

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

"EFECTO DEL ALFA-INTERFERON SOBRE EL  
OVARIO DE RATA EN DESARROLLO"

TESIS QUE PRESENTA:

JORGE MORALES MONTOR

Para obtener el grado de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA



México, D.F. Noviembre de 1991



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.

El presente trabajo fué realizado, bajo la asesoría de la Doctora Marta Catalina Romano Pardo, en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Durante el desarrollo de esta tesis, el alumno fué apoyado, mediante una beca otorgada por el CONACYT (No. de registro 61253).

### DEDICATORIAS:

A mi padre Jorge, por ser un ejemplo de superación constante, paciencia y por estar conmigo incondicionalmente dándome su apoyo en todo momento.

A mi madre Maria de Lourdes, por ser mi consejera en la vida y mi mejor amiga.

A mis hermanos Monica, Gustavo, Santa, Oscar y Luis por su cariño y apoyo incondicional.

A la P. de Biol. Lidia Baylon Pacheco, por todos estos bellos momentos compartidos, su cariño incondicional y por ser alguien muy especial en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS:

A la Doctora Marta Catalina Romano Pardo, por haberme brindado todo el apoyo académico durante mi estancia en su laboratorio y por los consejos que me dió.

A la Doctora Maria Eugenia Mendoza Garrido, por sus valiosas sugerencias y el tiempo que me dispensó para aclarar mis dudas.

A la Bióloga Patricia Candelaria Silva, con quién realizé la primera parte de los experimentos de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Dolores, Graciela, Jorge, Adriana y Carolina, por el tiempo que compartimos en el laboratorio.

A Jesus y Armando, por proporcionarme el material necesario para mi trabajo y por su amistad.

Al P. de Biol. Javier Pello Pineda quién a lo largo de la carrera y durante la realización de esta tesis me apoyó incondicionalmente y me brindo su amistad desinteresada.

A los Biólogos Marco Antonio Magos Castro y Veronica Ivonne Hernández por todos esos momentos agradables compartidos.

A la Q.F.B. Iris Alejandra Rojas Eisenring, quién colaboró de manera determinante y con especial interés en la realización de las figuras que aparecen en esta tesis. A si mismo, le agradezco el cariño que me ha ofrecido desinteresadamente.

Al Biólogo Francisco Sierra, quién además de brindarme su amistad me ayudó en la elaboración del material fotográfico.

## INDICE

1 .- INTRODUCCION .....	1-39
1.1.1 Estructura y Funcion del ovario.....	1-6
1.1.2 Control de la función ovárica .....	6
1.1.3 Hormonas ováricas y clases de esteroides foliculares.....	6-12
1.1.4 Células esteroidogénicas y su control por gonadotrofinas...	12-17
1.1.5 Mecanismo de acción de hormonas esteroides.....	17-19
1.2.1 Ciclo del estro en la rata.....	19-21
1.2.2 Secreción de esteroides ováricos durante el ciclo.....	21-22
1.2.3 Secreción de gonadotrofinas durante el ciclo.....	22-24
1.3.1 Inmunidad.....	25-26
1.3.2 El timo.....	26-28
1.3.3 Papel general del timo.....	28-29
1.3.4 Maduración inmunológica del timo.....	29
1.3.5 Hormonas y factores tímicos.....	29-32
1.4.1 Los Interferones.....	32-35
1.4.2 Mecanismo de acción de los Interferones.....	35-37
1.4.3 Efecto sobre células endocrinas.....	37-39
2.- ANTECEDENTES.....	40-44
3.- HIPOTESIS.....	45
4.- OBJETIVOS.....	46
5.- MATERIALES Y METODOS.....	47-55
5.1 Obtención de células de ovario.....	47-48
5.2 Bioensayo de células de ovario (Curva dosis-respuesta a hCG).	47-49
5.3 Curva temporal a hCG.....	49-50
5.4 Extracción de esteroides con éter.....	50

5.5 Bioensayo de células de testículo.....	50-52
5.6 Bioensayo de ovario con alfa-IFN: Efecto de dosis y tiempo de exposición.....	52-53
5.7 Determinación de esteroides.....	53-54
5.8 Determinación de la viabilidad celular.....	54-55
5.9 Análisis de resultados.....	55
6.- RESULTADOS.....	56-69
6.1 Secreción de testosterona en ovario de animales de 21 días...	56-58
6.2 Secreción de estradiol en ovario de animales de 21 días.....	58-59
6.3 Curva temporal de la producción de testosterona en el ovario de 21 días.....	59-61
6.4 Curva temporal de la producción de estradiol en el ovario de 21 días.....	60-63
6.5 Respuesta del testículo adulto al alfa-IFN.....	63-65
6.6 Efecto del alfa-IFN sobre la secreción de testosterona en el ovario de 21 días.....	65-67
6.7 Efecto del alfa-Interferón sobre la secreción de estradiol en el ovario de 21 días.....	67-69
7.- DISCUSION.....	70-77
8.- CONCLUSIONES.....	78-79
9.- LISTA DE ABREVIATURAS.....	80
10.- REFERENCIAS.....	81-91

## INTRODUCCION

### 1.1.1- ESTRUCTURA Y FUNCION DEL OVARIO

Los ovarios de los mamíferos son órganos pareados, aproximadamente iguales en tamaño y funcionalidad, excepto en algunas especies de mamíferos en los cuales sólo es funcional el derecho. Se encuentran dentro de la cavidad abdominal o pélvica y están unidos por un mesenterio (el mesovario) a la parte dorsal de las trompas de Falopio.

Los ovarios pueden estar envueltos dentro de una cápsula peritoneal, la cual varía considerablemente en el desarrollo y en la extensión con la cual se comunica a la cavidad celómica (Zuckerman, 1962).

En el hilio, el tejido conectivo vascular del mesovario se continúa con el estroma ovárico. La cubierta peritoneal del mesovario termina de manera repentina en el hilio y es sustituida por una capa de células cúbicas, el epitelio germinal, que cubre la superficie libre del ovario. Esta especialización del mesotelio peritoneal descansa sobre una delgada lámina basal. En este lugar bajo el epitelio, hay una capa mal delimitada de tejido conectivo denso, la túnica albugínea, cuya densidad aumenta con la edad (Leeson et al, 1987).

En los cortes del ovario se pueden distinguir dos zonas, una externa, la corteza, y una interna, la médula, que se fusiona con el tejido vascular del mesovario en el hilio. No hay una línea clara de separación entre las dos zonas. La médula consta de tejido conectivo fibroelástico laxo que contiene numerosos vasos sanguíneos, linfáticos y nervios grandes. El estroma contiene bandas diseminadas de fibras musculares lisas. La corteza consta de un estroma celular compacto que contiene los folículos ováricos. El estroma está formado por redes de fibras reticulares y células fusiformes dispuestas en espirales

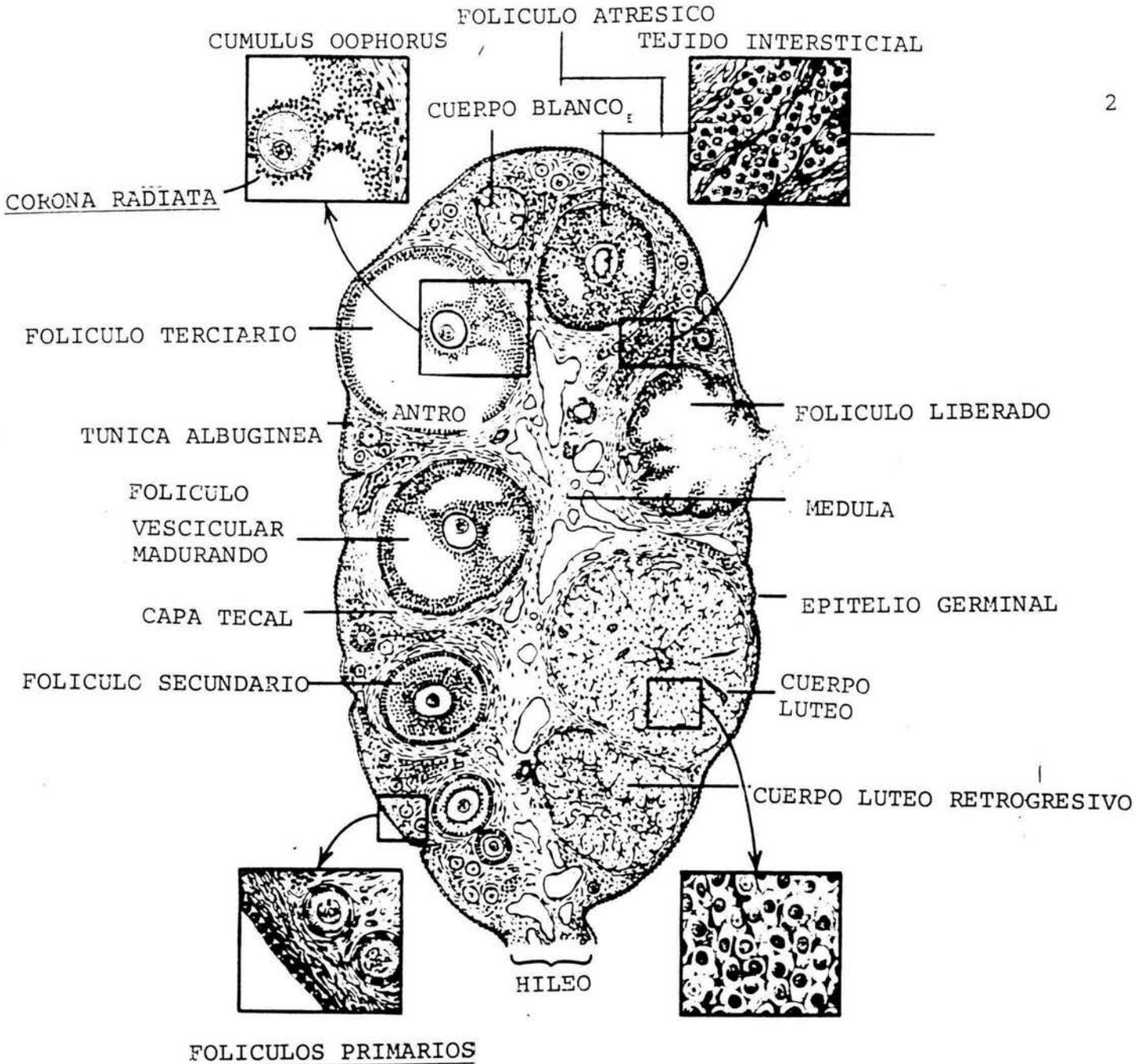


Figura # 1.- Estructura de un ovario de mamífero. Se muestran los diferentes estados de desarrollo folicular a través de la ovulación, formación del cuerpo luteo y regresión del mismo.  
Tomada de Hamm (1975)

de la teca. El tejido elástico es escaso y se encuentra sólo en las paredes de los vasos sanguíneos. Se pueden observar folículos en todas las etapas de su desarrollo, y el aspecto de la corteza ovárica depende de la edad y de la etapa del ciclo ovárico. Antes de la pubertad sólo se observan folículos primarios o primitivos. La madurez sexual se caracteriza por la presencia de folículos en crecimiento y sus productos finales (cuerpos amarillos y folículos atrésicos).

El ovario adulto presenta diferentes tipos celulares, como las células de la teca interna y de la granulosa, las cuales son responsables de la producción hormonal (Figura 1).

Desarrollo del ovario de la rata:

Debajo de la cápsula ovárica existen, desde el nacimiento numerosos folículos primordiales, cada uno conteniendo un óvulo inmaduro. Que el ovario alcance la madurez funcional depende de que se lleven a cabo tres eventos principales durante estadios tempranos de la gonadogénesis. Estos eventos son: la iniciación de la meiosis, la formación de los folículos, y la diferenciación de las células productoras de esteroides. En el primer evento el óvulo intrafolicular progresa a través de la vida fetal en la profase I deteniéndose en estadio de dictioteno, que se alcanza a los 4 días después del nacimiento en la rata. Este estado se caracteriza por la presencia de un núcleo que presenta la cromatina condensada (vesícula germinal) la cual contiene el número cromosómico diploide ( $n=42$ ), y un nucleolo peculiar (Zuckerman, 1963). El oocito permanece en ese estado de descanso meiótico de los cromosomas hasta que es seleccionado para su maduración en el adulto, después de la cual el oocito seleccionado para su maduración se reducirá al número cromosómico haploide ( $n=21$ ).

ovárico. Se llama así al conjunto formado por el ovocito rodeado de una o varias capas de células que interactúan con el y participan en la producción de esteroides sexuales.

Las células epiteliales foliculares se derivan del estroma embrionario.

El oocito rodeado de una sola capa de células de la granulosa y desprovisto de membrana vitelina, recibe el nombre de folículo primordial si estas son planas o folículo primario cuando éstas se vuelven cúbicas. Las células de la granulosa son las que se multiplican con gran rapidez en la maduración del oocito. La capa circular inmediata al oocito, da origen a dos o tres capas más de células; entonces, el oocito adquiere una membrana limitante y el folículo se llama folículo secundario.

Al iniciarse cada ciclo, varios de estos folículos se agrandan y se forma una cavidad alrededor del óvulo denominada antro, que es la parte central de una esfera de células. Cuando aparece este espacio interno, el folículo recibe el nombre de folículo terciario. El oocito conserva una cubierta protectora de granulosa que lo cubre en todo su rededor y recibe el nombre de corona radiada. Al incrementar el volumen del líquido el oocito nunca flota en él; por el contrario, está fijo a la pared interna del folículo, generalmente en el lado más cercano al hilio o alejado de la superficie del ovario (Hamm, 1975). El conjunto de células granulosas que se mantiene en contacto con el oocito reciben el nombre de cumulus ophorus. En este periodo de desarrollo, toda la granulosa ha aumentado de número por simple mitosis y hay una gran actividad secretora hacia el interior del líquido folicular. Este desarrollo folicular, originado por la multiplicación de las células de la granulosa, eventualmente hace presión sobre el tejido del interior

cápsula externa originaria de ese tejido de sostén del interior del ovario, esta cápsula es la denominada teca que a mayor desarrollo se subdivide en dos capas: una glandular y vascular, la teca interna y otra en que predomina el tejido conjuntivo, la teca externa. A todo el conjunto celular que hemos descrito, después que se empieza a acumular líquido se le denomina folículo de Graff. En su máximo desarrollo el folículo vuelve a invadir la corteza de donde salió originalmente y forma una protuberancia sobre la superficie del ovario, se reduce la fortaleza de la teca y ocurre la ovulación (Figura 1). Las células de la teca interna del folículo grafiano son la fuente primaria de la producción de estrógenos (Knobil, 1988). El fluido contenido en el antro, el licor folicular, se incrementa en volumen a medida que el proceso de ovulación avanza. Las células de la teca externa, finalmente contienen tejido contráctil el cual se cree juega un papel importante durante la ovulación (Zuckerman, 1962 y 1963). Durante el proceso de maduración y crecimiento del folículo, el oocito ha crecido únicamente en el primer impulso. Es decir que su gran volumen se debe al líquido que rodea al oocito (en los mamíferos); pero el oocito ha desarrollado una cápsula propia, no celular, transparente y que no cambia de volumen (hasta después de la ovulación y la fertilización) que es la denominada zona pelúcida. Esta zona está compuesta de mucopolisacárido y es relativamente rígida con respecto al exterior de la membrana del oocito (Zuckerman, 1962, de Alba, 1985). Después de la ovulación, el espacio total ocupado por el folículo, se transforma en el mamífero en un tejido totalmente diferente, con vascularización interna y con funciones endócrinas. Este es el cuerpo amarillo o cuerpo lúteo sucesor del folículo. Ahora, el espacio está ocupado por células de un solo tipo,

colapso del folículo. Las células luteínicas en su estado funcional conservan su forma poliédrica con núcleo distintivo y pigmento amarillo. De este estado pasan a un control degenerativo, al empezar la absorción del cuerpo amarillo y finalmente la reducción completa del volumen luteínico y pérdida total del color amarillo. La huella de un cuerpo lúteo en el ovario se conoce como corpus albicans ó cuerpo blanco (Hamm, 1975, Knobil, 1988).

#### 1.1.2.- CONTROL DE LA FUNCION OVARICA

La FSH (hormona folículo estimulante) proveniente de la hipófisis es la encargada de la maduración temprana de los folículos ováricos, y FSH junto con LH (hormona luteinizante) completan la maduración de los mismos. La fase rápida de secreción de LH es la que desencadena la ovulación y la formación inicial del cuerpo lúteo. Ocurre también una fase rápida más pequeña de secreción de FSH a mitad del ciclo pero al momento no se ha dilucidado su importancia. Por otro lado, la LH estimula la secreción de progesterona. (LLoyd,1979)

El control hipotalámico de la liberación de LH y FSH es ejercido por la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) que a través de los vasos porta llega a la hipófisis. La liberación de GnRH es pulsátil y esta característica es esencial para que suceda una secreción normal de gonadotrofinas (Figura 2).

#### 1.1.3.-HORMONAS OVARICAS Y CLASES DE ESTEROIDES FOLICULARES

Los folículos son las principales unidades funcionales del ovario de la hembra. La función de cada folículo es la de proveer el sistema de soporte nutricional necesario para la célula germinal, el oocito.

