



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE TIMULINA  
EN LA BURSA DEL OVARIO DE RATONES  
PREPÚBERES SOBRE LA RESPUESTA  
OVULATORIA**

***TESIS***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

***BIÓLOGA***

PRESENTA

**CLAUDIA REYES VÁZQUEZ**

Directora de tesis  
Dra. Patricia Rosas Saucedo



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.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Regulación neuroendócrina de las funciones del ovario</b> .....	1
1.1 Eje hipotálamo-hipofisario .....	1
1.2 Ovario .....	9
1.3 Pubertad .....	21
<b>2. Interacción entre el timo y la función reproductiva</b> .....	24
2.1 Timo .....	24
2.2 Timulina .....	30
2.3 La timulina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario	32
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	35
<b>HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	42
I. Respuesta ovulatoria del ratón prepúber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas .....	49
II. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de timulina en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con 2 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG. . .	56
III. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de timulina en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con 3 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG. . .	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	63
<b>CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	73

## **RESUMEN**

El timo participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la reproducción por intermedio de las hormonas que sintetiza, entre las que se encuentra la timulina que se caracteriza por ser sintetizada exclusivamente en las células epiteliales del timo. En estudios previos hemos mostrado que la timulina participa en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario ya que su administración por vía s.c. en el ratón prepúber induce superovulación en respuesta al estímulo gonadotrópico e inyectada en el hipotálamo o la hipófisis estimula la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas respectivamente, lo que culmina con la ovulación. Sin embargo se desconoce si esta respuesta está vinculada con efectos directos de la timulina sobre el ovario. Por ello en este trabajo se decidió estudiar los efectos de la administración de timulina en la bursa del ovario de ratones prepúberes, sobre la respuesta ovulatoria.

Los objetivos fueron los siguientes: 1. Analizar la respuesta ovulatoria del ratón prepúber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas. 2. Analizar la curva dosis-efecto de la administración de timulina en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con gonadotropinas.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD1 de 20 días de edad, divididos en tres grupos experimentales. Cada grupo se inyectó con 2, 3 ó 5 u.i. de gonadotropina coriónica equina (eCG). Se registró el día de la apertura vaginal, se realizó la toma diaria de frotis vaginales y se sacrificaron el día del primer estro vaginal. Se contó con un grupo de animales intactos (I) sacrificados a los 23 días de edad.

Los resultados mostraron que sólo el 25 % de los animales estimulados con 5 u.i. de eCG ovularon. Con base en estos resultados se estimularon a los animales con diferentes concentraciones de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y se sacrificaron 20 horas más tarde. Todos los animales tratados de esta forma ovularon y el número de ovocitos liberados aumentó

según la dosis de eCG administrada. Para evaluar los efectos de la timulina administrada en la bursa ovárica sobre la ovulación inducida por gonadotropinas, se utilizaron animales de 19 días de edad, divididos en los siguientes grupos experimentales: intactos, con operación simulada (OS), microinyección en bursa ovárica de solución salina (SS) y microinyección en bursa ovárica de timulina. La microinyección se llevó a cabo realizando una incisión dorsal bilateral de piel y músculo, se exteriorizaron los ovarios y se les inyectó timulina (30, 60, 120 ó 240 pg/bursa) o SS con ayuda de un microinyector acoplado a una aguja calibre 29G. Se inyectó un volumen total de 2  $\mu$ l/1 min en cada bursa ovárica. La OS consistió únicamente de la incisión dorsal bilateral de piel y músculo. Los animales sometidos a cirugía se anestesiaron con éter.

Tomando como referencia los resultados de la curva de gonadotropinas, todos los grupos se estimularon a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG. Los animales con OS o SS presentaron un menor número de ovocitos liberados, comparado con el grupo testigo (sólo con estimulación gonadotrópica) (OS  $8.8 \pm 0.5$ ; SS  $7.7 \pm 0.9$  vs TA  $14.5 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ ). La respuesta ovulatoria de los animales con microinyección de timulina en la bursa ovárica fue menor en comparación al grupo con SS. El grupo tratado con 240 pg no ovuló.

Con base en lo anterior, se incorporaron dos concentraciones bajas de timulina (7.5 y 15 pg) con un esquema de estimulación gonadotrópica mayor. Nuevamente los grupos con OS o SS presentaron un número de ovocitos liberados menor que el del testigo (OS  $12.6 \pm 2.7$ ; SS  $8.7 \pm 1.1$  vs TA  $32.0 \pm 3.5$ ,  $p < 0.05$ ). En los grupos tratados con 15 ó 30 pg más del 70 % de los animales ovuló y con 60 pg el 100% lo hizo presentando una cuota ovulatoria significativamente mayor a la del grupo con SS ( $14.9 \pm 0.9$  vs  $8.7 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que la administración de timulina en la bursa ovárica tiene un efecto dual sobre la respuesta ovulatoria de los animales tratados con gonadotropinas, efectos que dependen de la relación timulina-gonadotropinas.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Regulación neuroendócrina de las funciones del ovario

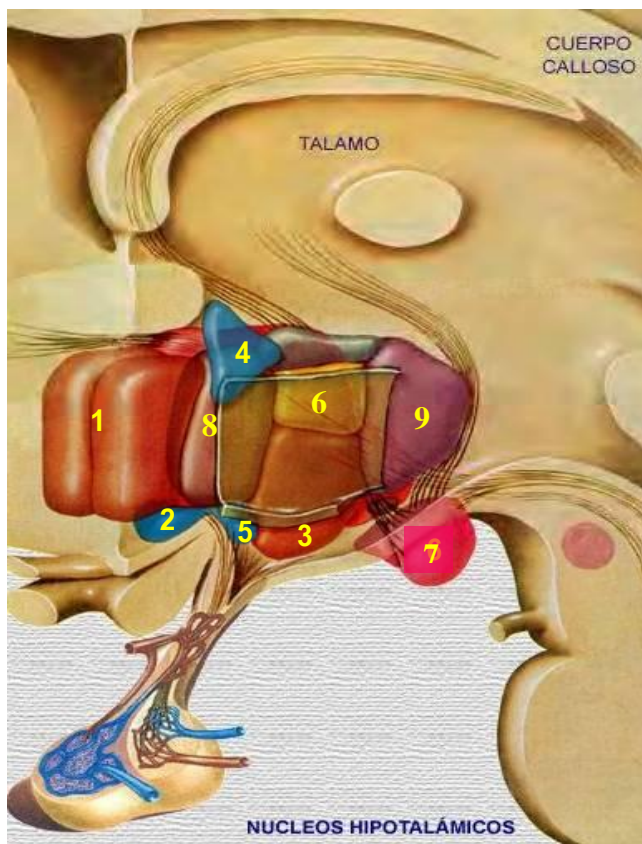
#### 1.1 *Eje Hipotálamo-Hipofisario*

El hipotálamo regula al sistema nervioso autónomo y al sistema endócrino y así la homeostasis del organismo. Es un área cerebral en la cual existen numerosas vías neuronales convergentes y divergentes al igual que una gran vasculatura. Es por esto que el hipotálamo, al realizar la integración de sus aferencias nerviosas y químicas, genera las respuestas que controlan las funciones neuroendócrinas (Snell, 1999; Yen, 2001).

El hipotálamo es la parte del diencefalo que se extiende desde la región del quiasma óptico hasta el límite caudal de los cuerpos mamilares. Se ubica por debajo del tálamo y forma el piso y la parte inferior de las paredes laterales del tercer ventrículo (Snell, 1999; Yen, 2001) (Figura 1).

En las zonas medial y lateral en dirección anteroposterior, se pueden observar grupos de núcleos que están separados por un plano sagital

imaginario. En la zona medial pueden reconocerse los siguientes núcleos a) preóptico, b) anterior, c) supraquiasmático, d) paraventricular y e) posterior. En la zona lateral se pueden reconocer los siguientes núcleos a) parte del preóptico, b) parte del supraquiasmático, c) supraóptico, d) lateral, e) ventromedial y f) dorsomedial (Snell, 1999) (Figura 1).



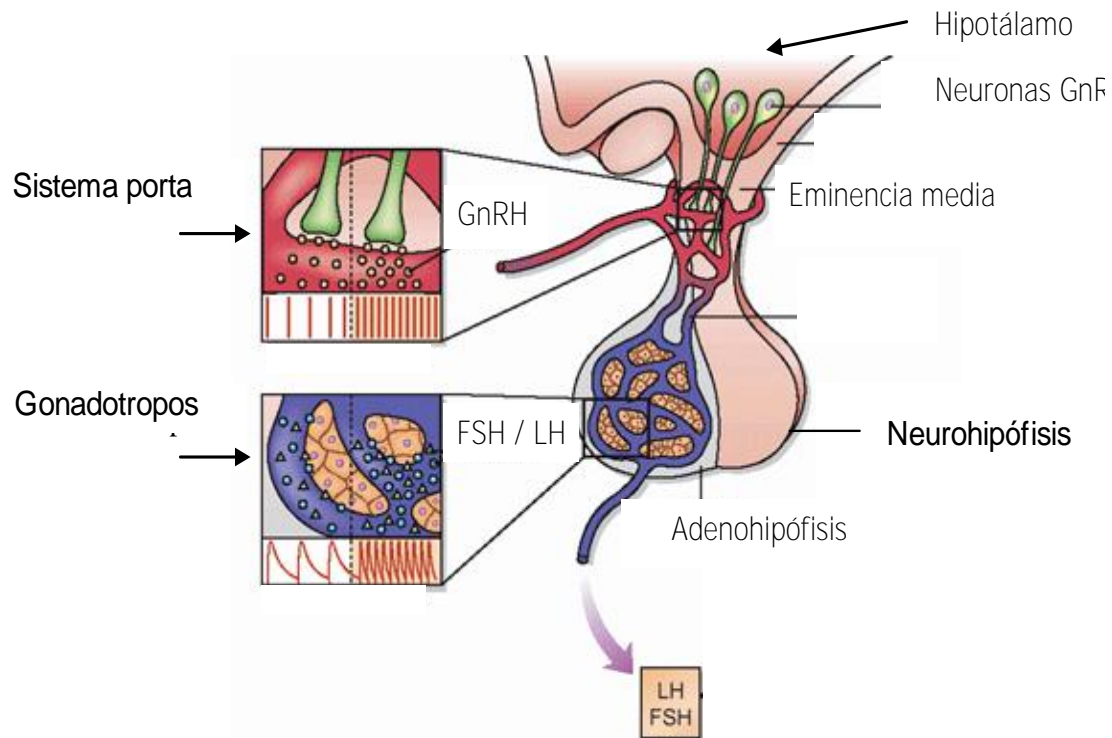
1. Núcleo preóptico
2. Núcleo supraquiasmático
3. Núcleo ventromedial
4. Núcleo paraventricular
5. Núcleo supraóptico
6. Núcleo dorsomedial
7. Cuerpos mamilares
8. Área hipotalámica anterior
9. Área hipotalámica posterior

**Figura 1.** Esquema que muestra algunos de los núcleos del hipotálamo (modificado de <[http://www.uff.br/fisiovet/Conteudos/hipotalamo\\_clip\\_image004.jpg](http://www.uff.br/fisiovet/Conteudos/hipotalamo_clip_image004.jpg)> consulta mayo 2010).

La hipófisis es una glándula endócrina situada en la base del cerebro. En el humano ocupa una depresión en forma de silla en el hueso esfenoides, llamada silla turca. Esta glándula está unida al hipotálamo por un pedículo corto (infundíbulo) y una red vascular. La hipófisis tiene dos componentes funcionales, la adenohipófisis, que es el tejido epitelial glandular y la neurohipófisis, que es el tejido nervioso secretor (Geneser, 2000; Ross, 2005) (Figura 2).

El hipotálamo está conectado con la hipófisis por dos vías: 1) fibras nerviosas que viajan desde los núcleos supraóptico y paraventricular hacia la neurohipófisis y 2) vasos sanguíneos largos y cortos que conforman el sistema porta hipotálamo-hipofisario que conecta sinusoides en la eminencia media con plexos capilares en la adenohipófisis (Merchenthaler y cols., 1989; Everet, 1994; Silverman y cols., 1994; Yen, 2001) (Figura 2).





**Figura 2.** Esquema que muestra la neurohipófisis, la adenohipófisis y el sistema porta hipotálamo-hipofisario en el humano. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) (modificado de <http://www.nature.com/neuro/journal/v7/n10/full/nn1326.html> consulta mayo 2010).

La secreción de las hormonas adenohipofisarias es regulada por factores de liberación e inhibición, secretados por el hipotálamo y conducidos a la adenohipófisis por el sistema porta hipotálamo-hipofisario (Snell, 1999; Yen, 2001).

<b>HORMONAS LIBERADORAS E INHIBIDORAS HIPOTALÁMICAS Y SUS EFECTOS SOBRE LA ADENOHIPÓFISIS</b>		
<b>Hormona reguladora hipotalámica</b>	<b>Hormona de la hipófisis anterior</b>	<b>Resultado funcional</b>
Hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH)	Hormona del crecimiento (GH)	Estimula la síntesis proteica y el crecimiento general de casi todas las células y tejidos entre otras.
Hormona inhibidora de la hormona del crecimiento (GHIH) o somatostatina	Hormona del crecimiento (GH) (producción reducida)	Reduce los efectos de la GH.
Hormona liberadora de la prolactina (PRH)	Prolactina (PRL)	Estimula la lactogénesis
Hormona inhibidora de la prolactina (PIH) dopamina	Prolactina (PRL) (producción reducida)	Reduce la lactogénesis
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)	Estimula a la glándula adrenal a producir glucocorticoides y hormonas sexuales
Hormona liberadora de tiotropina (TRH)	Hormona estimulante de la tiroides o tiotropina (TSH)	Estimula a la glándula tiroides a producir tiroxina y triyodotiroxina
Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)	Hormona estimulante del folículo (FSH) y Hormona luteinizante (LH)	Estimulan la esteroidogénesis. En el ovario regulan el crecimiento de los folículos y la ovulación. En el testículo regulan la espermatogénesis

En el sistema nervioso central existen grupos de neuronas especializadas que secretan GnRH (pyro-Glu<sup>1</sup>-His<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>) (Fink, 1986). Estas neuronas forman redes laxas y difusas que se localizan desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal (que incluye el núcleo septal triangular y medial), el núcleo de la estría terminal y en el hipotálamo el núcleo periventricular, las áreas preóptica medial y lateral, el área hipotalámica anterior y la zona retroquiasmática, además del hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Silverman y col., 1994). Una de las proyecciones más características de los axones de las GnRHérgicas va desde el hipotálamo medio basal hasta la eminencia media, que termina en un plexo extenso de botones sobre el vaso portal primario, el cual envía GnRH al gonadotropo que es su célula blanco (Silverman y cols., 1994; Palkovits, 2000; Yen, 2001) (Figura. 3).



