



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

*Biología
B0639/89
E.3*

**EL MEDIO CONDICIONADO DE CULTIVO DE CELULAS
EPITELIALES DE TIMO MODULA LA RESPUESTA A LA
HCG EN LAS CELULAS DE TESTICULOS DE RATA**

T E S I S

que presenta
DOLORES MARTIN TAPIA
para obtener el grado de
LICENCIADA EN BIOLOGIA



México, D. F. 1989



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.

Con mucho cariño:

a la vida y a mi dios, por darme la oportunidad de vivir y ser feliz.

a mi compañero y amigo: Mario Alberto.

a mis padres: Yolanda y Marcelo.

a mis hermanos: Mireya, Guadalupe, Laura y Lourdes.

a mi querida abuela: María de Jesús
(en memoria).

a la Sra. María Luisa, la Sra. Margarita,
al Sr. Bernardo y al Lic. Zertuche.

a mis amigos: Jorge (en memoria), Berna,
Ruth, Juan Carlos, Rosa, Chen, Malú,
Paty e Ivonne.

a mis compañeros de laboratorio, quienes me
han apoyado y dado su cariño durante
estos años de trabajo: Caro, Mercedes,
Graciela, Adriana, Aida, Jorge, Jesús
y Armando.

Mis Agradecimientos:

muy especialmente a la Dra. Marta Romano, quien con cariño y dedicación me brindó su apoyo, su tiempo y su experiencia para hacer posible la realización de este trabajo de tesis.

a el Dr. Eugenio Frixione Garduño y al Maestro Ricardo Mondragón, quienes valiosamente colaboraron con la parte de Microscopía Electrónica.

a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme apoyo económico durante la realización de este trabajo.

a el Sr. Carlos Rivera y al Sr. Rubén Paniagua, quienes colaboraron con el trabajo de dibujo y fotografía.

a mis sinodales: Bertha Hashimoto, Martha Salcedo, Martín Palomar y Martín Martínez por haber revisado y dar su voto aprobatorio de la tesis presentada.

Abreviaturas

ACTH	Hormona Adrenocoticotrópica
LHRH	Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante
LH	Hormona Luteinizante
hCG	Gonadotropina Coriónica humana
FSH	Hormona Folículo Estimulante
CRF	Factor Liderador de Corticotropina
GH	Hormona de Crecimiento
^{125}I -hCG	Gonadotropina Coriónica humana radiactiva
DMEM	Medio Mínimo Escencial Duldecco
MCT	Medio Condicionado de Timo
MCP	Medio Condicionado de Piel

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
1.1.	Descripción del Timo.....	2
1.1.1.	Desarrollo Embrionario del Timo.....	4
1.1.2.	Histología del Timo.....	5
1.1.3.	Células Epteliales del Timo y su Clasificación.....	8
1.2.	Función del Timo en el Sistema Inmune.....	12
1.2.1.	Inmunidad.....	13
1.2.2.	Los linfocitos.....	14
1.2.3.	Interacción Linfo-Epitelial del Timo.....	16
1.2.4.	Hormonas y Factores Tímicos.....	17
1.2.5.	Involución Tímica.....	20
1.3.	Interacción Neuro-Inmuno-Endócrina.....	21
1.3.1.	Interacción del Timo con las Gónadas.....	24
1.3.2.	Interacción del Timo con Otros Organos Endócrinos.....	30
1.4.	Estructura y Fución Testicular.....	31
1.4.1.	Organización Celular del Testículo.....	32
1.4.2.	Hormonas que Regulan la Función Testicular.....	33
1.4.3.	Mecanismo de Acción General de las Gonadotropinas...36	
1.4.4.	Síntesis de Testosterona.....	36
1.5.	Cultivos de Tejidos y Células.....	39
1.5.1.	Tipos de Cultivos.....	39
1.5.2.	Medios de Cultivo.....	41

1.5.3. Sustratos de Cultivo.....	42
2. HIPOTESIS.....	44
3. OBJETIVOS.....	45
4. METODOLOGIA.....	47
4.1. Cultivo Primario de Células de Timo de Rata.....	47
4.2. Microscopía Electrónica de Células de Timo.....	48
4.3. Bioensayo de Células de Testículo con MCT y MCP.....	49
4.4. Efecto de Diferentes Dosis del MCT sobre las Células de Testículo.....	50
4.5. Determinación de Testosterona.....	51
4.6. Células de Timo Tratadas con Testosterona Durante el Cultivo.....	52
4.7. Análisis Estadístico.....	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Cultivos de Timo y Piel de 7 y 15 días.....	54
5.2. Microscopía Electrónica de las Células de Timo.....	57
5.3. Efecto del MCT sobre la producción de Testosterona de las células de Testículo.....	60
5.4. Curva Dosis-Respuesta.....	63
5.5. Efecto de la Testosterona sobre las Monocapas de Células Epiteliales de Timo.....	63
6. DISCUSION.....	67

7.	CONCLUSIONES.....	72
8.	BIBLIOGRAFIA.....	73
9.	Glosario de palabras clave.....	85

El timo es un órgano linfoepitelial perteneciente al sistema inmune; en él se lleva a cabo la maduración de los linfocitos T responsables de la inmunidad celular en los vertebrados. Este órgano secreta varios tipos de hormonas y factores que intervienen en la regulación tanto de la inmunidad celular como de la humoral.

Desde el punto de vista anatómico, el timo es conocido desde hace muchos años, pero es hasta finales del siglo pasado y principios del presente cuando se comenzó a estudiar su función y estructura celular durante el desarrollo: los cambios que sufre durante las etapas prepuberal, puberal y adulta; así como también las influencias que ejercen las hormonas sobre su funcionamiento.

Actualmente son tema de gran interés las interacciones que guardan el Sistema Nervioso Central (SNC), el Sistema Endócrino y el Sistema Inmune. El alto grado de versatilidad de éstos sistemas, sugiere que existe una red compleja de diferentes tipos celulares y estructuras capaces de emitir y reconocer señales en forma bidireccional.

En los últimos años se ha estudiado la influencia del timo sobre algunas glándulas endócrinas como la tiroides, corteza adrenal y las gónadas: cuando se extirpa el timo en los primeros días de vida posnatal, posteriormente se presentan cambios degenerativos en éstos órganos, pero si se administran extractos tímicos o se hacen injertos de timo, casi inmediatos después de la extirpación, se observa reversibilidad de los

cambios, (para revisión ver Trainin, 1974).

También se ha encontrado que las hormonas esteroides producidas por la corteza suprarrenal y gonadas, intervienen en el proceso de involución del timo: la involución provocada por las hormonas puede ser de tipo gradual o aguda, dependiendo de las concentraciones de hormonas esteroides utilizadas y del tiempo de exposición (Trainin, 1974).

La influencia de las hormonas sobre la involución del timo no ha sido completamente estudiada y aún es escasamente comprendida, por lo que no se han podido establecer claramente cuales son los mecanismos generales por los que se lleva a cabo la misma conforme avanza la edad. Las evidencias que se tiene hasta el momento son: que las hormonas sexuales producen involución tímica en los animales, también que los extractos de placenta y la orina de mujer embarazada inducen atrofia tímica en las ratas. Por otra parte, cuando se administran gonadotropinas a ratas castradas no se observa el fenómeno de involución aguda del timo, mientras que en las no castradas el timo se presenta severos daños con disminución de la corteza y abundancia de macrófagos (Dougherty, 1952).

1.1. Descripción del Timo.

En la mayoría de los mamíferos el timo se encuentra en la parte superior del tórax: en el caso de la rata se encuentra inmediatamente arriba del corazón y en el humano se encuentra detrás del esternón (Fig.1). Es una masa de tejido color rosado grisáceo bilobulada con una apariencia

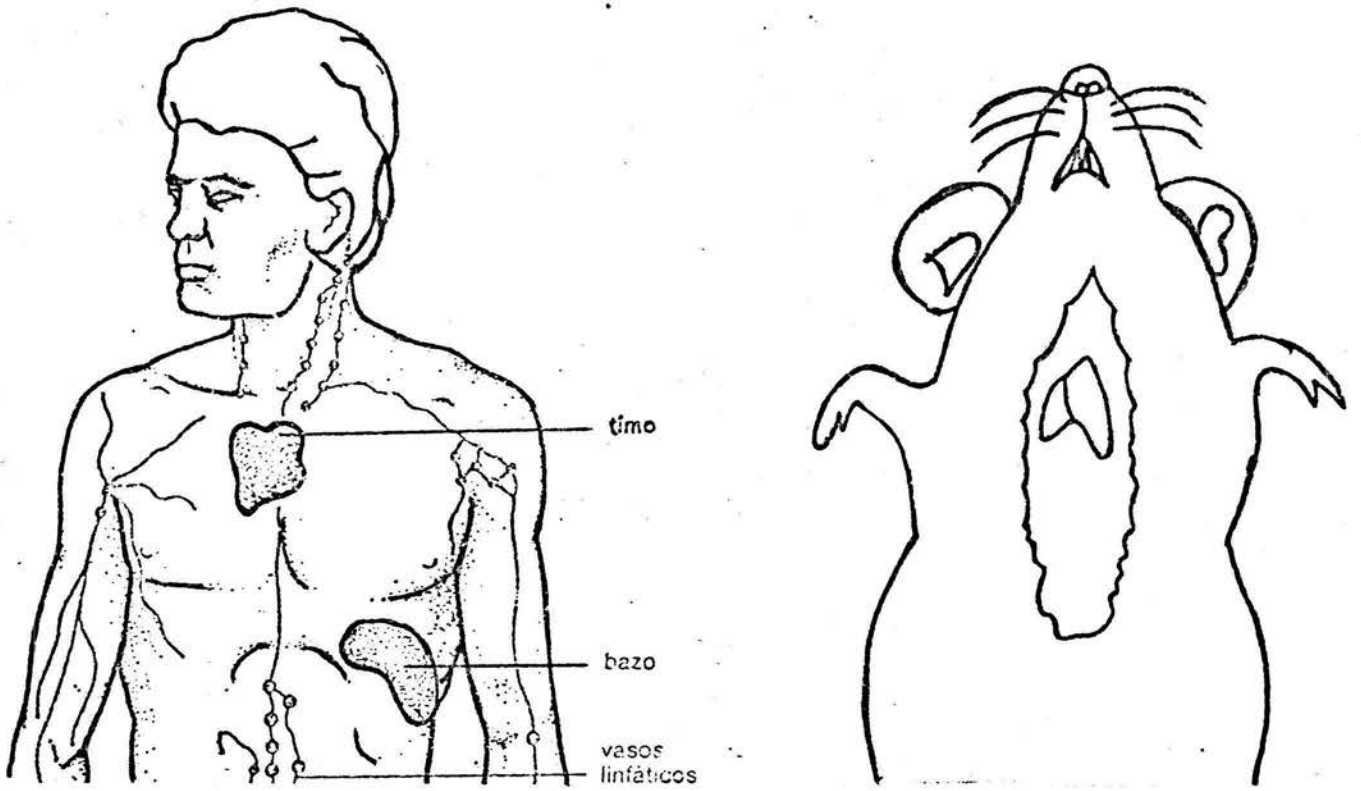


Fig.1. Esquema de la localización del timo en el humano y en la rata.

triangular semiaplanada (Ham, 1975).

1.1.1. Desarrollo Embrionario.

El timo se origina embriológicamente, a partir de la tercera bolsa faríngea del intestino primitivo, como resultado del crecimiento de células epiteliales de origen endodérmico. El epitelio dorsal de la tercera bolsa se convierte por diferenciación en tejido paratiroideo, mientras que el epitelio de la región ventral forma el primordio del timo (Langman, 1976). A medida que prosigue el desarrollo los tejidos tímicos y paratiroideos se separan de la pared faríngea, y en el caso del timo, éste migra en dirección caudal hasta alcanzar su sitio definitivo en el tórax (Ham, 1975 y Langman, 1976).

Las células epiteliales que forman el timo proliferan hacia fuera formando ramos laterales, los cuales serán los lóbulos del timo. Pueden existir algunas variaciones en cuanto al desarrollo del timo, éstas dependen de la especie y de los patrones genéticos, pero en general la secuencia y contribución celular es semejante.

Una vez formado el timo, dentro de él comienzan a cambiar las disposiciones de las células epiteliales: unas se distribuyen en grupos pequeños alrededor de un punto formando una especie de esferas llamadas "corpúsculos de Hassall"; otras se distribuyen de manera más o menos densa y tienden a separarse manteniéndose conectadas por desmosomas, estableciendo una estructura tridimensional sólida pero porosa, esta forma poco común de las células epiteliales fue la razón para que se

les diera el nombre de "Células Reticuloepiteliales del Timo" (Ham, 1975). La capa que rodea los primordios epiteliales del timo es de origen mesenquimal y penetra a lo largo de los vasos sanguíneos. Las células linfoides aparecen un poco más tarde en el desarrollo, cuando provenientes del sistema sanguíneo, penetran a los primordios epiteliales, donde proliferan y se diferencian.

1.1.2. Histología del Timo

Anteriormente se mencionó que el timo está conformado por dos lóbulos que se encuentran encapsulados por una capa de tejido conectivo. Esta capa se extiende hacia el interior del órgano formando tabiques y dividiendo ambos lóbulos en lobulillos incompletos. Los tabiques aunque penetran con cierta profundidad, no separan por completo al tejido tímico, ya que existen comunicaciones entre los lobulillos en las partes centrales (Ham, 1975).

Desde el punto de vista histológico, se divide al timo en dos zonas: la corteza y la médula. La corteza se divide a su vez, en dos subzonas: la corteza externa y la corteza profunda. En cada subzona se distinguen diferentes tipos celulares (Fig.2). La corteza se encuentra densamente poblada de linfocitos en diferentes pasos de maduración, envueltos en una trama de células reticuloepiteliales. Hacia el interior, en la zona medular, son más evidentes las células reticulares, células dendríticas y las células epiteliales; hay muy pocos linfocitos y algunos corpusculos de Hassall aislados (Ham, 1975; Windle, 1977; y Roitt,



Fig.2. Estructura general del timo. Hacia el centro en las zonas claras de cada lobulillo se encuentra la médula y las zonas oscuras corresponden a la corteza (fotografía tomada de Ham, 1975).

1984).

En la corteza es donde se lleva a cabo la mayor actividad de diferenciación linfocítica, en particular durante la etapa fetal y postnatal temprana. En ésta parte se crea un microambiente de interacciones celulares, que conjuntamente realizan una "simbiosis linfoepitelial" entre las células epiteliales y las linfoides, para hacer posible la maduración de los linfocitos T (Trainin, 1974; y Nabarra y Adrianarison, 1987).

En la corteza se encuentran grupos de células epiteliales, unidas entre sí por prolongaciones exoplásmicas largas, a través de desmosomas, formando redes en cuyos huecos existen una gran cantidad de linfocitos (Hoshino 1963). En el timo no existen centros germinativos de células linfoides; lo que sucede es que las células o linfocitos provienen de otra parte (médula ósea para los adultos o del hígado en el caso del feto) y llegan al timo a través del torrente sanguíneo (Trainin, 1974).

En la médula del timo se encuentra la mayor parte de la células epiteliales menor número de linfocitos y una cantidad considerable de macrófagos y células interdigitales. Los contactos entre las células epiteliales en la zona de la médula del timo son más cortos y estrechos que en la corteza (Hoshino, 1963). En la médula se encuentran diferentes tipos de células epiteliales, algunas se encuentran asociadas entre sí formando estructuras especializadas y otras son células epiteliales típicas.

Existen otros tipos de células que forman parte del timo y que han sido observadas en asociación con el tejido epitelial. Estas son las células

reticulares no epiteliales, células vasculares endoteliales, fibroblastos y tejido conectivo, algunos mioblastos y células nerviosas, así como también células polinucleares y mastocitos (Nabarra y Adrianarison, 1987).

1.1.3. Células Epiteliales del Timo

Las células epiteliales se caracterizan principalmente por 2 aspectos morfológicos: uno es la presencia de tonofilamentos de queratinas y la otra es la formación de desmosomas entre célula y célula.

Desde hace años se han hecho un gran número de trabajos histológicos acerca de la caracterización del timo, pero muchas de éstas investigaciones difieren en la nomenclatura, y en algunos casos los datos son contradictorios unos con otros. Actualmente Nabarra (1987), ha presentado una revisión minuciosa acerca de los tipos celulares que forman el timo, en la cual se ha tenido en cuenta los trabajos realizados por los autores más importantes, y ha propuesto la siguiente clasificación:

a). Células Epiteliales Clásicas ó del Tipo I.

Son células que se encuentran localizadas en ambas zonas, cortical y medular (Fig.3). Muchos autores se refieren a ellas llamándolas reticulo-epiteliales, son células elongadas que poseen largos pseudópodos, los que comunican unas con otras formando una red tridimensional. Su núcleo es grande y ovalado, en el citoplasma son

claros los haces de tonofilamentos y se presentan 3 o 4 vacuolas pequeñas, las cuales se cree que tienen función secretora. Se ha mencionado que el tamaño y número de vacuolas varía de acuerdo a la edad y a los estímulos hormonales que se llevan a cabo dentro del organismo.

b). Células Epiteliales Alveolares del Tipo II.

Se establecen únicamente en la médula, son globulares y más voluminosas que las epiteliales clásicas (Fig.3). Su núcleo es claro con cierta acumulación de la cromatina; el citoplasma es moderadamente rico en tonofilamentos. Estas células se caracterizan por tener en el citoplasma una extensa red de vacuolas medianas que forman saculos más o menos dilatados que son modificaciones del Aparato de Golgi. Se cree que estas vacuolas están relacionadas con algún mecanismo de almacenamiento o secreción, aunque algunas veces se observan desocupadas y otras con algunas sustancias distribuidas en su interior. Presentan una apariencia de laberinto, por lo que se cree que pueden representar un sistema de canalización que podría hacer contacto con el medio externo.

c). Células Epiteliales con Cavidad Intracitoplasmática de Tipo III.

Son células raras, encontradas en la médula que contienen una, o a veces dos cavidades de forma oval bastante extendidas (Fig.3). Su citoplasma es más denso que las células descritas anteriormente, y la cavidad ocupa casi todo el citoplasma. El lumen de esta cavidad se encuentra rodeado por cilios o por una orilla parecida a un cepillo. Algunos autores

opinan que su número y tamaño disminuye paralelamente con la secreción de hormonas tímicas.

d). Estructuras del timo en las que participan las Células Epiteliales.