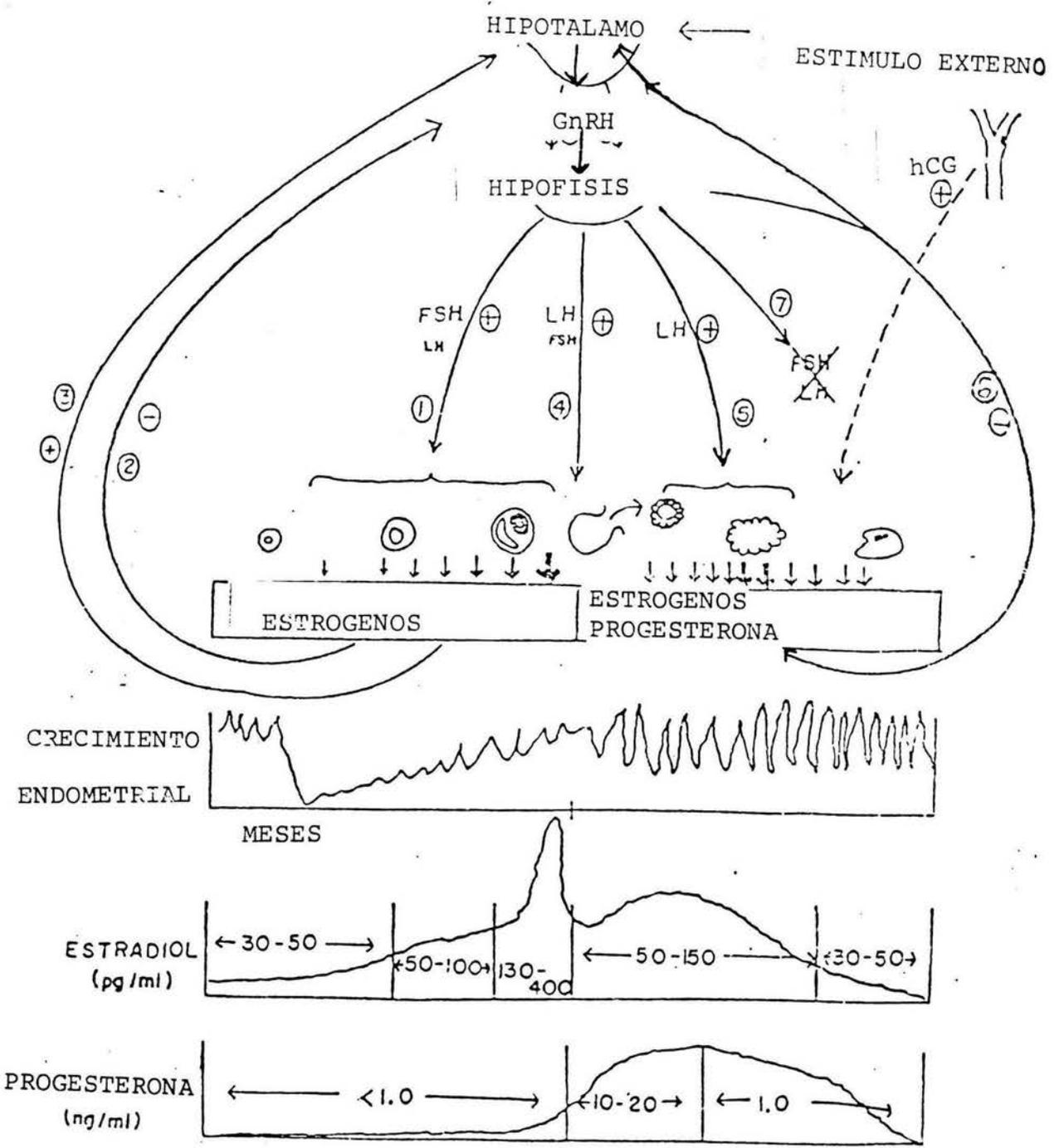


Figura 2.-- Representación esquemática de las interacciones hipotálamo-hipófisis-ovario durante un ciclo ovulatorio de mamífero. El hipotálamo libera factores liberadores de gonadotropinas (GnRH), que estimulan la liberación de LH y FSH por la hipófisis. La FSH (1) actúa a nivel del folículo, estimulando su maduración, mientras que la LH actúa sobre la formación y aumento del cuerpo lúteo, incrementando los niveles de estradiol y progesterona (4 y 5). A su vez, las concentraciones de estrógenos actúan a nivel hipotalámico por una retroalimentación positiva o negativa, según el caso, que modula la liberación de GnRH (2 y 3). Finalmente, las concentraciones séricas de progesterona actúan a nivel de hipófisis e hipotálamo, en una retroalimentación negativa, que modula la liberación de GnRH (6). Se presenta también el crecimiento endometrial y los picos de estradiol.

completar esta función, esencial para la reproducción y sobrevivencia de las especies. Primero, proveen los requerimientos nutritivos necesarios para el crecimiento del oocito y tal vez el estímulo que inicia su crecimiento. Más tarde, controlan la maduración citoplásmica y nuclear del oocito contenido en esos folículos que son seleccionados para la ovulación y contribuyen a la atresia y destrucción de los que no lo son (Ojeda,1979, Michael,1980 y Knobbil,1988).

Estos efectos directos de las células del folículo sobre el desarrollo y función del oocito encapsulado son mediados por cambios en el microambiente intrafolicular, dados en su gran mayoría por productos que son secretados por las células foliculares al fluido que rodea al oocito. (Zhuang,1982)

Los productos secretados mejor conocidos y mayormente caracterizados son las hormonas esteroideas sexuales.

Hormonas esteroideas ováricas:

Las hormonas esteroideas sexuales pueden ser clasificadas en las base de su estructura química y de su principal acción fisiológica. Se conocen tres tipos de esteroideas sexuales : las progestinas, los andrógenos y los estrógenos (Zukerman,1963, LLOYD,1979). Estos esteroideas son producidos por los folículos ováricos durante el desarrollo de los mismos. Los esteroideas ováricos están todos relacionados con, y pueden ser considerados como derivados químicos de uno de los siguientes compuestos químicos: pregnano, androstano y estrano.

A.- ESTROGENOS

Fisiológicamente, la estrona y el 17-beta-estradiol son los estrógenos foliculares más importantes. Sus nombres se deben a su papel en la inducción de la receptividad sexual (estro) en las hembras de mamíferos.

tienen un efecto estimulador sobre el ovario en desarrollo (Shaha, 1983). En experimentos en los cuales los estrógenos se administraron a ratas inmaduras hipofisectomizadas el peso ovárico se mantuvo y los ovarios resultaron más sensibles a la estimulación gonadotrófica. El tratamiento de ratas hipofisectomizadas con gonadotrofinas incrementó el número de folículos atrésicos por ovario, y la administración de estrógenos revirtió este efecto parcialmente (Brodic, 1976).

Los estrógenos también actúan dentro del ovario para inhibir la producción de andrógenos. Hay evidencias de que los estrógenos son capaces de regular el metabolismo de andrógenos por una acción directa sobre la enzima 5-alfa-reductasa (Eckstein, 1977).

Otra acción regulatoria intrafolicular de los estrógenos que ha sido claramente establecida, es su capacidad para aumentar la producción de estrógenos ováricos a través de efecto directo sobre las células de la granulosa, a través de la regulación de la actividad de aromatasa. Se ha encontrado además que los estrógenos inhiben la secreción de progesterona, al parecer este efecto limita la conversión de pregnenolona a progesterona (Adashi, 1982 y Khan, 1984).

Finalmente, se ha observado que los catecol-estrógenos, los cuales pueden ser sintetizados dentro del folículo, estimulan la esteroidiogénesis en las células de la granulosa y el cuerpo lúteo de rata (Louvet, 1975).

#### B.- ANDROGENOS

Si se comparan folículos saludables con los folículos atrésicos hay una relación inversa entre concentraciones intrafoliculares de andrógenos y estrógenos. El alto nivel de andrógenos en relación a los estrógenos en

ovulables. Sin embargo, de este dato es difícil determinar si la atresia es consecuencia de la predominancia de los andrógenos sobre los estrógenos o una consecuencia del proceso. Se ha demostrado que los andrógenos, junto con la hCG estimulan la síntesis de andrógenos ováricos y promueven la atresia en ratas. Este efecto de los andrógenos sobre la atresia folicular, se presenta sólo sobre los folículos en estadio pre-antral y antral temprano. Sin embargo, se ha descrito un efecto facilitatorio para los folículos más grandes que ya han entrado a los estados finales del desarrollo. En cultivo, los andrógenos estimulan la biosíntesis de progesterona por los folículos intactos, y por las células de granulosa aisladas de ovarios de rata, cerdo y ratón (Hillier,1979). Por otra parte la administración de andrógenos en ratas inmaduras incrementan la subsecuente acumulación de progesterona por células de ovario aisladas in vitro (Leung,1978) Los andrógenos, además de su papel estimulador, realzan la síntesis de progestinas estimulada por LH (Ojeda,1979,Knobil,1988).La testosterona incrementa la actividad de aromatasa inducida por FSH y no tiene efecto sobre la síntesis de estrógenos inducida por cAMP. (Penchartz, 1990)

#### C.- PROGESTINAS

Es incierto si las progestinas juegan algún papel directo en el funcionamiento intraovárico y los reportes son a menudo contradictorios. Algunos investigadores han encontrado que la administración de progesterona exógena a ratas inmaduras hipofisectomizadas inyectadas con estrógenos no tiene efecto sobre la morfología del ovario, mientras que otros han presentado evidencias de que la progesterona tiene un

da a animales no hipofisectomizados (Louvet, 1975). Se ha sugerido que el efecto de la progesterona en estos últimos experimentos es debido a un efecto indirecto mediado por la secreción pituitaria de gonadotrofinas y no a una inhibición directa a nivel folicular inducido por progesterona. Esto está apoyado por la observación de el retardo del crecimiento folicular inducido por progesterona ocurre sólo cuando las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas se han reducido significativamente (Lucky, 1977, Hillier, 1979).

En ratas pre-púberes, el tratamiento con progesterona reduce las concentraciones séricas de LH, y reduce la acumulación de estradiol en folículos aislados, pero sorprendentemente, facilita los efectos estimulatorios de bajas dosis de hCG sobre el crecimiento de pequeños folículos antrales y sobre la síntesis de estrógenos (Smiths, 1975). Se ha sugerido, que la progesterona puede facilitar la acción de la LH bajo ciertas circunstancias fisiológicas cuando las concentraciones de esta hormona son bajas (Banks, 1980).

En apoyo de una acción directa de la progesterona sobre la regulación ovárica, han sido identificados receptores específicos para progesterona en ovario de rata y subsecuentemente en células de granulosa de rata (Smiths, 1975 y Lucky, 1977). También han sido reportados sitios de unión para progestinas ováricas en conejo (Mizutani, 1979), cuyo (Bishop, 1983), vaca (Terada, 1983), y humano (Mizutani, 1979). La progesterona aumenta la capacidad de las células de granulosa de rata en cultivos para responder con aumento a la producción de cAMP, por estimulación con FSH. En otro estudio, las progestinas sintéticas incrementaron la síntesis de progesterona y 20-alfa-di-hidroprogesterona o 20-alfa-di-hidroxiprogestero- rona estimulada por FSH en células de

**Falta página**

**N°** 12

tratadas con estrógenos. En forma similar las progestinas sintéticas realzaron la producción de progestinas estimulada por LH en células que previamente habían sido tratadas con FSH para inducir la formación de receptores a LH. Además, en la presencia de cianocetona, un inhibidor de la delta-5-3-beta-hidroxiesteriode-deshidrogenasa, la progesterona aumentó la capacidad de la FSH para estimular la síntesis de pregnenolona. De estos estudios se concluyó que las progestinas actúan en un sitio distal sobre la producción de cAMP y no son un inhibidor competitivo de la actividad de aromatasa inducida por FSH. (Goldstein, 1989, Brandt, 1989, Pelusso, 1989).

Por otra parte, un efecto de inhibición de la progesterona sobre la secreción de estrógenos ha sido demostrada in vivo. La progesterona administrada en hamsters en la mañana del proestro resulta en una caída en la concentración sérica de estradiol sin un cambio importante en el nivel de gonadotrofinas. El hecho de que la administración de testosterona no revierta este efecto, indica que la progesterona actúa a nivel del sistema enzimático de la aromatasa. (Weniger, 1983).

Finalmente, no se conoce cual será el papel de las progestinas sobre la regulación de la producción de andrógenos en el ovario; sin embargo se sabe que la progesterona es un efectivo inhibidor de la C-17,20-liasa lo que sugiere su potencial en la regulación intraovárica de la biosíntesis de andrógenos (Terada et al., 1983)

#### 1.1.4.- CELULAS ESTEROIDIOGENICAS Y SU CONTROL POR GONADOTROFINAS

En todas las especies de mamíferos los principales tipos celulares relacionados con la esteroidogénesis folicular son básicamente dos:

células de la teca interna de la envoltura folicular, y las células intersticiales del estroma ovárico, y (b) células que responden a FSH, las de la granulosa, las cuales sólo después de la maduración folicular adquieren la capacidad de responder a LH. Estos dos tipos celulares básicos cumplen distintos papeles en el proceso esteroidogénico en virtud de sus diferentes hormonas regulatorias y la expresión disimil de enzimas esteroidogénicas (Knobil, 1988).

#### A.-) Células de la teca y células intersticiales

Los productos esteróides más abundantes de las células de la teca de todas las especies son los andrógenos, los cuales se producen del metabolismo del colesterol por varias vías metabólicas. La ruta enzimática preferida para la conversión de colesterol a andrógenos en la teca de ovario de humano y rata es vía la enzima delta-5-3beta- hidroxisteroidedeshidrogenasa. La dihidroxiandrostenedona producida vía esta enzima es entonces metabolizada a androstenediona (Figura 3). La acción estimuladora de la esteroidogénesis de la LH se produce vía receptores específicos presentes en las células de la teca en todos los estadios foliculares mediante la producción de cAMP. La acción esteroidogénica de la LH sobre las células de la teca aparentemente se produce por incremento de la actividad de 2 enzimas las cuales catalizan pasos limitantes y parecen ser los sitios en los cuales la LH estimula la producción de andrógenos por las células de la teca (Ojeda, 1979, Ojeda, 1981, Knobil, 1988).

Por otra parte, parece ser que la progesterona no es un factor limitante intermedio para la producción tecal de andrógenos en pequeños folículos antrales ya que la acumulación de progesterona en pequeños

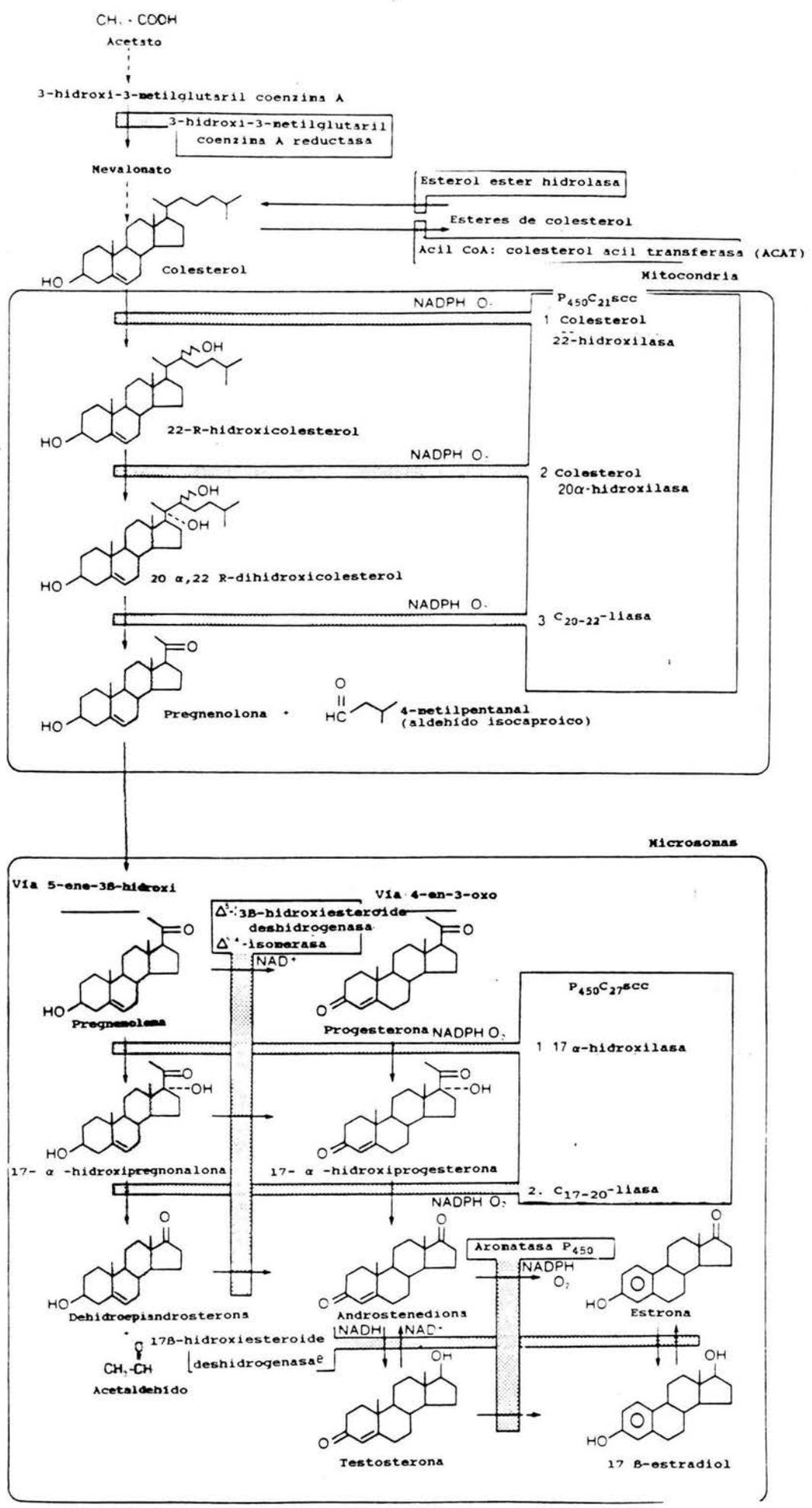


Figura # 3.- Las principales vias biosintéticas de producción de progestinas, andrógenos y estrógenos en el ovario. El colesterol puede ser sintetizado de novo a partir del acetato, o derivado de fuentes preformadas. El metabolismo de colesterol hacia esteroides sexuales se lleva a cabo secuencialmente por varios sistemas enzimáticos, cada uno con diferentes funciones catalíticas. La conversión de colesterol a andrógenos es llevado a cabo por 3 sistemas de enzimas que están acoplados al transporte de electrones por el citocromo P-450. Estos sistemas dependientes de P-450 son: la enzima que rompe el carbono 17 de la cadena de colesterol (P-450<sub>C<sub>17</sub></sub>), la enzima que rompe el carbono 21 de la cadena (P-450<sub>C<sub>21</sub></sub>) y la delta-5-3beta-hidroxiesteroideshidrogenasa-delta-5-4-isomerasa. La subsecuente conversión hacia los esteroides C<sub>19</sub> a estrógenos se lleva a cabo por el sistema enzimático P-450aromatasa. Los sistemas enzimáticos se encuentran distribuidos en diferentes sitios subcelulares como se indica en la figura. Tomada de Knobil, Volumen I (1989), página 2315.

estimulados por hCG, indicando que la activación de los receptores a LH también estimulan un paso en la conversión de colesterol a progesterona. Por lo tanto es evidente, que la producción de progesterona por las células de la teca es también hormonalmente regulada y varía con el estadio de desarrollo folicular. El principal andrógeno producido por la teca es la androstenediona, aunque también se produce testosterona en menor cantidad. Esto se debe principalmente a que hay deficiencia en una enzima, la 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Las células de la teca también pueden aromatizar andrógenos y contribuir directamente a la secreción ovárica de estrógenos en varios grados dependiendo de las especies y el estado folicular. Sin embargo, resultados de muchos estudios indican que la actividad de aromatasa en las células de la teca tiene mucho menor importancia que aquellas de la granulosa (Ganong, 1980, Michael, 1981, Ojeda, 1982 y Knobil, 1988).

