosina  $\beta_4$ , timosina  $\beta_8$  y timosina  $\beta_9$ ), la timopoyetina, el factor tímico humoral y la timulina (Goldstein y col., 1981; Vander y col. 2001).

#### **IV. Timulina**

La timulina o factor tímico del suero (FTS por sus siglas en francés), es sintetizada exclusivamente en las células retículo-epiteliales del timo. Es un nonapéptido (pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH) con peso molecular de 857 g/mol y cuya actividad biológica y vida media dependen de su asociación con el zinc. Se ha observado que la timulina estimula la diferenciación y maduración de las subpoblaciones de linfocitos T, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis de éstos (Pléau y col., 1981; Bach y col., 1984; Cruise y Lewis, 1995).

El control de la secreción de la timulina declina conforme avanza la edad del organismo y depende de una compleja red de eventos. Su liberación es modulada por un mecanismo de autorregulación (Cohen y col., 1986) y por el sistema neuroendócrino, en el que participan diversas hormonas hipofisarias (melatonina, GH, PRL, entre otras), hormonas tiroideas (tiroxina, triyodotironina) y hormonas esteroides. La timulina presenta una interacción bidireccional con el sistema neuroendócrino ya que modula directa o indirectamente la liberación de algunas hormonas como la ACTH, LH, TSH, PRL y CRF (Savino y col., 1988; Mocchegiani y

col., 1990; Molinero y col., 2000; Goya y col., 1995; Fabris y Mocchegiani, 1985; Dardene y col., 1988; Hadley y col., 1997)

## **V. Relaciones neuroendócrinas entre el timo y el sistema reproductor**

Alrededor de la década de los 70's, diversos grupos de investigación aportaron las primeras evidencias que vinculan al timo con el sistema reproductor. Uno de los modelos biológicos es el ratón congénitamente atímico y alopécico (nu/nu), el cual presenta retraso en el inicio de la pubertad, ovarios poco desarrollados con reducción en el número de folículos en crecimiento, bajas concentraciones de FSH y LH en sangre y de GnRH en hipotálamo y su fertilidad es muy baja o nula (Flanagan, 1966; Lintern-Moore y Pantelouris, 1975, Lintern-Moore y col., 1976; Rebar y col., 1980, 1981b).

Otro de los modelos utilizados para el estudio de la relación timo-sistema reproductor es el ratón timectomizado a los tres días de edad (Tx-3). La ausencia de timo desde la etapa neonatal conlleva a retraso en el inicio de la pubertad, menor desarrollo de los ovarios y el útero, concentraciones bajas de FSH, LH, GH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> y disgénesis ovárica en la etapa adulta. Esta última es de origen autoinmune y se presenta después de los 20 días de edad, lo que ocasiona infertilidad (Nishizuka y Sakakura, 1969; 1971; Besedovsky y Sorkin, 1974; Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

En ambos modelos biológicos, ya sea congénita o quirúrgicamente atímicos, el trasplante de timo durante la etapa neonatal previene o restituye las alteraciones reproductoras que los caracterizan (Nishizuka y Sakakura, 1969; Rebar y col., 1980), lo que permitió postular la participación del timo en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

Estudios realizados por Rebar y col. (1981a) utilizando un sistema de perfusión hipotálamo-hipofisario muestran que la adición de la timosina F-5 o de uno de los péptidos que la componen, la timosina  $\beta_4$ , incrementan la secreción de LH al medio de cultivo. La exposición por separado de la hipófisis o el hipotálamo a la hormona tímica, muestran que estos péptidos actúan sobre el hipotálamo estimulando la liberación de GnRH.

Las células retículo-epiteliales del timo de rata prepúber sintetizan un factor de 28 KD que modula la esteroidogénesis gonadal e inhibe la respuesta de las células del ovario y del testículo a la gonadotropina coriónica humana (hCG) al competir por el mismo receptor. El mismo factor incrementa la liberación de la FSH y la LH y potencia los efectos de la GnRH en cultivos de células de hipófisis de rata macho (Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989; Mendoza y col., 1995).

García y col. (2000), describen que en el ratón la timectomía realizada a los 10 días de edad (Tx-10), retrasa el inicio de la pubertad y disminuye la concentración de  $17\beta$ -estradiol, así como la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico. La administración sistémica diaria de timulina, iniciando inmediatamente después de la cirugía, normaliza los parámetros reproductores.

En la rata macho la administración de timulina reduce las concentraciones de testosterona; cuando los animales son hipofisectomizados y tratados con hCG, la inyección de timulina incrementa las concentraciones de este andrógeno. En estudios *in vitro*, la timulina modifica la síntesis de testosterona por los testículos de rata en función de la dosis administrada y de la edad del animal (Wise, 1998).

Estudios realizados en el cultivo de células de adenohipófisis de rata macho muestran que la adición de timulina al medio incrementa la liberación espontánea de la LH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997). Brown y col. (2000) observaron que la adición de timulina a las células adenohipofisarias de rata hembra estimula la liberación espontánea de ambas gonadotropinas, pero al estar presente la GnRH el efecto sobre la liberación de FSH es aditivo, mientras que el de LH es sinérgico.

Hinojosa y col. (2004) muestran en hipófisis de ratas sacrificadas en cada día del ciclo estral que la timulina modifica la liberación de FSH y LH espontánea o inducida por la adición de GnRH, dependiendo del día del ciclo estral en el que se encontraban los animales al momento del sacrificio.

Partiendo de la existencia de un eje neuro-inmuno-endócrino en el cual está vinculado el timo, gran parte de las alteraciones reproductivas asociadas con la ausencia o deficiencia del timo, son restablecidas por el tratamiento con timulina, probablemente por su acción sobre la hipófisis. Sin embargo, poco se sabe sobre de la regulación de este péptido a nivel hipofisario, lo que hace necesario profundizar en esta línea de estudio.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diversos estudios han mostrado que la timulina adicionada a cultivos de hipófisis anterior de rata hembra o macho, incrementa la liberación de FSH y LH, efecto que se potencia al estar presente la GnRH. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio utilizando células de adenohipófisis de rata hembra, han mostrado que la timulina modifica la liberación de las gonadotropinas dependiendo del día del ciclo estral. Estos resultados nos llevan a las siguientes preguntas ¿los efectos de la timulina sobre la liberación de las gonadotropinas dependen del ambiente hormonal del donador? ¿son los esteroides sexuales los que modulan estos efectos? Por ello se decidió estudiar la participación de la timulina en la liberación de FSH y LH en células adenohipofisarias de rata macho pretratadas con esteroides sexuales en las concentraciones más altas presentes a lo largo del ciclo estral de la rata hembra.

## **HIPÓTESIS**

Dado que en las células de adenohipófisis de rata hembra, la timulina estimula o inhibe la liberación de FSH y LH dependiendo del día del ciclo estral del animal donador, entonces en las células de adenohipófisis de rata macho, el tratamiento con timulina modificará la liberación de las gonadotropinas y estará en función del pretratamiento con esteroides sexuales.

## **OBJETIVOS**

- Determinar la concentración de GnRH con la que se obtiene la máxima respuesta en la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata macho.
- Analizar los efectos de la adición de timulina a cultivos de adenohipófisis de rata macho, sobre la liberación de FSH y LH.
- Analizar si el pretratamiento con los esteroides sexuales en las concentraciones más altas presentes a lo largo del ciclo estral de la rata hembra, modifican los efectos de la timulina sobre la liberación de gonadotropinas por las células adenohipofisarias de la rata macho.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho adultas de 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 ( $21\pm 2$  °C), humedad (43-47%), fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h), con libre acceso al agua y al alimento. En todos los casos se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana sobre Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El Comité de Bioética de la FES-Zaragoza, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en el presente estudio.

### **Cultivo de células adenohipofisarias**

Para cada ensayo se utilizaron 20 animales que 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 libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Posteriormente las hipófisis se llevaron a la campana de bioseguridad con 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 Petri para separar la adenohipófisis de la neurohipófisis, dividiendo a la primera en pequeños fragmentos que se colocaron en un matraz con tripsina (GIBCO BRL, Grand Island, NY,

USA) al 0.25% y se incubaron durante 15 min a 37 °C en baño María con agitación moderada. Se eliminó el exceso de tripsina y se resuspendió el tejido en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 1% (v/v) de antibiótico (penicilina 10,000 U/ml y estreptomicina 10 mg/ml) y 0.1% de glucosa y ajustando a pH 7.6.