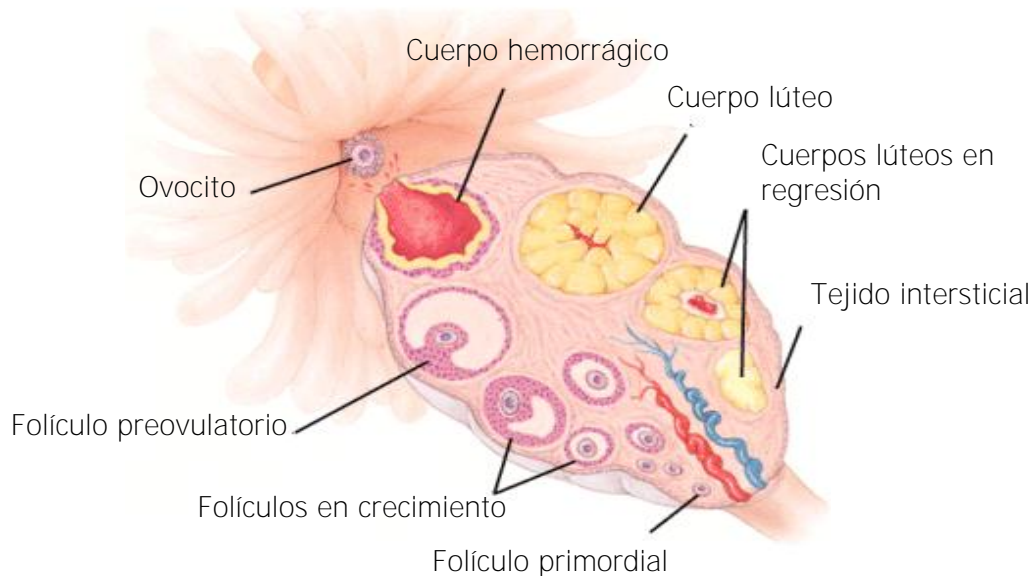
La naturaleza de liberación pulsátil de la GnRH determina la secreción episódica de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH). La periodicidad y amplitud de los pulsos de GnRH y por ende la secreción de las gonadotropinas son fundamentales en la regulación de la función gonadal y por lo tanto todo el eje reproductivo. En esta regulación también participan varios péptidos sintetizados por el propio gonadotropo como son 1) la activina que estimula la secreción de la FSH pero no la de LH; 2) la inhibina cuya función principal es suprimir la secreción basal de FSH al bloquear los efectos de la activina y 3) la folistatina que inhibe la secreción de la FSH al actuar como un regulador de la actividad de la activina (Gilfillan y Robertson, 1999; Schwall, 1999), así como los esteroides ováricos (estradiol y progesterona) (Fink, 1986; Yen, 2001).

La FSH y la LH son glicoproteínas compuestas por dos subunidades, una  $\alpha$  y otra  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es común para ambas gonadotropinas y la subunidad  $\beta$  le confiere la especificidad a la hormona (Snell, 1999 y Yen, 2001). Las gonadotropinas al llegar al ovario estimulan el crecimiento folicular, la secreción de esteroides sexuales y la ovulación (Tresguerres, 2003).

## **1.2 Ovario**

El ovario es la gónada femenina. En la mayoría de las hembras de los mamíferos es de forma ovoide. Es una glándula pareada cuyas funciones son liberar al ovocito capaz de ser fecundado y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor (Leeson y Leeson, 1990; Domínguez y cols., 1991).

El ovario tiene como unidad anatómico-funcional al folículo ovárico, a partir del cual se originan los tres compartimentos del órgano: 1) Folicular, formado por los folículos en diferentes estadios de desarrollo; 2) Luteal o cuerpo lúteo, estructura glandular que se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que han liberado al ovocito; 3) Intersticial o glándula intersticial, formada por células con actividad secretora, llamadas células intersticiales primarias en el ovario fetal y por las células de la teca interna de los folículos antrales que experimentan el proceso de atresia y se denominan células intersticiales secundarias (Harrison y Weir, 1977; Feder, 1981) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema que muestra los diferentes compartimentos del ovario: el folicular, el luteal y el intersticial (Tomado de Audersik y Audersik, 1996).

### ***Bursa ovárica***

El ovario de muchos mamíferos se encuentra dentro de un saco membranoso llamado bolsa o bursa ovárica. La bursa se compone de tres capas: 1) la parte interna que es un epitelio discontinuo de la bursa que da hacia el ovario; 2) la capa intermedia formada por tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, bloques de células de músculo liso y vasos sanguíneos y 3) la parte exterior, que es epitelio continuo frente a la cavidad peritoneal (Martin y cols., 1981).

Un lado de la bursa tiene una capa delgada de tejido conjuntivo y se puede ver al ovario a través de ella. En el otro lado hay una gruesa capa de grasa que se une al tejido conjuntivo (Martin y cols., 1981).

### ***Foliculogénesis***

La foliculogénesis es un proceso que da inicio poco antes del nacimiento o en los primeros días de vida postnatal (como en la rata y el ratón) y concluye aproximadamente en la primera semana de vida (Peters, 1978).

En los roedores, los ovocitos que miden 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, están rodeados por una sola capa de células planas o foliculares y de una lámina basal que los aísla del resto del ovario, lo cual da lugar a la formación de los folículos primordiales o de reserva. Los ovocitos que no son rodeados por estas células en general mueren y son eliminados (Peters, 1978; Domínguez y cols., 1991; Geneser, 2000; Sadler, 2004) (Figura 5).

Los folículos durante su desarrollo pueden ovular o dirigirse a la atresia, siendo esta última en la que culminan la mayoría de los folículos (Domínguez y cols., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994; Sadler, 2004).



La diferenciación de los folículos primordiales da inicio con el crecimiento del ovocito y la transformación de las células foliculares de planas a cúbicas (células de la granulosa) que forman un epitelio estratificado con gran capacidad proliferativa y sintética, dando lugar a los folículos primarios que son los que conforman el grupo de crecimiento. A medida que el folículo primario aumenta de tamaño, el estroma adyacente se organiza para formar la teca folicular que se diferencia en dos capas, una vascular interna y otra fibrosa externa. La teca interna consta de células del estroma agrandadas que son secretoras, entre las cuales hay muchos capilares; la teca externa está constituida por fibras de colágena y células fusiformes agrupadas que se juntan en la periferia con el estroma ovárico circundante (Leeson y Leeson, 1990; Domínguez y cols., 1991) (Figura 5).

Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito, comienza a observarse la presencia de líquido entre las células llamado licor folicular, el que se va acumulando hasta dar origen a una cavidad llamada antro folicular, el cual aumenta de tamaño conforme transcurre el desarrollo del folículo. En esta fase de desarrollo se les denomina folículos secundarios o antrales (Leeson y Leeson, 1990; Domínguez y cols., 1991; Sadler, 2004). Las células de la granulosa que se encuentran en contacto directo con el ovocito forman el *cumulus oophorus*. Posterior a la ovulación las células del cúmulo que permanecen con el

ovocito forman la corona radiada. Las células de la granulosa de los folículos secundarios están en constante proliferación, aumenta la cantidad de nexos y desmosomas que mantienen unidas a las células de la granulosa, lo que permite la intercomunicación celular (Leeson y Leeson, 1990; Domínguez y cols., 1991; Sadler, 2004) (Figura 5).

Durante la mayor parte del desarrollo del folículo, las células de la granulosa sólo poseen receptores a FSH. En el folículo en crecimiento, las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH, proceso en el cual los estrógenos actúan de manera sinérgica. La FSH estimula la síntesis de sus propios receptores, lo que permite que su número aumente. No todas las células de la granulosa poseen receptores a la LH, conforme el folículo madura algunas adquieren receptores a la LH por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos. En el transcurso de estos cambios, las células de la granulosa adquieren funciones diferentes, las adyacentes al ovocito le proporcionan soporte físico y nutrientes y las más cercanas a la membrana basal contienen gran cantidad de receptores a la LH por lo que son más activas en la producción de hormonas esteroides que las que se encuentran cerca de la cavidad antral (Domínguez y cols., 1991; Greenwald y Roy, 1994; Sadler, 2004).

En el ovario de rata, los folículos alcanzan la etapa preovulatoria alrededor de los 17 ó 19 días después de haber iniciado el crecimiento. Este tipo de folículo está formado por el ovocito I o primario, las células de la granulosa, la membrana basal, las células de la teca interna y la teca externa, el cumulus oophorus y el antro folicular (Leeson y Leeson, 1990; Domínguez y cols., 1991) (Figura 5).

En el folículo preovulatorio, el ovocito completa la primera fase de la meiosis y se convierte en ovocito II o secundario. La pérdida de la vesícula germinal y del nucleolo indican el reinicio de la división celular lo cual ocurre dos horas después de que se produce el pico preovulatorio de LH. Seis horas después culmina la meiosis, la proliferación de las células de la granulosa disminuye y se pierde la capacidad de síntesis de estrógenos y se comienza a sintetizar progesterona (Domínguez y cols., 1991) (Figura 5).

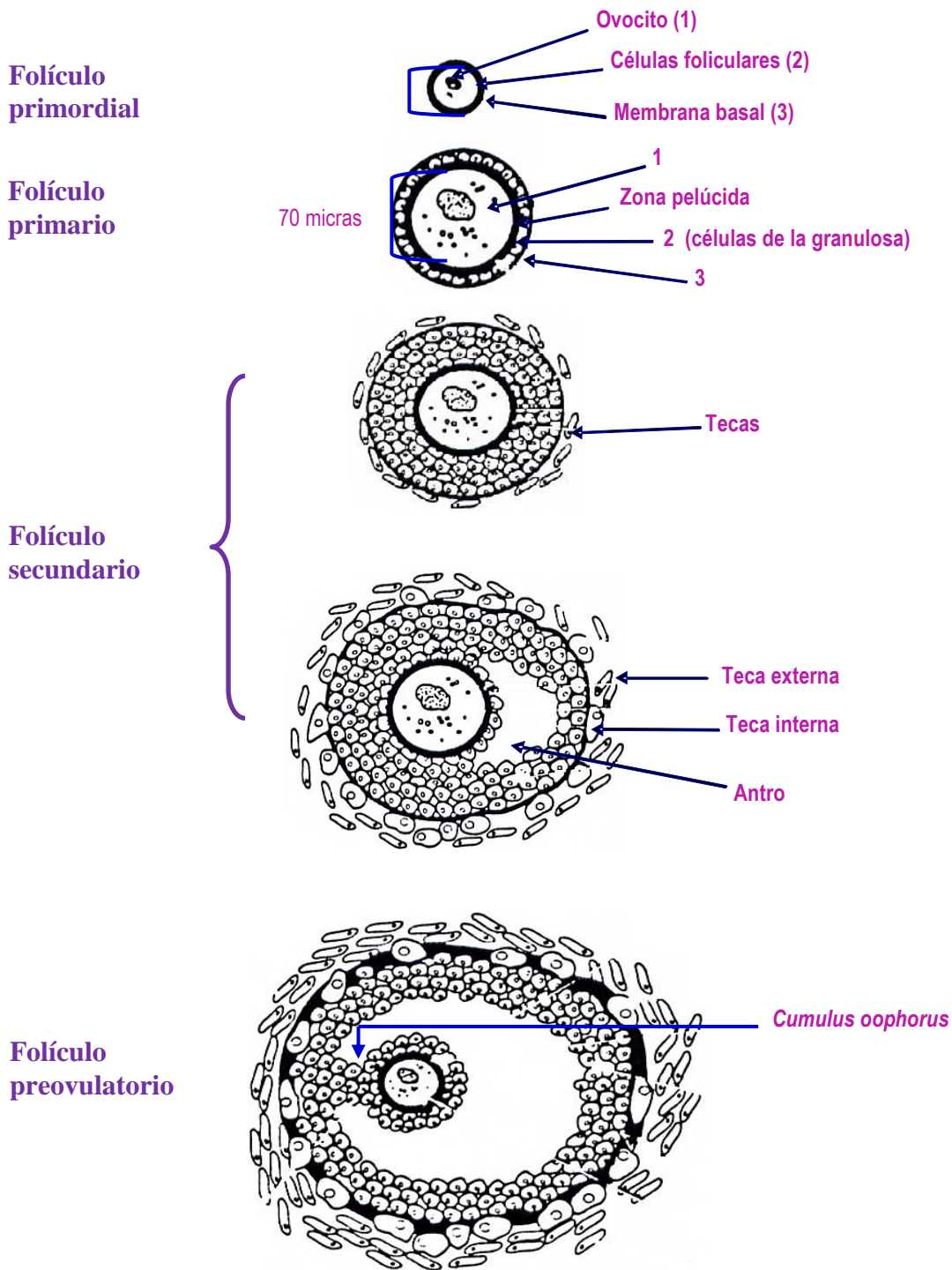


Figura 5. Esquema que muestra los diferentes tipos de folículos durante el crecimiento del folicular (Tomado de Van-Voorhis, 1998).

### *Ovulación*

La ovulación es la liberación del ovocito producida una vez que éste ha alcanzado el tamaño y el grado de diferenciación adecuado (Domínguez y cols., 1991).

Mecánicamente la ovulación consiste en el rápido aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica. Por último la ruptura folicular resulta en la extrusión de un complejo cúmulo-ovocito (Fink, 1986).

Para que se produzca la salida del ovocito son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecaes (Domínguez y cols., 1991). Los elementos que integran la teca externa (fibras de colágena, células de tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas) forman una vaina fibrosa que al disgregarse en un punto cercano a la superficie del ovario, dan lugar a un orificio (estigma ovárico) por el cual saldrá el ovocito (Leeson y Leeson, 1990).

Los factores que intervienen durante el proceso de ovulación son los siguientes: aumento del volumen y de la presión del licor folicular, proteólisis enzimática de la pared folicular por plasminógeno activado y contracción de las fibras musculares lisas en la teca externa, desencadenada por prostaglandinas (Fink, 1986; Domínguez y cols., 1991).

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un aumento notable en la concentración de estrógenos, seguido de un incremento brusco en la concentración de LH y en menor medida de la de FSH. Este es el detonador para que el folículo ovule (Yen, 2001).

### ***Esteroidogénesis***

Los ovarios secretan dos grupos principales de hormonas esteroideas: los estrógenos y los progestágenos. Los estrógenos promueven el crecimiento y la maduración de los órganos sexuales internos y externos y producen las características sexuales femeninas que se desarrollan en la pubertad; también actúan sobre las glándulas mamarias en las que estimulan el

crecimiento de los conductos y el estroma, y promueven la acumulación de tejido adiposo. Los progestágenos preparan al útero para el embarazo al promover cambios en el endometrio; también preparan a las glándulas mamarias para la lactancia al inducir la proliferación de los lobulillos (Gore-Langdon y Armstrong, 1994; Ross, 2005).