#### B.-) Células de la granulosa

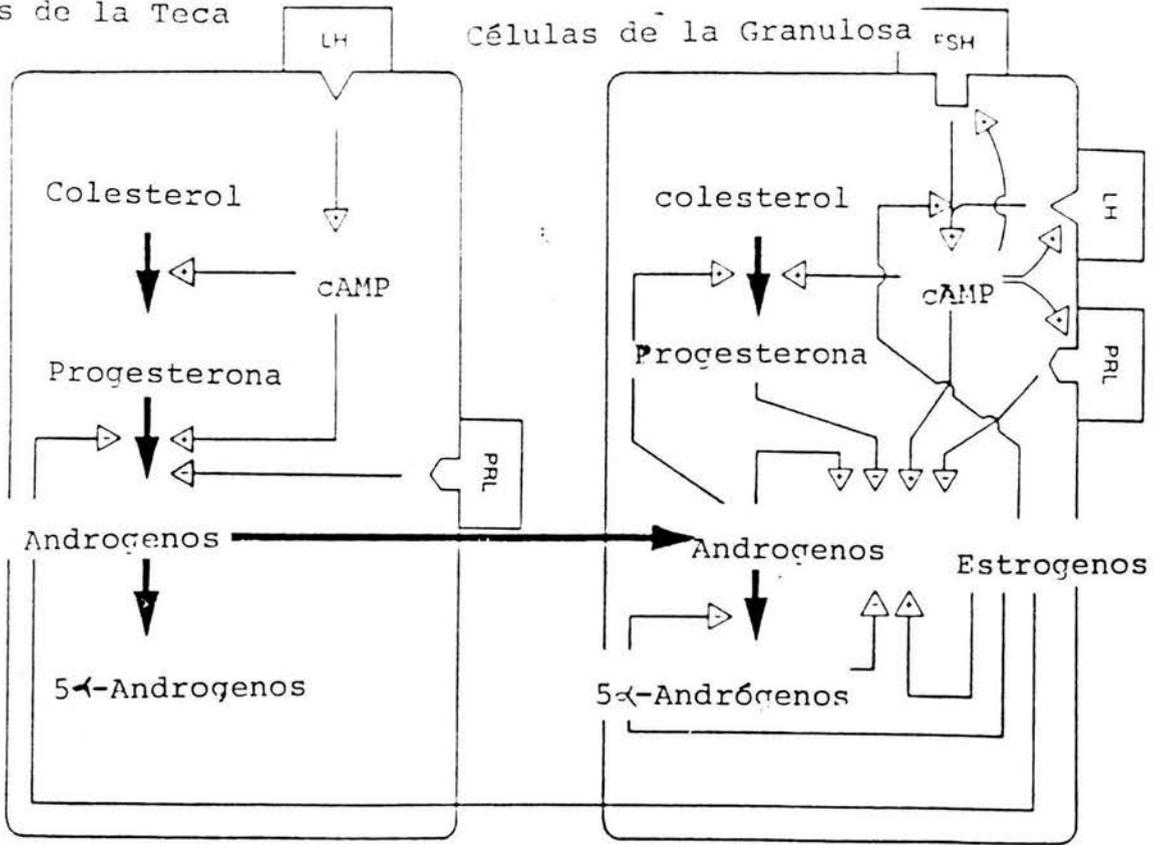
Las vías esteroidogénicas en la teca y en las células intersticiales provocan fundamentalmente la síntesis de novo de andrógenos, en cambio las vías de las células de granulosa están organizadas principalmente para metabolizar andrógenos a estrógenos y para la síntesis de novo de progestinas y sus metabolitos. Evidencias de estudios in vitro e in vivo indican que las células de la granulosa de grandes folículos antrales y preovulatorios son el principal (pero no exclusivo) sitio en todas las especies de actividad ovárica de aromatasa y biosíntesis de estrógenos. La regulación de la aromatización de andrógenos en todas las especies estudiadas se produce por efecto de FSH, la cual en cultivo de células de granulosa de rata estimula la actividad enzimática de aromatasa, medida en un cultivo celular, y

(Erickson y Hsueh, 1978)). Además de la acción de FSH para inducir la actividad de aromatasa en células de granulosa, la biosíntesis de estrógenos requiere de la cooperación de las células de la teca que es la fuente de substratos, andrógenos, para la reacción de aromatización (Figura 4). La producción de progesterona y sus metabolitos es una de las mayores actividades biosintéticas de las células de granulosa en folículos preantrales grandes y preovulatorios. La biosíntesis de progesterona ocurre inicialmente en las células de la granulosa en respuesta a la estimulación por FSH, pero esta acción aumenta posteriormente por LH, después de la aparición de los receptores correspondientes en estas células debido a FSH. En contraste, la LH sola no estimula la biosíntesis de progesterona. La vía biosintética para la progesterona en las células de la granulosa es típica de todas las células esterodiogénicas a través de la conversión de colesterol a pregnenolona y después a progesterona (Everett, 1978).

#### 1.1.5.- MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS ESTEROIDES

Una vez producidas y liberadas las hormonas esteroides son transportadas desde su sitio de biosíntesis a las células efectoras, donde comienza el mecanismo de acción hormonal. El primer paso para que comience el efecto de esta hormona sobre su célula blanco lo constituye el paso del esteroide en su forma libre (desprovisto de su proteína transportadora) al interior de la célula. Aunque no se conoce con precisión la naturaleza de este fenómeno de internalización a través de la membrana celular, se acepta en términos generales que ocurre por difusión pasiva, considerando la característica hidrofóbica lipofílica de la molécula de esteroide. La retención de la hormona esteroide en el citoplasma celular

células de la Teca



19

Figura # 4.- Mecanismo de cooperación de las dos células para la producción de esteroides en el ovario durante la foliculogénesis. El esquema es como sigue: las células de granulosa no diferenciadas responden exclusivamente a FSH, por un mecanismo dependiente de AMPc, activando a las enzimas requeridas para el metabolismo de colesterol a progesterona o andrógenos de la teca a estradiol. La biosíntesis de esteroides en la teca es estimulada únicamente por LH. Conforme el folículo madura, los receptores para LH y prolactina aparecen en las células granulosa como resultado de la estimulación por FSH y estrógenos. La LH puede contribuir inicialmente a la diferenciación de las células de la granulosa aumentando varios procesos dependientes de AMPc. La aparente inducción de la actividad de aromatasa es aumentada tanto por acción andrónica como estrógena y es inhibida por progestinas bajo ciertas circunstancias. Transitoriamente, la secreción incrementada de estrógenos por las células de granulosa causa inhibición de la biosíntesis de estrógenos foliculares inhibiendo la biosíntesis de andrógenos en las células tecaes. La actividad biosintética de la progesterona es subsecuentemente reestablecida y se incrementa

a la formación del complejo hormona receptor característico, que define a las células hormono-sensibles. Los receptores intracelulares son moléculas de naturaleza proteica que se unen específicamente a los diferentes tipos de esteroides. Este complejo interactúa entonces con el genoma celular e induce cambios metabólicos de tipo transcripcional y post-transcripcional (Figura 5).

Las hormonas esteroides también actúan directamente sobre la membrana celular modificando el potencial de membrana y produciendo cambios que imitan efectos anestésicos. Estos cambios no parecen ser mediados por receptores celulares.

#### 1.2.1.- CICLO DEL ESTRO EN LA RATA

[Mucho de lo que se conoce acerca de los ciclos sexuales de los mamíferos hembras, está basado en investigaciones acerca del ciclo del estro de la rata. Los eventos del ciclo están bajo control fotoperiódico, esto es que la periodicidad de la luz juega un papel dominante en la incidencia y duración de los estadios del ciclo ovárico (Knobil, 1988).]

La palabra "estro" es una adaptación latina de la palabra griega "oistro", la cual significa calor o frenesí. Este término fue usado primero por Heape (1965) para describir el "periodo especial de deseo sexual de la hembra" y lo distinguió del "celo" en el macho. Heape, además describió distintos estadios del ciclo aplicado a los mamíferos durante la temporada de reproducción. El "anestro" describe la temporada no reproductiva o periodo de descanso en la hembra, cuando los ovarios y órganos reproductivos accesorios están relativamente quiescentes y los intentos del macho por copular son resistidos. El proestro es la parte del ciclo en la cual el animal empieza a

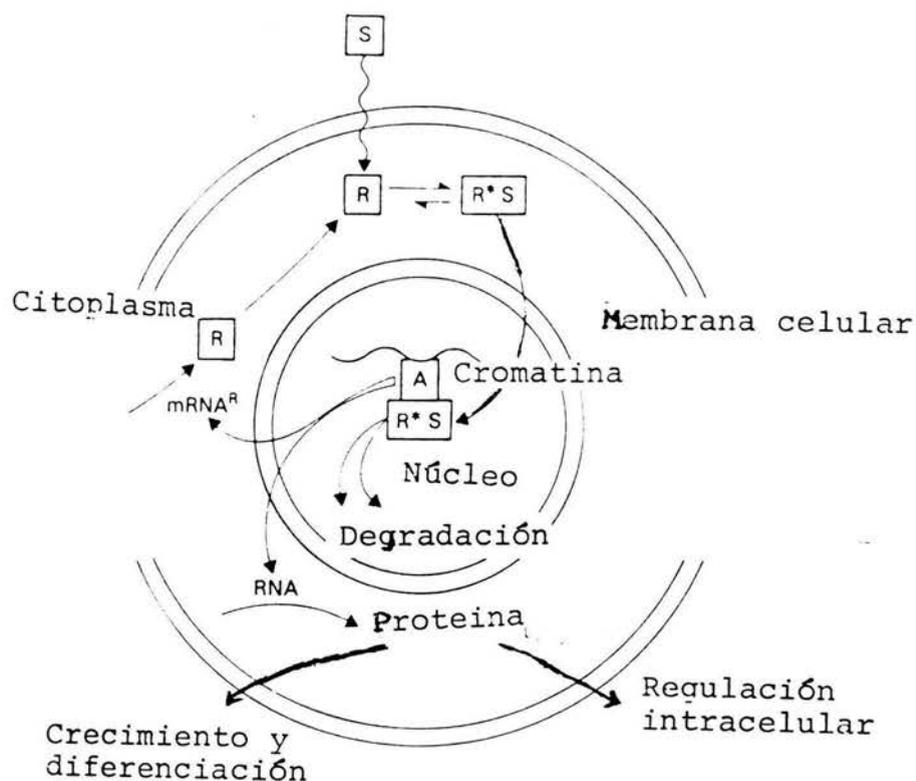


Figura # 5.- Mecanismo de acción de los esteroides: El esteroide (S) entra a la célula se combina con su receptor y lo activa (R), y el complejo se transloca al núcleo y se une al sitio aceptador (A) a la cromatina. La unión inicial da una activación de la síntesis de RNA. Con la unión prolongada del receptor-hormona a la cromatina, se incrementa la síntesis progresivamente llevando a: (i) un incremento general en el crecimiento y diferenciación de la célula; (ii) vía el mRNA de alguna proteína específica para el receptor que será restablecido. Después de la disociación del sitio aceptador, el esteroide y el receptor se degradan.  
Tomada de Langman (1976).

avanzada de maduración. El siguiente período, el estro, está caracterizado por la total maduración de los órganos reproductores, y por que la hembra está preparada para copular con el macho y es el único periodo en el que el coito puede ser fructífero en la mayoría de los mamíferos. En la ausencia de concepción, el estro es sucedido por un corto período de recuperación llamado metaestro, durante el cual el tracto reproductivo entra en una fase de relajamiento. El siguiente periodo, el diestro, es de duración variable en diferentes especies. Durante este tiempo, las secreciones ováricas preparan al tracto reproductivo para recibir al óvulo. Si la fertilización no se ha llevado a cabo, el animal regresa a proestro, y el ciclo comienza de nuevo (Heape, 1965).

#### 1.2.2.- SECRECIÓN DE ESTEROIDES OVARICOS DURANTE EL CICLO.

El periodo de preovulación durante el ciclo se caracteriza por un crecimiento de los folículos ováricos y una secreción elevada de estrógenos. El nivel de secreción de estradiol plasmático venoso del ovario es bajo durante el estro, empieza a aumentar significativamente en la última parte del metaestro hasta la mañana del diestro y alcanza su pico máximo por la mañana del proestro (Ojeda, 1979, Michael, 1980). En el cuarto día del ciclo de la rata, los niveles plasmáticos periféricos de estradiol son basales durante el estro. Por la fase final del metaestro hasta el diestro temprano, los niveles empiezan a aumentar. Este incremento continua a través del diestro y proestro temprano, para alcanzar valores pico y llegar a una meseta en la mitad del proestro. En ratas en el cuarto día del ciclo, los niveles periféricos plasmáticos de testosterona y androstenediona son similares

estrógenos, sugieren que los dos tipos de hormonas vienen del mismo órgano, el ovario, y que su control, síntesis y secreción pueden estar interrelacionados (Brown et al, 1970, Butcher et al., 1974 y Ojeda, 1979). En ratas adultas, la progestina dominante secretada dentro de la circulación ovárica durante el ciclo del estro, es la 20-alfa-hidroxiprogesterona. Hay dos picos de esta hormona junto con progesterona, el primer pico ocurre durante la mañana del metaestro, y ambos esteroides probablemente provienen del cuerpo lúteo recientemente formado. El segundo pico, ocurre durante la parte final de la tarde del proestro (Figura 6).

### 1.2.3.- SECRECIÓN DE GONADOTROFINAS DURANTE EL CICLO.

Los niveles séricos de LH son muy bajos durante la mañana del estro, a través del metaestro, diestro y medio día del proestro. Muchos estudios han reportado niveles basales no cambiantes de LH durante este tiempo, y un estudio reportó una variación leve, pero significativa diurna a través del ciclo (Bogdanove, 1964). Este patrón circadiano del estro y durante el diestro consiste de una pequeña elevación de LH cada día en el punto medio del período de luz, y los niveles más bajos se alcanzan en la media noche de cada día del ciclo. En la tarde del proestro, entre las 2 y 3 p.m., los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse rápidamente, y finalmente alcanzan un pico máximo entre las 5 y 7 p.m. del mismo día. Este pico de LH induce la ruptura folicular y la ovulación después de lo cual, los niveles sanguíneos de esta hormona empiezan a declinar y alcanzan niveles basales temprano en la mañana del estro (Brown-Grant, 1970)

Durante la tarde del proestro, el pico de LH que induce la ovulación se

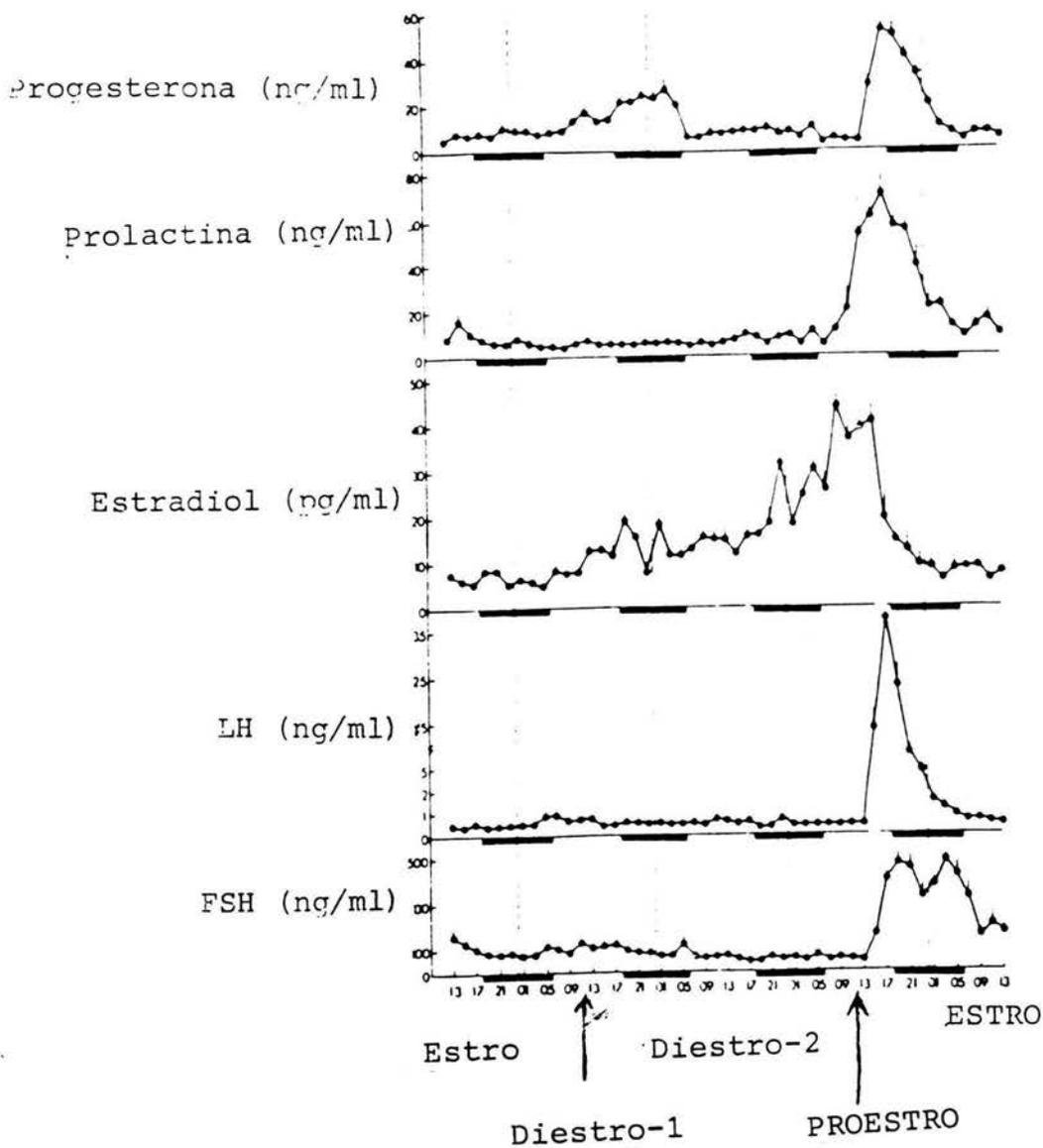


Figura 6.- Concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma, obtenido a intervalos de 2 hrs. através de cada día de los 4 días durante el ciclo del estro de la rata. Cada punto representa la media de la concentración de hormona ( $\pm$  DS) de 6 ratas. Las barras en negro representan el intervalo obscuro del ciclo y los números abajo representan el tiempo del día cada 24 hrs. Tomada de Ojeda y Smith (1984)

600 ng/ml . Este pulso sencillo declina temprano en la mañana del estro, y hacia el final de la mañana, y durante el día del estro, los pulsos de LH son infrecuentes, o están ausentes. Los pulsos regresan por la mañana del metaestro y continúan a través del proestro (Butcher et al. 1974). El patrón de secreción de FSH durante el ciclo es similar al de LH, específicamente, se incrementan niveles de FSH al final del estro, y a través del metaestro, diestro y medio día del proestro (Chowers y Mc.Caan, 1985).

Desde la mitad de la tarde del proestro, la secreción de FSH se incrementa simultáneamente con la de LH. Esto es, de las 2 a las 3 p.m. los niveles circulantes de FSH empiezan a incrementarse rápidamente y, finalmente alcanzan un pico máximo entre las 5 y 7 de la misma tarde. Los niveles circulantes de FSH empiezan a entonces a declinar y alcanzan una línea basal temprano por la mañana del estro (Gay y Tomacari, 1974).

Esta fase inicial de secreción de FSH, presenta alguna similitud con la de LH, sin embargo, la fase de secreción de FSH, depende de varios factores (Knobil, 1988)

### 1.3.1.- INMUNIDAD

La inmunidad comprende un conjunto de capacidades y operaciones que contribuyen a desarrollar y preservar la individualidad de los seres vivos. Aunque en ciertos invertebrados se han descrito fenómenos que semejan una respuesta inmunitaria, es a partir de los vertebrados donde la respuesta inmune adquiere un grado de complejidad avanzado. De hecho, esta respuesta es responsable en buena parte de la supervivencia evolutiva (índice de éxito biológico) en los últimos 300 millones de años de la vida en la tierra (Roitt, 1979, Rojas, 1980)

Respuesta inmune es el término que designa la mera formación de anticuerpos, independientemente del uso que el organismo le de a los mismos. El concepto de inmunidad, por otra parte, comprende todo aquello, y no sólo las reacciones antígeno-anticuerpo, que contribuya a librar o proteger de las agresiones del medio que tienden a modificar la individualidad o a perturbar la homeostasis a través de la colonización externa del sujeto por microbios patógenos.

Podemos dividir a la inmunidad en dos grandes capítulos funcionales: por una parte la inmunidad innata, constitutiva o natural, y por otra, la inmunidad adaptativa (Hicks, 1988).