Se realizó la disgregación celular, deslizando repetidas veces los fragmentos de adenohipófisis a lo largo de una pipeta de 10 ml, hasta lograr la máxima separación de las células en el medio eliminando los fragmentos de tejido. En cada ensayo se realizó el conteo celular en un hemocitómetro para obtener una concentración final de  $10^6$  células/ml.

Las células se sembraron en cajas de cultivo Nalgen Nunc (Internatonal, Rochester, NY, USA). Los cultivos se incubaron a 37 °C, en una atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. A todos los cultivos se les realizó un cambio de medio por medio fresco a las 24 h y otro a las 48 h.

## **Diseño experimental**

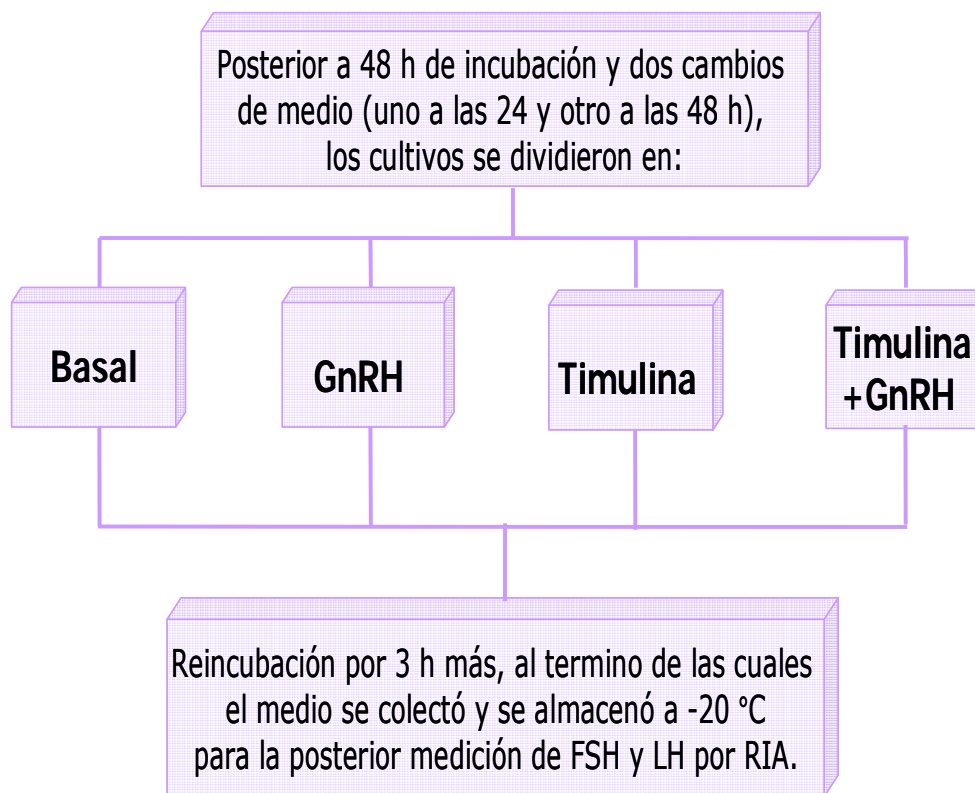
### ***1. Determinación de la concentración de GnRH con la que se obtiene la máxima respuesta en la liberación de FSH y LH.***

Con el objeto de obtener la máxima liberación de FSH y LH en respuesta a GnRH, se realizó una curva dosis-respuesta sometiendo las células de adenohipófisis preincubadas por 48 h a concentraciones crecientes de GnRH (0 basal,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) por un periodo de tres horas. Pasado este tiempo se recuperó el medio y se almacenó a -20 °C.



**2. Estudio de los efectos de la timulina sobre la liberación basal y estimulada de FSH y LH.**

Con el propósito de analizar los efectos de la timulina sobre la liberación basal y estimulada por GnRH de ambas gonadotropinas, después de la preincubación de 48 h, los cultivos se dividieron en los siguientes grupos experimentales: basal, sin tratamiento, tratados con GnRH ( $10^{-10}$  M)<sup>\*</sup> o con timulina (100 ng/ml) o con GnRH+timulina (mismas concentraciones que los grupos anteriores) y se incubaron por tres horas. Completado este tiempo, el medio de cultivo se colectó y almacenó a -20 °C (Fig. 7).



**Figura 7.** Diagrama que muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos de timulina (100 ng/ml) con y sin GnRH ( $10^{-10}$  M).

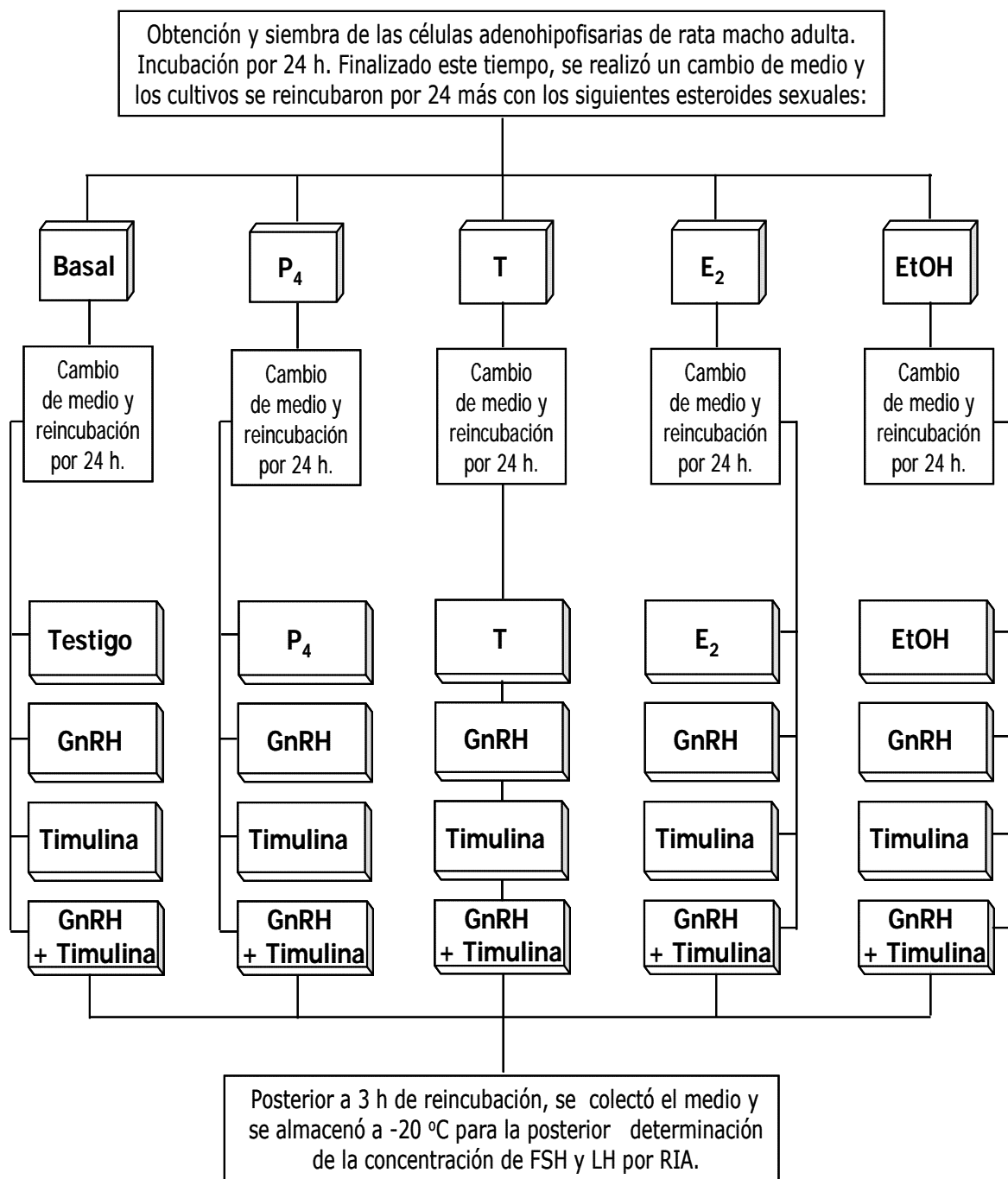
<sup>\*</sup> Concentración de GnRH a la que las células de adenohipófisis de rata macho respondieron para la liberación de FSH y LH.