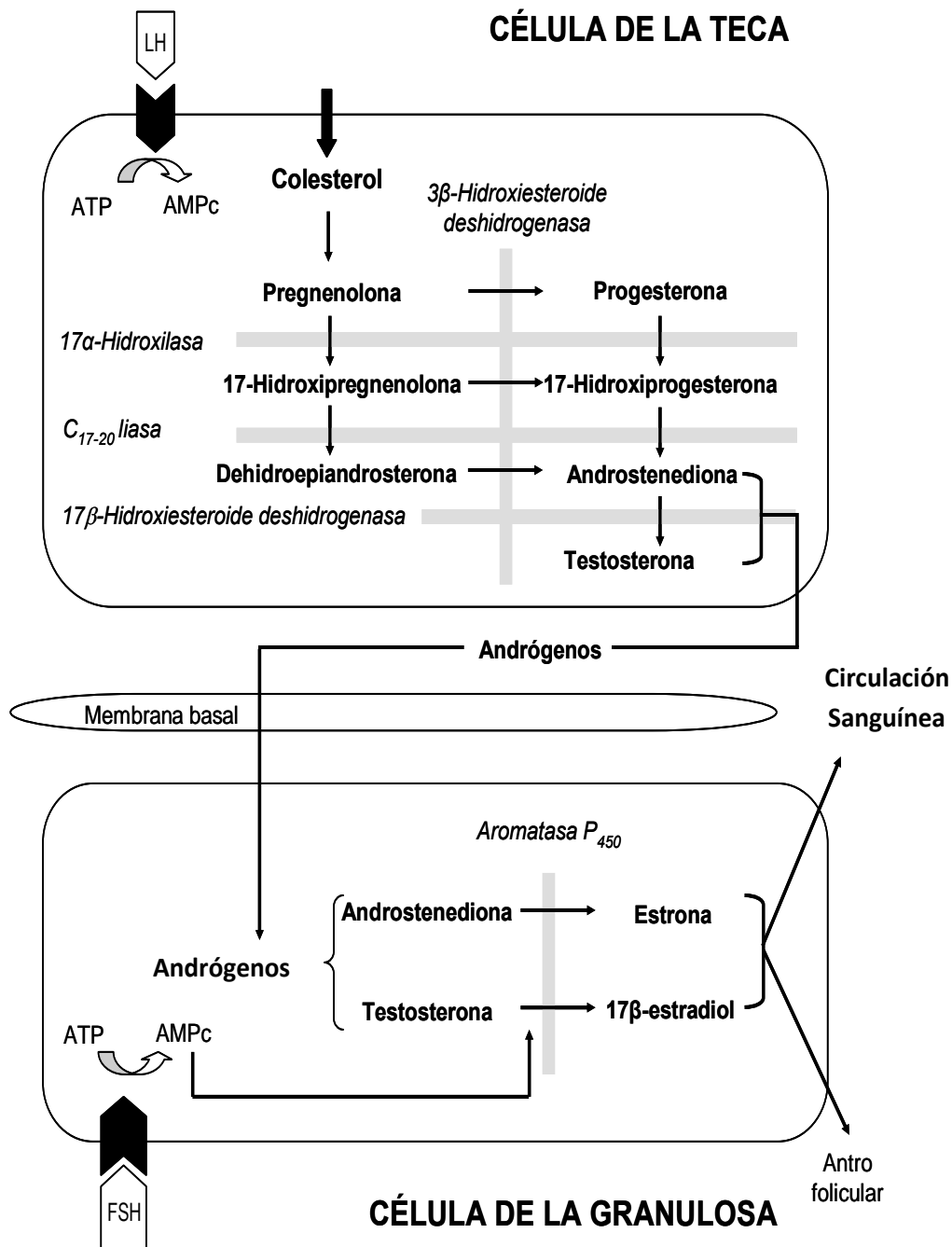
El precursor de la ruta biosintética de la esteroidogénesis es el colesterol que deriva de lipoproteínas del plasma sanguíneo, en forma de ésteres o de la síntesis *de novo* a partir de acetato (Pedernera, 1993; Gore-Langdon y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999).

El colesterol en el ovario se transforma en pregnenolona por la eliminación de un fragmento de seis carbonos. La pregnenolona es la hormona común en la biosíntesis de toda clase de hormonas esteroideas y puede ser transformada en progesterona o en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona (Goldfien y Monroe, 1988) (Figura 6).

En la conversión a progesterona se necesita la intervención de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y de la  $\Delta^{5,4}$ -cetosteroide isomerasa que cambian la doble ligadura de la posición  $\Delta^5$  a la posición  $\Delta^4$ . Posteriormente la progesterona es transformada en el retículo endoplásmico en  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona por la  $17\alpha$ -hidroxilasa. Después la enzima C17,20-liasa puede separar la cadena lateral de los carbonos (20 y 21) para formar andrógenos (Goldfien y Monroe, 1988; Gore- Langdon y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999) (Figura 6).

La  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona es transformada por la enzima C17,20-liasa en dehidroepiandrosterona (DHEA), compuesto que puede transformarse en androstenediona. La androstenediona es el principal andrógeno secretado por el ovario, la cual es transformada a testosterona por la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. También pueden generarse pequeñas cantidades de DHEA. Todos estos andrógenos sirven de substrato en la biosíntesis de estradiol, que en la rata y el ratón es el principal estrógeno producido por el ovario y cuya transformación depende de un grupo de enzimas conocidas como aromatasas (Goldfien y Monroe, 1988; Van Voorhis, 1999) (Figura 6).





**Figura 6.** Esquema que muestra las rutas biosintéticas de los esteroides sexuales. Hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), trifosfato de adenosín (ATP), monofosfato de adenosín cíclico (AMPc) (Tomado de Gore- Langdon y Armstrong, 1994).

La esteroidogénesis es regulada por las gonadotropinas, los propios esteroides y una serie de factores de crecimiento y hormonas que son sintetizadas por el ovario, las que regulan la acción de las gonadotropinas actuando de manera parácrina, autócrina e incluso en la hipófisis (Domínguez y cols., 1991; Hiller, 1994).

### ***1.3 Pubertad***

La pubertad es el paso de la inmadurez a la madurez sexual. La pubertad inicia al aumentar gradualmente la secreción de gonadotropinas. En la rata hembra, la señal que indica que la pubertad ha ocurrido es la canalización de la vagina, como consecuencia de la estimulación de estrógenos. Esta apertura vaginal se presenta al día siguiente del aumento preovulatorio de gonadotropinas (Ramírez, 1973; Ojeda y Urbanski, 1994).

Con base en estudios de inmunocitoquímica, biología celular, fisiología y neurobiología, el desarrollo postnatal de la rata hembra se ha clasificado en cuatro fases: una etapa neonatal que inicia el día del nacimiento y termina el día siete de edad; una etapa infantil que se extiende del día 8 al 21; una juvenil que termina alrededor del día 30 a 32 y una peripuberal con una duración variable que se caracteriza por la presencia de la apertura vaginal y la primera ovulación (Ojeda y cols., 1986).

*Etapa neonatal.* Se caracteriza por la insensibilidad del ovario a las gonadotropinas, por lo que el desarrollo folicular se inicia en forma independiente a éstas (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1989). Esta falta de sensibilidad se presenta los primeros cuatro a cinco días posteriores al nacimiento, después se inicia la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, la regulación hormonal entre los componentes del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario no es plenamente operativa. A partir del día cuatro de edad se incrementan los receptores a FSH hasta el día 16 de vida (Ojeda y cols., 1986). La FSH comienza a estimular la producción de estradiol a partir de testosterona. El control negativo de la secreción ganadotrópica por el estradiol es ineficiente debido a la presencia en el suero de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) que se une a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Ojeda y cols., 1986).

*Etapa infantil.* Las concentraciones de FSH incrementan rápidamente alcanzando un pico máximo alrededor del día 12. Posteriormente estas concentraciones disminuyen hasta llegar a la concentración más baja observada poco antes del primer proestro, mientras que la secreción de LH permanece baja. Para el día 16 la AFP disminuye, lo que permite la elevación de estrógenos libres en la circulación, hecho que coincide con la disminución de la concentración de FSH en el día 12 (Ojeda y cols., 1986).

*Etapa juvenil.* En esta etapa se observa claramente que el eje hipotálamo-hipófisis es capaz de responder a la estimulación de estrógenos con aumento en la secreción de gonadotropinas. La LH disminuye y después tiende a volverse pulsátil en intervalos de 30 minutos. Los estrógenos libres o activos continúan aumentando, ya que la AFP disminuye aún más respecto a la fase infantil (Peters, 1978; Ojeda y cols., 1986). Los cambios diurnos en el patrón de liberación de la LH son de gran importancia para que el ovario sea capaz de producir las cantidades de esteroides suficientes para activar el aumento de LH. En esta etapa se da un incremento de los receptores a LH que también ocurre durante la etapa infantil, pero es más pronunciada durante la etapa juvenil (Ojeda y cols., 1986).

*Etapa peripuberal.* En esta etapa se desencadena una cascada de eventos que culmina con un aumento preovulatorio de gonadotropinas y la primera ovulación. Se mantiene la amplitud de los pulsos de LH que es responsable de estimular al ovario y provocar una mayor producción de estradiol, aunado a un incremento en el número de receptores para la FSH y la LH, que se traduce en una máxima respuesta esteroidogénica. Aumentan las concentraciones de estradiol, progesterona y testosterona, mismas que llegan a estimular la descarga de GnRH que culmina con la liberación brusca de gonadotropinas y como consecuencia la primera ovulación (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1989).

Para explicar cada uno de los eventos de la cascada que culmina con la pubertad, la etapa peripuberal se divide en: 1) Anestro: la vagina se encuentra cerrada, el útero es pequeño y no se detecta ningún fluido intrauterino, existe liberación de LH. 2) Proestro temprano: la vagina se encuentra cerrada y el útero es largo con fluido intrauterino. 3) Proestro tardío: corresponde al primer día del proestro, muchos animales presentan aún la vagina cerrada, el útero es largo balonado y lleno de fluido. 4) Estro: es el día de la primera ovulación, la vagina está abierta y predominan células cornificadas, el fluido uterino ya ha desaparecido y en los ovarios se pueden observar cuerpos lúteos frescos. 5) Primer diestro: la citología de la vagina se caracteriza por presentar leucocitos y en los ovarios se observa la presencia de cuerpos lúteos (Feder 1981; Ojeda y cols., 1986).

## **2. Interacción entre el timo y la función reproductiva**

### **2.1 Timo**

El timo es el órgano responsable de la inmunogénesis del individuo, ya que en él se lleva a cabo la maduración y diferenciación de los linfocitos T o inmunocompetentes encargados de mediar la inmunidad celular (Roitt y 1993; Ross y cols., 2005).

El timo es un órgano linfático que se encuentra en el tórax, inmediatamente por debajo de la parte superior del esternón. Es una masa de color rosado grisáceo, aplanada y triangular. En general se considera que es una estructura única bilobulada (Roitt y cols., 1993).

El timo es el único órgano linfoide primario que surge de dos evaginaciones endodérmicas que reciben el nombre de bolsas faríngeas. Posteriormente, el timo crece hacia el mediastino en forma de una prolongación tubular hacia el interior del tórax y pierde su conexión con los puntos de origen. Los cordones proliferan y envían ramas laterales hacia el interior de los lóbulos. Otras células de estos cordones se distribuyen de manera menos densa hacia la periferia del órgano y tienden a separarse, pero siempre se mantienen unidas entre sí por proyecciones citoplasmáticas que forman una red. Se le considera linfoide, ya que durante la vida embrionaria es poblado por células madre traídas por la sangre desde el saco vitelino, que se diferencian en linfocitos dentro del ambiente especial del timo (Fawcett, 2000; Sadler, 2004; Ross y cols., 2005).

El timo es un órgano formado por dos lóbulos unidos en la parte media por tejido conectivo. Cada uno de los lóbulos está rodeado por una cápsula de tejido conectivo derivado del mesénquima, que penetra formando tabiques o trabéculas que lo dividen en lobulillos. Está formado por una matriz de células epiteliales dispuestas en forma de red por lo que se le denomina retículo-epiteliales, en cuyos espacios se depositan los linfocitos (Roitt y cols., 1993; Ross y cols., 2005).

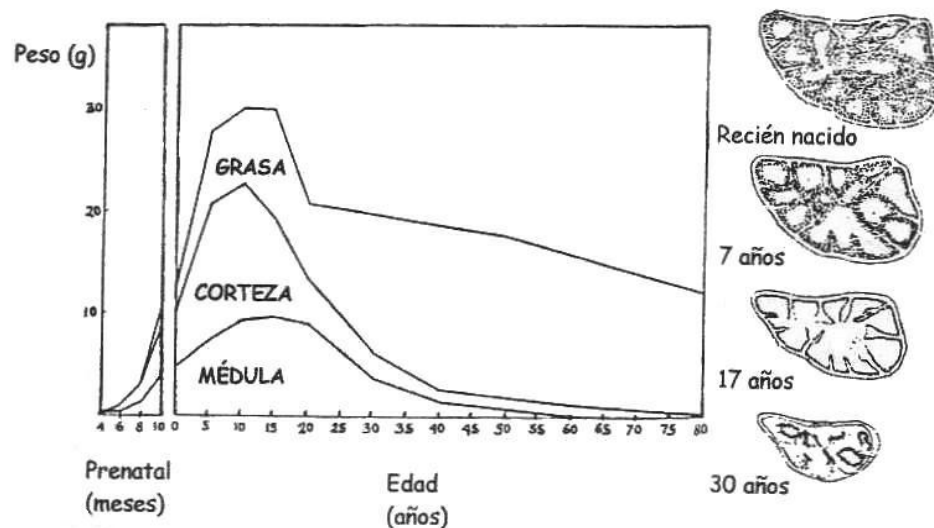
Cada lóbulo del timo presenta una corteza discontinua y una médula continua. En la parte periférica o corteza, las células retículo-epiteliales están distribuidas más espaciadamente y con gran cantidad de linfocitos entre ellas; a diferencia de la zona central o médula que presenta mayor densidad de células retículo-epiteliales con menor número de proyecciones y de linfocitos (Roitt y cols., 1993; Fawcett, 2000; Ross y cols., 2005).

En la médula se encuentra una estructura llamada corpúsculo de Hassall que es un agrupamiento de células retículo-epiteliales engrosadas y dispuestas concéntricamente (Roitt y cols., 1993; Ross y cols., 2005).

Las dimensiones del timo varían considerablemente según la edad. En el humano, el timo presenta su talla máxima durante la vida fetal y en los dos primeros años de vida extrauterina, en relación al crecimiento corporal. A partir del segundo año y hasta la pubertad, continúa aumentando de volumen, pero no tan rápidamente como el resto del cuerpo. El timo es muy sensible a los efectos de los esteroides, por ello inicia su involución en la pubertad disminuyendo de volumen y funcionalidad a medida que pasan los años. La corteza se hace más delgada debido a la disminución en la tasa de proliferación linfocítica, aumenta el área de la médula, el número de corpúsculos de Hassall y la cantidad de tejido adiposo, de tal forma que a la vejez el órgano es un cúmulo de grasa (Fawcett, 2000) (Figura 7).