Las células epiteliales pueden estar unidas con otros tipos celulares para formar grupos específicos. Estas asociaciones célula-célula forman principalmente en el timo dos estructuras: unas las cavidades quísticas, de forma más o menos elongada con ramificaciones; y la segunda asociación da lugar a los corpúsculos de Hassall formados por agrupaciones celulares con arreglos concéntricos (Fig.3).

Las cavidades quísticas, son cavidades extracelulares, que habían sido descritas en los trabajos de microscopía de luz desde hace muchos años, pero en los trabajos realizados más recientemente han sido casi olvidadas. Se encuentran en la médula del timo y son altamente desarrolladas en los murinos. Están formadas por células reticulares que se orientan alrededor, dando una apariencia pseudotubular. Las células epiteliales que rodean estas estructuras tienen continuidad con la red tímica, exhiben una polaridad definida y presentan a su alrededor tonofilamentos. Su función hasta el momento no ha sido explicada convincentemente, pero se cree que sirven como indicador en la trayectoria de los linfocitos entre las dos zonas del timo, durante los procesos de maduración. También se ha observado, en timos de humano y ratón con enfermedades patológicas y stress, que estas cavidades secretan sustancias mucosas (Herny (1966) y Cordier (1974), citados por

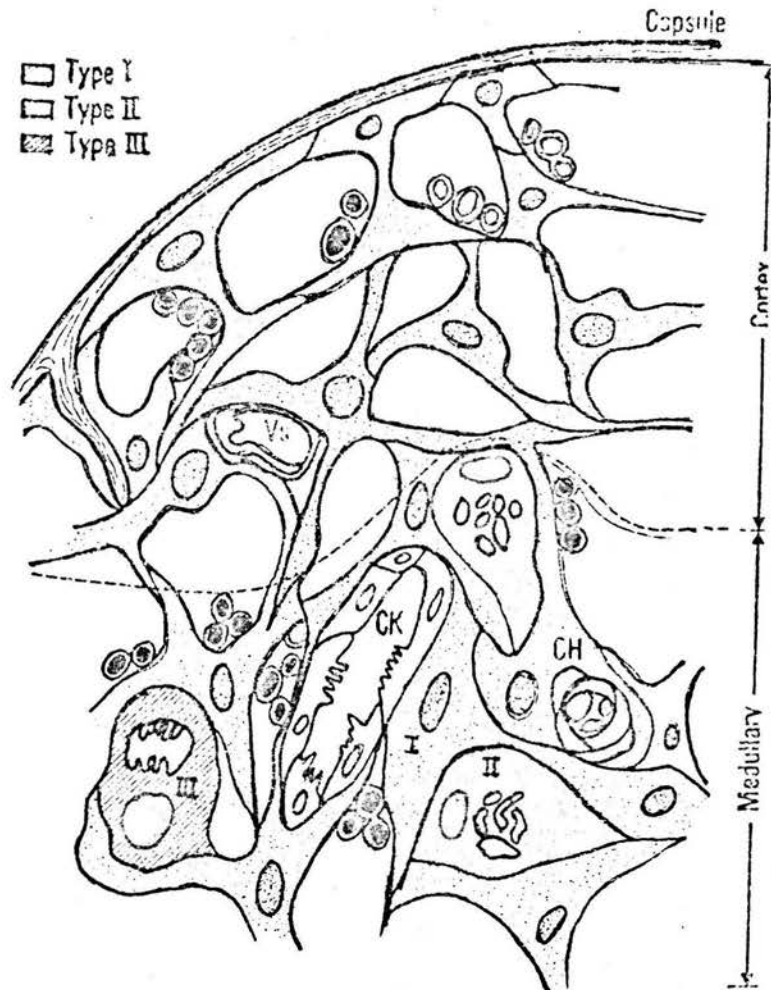


Fig.3. Representación esquemática de los tipos de células epiteliales que se encuentran en el timo y de las estructuras especializadas como cavidades quísticas (CK) y corpúsculos de Hassall's (CH) características de este órgano (tomada de Nabarra, 1987).

Nabarra, 1987).

Los corpúsculos de Hassall son estructuras que se encuentran en la médula del timo. Estas estructuras son muy abundantes en el timo de los murinos, pero en otras especies no son muy frecuentes. Los corpúsculos están formados por un centro más o menos denso, encerrado por un número considerable de células epiteliales unidas por desmosomas. El centro está formado por una o varias células necróticas, sus núcleos tienen una apariencia picnótica y presentan acúmulos de cromatina; el citoplasma contiene numerosas agrupaciones de queratina. Las células que encierran el núcleo central, tienen distintos arreglos de tonofilamentos que se presentan en numerosas agrupaciones de capas concéntricas alrededor del núcleo. También se han observado a éste nivel algunos linfocitos y células polinucleares en proceso de degeneración. Por todo esto se cree que los corpúsculos de Hassall representan el cementerio del timo. La función y el origen de los corpúsculos de Hassall aún están sujetos a investigación y existen acaloradas controversias al respecto. Sin embargo es generalmente aceptado que son estructuras de naturaleza epitelial. Las radiaciones y el alto nivel de los corticosteroides aumentan su cantidad y también su complejidad estructural parece estar muy ligada a ciertas modificaciones inmunológicas (Blau JN (1967 y 1968), Jaroslow B.(1967); citados por Nabarra, 1987).

1.2. Función del Timo en el Sistema Inmune

1.2.1. Inmunidad.

La inmunidad está relacionada con el reconocimiento y la eliminación de todo material extraño o no propio que pueda penetrar en el organismo, ya sea una infección patógena o un injerto benéfico. La inmunología estudia a los órganos, células y moléculas responsables de estos procesos de reconocimiento y eliminación; la manera como estos elementos reaccionan e interaccionan entre sí; las consecuencias benéficas o indeseables de su actividad; y por último, los mecanismos involucrados para que estas actividades pueda ser aumentadas o disminuidas en beneficio propio, (Playfair, 1983).

El sistema inmune puede ser subdividido en sistema inmune "no específico" (también conocido como sistema innato o natural), y el sistema inmune específico (conocido como sistema inmune adquirido). El no específico comprende todas las reacciones que no son antígeno-dependientes; mientras que en las reacciones del sistema inmune específico están involucradas las células T, las células B y los anticuerpos: todos ellos funcionan por un mecanismo antígeno-dependiente.

La inmunidad adquirida está basada en las propiedades especiales de los linfocitos, los cuales pueden responder selectivamente a diferentes antígenos o moléculas extrañas; además tienen la capacidad de originar una memoria específica y un patrón de respuesta adaptativa. En la mayoría de las ocasiones se ejercen interacciones entre los anticuerpos con el complemento y las células fagocíticas; e interacciones de los linfocitos T con los macrófagos para dar una respuesta inmunológica más eficaz ante un agente extraño.

Los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inmune, ya que tienen la capacidad de fagocitar a las células extrañas, procesarlas y exponer los determinantes antigénicos a los linfocitos T, los que a su vez estimulan la formación de clonas de células B y T, para activar y potenciar la respuesta inmune contra las estructuras que contienen los antígenos, (Roitt, 1984).

1.2.2. Los Linfocitos

Los linfocitos son células pequeñas de forma esférica en la mayoría de las especies; son relativamente inactivos metabólicamente en condiciones normales ya que no presentan división celular y su principal característica es que encuentran circulando continuamente en el cuerpo a través del torrente sanguíneo. Bajo estimulación apropiada con un antígeno, los linfocitos pequeños se transforman en células grandes, y activan su división celular. Este fenómeno indica que en esos momentos hay una intensa actividad metabólica.

Los linfocitos se clasifican en dos tipos: los "B" y los "T", los cuales tienen distintas funciones. Los B son células productoras de anticuerpos que se liberan a la sangre y son los responsables de la inmunidad humoral. Los linfocitos T son células "sensibilizadoras", timo-dependientes, responsables de la inmunidad celular y en parte también participan en la regulación de la inmunidad humoral (Alastair, 1978 y Roitt, 1984).

La existencia de una célula tronco o célula madre (originada en la

médula ósea) como precursora de los linfocitos, ha sido un tema muy discutido y en la actualidad se ha demostrado su existencia por medio de transferencias celulares y análisis cromosomales en ratones irradiados.

A diferencia de otras células hematopoyéticas, los linfocitos sólo se dividen cuando son estimulados con algún antígeno, y la propagación de clonas requiere de la exposición repetida al antígeno, seguida de un proceso de selección específica.

En los mamíferos los linfocitos de la clase B completan su maduración en la médula ósea, y los de la clase T sufren posteriormente diferenciación en el timo.

La célula madre, una vez que ha migrado al timo se dividirá repetidamente y dará como resultado pequeños linfocitos del tipo T. Los timocitos al madurar, adquieren una especialización que determina el papel que desempeñarán en la respuesta inmune. Se describen generalmente tres poblaciones de linfocitos T: los citotóxicos, los coadyuvantes y los supresores, (Tonegawa, 1985). Pero desde el punto de vista funcional se tienen 5 tipos de linfocitos T: citotóxicos (Tc) que eliminan directamente a las células extrañas; de la hipersensibilidad tardía (Td); coadyuvantes que son a su vez de dos tipos: los Th que ayudan a la diferenciación y proliferación de los linfocitos B, y los Ta que amplifican la diferenciación y proliferación de los Tc; y por último, se encuentran los linfocitos T supresores (Ts) que suprimen la respuesta inmune. Todas las interacciones que realizan los linfocitos T se llevan a cabo por interacciones célula-célula; en cambio los linfocitos B actúan produciendo anticuerpos que se exportan a la

circulación. Una vez que han madurado, los linfocitos T dejan el timo y se dirigen a su sitio de acción dentro del sistema inmune, además de que una parte de ellos también circula en el torrente sanguíneo, (Khan, 1978).

1.2.3. Interacción Linfo-Epitelial del Tímo

Los linfocitos T muestran ciertas características de acuerdo al micro-ambiente del timo en el que se han diferenciado. Se ha demostrado por medio de técnicas de inmunofluorescencia, que los sitios donde existen células epiteliales, macrófagos y células interdigitales, poseen patrones que determinan la selección, proliferación y diferenciación de los timocitos (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981).

Maximov (1908-1912: citado por Trainin, 1974), realizó algunos estudios histológicos y observó que existe una interacción muy estrecha entre las células epiteliales y las células linfoides del timo, las que de alguna manera, interactúan unas con otras y ellas mismas estimulan su proliferación y diferenciación.

Con la base de estos trabajos, Jolly (1913-1932: citado por Dougherty, 1952) después de varios años de experimentación, elabora el concepto de "simbiosis linfoepitelial para referirse al mecanismo de maduración en el que están involucrados el timo y las células linfoides.

1.2.4. Hormonas y Factores Tímicos.

A partir de 1949, Abraham White, conocido como el padre de la endocrinología tímica, es el primero en declarar la vital importancia del timo en la regulación inmunológica.

El timo es considerado como una glándula endócrina, ya que en él se sintetizan muchos y diferentes productos parecidos a las hormonas, que son encontrados en el mismo timo y en el plasma. Estas sustancias tienen diferentes estructuras químicas y presentan actividad biológica, (Pierpaoli y Sorokin, 1972; y Goldstein, 1984). En experimentos con cámaras con perfusión, se ha demostrado que las sustancias difundidas por el tejido del timo pueden restaurar las funciones inmunes en ratones timectomizados y atímicos: con esto se demuestra que existen factores humorales que son secretados por las células del timo íntegro (Khan, 1978), y también por las células de timo cultivadas in vitro, (Kruisbeek y cols., 1977).

Generalmente se consideran a las células epiteliales, del timo, como las encargadas de la producción de tales factores inmunológicos.

Se ha observado en timocitos de rata, que cuando éstos se incuban junto con monocapas de células epiteliales de timo, exhiben un incremento de la síntesis de proteínas, medida mediante la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente, y en presencia de mitógenos. También se ha visto en estos casos un incremento de las células T coadyuvantes (Kruisbeek, 1977). Esta misma inducción en los linfocitos se ha observado en presencia de monocapas de células epiteliales de timos humanos (Willis-Carr y cols., 1978), y también

cuando se exponen los linfocitos de ratones atímicos (nu/nu) a monocapas de timos de sus parientes normales (Sato y cols., 1976).

Varios de éstos factores han sido ya aislados, semipurificados y algunos caracterizados, con la finalidad de estudiar la relación que guardan con el sistema inmune y con otros órganos. Los factores y hormonas tímicas hasta ahora descritos, se muestran en la tabla 1 así como algunos aspectos relacionados con su actividad biológica.

Goldstein y colaboradores desde principios de los 60's, han venido realizando experimentos en donde proponen la existencia de factores tímicos de tipo no celular, llamados inicialmente "fracción 5 de timosina". Cuando se administra la fracción 5 a ratones previamente irradiados, les induce una potente estimulación en la regeneración del tejido linfoide (Goldstein, 1984); así como también aumenta la proporción de recuperación de las células inmunocompetentes del timo en diferentes razas de ratones, (Neta y cols., 1985). Posteriormente Goldstein y su grupo realizaron trabajos más finos y detallados con las timosinas para lograr su purificación, localización dentro del timo y su caracterización química. Por ejemplo indican que la timosina Alfa-1, se localiza en la parte cortical y medular del timo: pero la timosina que se encuentra en la médula desaparece después de los 13 años de edad; mientras que la de la zona cortical persiste durante toda la vida (Hirokawa y cols., 1982), y la presencia de las timosinas y otros factores tímicos en el organismo, van disminuyendo conforme avanza la edad, y en la mayoría de los casos su función se correlaciona con los diferentes pasos que sigue la maduración de los linfocitos T (Schuurman y cols., 1985). Las timosinas inducen diferenciación de las células T

incrementando las funciones inmunológicas, en ratones atímicos, en ratones timectomizados, en ratones propensos a presentar enfermedades autoinmunes y en humanos con deficiencias inmunológicas (Thurman y cols., 1975).

Por otro lado el grupo de Dardenne, Bach y colaboradores han logrado aislar y caracterizar, así como también obtener un anticuerpo específico para encontrar la localización en el timo de otra hormona tímica, la timulina o formalmente llamada "Factor Tímico Sérico" (Dardenne y cols., 1974). Este grupo ha llegado también a establecer en cultivos de células epiteliales de timo, que las vacuolas de estas células contienen el factor tímico sérico (Schmitt y cols., 1982).

1.2.5. Involución Tímica.

Las dimensiones del timo varían según la edad del organismo, son máximas en proporción al resto del cuerpo, durante la vida fetal y en los primeros estadios de la vida extrauterina; conforme avanza la edad aumentan en tamaño hasta llegar al máximo en la pubertad. Después de la pubertad el timo tiende a involucionar, en consecuencia disminuye su volumen a medida que pasan los años (Ham, 1975). Su apariencia histológica también cambia con la edad; comienza con un proceso generalmente lento, que consiste en un adelgazamiento gradual de la corteza seguido por un reemplazo parcial del tejido característico de timo por tejido adiposo con un poco de tejido conectivo (Windle, 1977).

Hammar (1905), observó que el decremento en el tamaño del timo puede presentarse de dos maneras: una "aguda o accidental", y otra que es de tipo "gradual o de la edad". La involución gradual se lleva a cabo conforme avanza la edad del individuo. Hellman (1913) utilizando métodos cuantitativos establece que los órganos linfoides, incluyendo al timo, van perdiendo peso conforme avanza la edad. De acuerdo a éstos trabajos, Dougherty (1952), sugirió que las hormonas sexuales producidas a partir de la pubertad, tienen que ver con la involución gradual del timo.

En el caso del humano, el timo involuciona rápidamente después de los 20 años; al mismo tiempo se observan reducciones en los niveles de timulina y timosinas en plasma y disminuye la actividad biológica de las células epiteliales del timo (Schuurman, 1985). Por otro lado se observa que cuando se efectúa la castración en ratas adultas, el timo

se regenera rápidamente (Fitzpatrick, 1985).

La involución aguda en la rata puede presentarse con la administración de hidrocortisona, en éstos animales hay una reducción en el peso del timo después de los 8 días de tratamiento, y el tejido tímico presenta severos daños que se manifiestan como picnosis en los núcleos de los linfocitos y como vacuolas en las células reticuloepiteliales, las que provocan un fenómeno inflamatorio que las hace aumentar de volumen e hipertrofiarse; las células fagocíticas muestran una gran actividad acabando con los linfocitos dañados (Ito y Hoshino, 1962; Haelst, 1967), y en los cultivos de timo la dexametasona promueve cambios morfológicos en los tipos celulares (Masuda y cols., 1985).

El stress, las enfermedades graves, la exposición a radiaciones, la administración de fármacos y sustancias coloidales o quelantes, etc., pueden provocar la involución aguda o atrofia del timo (Haelst, 1967; Cowan y Sorenson, 1964).

1.3. Interacción Neuro-Inmuno-Endócrina.

Existen muchas evidencias de productos peptídicos que parecen transmitir información desde el compartimiento inmune al sistema nervioso central (SNC). Dentro de estos productos se incluye a las timosinas, linfocinas, interleucinas, péptidos opiáceos, hormona de crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y hormona estimuladora de la tiroides (TSH). Estas sustancias podrían funcionar como circuitos

inmunomoduladores neuroendócrinos, por lo que se les adjudica el nombre de "Inmunotransmisores", ya que transmitirían signos específicos e información a las neuronas y otros tipos celulares (Harbour-McMenamin y cols., 1986); y Blalock, 1987).

Se propone que muchas de las sustancias producidas por el sistema inmune pueden servir como inmunotransmisores para modular ambos ejes, Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal y el Hipotálamo-Hipofisiario-Gonadal (Hall y cols., 1985).

En ratón, rata y conejillo de indias se ha detectado que existen sitios en el cerebro, principalmente en hipotálamo y glándula pituitaria, donde se localizan timosinas-1 y 4. Cuando se inyecta directamente timosina-1 en el cerebro se produce un aumento de los niveles sanguíneos de corticosterona; sin embargo éste fenómeno no se repite cuando se administra la timosina directamente a las células adrenales en cultivo. Esto lleva a pensar que el efecto corticogénico de la timosina-1 está mediado por el SNC y/o la glándula pituitaria (Oates, 1984). Por otro lado la timosina-4 estimula en el cerebro, la secreción del Factor Liberador de Hormona Luteinizante (LHRH) del hipotálamo y, consecuentemente, se libera LH de la pituitaria (Rebar y cols., 1981).