**3. Estudio de los efectos de la timulina y los esteroides sexuales sobre la liberación basal y estimulada de las gonadotropinas.**

Con el fin de evaluar si los esteroides sexuales en las concentraciones más altas presentes a lo largo del ciclo estral de la rata hembra, modifican los efectos de la timulina sobre la liberación de gonadotropinas por las células de adenohipófisis de rata macho, se utilizaron células previamente incubadas por 24 h que se reincubaron por 24 h más en presencia de progesterona [P<sub>4</sub>] (50 ng/ml) (Sigma), testosterona [T] (100 pg/ml) (Sigma) o estradiol [E<sub>2</sub>] (100 pg/ml) (Sigma) previamente disueltos en alcohol etílico (EtOH) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) al 1%. Se contó con un grupo al cual sólo se le adicionó EtOH al 1% (Kamel y col., 1987) y con un grupo sin tratamiento (basal). Al término del pretratamiento con esteroides sexuales, se cambió el medio por medio fresco y cada uno de los grupos anteriores se dividió en: Testigo y tratados con timulina (100 ng/ml) o con GnRH (10<sup>-10</sup> M) o con GnRH+timulina (mismas concentraciones que los grupos anteriores), los cuales se incubaron por 3 h. Se colectó el medio y se almacenó a -20 °C (Fig. 8).

**Radioinmunoanálisis**

En todos los medios de cultivo almacenados a -20 °C (Reyna y col., 2001), se determinaron las concentraciones de FSH y LH por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo en el Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", empleando los reactivos y protocolos proporcionados por el Nacional Pituitary Program (NIADDK, Bethesda, MD, USA).



**Figura 8.** Diagrama que muestra los grupos experimentales utilizados para evaluar los efectos de los esteroides sexuales sobre la acción de timulina. P<sub>4</sub> (50 ng/ml); E<sub>2</sub> (100 ng/ml); T (100 pg/ml); EtOH (1%); GnRH (10<sup>-10</sup> M); timulina (100ng/ml).

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 8 y 10.6% para FSH y de 5.1 y 12% para LH, la sensibilidad fue de 0.1 ng/ml. Los resultados se expresaron en términos de los estándares NIADDK RP-2 y RP-3 para FSH y LH respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada experimento. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  e.e.m. Las concentraciones de FSH y LH en el medio de cultivo se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En los casos en los que se compararon pares de datos se usó la prueba de "U" de Mann-Whitney. Sólo se consideraron como significativos los resultados cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

## RESULTADOS

### 1. Concentración de GnRH con la que se obtiene la máxima respuesta en la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata macho adulta.

La respuesta de las células adenohipofisarias a la administración de diferentes concentraciones de GnRH mostró que para ambas gonadotropinas se obtiene su máxima liberación con la concentración de  $10^{-10}$  M. Para el caso de la LH, además se presentaron diferencias estadísticamente significativas con las concentraciones de  $10^{-11}$  y  $10^{-6}$  M (Tabla 1).

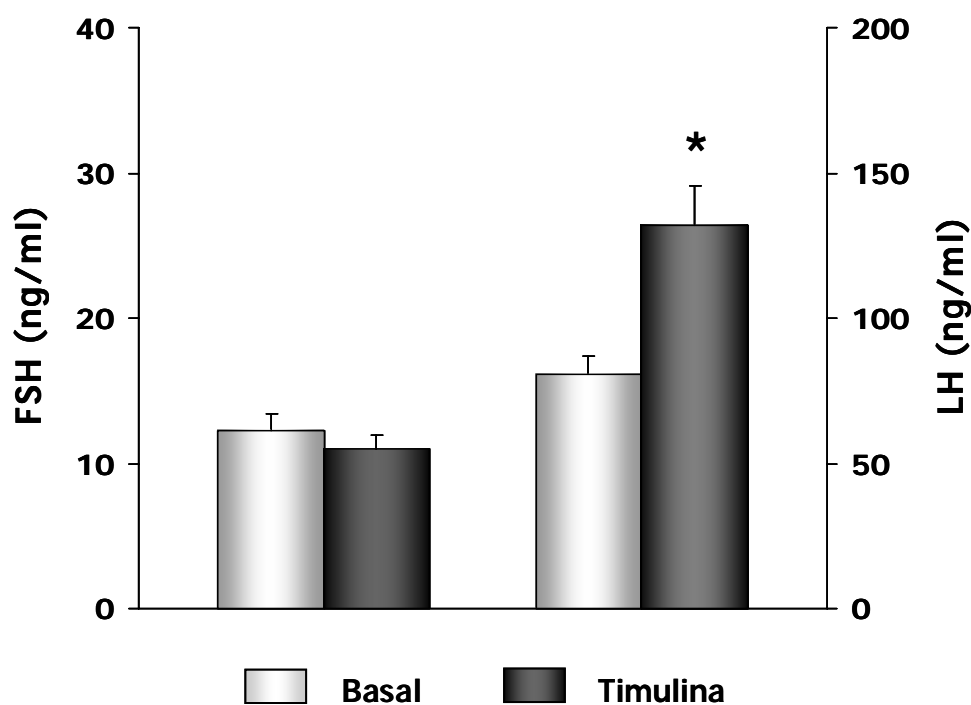
**Tabla 1.** Media  $\pm$  e.e.m. de las concentraciones de FSH y LH liberadas al medio de cultivo por las células de adenohipófisis obtenidas de rata macho. Después de 48 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células fueron expuestas o no (basal) por 3 h a diferentes concentraciones de GnRH.

	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
<b>Basal</b>	12.3 $\pm$ 1.5	81.3 $\pm$ 6.9
<b>GnRH: <math>10^{-12}</math> M</b>	12.7 $\pm$ 1.2	115.9 $\pm$ 12.5
<b><math>10^{-11}</math> M</b>	17.0 $\pm$ 2.5	120.8 $\pm$ 9.9 *
<b><math>10^{-10}</math> M</b>	23.6 $\pm$ 3.4 *	125.1 $\pm$ 7.7 *
<b><math>10^{-9}</math> M</b>	12.3 $\pm$ 1.4	90.1 $\pm$ 9.4
<b><math>10^{-8}</math> M</b>	15.3 $\pm$ 2.3	99.0 $\pm$ 8.8
<b><math>10^{-7}</math> M</b>	10.9 $\pm$ 1.3	98.6 $\pm$ 9.0
<b><math>10^{-6}</math> M</b>	11.2 $\pm$ 1.0	110.7 $\pm$ 10.4 *

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

## 2. Efectos de la timulina sobre la liberación basal y estimulada de FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata macho adulta.

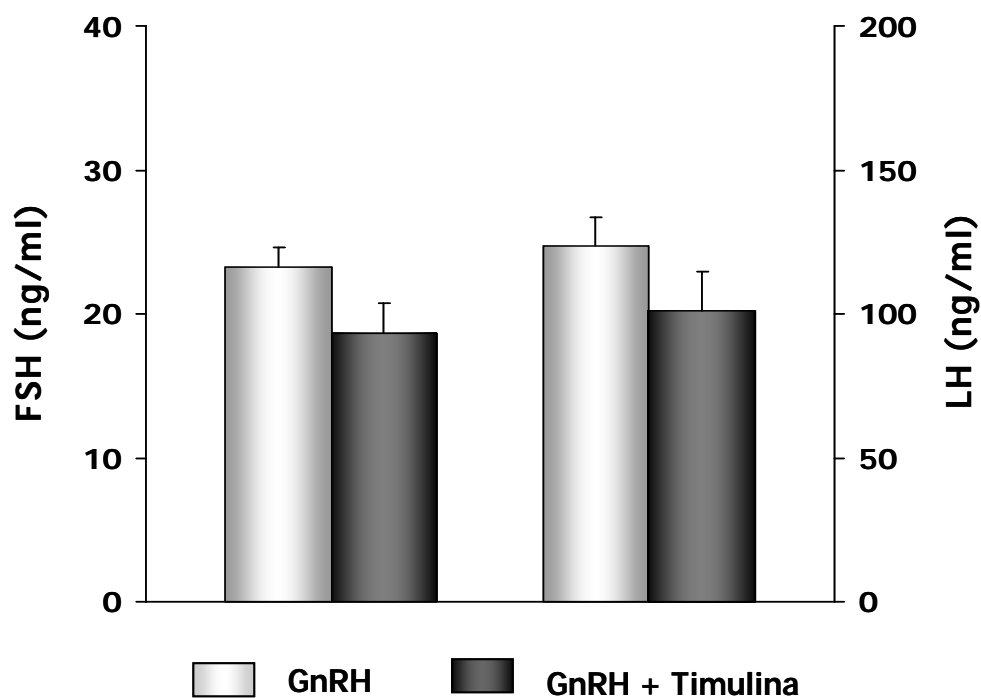
En los cultivos de células de adenohipófisis, el tratamiento con timulina incrementó la liberación basal de LH, lo que no ocurrió con la de FSH (Fig. 9).