A.-) Inmunidad natural e Inmunidad adaptativa: según que las capacidades inmunológicas sean innatas al individuo o hayan requerido estímulos o experiencias antigénicas para su desarrollo. Son ejemplos de inmunidad natural, las barreras tegumentarias, la reacción inflamatoria, los antibióticos de superficie, la acidez del jugo gástrico, la lisozima, el complemento hemolítico, etc. Algunas formas de inmunidad natural son hereditarias, e inclusive se segregan en forma mendeliana; aunque el mecanismo de tal inmunidad no sea siempre conocido (Roitt, 1979, 1980)

linfocitos sensibilizados y el interferón son respuestas (específicas o inespecíficas) ante estímulos externos, y corresponden a la inmunidad adaptativa, que suele operar incidiendo sobre fenómenos de la inmunidad natural, desencadenándolos, amplificándolos o modulándolos, en esencia, aumentando su eficacia (Bellanti, 1978)

La inmunidad natural no es específica, aunque su eficacia pueda presentar ciertos grados de especificidad relativa, en tanto que la inmunidad adaptativa suele generar reacciones altamente específicas para cada tipo de agente infeccioso, o inclusive, variantes antigénicas del mismo, y además recuerda el hecho, de tal manera que un encuentro subsecuente con el mismo microorganismo, puede ser resuelto en forma más eficaz, a veces por el resto de la vida, y otras, por periodos más breves (Rojas, 1978).

Ambos sistemas, inmunes, el natural y el adaptativo están constituidos por una amplia red de moléculas y células (Hicks, 1988).

### 1.3.2.- El TIMO

El timo es un órgano linfoepitelial que pertenece al sistema inmune, y donde se llevan a cabo la maduración de un tipo de linfocitos, que son los responsables de la inmunidad celular en mamíferos, los linfocitos T. Además el timo, es considerado una glándula endócrina, ya que secreta diferentes tipos de hormonas que son responsables de la regulación de la inmunidad celular y también en parte de la humoral (Chiodi, 1940).

El timo, es un órgano que se conoce desde hace mucho tiempo, pero no es sino hasta finales del siglo pasado y principios de éste que se comenzó a estudiar su función y estructura. Sin duda uno de los puntos de mayor interés, desde el punto de vista endócrino, es la influencia que ejercen las hormonas sobre su funcionamiento propio y el funcionamiento

endócrino y el propio sistema inmune (Chiodi, 1940, Traininn, 1974). Anatómicamente, el timo se encuentra en la mayoría de los mamíferos, en la parte superior del tórax, inmediatamente por arriba del corazón y enfrente de la aorta. El timo es una masa de color rosado grisáceo bilobulada con una apariencia triangular semiaplanada. En humanos y otras especies de mamíferos, este órgano empieza a involucionar inmediatamente después de la pubertad (Grenstein et al., 1986)

Embrilógicamente, el timo se origina a partir de la tercera bolsa faríngea del intestino primitivo, como resultado del crecimiento de células epiteliales que derivan del endodermo. 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. Conforme el desarrollo avanza, los tejidos tímico y paratiroideo se separan, migrando el timo en dirección caudal hasta alcanzar su sitio definitivo en el tórax (Langman, 1976).

Las células epiteliales del timo proliferan hacia afuera 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 distribución celular es semejante (Hamm, 1975).

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, ésta forma poco común de las células epiteliales fue la razón para que se

1975, y Langman, 1976).

### 1.3.3.- PAPEL GENERAL DEL TIMO

Las células blancas sanguíneas (los leucocitos) se producen en la médula ósea. Las células madre en este tejido hemopoiético dan nacimiento a los siguientes tipos sanguíneos celulares: granulocitos (originan neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos (los cuales originan a algunos macrofágos), y linfocitos (que son de dos tipos B y T). Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad mediada por células, y participan en forma importante en el mecanismo de cooperación celular para la producción de anticuerpos. Los linfocitos T llegan a ser competentes sólo cuando han pasado por el timo, donde están en contacto con una o más hormonas tímicas, o, alternativamente son estimulados para ser inmunológicamente competentes en respuesta a factores humorales (hormonas) liberadas por el timo (Trainin, 1974, Rojas, 1978, Roitt, 1980).

Ambos procesos pueden ser componentes de la maduración de los linfocitos T. Las células T totalmente diferenciadas juegan una variedad de papeles dentro del concierto inmunológico: pueden funcionar como células "asesinas" para combatir tumores celulares (células K y NK), pueden liberar sustancias que afectan la función de los macrofagos (linfocitos efectores) y pueden funcionar como "ayudantes" en la presencia de células B para la producción de anticuerpos (linfocitos auxiliares). Por tanto, el timo es un elemento clave en el complejo programa del desarrollo total del sistema inmune (Playfair, 1983).

Anormalidades de la función tímica, pueden en el otro extremo, ser responsables de algunas patologías relacionadas principalmente con el sistema inmune. además de que se ha demostrado que una atrofia del timo

1940, Alastair, 1978).

#### 1.3.4.- MADURACION INMUNOLOGICA DEL TIMO

Las células estaminales pluripotenciales, además de dar origen a la serie mieloide, eritrocitos y megacariocitos, también originan a los precursores linfoides. De éstos últimos, aquellos destinados a desarrollarse en el sistema T migran al microambiente tímico, el cual se ha integrado tempranamente en la vida embrionaria, como ya se mencionó (Hamm, 1975 y Langman, 1976).

La primera oleada de células estaminales linfoides hacia el timo, ocurre alrededor de la octava semana de gestación, y éste rápidamente se puebla con esta expansiva progenie linfoide. Estas células linfoides proliferan, maduran y migran de la corteza hacia la médula del timo, cambiando a lo largo de este proceso la expresión de una variedad de glicoproteínas antigénicas en su membrana, las cuales, de paso, permiten identificarlas en sus distintas etapas de maduración. Al salir del timo, los linfocitos T viajan por la circulación hacia los órganos linfoides secundarios o periféricos, a los que se sembrarán en forma preferencial en las zonas asignadas, también conocidas como timo dependientes (por ejemplo zona paracortical profunda en ganglios linfáticos, pulpa blanca en el bazo, áreas intrafoliculares en el tejido linfoide intestinal), como resultado de la interacción de los determinantes T de los linfocitos y determinantes complementarios del endotelio en las vénulas postcapilares de los órganos por poblar (Hamm, 1975, Langman, 1976, Alastair, 1978).

#### 1.3.5.- HORMONAS Y FACTORES TIMICOS

Se conocen varias hormonas tímicas, como la timosina, la timopoyetina y el Factor tímico sérico (TFS), entre otros. Estas hormonas se producen

producción abruptamente en la tercera década de la vida (Tabla 1).

#### A.-) Las timosinas

El término timosina es generalmente usado para describir una clase de sustancias biológicamente activas que se encuentran al hacer extractos de timo. Hay diferentes clases de timosinas, de las cuales se han determinado sus estructuras primarias. La timosina alfa-1 es una de las que mayormente se han estudiado, junto con la timosina beta-4. La timosina alfa-1 fué aislada primeramente de timo de ternera, y consiste en una secuencia de 28 aminoácidos, y es altamente activa en varios ensayos biológicos. Este polipéptido, probablemente se deriva de una molécula precursora más grande, y parece ser idéntico a un polipéptido producido en otras especies: hombre, cerdo, oveja, chinchilla y ratón. (Trainin, 1974 y Greenstein et al., 1986)

También se ha reportado la estructura de la timosina beta-4. Este polipéptido actúa sobre las células precursoras para formar protimocitos, a diferencia de la timosina alfa-1 que puede actuar sobre protimocitos para inducir su diferenciación a más células T maduras. La timosina beta-4 también se encuentra en altas concentraciones en otros tejidos distintos al timo (Neta Ruth, 1985).

#### B.- Timopoiatina

Una sustancia originalmente llamada factor tímico, y ahora llamada timopoiatina, fué aislada de timo de bovino y se encontró que induce la diferenciación de células de médula ósea a linfocitos T. Esta hormona está compuesta de una secuencia de 49 aminoácidos. Hay dos péptidos estrechamente relacionados, la timopoiatina I y la timopoiatina II, las cuales difieren solamente por dos residuos aminoácidos, y probablemente representen variantes isohormonales

Hormona/Factor	Propiedades Químicas	Efectos Biológicos
Fracción 5 de timosinas	Familia de polipéptidos ácidos estables al calor con PM de 1000 a 15000.	Induce la maduración y diferenciación de linfocitos.
Timosina Alfa-1	Polipéptido de 28 residuos, PM 3108, pI 4.2, secuencia determinada.	Aumenta la actividad mitogénica de los linfocitos e induce marcadores de las células T.
Timosina Beta-4	Polipéptido, 43 residuos, PM 4982, pI 5.1, secuencia determinada.	Induce a la enzima transferasa terminal (TdT) en las células médula ósea.
Timosina Alfa-7	Polipéptido de 43 residuos, PM 2500. pI 3.5	Induce la maduración de linfocitos T supresores.
Factor Tímico Humoral (FTH)	Polipéptido, PM 3200 , pI 3.5	Promueve la maduración de los linfocitos T en las reacciones mitogénicas.
Timopoyetinas (tipo I,II y III)	Polipéptido de 49 residuos PM 5562, pI 5.7 , secuencias determinadas.	Induce la formación de marcadores en las células T en médula ósea y aumenta la función de thymocytes.
Hormona Tímica Sérica (FTS o timulina)	Nonapéptido de PM 875, pI 7.5, secuencia determinada.	Aumenta la actividad citotóxica de los linfocitos T "in vivo" e "in vitro".
Hormona Tímica homeostática.	Glicopéptido de PM 1800 a 2500.	Suprime el deterioro que causa la timectomía y restaura la hipersensibilidad tardía.
Factor Tímico X	Polipéptido de PM 4200	Aumenta el número de células T y recupera la hipersensibilidad tardía.
Fracción Protéica del plasma humano.	Proteína, PM 57700: propiedades análogas a la prealbúmina.	Promueve maduración de células T observadas por aloreactividad

Tabla 1. Principales Hormonas y factores tímicos que se conocen. Se muestran algunas propiedades químicas y funcionales de las moléculas.

#### C.- Factor tímico sérico

Un factor secretado por el epitelio tímico ha sido aislado de ratones normales y suero de cerdo, el cual se ha denominado factor tímico sérico (TFS). Este péptido normaliza un gran número de respuestas inmunes en ratones atímicos o timectomizados. Su secuencia primaria ha sido establecida, y consiste de 9 residuos de aminoácidos. Su actividad biológica consiste en realzar la generación de células T citotóxicas en ratones timectomizados, induce la producción de células T supresoras en ratones, y actúan como mitógenos de linfocitos in vitro e in vivo (Grossman, 1984).

#### D.- Factor tímico humoral

Otro factor que ha sido aislado de timo de ternera y que posee un amplio rango de actividades biológicas es el factor humoral tímico (THF). Este factor, restablece la respuesta inmune en ratones timectomizados y restaura la capacidad celular para rechazar injertos. El THF se compone de una secuencia de 31 aminoácidos. (Trainin, 1974).

#### 1.4.1.-LOS INTERFERONES

Los interferones (IFNs) son una familia de proteínas que están funcionalmente relacionadas, con pesos moleculares aparentes de cerca de 20 kD. Estas moléculas ejercen un amplio espectro de actividad antiviral en células animales. También poseen otras muchas actividades biológicas

diferentes de su capacidad antiviral (Figura 7).

Un interferón es a menudo activo sólo en células de las especies animales que las producen; el proceso metabólico celular requerido para que se lleve a cabo la actividad del interferón involucra la síntesis de

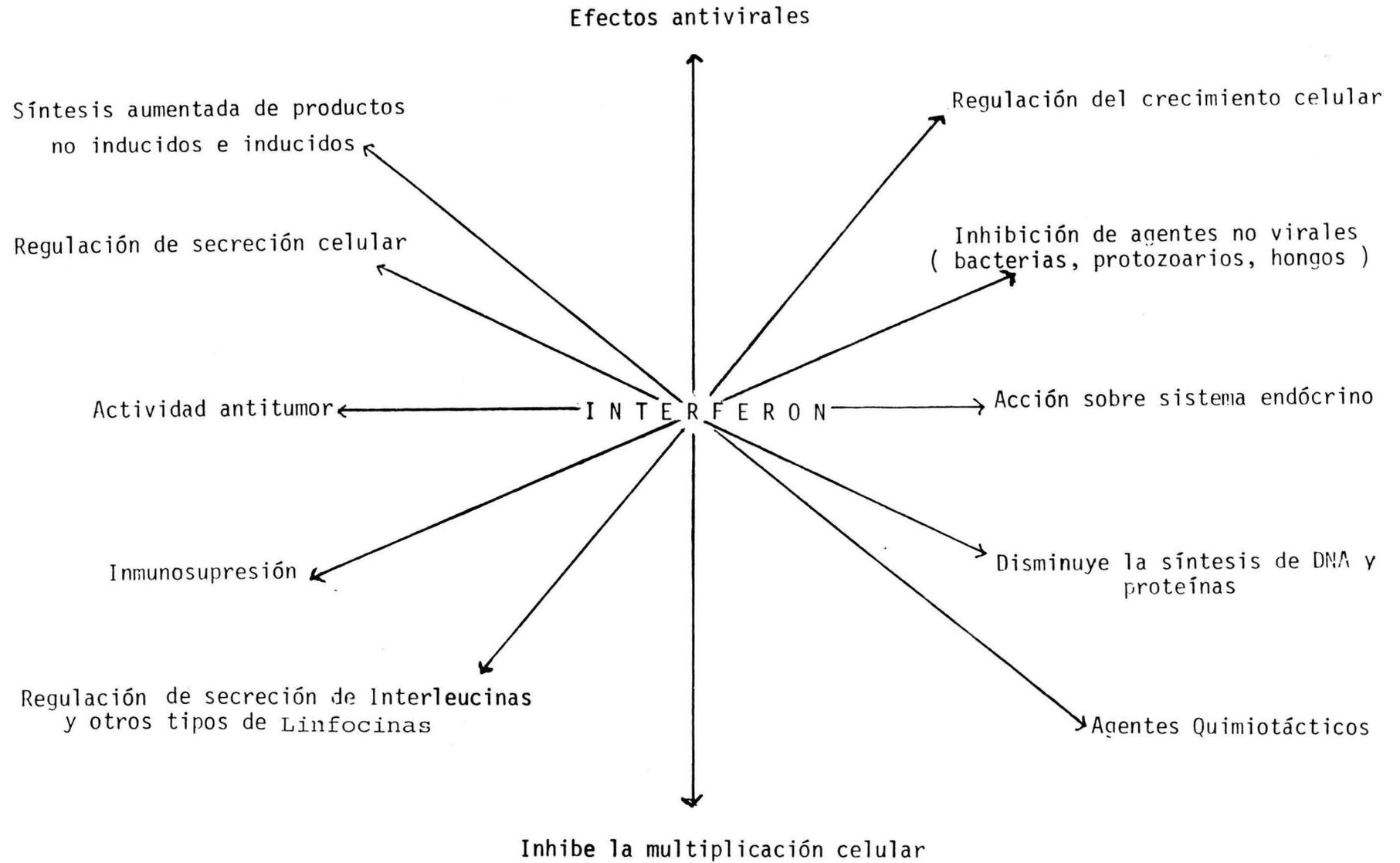


FIGURA # 7.- Acciones **Biológicas** de los diferentes tipos de interferón sobre una amplia gama de sistemas biológicos. Tomada de Gresser (1979).

significantes de actividad biológica, generalmente causan muy poca o ninguna toxicidad sobre la célula efectora (Pestka, 1987).

Los interferones son biológicamente similares a los anticuerpos, excepto por sus propiedades inherentes. Ambas moléculas, son de origen proteico, y la mayoría de las veces presentan residuos de azúcar en su estructura. Las dos moléculas son antivirales, pero sin embargo los interferones no actúan directamente sobre virus intactos, sino que favorecen cambios en las células para inducir un estado antiviral (Clemens, y Mc. Nurian, 1985).

El desarrollo del estado antiviral requiere actividad metabólica por parte de las células. Si la síntesis de RNA y proteínas está inhibida, también lo está el desarrollo de un estado antiviral. Este fenómeno inducido por el interferón está dirigido contra una amplia variedad de virus, en marcado contraste con la especificidad de los anticuerpos que pueden distinguir entre subtipos de virus (Stannton et al., 1987).

Muchos interferones tienden a ser específicos de especies en acción, una propiedad biológica no usual, pero no única. Por ejemplo, el interferón de pollo es completamente inactivo sobre células humanas; sin embargo, el interferón alfa humano, no sólo es activo en células de humano, sino también de cerdo, vaca, y de otras especies de animales, así que la especificidad del interferón no es absoluta. (Mannering y Deloria, 1986).

Por otra parte, se ha reportado que no sólo las células inmunológicas producen interferón, sino que también lo hacen una amplia variedad de otras células, como son los fibroblastos y las células epiteliales. En efecto, ha sido reportado que casi cada tipo celular produce al menos un tipo de interferón, pero la cantidad de interferón producido por

biológica de los interferones. (Gresser y Cantell, 1979). Los interferones poseen propiedades características muy importantes. Su actividad biológica es remarcablemente estable; sobreviven a tratamientos a pH muy ácido (muchos son estables a pH de 2), a tratamientos con detergentes iónicos (SDS), y resisten tratamientos con agentes sulfhidriloreductores (mercaptoetanol). Muchos interferones tienden a ser también termoestables (Gresser, 1979).

#### 1.4.2.- MECANISMO DE ACCION DE LOS INTERFERONES

Al nivel del tejido blanco, los IFNs inician su acción por su unión a receptores específicos sobre las membranas celulares. Las diferencias estructurales y funcionales entre las especies de IFN, son también consistentes con sus propiedades de unión (Figura 8). El IFN $\alpha$  y el IFN $\beta$  parecen unirse a la misma molécula receptora, pero el IFN $\gamma$  tiene su propio receptor específico (Rubinstein y Orchansky, 1987).

La unión del IFN a su molécula receptora trae como consecuencia una serie de eventos bioquímicos que llevan a una respuesta específica en la función celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que acoplan la ocupación del receptor con la respuesta específica, no están aún claros. Un sistema de segundos mensajeros específicos involucrado en la acción del IFN no ha sido encontrado aún, sin embargo se han encontrado cambios en varios sistemas de señales después del tratamiento con IFN (Koide et al., 1988).

Estos sistemas incluyen el del cAMP, calcio, y diacilglicerol-proteína cinasa C. El mecanismo de acción desencadenado por la acción del IFN involucra claramente la activación de la síntesis de proteínas. Las proteínas sintetizadas inducidas por el IFN mejor caracterizadas, son la proteína cinasa C y la 2'5'-oligoadenilato sintetasa, las cuales se

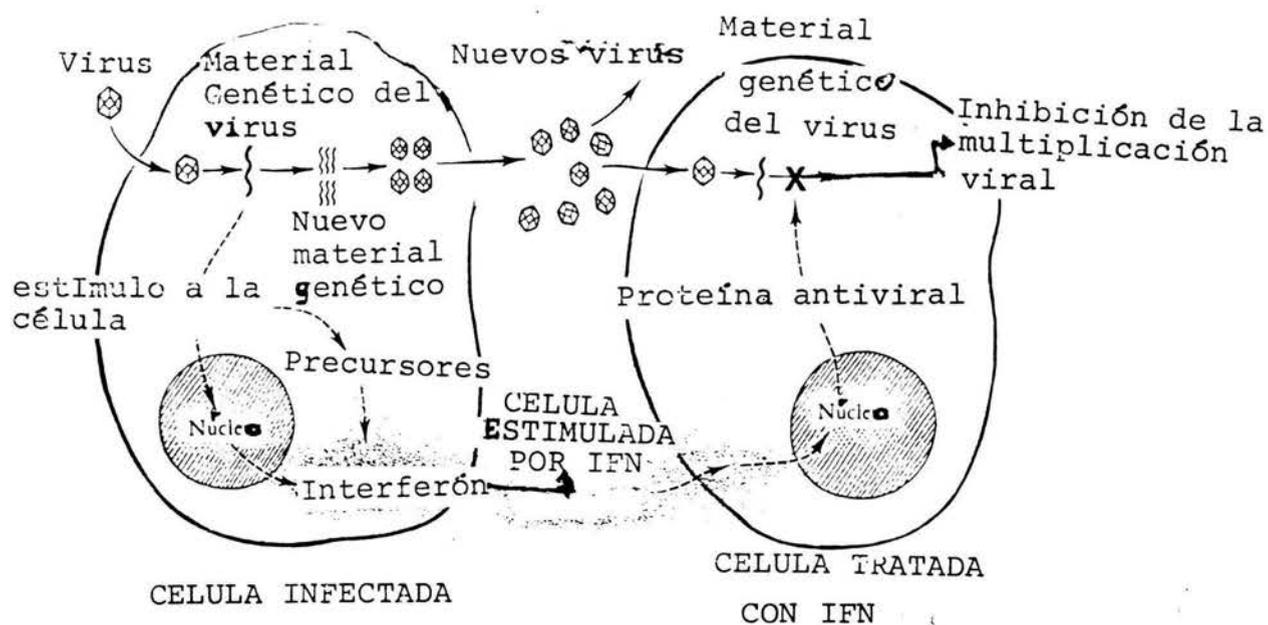


Figura #8.- Acción antiviral del Interferón. Una vez que el virus ha infectado la célula, el material genético de este produce una estimulación a la célula para que produzca precursoros del IFN. El Interferón producido actúa sobre el núcleo celular activando la producción de una proteína que inhibe la replicación viral. Tomada de Playfair (1983).