La ACTH derivada de los leucocitos es muy similar a la que secreta la pituitaria, con respecto a su actividad biológica, peso molecular, antigenidad y tiempo de retención (en la fase de inversión de cromatografía en columna); también se ha mostrado alguna semejanza en su secuencia de aminoácidos. Trabajos recientes muestran que las células linfoides periféricas responden a la ACTH y al Factor Liberador de

Corticotropina (CRF) (Weigent y Blalock, 1987). Esto sugiere que las células del sistema inmune manifiestan alguna semejanza con las células de la pituitaria en su habilidad para responder a un signo positivo proveniente del hipotálamo y a uno negativo proveniente de la glándula adrenal. Por ejemplo, experimentos realizados en ratas macho muestran que el timo guarda una relación directa con la corteza adrenal: ya que en los animales timectomizados, bajan los niveles en plasma de corticosterona y de ACTH, en comparación con los controles normales; y por otro lado los animales hipofisectomizados y timectomizados tienen niveles de corticosterona siempre más bajos que los animales simplemente hipofisectomizados (Deschaux y cols., 1979).

En los linfocitos B, se ha mostrado que existen receptores para insulina y hormona de crecimiento (GH) y que estas hormonas actúan en distintos tiempos del ciclo celular. Bajo ciertas condiciones los linfocitos además producen factores parecidos a la insulina y GH los cuales son secretados al ambiente (Snow, 1985).

La interleucina-1 producida por los macrófagos del timo es una monoquina que puede afectar directa o indirectamente el cerebro, ya que produce efectos pirogénos cuando es administrada en el ventrículo cerebral. También otras sustancias tales como la histamina y la serotonina, clásicos neurotransmisores del cerebro, son liberadas durante ciertos tipos de respuesta inmune por los linfocitos; por esto se cree que podrían actuar como mensajeros dado que tienen la probabilidad de penetrar al cerebro y producir una determinada respuesta (Besedovsky y cols., 1985).

Los opioides o endorfinas endógenas, también están involucradas en

algunos cambios patológicos inducidos durante el shock endotóxico, y se ha visto que también los leucocitos, junto con las células de la pituitaria son fuente de endorfinas (Weigent, 1987).

1.3.1. Interacción del Timo con las Gónadas.

Es bien conocido el hecho de que los esteroides sexuales ejercen una profunda influencia sobre la respuesta inmunológica. Un ejemplo son los estrógenos que actúan sobre el timo afectando "in vitro", la liberación de factores inmunorreguladores, importantes para la proliferación, diferenciación y respuesta de los linfocitos (Stimson y Crilly, 1981). También existen evidencias de que las células del timo presentan receptores a ciertos esteroides como estradiol, testosterona y androstendiona (Grossman y cols., 1979; y Morgan y Grossman, 1985).

Por otra parte Soli (1907-1909; citado por Chiodi, 1938), observó que cuando se extirpa el timo a pollos jóvenes, se produce una disminución en el peso y volumen de los testículos. Pighimi (1922; citado por Chiodi, 1938), encontró que la timectomía en gallos produce atrofia testicular, los túbulos seminíferos son pequeños y la evolución espermática es incompleta; y en el caso de las hembras observó que se presentaron alteraciones similares en los ovarios, y que nunca produjeron huevos.

Chiodi hacia la década de los 30's, observó que conforme avanza la edad en las ratas normales, el timo va perdiendo peso; y que en animales castrados, el timo y la hipófisis aumentan significativamente de peso,

hasta los 100 días de edad. Por otras parte observó que los extractos de placenta y orina de mujer embarazada, inyectados a ratas normales, provocan una disminución en la región de la corteza y una reducción del número de los corpúsculos de Hassall en el timo, el cual presenta una apariencia de involución aguda (Chiodi, 1938).

Nishizuka y Sakakura (1969-) han encontrado, que la timectomía realizada a ratones hembra a los 3 días de edad, impide el desarrollo normal de los ovarios y causa esterilidad. Los ovarios de éstos animales se presentan extremadamente pequeños, tienen ausencia de folículos maduros y cuerpos lúteos, y las células intersticiales están hipertrofiadas. También se observa una ligera masculinización en las hembras y una marcada infiltración linfocítica en los ovarios hipertrofiados (Nishizuka y Sakakura; 1969 y 1971 [a y b]). Por otra parte, observaron que los injertos singénicos de timo, o bien las inyecciones de células dispersas en suspensión provenientes de ratones recién nacidos, pueden prevenir en éstos animales la disgenesia ovárica, cuando son administrados durante los primeros 14 días de vida post natal (Sakakura y Nishizuka, 1972). Han sugerido también que el desarrollo folicular temprano (posnatal) es independiente de las funciones de la pituitaria, ya que han observado que la hipofisectomía en ésta etapa no afecta ni el número ni el crecimiento de los oocitos, ni tampoco el tamaño normal de los folículos, pero en cambio es importante la presencia del timo para que se lleve a acabo el desarrollo normal y maduración de la gónada femenina.

En ratones timectomizados a los 3 días de edad, también se ha visto que existe un decremento en los niveles séricos de Hormona Luteinizante

(LH), Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona de Crecimiento (GH), y se observa hasta los 60 días de edad; y después de los cuatro meses estos animales presentan niveles de prolactina, LH y FSH significativamente elevados y se observan tumores en los ovarios. Se cree que estas alteraciones son debidas al inadecuado desarrollo gonadal, con bajas concentraciones de estrógenos y a la falta del desarrollo de receptores para LH en las células de la granulosa (Michael, 1979; Michael y cols., 1980; y Allen y cols., 1984).

Besedovsky y Sorkin (1974) observaron que la timectomía practicada entre los 2 a 10 días de vida en ratones hembras da como resultado un retardo de la pubertad, con retraso de la apertura vaginal y una reducción en el tamaño de los ovarios y utero, los cuales tienen la apariencia característica de la inmadurez prepuberal.

La timectomía "in útero" de monos rhesus, inhibe la oogenésis e induce diferenciación anormal de los ovarios; éstos contienen un número reducido de células germinales totales y presentan atrofia folicular, (Healy y cols., 1985). Se propone que en este caso la relación timo-gónada está mediada por algún factor tímico que estimula directamente la oogenésis, o que indirectamente estimula la secreción de la hipófisis. Estos datos sugieren que el timo fetal en monos rhesus, modula de alguna forma el desarrollo folicular.

El desarrollo ovárico de los ratones atímicos (nu/nu), es muy similar al de los ratones timectomizado neonatalmente. Ambos grupos muestran una reducción en el número y desarrollo de los folículos, retraso de la pubertad y después de los 4 meses de edad ya no hay ovulación. Los ovarios también tienen tamaño reducido y la mayoría de las hembras son

usualmente estériles. La esterilidad en las hembras atímicas, se debe a que existen cambios en el desarrollo y disposición folicular: hay pérdida de folículos primarios, retraso en el crecimiento de los oocitos y retardo de la primera ovulación (Linter-Morre I y II, 1975).

La cepa de ratones atímicos homocigotos (nu/nu) ha sido ampliamente estudiada por Rebar y colaboradores, se ha observado que presentan niveles bajos de gonadotropinas tanto en plasma como en la hipófisis de hembras y machos. También han observado en animales adultos reducción de los niveles de estrona, estradiol, androstendiona y testosterona en sangre. En el hipotálamo de éstos animales se encuentran reducidas las cantidades de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Los datos anteriormente mencionados en los nu/nu, fueron comparados con los de sus parientes heterocigotos (nu/+), que son fenotípica y endocrinológicamente normales (Rebar y cols., 1981 y 1982).

Se ha observado que los trasplantes de timos en los nu/nu (provenientes de los heterocigotos (nu/+)) restablecen los niveles de LH y FSH a las hembras y en cierta forma a los machos (Rebar y cols., 1980). Por otra parte se ha visto que no existen diferencias entre los ovarios de los ratones homocigotos heterocigotos en su habilidad para unir gonadotropina coriónica humana (hCG) en condiciones "in vitro", por lo que sugieren que la anormalidad en los ratones atímicos no es debido a las deficiencias gonadales per se (Rebar, 1984).

Se ha reportado que la fracción 5 de timosina, produce un incremento en los niveles plásmicos de estrógenos, acelera la apertura vaginal y produce involución tímica. Cuando se elevan las concentraciones de

estradiol, se observa una disminución en plasma de timosina -1 (un péptido que comprende el 0.6% de la fracción 5 de timosina). Con éstos resultados se sugiere que existe un mecanismo de retroalimentación en el mismo timo (Allen y cols., 1984).

Romano y colaboradores (1981) reportaron, que el medio de incubación de un órgano inmunológico característico de las aves, llamada Bursa de Fabricio, inhibe "in vitro" la respuesta de las células del testículo a la gonadotropina coriónica humana (hCG) en pollos recién nacidos, provocando una disminución de la producción de testosterona. Por otra parte el extracto de timos de pollo produce el mismo efecto sobre las células del testículo que el medio de incubación de Bursa (Pedernera y cols., 1985). Fraccionando en una columna de Ultrogel un extracto crudo de timos de rata prepúber, se observó que la fracción con péptidos de alrededor de 28,000 D de tamaño, el cual se llamó "Factor Tímico" (FT), es capaz de inhibir la acción de la hCG sobre las células de Leydig "in vitro", (Pedernera y cols., 1986).

Hiriart y Romano (1986), realizaron observaciones acerca del mecanismo de acción del FT de 28 kD en la células de Leydig, y encontraron que existe una interacción de tipo competitivo entre el FT y la 125 I-hCG, por el mismo receptor o sitio de unión (Fig. 4).

En este grupo actualmente se continúa con las investigaciones relacionadas con el factor tímico. Se ha realizado el estudio de la actividad del factor tímico en diferentes edades, y se ha visto que la mayor actividad inhibitoria del factor se encuentra cuando los animales tienen 3 días de edad (Reyes-Esparza y Romano, 1988). Se ha

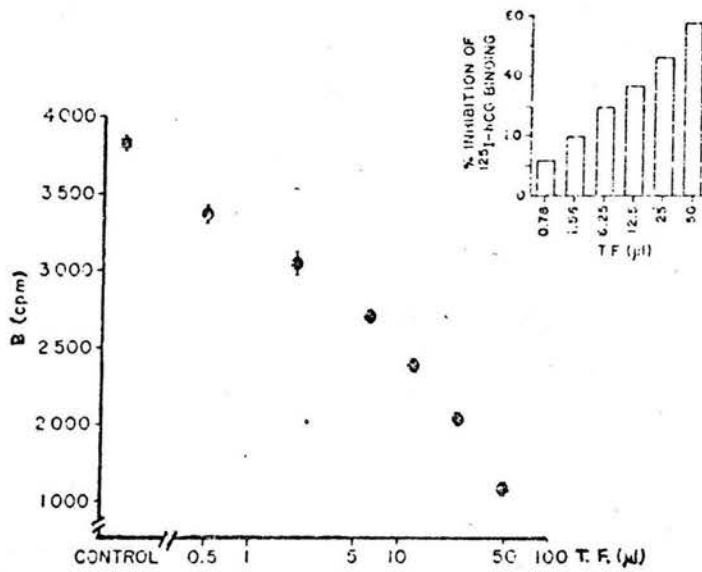


Fig.4. El efecto del factor tímico de 28 KD sobre la unión de la ¹²⁵I-hCG al receptor de la células de Leydig, es dosis-dependiente (tomada de Hiriart y Romano, 1986).

avanzado en la purificación y caracterización del FT (Porrás y Romano, 1988). Además también se han estudiado los efectos que producen factores tímicos en otros órganos como ovario e hipófisis. Mendoza (1988) estudió el efecto del FT de 28 kD en las células gonadotropas de la hipófisis en cultivo, y encontró que los grupos celulares estimulados con la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en presencia del FT, liberan al medio de cultivo mayores concentraciones de gonadotropinas (LH se incrementa 45% y FSH 56%) que aquellas que sólo recibieron GnRH, mientras que el FT por sí sólo no modifica la secreción basal. Aguilera (1988), muestra también que el FT de 28 kD inhibe la secreción de estradiol, progesterona y testosterona en las células del ovario cuando éstas son estimuladas con la hCG.

1.3.2. Interacción del Timo con otros Organos Endócrinos.

Gregoire y Comsa hacia los años 30's, inician independientemente, investigaciones que contribuyen al entendimiento de los mecanismos involucrados en la involución tímica. Comsa observó que la timectomía provoca cambios degenerativos de carácter irreversible, en la corteza adrenal, en tiroides y en las gónadas. Posteriormente cuando administró extractos tímicos por diferentes vías, observó que los daños causados en estos órganos pueden ser reversibles, (Trainin, 1974).

El timo es uno de los primeros órganos endócrinos que aparecen durante el desarrollo embrionario. En esta etapa los cambios que sufre la adenohipófisis por la timectomía, y los cambios que sufre el timo por la hipofisectomía sugieren que el eje Timo-Hipófisis ya es funcional

durante la embriogenesis. En el caso del embrión de pollo, la timectomía produce una disminución de las células hipofisiarias productoras de prolactina, TSH y GH. Por otra parte, cuando se extirpa la hipófisis se encuentra un decremento en la actividad mitótica de las células epiteliales del timo y los linfocitos tímicos se encuentran inactivos y resistentes a los tratamientos prolongados con cortisol, (Jankovic y cols., 1981).

La timectomía en ratón neonatal, hace que se presenten cambios en las células hipofisiarias, aumentan de tamaño y presentan acumulaciones granulosas; el retículo endoplásmico se deforma y aumenta de tamaño formando estructuras parecidas a cisternas. La hipofisectomía neonatal en éstos ratones también provoca cambios en el desarrollo del timo e inactividad linfocítica; se cree que estos cambios se deben a alteraciones en las concentraciones de hormona de crecimiento, ya que esta hormona se considera clave en los procesos de proliferación y diferenciación de los linfocitos T durante el desarrollo. También la tiroidectomía en ratas de 35 días de edad, provoca cambios en la histología del timo, éste presenta una apariencia muy semejante al timo de ratas viejas en cuanto al estado de hipertrófia. Cuando las ratas son adrenalectomizadas, se observa que existe un aumento en el tamaño del timo y en la liberación de factores tímicos; pero en cuanto se administra cortisol, la producción y liberación de factores tímicos decrece (Comsa y cols., 1979).

1.4. Estructura y Función Testicular.

Los testículos son las glándulas del sistema reproductor masculino,

juegan una función primordial en la secreción y producción de hormonas esteroideas sexuales, además en ellos se lleva a cabo la proliferación y diferenciación de las células germinales.

En los mamíferos los testículos se originan en la cavidad del cuerpo por detrás del peritoneo y por dentro del riñón que se está desarrollando. A medida que prosigue el desarrollo, los testículos emigran hacia abajo, penetran en el conducto inguinal y bajan hacia el escróto, que alcanzan aproximadamente hasta el séptimo mes de vida fetal (humano).

Los testículos son de forma oval, están cubiertos por una capa gruesa de tejido fibroso blando llamada cápsula albugínea. A nivel del borde posterior de cada testículo, la capa se engrosa considerablemente y penetra hacia la glándula, para formar tabiques incompletos o lóbulos, que tienden a juntarse en forma concéntrica formando una red (rete-testis). Cada lóbulo contiene de uno a tres túbulos seminíferos enrollados de manera apretada y compacta (Ham, 1975).

1.4.1. Organización Celular del Testículo.

En el período fetal temprano existe proliferación de células germinales y diferenciación celular. Tanto en la hembra como en el macho, las células germinales primordiales no se forman en la gónada; en el caso del macho emigran hasta llegar al testículo, y penetran en él incorporándose a los cordones epiteliales de los túbulos seminíferos.

Un corte transversal de un tubo seminífero de adulto, nos muestra células espermáticas en diferentes estados de maduración ; otro tipo de

células epiteliales llamadas "Células de Sertoli" que se encuentran unidas a la membrana basal del túbulo y el tejido intersticial del testículo, formado por las células de Leydig las cuales son las encargadas de la producción de esteroides sexuales (Fig.5).

Las células de Sertoli no son muy prominentes durante la niñez, pero a partir de la pubertad comienzan a aumentar de volumen presentando un núcleo polimorfo y voluminoso con un citoplasma que se extiende desde la membrana basal hasta la luz tubular, atravesando diversas capas de células germinales en desarrollo.

1.4.2. Hormonas que Regulan la Función Testicular.

En el feto del mamífero la síntesis de testosterona se correlaciona con la diferenciación de las células de Leydig; en esta etapa el testículo es principalmente modulado por la gonadotropina coriónica (CG) (Kretser y cols., 1983).

Tanto la gonadotropina coriónica como la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH) son moduladoras de la función del testículo. Son glucoproteínas formadas por dos subunidades designadas como Alfa y Beta. Desde el punto de vista biológico son importantes las dos cadenas ya que la molécula completa interacciona con el receptor del órgano blanco. Las cadenas de la hCG tienen un peso molecular de 18,000 y 28,000 respectivamente.