\*  $p < 0.05$  vs Basal (prueba de "U" de Mann-Whitney).

**Figura 9.** Efectos del tratamiento con timulina sobre la liberación basal de FSH y LH (media  $\pm$  e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de adenohipófisis de rata macho. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, los cultivos fueron tratados por 3 h con timulina (100 ng/ml) y otras no tuvieron tratamiento (basal).

La adición de timulina en combinación con GnRH a las células de adenohipófisis, no provocó cambios estadísticamente significativos en la liberación de FSH y LH con respecto al grupo que recibió únicamente GnRH (Fig. 10).



**Figura 10.** Efectos del tratamiento con timulina (100 ng/ml) sobre la liberación estimulada por GnRH ( $10^{-10}$  M) de FSH y LH (media  $\pm$  e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de adenohipófisis de rata macho. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, los cultivos fueron tratados por 3 h con GnRH o con GnRH+timulina.

### **3. Efectos de la timulina y los esteroides sexuales sobre la liberación basal y estimulada de gonadotropinas.**

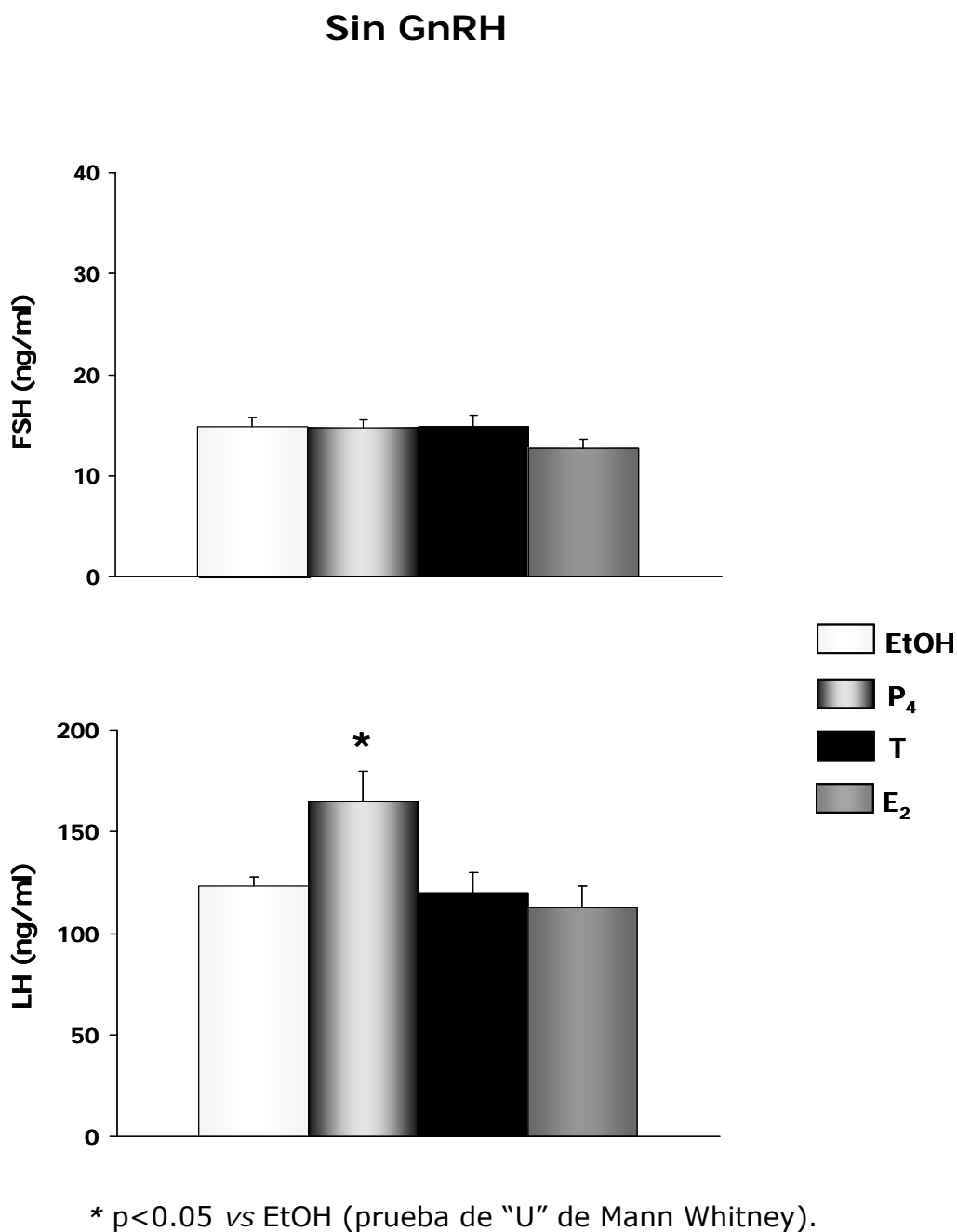
Debido a que la adición de EtOH incrementó la liberación espontánea de LH ( $123.2 \pm 5.8$  vs  $80.5 \pm 6.6$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) se utilizaron éstos como grupos de comparación para analizar tanto los efectos de los esteroides como los de la timulina sobre la liberación de gonadotropinas.

En la figura 11, se observa que la liberación basal de FSH por las células de adenohipófisis no se modificó por el pretratamiento con esteroides.

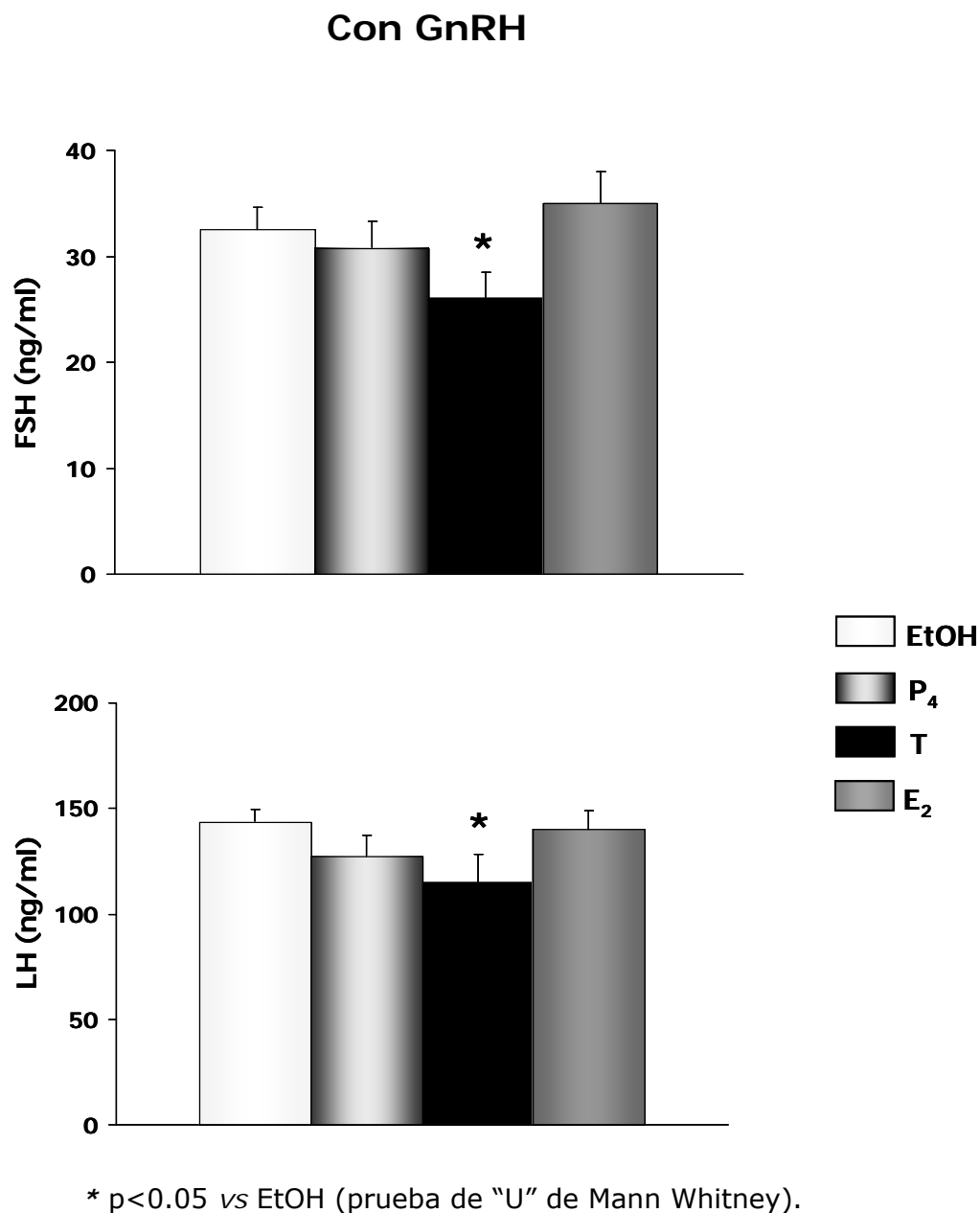
En los cultivos de células adenohipofisarias pretratadas con  $P_4$  la liberación basal de LH fue mayor que en los tratados con EtOH (Fig. 11).