Estas dos enzimas, se encuentran presentes en células no infectadas normalmente en un estado latente, debido a que son absolutamente dependientes de un RNA de doble cadena para su activación. En células infectadas por virus, se pueden dar grandes cantidades de RNA de doble cadena durante el proceso replicativo del virus, ya sean virus del tipo DNA ó RNA ( Lengyell, 1987).

#### 1.4.3.- EFECTOS ENDOCRINOS DEL INTERFERON

En años recientes, se ha establecido, que los IFNs no sólo son una defensa importante del huésped contra los virus y tumores, sino que también juegan un papel importante en muchos otros eventos fisiológicos normales (Orava y Kauppila, 1987).

Los múltiples efectos de los IFNs sobre las funciones celulares ha estimulado el interés por aclarar sus posibles efectos sobre célula endócrinas. Esto es importante por dos razones: primeramente, el uso creciente del IFN como terapia en varias enfermedades, demanda un mejor entendimiento de sus efectos principales y efectos colaterales. Segundo el papel del IFN relacionado con la defensa del huésped y procesos fisiológicos normales, puede estar interrelacionado con la función de la células endócrinas (Tabla # 2). Los IFNs tienen efecto inhibitorio sobre la producción de hormonas en tejido gonadal. Se ha reportado que las concentraciones séricas de estradiol y progesterona decrecen durante el tratamiento con IFN alfa, sin un cambio significativo aparente en las concentraciones de LH o FSH (Kauppila et al, 1982). En otro estudio clínico se reportó que el tratamiento de pacientes masculinos enfermos de leucemia con alfa-IFN tienden a disminuir las concentraciones séricas de testosterona, sin embargo tampoco se vieron cambios en los niveles de LH Y FSH (Schilsy et al, 1987). El efecto de los IFNs sobre

Tabla 2.- Acción endócrina de los diferentes tipos de interferón. Cada tipo de IFN fué aprobado en el mismo modelo experimental y se presenta su acción en cada glándula endócrina que se ha utilizado.

T<sub>4</sub> = Testosterona E<sub>2</sub> = Estradiol T<sub>3</sub> = triodotironina

ACCION ENDOCRINA DEL IFN

<u>Glándula</u>	<u>Efecto</u>	<u>Tipo de IFN que produce el efecto</u>
Testículo	Inhibe la secreción de T <sub>4</sub> en células de Leydig.	IFN-α
	Disminuye la conversión estimulada de T <sub>4</sub> a E <sub>2</sub> por células de sertoli en cultivo.	IFN-β, IFN-α
	Inhibe las concentraciones séricas de Testosterona (T <sub>4</sub> )	IFN-α,γ
	Inhibe las producción de RNAm que codifica para las enzimas P-450 colesterol hidrolasa y P-450 aromatasa.	IFN-α,γ
Hipófisis-Adrenal	Incrementa las concentraciones de cortisol.	IFN-α,β
	Incrementa los niveles de ACTH	IFN-α
Tiroides	Inhibe las producción de hormona tiroidea	IFN-α
	Baja las concentraciones séricas de TSH administrandolo a largo plazo.	IFN-α
	Inhibe la secreción estimulada de T <sub>3</sub> por TSH en tirocitos humanos en cultivo	IFN-α,β,γ
Páncreas	Inhibición de insulina y proinsulina de células pancreáticas en cultivo.	IFN-α,γ

gonadales. Las concentraciones de hormonas tiroideas séricas baja durante el tratamiento con alfa-IFN, sin embargo no hay cambio consistentes en las concentraciones de TSH (Fentiman et al, 1985). Los efectos directos del IFN sobre la producción de hormonas tiroideas se ha estudiado en tirocitos en cultivo, demostrándose que la secreción de  $T_3$  estimulada por TSH es inhibida por el tratamiento con IFN (Nagayam et al, 1987). Otros efectos del IFN sobre células endócrinas incluyen la inhibición de la secreción de insulina y de la producción de proinsulina por células pancreáticas en cultivo (Holsber y cols, 1988).

## ANTECEDENTES

La existencia de una interacción bidireccional entre el sistema inmune y endócrino ha sido propuesta desde hace algún tiempo. Observaciones recientes, sugieren que esta interacción está mediada por una serie de señales mutuas mediadas por hormonas y receptores específicos. (Hiriart y Romano, 1986).

La castración tanto de ratas macho como hembras, induce un incremento en el peso del timo (Chiodi, 1940; Greenstein y cols., 1986). También han sido caracterizados receptores para andrógenos, estrógenos y progesterona en el timo de ratas (Grossman, 1984).

Por otro lado, se ha comunicado que los estrógenos actúan sobre el timo afectando la liberación de algunos factores inmunorreguladores, importantes para la diferenciación, proliferación y actividad de los linfocitos. (Stimmson y Crilly, 1981)

Se sabe, por contraparte, que el timo produce hormonas que influyen la maduración y función del ovario. Nishizuka y Sakakura (1969), encontraron que la timectomía neonatal en ratas hembras produce una profunda perturbación en el desarrollo del ovario e incluso esterilidad. La atrofia ovárica se caracteriza por una disminución en el número de folículos ováricos, menor cantidad de cuerpos lúteos y una hipertrofia de las células intersticiales, esto último acompañado por un incremento anormal en la producción de esteroides. (Hattori y Brandon, 1979). También se ha observado que en ratones timectomizados a los tres días de edad, hay una ligera masculinización en las hembras una marcada infiltración linfocítica en los ovarios hipertrofiados. (Nishizuka y Sakakura, 1969 y 1971, Rebar, 1978 ).

Se ha observado que en ratones timectomizados existe un decremento e

estimulante (FSH) y hormona de crecimiento (GH). A partir de los cuatro meses, estos animales presentan niveles significativamente elevados de prolactina, LH y FSH, y tumores en el ovario. Al parecer, estas alteraciones en las gonadotropinas son debidas a un desarrollo gonadal inadecuado, lo cual produce concentraciones de estrógenos bajas, y a la falta de receptores para LH en las células de la granulosa ( Michael, 1979; Michael y cols. 1980 y Allen y cols. 1984 ).

A su vez, los trastornos gonadales que se observan tanto en animales congénitamente atímicos como timectomizados, han sido atribuidos en parte a la disminución de los niveles de gonadotropinas (Michael y cols 1980, ; Rebar y cols., 1981; Farookhi y cols., 1988). En ratones atímicos nu/nu, Rebar y cols. (1981) encontraron que el desarrollo ovárico es muy parecido al de los ratones timectomizados neonatalmente. Estos animales presentan una reducción en el número y desarrollo de folículos y cuerpos lúteos, y una hiperplasia de las células intersticiales. Estos cambios se acompañan de un retraso en la pubertad caracterizado por retardo en la apertura vaginal; además la mayoría de hembras son estériles. (Linter-Moore y Panterlouis, 1975).

Se ha comunicado que un factor del timo de peso molecular de aproximadamente 28,000 D al cual se le denominó "Factor Tímico" ( FT ) es capaz de inhibir la acción de la hCG sobre la secreción de testosterona por las células de Leydig in vitro (Pedernera y cols. 1986). En esta misma línea del FT, en 1986 Hiriart y Romano encontraron que existe una interacción competitiva entre  $^{125}\text{I}$ -hCG y el FT por el mismo receptor en células de Leydig. Se han realizado estudios en relación a la actividad del FT en diferentes edades en células de Leydig, demostrándose que la mayor actividad inhibitoria de este factor

Así mismo, Aguilera y Romano comunicaron que el timo de rata prepúber secreta al medio de incubación productos que inhiben la secreción de estradiol, progesterona y testosterona en las células del ovario cuando son estimuladas por hCG in vitro.

Finalmente, se ha encontrado que la disgenesia ovárica que se observa en ausencia de timo puede ser reparada haciendo transplantes de timo completo, así como administrando un factor aislado del mismo; también se restaura administrando extractos e injertos de otros órganos linfoides. (Sakakura y Nishizuka, 1972).

#### Papel endócrino del interferón .

Por otra parte, la interacción bidireccional entre el sistema inmune y endócrino se manifiesta en el efecto de otros productos secretados por células del sistema inmunológico como es el caso del interferón (IFN) ( Drava, M. Vihko, R., 1985)

En años recientes, se ha establecido que los interferones (IFNs) no sólo son un importante sistema de defensa del huésped en contra de infecciones virales, y de resistencia a tumores, sino que además regulan algunos procesos fisiológicos normales. ( Drava, M. 1989)

Los IFNs han sido detectados en el fluido amniótico humano ( Lebon y cols. 1982) y la placenta de murino, aún en la ausencia aparente de infección viral o de cualquier otro tipo. Se ha sugerido que el interferón del fluido amniótico podría estar relacionado con la regulación del desarrollo fetal, o bien en la inmunorregulación de la aceptación fetal. ( Lebón y cols., 1982).

Evidencias recientes, sugieren que los IFNs tienen efectos directos inhibitorios sobre la producción hormonal de las gonadas.

Se ha encontrado, que el tratamiento con IFN alfa reduce las concentraciones séricas de estradiol y progesterona, sin un cambio

aparente en los niveles de LH o FSH. (Kauppila, 1982; citado por Orava). En 1987, en un estudio in vivo Branca y cols. observaron que el IFN inhibe la conversión, estimulada por FSH, de testosterona a estradiol por células de Sertoli de rata en cultivo.

Vihko y cols. (1985) encontraron que el pretratamiento de células de Leydig de cerdo en cultivo con IFN leucocitario humano, suprimía la subsecuente producción de testosterona estimulada por hCG en una forma dependiente de la dosis, y del tiempo de exposición al IFN. El tratamiento de las células de Leydig de porcino con dos tipos específicos de IFN (alfa y gamma), también inhibe la producción de testosterona estimulada por hCG y la inhibición es mayor si se da un tratamiento combinado con los dos tipos de IFN (Orava, M. 1989). Observaciones hechas recientemente, sugieren que el IFN gamma modifica la esteroidogénesis en células de Leydig de porcino en cultivo, inhibiendo la acumulación de mRNA que codifica para las enzimas esteroidogénicas del sistema que rompe la cadena lateral de colesterol y del que rompe en el carbono 17. Dado que ambas enzimas esteroidogénicas son dependientes del sistema de citocromo P-450 su abreviatura es: P450 scc para la primera y P-450 c17 para la segunda.

Asimismo, se ha encontrado que el IFN-gamma inhibe la actividad de la P450scc, posiblemente dificultando la toma del sustrato por la enzima. (Orava y cols., 1989)

A diferencia del efecto inhibitorio que produce en tejidos gonadales el interferón, tendría un efecto opuesto sobre la producción hormonal del eje pituitaria-adrenal. El tratamiento de humanos con diferentes preparaciones de IFN, tanto en forma aguda como intermitente incrementa las concentraciones séricas de cortisol. (Goldstein y

las concentraciones séricas de cortisol se acompañó de una elevación en los niveles de hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Sin embargo, en otro estudio que utilizó dosis más bajas de IFN no hubo cambios en las concentraciones séricas de ACTH. Por lo tanto no está claro si el IFN actúa directamente sobre la glándula adrenal para estimular la secreción de cortisol, o bien indirectamente a través de la estimulación de la secreción de ACTH en la pituitaria (Holsber y cols., 1988).

## HIPOTESIS

Se conoce que los interferones juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica ante una invasión viral. Por otra parte está bien caracterizada su capacidad antiproliferativa. Se conoce que los interferones no sólo son producidos por células del sistema inmune, sino también por células de otros tejidos, lo que sugiere la participación de estas proteínas en algunos otros fenómenos no relacionados exclusivamente con su actividad antiviral.

Se ha comunicado, que el tratamiento con interferón a mujeres portadoras de neoplasias, produce alteraciones de los niveles séricos hormonales. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual se producen estos cambios, así como los posibles mecanismos moleculares que determinan los efectos endócrinos de los interferones. Por lo tanto su papel como reguladores de algunas funciones endócrinas está aún muy oscuro.

Si el interferón es capaz de alterar los niveles séricos de esteroides sin alterar los de LH y FSH, entonces es posible que esta proteína modifique directamente la secreción de esteroides por el ovario. El presente estudio fué diseñado con objeto de aclarar en parte este problema.

4

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto del Interferon sobre el ovario de rata en desarrollo.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Verificar la actividad biológica del alfa-IFN leucocitario humano sobre un modelo conocido, como es el testículo de rata adulta, el cual se sabe por bibliografía que es inhibido en la secreción de esteroides por la molécula de alfa-IFN. Esto con el objeto de saber si durante el viaje de Cuba a México y el tiempo de almacenaje el alfa-IFN no había perdido su actividad biológica.

2.- Hallar la dosis óptima de hCG que estimula la secreción de esteroides en las células del ovario inmaduro "in vitro"

3.- Determinar el tiempo óptimo de respuesta de las células de ovario a la hCG.

4.- Estudiar el efecto del alfa-Interferón leucocitario humano sobre la secreción de esteroides por el ovario de rata de 21 días in vitro

a.-) Determinar el efecto de diferentes dosis del alfa-IFN leucocitario humano sobre el ovario de rata de 21 días in vitro.

b.- Investigar la posible interacción entre el alfa-IFN leucocitario humano y la hCG en el mismo modelo.

### 5.1 .- Obtención de células de ovario

Se utilizaron 20 ratas hembra de la raza Wistar de 21 días de nacidas para cada bioensayo, provenientes de la granja del CINVESTAV. Los animales fueron anestesiados con éter (Baker, 9240-61) hasta el nivel de paro respiratorio. Los ovarios fueron extraídos quirúrgicamente disecándose la grasa y el tejido conectivo en una caja Petri que contenía medio de cultivo (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, DMEM) enriquecido con 0.1% de albumina de suero de bovino (BSA) (Sigma) bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss, W.G. mod. 475022) a un aumento de 2x10. Luego los ovarios se cortaron en 2 ó 3 pedazos y se incubaron en una solución de DMEM + 0.1% de BSA y colagenasa 1mg/ml (Gibco, 840-701 IH) 30 min. a 37 ° C, en agitación continua de 90 ciclos por minuto en un baño tipo Dubnoff. Al término de este tiempo, las células disociadas se lavaron en DMEM+BSA 2 veces para desechar la enzima, centrifugándolas 15 min. a 1000 r.p.m. en una centrifuga Beckman (Modelo TJ-6). La pastilla celular se resuspendió en DMEM + BSA y disoció mecánicamente con una pipeta Pasteur con la punta flameada hasta observar que el medio se pone turbio y se centrifugan 10 min. a 900 r.p.m.. Al término de este tiempo, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en una solución de DMEM+.1% de BSA+ 0.1mM de 1-metil-3-Isobutilxantina (Sigma Chem. Co.), al volumen deseado para el Bioensayo (5ml. totales). Para eliminar grumos esta suspensión celular se filtra a través de una malla de nylon. (Figura 1)

### 5.2.- Bioensayo de células de ovario (Curva Dosis-Respuesta a hCG)

# OVARIO DE RATA

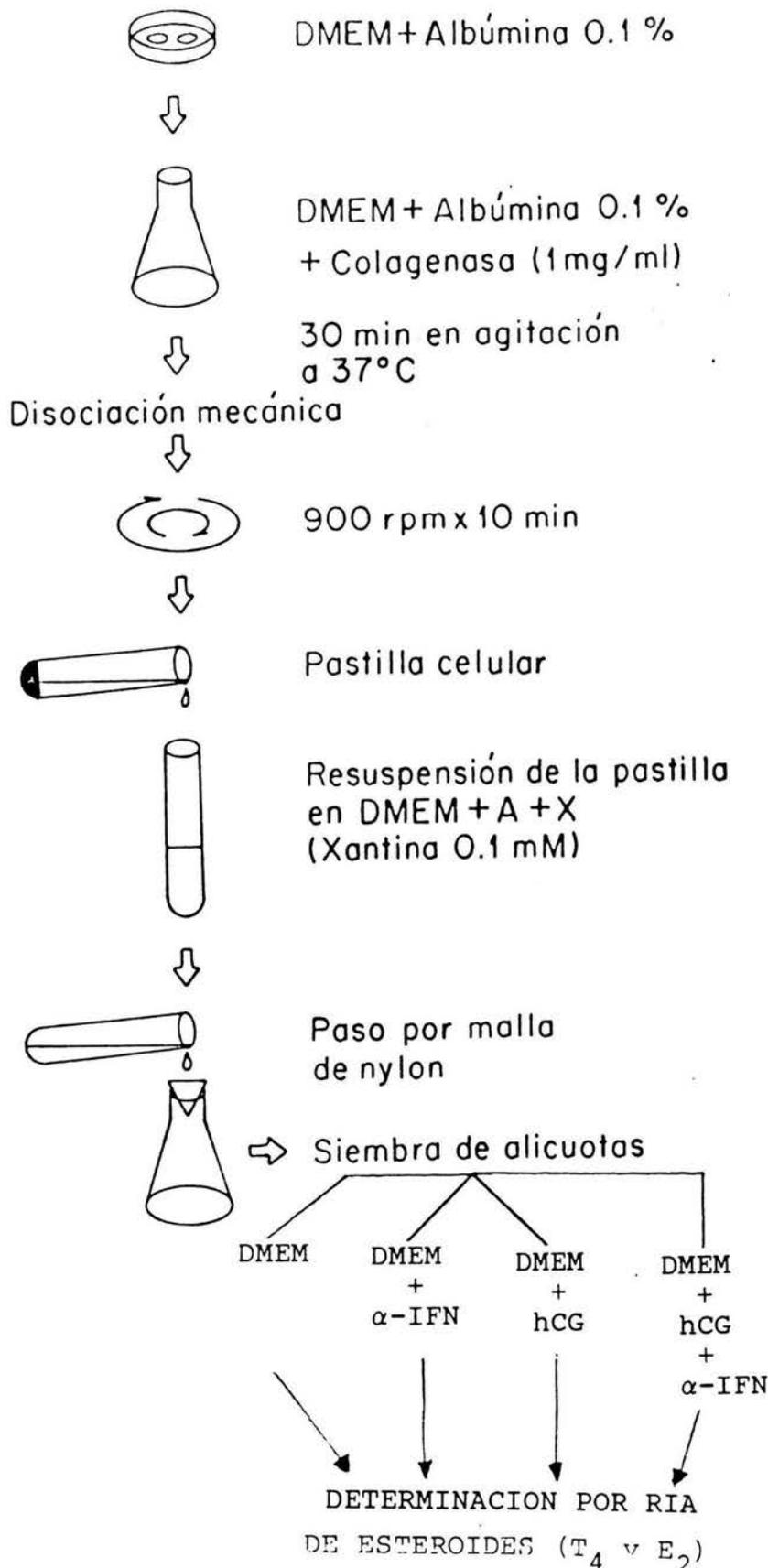


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra los diferentes pasos para la obtención y posterior bioensayo de las células de ovario. A = Albúmina de suero de bovino y X = 1,3 - metil, butil xantina.

con gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Sigma Chem. Co. CG-91) a diferentes concentraciones (2.5, 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml de hCG) para obtener una curva dosis-respuesta. Las células se incubaron en matraces Erlen-Meyer de 10 ml; cada tratamiento se realizó por triplicado en un volumen final de 1 ml por matraz. Los matraces control basal llevaban 100 ul de células (aproximadamente 10000 células) + 50 ul de DMEM + 850 ul de DMEM+BSA+Xantina (D+A+X), mientras que los matraces estimulados tenían 100 ul de células + 50 ul de hCG + 850 ul de D+A+X. Los matraces se ponían a incubar en un baño metabólico Dubnoff con agitación constante de 3 ciclos por segundo durante 3 horas (h), en una atmósfera que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire húmedo.