En el testículo adulto, la secreción de testosterona por las células de Leydig está regulada por estas hormonas adenohipofisarias

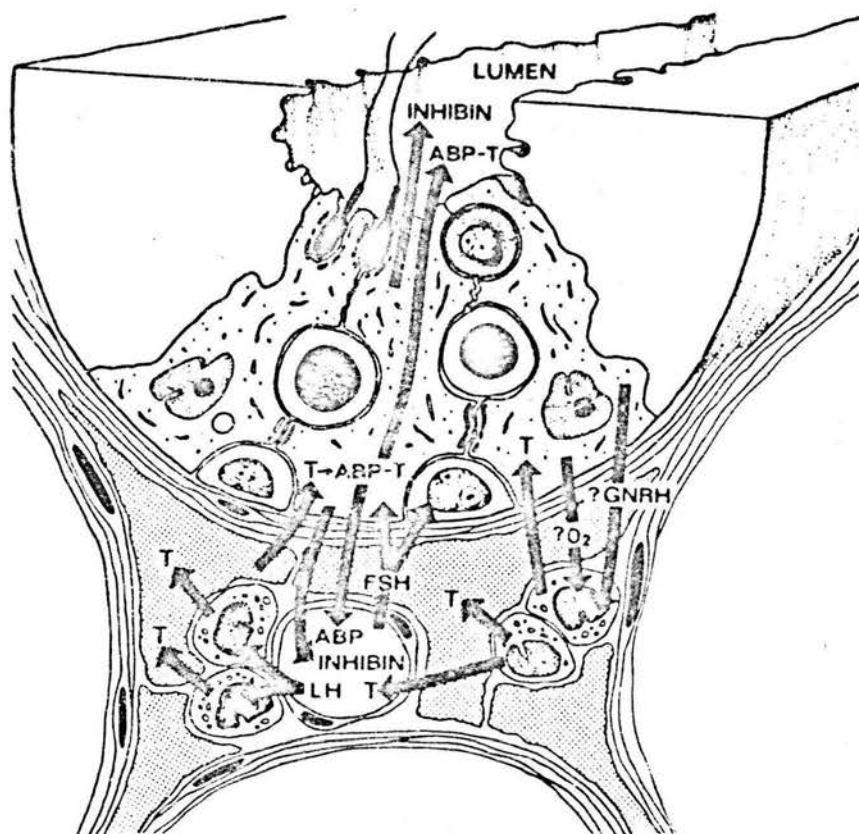


Fig.5. Organización celular y actividad endócrina del testículo adulto. testosterona (T), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona liberadora de gonadotropinas (GNRH), y proteína unidora de andrógenos (ABP) (tomado de Kretser, Burger y Hudson, 1983).

principalmente LH, FSH y Prolactina. Existe un control de retroalimentación entre el hipotálamo, las células gonadotropas de la hipófisis y las células de Leydig. Cuando bajan los niveles de andrógenos en sangre, el hipotálamo capta la señal y sus neuronas comienzan a secretar cantidades de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), un decapeptido que es liberado a través de las terminales neuronales hacia el sistema portal, el cual lo transporta sin diluir hasta las células de la hipófisis.

En la hipófisis se estimulan las células gonadotropas, y en respuesta se libera LH hacia la sangre, la LH llega al testículo, y estimula la síntesis de esteroides. Cuando aumentan las concentraciones de andrógenos en sangre, se deprime nuevamente la secreción de LH por la hipófisis (Gordon, 1979).

Ambas hormonas, la LH de origen hipofisiario, y la hCG de origen placentario, a pesar de ciertas diferencias estructurales y procedencia, tienen una similitud en cuanto a su actividad biológica y comparten el mismo receptor en la células de Leydig.

Las gonadotropinas en el adulto, son secretadas por la hipófisis en pulsos de alta actividad biológica. Los cambios del estado reproductivo del organismo están íntimamente asociados con los cambios ocurridos en la amplitud y frecuencia de los pulsos secretorios (Tahka, 1986).

Los efectos de la LH/hCG en la función de la célula de Leydig, de la rata madura, son dosis-dependiente. Las pequeñas dosis de LH/hCG aumentan el número de receptores, así como también estimulan la síntesis de testosterona, y las grandes dosis dan un efecto opuesto (Dufau y

cola., 1984).

1.4.3. Mecanismo de Acción General de las Gonadotropinas.

La unión de la LH o hCG, al receptor membranal de las células de Leydig induce la unión de nucleótidos de guanina (GTP) a las proteínas G (o N) reguladoras que conducen a la activación de la adenilato-ciclasa, y al aumento del nucleótido intracelular 3',5'-AMP (AMPc). El AMPc actúa como un segundo mensajero incrementando la esteroidogénesis en sus pasos limitantes (ruptura de la cadena lateral del colesterol en la mitocondria) para conducir a la síntesis testicular de testosterona (Dufau, 1988) (Fig.6).

1.4.4. Síntesis de Testosterona.

Se considera al colesterol como el precursor obligado de todas las hormonas esteroideas. En el testículo, se propone que la ruptura de la cadena lateral de colesterol, está regulada por la LH, dando como resultado a la molécula de pregnenolona. La pregnenolona resultante migra hacia el citoplasma de la célula de Leydig, donde puede seguir dos caminos para la síntesis de andrógenos: (a) la vía Δ^4 o (b) la vía Δ^5 . Ambas rutas de biosíntesis dan como producto a la testosterona (Fig.7).

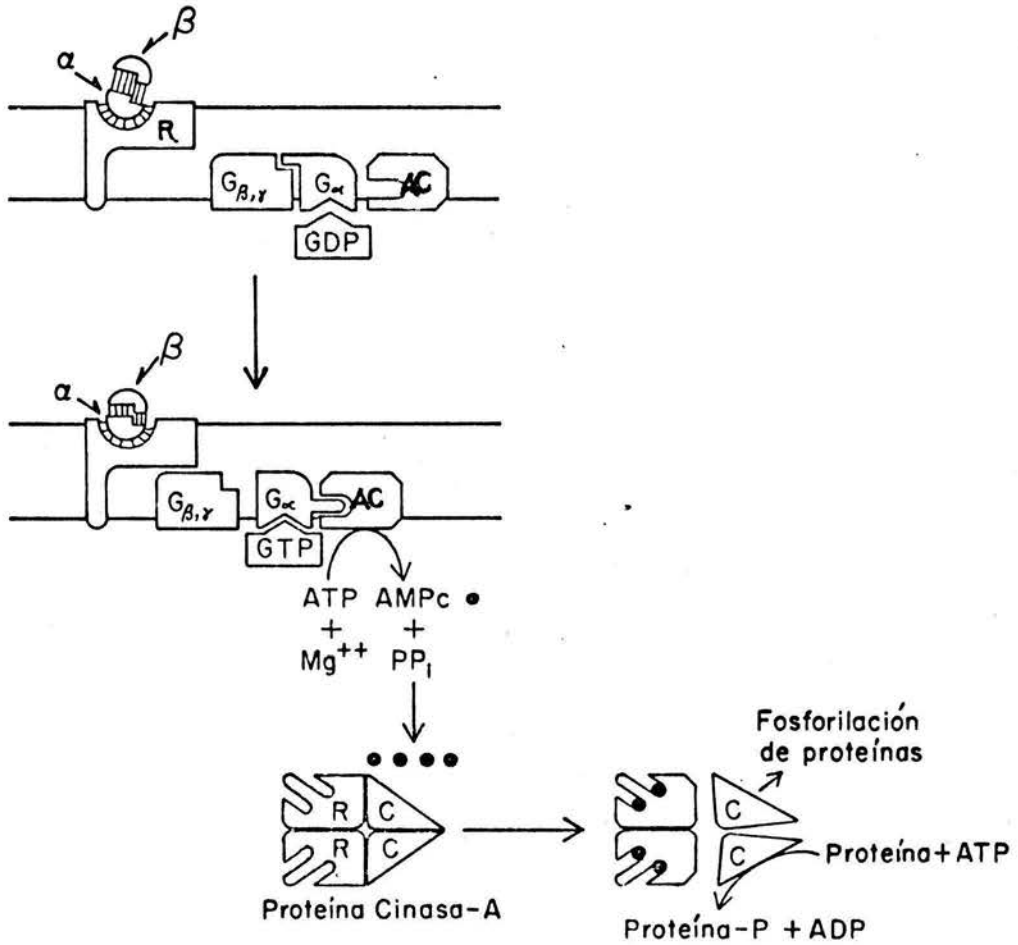
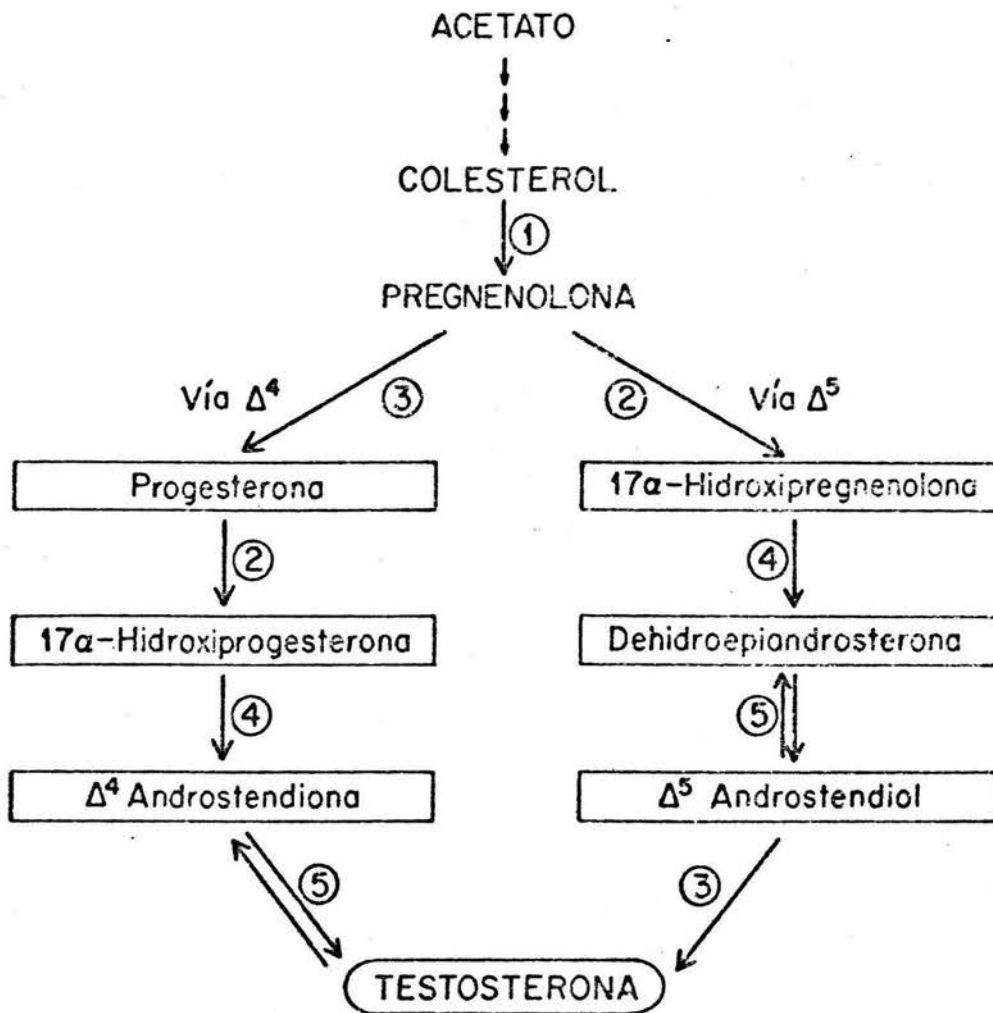


Fig.6. Mecanismo de acción general de las gonadotrofinas (y algunas otras hormonas proteicas) en la célula blanco. (R), receptor; (G), proteína G o N; (AC), adenilatociclasa.



ESQUEMA DE SINTESIS DE TESTOSTERONA EN TESTICULO.

Fig.7. Vías de síntesis de testosterona y enzimas que participan. (1) 20 α -Hidroxilasa, 22R-Hidroxilasa y la 20,22R-Desmolasa ; (2) 17 α -Hidroxilasa; (3) 3 β -Esteroides deshidrogenasa y la Δ^4 - Δ^5 Isomerasa; (4) 17,20-Esteroides desmolasa; y (5) 17 β -oxido reductasa.

1.5. Cultivo de tejidos

En los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones utilizando los modelos de cultivos "in vitro" encaminadas al estudio de los sistemas fisiológicos. Una gran parte de éstos trabajos han contribuido sustancialmente a el entendimiento del comportamiento funcional de las células.

1.5.1. Tipos de Cultivos

Existen principalmente dos: los cultivos primarios y los de líneas celulares establecidas, a continuación se discute cada tipo de cultivo.

I. Los cultivos primarios se refieren a las células aisladas, las cuales se obtienen por diferentes métodos a partir de un tejido u órgano extraído directamente del organismo. Dentro de éstos cultivos además se encuentran distintas modalidades:

a). Cultivos de explantes u organotípicos, son cultivos de órganos completos o fragmentos de tejido, en un sustrato adecuado y con un medio nutritivo especial. En general se utilizan en esta técnica un medio sólido contenido en tubos o cajas de Petri y en algunas ocasiones se utilizan cámaras especiales para mantener el órgano, esto depende del tipo de estudio que se realice.

La ventaja de éste sistema es que se mantiene aislado el tejido, no influyen otros órganos en su actividad. Pero las desventajas que se presentan es que la región central del explante es pobremente nutrida, por lo que las células en esa zona lo más probable es que estén dañadas.

Por otra parte este sistema dificulta la difusión de sustancias a través del tejido y tampoco es posible observar las estructuras y condiciones celulares bajo el microscópio debido a el espesor del explante.

b). Cultivos de células aisladas mantenidas en suspensión. Se realizan en un medio de cultivo líquido con las células en movimiento continuo para evitar las uniones entre ellas, ya que la mayoría de los tipos celulares tienden a formar agregados expresando de esta manera la importancia de reconocimiento y funcionalidad.

Este método proporciona la ventaja de poder manejar grandes cantidades de células y cosecharlas sin necesidad de utilizar enzimas que pudieran alterarlas. Pero con esta forma de cultivo no es posible analizar el comportamiento celular ya que no permite valorar las interacciones que se llevan entre ellas. Esta técnica es más adecuada para el estudio de células que no requieren unirse a un sustrato ni crear comunicaciones físicas con sus vecinas, como sería el caso de los cultivos de linfocitos.

c). Cultivos de células aisladas adheridas a un sustrato. Este tipo de células tienden a formar monocapas. Las células se obtienen al disgregar el tejido por métodos enzimáticos (con colagenasa, tripsina, pepsina, elastasa, etc.) y/o mecánicos con la utilización de pipetas de diferentes calibres.

En estos cultivos las células se adhieren, forman una monocapa pero su desarrollo está limitado por la superficie del sustrato donde crecen. Para los cultivos primarios es muy importante la edad del tejido, por lo que preferentemente se utilizan los tejidos de organismos en los

primeros estadios del desarrollo, ya que presentan una mayor capacidad para adherirse al sustrato y se adaptan mas rapidamente a las condiciones "in vitro". Con este tipo de cultivos se permite observar la adaptación y formaciones de conexiones entre las células para la construcción de monocapas.

II. Cultivos de líneas celulares establecidas. Estos son originarios de un cultivo primario inicial que posteriormente se han sometido a diferentes pasajes a través de los cuales las células sufren modificaciones. El número de pasajes está referido a las veces que las células son recultivadas desde la obtención inicial. La edad del cultivo se expresa como el número de pases o subcultivos.

Durante la transformación (inducida o espontánea) se presentan cambios genéticos y morfológicos importantes (mutantes), de tal modo que esto representa una desventaja en cuanto a la utilidad. Por otra parte estas células tienen una gran potencialidad para dividirse por lo que su proliferación es ilimitada (González del Pliego, 1983).

1.5.2. El Medio de Cultivo

El éxito de un cultivo de células depende de múltiples factores fisicoquímicos y bioquímicos que afectan la forma, proliferación y diferenciación celular. Desde el punto de vista bioquímico son importantes las proteínas, hormonas y nutrientes que se presentan en el medio para optimizar el desarrollo celular.

Existen diferentes tipos de medios de cultivo que han sido diseñados para las necesidades de los distintos tipos celulares, esto depende de la clase de células que se trate. El medio de cultivo se suplementa para proporcionarle a las células un ambiente semejante a su medio natural, con el fin de evitarles cambios traumáticos violentos.

Generalmente los medios de cultivo contienen una mezcla definida de nutrientes de bajo peso molecular disueltos en una solución amortiguadora salina fisiológica. Este medio debe de proporcionar todos los nutrientes esenciales, incluyendo todos los materiales crudos necesarios para la producción de nuevas células, sustratos para el metabolismo energético, vitaminas, trazas de minerales y una concentración de iones inorgánicos adecuada. Además de nutrientes, contienen diversos compuestos que no lo son, como el rojo de fenol que es un indicador de pH y algunos amortiguadores como el HEPES (N-2-Hidroxietilpiperacina-N-2 ácido etanesulfónico), (Ham R., 1979).

1.5.3. Sustratos de Cultivo

Un sustrato para utilizarse en las técnicas de cultivo debe de reunir ciertas características para cumplir realmente su función, y son las siguientes: debe no ser biológicamente inerte (no tóxico) y ópticamente transparente, debe permitir la adhesión, la adaptación y actividad celular de migración y desarrollo; ya que la interacción entre la célula y el sustrato es un factor muy importante en el mantenimiento y diferenciación de las mismas.

Actualmente el crecimiento de células, tejidos y el mantenimiento de órganos se realiza en diversos elementos como: cajas de Petri, botellas, cubreobjetos, matraces, cámaras microscópicas, etc.. Además estas superficies, de vidrio o plástico, comunmente son cubiertas por sustancias orgánicas como: colagenasa, sueros, hormonas, componentes de matriz extracelular, etc., las cuales aumentan y favorecen la adhesividad y desarrollo del cultivo (González del Pliego, 1983).

Desde hace tiempo en nuestro laboratorio se viene investigando el efecto que tienen un factor tímico (FT) de aproximadamente 28 KD que modula la respuesta de las células de testículo a la hCG. Este factor inicialmente se obtuvo de un extracto crudo de timos de rata prepuber, y se ha visto que compite por el mismo receptor de la hCG en la célula de Leydig. Pero aún no sabemos cuales de los componentes celulares del timo son los encargados de producir dicho FT. Como ya se mencionó anteriormente en la introducción, la timulina y algunas timosinas son producidas por las células epiteliales del timo. Por esta razón nosotros pensamos que el FT de 28 KD que estamos estudiando podría ser producido y secretado por las células epiteliales del timo al medio de cultivo.

Por otra parte se ha encontrado que las hormonas producidas por el sistema endócrino, principalmente las hormonas esteroides modulan el desarrollo y funcionamiento de algunos órganos del sistema inmune como es el caso del timo. La administración de altas concentraciones de estas hormonas a animales jóvenes afecta tanto la población de células linfoides como la producción de factores y hormonas tímicas que modulan el funcionamiento del sistema inmune. También se ha observado que algunos tipos de linfocitos y células epiteliales de timo tienen receptores para esteroides como estradiol, dihidrotestosterona, corticosterona, progesterona, testosterona y dexametasona (Cowa y cols., 1964; Trainin, 1974; Grossman, 1984; Masuda y cols., 1985). Por esto suponemos que la administración de testosterona a las células de timo en cultivo, podría afectar directamente la producción y/o la secreción del FT al medio.