Cuando las células fueron estimuladas con GnRH, sólo las pretratadas con T presentaron concentraciones significativamente menores de FSH y LH (Fig. 12).





**Figura 11.** Concentración de FSH y LH (media  $\pm$  e.e.m.) en el medio de cultivo de células de adenohipófisis de rata macho adulta preincubadas por 24 h con etanol (1%), P<sub>4</sub> (50 ng/ml), T (100 ng/ml) o E<sub>2</sub> (100 pg/ml). Posteriormente se realizó un cambio de medio por medio fresco y los cultivos fueron incubados por 3 h.



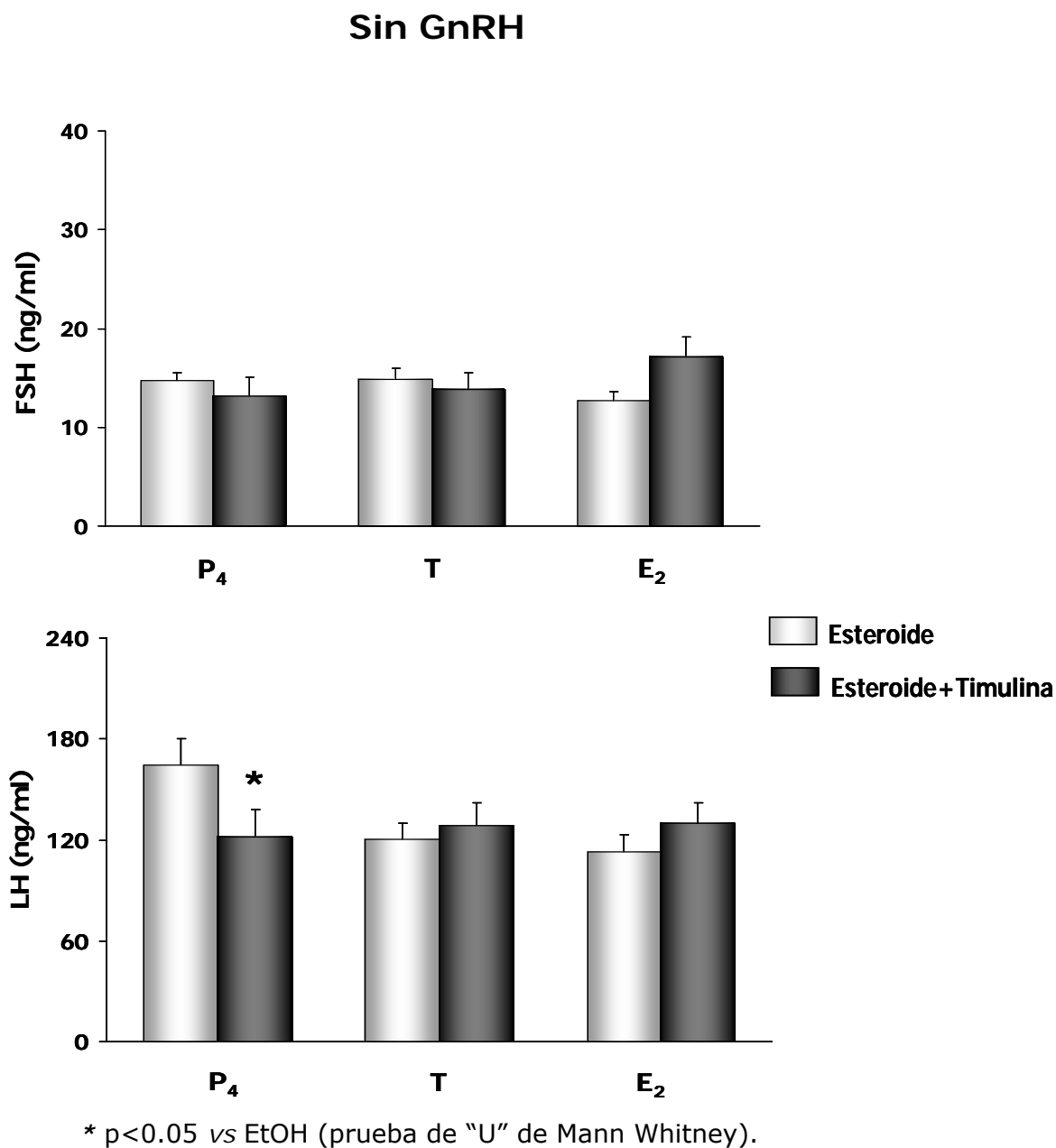
**Figura 12.** Concentración de FSH y LH (media  $\pm$  e.e.m.) en el medio de cultivo de células de adenohipófisis de rata macho adulta preincubadas por 24 h con etanol (1%), P<sub>4</sub> (50 ng/ml), T (100 ng/ml) o E<sub>2</sub> (100 pg/ml). Posteriormente se realizó un cambio de medio por medio fresco y los cultivos fueron tratados con GnRH ( $10^{-10}$  M) e incubados por 3 h más.

La adición de timulina no afectó la liberación de FSH independientemente del esteroide al cual estuvieron previamente expuestas las células adenohipofisarias comparado con las células que sólo se trataron con el esteroide (Fig. 13).