Dada la alta susceptibilidad del timo a los esteroides, el aumento en las concentraciones de glucocorticoides que ocurre bajo condiciones de estrés acelera su involución, lo que se manifiesta como decremento rápido en talla y peso principalmente por la pérdida de linfocitos corticales. También se ha observado involución del timo durante el embarazo y la lactancia (Grossman, 1985; Roitt y cols., 1993).





**Figura 7.** Esquema que muestra los cambios de peso y composición del timo durante el proceso de involución (Tomado de Bellanti, 1986).

El trabajo realizado por Calzolari en 1898, fue la primera evidencia de la relación entre el sistema reproductor y el timo al observar en el conejo macho, que la castración provocaba hipertrofia del timo.

Uno de los modelos utilizados en el estudio de la relación del timo con el sistema reproductor es el ratón timectomizado a los tres días de edad (Tx3). La extirpación del timo conlleva a una serie de alteraciones reproductivas como son retraso en el inicio de la pubertad, menor peso de los ovarios y el útero, concentraciones bajas de FSH, LH, progesterona y estradiol, y en la etapa adulta disgénesis ovárica e infertilidad (Nishizuka y Sakakura, 1969; 1971; Besedovsky y Sorkin, 1974; Michael, 1983). En este

modelo biológico, el transplante de timo durante la etapa neonatal previene estas alteraciones reproductivas (Nishizuka y Sakakura, 1969; Rebar y cols., 1980).

### *Hormonas sintetizadas por el timo*

Las timosinas son polipéptidos secretados por las células retículo-epiteliales del timo. De los extractos tímicos como la timosina fracción 5 (TF-5) se han aislado varios polipéptidos con diversas funciones biológicas, las cuales se han clasificado en familias de acuerdo al punto isoeléctrico que presenten: Timosina  $\alpha$ 1, Timosina  $\alpha$ 5, Timosina  $\alpha$ 7, Timosina  $\gamma$ 1, Timosina  $\beta$ 1, Timosina  $\beta$ 3, Timosina  $\beta$ 4, Timosina  $\beta$ 7, Timosina  $\beta$ 8, Timosina  $\beta$ 9, Timosina  $\beta$ 10 (Goldstein y cols., 1981,1984).

La TF-5 también contiene otras timosinas como factor tímico humoral (THF), timoestimulina, timopoiatina, factor tímico X (FTX), factor tímico del suero (FTS) o timulina (Goldstein y cols., 1981).

Algunos de los polipéptidos tímicos participan en la secreción de las hormonas que intervienen en el crecimiento gonadal. Si se agrega TF-5 ó timosina  $\beta$ 4 a un sistema de perfusión de hipotálamo e hipófisis, se incrementa la producción de GnRH y por consiguiente la de LH (Rebar y cols., 1981).

En ratones prepúberes, la administración subcutánea de TF-5 aumenta la concentración plasmática de estradiol y adelanta la edad de la apertura vaginal (Michael, 1983). La administración de timosina  $\beta_4$ , en el tercer ventrículo del cerebro del ratón adulto, incrementa la concentración de LH en el plasma (Hall y cols., 1992).

## ***2.2 Timulina***

La timulina es un péptido que se caracteriza por ser sintetizado exclusivamente por las células retículo-epiteliales del timo. En el suero de ratones normales la timulina está presente, mientras que ésta desaparece de la circulación al realizar una timectomía y reaparece poco tiempo después de realizar un injerto de timo (Bach y Dardenne, 1972; Dardenne y Bach, 1981; Pléau y cols., 1981; Savino y cols., 1982; Dardenne y cols., 1980).

La timulina es una hormona formada por nueve aminoácidos: pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH, con peso molecular de 900 daltons y punto isoeléctrico de 7.5 (Pléau y cols., 1981; Dardenne y cols., 1984). Este nonapéptido es biológicamente inactivo si no mantiene una relación equimolar con el ión zinc. La unión de la timulina con el  $Zn^{2+}$  puede formar complejos 1:1 ó 1:2 (Dardenne y cols., 1982 y 1985; Gastinel y cols., 1984; Low y Goldstein, 1984).

La timulina es una hormona implicada en varios aspectos intra y extra tímicos de la diferenciación de las células T (Dardenne y Bach, 1981).

Los linfocitos T presentan dos tipos de receptores a timulina y su unión es específica, saturable y reversible. La constante de disociación de cada receptor es de  $0.516 \pm 0.2$  nM y  $110 \pm 27.8$  nM, su concentración es de  $0.186 \pm 0.045$  y  $2.026 \pm 0.367$  pmol/mg de membrana y su número es de  $5 \times 10^4$  y  $8 \times 10^4$  receptores por célula (Pléau y cols., 1980).

En el ratón, la timulina es detectada desde el día 14 de edad, su producción se mantiene en concentraciones constantes entre los primeros cinco y siete meses de edad y a partir del séptimo mes su concentración comienza a disminuir. Para los 15 ó 18 meses de edad, cuando el proceso de involución tímica es considerable, las células retículo-epiteliales comienzan a degenerar, lo que lleva a que en los animales viejos la timulina tienda a desaparecer de la circulación (Dardenne y Bach, 1981).

La timulina atraviesa la barrera hematoencefálica ya que se ha observado actividad de rosetas en el líquido cerebroespinal de pacientes con esclerosis múltiple tratados con timulina por vía subcutánea (Bach y Dardenne, 1984).

El control de la secreción de la timulina parece depender de una compleja red de eventos. Los primeros estudios sugieren que la hormona por si misma controla su secreción. Posteriormente se describe que la producción y secreción de la timulina es regulada de manera directa o indirecta por el sistema endócrino (GH, PRL y tiroxina). De igual forma, existen estudios que muestran que la timulina posee actividad hipofisiotrópica al modular la liberación de hormonas como la ACTH, LH, TSH, PRL y CRF (Savino y cols., 1984; Fabris y Mocchegiani, 1985; Folch y cols., 1986; Dardenne y cols., 1988; Hadley y cols., 1997; Goya y cols., 2004).

### ***2.3 La timulina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario***

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

La timulina tiene un efecto sinérgico sobre la liberación de LH y un efecto aditivo sobre la de FSH en las células de adenohipófisis coincubadas con GnRH. Sus efectos estimulantes sobre la liberación de las hormonas adenohipofisarias disminuye con la edad del donador de las células (Brown y cols., 2000).

Hinojosa y colaboradores (2004) mostraron en células de adenohipófisis obtenidas 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.

En cultivos de células de la granulosa de ovarios de cerda se ha mostrado que la administración de timulina incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasa. Cuando se adiciona timulina junto con FSH o con LH se observa incremento en la secreción de progesterona, evento que no sucede si sólo se administra timulina (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990).

En ratones de 20 días de edad, la administración de la gonadotropina coriónica equina (eCG), no induce la ovulación, pero si se les administra

diariamente timulina desde el día anterior a la inyección de eCG hasta el día del sacrificio, los animales superovulan (Hinojosa y cols., 1999).

En el ratón hembra timectomizado a los diez días de edad (Tx-10), que presenta disminución en las concentraciones séricas de estradiol en suero a la pubertad y menor respuesta ovulatoria a la administración de eCG y a la gonadotropina coriónica humana (hCG), la inyección diaria de timulina iniciando inmediatamente después de la timectomía, normaliza la concentración de estradiol y restablece la respuesta ovulatoria (García y cols., 2000).

En ratones prepúberes, la microinyección de timulina en el hipotálamo medio basal o la adenohipófisis estimula la ovulación previamente bloqueada por el uso del éter como anestésico (García y cols., 2005).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La función reproductiva está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Se ha mostrado que el timo participa en esta modulación por intermedio de la timulina, ya que su administración subcutánea induce superovulación en respuesta al estímulo gonadotrópico e inyectada directamente en el hipotálamo o la hipófisis estimula los mecanismos que culminan con la ovulación. Sin embargo, no se cuenta con información que muestre si la timulina tiene efectos directos sobre el ovario como órgano fundamental del eje reproductivo.

Por ello, en el siguiente trabajo se estudiaron los efectos de la microinyección de timulina directamente en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con gonadotropinas.



## **HIPÓTESIS**

La timulina promueve la ovulación al ser administrada de manera sistémica, directamente en el hipotálamo o en la hipófisis, dado que el ovario forma parte del eje reproductivo, entonces la administración de timulina directamente en este órgano favorecerá la respuesta ovulatoria.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos de la timulina administrada en la bursa ovárica del ratón prepúber sobre la ovulación inducida por la administración de gonadotropinas.

## **Objetivos específicos**

- Analizar la respuesta ovulatoria del ratón prepúber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas.
- Analizar la curva dosis-efecto de la administración de timulina en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con gonadotropinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Animales*

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 mantenidos en condiciones convencionales de bioterio, con fotoperiodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h), 26% de humedad, temperatura de 22°C ±2 y alimentación *ad libitum*.

Las cruzas se realizaron utilizando animales adultos (3 meses de edad) en una proporción de tres hembras por un macho; las hembras se revisaron diariamente durante siete días en busca de tapón espermático (TE), cuya presencia se consideró como día uno de preñes. En las hembras en las que no se logró observar el TE, se registró el peso corporal siete días después de haber retirado al macho y se comparó con el peso al momento de la crua; aquellas que tuvieron un incremento entre el 10 y el 15 % se consideraron como preñadas. Diecisiete días después de la presencia del TE, las hembras gestantes se separaron en cajas individuales para registrar el día de la parición.

Al nacimiento se registró el número total de crías y al día siguiente (día uno de edad) se llevó a cabo el sexado, se retiraron los machos; y las hembras se distribuyeron en una relación de 5 ó 6 por madre. El destete se realizó a los 19 días de edad.

### *Procedimiento de microinyección*

Hembras prepúberes de 19 días de edad se anestesiaron con éter y se les realizó una incisión por vía dorso-lateral de piel y músculo a la altura del último par de costillas por donde se exteriorizó el ovario. Se introdujo en la bursa ovárica una aguja del No. 29 (con el bisel previamente acortado) conectada a una jeringa Hamilton de 25  $\mu$ l, acoplada a una bomba de microinyección (Bioanalytical Systems, BAS, Modelo CMA/100) y calibrada para inyectar un volumen de 2  $\mu$ l/min de solución salina (NaCl 0.9%)(disolvente de la timulina) o timulina (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo. USA) (en las concentraciones que se indican en el diseño experimental). Este procedimiento se realizó en ambos ovarios.

### *Procedimiento de autopsia*

Los animales se sacrificaron por decapitación a los 23 días de edad o al primer estro vaginal, según se indique en el diseño experimental. A la autopsia se disecaron los ovarios, el útero, el timo y el bazo y se pesaron en balanza de precisión. En los oviductos se buscó la presencia de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, en cuyo caso se procedió a contarlos.

### *Diseño experimental*

#### **1. Respuesta ovulatoria del ratón prepúber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas.**

Se utilizaron ratones prepúberes de 20 días de edad que se dividieron en tres grupos. A cada grupo se le inyectó por vía subcutánea una de las siguientes concentraciones de eCG (Sigma) 2, 3 ó 5 u.i. Los animales se revisaron diariamente para registrar el día de la apertura vaginal, momento en el que se inició la toma diaria de frotis vaginales y se sacrificaron entre las 10:00 y 11:00 h del día del primer estro.

Otros grupos de animales de la misma edad e inyectados con las mismas concentraciones de eCG antes mencionadas, se les inyectó 54 horas después de eCG, 3 u.i. de hCG (Sigma) y 20 horas después se sacrificaron. En todos los animales se registró el día de la apertura vaginal y la presencia del primer estro.

Se contó con un grupo de animales intactos que se sacrificaron a los 23 días de edad entre las 10:00 y 11:00 h.

**2. Curva dosis-efecto de la administración de timulina en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con gonadotropinas.**

A los 19 días de edad los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: testigos (animales intactos), operación simulada (incisión de piel y músculo), microinyección en bursa de solución salina y microinyección en bursa de timulina. El grupo de timulina a su vez se subdividió para inyectarles en cada ovario una de las siguientes concentraciones de timulina 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 pg, siguiendo el método descrito previamente. Las concentraciones se determinaron con base en estudios previos (Hinojosa y cols., 1999; García y cols., 2000).

Al día siguiente de la microinyección de timulina se les sometió a una prueba ovulatoria administrando gonadotropinas en las concentraciones determinadas para tal fin en el experimento anterior. Los animales se sacrificaron 72 h después de la administración de eCG.

### *Análisis estadístico*

La edad de la apertura vaginal, la presencia del primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal), el número de ovocitos liberados y el peso corporal y de los órganos, se expresaron como la media  $\pm$  e.e.m.

El número de ovocitos liberados se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn's. La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan entre el número total de animales) se comparó utilizando la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. El peso corporal y de los órganos se analizó con la prueba de *t* de Student.

En todos los casos sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

**RESULTADOS**

**I. Respuesta ovulatoria del ratón prepúber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas.**

**a) Administración de eCG (2, 3 ó 5 u.i.).**

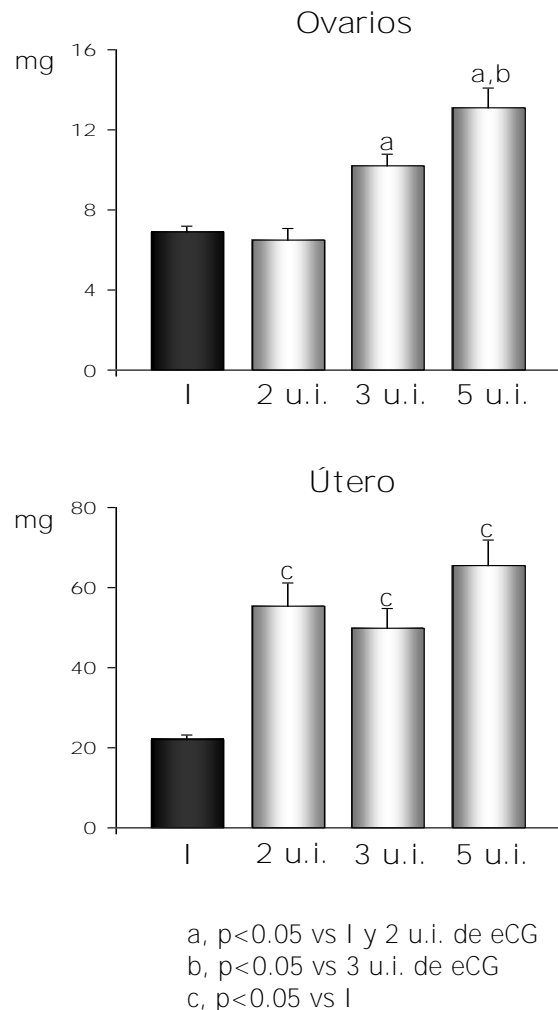
Los resultados muestran que en los ratones prepúberes de 20 días de edad, la administración de eCG, independientemente de la concentración, indujo la apertura vaginal entre los 21 y 23 días de edad y el primer estro vaginal se presentó de 72 a 96 horas después de la administración de eCG. La ovulación sólo se presentó en el 25 % de los animales tratados con 5 u.i. de eCG (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV), primer estro vaginal (PEV) y número de ovocitos liberados de ratones inyectados con diferentes concentraciones de eCG a los 20 días de edad y sacrificados al primer estro vaginal.