Terminado este tiempo, las células se transfirieron a tubos de plástico para ser centrifugadas a 900 r.p.m. durante 15 min. El sobrenadante se decantó en tubos cónicos de tapón esmerilado de 10 ml. (Pyrex, núm. 8084) para la extracción de los esteroides (T<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>) con éter. La pastilla celular se resuspendió para observar la viabilidad celular después de cada bioensayo mediante el uso del azul tripano.

### 5.3.- Curva Temporal a hCG

Una vez obtenida la dosis que producía una respuesta estimuladora submáxima medida por la producción de esteroides a hCG se procedió a determinar el tiempo necesario de interacción de las células con la hormona, para obtener la mejor respuesta en la producción de testosterona (T<sub>4</sub>) y estradiol (E<sub>2</sub>). Esta curva temporal se realizó utilizando la dosis de 10 ng/ml de hCG poniendo las incubaciones bajo las mismas condiciones utilizadas en la curva dosis-respuesta, pero a diferentes tiempos. Una vez terminado cada período de incubación, la

utilizó para la determinación de esteroides previa extracción con éter y la pastilla celular para determinar la viabilidad de las mismas como se describió previamente.

#### 5.4.- Extracción de esteroides con éter

Se prepararon tubos cónicos con tapón esmerilado que contenían 5 ml. de éter etílico para análisis (Merck, num. 931), un tubo por matraz. Se transfirió posteriormente la muestra a los tubos y se agitó vigorosamente 5 veces, para asegurar que se mezclara bien la muestra con el éter. Posteriormente se congeló la fase acuosa del tubo en una mezcla de acetona industrial con hielo seco. El éter que contenían entonces los extractos se transfirió a tubos cónicos de vidrio y se incubaron a baño María a 37°C, hasta que el éter se evaporó completamente. Finalmente los esteroides se resuspendieron en amortiguador para Radioinmunoanálisis (RIA) (500 ul por tubo) y se realizó la determinación de testosterona y estradiol.

#### 5.5.- Bioensayo de células de testículo con alfa-IFN

Los testículos se obtuvieron de una rata Wistar adulta joven (250-300 g de peso) básicamente de acuerdo a la técnica de Hendelson y cols. (1975) que se realizó de la siguiente manera: una vez anestesiada la rata hasta el nivel de paro respiratorio se extrajeron los testículos quirúrgicamente.

Se lavaron 3 veces en una solución salina libre de  $Ca^{2++}$  y  $Mg^{2++}$  y se desechó la cápsula albúginea y la mayor parte de vasos sanguíneos. Para poder separar los túbulos seminíferos de las células intersticiales se utilizó una solución enzimática compuesta por DMEM + 0.1% de BSA y

en esta solución enzimática por 15 minutos en baño metabólico de incubación con agitación continua de 9 ciclos por segundo. Posteriormente se lavaron las células dos veces con DMEM+BSA para desechar la enzima y la suspensión se filtró con una malla de nylon, para después centrifugar a 1000 r.p.m. durante 10 minutos (este procedimiento se repitió las veces que se lavaron las células). Finalmente el precipitado celular se resuspendió en D+A+X a razón de 1ml por cada 100 ul de precipitado celular (Figura 2). De la suspensión celular se tomaron alícuotas de 200 ul y se llevaron a un volumen final de 2ml. por matraz con la solución de D+A+X. Algunas células recibieron en el medio de incubación diferentes dosis de alfa-IFN leucocitario (obtenido por donación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en La Habana, Cuba) + hCG (Reyes-Esparza y Romano, 1989) ó bien DMEM + agua en el caso de los grupos basales. Se utilizaron alícuotas de la ampollita de alfa-IFN de 25,000 U.I. , haciéndose distintas diluciones , diluyendo el IFN en DMEM sólo. Para observar el efecto del alfa-IFN se realizó una curva dosis-respuesta, utilizando dosis desde 0.1, 1, 10 100, y 1000 U.I. (Drava, 1986). Las condiciones de incubación son las mismas que para el bioensayo de ovario, con la modificación de que el tiempo de incubación de las células con el alfa-IFN fué de 5 hrs. (Drava, 1986). Los controles basales contenían 1750 ul de D+A+X + 200 ul de suspensión celular + 25 ul de agua + 25 ul de DMEM sólo. Los controles estimulados con hCG contenían 1750 de D+A+X + 200 ul de suspensión celular + 25 ul de hCG en una dosis de 1ng /ml + 25 ul de DMEM sólo. Los experimentales basales contenían 1750 ul de D+A+X + 200 ul de suspensión celular + 25 ul de agua + 25 ul de alfa-IFN (dosis de 0.1, 1, 10, 100, 1000 U.I.) Los experimentales

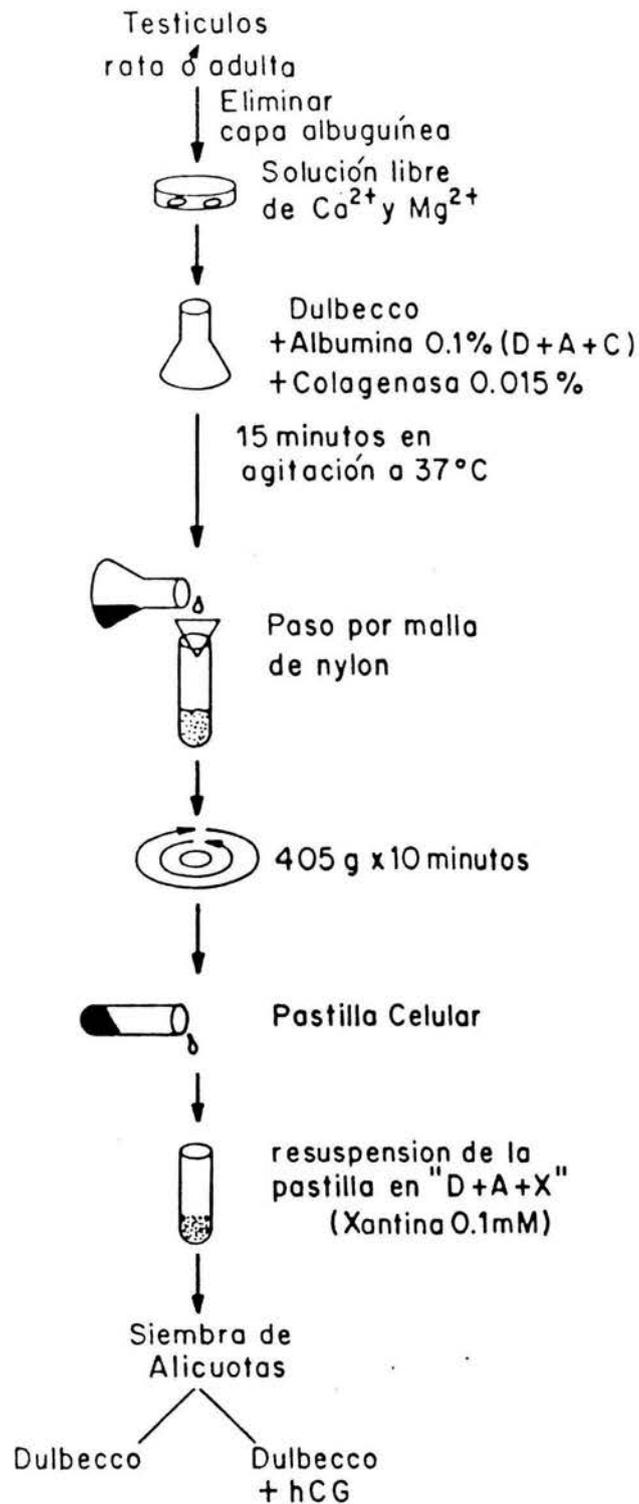


Figura 2. Diagrama de flujo que se siguió para obtener la población de células de Leydig y su posterior uso en los experimentos.

celular + 25 ul de hCG + 25 ul de alfa-IFN. Después de transcurrido el tiempo de incubación se determinó la producción de  $T_4$  por RIA

#### 5.6.- Bioensayo de ovario con alfa-IFN: Efecto de dosis y tiempo de exposición

Para establecer la acción del IFN sobre la producción de esteroides por el ovario estimulado con hCG, se estudió el efecto de varias dosis de interferón en el modelo. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para el bioensayo de testículo. Las dosis de alfa-IFN, que fueron utilizadas estuvieron entre 0.01 y 1000 U.I. y la dosis de hCG fué de 10 ng/ml. El tiempo de incubación de las células fué de 4 hrs. Se hicieron grupos basales control, estimulados control con hCG, y basales y estimulados con hCG en presencia de Interferón. El volumen final de cada matraz fué de 1ml.

Para determinar que tiempo era el más adecuado para obtener la mejor respuesta en la interacción del alfa-IFN con la hCG sobre la esteroidogénesis ovárica se realizó una curva temporal utilizando tiempos entre media hora y 10 horas en presencia o ausencia de IFN (1000 U.I.). Las condiciones de incubación fueron las mismas descritas para otros bioensayos. Una vez finalizado cada tiempo de incubación, las células se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para extracción de esteroides con éter, mientras que la pastilla se usó para observar la viabilidad celular.

#### 5.7.- Determinación de esteroides ( $T_4$ y $E_2$ )

Se llevó a cabo por la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA). Esta es una

permite cuantificar cantidades diminutas de innumerables sustancias. El fundamento básico del RIA se rige por la ley de acción de masas de las uniones antígeno-anticuerpo, donde la hormona marcada (radiactiva) compite 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 fué la 1,2,6,7-<sup>3</sup>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<sub>2</sub> NaPO<sub>4</sub> 4.3 g, HNa<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2.7 g, NaCl 4.5 g Azida de Sodio 0.5 g y Gelatina 0.5g: para 500 ml a pH = 7.2) El mismo procedimiento se usó para la determinación de E<sub>2</sub>, y se utilizó un anticuerpo anti-estradiol (Radioassay System Lab., Inc. 1721) que une además un 2.75% de estrona. La dilución final del anticuerpo fué de 1:57000, y la hormona marcada fué la 1,2, 4, 8-<sup>3</sup>H Estradiol (Amersham Int.). La separación del estradiol tritiado libre del unido al anticuerpo, se realizó por el mismo procedimiento que para testosterona. La cuantificación de los complejos anticuerpo <sup>3</sup>H-Testosterona y anticuerpo <sup>3</sup>H-Estradiol se realizó en un contador para emisiones beta (Packard, Tri-Card 3255), utilizándose el líquido de centelleo de Miles-Yeda (PPD 4g, POPOP 200 mg, Tolueno 665 ml y Tritón 335 ml para un litro), la sensibilidad del RIA fué 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

fria, y la transformación logit de "y" es  $\ln (y/100-y)$  . Los datos se obtuvieron por duplicado.

#### 5.8.- Determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular se realizó por el método de tinción por azul de tripán al 0.1%. Las células vivas no incorporan el colorante a su citoplasma, mientras que las muertas lo absorben y se tiñen de color azul. Después de ponerlas con el colorante se cuentan en un hemocitómetro bajo un microscopio óptico.

#### 5.9 Análisis de Resultados

Para saber si los tratamientos tenían una significancia estadística, estos fueron analizados con un análisis de varianza simple (ANOVA) seguidos por una prueba de "t" de Student (Snedecor, 1979).

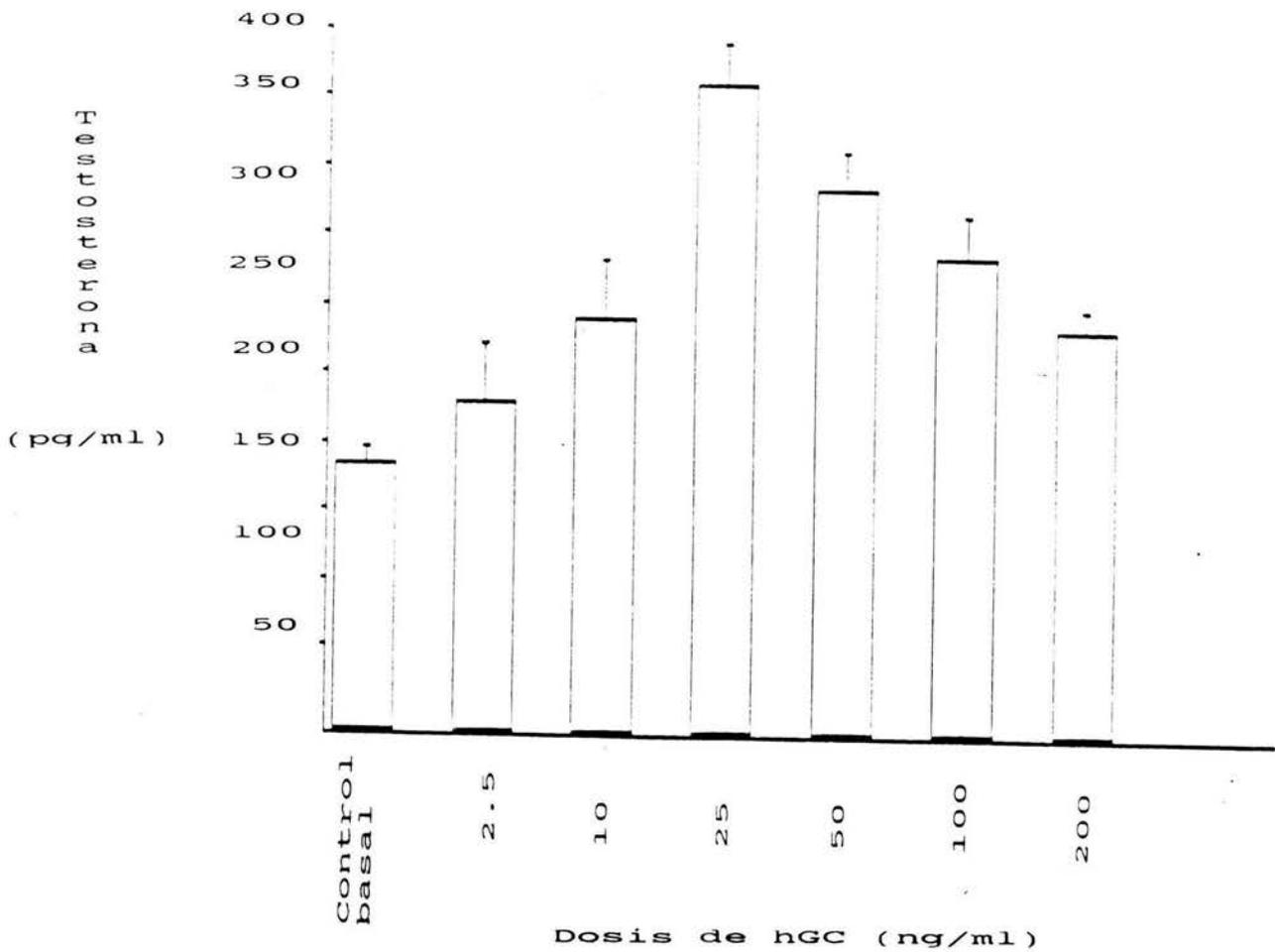
Los datos se expresan como la media la desviación estandar de 5 experimentos por triplicado para cada objetivo.

### 6.1.- Secreción de testosterona en ovario de animales de 21 días .

#### Efecto de hCG

En la Figura 1 se muestra el efecto de las diferentes dosis de hCG sobre la secreción de  $T_4$  en el ovario de 21 días. La dosis de 2.5 ng/ml no tiene aún efecto de estímulo cuando se le compara con la secreción basal, observándose una respuesta en la secreción estimulada neta hasta la dosis de 10 ng/ml, para alcanzar su máximo estímulo a los 25 ng/ml. A partir de esta dosis, observamos un ligero descenso en la producción estimulada de  $T_4$ . Esta caída en la secreción es con respecto a la dosis máxima y no a la secreción basal, ya que aún sigue habiendo un estímulo sobre la basal. A partir de 50 ng/ml, ya no hay una respuesta secretoria en subida, sino que se llega a una meseta, por que las diferencias entre la secreción estimulada por 50 y 200 ng/ml de hCG no son significativas a una  $P < 0.05$ .

El estímulo de la dosis de 10 ng/ml sobre la basal provoca un 50% de incremento (Figura 1b) y la diferencia en incremento entre la dosis de 10 ng/ml y 25 ng/ml es del 21% y el incremento neto entre la basal y la dosis máxima de estímulo en secreción es de 71%. Por tanto, de las dosis que nosotros probamos, escogimos la de 10 ng/ml como sub-máxima, ya que como se observa en la figura a 25 ng/ml ya se alcanzó la respuesta secretoria máxima de las células, y estadísticamente hay diferencia significativa a una  $P < 0.05$ . Sabemos que a dosis máximas los receptores a hCG se saturan, por lo tanto, dado que el efecto del alfa-IFN no estaba bien definido sobre este modelo experimental, usando la dosis máxima de estimulación con hCG no hubiera sido posible obtener resultados extrapolables si el alfa-IFN hubiese estimulado en lugar de inhibir como se verá mas adelante. Así que en adelante se escogió la dosis de 10



**Figura 1.** Curva Dosis-Respuesta a hCG: Secreción de Testosterona por el ovario de 21 días. Las células se obtuvieron como se menciona en materiales y métodos y se incubaron a 37°C por 3 horas. Se observa el pico máximo de secreción a la dosis de 25 ng/ml después del cual hay una caída en la secreción de testosterona. Se grafica la media  $\pm$  DS de 5 experimentos hechos por triplicado.

ng/ml para trabajar.

#### 6.2.- Secreción de estradiol por el ovario de animales de 21 días

##### Efecto de hCG

La respuesta secretoria de las células al estímulo con hCG con respecto al  $E_2$  se alcanza desde dosis mas bajas que con testosterona ya que con 2.5 ng/ml la célula incrementa su secreción de  $E_2$  en 8 veces la basal.

La dosis de 10 ng/ml junto con la de 25 ng/ml son las que producen el mayor estímulo sobre la secreción de estradiol, ya que no hay diferencia significativa a una  $P < 0.05$  entre ambas dosis, y nuevamente se observa un descenso en la respuesta celular cuando se adicionaron dosis mayores de 25 ng/ml.

Este descenso fué mucho más marcado que el observado para la secreción de testosterona (Figura 2).

La dosis de 25 ng/ml incrementa la basal en 10 veces, por lo que de acuerdo al criterio utilizado, aunque no hubo diferencia entre la dosis de 10 ng/ml y 25 ng/ml, se seleccionó la dosis de 10 ng/ml para trabajar en adelante, dado que si era dosis submáxima para testosterona.