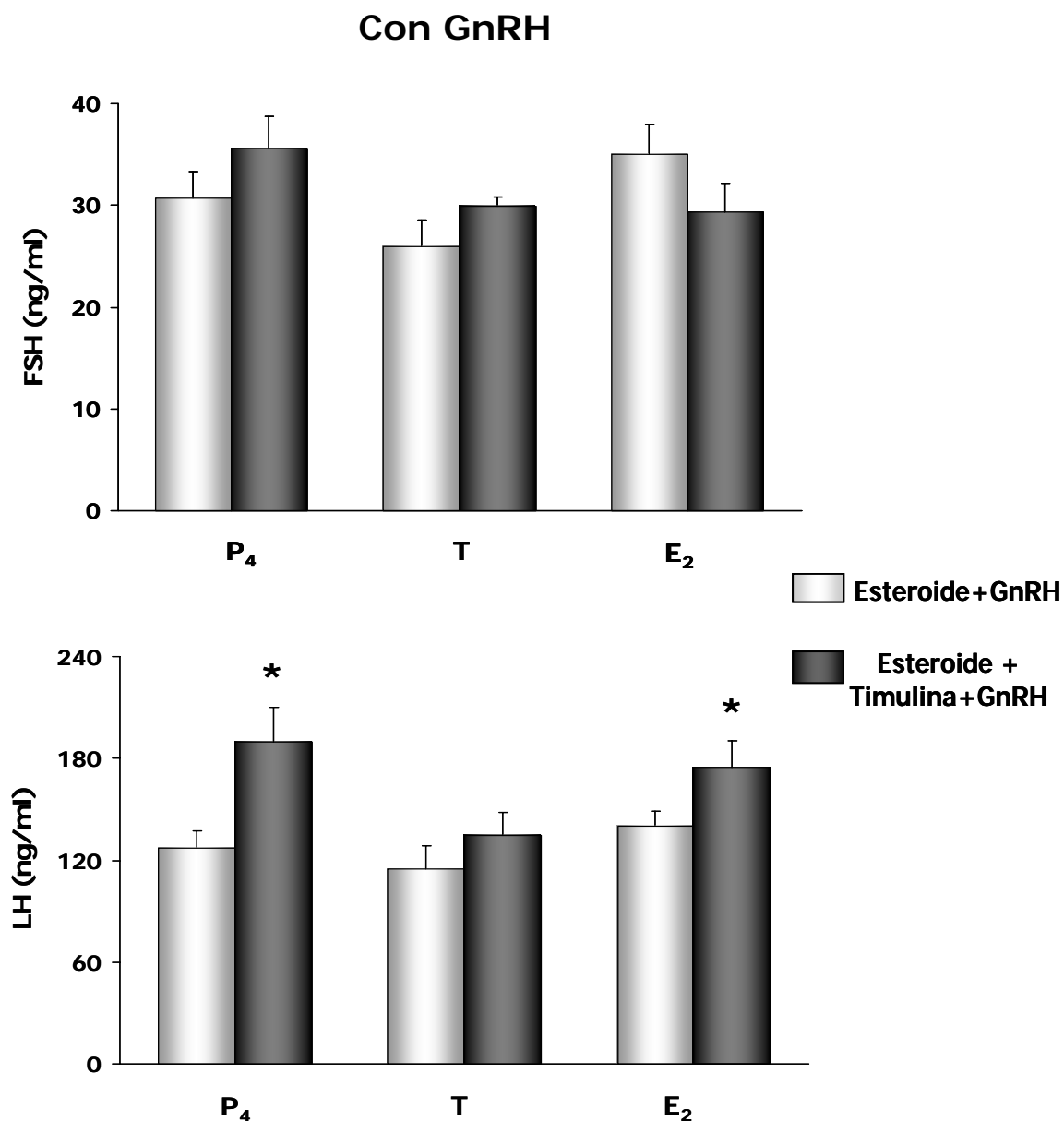
La administración de timulina a las células pretratadas con  $P_4$ , resultó en una menor liberación de LH respecto a las células que sólo estuvieron en presencia del esteroide, mientras que en las células previamente expuestas a T y  $E_2$  la timulina no provocó cambios significativos (Fig. 13).

En las células de adenohipófisis que fueron pretratadas con los esteroides sexuales, el tratamiento con timulina no afectó de manera significativa la acción estimulante de la GnRH en la liberación de FSH (Fig. 14).

Cuando a las células de adenohipófisis pretratadas con  $P_4$  o  $E_2$ , se les adicionó timulina y se les estimuló con GnRH se observó un incremento significativo en la liberación de LH, lo que no ocurrió en las células pretratadas con T (Fig. 14).



**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de FSH y LH secretada por las células de adenohipófisis extraídas de rata macho adulta. Las células fueron previamente expuestas a P<sub>4</sub> (50 ng/ml), T (100 ng/ml), o E<sub>2</sub> (100 pg/ml), por 24 h. Después de este tiempo, el medio se cambió por medio fresco y las células fueron tratadas o no con timulina (100 ng/ml).



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

**Figura 14.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de FSH y LH secretada por las células de adenohipófisis extraídas de rata macho adulta. Las células fueron previamente expuestas a P<sub>4</sub> (50 ng/ml), T (100 ng/ml), o E<sub>2</sub> (100 pg/ml), por 24 h. Después de este tiempo, el medio se cambió por medio fresco y las células fueron tratadas por 3 h con GnRH ( $10^{-10}$  M) o GnRH+timulina.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que en las células de adenohipófisis de rata macho adulta, la timulina no incide sobre la liberación basal o estimulada de FSH, pero es capaz de estimular la liberación de LH a valores similares a los observados cuando se adiciona GnRH. Sin embargo estos efectos son modulados por el pretratamiento con esteroides sexuales ya que la timulina potencia la liberación de las gonadotropinas o inhibe su liberación en función del esteroide en cuestión.

Existen diferencias sexuales en la respuesta de las células de adenohipófisis al estímulo de GnRH: en las células adenohipofisarias de rata hembra la máxima liberación de ambas gonadotropinas se obtiene con  $10^{-8}$  M y en las células de macho fluctúa entre  $10^{-12}$  y  $10^{-10}$  M dependiendo de la gonadotropina (Hinojosa, 2006). Sanders y col. (1975) muestran que las células de hembra presentan una curva dosis-respuesta, en la que la máxima liberación de gonadotropinas se obtiene con  $10^{-7}$  M de GnRH, mientras que en las células de adenohipófisis de rata macho hay una respuesta elevada y similar desde  $10^{-10}$  hasta  $10^{-7}$  M de GnRH para ambas gonadotropinas. Otros estudios mencionan que la concentración de  $10^{-9}$  M de GnRH estimula a las células de adenohipófisis de macho para la liberación de gonadotropinas (Zaidi y col., 1988; Mendoza y Romano, 1989).

En este estudio las células de adenohipófisis de rata macho estimuladas con diferentes concentraciones de GnRH mostraron la máxima respuesta

con  $10^{-10}$  M para la liberación de ambas gonadotropinas, resultados que coinciden con los rangos descritos por Sanders y col. (1975) e Hinojosa y col. (2006). Según Liu y Jackson (1984) la concentración de GnRH de  $10^{-9}$  M o menor es la óptima para que las células adenohipofisarias en cultivo respondan, ya que es comparable a la concentración fisiológica.

Estos estudios evidencian que la hipófisis de la rata macho es más sensible al estímulo de GnRH, lo que podría estar relacionado con sus condiciones *in situ*, ya que el macho no está sujeto a elevaciones bruscas en la liberación de gonadotropinas, como ocurre en el ciclo estral de la hembra.

Diversos estudios realizados con hipófisis de machos señalan que la timulina incrementa la liberación de LH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997), sin embargo se desconoce lo que sucede con la liberación de FSH. Nuestros resultados, coinciden con lo descrito anteriormente, ya que muestran que la timulina tiene un efecto estimulante sobre la liberación basal de LH y aportan la evidencia de que la timulina no modifica la liberación basal de FSH.

En hipófisis de rata hembra, otros autores describen que la timulina estimula la liberación de ambas gonadotropinas (Brown y col., 2000; Ortega, 2007), esto aunado a nuestros resultados permite sugerir que los efectos de timulina sobre la liberación de las gonadotropinas es sexo dependiente. Cabe la posibilidad de que estas diferencias estén relacionadas con los tiempos de exposición y las concentraciones de timulina, ya que se ha mostrado que la acción de esta hormona sobre la

liberación de las gonadotropinas es tiempo y dosis dependiente (Brown y col., 2000).

Un probable mecanismo para explicar el efecto estimulante de la timulina sobre la liberación de LH sería el aumento en el contenido de AMPc intracelular (Hadley y col., 1997) del que se ha sugerido está involucrado en las vías de transducción de señales activadas por timulina (Brown y col. 2000).

Se ha descrito que la concentración de AMPc en la hipófisis en cultivo de los machos adultos, es directamente proporcional a la concentración en el medio de LH estimulada por GnRH (Naor y col., 1978) y que en la hipófisis de hembra GnRH y timulina no comparten pasos cercanos en sus vías de señalización (Brown y col., 2000). Con base en lo anterior, este estudio muestra que GnRH enmascara el efecto estimulante de la timulina sobre la liberación de LH, probablemente al ocupar preferentemente las señales necesarias para que timulina actúe sobre la liberación de las gonadotropinas.

El análisis comparativo de resultados previos del laboratorio con los de este estudio ponen en evidencia la existencia de diferencias sexuales en la respuesta de la adenohipófisis, ya que bajo condiciones experimentales similares, el efecto de timulina sobre la liberación basal de LH resulta ser inhibitorio para la hembra (Ortega, 2007) y estimulante para el macho. Las diferencias también se observan en presencia de GnRH, donde en la hembra la timulina potencia el efecto estimulante de la GnRH (Ortega, 2007), mientras que en el macho no tiene efectos. Resultados que pueden estar ligados a las diferencias



sexuales que presenta la activación del AMPc por GnRH (Naor y col., 1978). Esto indica que la liberación *in vitro* de las gonadotropinas por las hipófisis depende del sexo del donador por lo que los esteroides sexuales pueden estar jugando un papel importante.