Parámetros	Intactos	eCG		
		2 u.i.	3 u.i.	5 u.i.
Número de animales	10	12	12	12
AV (días)	---	21.5 $\pm$ 0.2	23.0 $\pm$ 0	22.0 $\pm$ 0
PEV (días)*	---	2.2 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0
TAO	0/10	0/12	0/12	3/12
Número de ovocitos	0	0	0	30.0 $\pm$ 13.9

\* Días posteriores a la apertura vaginal

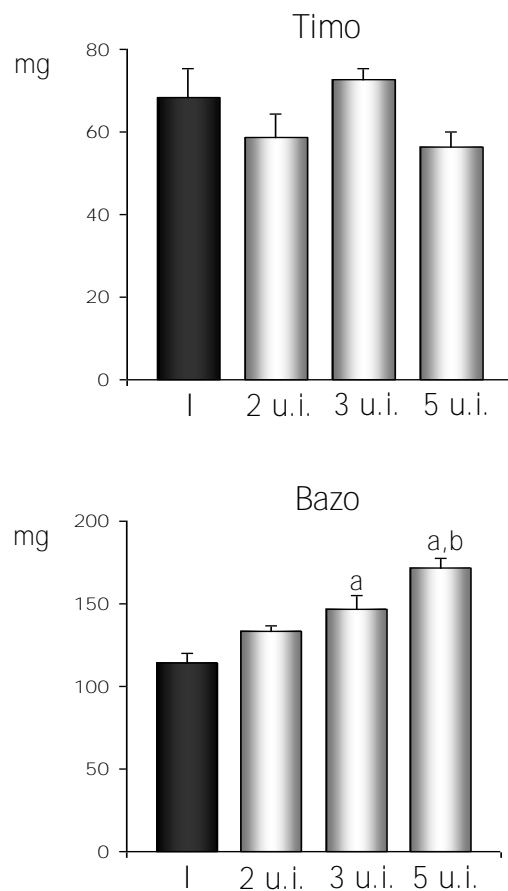
El peso de los ovarios de los animales tratados con 3 ó 5 u.i. de eCG se incrementó de manera significativa en comparación con el grupo de hembras intactas sacrificadas a los 23 días de edad. En cuanto al peso del útero, el tratamiento con eCG provocó aumento estadísticamente significativo en todos los grupos respecto al de los animales intactos (**Figura 8**).



**Figura 8.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero de ratones intactos (I) sacrificados a los 23 días de edad y de ratones tratados a los 20 días de edad con diferentes concentraciones de eCG y sacrificados al primer estro vaginal.



El peso del timo de los grupos inyectados con eCG, no mostró diferencias significativas respecto al grupo de animales intactos. El peso del bazo de las hembras tratadas con 3 ó 5 u.i. de eCG se incrementó significativamente en comparación con los animales intactos, siendo el grupo con 5 u.i. de eCG el que resultó tener el mayor peso (**Figura 9**).



a,  $p < 0.05$  vs I  
 b,  $p < 0.05$  vs 2 u.i. y 3 u.i.

**Figura 9.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo y el bazo de ratones intactos (I) sacrificados a los 23 días de edad y de ratones tratados a los 20 días de edad con diferentes concentraciones de eCG y sacrificados al primer estro vaginal.

**b) Administración de eCG (2, 3 ó 5 u.i.) y hCG (3 u.i.).**

En todos los grupos inyectados con diferentes concentraciones de eCG + 3 u.i. de hCG la canalización vaginal ocurrió entre los 21 y 22 días de edad y el primer estro se presentó 72 horas después de la administración de eCG (Tabla 2).

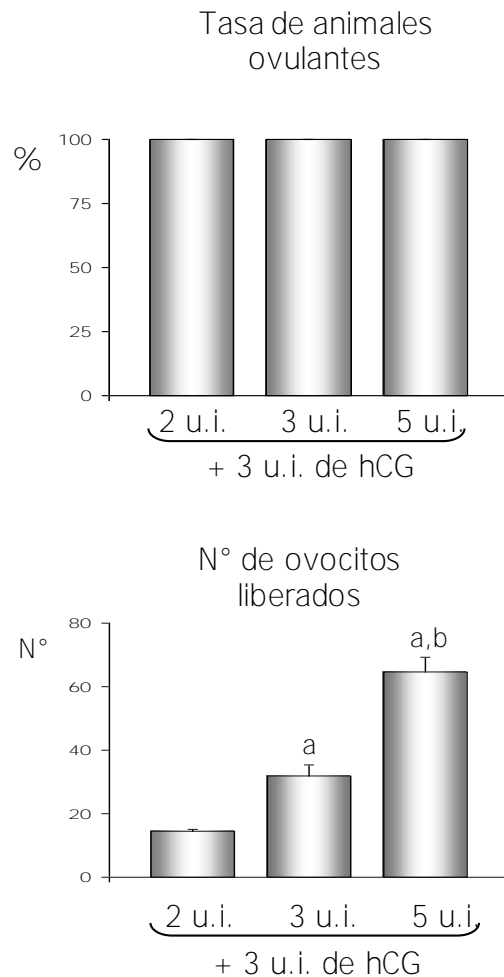
**Tabla 2.** Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y del primer estro vaginal (PEV) de ratones inyectados a los 20 días de edad con 2, 3 ó 5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	2 u.i. eCG	3 u.i. eCG	5 u.i. eCG
	+ 3 u.i. hCG		
Número de animales	12	12	10
AV (días)	21.5 $\pm$ 0.2	21.5 $\pm$ 0.2	22.0 $\pm$ 0
PEV (días)*	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0

\* Días posteriores a la apertura vaginal

A diferencia de lo observado en los grupos experimentales estimulados únicamente con eCG, la administración secuencial de eCG (independientemente de la concentración) y hCG indujo la ovulación en el 100% de los animales. El análisis comparativo del número de ovocitos liberados muestra que fue significativamente mayor en función de la concentración de eCG administrada (**Figura 10**). Con 2 u.i. de eCG + hCG la

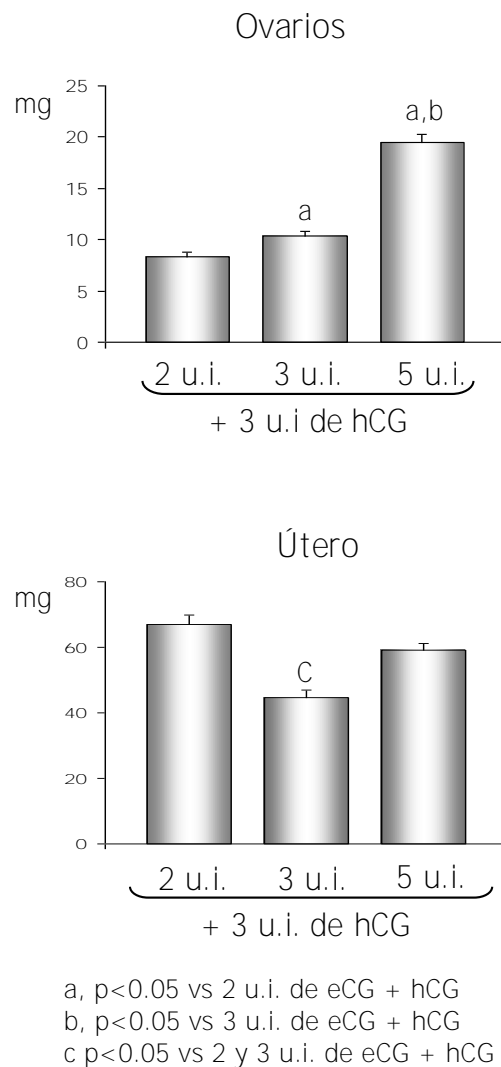
cuota ovulatoria fue similar al número de crías promedio por parición que presenta el ratón CD1 adulto ( $14.6 \pm 0.4$ ) (datos no publicados) por lo que la respuesta ovulatoria a 3 ó 5 u.i. de eCG + hCG se consideró como superovulación.



a,  $p < 0.05$  vs 2 u.i. de eCG + hCG  
b,  $p < 0.05$  vs 2 y 3 u.i. de eCG + hCG

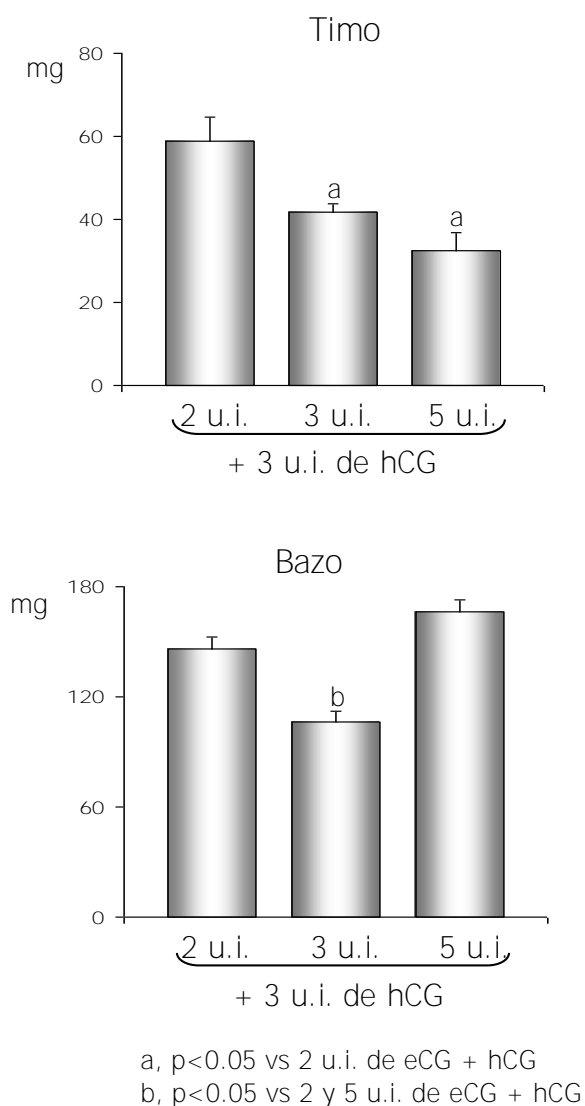
**Figura 10.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones inyectados a los 20 días de edad con 2, 3, ó 5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

El peso de los ovarios de los animales tratados con eCG + hCG mostró un incremento estadísticamente significativo y directamente proporcional a la concentración de eCG administrada. El peso del útero del grupo con 3 u.i. de eCG + hCG fue significativamente menor comparado con el peso del útero de los otros dos grupos experimentales (**Figura 11**).



**Figura 11.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero de ratones inyectados a los 20 días de edad con 2, 3, ó 5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

El peso del timo de las hembras tratadas con 3 ó 5 u.i. de eCG + hCG fue significativamente menor, en comparación con el grupo estimulado con 2 u.i. de eCG + hCG, mientras que el bazo de los animales con 3 u.i. de eCG + hCG mostró menor peso respecto a los grupos con 2 ó 5 u.i. de eCG + hCG (Figura 12).



**Figura 12.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo y el bazo de ratones inyectados a los 20 días de edad con 2, 3 ó 5 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

**II. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de timulina (30, 60, 120 ó 240 pg) en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con 2 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG.**

Tomando en consideración la respuesta ovulatoria de los animales prepúberes frente al estímulo gonadotrópico, se decidió analizar los efectos de la administración de timulina en la bursa ovárica utilizando 2 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG, ya que ovula el 100% de los animales y la cuota ovulatoria es similar al número de crías por parición que caracteriza a las hembras adultas de la cepa de animales utilizada ( $14.6 \pm 0.4$  crías).

**Tabla 3.** Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y del primer estro vaginal (PEV) de ratones de 19 días de edad con operación simulada (OS) o inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina y testigos (TA), tratados a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

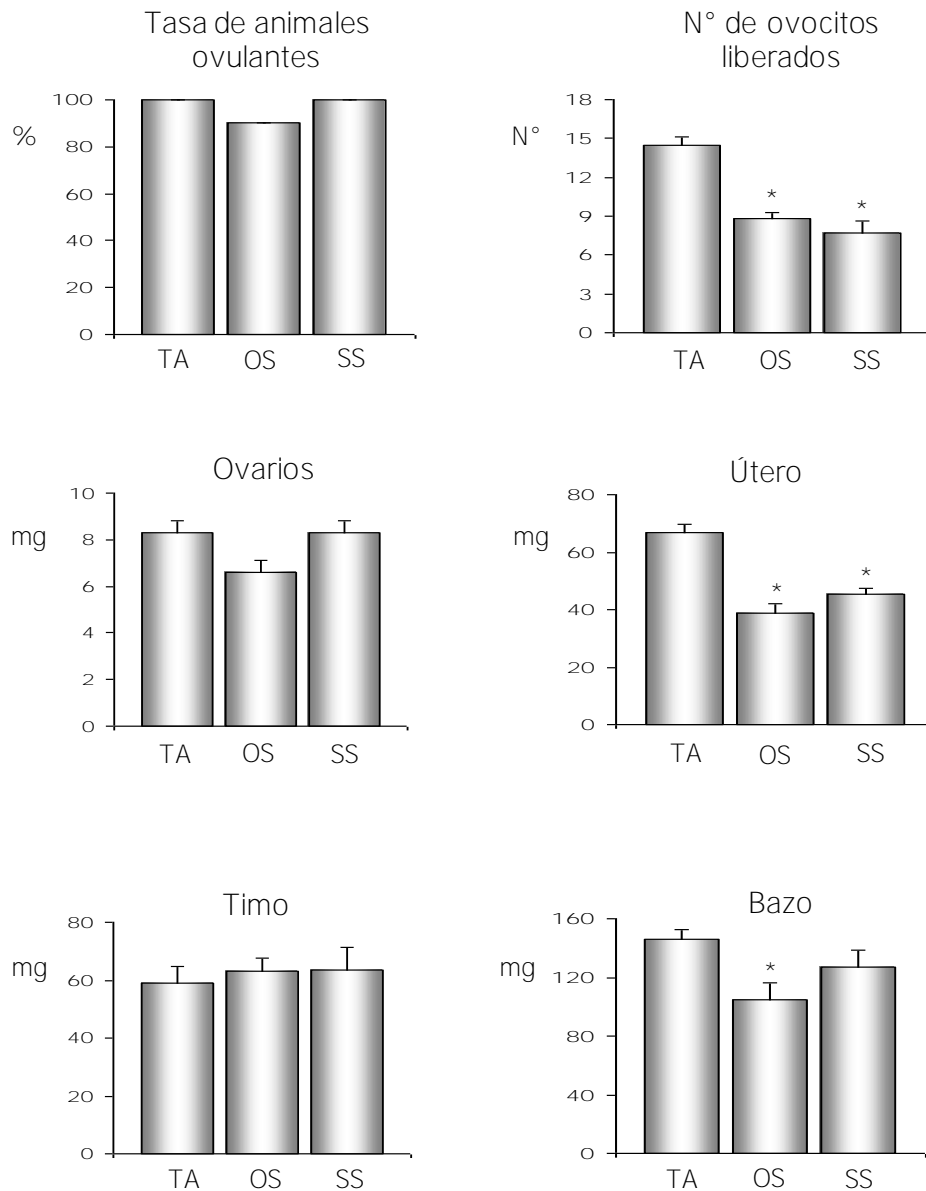
Grupos		AV (días)	PEV (días)*
TA		$21.5 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.2$
OS		$22.5 \pm 0.2$	$0.5 \pm 0.2$
SS		$22.1 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.2$
Timulina (pg)	30	$22.6 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.2$
	60	$22.8 \pm 0.2$	$0.2 \pm 0.2$
	120	$22.5 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.2$
	240	$22.0 \pm 0$	$1.0 \pm 0$

\* Días posteriores a la apertura vaginal.