#### 6.3.- Curva Temporal de producción de $T_4$ en ovario de 21 días

##### A.- Secreción basal

##### B.- Secreción estimulada

En la figura 3a observamos los cambios que ocurren en la secreción basal aumentada conforme pasa el tiempo. Dicha secreción aumenta de forma lineal, para alcanzar su nivel óptimo entre 4 y 6 horas. Así es que considerando que entre 4 y 6 horas se encuentra el tiempo óptimo de actividad de las células, se escogió el tiempo de 5 horas

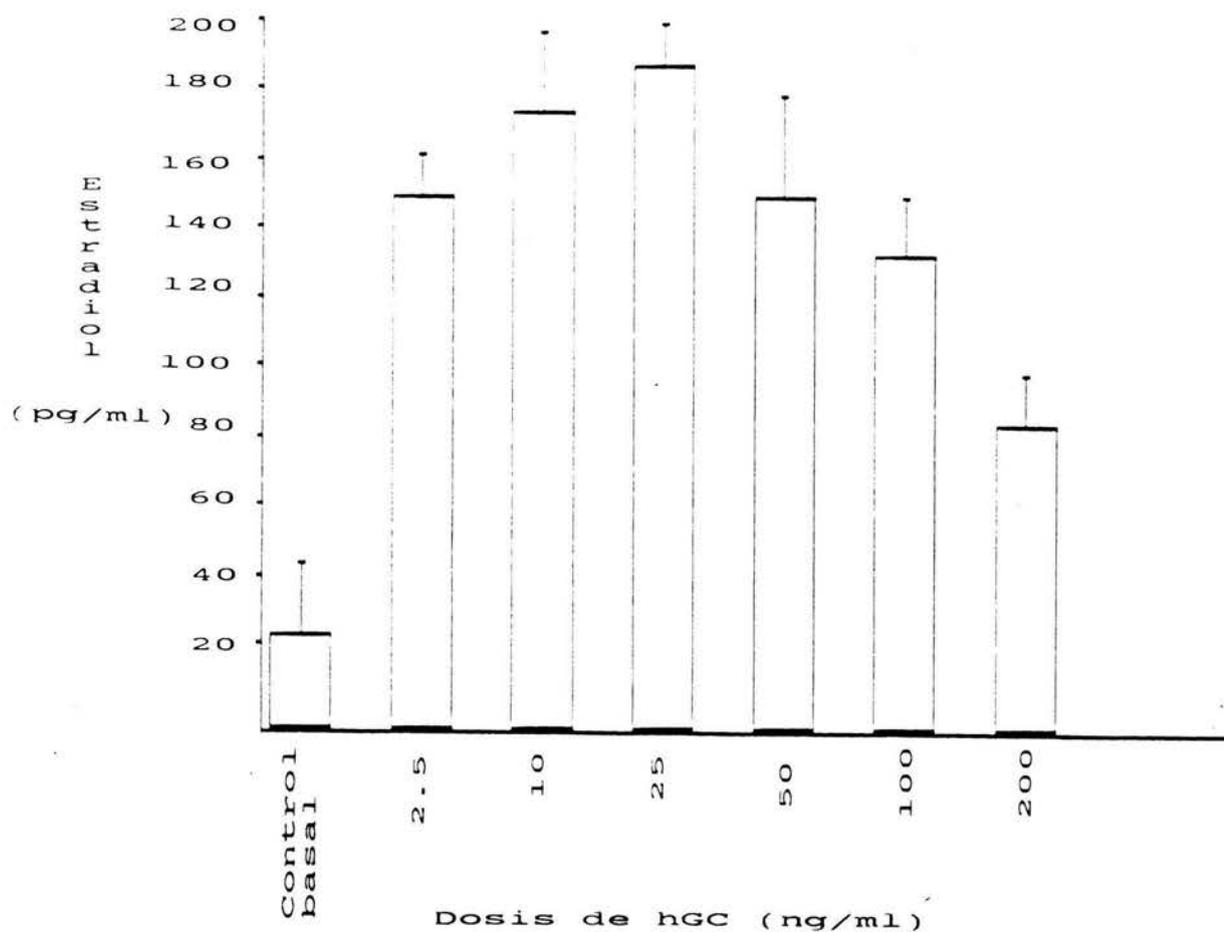


Figura 2. Curva Dosis-Respuesta a hCG: Secreción de Estradiol por el ovario de 21 días. Las células se trataron igual que en la figura 1. Se observa nuevamente que el pico máximo de secreción se alcanza con la dosis de 25 ng/ml y que después cae marcadamente la producción del esteroide. Se grafica la media  $\pm$  DS de 5 experimentos hechos por triplicado.

para incubar las células en los experimentos con IFN.

La secreción temporal aumentada de testosterona estimulada con una dosis fija de hCG (10 ng/ml) se muestra en la figura 3b. Conforme el tiempo de incubación aumenta, la secreción estimulada se incrementa en una forma lineal uniforme hasta las 6 horas. Después de este tiempo la producción de testosterona disminuye de manera significativa.

#### 6.4.- Curva Temporal de producción de $E_2$ en ovario de 21 días

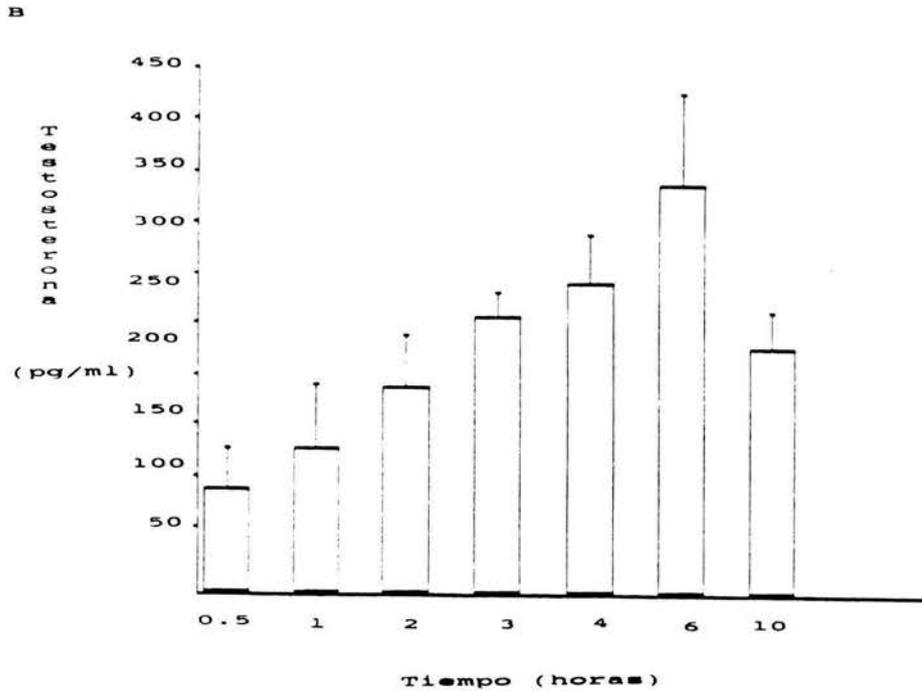
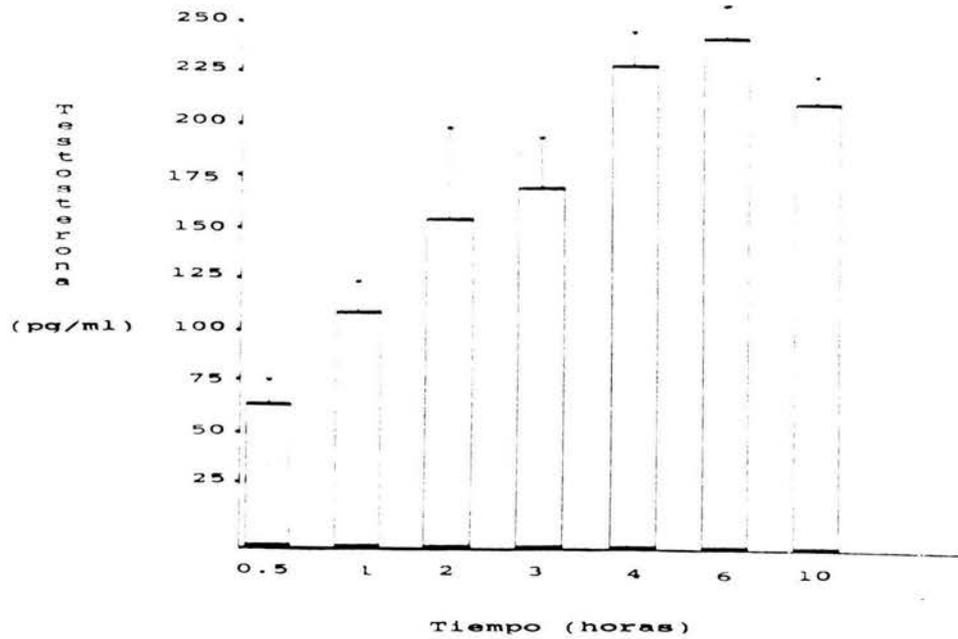
A.- Secreción basal

B.- Secreción estimulada

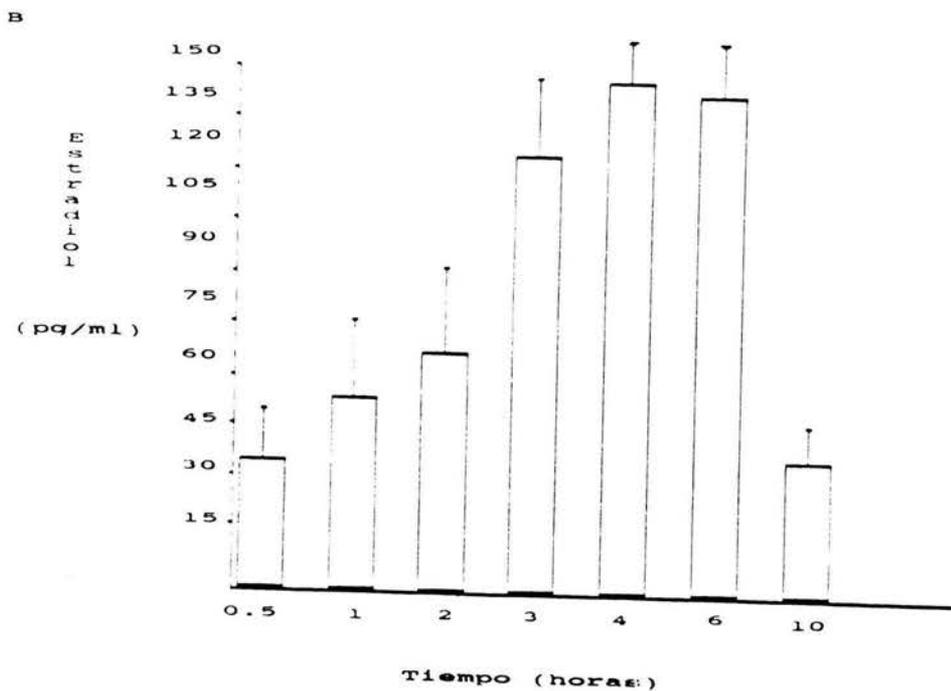
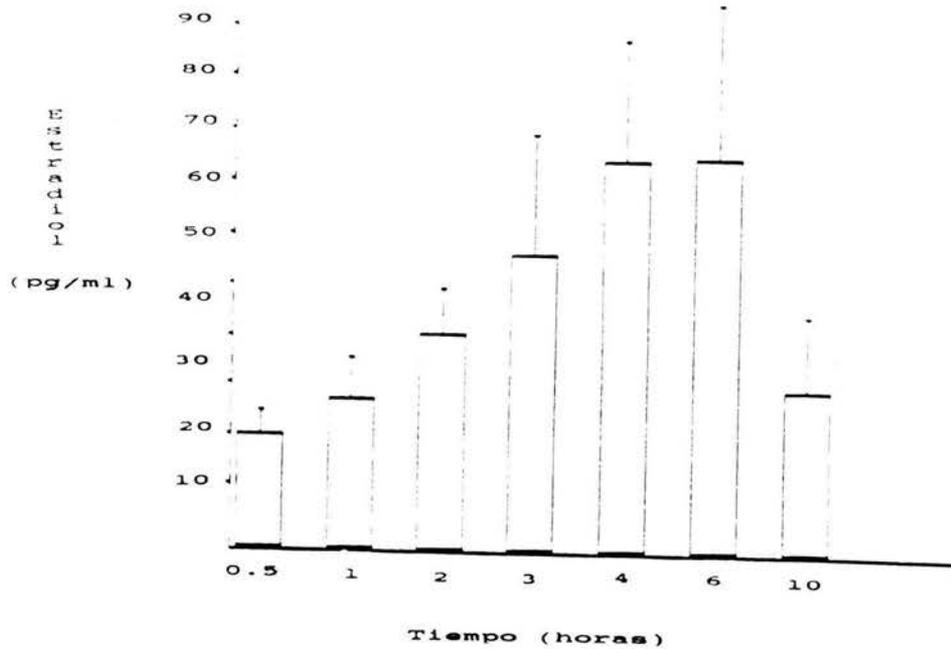
En lo que respecta a la secreción basal temporal de estradiol, hay un incremento lineal claro hasta las 3 horas, para alcanzar a las 4 horas un pico que permaneció estable entre las 4 y las 6 horas. A las 10 horas, se observó un marcado decremento de la actividad celular de manera que se alcanzaron niveles de secreción similares a los encontrados a la hora. Nuevamente, 5 horas de incubación son un tiempo adecuado para que las células estén en condiciones óptimas de funcionamiento. (Figura 4a)

Se observa en la figura 4b el patrón de secreción de estradiol estimulada con 10 ng/ml de hCG. Es evidente que hay un incremento en la secreción hormonal lineal hasta las 2 horas, tiempo después del cual se incrementa la estimulación al doble (con respecto a los tiempos anteriores), alcanzando el máximo aparente de secreción acumulada a las 4 horas. A las 10 horas se hizo claro el descenso de la actividad celular, estando en este tiempo la producción al mismo nivel que a la 1/2 hora de incubación.

El pico entre 4 y 6 horas sufre muy poca disminución entre uno y otro,



**Figura 3.** Curva Temporal: Secreción de Testosterona a diferentes tiempos en ovario de 21 días. A) Secreción basal: Se puede observar que las células van aumentando la producción del esteroide a medida que aumenta el tiempo de incubación. A las 6 horas alcanzan el máximo de secreción. La viabilidad celular se mantuvo uniforme a lo largo del experimento. B) Secreción estimulada: Se utilizó hCG a la dosis de 10 ng/ml para estimular a las células. Se observa que a las 6 horas hay un máximo de respuesta. La viabilidad celular se mantuvo uniforme. Se grafica la media  $\pm$  DS de 5 experimentos hechos por triplicado en ambas gráficas.



**Figura 4.** Curva Temporal: Secreción de Estradiol a diferentes tiempos en ovario de 21 días. A) Secreción basal: Se observa que a las 4 horas las células alcanzaron el máximo de secreción que mantienen hasta las 6 horas. A las 10 horas se produjo una caída en la producción hormonal. B) Secreción estimulada: Las células se estimularon con 10 ng/ml de hCG y se incuban a 37°C. A las 4 horas las células alcanzaron su máxima producción de estradiol. A las 10 horas las células disminuyeron su secreción marcadamente. La viabilidad celular se mantiene constante a lo largo del tiempo. Se grafica la media  $\pm$  DS de 5 experimentos hechos por triplicado en ambas gráficas.

una respuesta celular aceptable.

#### 6.5.- Curva Dosis-Respuesta de alfa-IFN sobre testículo adulto

- A.- Secreción Basal
- B.- Secreción estimulada
- C.- Secreción diferencial

La dosis de hCG utilizada en estos experimentos corresponde a 1 ng/ml ya que por bibliografía (Reyes-Esparza y Romano, 1989) está establecida como submáxima para este modelo experimental. Es mucho más baja que la utilizada para el ovario en desarrollo porque es testículo adulto, por lo tanto es mucho más sensible al estímulo gonadotrófico, ya que en él están bien establecidos todos los mecanismos de síntesis de esteroides y respuesta a LH y FSH. En la Fig.-5a se muestra el efecto del alfa-IFN sobre la secreción basal de testosterona. Como se observa en la figura, no existe una clara dependencia de la dosis de interferón sobre la secreción basal de testosterona, ya que las dosis de 0.1 y 1 U.I./ml tienden a inhibir la basal, aunque entre ellas no haya diferencia significativa disticamente hablando, ya que a una  $P < 0.05$  no hay diferencia en el efecto. A la dosis de 10 U.I./ml incluso hay una estimulación sobre la basal, para a 100 U.I./ml volver a tener efecto inhibitorio, y alcanzar un máximo de inhibición a la dosis mayor utilizada de 1000 U.I./ml de alfa-IFN.

Como se puede observar en la figura 5b, la inhibición que produce el alfa-IFN sobre la secreción estimulada por hCG en el testículo se produce marcadamente desde la dosis más baja (0.1 U.I./ml) usada, y este efecto aumenta en la siguiente dosis, para que realcanze una meseta a partir de ésta. La mayor inhibición de la respuesta a hCG fué de alrededor del 70% sobre el control hCG. La dosis de 0.1 U.I./ml de

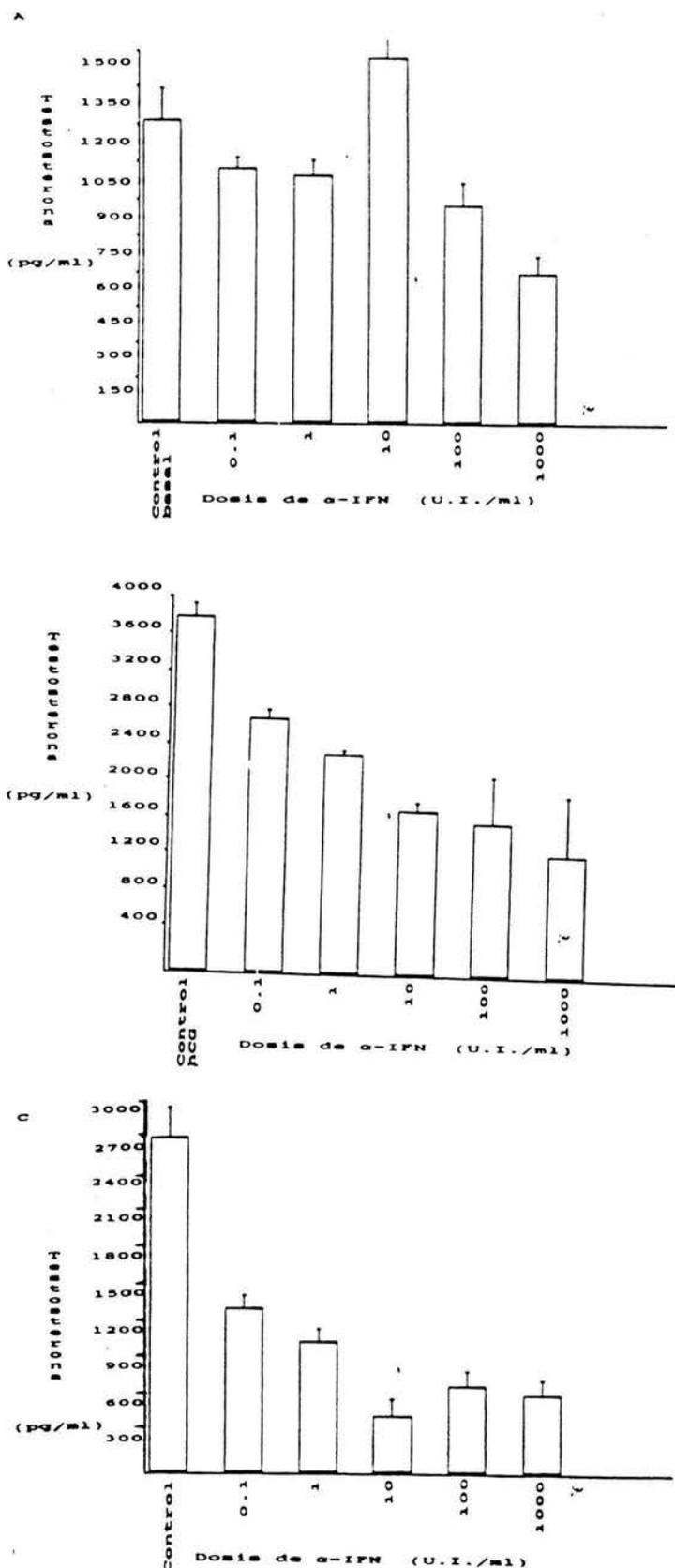


Figura 5. Efecto del  $\alpha$ -IFN sobre la secreción de testosterona por el testículo adulto. A) Secreción basal. La viabilidad celular medida por la prueba del azul tripan no se modifica a lo largo del experimento. B) Secreción estimulada de testosterona en presencia de  $\alpha$ -IFN. Se utilizó una dosis de hCG de 1 ng/ml y las células fueron incubadas a 37°C durante 5 horas en agitación continua. La viabilidad celular se mantuvo constante a lo largo del experimento. C) Secreción diferencial. Se observa la relación que hay entre la secreción basal y la secreción estimulada de testosterona. Se modifica

alfa-IFN inhibió en un 40% la secreción estimulada de testosterona. La secreción diferencial calculada de  $T_4$  ante diferentes dosis de IFN ( $T_4$  estimulada- $T_4$  basal) se presenta en la Fig.-5c, y continúa observándose un patrón dosis-dependiente de secreción a pesar del comportamiento ambiguo de la secreción basal. Otra vez, la menor inhibición provocada por el IFN se observa ya desde la dosis mas baja y esta continua hasta llegar a a un efecto mayor de inhibición a la dosis de 1000 U.I./ml de alfa-IFN.