Hasta el momento se ha demostrado que el timo de rata prepuber contiene un factor, de aproximadamente 28 KD que es capaz de inhibir la acción de la hCG en las células del testículo. Sin embargo se desconoce cuál o cuales de todos los tipos celulares que componen al timo, producen este factor que modula la esteroidogénesis en el testículo.

Por lo tanto los objetivos específicos de éste trabajo son los siguientes:

- 1.- Obtener monocapas de células reticuloepiteliales de timo de rata y el medio condicionado que producen.
- 2.- Obtener monocapas de células de piel de rata y el medio condicionado que producen.
- 3.- Identificarlas morfológicamente a las células de timo cultivadas mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión.
- 4.- Estudiar los efectos de los medios condicionados de timo y piel obtenidos de monocapas de 7 y 15 días de cultivo, sobre una suspensión de células de testículo enriquecida en células de Leydig utilizada como ensayo biológico de actividad de las mismas.
- 5.- Determinar la secreción de testosterona por las células de Leydig, mediante la técnica de radioinmunoanálisis.

Por otra parte también en la literatura se sugiere que los esteroides gonadales afectan algunas funciones inmunes, entre ellas las del timo. Por esta razón también nos planteamos el siguiente objetivo :

* Utilizando el modelo de cultivo de monocapas de timo, administrar testosterona al medio con el fin de analizar su efecto sobre la producción del factor (o factores), que se encuentra en el medio condicionado de timo y que modula esteroidogénesis en el testículo de la rata adulta.

4.1. Cultivo Primario de Células de Timo y Piel de Rata

Se utilizaron ratas macho de la raza Wistar de 1 o 2 días de nacidas, provenientes de la granja del CINVESTAV. El timo y una pequeña porción de piel abdominal fueron extraídos quirúrgicamente de los animales, bajo condiciones de esterilidad bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss, W. G. mod. 475022) a un aumento de 2×10 . Se lavaron y limpiaron varias veces los tejidos en una solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} estéril (NaCl , 800 mg; KCl , 40 mg; NaHCO_3 , 34.8 mg; glucosa 100 mg en 100 ml a $\text{pH} = 7.4$), extrayéndose cuidadosamente la cápsula de tejido conectivo del timo. Los tejidos de timo y piel se picaron y se incubaron durante 15 y 45 minutos, respectivamente, en una solución enzimática compuesta por tripsina (GIBCO, semipurificada) al 0.25% en solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} a 37°C con agitación constante de 90 ciclos por minuto, en un baño de agua de Dubnoff. Posteriormente las fracciones de tejido se lavaron 3 veces con solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se suspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido con 15% de Suero Bovino Fetal (SBF) y 1% de una solución de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml y estreptomycinina 10,000 ug/ml, GIBCO). A este medio preparado le llamamos DMEM-completo. A continuación se realizó la disociación mecánica de las células con una pipeta Pasteur con punta flameada. Para evitar los grumos de tejido se pasó la suspensión celular a través de una malla de nylon. De la suspensión celular de timo se tomaron alícuotas de 200 μl , que corresponden aproximadamente a 10^5 células vivas (determinación por la técnica de exclusión celular de azul

de Tripán), y de piel alicuotas de 200 μ l (10^4 células vivas). Las células de timo y piel se sembraron en cajas de plástico para cultivo de 35mm de diámetro con 1 ml de DMEM-completo. Las células se mantuvieron en una incubadora (Hotpack, CO₂ Incub., mod. 351820, Multimode Control System) con una atmósfera de 95% de aire húmedo y 5% de CO₂ a una temperatura de 37 ° C. El medio fue cambiado cada tercer día por DMEM-completo fresco, y dos días antes de realizar el Bioensayo (detallado más adelante) se cambió el medio a todos los cultivos pero ahora no se agregó SBF. Las células se mantuvieron en cultivo durante 7 o 15 días. Al final de estos dos últimos días de cultivo, se tomó el medio al que llamaremos medio condicionado de timo (MCT) y de piel (MCP), se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se utilizó para los experimentos que más adelante se detallan.

4.2. Microscopía Electrónica de las Células Epiteliales del Timo

La técnica utilizada para realizar la preparación de las monocapas de timo fue la convencional, y se llevó a cabo de la siguiente manera: las monocapas de células obtenidas de cultivos primarios de timo de 7 y 15 días, se lavaron con 1 mililitro de solución de Cloruro de Sodio (9 g:1000 ml). Se fijaron las monocapas con glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos PBS a pH=7.4 por 3 horas; pasado ese tiempo se levantaron las células con una espátula de hule y se recolectaron en un tubo pequeño. Se lavaron con PBS, y se centrifugaron 3 veces a 1000 rpm durante 10 minutos. El tratamiento posterior se realizó por parte de la unidad de microscopía electrónica

del CINVESTAV, donde fueron tratadas la monocapas para su deshidratación con etanol a diferentes grados de dilución, también con resina en diferentes fases, también se realizaron diferentes cortes con un ultramicrotómo. La tinción de las preparaciones se realizó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Por último las observaciones se realizaron en un microscópio electrónico tipo JEOL 2000-X.

4.3. Bioensayo de las Células de Testículo con los MCT y MCP.

Los testículos se obtuvieron de una rata Wistar adulta joven (250-300 g) de acuerdo a la técnica de Mendelson y cols. (1975) modificada, que se realizó de la siguiente manera: se anestesió a la rata hasta el paro respiratorio, se extrajeron los testículos quirúrgicamente, se lavaron 3 veces en solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , se les desechó la capsula albugínea y la mayor parte de vasos sanguíneos. Para separar a las células intersticiales de los túbulos seminíferos se utilizó una solución enzimática compuesta por DMEM con 0.1% de Albúmina de Suero Bovino (ASB) de GIBCO y 15 ug de colagenasa (Sigma Chem. Co.) por ml. Los testículos se incubaron en ésta solución enzimática durante 15 minutos en baño de incubación a $37^{\circ}C$ con agitación constante de 9 ciclos por segundo. Posteriormente se lavaron las células dos veces para desechar las enzimas con DMEM-ASB. Se pasaron a través de una malla de nylon y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos (este procedimiento se repitió las veces que se lavaron las células). Finalmente el precipitado celular se resuspendió en DMEM-ASB más 0.1 mM de 1-metil-3-Isobutilxantina (Sigma Chem. Co.), a razón de un mililitro por cada 100 ul de precipitado celular. De la suspensión celular se tomaron

alícuotas de 200 μ l y se llevaron a un volumen final de 2 mililitros, con 50% de DMEM-ASB-Isobutilxantina más el 50% de los medios condicionados de timo (MCT) y de medio condicionado de piel (MCP) respectivamente. El control recibió sólo DMEM. Algunos de los grupos fueron estimulados con 1 mU de gonadotropina coriónica humana (hCG) por mililitro de medio de incubación. Posteriormente se gasearon las células en suspensión por 15 minutos en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO_2 y un 95% de aire húmedo; se prosiguió la incubación en un baño metabólico Dubnoff con agitación constante de 3 ciclos por segundo durante 105 minutos más. Terminada la incubación se transfirieron las células a tubos de plástico para ser centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos. Se extrajeron los sobrenadantes y se congelaron inmediatamente, para más tarde realizar la determinación de testosterona producida por las células.

4.4. Efecto de Diferentes Dosis del MCT sobre las Células de Testículo.

El MCT se concentró por el método de liofilización, el cual consiste en evaporar el agua contenida en el medio a temperaturas menores de -20°C al alto vacío. Posteriormente el polvo se disolvió en una proporción de 10 ml:1 ml con DMEM. Este pequeño volumen se sometió a diálisis en solución de Hank's (NaCl ; KCl ; CaCl_2 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; Glucosa y NaHCO_3) a pH= 7.4 durante 24 horas, utilizandose bolsas de celulosa para diálisis.

Las células de testículo disociadas, como se describió antes, se

resuspendieron en matraces de vidrio con DMEM-ASB-Isobutilxantina más diferentes cantidades del MCT previamente concentrado y dializado (25, 50, 100 y 150 ul de MCT por mililitro de la suspensión celular) ajustando un volumen final de 1 ml. Se incubaron las células durante 2 horas. Posteriormente se centrifugaron y se recolectaron los sobrenadantes, en los que posteriormente se determinó la concentración de testosterona por el método de Radioinmunoanálisis (RIA).

4.5. Determinación de Testosterona.

Se llevó a cabo por la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA). Esta es una de las técnicas más confiables para realizar la determinación de esteroides. Tiene una sensibilidad y especificidad muy alta, ya que permite cuantificar cantidades diminutas de innumerables sustancias. El fundamento básico del RIA se rige mediante la ley de acción de masas de las uniones antígeno-anticuerpo, donde la hormona marcada (radiactiva) compete por la unión al receptor con la hormona no marcada (fría). Se utilizó para realizar el RIA un anticuerpo anti-testosterona (Radioassay System Lab., Inc. # 1720), que une además un 18.75% de 5-dihidrotestosterona. Se utilizó el anticuerpo a una dilución final de 1:56,000 ; la hormona marcada fue la [1,2,6,7-³ H] Testosterona (Amersham, Int.). La separación de la testosterona tritiada libre de la unida al anticuerpo, se realizó adsorbiéndola con carbón activado (Merck) al 0.625% en amortiguador para RIA (H NaPO 4.3g , HNa PO 2.7g , NaCl 4.5g Azida de Sodio 0.5g y Gelatina 0.5g ;para 500 ml a pH=7.2). La cuantificación del complejo Anticuerpo[³ H]Testosterona, se realizó en

un contador para emisiones beta (Packard, Tri-Card #3255), utilizándose el líquido de centelleo de Miles-Yeda (PPO 4g; POPOP 200mg; Tolueno 665ml; Tritón 335ml, para un litro). La sensibilidad del RIA fue de 6.25 pg/ml.

El cálculo de las concentraciones hormonales se realizó con el método logit-log propuesto por Rodbard (Bedolla y cols., 1984), extrapolando los resultados obtenidos a una curva estandar, realizada con el logaritmo de las concentraciones conocidas contra el logit de "y" : donde "y" es la relación entre la unión total y la unión en presencia de la hormona fría, y la transformación logit de "y" es $\ln [y/100-y]$.

4.6. Células de Timo Tratadas con Testosterona Durante el Cultivo.

A los 5 días de cultivo las monocapas de células de timo, se trataron con 10 ng/ml de testosterona durante 48 horas, el esteroide previamente se disolvió en un pequeño volumen de alcohol etílico y se agregó al DMEM sin SBF. Posteriormente se recolectaron los medios y se trataron con carbón activado al 0.625% durante 10 minutos a 4 ° C, con el fin de eliminar la testosterona del medio. Pasado éste tiempo se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 minutos más. Se recuperaron los sobrenadantes, se filtraron con filtros millipore de celulosa con una abertura de 0.22 μ m (Swinnex-Gs), y finalmente rectificó el pH de los mismos. El MCT así tratado se agregó al bioensayo de las células de testículo (50% DMEM + 50% MCT). Los grupos experimentales que utilizamos se ilustran a continuación:

Medios	Tratamiento con carbón activado
DMEM	-
DMEM	+
DMEM+Testo	+
MCT	-
MCT	+
MCT+Testo	+

4.7. Análisis Estadístico.

Utilizamos la prueba de F de Fisher para dos muestras poblacionales para determinar el tipo de varianzas (homogeneas o heterogeneas). Para el analisis de datos se realizó análisis de varianza y utilizamos la prueba de t de Student de dos colas.

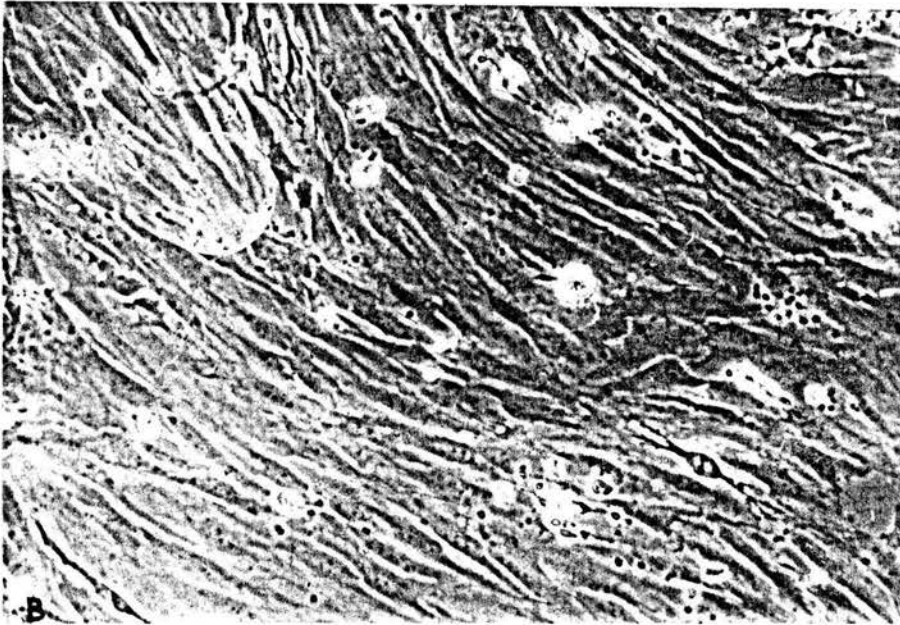
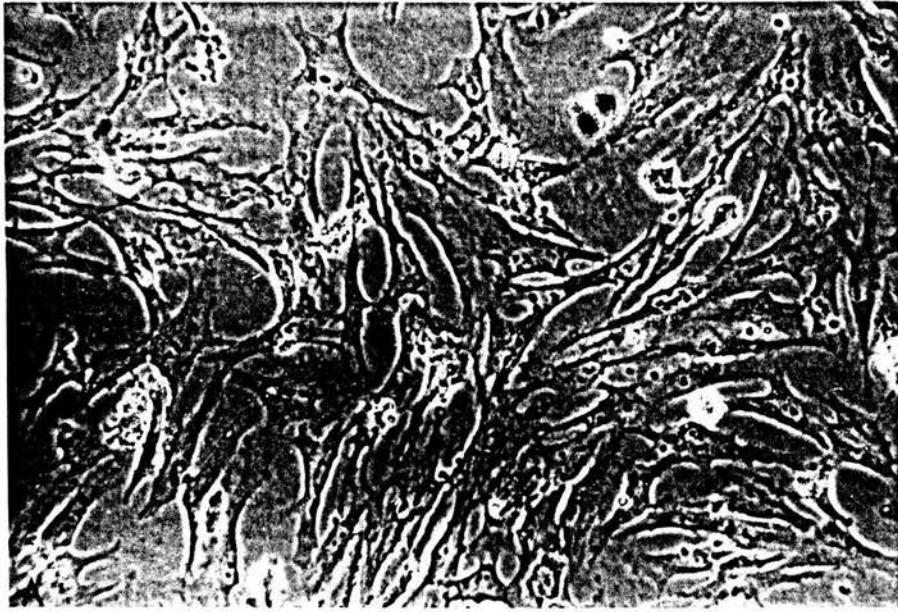
5.1. Cultivos de Timo y Piel de 7 y 15 días.

Al inicio de los cultivos de timo se observa una gran abundancia de células flotando en el medio, pero conforme avanzan los días de cultivo, las células epiteliales se adhieren al sustrato de modo que cuando es cambiado el medio anterior por medio fresco se van eliminando los timocitos, ya que como se ha descrito (Kruisbeek, 1977 y Raedler, 1978) no se unen al sustrato como lo hacen la mayoría de las células no linfoides.

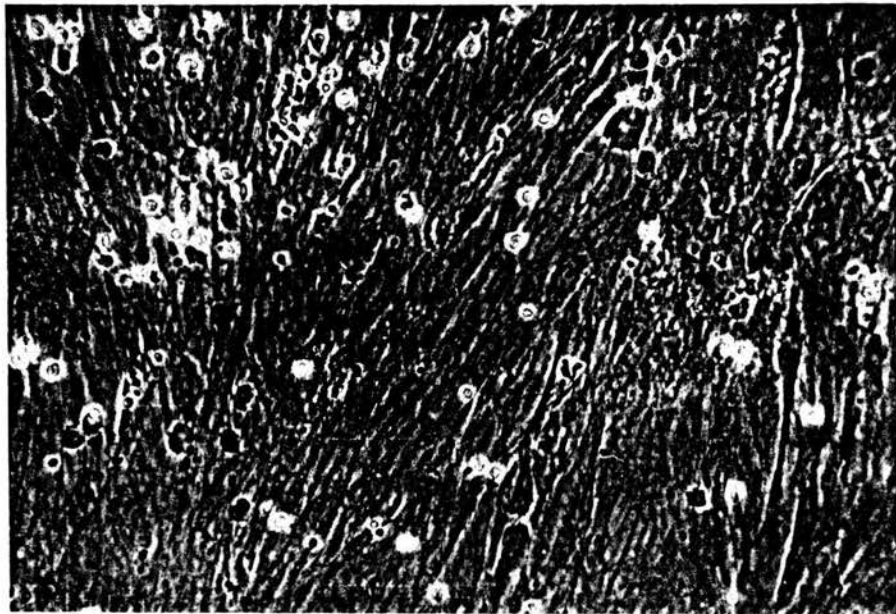
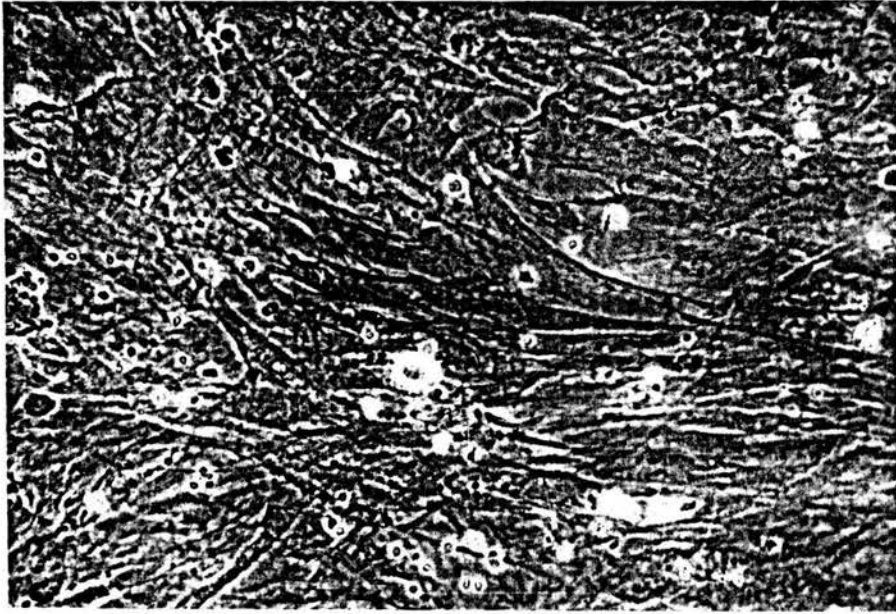
La confluencia celular de las células de timo se obtuvo hasta los 7 días de cultivo, mientras que en piel la monocapa es completa a partir del 5to día de cultivo.