En los grupos TA, OS y SS tratados con 2 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG, la apertura vaginal se presentó entre los 21 y 22 días de edad y el primer estro 72 horas después de la administración de eCG, eventos que no se modificaron con la inyección de timulina en la bursa ovárica (Tabla 3).

Tanto en el grupo con OS como en el de microinyección de SS la tasa de animales ovulantes se mantuvo similar a la de los animales testigo, sin embargo el número de ovocitos liberados fue significativamente menor en los animales con OS respecto al grupo TA. La microinyección de SS no modificó este parámetro respecto a la OS. Resultados similares se observaron en el peso del útero, mientras que el peso del bazo sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en los animales con OS respecto a los otros grupos (**Figura 13**).

El peso de los ovarios y el timo no se modificó de manera significativa independientemente de la manipulación quirúrgica (**Figura 13**).



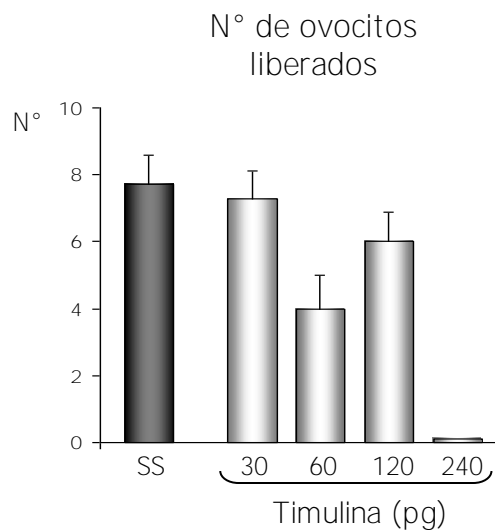
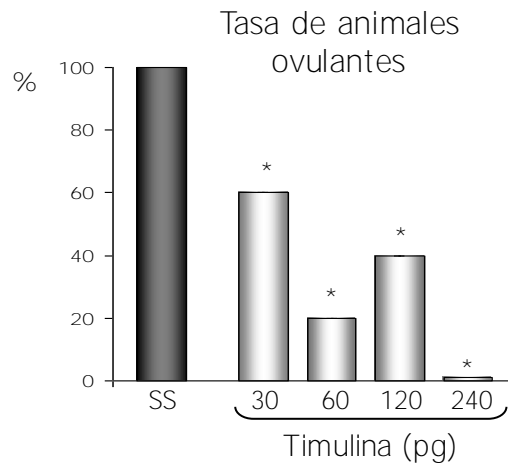
\*  $p < 0.05$  vs TA

**Figura 13.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados y del peso de los órganos de ratones de 19 días de edad con operación simulada (OS) o inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) y testigos (TA) tratados a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.



Debido a las diferencias observadas en los parámetros evaluados en función de la manipulación experimental, se consideró a los animales con microinyección de SS como grupo de comparación para analizar los efectos de la administración de timulina en la bursa ovárica.

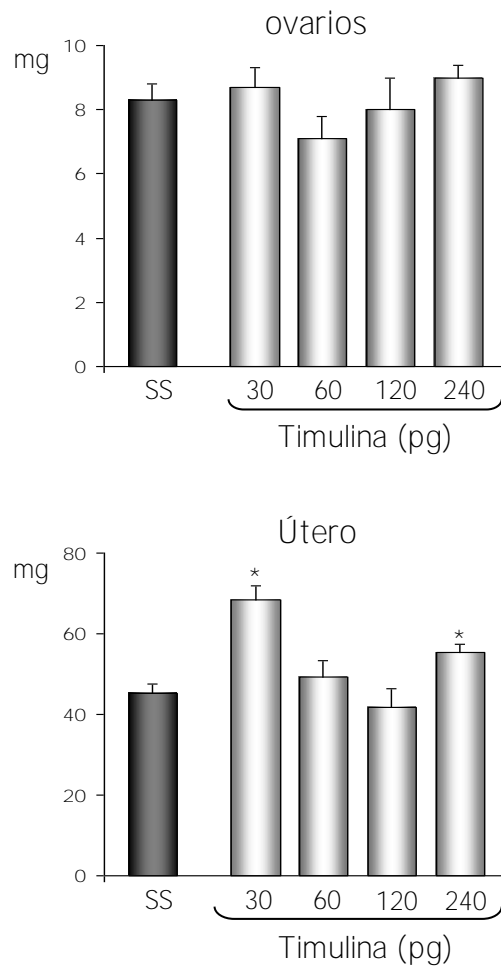
Con la mayoría de las concentraciones de timulina empleadas, el porcentaje de animales ovulantes disminuyó significativamente respecto al grupo con SS y con la concentración más alta (240 pg) ninguno ovuló (**Figura 14**). Sin embargo, la cuota ovulatoria de los grupos inyectados con timulina que llegaron a ovular, no mostró diferencias significativas respecto a la de los animales con SS.



\*  $p < 0.05$  vs SS

**Figura 14.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones de 19 días de edad inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina, tratados a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

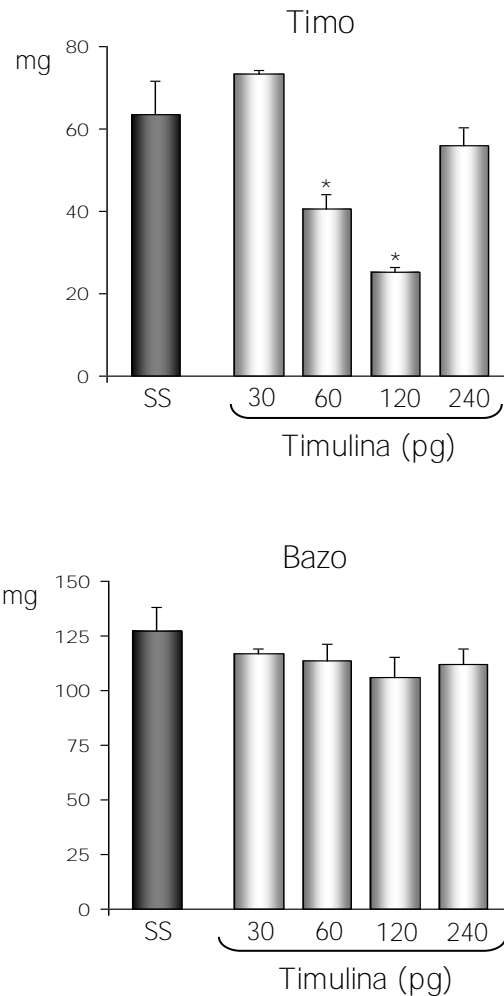
El peso de los ovarios no se modificó de manera significativa independientemente de las concentraciones de timulina, mientras que el peso del útero de los animales tratados con 30 ó 240  $\mu\text{g}$  de timulina fue significativamente mayor al del grupo con SS (**Figura 15**).



\*  $p < 0.05$  vs SS

**Figura 15.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero de ratones de 19 días de edad, inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina, tratados a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

El peso del timo disminuyó significativamente al administrar 60 ó 120 pg de timulina en comparación con los animales con SS. El peso del bazo no se modificó en ninguno de los animales tratados con timulina respecto al grupo con SS (**Figura 16**).



\*  $p < 0.05$  vs SS

**Figura 16.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del timo y el bazo de ratones de 19 días de edad inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina tratados a los 20 días de edad con 2 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

**III. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de timulina (7.5, 15, 30, 60 o 120 pg) en la bursa ovárica sobre la respuesta ovulatoria del ratón prepúber tratado con 3 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG.**

Con base en los resultados de los experimentos anteriores, se decidió utilizar una estimulación gonadotrópica mayor y analizar los efectos de dos concentraciones de timulina menores a 30 pg.

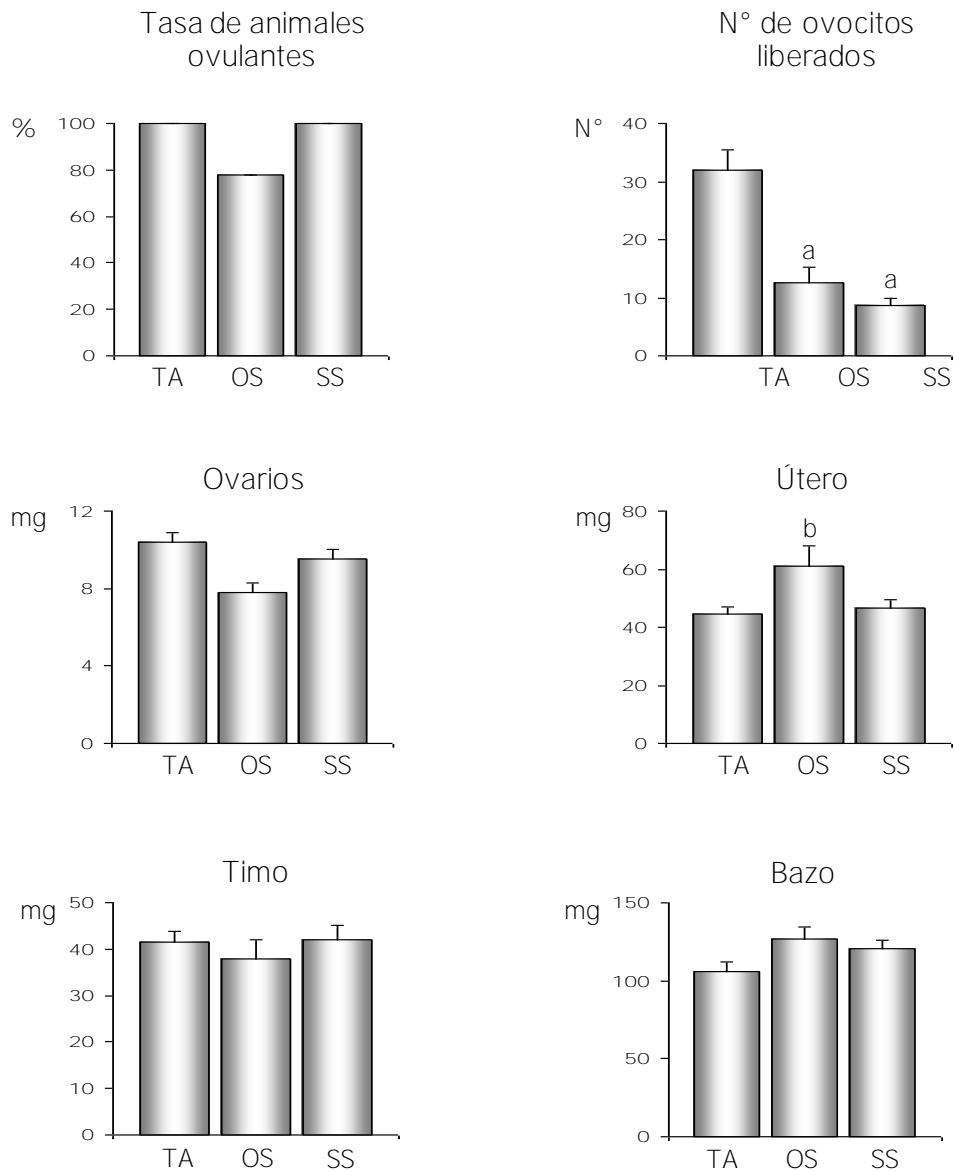
En todos los grupos experimentales inyectados con 3 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG la apertura vaginal se presentó entre los 21 y 23 días de edad. Y el primer estro se presentó 72 horas después de la administración de eCG (Tabla 4).

**Tabla 4.** Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y del primer estro vaginal (PEV) de ratones de 19 días de edad con operación simulada (OS) o inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina y testigos (TA) tratados a los 20 días de edad con 3 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

<b>Grupos</b>		<b>AV (días)</b>	<b>PEV (días)*</b>
<b>TA</b>		21.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2
<b>OS</b>		23.0 $\pm$ 0	0
<b>SS</b>		21.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
<b>Timulina (pg)</b>	<b>7.5</b>	23.0 $\pm$ 0	0
	<b>15</b>	22.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2
	<b>30</b>	22.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	<b>60</b>	23.0 $\pm$ 0	0
	<b>120</b>	23.0 $\pm$ 0	0

La OS no modificó significativamente la tasa de animales ovulantes respecto al grupo TA, evento que se conservó similar en los animales con microinyección de SS, mientras que el número de ovocitos liberados disminuyó de manera significativa en el grupo con OS y se mantuvo así en los animales con microinyección de SS (**Figura 17**).

El peso de los órganos no mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales, excepto el peso del útero de los animales con OS que resultó ser significativamente mayor al del grupo TA (**Figura 17**).



a,  $p < 0.05$  vs TA  
 b,  $p < 0.05$  vs TA y SS

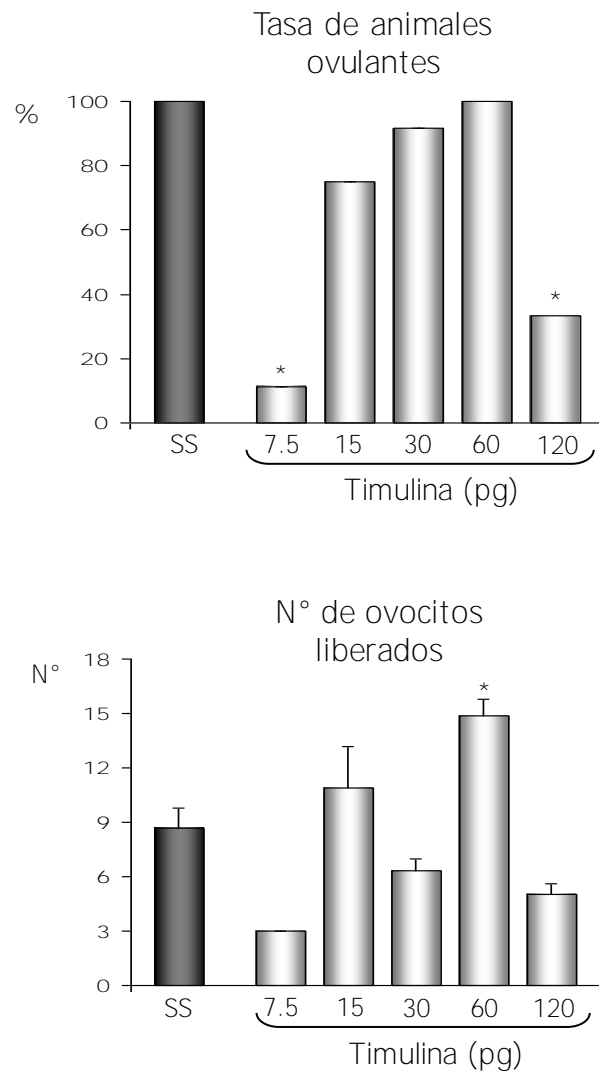
**Figura 17.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados y del peso de los órganos de ratones de 19 días de edad con operación simulada (OS) o inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) y testigos (TA) tratados a los 20 días de edad con 3 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Como en el experimento anterior, se consideró a los animales inyectados con SS como grupo de comparación.