En general los efectos de timulina sobre los gonadotropos obtenidos de rata macho se centran en provocar cambios en la liberación de LH. Los eventos en los que participa una y otra gonadotropina en las funciones de la gónada del macho podrían dar una explicación a esta preferencia. La FSH actúa sobre las células de Sertoli manteniendo un ritmo constante en la producción y maduración de los espermatozoides, promueve la producción de proteína fijadora de andrógeno y la secreción de inhibina (Guyton 1997; Ganong 2000), mientras que la LH estimula a las células de Leydig para la síntesis de  $\tau$ . Con base en lo anterior, se podría sugerir que la timulina está vinculada con los mecanismos que regulan la esteroidogénesis del testículo.

El EtOH tuvo un efecto estimulante sobre la liberación basal de LH, pero no así para la de FSH. El EtOH afecta la función hipotálamo-hipofisaria de manera específica para cada hormona, ya que al administrarse en un modelo *in vivo*, incrementa en el hipotálamo la concentración de GnRH y en suero decrece la de LH sin afectar la de FSH (Dees y Kozlowski, 1984; Dees y col.1990). Emanuele y col. (1991), describen que la disminución en la concentración de LH se debe a que el EtOH daña la síntesis y liberación de la misma, por lo que es retenida en la hipófisis, efecto que se revierte después de 24 h. Una posible explicación al estímulo de LH observado por la adición de EtOH sería un efecto inhibitorio en la liberación de la gonadotropina seguido de la eliminación

del EtOH mediante un cambio de medio por medio fresco, lo que permite la liberación de la LH acumulada en las células hipofisarias.

El EtOH disminuye la concentración del ARNm de la subunidad  $\beta$  para LH, pero no modifica el ARNm de la subunidad  $\alpha$  que es común para la síntesis de ambas gonadotropinas (Emanuele y col., 1991), lo que explica que la liberación de FSH no se vea alterada. Un mecanismo similar podría estar ocurriendo en nuestros cultivos.

La  $P_4$  sola no modifica la liberación de las gonadotropinas ya que su receptor depende de la presencia del  $E_2$  (Lagacé y col., 1980; Janovick y Conn, 1996; Chabbert-Buffet y col., 2000). También se ha detectado en gonadotropos en cultivo la presencia del receptor nuclear a  $P_4$  en ausencia de  $E_2$ , sugiriendo una actividad independiente de estrógenos (Turgeon y Waring, 2000), lo que explicaría que en nuestros cultivos, la  $P_4$  incremente la liberación basal de LH.

Estudios *in vivo* (mona) muestran que la administración aguda de concentraciones relativamente altas de  $P_4$  incrementa la liberación de LH (Dierschke y col., 1973). Un efecto similar se observó en este estudio considerando que las concentraciones de  $P_4$  a las cuales se expusieron las células de adenohipófisis de rata macho son semejantes a las de la rata hembra en diestro 1 (25 veces más altas).

En las células de adenohipófisis de hembra, el pretratamiento con T disminuye la liberación estimulada de gonadotropinas (Kamel y col., 1987), efecto que desaparece al adicionar concentraciones altas de GnRH (Denef y col., 1980). Resultados obtenidos por Ortega (2007) en

células adenohipofisarias de rata hembra muestran que el pretratamiento con T en las concentraciones características de los machos (más altas que las de las hembras) incrementa la liberación basal y estimulada de FSH, mientras que la de LH no se modifica. En este estudio las células de rata macho previamente expuestas a T reducen la liberación de ambas gonadotropinas en respuesta a la GnRH. Con lo anterior se puede sugerir que la testosterona ejerce efectos específicos y frecuentemente opuestos sobre la secreción de FSH y LH dependiendo del sexo del donador y de la concentración del esteroide y de la GnRH.

El tratamiento con timulina a las células pretratadas con  $P_4$  bloquea la acción estimulante que se presenta por la impronta de  $P_4$  sola sobre la liberación de LH. Sin embargo, cuando se adiciona GnRH además de timulina se observa una acción estimulante sobre la liberación de LH, lo que nos permite sugerir un efecto sinérgico entre ambas hormonas.

Las células que estuvieron pretratadas con  $E_2$  no modifican la liberación de LH en respuesta a timulina, sin embargo al incorporar GnRH aumenta la liberación de dicha gonadotropina. Al parecer la timulina amplifica la señal conferida por el  $E_2$  incrementando la sensibilidad de las células adenohipofisarias a la GnRH.

Dentro de las relaciones endócrinas bidireccionales que existen entre el timo y el sistema reproductor, se ha descrito que en las células retículo-epiteliales del timo de rata, los esteroides estimulan la liberación de timulina. La  $P_4$  y el  $E_2$  regulan la liberación y acciones de la timulina tanto *in vivo* como *in vitro*, estos efectos también se observan con T

pero en menor magnitud (Dardenne y col., 1986; Savino y col., 1988; Hinojosa y col., 2002). Además en el macho, la cantidad de testosterona liberada a la circulación aumenta en proporción directa a la cantidad de LH disponible. A su vez este esteroide inhibe directamente la liberación de LH al actuar sobre la adenohipófisis e indirectamente al inhibir la liberación de GnRH en el hipotálamo (Ganong, 1996; Guyton, 1997).

Con base en lo anterior, nuestros resultados muestran que la inhibición que ejerce la T sobre la liberación estimulada de LH se mantiene *in vitro*. El efecto estimulante que tiene la timulina sobre la liberación basal de LH mantendría la disponibilidad de la misma antes de que ocurra el control inhibitorio de la T. Si es así, la timulina estaría actuando en la hipófisis del macho como un regulador fino en la liberación de gonadotropinas.

Los resultados de este estudio aportan nuevas evidencias de que los efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH, son sexo dependientes y son modulados de manera diferente por la  $P_4$ , T y  $E_2$ , lo que indica que los gonadotropos poseen características intrínsecas que conllevan a la respuesta final.

En resumen, podemos decir que la timulina posee actividad hipofisiotrópica, tiene un efecto dual y diferencial sobre la liberación de FSH y de LH. Su acción depende de la sensibilidad que le confiere el esteroide al gonadotropo, de la presencia de GnRH y del sexo del donador.

## **CONCLUSIONES**

- En cultivos de células de adenohipófisis de rata macho, la timulina estimula la liberación basal de LH y no modifica la de FSH.
- En las células de adenohipófisis en cultivo, la timulina inhibe el efecto estimulante de la progesterona sobre la liberación basal de LH y lo potencia en presencia de GnRH.
- La timulina amplifica la respuesta estimulada por GnRH sobre la liberación de LH en las células de adenohipófisis pretratadas con estradiol.
- En la rata macho, la timulina posee actividad hipofisiotrópica diferencial sobre la liberación de las gonadotropinas y sus efectos son modulados por los esteroides sexuales y la presencia de GnRH.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera G y Romano MC. (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rata ovarian cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **123**, 367-373.
- Audesirk T y Audesirk G. (1997). Biología. La vida en la Tierra. Pearson, 4ª edición. México. 765-775 p.p.
- Bach JF, Avrameas S, Bach MA, Benveniste J, Capron A, De Préval C, Fauve RM, Griscelli C, Lagrange PH, Lévy JP, Papiernik M, Peltier AP, Preud'homme JL, Revillard JP, Reyes F y Salmon Ch. (1984). Inmunología. Limusa. México. 24-28, 96-98 p.p.
- Bellanti JA y Kadlec J. (1987). Inmunología general. En: Inmunología. Interamericana, 3ª edición. México. 49 p.p.
- Bellanti JA. (1987). Inmunología. Interamericana, 3ª edición. México, 18-58 p.p.
- Berne R y Levy M. (1992a). La corteza suprarrenal. En: Fisiología. Cap. 41. Mosby/Doyma libros. España. 558-560 p.p.
- Berne R y Levy M. (1992b). Revisión de la función reproductora. En: Fisiología Cap. 43. Mosby/Doyma libros. España. 579-589 p.p.
- Besedovsky HO y Sorkin E. (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM y Goya RG. (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J. Gerontol.* **55A**, B170-B176.
- Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A y Bouchard P. (2000). Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* **65**, 613-620.
- Cohen S, Berrih S, Dardenne M y Francois-Bach J. (1986). Feedback regulation of secretion of a thymic hormone (thymulin) by thymic epithelial cells in culture. *Thymus* **8**, 109-119.
- Cruise JM y Lewis RE. (1995). Illustrated dictionary of immunology. CRC Press. USA. 294-295 p.p.
- 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, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J y Bach JF. (1986). Thymic hormone-containing cells. VII Adrenals and gonads control *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J. Immunol.* **136**, 1303-1308.
- Dees WL y Kozlowski GP. (1984). Differential effects of ethanol on luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion in the female rat. *Alcohol.* **1**, 429-433.