La micrografía 1-A muestra un cultivo de células de timo de cinco días, donde se observan células con aspecto epitelioides de varios tipos que forman en general un retículo característico. El tipo celular predominante son células alargadas, con extremidades bifurcadas y un núcleo de mediano tamaño ubicado más o menos centralmente. Además entre las células reticuloepiteliales se encuentran algunas células las cuales han sido clasificadas por su apariencia morfológica como células dendríticas (Kamperdijk, 1985), (ver la micrografía 1-B). A los 15 días de cultivo (micrografías 1-C y 1-D) se observa una monocapa completa de célula de timo, las cuales tienden a formar arreglos epiteliales; en este tiempo persisten las células dendríticas pero en escasa cantidad.

Los cultivos de piel fueron utilizados como testigos para obtener



Micrografías 1-A y 1-B. Células de timo de rata cultivado durante 5 días. En la 1-B se muestra la presencia de algunas células dendríticas (CD). Toma en microscopio de luz y contraste de fases, 1920X.



Micrografías 1-C y 1-D. Células de timo de rata cultivadas durante 15 días. Microscopio de luz y contraste de fases, 1920X.

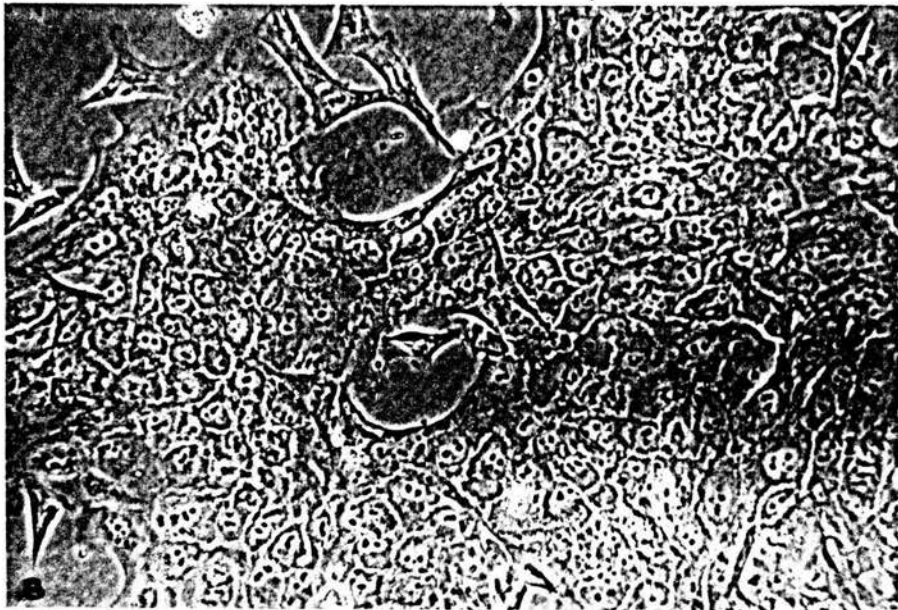
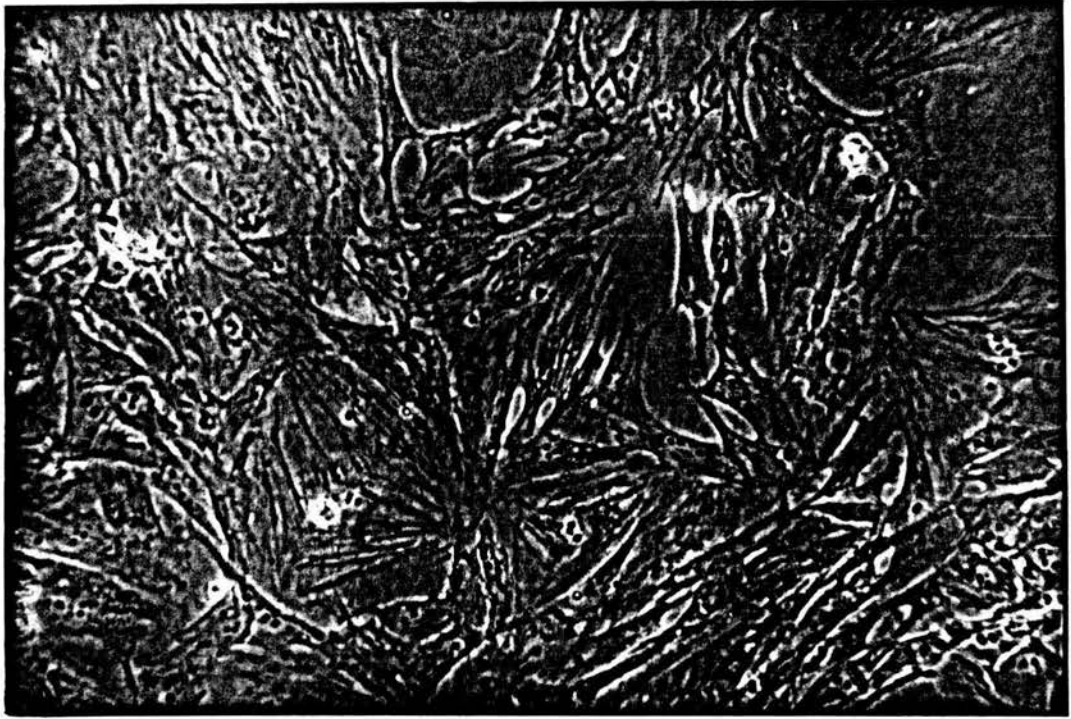
su medio condicionado y probarlo en condiciones semejantes al MCT. Desde el inicio del cultivo, las células de piel tenían una apariencia fibroblastoide característica, con citoplasma abundante y bordes irregulares y una capacidad de adherencia al sustrato mucho mayor que las células de timo, (en la micrografía 2-A se muestra un cultivo de piel de 5 días y en la 2-B un cultivo de piel de 15 días). En estos cultivos se muestran también colonias celulares de apariencia morfológica uniforme de tipo epitelioide conformadas por células poligonales (micrografía 2-B).

5.2. Microscopía Electrónica de las Células de Timo.

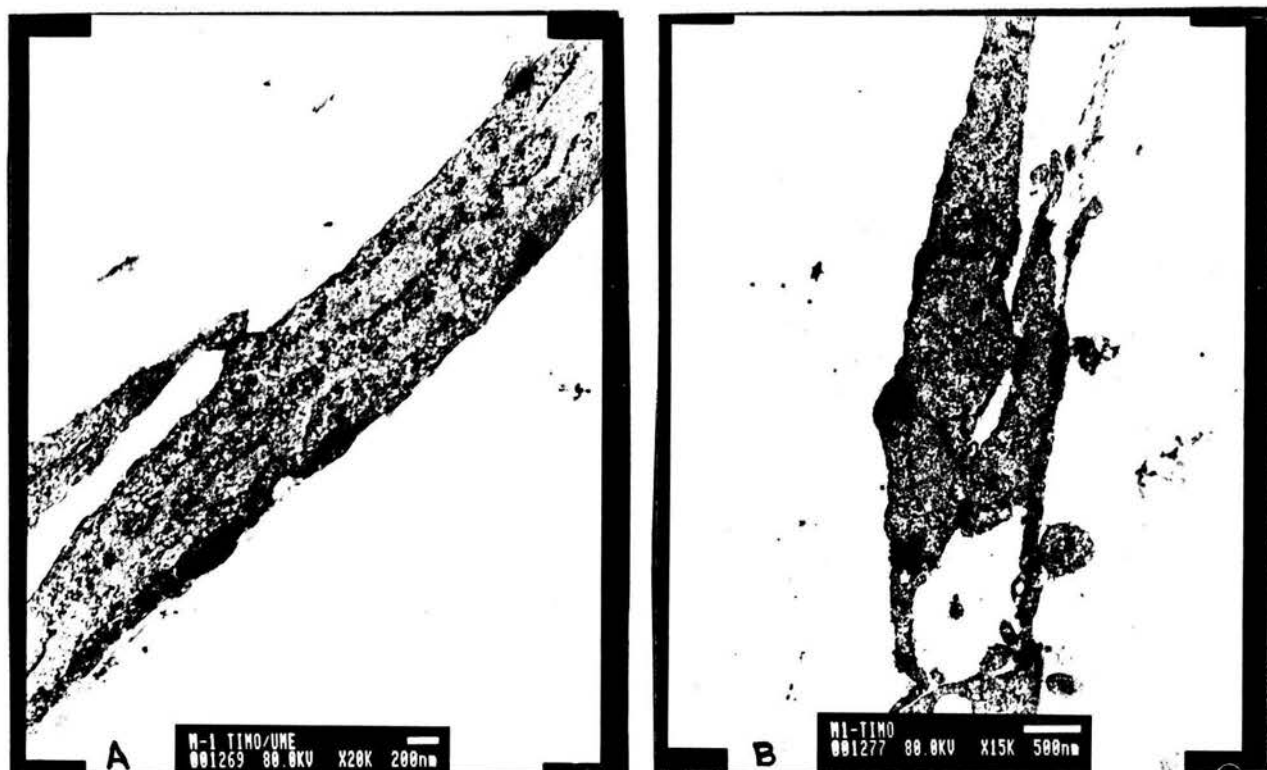
Las células de timo al igual que otros tipos de células epiteliales se caracterizan por la presencia de filamentos intermedios de queratinas. Estos filamentos se encuentran más densamente organizados en las estructuras llamadas desmosomas, que son sitios de unión célula-célula. Los desmosomas se prolongan hasta los espacios intercelulares creando una fuerte unión entre las células.

En el caso de los epitelios de timo los desmosomas no son muy abundantes, pero son muy importantes y característicos, sobre todo en las zonas donde se realiza la unión intercelular para la formación del retículo.

En las electromicrografías 3-A y 3-B de células de timo se observa que los tonofilamentos de queratinas se orientan alrededor de las membranas plasmáticas de ambas células, tanto de la cara interna como de la



Micrografías 2-A y 2-B. Células de piel de rata cultivadas durante 5 días. La micrografía fue tomada con microscopio de luz y contraste de fases, 2720 X y 1920 X respectivamente.



Electromicrografías 3-A y 3-B tomadas de células epiteliales del timo de la rata, cultivadas durante 7 días. Las zonas oscuras alrededor de la membrana plasmática son acumulos de filamentos de queratinas, las cuales forman uniones llamadas desmosomas entre las células vecinas.

externa, donde se lleva a cabo la unión.

5.3. Efectos del MCT sobre la producción de Testosterona de las Células de Testículo.

Cuando a las preparaciones de células testiculares se les agregó MCT, obtenido de monocapas de 7 días de cultivo, no se observaron cambios en la producción basal de testosterona. Sin embargo la respuesta de estas células a la hCG se modificó significativamente, obteniendo una inhibición aproximadamente del 20% de la respuesta misma (Fig. 8).

El MCP de 7 días de cultivo, no produjo cambios en la secreción basal de testosterona, ni tampoco modificó la respuesta de las células del testículo a la hCG.

En la figura 9 se muestran los efectos del MCT obtenido de cultivos de 15 días de desarrollo. Nuevamente se observa una reducción significativa ($P < 0.05$) de la producción de testosterona en presencia de la hCG. Sin embargo la disminución es menos importante que cuando se usó el MCT de 7 días en presencia de la hCG. La producción basal del esteroide no se afectó por el agregado del MCT.

Cuando se utilizó el MCP de cultivos de 15 días se produjo un aumento significativo de la producción basal de testosterona. Asimismo se produjo un aumento de la respuesta a la hCG en presencia del MCP. Este incremento de la respuesta a la hCG es evidente aún cuando se resta la producción basal del esteroide (Fig. 9).

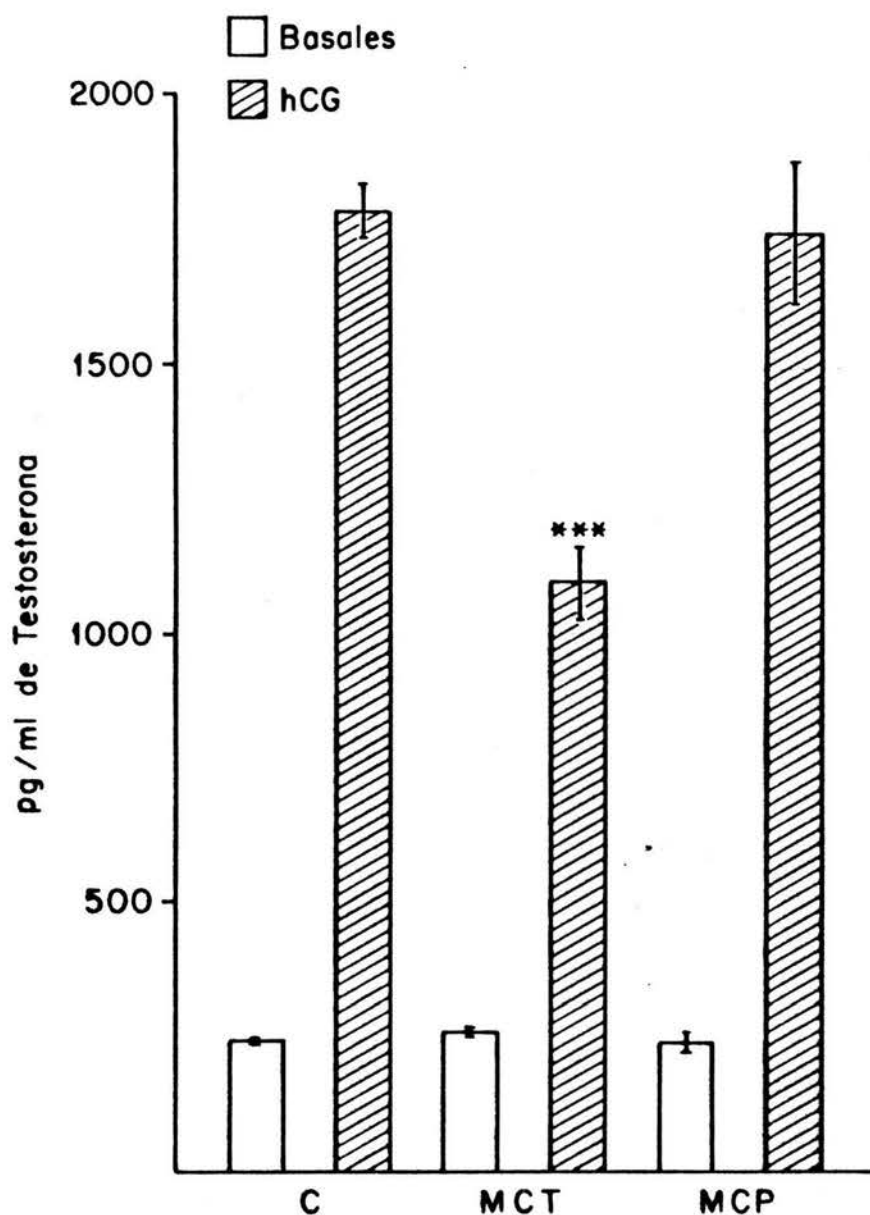


Fig.8. Efecto del medio condicionado de timo (MCT), obtenido de monocapas de células tímicas cultivadas durante 7 días, sobre la producción de testosterona por las células de testículo en condiciones basales y bajo estímulo con 1mU de hCG. Las barras vacías indican la secreción basal y las barras rayadas la secreción del esteroide ante el estímulo de la hCG. C, grupo control; MCT, grupo que recibió medio condicionado de timo; y MCP, grupo que recibió medio condicionado de piel. Los datos expresan la media \pm desviación estándar, con (***) $P < 0.001$.

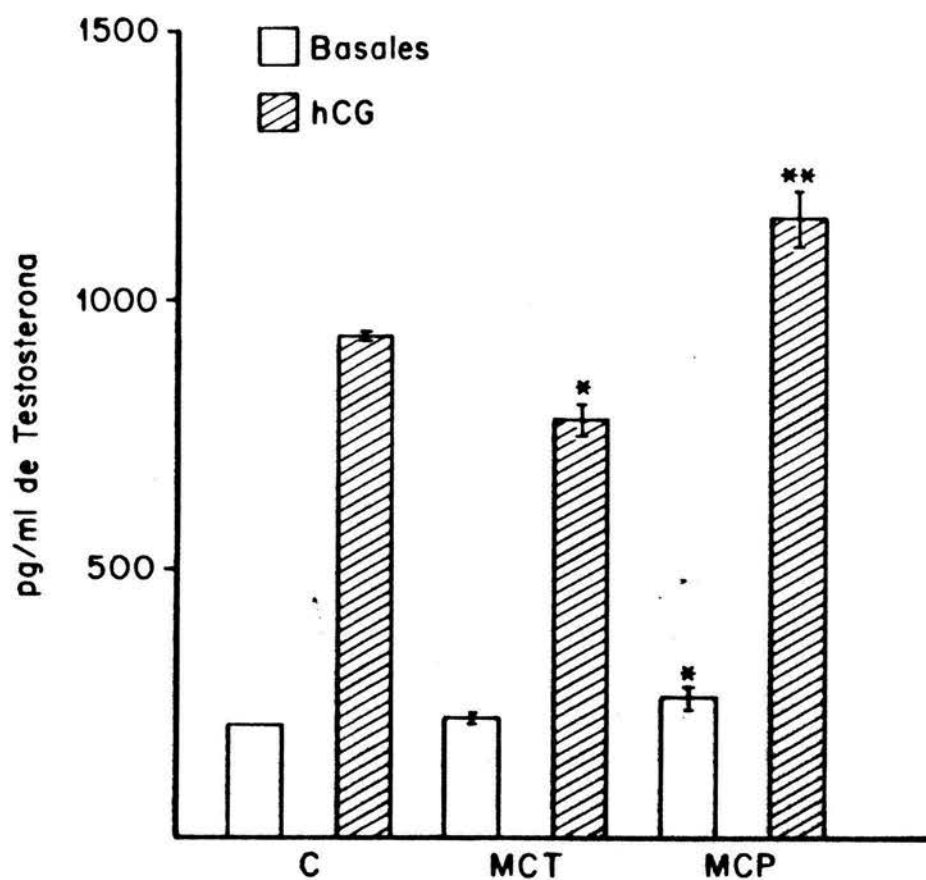


Fig.9. Efecto del medio condicionado de timo (MCT), obtenido de monocapas de células cultivadas durante 15 días, sobre la producción de testosterona por las células de testículo en condiciones basales y estimulada con 1 mU de hCG. Las barras vacías indican secreción basal de testosterona y las barras rayadas la secreción de este esteroide ante el estímulo de la hCG. (C) grupo control; (MCT) medio condicionado de timo; y (MCP) grupo que recibió medio condicionado de piel. Los datos expresan la media \pm desviación estándar, con (*) $P < 0.05$ y (**) $P < 0.01$.