La mayoría de los animales tratados con 15, 30 ó 60 pg de timulina en la bursa ovárica ovularon frente al estímulo de 3 u.i. de eCG + 3 u.i. de eCG. lo que no se observó con las concentraciones de 7.5 ó 120 pg de timulina, respecto al grupo con SS (**Figura 18**).

Con la concentración más baja de timulina, sólo un animal logró ovular y únicamente tres ovocitos, sin embargo la microinyección de 60 pg de timulina incrementó la cuota ovulatoria de manera significativa respecto a la del grupo con SS. El resto de las concentraciones de timulina no modificaron significativamente el número de ovocitos liberados en comparación con los animales con SS (**Figura 18**).

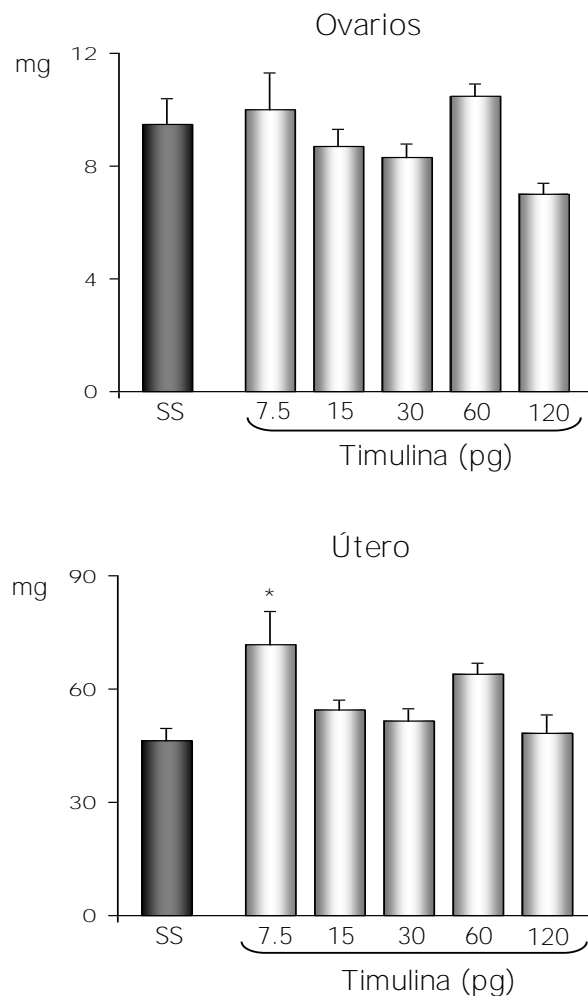




\*  $p < 0.05$  vs SS

**Figura 18.** Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones de ratones de 19 días de edad, inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina, tratados a los 20 días de edad con 3 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

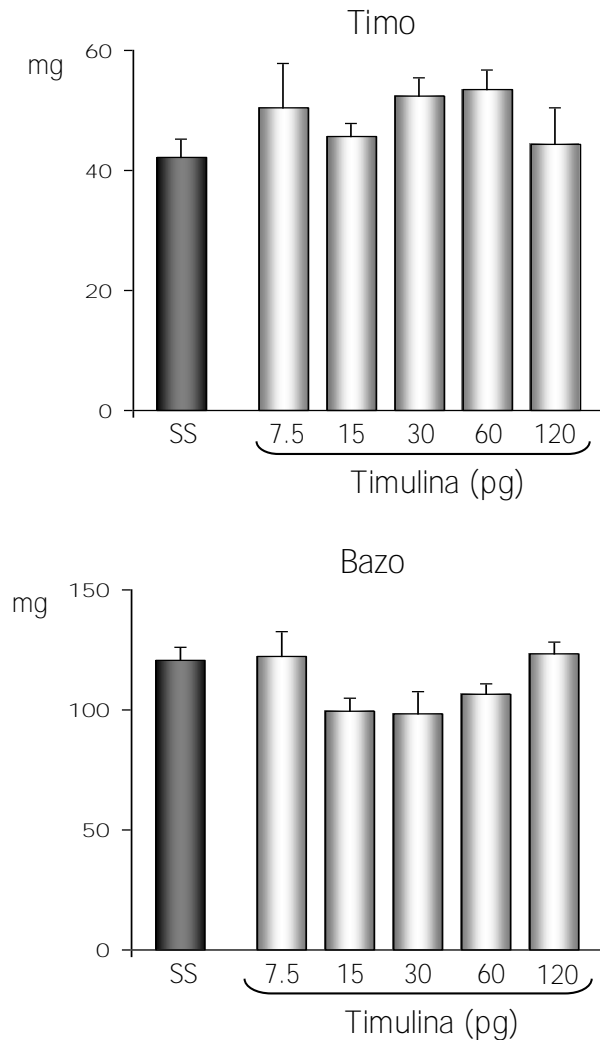
El peso de los ovarios de los grupos con timulina no presentó cambios respecto al grupo con SS, mientras que el peso del útero fue significativamente mayor al inyectar 7.5 pg de timulina, respecto al grupo con SS (Figura 19).



\* p<0.05 vs SS

**Figura 19.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero de ratones de 19 días de edad, inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina y tratados a los 20 días de edad con 3 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Ninguno de los grupos experimentales tratados con timulina presentó cambios significativos en el peso del timo y del bazo comparado con el grupo con SS (**Figura 20**).



**Figura 20.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y el útero de ratones de 19 días de edad, inyectados en la bursa ovárica con solución salina (SS) o concentraciones crecientes de timulina, tratados a los 20 días de edad con 3 u.i. de eCG, 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

## **DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración de timulina en la bursa ovárica tiene un efecto dual (estimulante o inhibitorio) sobre la respuesta ovulatoria de los animales tratados con gonadotropinas, efectos que dependen de la relación timulina-gonadotropinas.

El ratón de la cepa CD1 se caracteriza por no ovular de manera espontánea el día del primer estro vaginal (García y cols., 2000) a diferencia de la rata (Ojeda y cols., 1986). Sin embargo se pueden sincronizar ambos eventos por la administración de gonadotropinas. Al respecto se ha mostrado que la respuesta ovulatoria depende de la dosis administrada y de la edad del animal (Villavicencio y cols., 1993; Greenwald y Roy, 1994). En este estudio la eCG indujo la apertura vaginal en todos los animales independientemente de la manipulación experimental posterior (hCG, OS, SS, Timulina), lo que indica que esta gonadotropina estimula la síntesis de estrógenos (Roser, 1999) en concentraciones suficientes para provocar la canalización vaginal. El aumento al doble o más en el peso del útero de estos animales respecto al peso del útero de los animales prepúberes sin tratamiento gonadotrópico, apoya esta interpretación ya que éste órgano es blanco de los estrógenos (Greenwald y Roy, 1994; Yao y Bahr, 1999; Yen, 1999).

Por otra parte, el incremento en la masa ovárica podría ser reflejo del crecimiento folicular, sin embargo la mayoría de los animales no ovulan frente al estímulo único de eCG, lo que sugiere que el animal de 20 días de edad no es capaz de liberar el pico endógeno de LH, como ya ha sido propuesto anteriormente (Hinojosa y cols., 1999), probablemente porque el eje hipotálamo-hipofisario aún no está maduro (Ojeda y Urbanski, 1994).

Cuando a los animales se les inyectó de manera secuencial ambas gonadotropinas, todos ovularon, lo que indica que la gónada del animal en la etapa peripuberal ya es capaz de realizar sus funciones ante el adecuado estímulo gonadotrópico (Hinojosa y cols., 1999) y confirma lo propuesto anteriormente sobre la inmadurez del eje hipotálamo-hipofisario. En estos animales la cuota ovulatoria fue directamente proporcional a la concentración de eCG, evento que podría estar vinculado con el rescate de los folículos de la atresia y el incremento en el número de folículos preantrales normales descritos como efectos de la eCG sobre el crecimiento folicular (Monniaux y cols., 1984; Roser, 1999).

El consecuente incremento en el peso de los ovarios, probablemente corresponde a la formación de los cuerpos lúteos, resultado del número de ovocitos liberados en cada uno de los grupos (Zelevnik, 1999).

El timo es un órgano que inicia su involución en la pubertad, dado el aumento en las concentraciones de hormonas sexuales que ocurren en esta etapa (Grossman, 1985; Roitt y cols., 1993). El bazo es un órgano que no se modifica por las variaciones de estos esteroides (Kuhl y cols., 1983), sin embargo se ha mostrado que la disminución del peso del timo coincide con el aumento en el peso del bazo, por un proceso de compensación inmunológica (Ham, 1975). Es por esto que se considera a estos órganos como buenos indicadores de las fluctuaciones en las concentraciones de esteroides sexuales. Sin embargo, en los animales inyectados con eCG, no se modificaron, lo que indica que probablemente las concentraciones de progesterona no son lo suficientemente altas para provocar un efecto de involución del timo.

El timo de los animales tratados con ambas gonadotropinas al parecer ya manifiesta el comportamiento esperado (involución) al ser sometido a las concentraciones de estrógenos y progesterona que ocurren cuando se presenta la ovulación (Kuhl y cols., 1983).

No obstante que la mayoría de los animales que se sometieron a una operación simulada ovularon en respuesta a la administración de 2 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG, la cuota ovulatoria fue 40% menor a la observada en los animales que sólo recibieron el estímulo gonadotrópico. Una de las variables involucradas en esta intervención quirúrgica es el uso del éter como

anestésico. Al respecto, García y colaboradores (2005) muestran en los ratones prepúberes, que la anestesia con éter bloquea la ovulación inducida por la administración de eCG, misma que se restablece al inyectar GnRH o hCG. El análisis histológico de los ovarios de los animales que no ovularon muestra un considerable incremento de folículos grandes atrésicos (Rosas y col., 2006; García y cols., 2005). En nuestro caso, los animales con OS recibieron hCG y aún así el número de ovocitos liberados fue considerablemente menor.

Kim y colaboradores (1994, 1996) describen en la rata adulta cíclica, que la exposición a vapores de éter en el día del proestro bloquea la ovulación el día del estro esperado como consecuencia de alteraciones en la descarga de GnRH y Devorshak-Harvey y colaboradores (1985) muestran que la administración de un antagonista a GnRH en la rata en diestro 1, reduce la amplitud de los pulsos de LH lo que provoca aumento en el porcentaje de folículos atrésicos, por lo que una posible explicación a la disminución de la cuota ovulatoria de nuestros animales, sería que el éter esté inhibiendo los pulsos de GnRH responsables de la secreción tónica de LH (Fox y Smith, 1985) necesaria en el crecimiento y maduración de los folículos que van a ser ovulados (Ojeda y cols. 1994).

Cabe la posibilidad de que la disminución en el número de ovocitos liberados en los animales con OS no sea sólo el resultado de la exposición a los vapores de éter, también la propia cirugía puede estar involucrada en esta respuesta. Flores y colaboradores (2005, 2006, 2008) y Cruz y colaboradores (2006) observan en la rata adulta que la anestesia con éter incrementa en el lapso de una hora las concentraciones hormonales de los esteroides sexuales, mismas que se modifican al realizar la incisión de piel y músculo y la perforación del peritoneo. Sin embargo, se desconoce si estos cambios repercuten en la respuesta ovulatoria.

La microinyección de SS no modificó la respuesta ovulatoria respecto a la de los animales con OS, sin embargo no en todos los parámetros evaluados fue así, por lo que se tomó al grupo con SS para evaluar los efectos de las diferentes concentraciones de timulina sobre la ovulación inducida.

Es ya conocida la existencia de una relación bidireccional entre los péptidos sintetizados por el timo y la reproducción (Goldstein y cols, 1981). En particular se ha mostrado en estudios *in vivo* e *in vitro*, que la timulina tiene efectos en la regulación de la secreción de gonadotropinas ejerciendo sus efectos tanto a nivel hipotalámico (García, y cols., 2005) como hipofisario (Brown y cols., 2000; Hinojosa y cols., 2004; García y cols., 2005), pero poco se ha estudiado sobre su posible acción a nivel ovárico.



Ledwitz-Rigby y Scheid (1990) observan que la timulina adicionada al cultivo de células de la granulosa de ovario de cerda incrementa la actividad aromataasa y mayor secreción de progesterona estimulada por gonadotropinas, eventos que están en función del tiempo de incubación por lo que concluyen que la timulina participa en la transición de células FSH-sensibles a células LH-sensibles.

En estudios recientes del laboratorio hemos mostrado que la timulina adicionada al cultivo de células de la granulosa de ovario de ratón, es capaz de estimular la secreción basal de estradiol y disminuir la de progesterona de manera dosis dependiente (datos no publicados).

En los grupos inyectados con diferentes concentraciones de timulina en la bursa ovárica, la frecuencia de animales que lograron ovular frente al estímulo de 2 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG fue muy variable pero siempre menor a la de los animales con SS, lo que indicaría que la timulina estaría ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas. El efecto modulador de la timulina (estimulante o inhibitorio), dependiendo de la concentración administrada se ha observado en diversos modelos experimentales. La inyección sistémica de timulina en concentraciones altas reduce la hiperalgesia (Safieh-Gorabedian y cols., 1996), sin embargo la administración de dosis bajas induce esta patología (Safieh-Gorabedian y cols., 1997). Las

concentraciones altas promueven la diferenciación de linfocitos t-supresores y concentraciones bajas de t-cooperadores (Bach y Dardenne ,1984). En cultivo de células de Leyding de rata, la administración de concentraciones bajas de timulina incrementa la liberación de testosterona, mientras que las concentraciones altas la disminuye (Wise, 1998).