- Dees WL, Skelley CW, Hiney JL y Johnston CA. (1990). Actions of ethanol on hypothalamic and pituitary in prepubertal female rats. *Alcohol* **7**, 21-25.
- Deneff C, Hautekeeten 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.
- Dierschke J, Yamaji T, Karsch FS, Weick RF, Weiss G y Knobil e. (1973). Blockade by progesterone of estrogen induced LH and FSH release in the rhesus Monkey. *Endocrinology* **92**, 1496.
- Emanuele MA, Tentler J, Emanuele NV y Kelley MR. (1991). *In vivo* effects of acute EtOH on rat  $\alpha$  and  $\beta$  luteinizing hormone gene expression. *Alcohol* **8**, 345-348.
- Fabris n y Moccheigiani E. (1985). Endocrine control of thymic serum factor production in young-adult and old mice. *Cell Immunol.* **91**, 325-335.
- Fawcett DW. (2000). Tratado de Histología. Interamericana-Mc Graw Hill, 12<sup>a</sup> edición. México. 522-532, 915 p.p.
- Flanagan SP. (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* **8**, 295-309.
- Ganong WF. (2000). Fisiología Médica. Cap. 21, Sección IV. El manual moderno. México. 459-482 p.p.
- Ganong WF. (2004). Fisiología Médica. Cap. 23, Sección IV. El manual moderno. México. 467-472 p.p.
- García ML, Hinojosa BL, Domínguez CR, Chavira R y Rosas SP. (2000). Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J. Endocrinol.* **166**, 381-387.
- García ML, Hinojosa BL, Domínguez CR, Chavira R y Rosas SP. (2005). Effects of injecting thymulin in the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* **12**, 314-320.
- Geneser F. (2000). Histología sobre bases biomoleculares. Editorial Médica Panamericana, 3<sup>a</sup> edición. España. 421-425, 581-586 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.

- Goya RG, Gagnerault MC, Sosa EY y Dardenne M. (1995). Reduced ability of hypothalamic and pituitary extracts from old mice to stimulate thymulin secretion in vitro. *Mech. Ageing Dev.* **83**, 143-154.
- Guyton AC. (1997). Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso. Parte II, Sección 2 y 3. Editorial Médica Panamericana, 2ª edición. España. 437-439 p.p.
- 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.
- Hall NRS, O'Grady MP y Menzies RA. (1992). Thymic regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Im. J. Immunopharmac.* **14**, 353-359.
- Hinojosa L, García L, Chavira R, Cárdenas M, Romano MC, Domínguez R y Rosas P. (2002). Los esteroides sexuales modulan los efectos de la timulina en la liberación de la FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata hembra. XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. C 230.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, 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 Science* **76**, 795-804.
- 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.
- Iversen S, Iversen L y Saper CB. (2001). Homeostasis de la estimulación, la emoción y el comportamiento. Sistema nervioso autónomo e hipotálamo. En: Principios de Neurociencia. Parte VII Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM Eds. Mc Graw Hill-Interamericana. México. 960-981 p.p.
- 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.
- Kamel F, Balz JA, Kubajak CL y Scheneider VA. (1987). Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **120**, 1651-1657.



- 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.
- 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.
- Langman y Sadler TW. (1996). Embriología Médica. Médica Panamericana, 7ª edición. Buenos Aires. 299-300 p.p.
- 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.
- Lintern-Moore S, Moore S y Pantelouris EM. (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic nude mice. *Exptl. Cell Res.* **97**, 430-432.G
- Liu T y Jackson GL. (1984). Long term superfusion of rat anterior pituitary cells: Effects of repeated pulses of gonadotropin-releasing at different doses, durations, and frequencies. *Endocrinology* **115**, 605-613.
- Mendoza ME y Romano MC. (1989). Prepubertal rat thymus secretes factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* **14**, 233-242.
- 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. Rerepro. Immunol.* **28**, 203-215.
- 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, Nishizuka Y, Mc Clure 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. NB Schwartz y M Hunzicker-Dunn. Eds. Raven Press. New York. 279-284 p.p.
- Michael SD. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: Factors Regulating Ovarian Function. GS Greenwald y PF Terranova Eds., Raven Press, New York, 445-464 p.p.

- Miller MA, y Leavell LC. (2001). Manual de Anatomía y Fisiología. La Prensa Médica Mexicana, 2ª edición. México. 484, 749-754 y 734-736 p.p.
- Moccegiani E, Paolucci, Balsamo A, Cacciari E y Fabris N. (1990). Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in human. *Horm. Res.* **33**, 248-255.
- Molinero P, Soutto M, Benot S, Hmadcha A y Guerrero 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.
- Naor Z, Meidan UZ y Koch Y. (1978). Sex difference in pituitary cyclic AMP response to gonadotropin-release hormone. *Am. Phys. Soc.* E37-E41.
- Ninomiya JG, de Coronado ZP y Robledo RA. (1995). Fisiología Humana, Endocrinología y Metabolismo. El Manual Moderno. México. 305-308, 325 y 328 p.p.
- 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 disgénesis induced by neonatal thymectomy in the Mouse. *Endocrinology* **89**, 886-895.
- Noback RC. (1980). Hipotálamo: localización y funcionamiento general. En: Sistema Nervioso Humano. Mc Graw-Hill. México. 253-265 p.p.
- Nolte J. (1994). El cerebro humano. Introducción a la Anatomía Funcional. Mosby/Doyma Libros, 3ª edición. España. 262-270 p.p.
- Ortega RCC. (2007). 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 esteroide sexuales. Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza, UNAM.
- Pléau JM, Dardene M y Bach JF. (1981). The serum thymic factor (FTS). *Mol. Cell. Biochem.* **41**, 67-72.
- 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 thymic transplantation. *Endocrinology* **107**, 2130-2132.
- Rebar RW, Morandini IC, Erickson FG y Petze EJ. (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* **108**, 120-126.

- Rebar RW, Morandini IC, Petze JE y Erickson FG. (1982). Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol. Reprod.* **27**, 1267-1276.
- Rebar RW, Morandini IC, Silva de Sa MF, Erickson GF y Petze EJ. (1981c). The importance of the thymus gland for normal reproductive function in mice. En: Dynamics of Ovarian function. Schwartz NB y Hunzicker-Dunn M. Raven Press. New York. 285-290 p.p.
- Reyna R, Traynor KD, Hines G, Boots LR y Azzíz R. (2001). Repeat freezing and thawing does not generally alter assay results for several commonly studied reproductive hormones. *Fertil. Esteril.* **76**, 823-825.
- Rodríguez JM. (1996). Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Noriega editores. México. 40-73 p.p.
- Roitt IM y Delves PJ. (2003). Inmunología. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana, 10ª edición. Argentina. 251 p.p.
- Sanders FJ, May PB y Donabedian RK. (1975). In vitro pituitary responsiveness to gonadotrophin-releasing hormone (LH-RH) in intact and castrated male and female rats. *Mol. Cell Endocrinol.* **3**, 71-78.
- Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T y Dardenne M. (1988). Thymic hormone containing cells. IX. Steroids in vitro modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J. Steroid. Biochem.* **30**, 479-484.
- Schumm D. (1989). Integración del Metabolismo, Hormonas esteroides. En: Principios de Bioquímica. Parte VIII Cap. 30. El Manual Moderno. México. 417-430 p.p.
- Turgeon J y Waring DW. (2000). Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology* **141**, 3422-3429.
- Ungar F. (1989). Cap. 15 Bioquímica de las hormonas, I Receptores hormonales, hormonas esteroides y tiroideas. En: Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Reverte, 2ª edición. España. 707-739 p.p.
- Vander A, Sherman J y Luciano D. (2001). Human Physiology. The mechanisms of body function. Mc Graw Hill, 8ª edición. USA. 241-215 p.p.
- White A, Handler P, Smith EL, Hill RL y Lehman IR. (1978). Principios de Bioquímica. Cap. 44. Mc Graw Hill. España. 1288-1307.

- Wise T. (1998). *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **66**, 129-135.
- Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RL. (2001). *Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Editorial Médica Panamericana, 4ª edición. Argentina. 664-665 p.p.
- Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT. (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **12**, 253-264.