5.4. Curva Dosis-Respuesta.

En la figura 10 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de MCT obtenido de cultivos de 7 días sobre la producción de testosterona en las células de testículo, en condiciones basales y estimuladas con hCG. No se observaron cambios significativos en la producción basal de testosterona del control ni del grupo tratado con el MCT. En los grupos tratados con MCT y estimulados simultáneamente con hCG se observó una inhibición significativa de la producción de testosterona, en comparación con el grupo control estimulado con hCG. La mayor inhibición se observó desde 100ul del MCT concentrado (10:1); a partir de la cual no hubo respuesta prácticamente a la hCG. La dosis de inhibición del 50% fue la de 50ul. En esta figura se muestra que la inhibición de la respuesta a la hCG por el MCT es dependiente de la dosis del medio condicionado agregado al bioensayo.

5.5. Efecto de la Testosterona sobre las Monocapas de Células

Epiteliales de Timo.

La utilización del carbón no parece modificar la secreción basal ni estimulada de testosterona por las células del testículo. Los Medios condicionados de timo obtenidos de células tratadas por 48 horas con 10 ng de testosterona/ml de medio, no modificaron la producción basal de testosterona por las células de testículo. Sin embargo todos los MCT, los que fueron tratados con testosterona y los que no fueron tratados, produjeron inhibición en la producción de testosterona cuando estuvo

Curva dosis-respuesta del MCT.

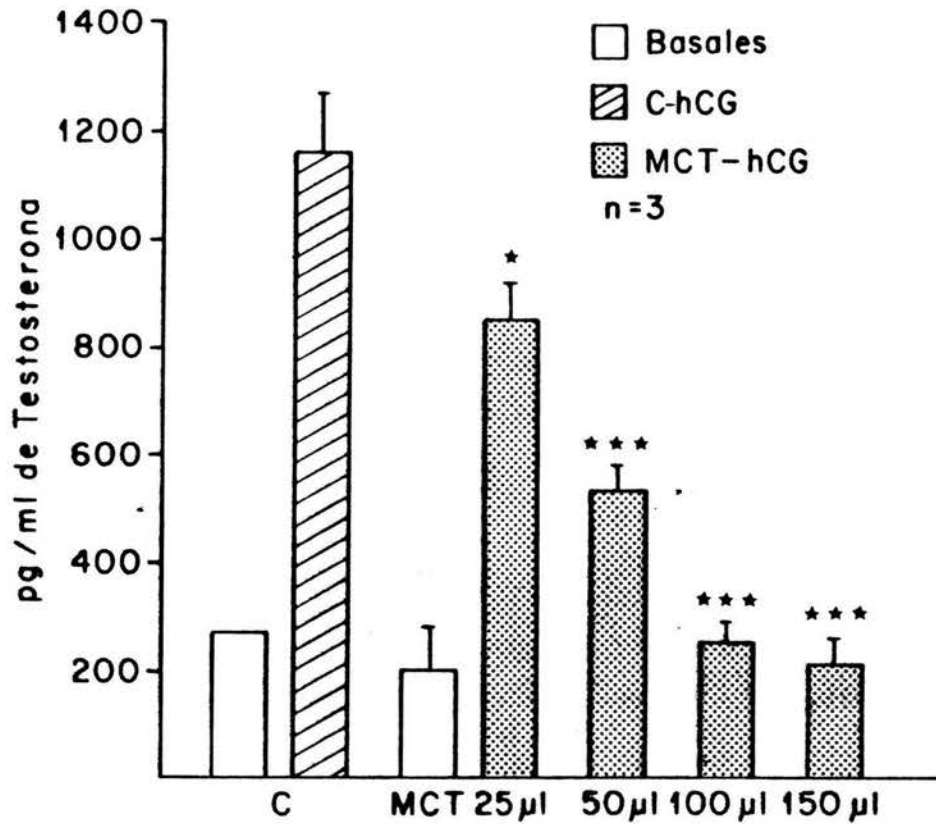


Fig.10. Curva dosis-respuesta al medio condicionado de timo (MCT)

concentrado (10:1), obtenido de monocapas de células epiteliales de timos cultivadas durante 7 días. El efecto de diferentes dosis del MCT sobre la producción de testosterona por las células de testículo de rata adulta, estimuladas con 1mU de hCG, se muestran en las barras punteadas. Los datos expresan la media \pm desviación estándar, con (*) $P < 0.05$, (***) $P < 0.001$ comparandolos con su grupo control (barras rayadas).

presente la hCG sobre las células de testículo (ver Fig.11).

En resumen con los experimentos preliminares presentados en este inciso no se ha podido demostrar una modulación de la producción del factor (o factores) tímico modulador de la función testicular. Sera necesario realizar otros experimentos para obtener consideraciones más certeras sobre este punto.

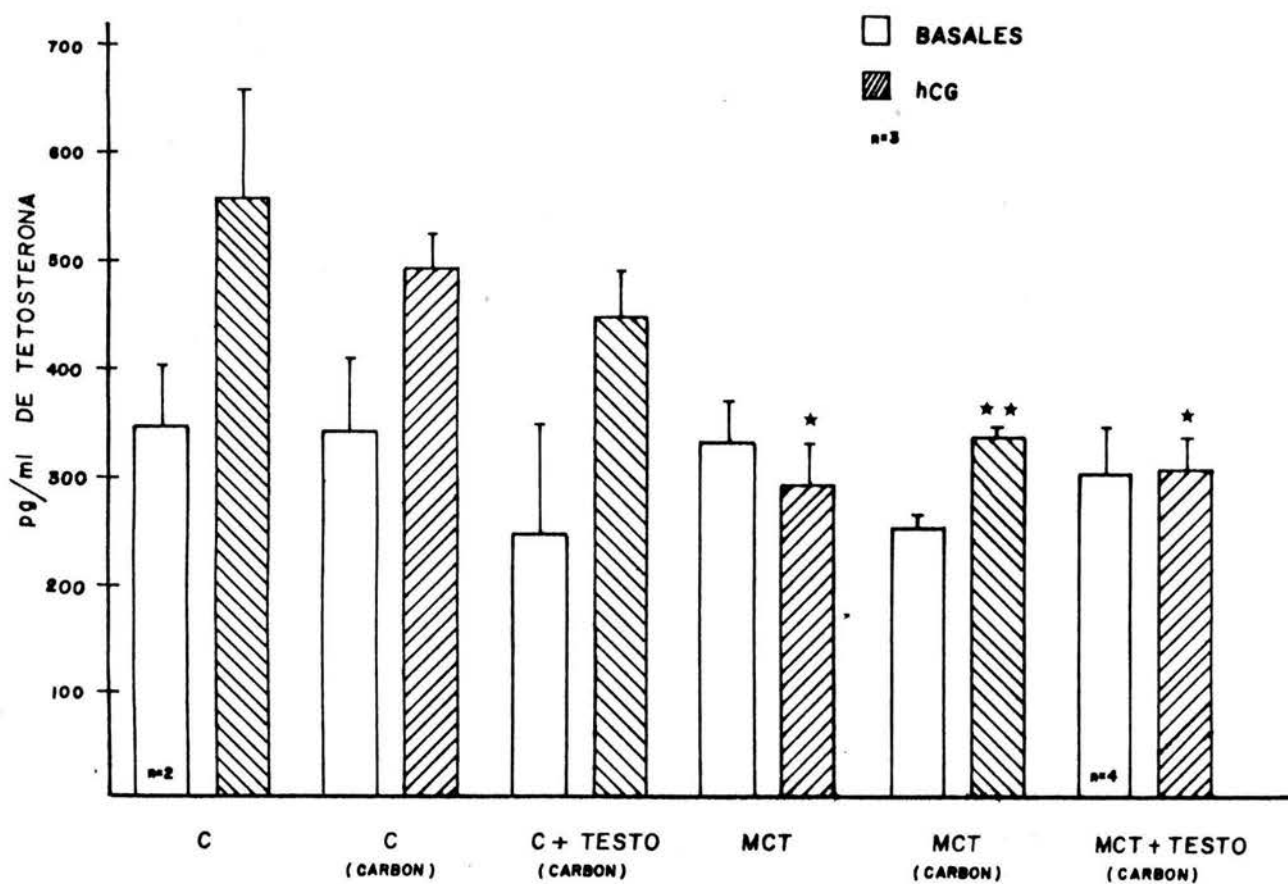


Fig.11. Efecto del medio condicionado de timo (MCT) obtenido de células epiteliales previamente tratadas con 10 ng/ml de testosterona por 48 horas, sobre la producción de testosterona por las células de testículo de rata en condiciones basales y estimulando con 1 mU de hCG. Los datos expresan la media \pm desviación estándar, (*) $P < 0.05$ y (**) $P < 0.01$, comparando cada grupo con su control (C).

Las modificaciones que realizamos a la técnica de cultivo consistió en disociar completamente las células antes de la siembra, esto facilitó que el cultivo estuviera más rápidamente libre de la mayor cantidad de linfocitos. En la mayoría de los trabajos reportados por otros autores, se reporta la siembra de trozos del tejido de timo (Kruisbeek, 1977; Stimson, 1981; Cohen, 1986).

La confluencia celular de los cultivos de timo, se obtuvo alrededor de los 7 días. Sato (1976) reporta que los cultivos de células de timo de ratón consiguen la confluencia en un tiempo semejante al que hallamos nosotros, y en el caso de los cultivos de timo humano se logra hasta los 12 días, (Cohen, 1986).

En nuestro laboratorio y en otros como el de Kruisbeek (1977), Stimson (1981) y Cohen (1986), se ha observado que las células epiteliales constituyen la población más numerosa en este modelo de cultivo primario de timo. Las observaciones realizadas con el microscopio electrónico, de los cultivos de células de timo de 7 días obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que existe un alto porcentaje (90-95 %) de células que presentan propiedades características de los epitelios, es decir abundancia de tonofilamentos y presencia de desmosomas.

Durante los días de cultivo se examinaron las células de timo diariamente y se distinguieron cuatro tipos celulares con características morfológicas diferentes. Unas presentaban forma

fibroblastoide de tamaño pequeño; otras eran de tamaño mediano con largas prolongaciones citoplasmáticas y tendían a formar un retículo entre ellas; otras presentaban prolongaciones parecidas a las dendritas neuronales. El último grupo estaba formado por células pequeñas y redondas que se encontraban flotando en el medio de cultivo, por su apariencia sugerimos que sean linfocitos que no se adhieren al sustrato, y además fueron perdidos cada que se cambiaron los medios de cultivo; algunas de estas células también podrían haber sido células epiteliales que se despegaron del sustrato. Las células que predominaron después de los 5 días de cultivo fueron las células medianas de apariencia reticular. Conforme fue aumentando la población celular en las cajas, estas células formaron monocapas con apariencias reticulares (ver micrografías 1-C y 1-D).

Por trabajos realizados por otros autores se sabe que en el cultivo de timo, la población de fibroblastos es mínima durante los primeros 10 días de cultivo. Kruisbeek (1977) comunica que la contaminación de fibroblastos en los cultivos primarios de células de rata es mínima, en contraste con otros cultivos de ratón, conejo y humano. Por ejemplo en los cultivos de timo humano se hace prominente la contaminación de fibroblastos de los 13 días en adelante (Cohen, 1986).

Observaciones de nuestros cultivos al microscopio de luz y electrónico concordan con dichos resultados. Sin embargo será necesario realizar estudios adicionales para caracterizar completamente las poblaciones celulares.

Como se mostró en la sección de resultados, el medio condicionado

obtenido de los cultivos de células de timo produce una marcada inhibición de la respuesta a la hCG por parte de las células de Leydig. Dado que a los 7 días de cultivo, de los timos disociados, el mayor porcentaje celular está representado por las células reticuloepiteliales, se podría afirmar que este tipo celular es el responsable de la producción y la liberación de un factor (o factores) capaz de modular la producción estimulada de testosterona.

Con la ayuda de anticuerpos otros investigadores han logrado identificar los tipos celulares responsables de la producción de hormonas tímicas y factores relacionados. Tal es el caso de la timulina la cual se ha localizado en las vacuolas de las células epiteliales de corteza y médula del timo (Dardenne y cols., 1974; y Schmitt, 1982). Estos mismos autores han observado que los cultivos de células epiteliales de timo producen timulina, y la secretan al medio (Cohen, 1986).

Los resultados de nuestro laboratorio y los de otros autores nos permiten sugerir que las células reticuloepiteliales del timo que cultivamos son las encargadas de producir el FT de 28 KD, que modula la producción de testosterona en el testículo in vitro.

El efecto del MCT se observa únicamente sobre la secreción de testosterona dependiente de hCG, lo cual sugiere que el factor modula la respuesta a esta hormona interactuando sobre algunos de los sitios activos para esta gonadotropina en la células de Leydig. Por los resultados obtenidos con el factor tímico del fraccionamiento cromatográfico del extracto crudo acetónico de timo, se puede plantear

que en el MCT se encontraría una molécula similar que inhibe competitivamente la respuesta a hCG (Hiriart y Romano, 1986). Sin embargo dado que el MCT es más complejo no se pueden descartar otros mecanismos de acción. Es importante hacer notar que estos otros probables factores activos no modifican la secreción basal de testosterona en este modelo.

El medio condicionado usado como control (MCP), obtenido de las células de piel, o bien no tuvo efecto sobre la producción de testosterona, o bien estimuló marcadamente la producción de este esteroide en ambos casos: basal y el estimulado con hCG, para el caso de los cultivos de 15 días. Estos datos sugieren que el efecto del MCT es particular y que no es el resultado de incubar células de cualquier tipo, ya que el MCP produce modificaciones opuestas a las del MCT. De paso es interesante destacar el efecto del MCP sobre la esteroidogénesis, el que será interesante investigar en el futuro.

Por otra parte, el hecho de que la influencia de los medios condicionados, sea diferente cuando se toma el MCT de cultivos de diferente edad sugiere que podría estar cambiando la población celular, o bien que por alguna razón los tiempos prolongados de cultivo modifican el comportamiento de las células involucradas en el efecto modulador de la esteroidogénesis. Puesto que sabemos que el modelo de cultivo utilizado, es una población enriquecida pero no pura de células reticuloepiteliales, nos parece más probable que los cambios que se producen cuando el cultivo avanza, podrían deberse a que como vemos en el MCP producen un efecto opuesto. Este hecho podría explicar la disminución de la actividad del MCT que se observa cuando se toma de

cultivos de células de 15 días de desarrollo in vitro. Estas interrogantes podrían retomarse en el futuro trabajando con poblaciones más puras de las células del timo.

Puesto que las hormonas esteroides producen disminución en la producción de los factores producidos por el timo, esperábamos que existiera alguna alteración del factor (o factores) que modula la secreción de testosterona en el testículo, por un mecanismo de retroalimentación entre el mismo esteroide y las células del timo. Sin embargo los resultados preliminares expuestos en la figura 11 indican que la testosterona a la concentración de 10 ng/ml de medio no produce cambios ni en las condiciones morfológicas de las células ni en la actividad que tienen el factor en las células testiculares frente a la hCG. El hecho de que aún los medios condicionados tratados con carbón no desapareció la inhibición de la esteroidogénesis, indica que a pesar del tratamiento con carbón, el MCT conserva a la sustancia activa que investigamos. La falta de respuesta de las monocapas al tratamiento con testosterona podría explicarse por la falta de receptores celulares a esta hormona; las células que nos ocupan podrían sin embargo ser sensibles a otras dosis o a otras hormonas esteroides como la dihidrotestosterona, progesterona o estradiol, lo que indica la necesidad de extender estos estudios para profundizar sobre los posibles mecanismos de retroalimentación entre el timo y el testículo.

- El medio condicionado obtenido de células de timo en desarrollo contiene un factor que inhibe la secreción de testosterona inducida por hCG en las células de Leydig de rata adulta, sin afectar la secreción basal de esta hormona.

- Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que las células reticuloepiteliales del timo son las encargadas de producir el factor que modula la secreción de testosterona en las células de Leydig.

- El medio condicionado de piel no produce inhibición en la producción de testosterona, por el contrario estimula la producción de dicha hormona cuando es tomado de cultivos de 15 días.

- La testosterona a la concentración de 10 ng/ml de medio en las células de timo, no produce cambios aparentes en la producción y/o la actividad inhibitoria del MCT que inhibe la producción estimulada de testosterona en las células de Leydig.

Aguilera G. y Romano M.

Las células epiteliales de timo en cultivo modulan la secreción de esteroides en las células de ovario de rata in vitro.

XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Queretaro 1988.

(cartel No. 93: enviado a publicación a la revista Journal of Endocrinology)

Alastair J. Cunningham

Understanding Immunology

Academic Press New York, p.p. 254: 1978.

Allen S.L., McClure E.J., Goldstein L.A., Barkley S.M. and Michael D.S.

Estrogen and Thymic hormone Interactions in the Female Mouse.

Journal of Reproductive Immunology, 6: 25-37: 1984.

Bedolla Tovar N., Ulloa-Aguirre A., Landeros V. J., y

Pérez-Palacios G. (1984).

Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis.

I. Guía para la evaluación de resultados.

Rev. Invest. Clin. Mexicana 36: 179-192.