Dado los efectos inhibitorios y estimulantes de la timulina, no podemos descartar que está promoviendo la esteroidogénesis, como lo indica el peso del útero y del timo (Kuhl y cols., 1983), pero los efectos del éter sobre la secreción tónica de LH, como se observa en el grupo con SS, al parecer estarían enmascarando su acción. Por ello se decidió utilizar concentraciones bajas de timulina con un esquema de estimulación gonadotrópica mayor.

Nuevamente los animales expuestos a los vapores de éter presentaron una drástica disminución en la cuota ovulatoria, no obstante que se administró una concentración más alta de eCG. Estos resultados confirman lo previamente descrito sobre los efectos del éter sobre la secreción pulsátil de LH.

Las concentraciones de 30 y 60 pg de timulina inyectadas en la bursa ovárica recuperaron la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico mayor. Se sabe que en los folículos en estadios avanzados de la diferenciación, la LH apoya a las células de la granulosa en el proceso de esteroidogénesis (Van Voorhis, 1999), ya que su liberación pulsátil promueve la actividad aromatasa de aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH (Domínguez y cols., 1991). Con base en lo anterior, una posible explicación al incremento en la respuesta ovulatoria al administrar una dosis mayor de eCG, sería que la presencia previa de timulina (en concentraciones promedio de 60 pg), como se ha mostrado *in vitro*, estaría interactuando con las células de la granulosa amplificando la actividad aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990) y la esteroidogénesis (Cabrera, datos no publicados) compensando la deficiencia provocada por la falta de los pulsos de LH, lo que da lugar a los cambios que experimentan *in vivo* las células de la granulosa durante el proceso de crecimiento y maduración folicular.

Al parecer la concentración más baja (7.5 pg) no fue suficiente para contrarrestar los efectos del éter y permitir que los animales ovularan, sin embargo es capaz de promover la esteroidogénesis como lo muestra el peso del útero.

Nuestros resultados apoyan lo descrito por Ledwitz-Rigby y Scheid (1990) sobre la existencia de una relación timulina-gonadotropinas en el ovario y además muestran que los efectos de la timulina están en función del equilibrio de esta relación. El hecho que la respuesta ovulatoria de los animales tratados con 120 pg de timulina fuera similar entre los dos esquemas de estimulación gonadotrópica, apoyan esta interpretación.

También se ha descrito que el efecto dual de la timulina no sólo depende de su concentración, también depende del estatus hormonal del animal, ya que la adición de timulina (dosis única) al cultivo de células de adenohipófisis provenientes de animales sacrificados en cada día del ciclo estral, incrementa o disminuye la liberación de gonadotropinas dependiendo de día del ciclo estral (Hinojosa y cols., 2004). Con esto, podemos sugerir que timulina puede ser uno de los factores intraováricos que actúan por vías autócrinas y parácrinas para orquestar la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas y regular así el desarrollo folicular (Van Voorhis, 1999; Greenwald y Roy., 1994).

En resumen, con nuestros resultados podemos sugerir que si el éter modifica los pulsos de LH, incrementa la atresia folicular y bloquea la ovulación, la timulina probablemente facilita los mecanismos que rescatan a los folículos de la atresia. El análisis de la dinámica de crecimiento de la población folicular permitirá ampliar la información al respecto.

## CONCLUSIONES

- La respuesta ovulatoria del ratón prepúber de 20 días de edad indica que el ovario a esta edad ya es capaz de realizar sus funciones bajo el adecuado estímulo gonadotrópico.
- El uso del éter como anestésico disminuye significativamente la cuota ovulatoria de los animales estimulados con ambas gonadotropinas.
- La timulina administrada en el ovario del ratón prepúber estimula o inhibe la respuesta ovulatoria inducida, dependiendo de la relación timulina-gonadotropinas.
- La timulina no muestra una relación dosis-efecto en la respuesta ovulatoria de los animales tratados con gonadotropinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Audesirk T y Audesirk G (1996). *Biology life on earth*. 4ª ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey USA. 772 p.
- Bach JF y Dardenne M (1972). Thymus dependency of rosette forming cells. Evidence for a circulating thymic hormone. *Transplant Proc* 4, 345.
- Bach JF y Dardenne M (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications*. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York, pp 593-613.
- Becu-Villalobos D y Lacau-Mengido IM (1989). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 40, 1-17.
- Bellanti JA (1986). *Inmunología*. 3a ed. Interamericana. México. 662 pp.
- 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.
- Calzolari A (1898). Recherches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch ital Biol Torini* 30, 71-77.
- Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Melendez G, Rodríguez JO, Chavira R, Dominguez R (2006). The role muscarinic systemic in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive biology and Endocrinology* 4:43.
- Dardenne M y Bach JF (1981). Thymic hormones. En: *The thymus gland*. M Kendall Ed, Academic Press, New York 113-131 pp.
- Dardenne M, J. M. Pléu, J. Y. Blouquit y J. F. Bach. (1980). Characterization of factor thymique sérique (FTS) in the thymus. *Clin. Exp. Immunol* 42, 477-482.
- Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J y Bach JF (1982). Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 5370-5373.
- Dardenne M, Savino W y Bach JF (1988). Modulation of thymic endocrine function by thyroid and steroid hormones. *Int J Neurosci* 39, 325-334.

- Dardenne M, Savino W, Berrih S y Bach JF (1985). A zinc-dependent epitope on the molecule of thymulin, a thymic hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7035-7038.
- Dardenne M, Savino W, Gastinel L y Bach JF (1984). Thymulin. New biochemical aspects. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications*. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York, pp 37-42.
- Devorshak-Harvey E, Peluso JJ, Bona-Gallo A, Gallo RV (1985). Effect of Alterations in pulsatile Luteinizing Hormone Release on Ovarian Follicular Atresia and Steroid Secretion on Diestrus 1 in the Rat Estrous Cycle. *Biology of Reproduction* 33. 103-111.
- Domínguez R, Chávez R y Cruz ME (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. R Domínguez Ed, PUIS-UNAM, MA Porrúa, México, 161-192.
- Everett JW (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, 1509-1526 pp.
- 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, 12ª edición. México. 522-532, 915 p.p.
- Feder H (1981). Estrous cyclicity in mammals En: *Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior*. N.T. Adler Ed., Plenum Press, New York, pp 279-333.
- Fink G (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci Prog Oxf* 70, 403-423.
- Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2008). The acute effects bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproductive biology and Endocrinology* 6:48.
- Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Chavira R, Dominguez R, Cruz ME (2005). The Participation of the Cholinergic System in Regulating Progesterone Secretion Through the Ovarian-Adrenal Crosstalk Varies Along the Estrous Cycle. *Endocrine*, 28(2).

- Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Melendez G, Barco AI, Chavira R, Cruz ME, Dominguez R (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the Cholinergic system. *Reproductive biology and Endocrinology* 4:11.
- Folch H, Eller G, Mena M, Esquivel P (1986). Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of FTS level. *Cell Immunol.* 102, 211-6.
- Fox SR, Smith MS (1985). Changes in the Pulsatile Pattern of Luteinizing Hormone Secretion during the Rat Estrous Cycle. *Endocrinology* 116 (4) 1485-1492.
- 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.
- Gastinel LN, Dardenne M, Pléau JM, Bach JF (1984). Studies on the zinc binding site to the serum rhymic factor. *Biochim Biophys Acta*, 797, 147-155.
- Geneser F (2000). Histología sobre bases biomoleculares. Editorial Médica Panamericana, 3ª edición. España. 421-425, 581-586 p.p.
- Gilfillan C y Robertson, DM (1999). Follistatin En: *Encyclopedia of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, Vol II, Academic Press, San Diego, pp 396-406.
- Goldfien A y Monroe S (1988). Ovarios. En: *Endocrinología básica y clínica*. Eds. Greenspan F S y Forsham P H. El manual moderno. México. 379-425 pp.
- Goldstein AL (1984). Thymic Hormones and Lymphokines. *Basic Chemistry and Clinical Applications*. Plenum Press, New York, pp 669.
- Goldstein AL, Low TLK, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu S-K, Naylor PB y McClure JE (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog Horm Res* 37, 369-415.



- Gore-Langton, R.E., y Armstrong, D.T (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y J.D. Neill Eds., 2a de., Vol I, Raven Press, New York, p.p. 571-627.
- Goya RG, Brown OA, Pléau JM, Daerdenne M. (2004). Thymulin and the neuroendocrine system. *Elsevier*, 25, 139-142.
- Greenwald GS y Roy SK (1994). Follicular development and its control. En: *The physiology of reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. 2ª ed. Raven Press, New York, 629-721o 724.
- Grossman CJ (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227, 257-261.
- Hadley AJ, Rantle CM y Buckingham JC. (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 4, 62-69.
- Hall NRS, O'Grady MP y Menzies RA (1992). Thymic regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Int J Immunopharmac* 14, 353-359.
- Ham A W, (1975). *Tratado de Histología*. Interamericana. 6ta edición. México, 328-340.
- Harrinson RJ. Weir BJ. (1977) Structure of the mammalian ovary. En: *The ovey*. Zuckerman, L Y Weir BJ, Eds. Academic Press, New York, 113.
- Hiller, SG (1994). Hormonal control of folliculogenesis and luteinization function. En: *Molecular biology of the famele reproductive system*. Edited by Fidlay JK. Academic Press, Inc., New York, 1-13 pp.
- Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R, y Rosas P (1999). Effects of the thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothymic mice. *J Endocrinol* 163, 255-260.
- 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.
- Kim C-Y, Ryu JH, Maeyama K, Wakabayashi K, Watanabe T, Nobunaga T y Satoh H (1996). The brain histamine (HA) and pituitary luteinizing hormone (LH) levels in female rats anesthetized with ether on proestrus. *Exp Anim* 45, 175-177.
- Kim C-Y, Wakabayashi K y Nobunaga T (1994). Time-dependent ovulation-

- blocking effect of ether anesthesia differs from pentobarbital in rats. *Tohoku J Exp Med* 172, 237-242
- Kul H, Gross M, Schneider M, Webwe W, Mehlis W, Stegmuller M y Taubert HD (1983). The effect of sex steroids and hormonal contraceptives upon thymus and spleen on intact female rats. *Contraception*, Dec. 28(6): 587-601.
  - Ledwitz-Rigby F y Scheid PG (1990). Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulose cell responsiveness to gonadotropins in vitro VIII. Ovarian Workshop. Regulatory process and gene expression in the ovary, 473 - 478.
  - Leeson CR y Leeson, TS (1990). *Histología*. 4ª edición. Interamericana, México. 602 pp.
  - Low TLK y Goldstein AL (1984). Thymosins: structure, function and therapeutic applications. En *Thimic Hormones and lymphokines*. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York 6, 21-38 .
  - Martin GG, Sack M, Talbot P (1981). Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of golden hamster. *The Anatomical record*, 201(3): 485-98.
  - 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.
  - Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR (1984). Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J. Reprod. Fert.* 70, 243-253.
  - Nishizuka 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.
  - Ojeda SR y Urbanski HF. (1994). Puberty in the rat. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. 2ª ed. New York: Raven Press, 363-409 pp.
  - Ojeda. S., Urbanski, H. y Ahmed C. (1986). The onset of Female Puberty: Studies in the Rat. *Rec. Proc. Horm. Res.* 42, 385-442.
  - Palkovits M. (2000). Micro- and macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En: *Neuroendocrinology in Physiology and*

- Medicine. PM Conn y ME Freeman Eds, Humana Press, New Jersey, 23-40 pp.
- Pedermera E (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: Comunicación Neuroendócrina Bases Celulares y Moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp 33-46.
  - Peters H. (1978). Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrates ovary. Comparative Biology. R.E. Jones De., New York, Plenum Press, p.p. 151-144.
  - Pléau JM, Dardene M y Bach JF. (1981). The serum thymic factor (FTS). *Mol. Cell. Biochem.* 41, 67-72.
  - Pléau J-M, Fuentes V, Morgat J-L y Bach J-F (1980). Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2861-2865.
  - Ramírez VD. (1973). Endocrinology of puberty. En: Handbook of physiology. American Physiological Society. Washington DC, 1-29 pp.
  - Rebar RW, Miyake A, Low TLK y Goldstein AL (1981). 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.
  - Roitt IM, Brostoff J, Male D. (1993). Inmunología. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana, 8ª edición. Argentina. 251 p.p.
  - Rosas P. Rosas P, Velásquez D, Morales L y García L. (2006). La timulina inyectada en el hipotálamo y en la hipófisis estimula el desarrollo folicular de los ovarios del ratón tratado con eCG. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas C-287.
  - Roser JF (1999). Equine Chorionic Gonadotropin. En: Encyclopedia of Reproduction Vol 2, Knobil E y Neill JD Eds. USA: Academic Press, 29-37 pp.
  - Ross MH, Kaye GI y Pawlina W (2005). Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. 4ª ed, Médica Panamericana, Argentina, pp 380-384, 644-655.
  
  - Sadler TW. (2004). Embriología médica. 7ª edición. Médica Panamericana, México D.F. 11-25.
  - Safieh-Garabedian B, Jalakhian RH, Saadé NE, Haddad JJ, Jabbur SJ y

- Kanaan SA (1996). Thymulin reduces hyperalgesia induced by peripheral endotoxin injection in rats and mice. *Brain Res* 717, 179-183.
- Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Jalakhian RH, Poole S, Jabbur SJ y Saadé NE (1997a). Hyperalgesia induced by low doses of thymulin injections: possible involvement of prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Neuroimmunol* 73, 162-168.
  - Savino W, Dardenne M, Papiernik M y Bach JF (1982). Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *J Exp Med* 156, 628-633.
  - Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S y Dardenne M (1984). Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels *in vivo* can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* 55, 629-635.
  - Schwall RH (1999). Activin and receptors. En: *Encyclopedia of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, Vol I, Academic Press, San Diego, pp 26-34.
  - Schwall RH (1999). Inhibin. En: *Encyclopedia of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, Vol II, Academic Press, San Diego, pp 832-839
  - Silverman A-J, Livne I y Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2<sup>o</sup> ed, Vol I, Raven Press, New York, 1683-1709 pp.
  - Snell R. S. (1999). *Neuroanatomía clínica*. 4ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 481-486 p.p.
  - Tresguerres J. A. F. (2003). *Fisiología Humana*. 2ed. Interamericana de España. 1037-1047 pp.
  - Van-Voorhis BJ (1999). Follicular development. En: *Encyclopedia of Reproduction* Vol 2, Knobil E y Neill JD Eds. USA: Academic Press, 376-389 pp.
  - Villavicencio J y Domínguez R (1993). Differences in follicular growth and atresia induced by gonadotrophin stimulation in pre-pubertal rats are age-dependent. *Med Sci Res* 21, 361-362.
  - Wise T (1998). *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular

- steroid synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 66, 129-135.
- Yao H y Bahr J (1999). Ovary, Overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 3. E Knobil y JD Neill Eds. Academic Press, New York. 590-596.
  - 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 perifused with thymic extracts. *Thymus* 12, 253-264.
  - Zeleznic AJ (1999). Luteinization. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 3. E Knobil y JD Neill Eds. Academic Press, New York. 1076-1083.