Besedovsky O.H. and Sorkin E.

Thymus Involvement in Female Sexual Maturation

Nature, 249: 356-358: 1974.

Besedovsky O. H., del Rey E. Adriana and Sorkin Ernest.

Immune-Neuroendocrine Interactions.

The Journal of Immunology, 135: 2: 750s-754s: 1985.

Chiodi Hugo.

EL TIMO; En Relación con el Crecimiento y la Función Sexual.

- Editorial: "EL ATENEO", Buenos Aires, 1938.
- Cohen Sylvia, Berrih Sonia, Mireille Dardenne and Bach Francois Jean.
Feedback Regulation of the Secretion of a Thymic Hormone (thymulin) by
Human Thymic Epithelial Cells in Culture.
Thymus, 8: 109-119: 1986.
- Comsa J., Leonhardt H. and Ozminski K.
Hormonal Influences on the Secretion of the Thymus.
Thymus, 1: 81-93: 1979.
- Cowan K.W., MRCP D. M. (Ed) and Sorenson George M.D.
Electron Microscopic Observations of Acute Thymic Involution Produced
by Hydrocortisone.
Lab. Investigation, 13: 4: 353-370: 1964.
- Dardenne M., Papiernik M., Bach J.F. and Stutman O.
Studies on Thymus Products: III Epithelial Origin of the Serum Thymic
Factor.
Immunology, 27: 299-304: 1974.
- Deschaux P., Binimbi Massengo and Fontanges R.
Endocrine Interactions of the Thymus with the Hypophysis, Adrenal and
Testes: Effects of two Thymic Extracts.
Thymus, 1: 95-108: 1979.
- Dougherty F. Thomas.
Effect of Hormones on Lymphatic Tissue.
Physiological Reviews, 32: 4: 379-401: 1952.
- Dufau Maria L.
Endocrine Regulation and Communicating Functions of the Leydig Cell.
Ann. Rev. Physiol., 50: 483-508: 1988.
- Dufau M.L., Winters C.A., Hattori M., Aquilano D., Baranao J.L., Nozu

- K., Bauka A. and Catt K.J.
Hormonal Regulation of Androgen Production by the Leydig Cell.
J. Steroid Biochem, 20: 161-173: 1984.
- Duijvestijn M.A. and Hoefsmit M.E.C.
Ultrastructure of the Rat Thymus:
The Micro-Environment of T-Lymphocyte Maturation.
Cell. Tissue. Res., 218: 279-292: 1981.
- Fitzpatrick, F.T.A., Kendall, M.D., Wheeler, M.J., Adcock, I.M. and
Greenstein, B.D. (1985).
Reappearance of the thymus of ageing rats after orchidectomy.
Journal of Endocrinology 107, 223-229.
- Goldstein A.
Thymic Hormones and Lymphokines.
Plenum Press, 1984.
- Gonzales del Pliego Olivares Margarita Virginia
Desarrollo de la cubierta celular de las células Neuro-Gliales de
embrión de pollo en cultivo.
Tesis de maestría en Ciencia-Biológicas UNAM. Facultad de Ciencias del
departamento de Biología (1983).
- Gordon Malcolm S.
Fisiología Animal: Principios y Adaptaciones.
Editorial: C.E.C.S.A. México, 1979.
- Grossman J. Charles, Nathan Paul, Taylor B. Brandon and Sholiton J.
León.
Rat Thymic Dihydrotestosterone Receptor.
Steroids, 34: 5: 539-553: 1979.
- Grossman J. Charles.

Regulation of the Immune System by Sex Steroids.

Endocrine Reviews, 5: 3: 435-455: 1984.

Haelst Van U.

Light and Electron Microscopic Study of the Normal and Pathological Thymus of the Rat.

II. The Acute Thymic Involution.

Zeitschrift für Zellforschung, 80: 153-182: 1967.

Hall R. Nicholas, McGillis P. Joseph, Spangelo L. Bryan and Goldstein L. Allan.

Evidence that Thymosins and other Biologic Response Modifiers can Function as Neuroactive Immunotransmitters.

The Journal of Immunology, 135: 2: 806s- 811s: 1985.

Ham R., and Mc Keehan, W., (1979).

Media and Growth requirements.

Methods in Enzimology, 58: 44-93.

Ham W. Arthur

Tratado de Histología

Septima Edición, Editorial: Interamericana, 1975.

Harbour-McMenamin D., Smith M. Eric and Blalock Edwin.

Production of Immunoreactive Chorionic Gonadotropin During Mixed Lymphocyte Reactions: a Possible Selective Mechanism for Genetic Diversity.

Cell Biology, 83: 6834- 6838: 1986.

Healy L. David, Bacher John and Hodgen D. Gary.

Thymic Regulation of Primate Fetal Ovarian-Adrenal Differentiation.

Biology of Reproduction, 32: 1127-1133: 1985.

Hiriart M. and Romano M. C.

Human Chorionic Gonadotropin Binding to Rat Testis Receptors is Inhibited by Thymus Factor.

Life Sciences, 38: 789-795: 1985.

Hirokawa Katsuike, McClure John E. and Goldstein L. Allan.

Age- Related Changes in Localization of Thymosin in the Human Thymus. Thymus, 4: 19-29: 1982.

Hoshino Takeshi.

Electron Microscopic Studies of the Epithelial Reticular Cells of the Mouse Thymic.

Zeitschrift f"r Zellforschung, 59: 513-529: 1963.

Ito Takashi and Hoshino Takeshi.

Histological Changes of the Mouse Thymus During Involution and Regeneration Followin Administration of Hidrocortisone.

Zetschrift f"r Zellforschung, 56: 445-464: 1962.

JanKovic B.D., Isakovic Katarina, Micic Mileva and Znezevic Z.

The Embryonic Limpho-Neuro-Endocrine Relationship.

Clin. Immunology and Immunopathology, 18: 108-120: 1981.

Khan Amanullah

Thymic Hormones and Immunoepptides.

Annals of Allergy, 41: : 1978.

Kretser, D.M.,Burger,H.G. and Hudson

The Pituitary and Testis: Clinical and Experimental Studies

Monographs on Endocrinology volume 25 (1983).

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.

Kruisbeek Ada M., Kröse Tonny C.J.M. and Zijistra Jelly J.

Increase in T Cell Mitogen Responsiveness in Rat Thymocytes by Thymic Epithelial Culture Supernatant.

European Journal Immunol, 7: 375-381: 1977.

Langman Jan.

Embriología Médica, tercera edición

Editorial: Interamericana, 1976.

Linter-Moore Sue.

Ovarian Development in Athymic Nude Mice

I. The size and Composition of the follicle population.

Mechanisms of Ageing and Development, 4: 385-390: 1975.

Linter-Moore Sue.

Ovarian Development in Athymic Nude Mice.

II. The Growth of the Oocyte and Follicle.

Mechanisms of Ageing and Development, 4: 391-398: 1975.

Masuda A., Nishimoto Y., Morita T. and Matsuyama M.

Dexametasone-induced changes in morphology and Keratin organization of rat thymic epithelial cells in primary culture.

Exp. Cell. Research. 160: 343-355: 1985.

Mendelson C., Dufau M. and Catt K (1975).

Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine

3'-5'-monofosphate and testosterone production in isolated Leydig cells.

J. Biol. Chem. 250:(22): 8818-8823.

Mendoza G. Ma. E.

Modulación de la producción de gonadotropinas por agentes del sistema inmunológico en las células de adenohipofisarias en cultivo.

Tesis doctoral en la especialidad de fisiología y biofísica del

CINVESTAV-IPN, junio de 1988 (En prensa para la revista Thymus) .

Michael Sandra D.

The Role of the Endocrine Thymus in Female Reproduction.

Arthritis and Rheumatism, 22:(11): 1241-1245: 1979.

Michael S.D., Taguchi O. and Nishizuka Y.

Effect of Neonatal Thymectomy on Ovarian Development and Plasma LH,
FSH, GH and PRL in the Mouse.

Biology of Reproduction, 22: 343-350: 1980.

Morgan David D. and Grossman Charles J.

Studies on the Cytosolic Estrogen Receptor from Rat Thymus.

Thymus, 7: 279-286: 1985.

Nabarra B. and Adrianarison I.

Ultrastructural Studies of Thymic Reticulum:

Epithelial Component.

Thymus, 9:95-121: 1987.

Neta Ruth, Schuwartz Gretchen N., MacVittie J. and Douches Susan D.

Thymic Hormones in Thymus Recovery from Radiation Injury.

Experimental Hematology Today-1985.

Edited by S.J.Baun, D.H. Pluznik, L.A. Rozenszajn. Springer-Verlag, New
York Inc.

Nishizuka Yasuaki and Sakakura Teruyo.

Thymus and Reproduction:

Sex Linked Dysgenesis of the Gonad After Neonatal Thymectomy in Mice.

Science, 166: 753-755: 1969.

Nishizuka Y. and Sakakura T.

a). Ovarian Dysgenesis Induced by Neonatal Thymectomy in the Mouse.

Endocrinology, 89: 886-893: 1971.

Nishuzuka Yasuaki and Sakakura Teruyo.

b). Effect of Combined Removal of Thymus and Pituitary on Pos-natal

Ovarian Follicular Development in the Mouse.

- Endocrinology, 89: 902-903: 1971.
- Oates K. Karen and Goldstein Allan L.
Thymosins: Hormones of the Thymus Gland.
TIPS- August: 347-352: 1984.
- Pedernera E., Aguilar M.C. and Romano M.
A Factor from Bursa of Fabricius Inhibits in vitro the Chorionic
Gonadotropin Response of the Chick Testis.
General and Comparative Endocrinology, 57: 124-129: 1985.
- Pedernera E., Díaz-Osuna J. and Calcagno M.
A thymus Factor Influences the in vitro Testosterone Secretion of
Leydig Cells in the Rat.
Life Sciences, 38: 779-787: 1986.
- Pierpaoli W. and Besedovsky H.O.
Role of the Thymus in Programming of Neuroendocrine Functions.
Clin. Exp. Immunol, 20: 323-328: 1975.
- Pierpaoli W. and Sorkin E.
Hormones, Thymus and Lymphocyte Functions.
Specialia, 15: (11): a385-1389: 1972.
- Playfair J.H.L.
La Inmunología en Esquemas.
Primera Edición, Editorial: Alhambra, España, 1983.
- Porrás Villalobos Graciela
Purificación parcial de una proteína de timo que modula la liberación
de testosterona en el testículo de la rata.
Tesis de maestría en la especialidad de fisiología y biofísica del
CINVESTAV-IPN, México, junio de 1988.
- Rebar Robert W.

Effects of Thymic Peptides on Hypothalamic-Pituitary Function.
Thymic Hormones and Lymphokines, Edited by Allan L. Goldstein.
Plenum Publishing Corporation, 1984.

Rebar Robert W., Morandini I.C., Benirschke Kurt, and Petze John E.
Reduced Gonadotropins in Athymic Mice: Prevention by Thymic
Transplantation.
Endocrinology, 107: (6): 2130-2132: 1980.

Rebar Robert W., Morandini I.C., Erickson F. and Petze John E.
The Hormonal Basis of Reproductive Defects in Athymic Mice: Diminished
Gonadotropin Concentrations in Prepuberal Females.
Endocrinology, 108: (1): 120-126: 1981.

Rebar Robert W., Morandini I.C., Petze John E. and Erickson Gregory F.
Hormonal Basis of Reproductive Defects in Athymic Mice: Reduced
Gonadotropins and Testosterone in Males.
Biology of Reproduction, 27: 1267-1276: 1982.

Reyes-Asparza J. A.

Efecto de la edad sobre la liberación del Factor Tímico que inhibe la
acción de la hCG sobre la célula de Leydig en la rata.
Abstrac No. 051 del XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas,
Queretaro, agosto 1988.

Roitt Ivan M.

Essential Immunology.
Fifth Edition Blackwell Scientific Publications.
Oxford London, 1984.

Romano M., Aguilar, M.C., Méndez, M.C. and Pedernera, E. (1981)
Bursa of Fabricius produces in vitro a factor which inhibits the
chorionic gonadotropin response of the newly hatched chick testis.

J. Steroid Biochem, 15: 429-432.

Sakakura Teruyo and Nishizuka Yasuaki.

Thymic Control Mechanism in Ovarian Development: Reconstitution of Ovarian Dysgenesis in Thymectomized Mice by Replacement with Thymic and Other Lymphoid Tissues.

Endocrinology, 90: 431-437: 1972.

Sato Vicki L., Samuel Waksal D. and Herzenberg Leonard A.

Identification and Separation of Pre T-Cells from nu/nu Mice: Differentiation by Pre-Culture with Thymic Reticuloepithelial Cells. Cellular Immunology, 24: 173-185: 1976.

Savino W., E.Bartoccioni, F. Homo-Delarche, M.Cl. Gagnerault, T. Itoh and M. Dardenne.

Thymic hormone containing cells-IX. Steroids in vitro modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells.

J. Steroid. Biochem. Vol. 30:(1-2): 479-484, 1988.

Schmitt D., Monier J.C., Dardenne M., Pleau J.M. and Bach J.F.

Location of FTS (Facteur Thymique Serique) in the Thymus of Normal and Auto-Immune Mice.

Thymus, 4: 221-231: 1982.

Schuurman H.J., Van de Wijngaert F.P., Delvoe L., Broekhuizen R., McClure J.E., Goldstein A.L. and Kater L.

Heterogeneity and Age Dependency of Human Thymus Reticuloepithelium in Production of Thymosin Components.

Thymus, 7: 13-23: 1985.

Snow E. Charles

Insulin and Growth Hormone Function Minor Growth Factors that Potentiate Lymphocyte Activation.

- The Journal of Immunology, 135:(2): 776s-778s: 1985.
- Spangelo Bryan L., Judd Allan M., Ross Philip C., Login Ivan S., Jarvis W. David, Badamchian Mahnaz, Goldstein Allan and MacLeod Robert M.
Thymosin Fraction 5 Stimulates Prolactin and Growth Hormones Release from Anterior Pituitary Cells in vitro.
Endocrinology, 121:(6): 2035-2043: 1987.
- Steinberger Anna and Steinberger Emil.
Testicular Development, Structure and Function.
Raven Press- New York, 1980.
- Stimson W.H. and Crilly P.J.
Effects of Steroids on the Secretion of Immunoregulatory Factors by Thymic Epithelial Cell Cultures.
Immunology, 44: 401-407: 1981.
- Tahka K.M.
Current Aspects of Leydig Cell Function and its Regulation.
J. Reprod. Fert., 78: 367-380: 1986.
- Tonegawa Susumu.
Moléculas del Sistema Inmunitario
Edición Española del Scientific American, No. 111: 1985.
- Tortora Gerard J. y Nicholas P. Anagnostakos.
Principios de Anatomía y Fisiología.
Editorial: H:A:R:L:A:, 1977.
México, Buenos Aires, Bogotá, Sao Paulo.
- Thurman G.B., Ahmed A., Strang D.M., Gershwin M.E., Steinberg A.D. and Goldstein A.L.
Thymosin-Induced Increase in Mitogenic Responsiveness of Lymphocytes of C57BL/6L, NZB/w and Nide Mice.

Transplant Proc., 7: 299- : 1975.

Trainin N.

Thymic Hormones and the Immune Response.

Physiological Reviews, 54: 2: 272-315: 1974.

Weigent Douglas A. and Blalock Edwin J.

Interactions Between the Neuroendocrine and Immune Systems: Common
Hormones and Receptors.

Immunological Reviews, 100: 79-108: 1987.

Willis-Carr Judith I., Ochs Hans D. and Wedgwood Ralph J.

Induction of T-lymphocyte Differentiation by Thymic Epithelial Cell
Monolayers.

Clinical Immunology and Immunopathology, 10:315-324: 1978.

Windle Williams F.

HISTOLOGIA, Quinta Edición: 1977.

Editorial: McGraw-Hill Latinoamericana S.A.

Glosario de palabras clave.

- Bioensayo de células de testículo, consiste en mantener "in vitro" a las células durante un periodo corto (2 horas en este caso), y hacer el estudio de su actividad biológica (en este caso cuantificamos la testosterona producida).
- Cultivo Primario, es aquel donde las células cultivadas, fueron extraídas del órgano del animal íntegro.
- Desmosomas, estructuras características que se encuentran entre las uniones de los epitelios. Están formados principalmente por proteínas como las queratinas y desmoplaquinas.
- Gónadas, glándulas sexuales (testículos/ovarios), las cuales secretan hormonas que regulan el desarrollo y maduración de las células germinales, así como también el desarrollo de los órganos sexuales secundarios y el comportamiento sexual del individuo.
- Gonadotropinas, hormonas peptídicas cuyo órgano blanco son las gónadas.
- Hipófisis, se encuentra en el cerebro y la cual es responsable de secretar varios tipos de hormonas peptídicas que regulan, entre otras, las funciones las células del páncreas, gonadas, tiroides, etc.
- Hormonas Tímicas, producidas por el timo, las cuales juegan un papel muy importante en las señales de regulación y maduración de las células que forman el sistema inmune humoral y el celular.
- Involución Tímica, fenómeno en el cual se lleva a cabo un

reemplazamiento del tejido linfoepitelial del timo por tejido adiposo, conforme avanza la edad. Los factores que la regulan aún no se han determinado concretamente, pero existen muchas evidencias de que puedan ser, entre otros, los esteroides sexuales.

- Leydig-células, son células testiculares pertenecientes al tejido intersticial, las cuales son las encargadas de producir y secretar testosterona, fundamentalmente.

- Linfocitos T, células pequeñas las cuales maduran en el timo, se encargan de la inmune mediada por células, y regulan la inmunidad humoral.

- Linfoepitelial, tejido formado por epitelio y células linfocíticas.

- Medio Condicionado de Timo, medio obtenido de monocapas de células ya desarrolladas, después de 7 o 15 días que son sembradas.

- Medio de Incubación, medio obtenido de la producción y metabolismo tejido fragmentado, los cuales han sido incubados por un periodo corto de tiempo (horas).

- Radioinmunoanálisis, técnica de investigación, en la cual se utilizan sustancias radiactivas (iones, proteínas, esteroides, etc.) para estudiar y cuantificar cantidades muy pequeñas de sustancias que participan en los fenómenos fisiológicos.

- Reticulo-epitelial, característica de las células epiteliales tímicas, las cuales tienden a formar redes tridimensionales entre ellas.