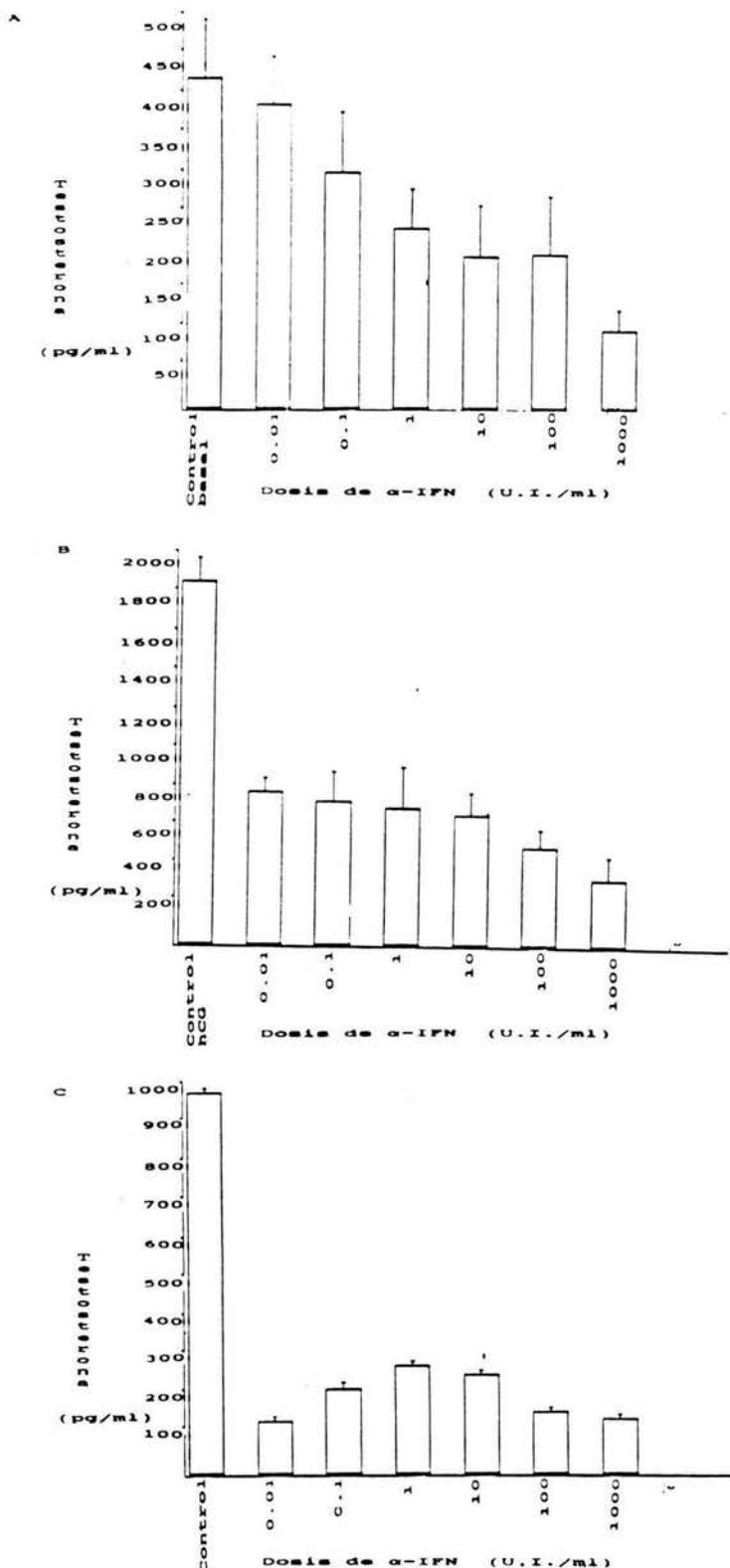
#### 6.6 Efecto del alfa-IFN sobre la secreción de $T_4$ estimulada con hCG en el ovario de 21 días

La secreción basal de testosterona es afectada por las diferentes dosis del IFN en un patrón dosis-dependiente y continua aumentando a la mayor dosis utilizada en estos experimentos.

A la dosis más baja (0.01 U.I./ml) el efecto inhibitorio del IFN sobre la basal es de 4%; este efecto aumenta hasta 18% en la siguiente dosis y hasta 32% en la dosis de 1 U.I./ml. Se observa claramente en la figura 6a que la relación de inhibición hasta la dosis de 1 U.I./ml es uniforme ya que cada dosis va aumentando su efecto en 14%, para mantenerse así hasta la dosis de 10 U.I./ml y alcanzar el 70% de inhibición con la dosis más alta.

La figura 6b muestra el patrón de secreción de testosterona estimulada con hCG a diferentes dosis de IFN. El efecto inhibitorio que produce esta proteína es muy marcado desde la dosis más baja, donde se observa un 55% de inhibición de la respuesta a hCG. Con dosis mayores se mantiene y se hace más notable dicho efecto con la dosis de 1000 U.I./ml con un 80% de inhibición.

La secreción diferencial de  $T_4$  nos muestra que las dosis de alfa-IFN



**Figura 6.** Efecto del  $\alpha$ -IFN sobre la secreción de testosterona por el ovario de rata de 21 días. A) Secreción basal. B) Secreción estimulada. Las células se estimularon con 10 ng/ml de hCG y se incubaron a 37°C durante 5 horas en agitación continua. C) Secreción diferencial de testosterona. La viabilidad celular no se modifica a lo largo de los experimentos. Se grafica la media  $\pm$  DS de los datos obtenidos en 5 experimentos hechos por triplicado.

tienen una inhibición semejante y que no hay diferencias entre los efectos producidos por las dosis de 0.01, 100 y 1000 U.I./ml. De la misma forma, las dosis de 0.1 y 10 U.I./ml no son diferentes en su efecto y la dosis de 1 tiene un efecto inhibitorio menor con respecto a las otras dosis. Lo importante es que el efecto inhibitorio sobre la secreción de  $T_4$  es muy notorio desde la dosis más baja utilizada, y que se mantiene así durante las diferentes dosis (Figura 6c).

#### 6.7.- Efecto del alfa-IFN sobre la secreción de estradiol

En la figura 7b se puede observar que el efecto del IFN sobre la secreción de estradiol en el ovario inmaduro es dosis-dependiente y llega a un máximo de actividad inhibitoria a la dosis de 100 U.I./ml. manteniendose este efecto a las 1000 U.I./ml, ya que no hay diferencia significativa estadísticamente hablando entre estas dos dosis. Como se puede observar en la figura , el efecto es paulatino, ya que la primer dosis inhibe sólo 10% sobre el control que sólo recibió hCG. La dosis de 1 U.I. inhibe la respuesta a hCG en un 25%, y aumenta a 42% a la dosis de 10 U.I./ml. Las dosis de 100 U.I./ml y 1000 U.I./ml inhiben en un 70% el efecto de la gonadotropina.

En la Fig.-7a se presenta el efecto del alfa-IFN sobre la secreción basal de estradiol. Es evidente que el efecto del interferón es aquí menos marcado que el caso de testosterona . La inhibición producida por la proteína , aunque sigue un comportamiento relacionado a la dosis, se estabiliza entre las dosis de 0.1 y 100 U.I./ml, ya que a una  $P < 0.05$  no hay diferencia estadística significativa entre estos tratamientos, para que se observe el mayor efecto inhibitorio del alfa-IFN a la dosis de 1000 U.I./ml, dosis a la cual se inhibe la secreción basal en un 65%.

La comparación diferencial (Fig 7c) presenta un comportamiento bastante

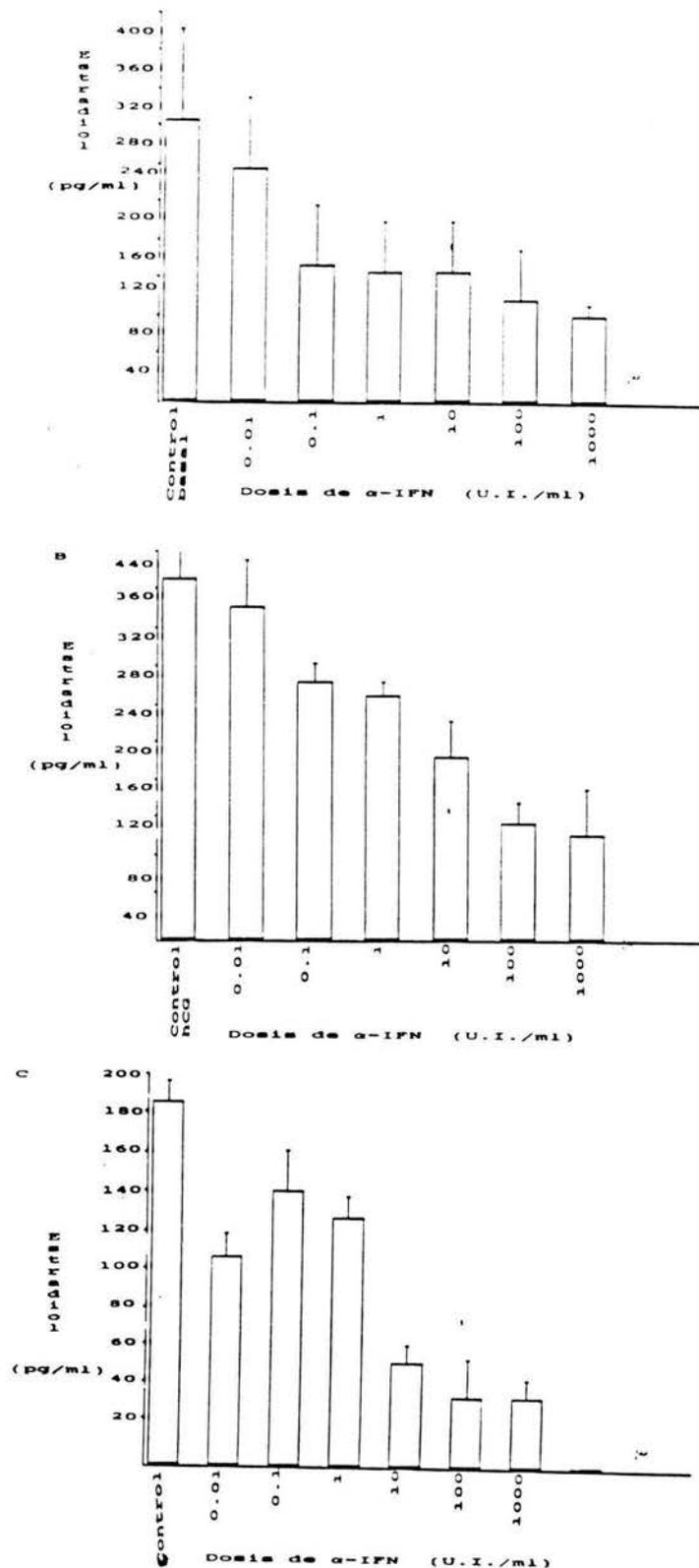


Figura 7. Efecto de  $\alpha$ -IFN sobre la secreción de estradiol por el ovario de rata de 21 días. A) Secreción basal. B) Secreción estimulada de estradiol. Se utilizó la dosis de hCG de 10 ng/ml, incubándose las células a 37°C durante 5 horas en agitación constante. C) Secreción diferencial de estradiol obtenida restando la secreción basal que se obtuvo cuando las células se estimularon con hCG. La viabilidad celular no se modifica a lo largo de los experimentos. Se grafica la media  $\pm$  DS de los datos obtenidos en 5 experimentos hechos por triplicado.

relacionado con la concentración de alfa-IFN utilizada en los experimentos. Entre las dosis de 0.01 y 1 U.I./ml la inhibición no es significativa a una  $P < 0.05$ , sin embargo es muy marcada a partir de 10 U.I./ml. manteniéndose el efecto entre las dosis de 10 U.I./ml y 1000 U.I./ml que no presentan diferencias significativas entre cada tratamiento.

## DISCUSION

A la edad de 21 días, la rata hembra se encuentra en el estadio juvenil del desarrollo. Djeda en 1979, reportó que los niveles séricos de testosterona en esta etapa del desarrollo se encuentran más elevados, de 3 a 4 veces que los de estradiol. Por otra parte Pelusso en 1988, observó un patrón similar en cultivo de ovarios perfundidos. Nuestros resultados son congruentes con estas observaciones, ya que al estimular la secreción de testosterona con hCG utilizada como equivalente a LH la producción de testosterona es mucho mayor que la de estradiol ( ver Figuras 1a y 1b).

A los 21 días de edad se observó en el ovario de la rata un franco predominio en la producción de testosterona sobre la de estradiol, dado que la capacidad de aromatización por el ovario en este periodo del desarrollo no está aún bien establecida. Lloyd en 1979 y Knobil en 1988 reportan que durante el estadio juvenil de la rata, la actividad de la aromatasa está muy disminuída, esta enzima es la responsable del paso limitante para que los andrógenos se aromaticen a estrógenos. Otra observación que apoya el hecho de que haya un predominio de testosterona sobre los otros esteroides (estradiol y progesterona) fué hecha por Djeda, en 1979 y 1981, quien encuentra que durante este periodo del desarrollo hay una actividad elevada de conversión de progesterona a testosterona, que prepara así al ovario a entrar al estadio prepúber del desarrollo, en el cual la maquinaria enzimática para aromatizar andrógenos quedará bien establecida.

Por otra parte, Michael, 1980, Zhuang en 1982, Djeda en 1980 y Knobil en 1988 han reportado que en el periodo juvenil del desarrollo, los niveles séricos de FSH son más bajos que los de LH. Esta

descompensación en la secreción de gonadotropinas podría explicar en parte la baja capacidad de aromatización de andrógenos, ya que está es estimulada por FSH en las células de la teca.

En las figuras 1a y 1b se puede observar que la dosis de 25 ng/ml es la dosis máxima a la que las células de ovario responden. No se usó esta dosis si no la de 10 ng/ml por que si hubiese habido un efecto estimulador por parte del IFN posiblemente no se hubiera visto claramente, dado que las células ya habrían alcanzado el máximo de actividad esteroidogénica. Se esperaba una inhibición en la secreción de esteroides por que Orava y Kauppila demostraron, en 1989, que en células de Leydig de rata, cuyo y cerdo en cultivo, el alfa-IFN inhibe la secreción de testosterona estimulada por hCG en una forma dependiente de la dosis, y que este efecto no se da sobre la producción basal de este esteroide. Nuestros resultados con testículo adulto, demostraron que este efecto inhibitorio no se da sólo a nivel de la secreción estimulada, sino también sobre la basal, lo que nos dice que hay diferencia en este aspecto con su modelo. Posiblemente, el alfa-IFN está actuando a nivel de sus propios receptores en testículo, y no de manera competitiva con los receptores a hCG, dado que tiene una importante acción inhibitoria sobre la secreción basal (ver más adelante).

En lo que respecta al estradiol, en la figura 2a se ve que la secreción de esta hormona es mucho más sensible al estímulo gonadotrófico ya que a la dosis más baja (2.5 ng/ml) las células aumentan su actividad en 8 veces la basal. Estos resultados sugieren que existe una mayor sensibilidad al estímulo gonadotrófico para estradiol que para testosterona. Esto va a provocar una maduración folicular nautilina, preparando al ovario para llegar al estadio puberal y al

establecimiento del ciclo del estro en la rata.

El mejor tiempo de exposición a hCG sobre la esteroidogénesis fué observado haciendo una curva temporal de producción de esteroides. La producción esteroidogénica fué tiempo-dependiente. En nuestro laboratorio, se ha encontrado este efecto, tanto para el ovario infantil como juvenil.

La secreción de testosterona demostró que las células a las 6 horas de incubación están en buenas condiciones, ya que a este tiempo se presenta el pico más alto de secreción. Era importante determinar el tiempo óptimo de producción y sobrevivencia de las células, por que en los trabajos en los que se utiliza IFN en testículo (Kauppila en 1987, Catt, en 1987, Kauppila en 1989) el tiempo de incubación óptimo es de 5 horas. Nuestro modelo permite utilizar este tiempo de incubación con el interferón sin que haya alteraciones en la viabilidad celular. Con referencia al estradiol, el tiempo de interacción óptimo con hCG es a las 4 horas, aunque entre 4 y 6 horas la diferencia no es significativa lo que implicaría que entre esos tiempos se encuentra el tiempo óptimo de la respuesta secretora. Después de este tiempo, la actividad celular comienza a decaer lo que indica un posible efecto de regulación negativa por exceso a hCG, ya que las pruebas de exclusión del colorante mostraron que la sobrevivencia celular no se afectaba.

Este punto es una aportación original del trabajo, ya que no se había reportado a la fecha ningún estudio sobre el curso temporal del efecto de la hCG in vitro en células disgregadas de ovario juvenil.

Al observar lo que ocurre con la secreción basal en las figuras 3b y 4b se nota el mismo patrón de incremento en el tiempo que el descrito para los estimulados, indicando otra vez que a los primeras horas de

interacción las células están en buenas condiciones de funcionamiento y que son capaces de producir esteroides espontáneamente.

Para probar que la actividad del IFN de que disponíamos es la misma que la del alfa-IFN de los trabajos de Kauppila se empleo un modelo similar al que estos autores usaron , células disgregadas de testículo adulto. Como se observa en las figuras, el IFN produce un efecto inhibitorio sobre la secreción de testosterona, tanto basal (5b) como estimulada (5c) en células de testículo. El efecto que se encontró es dosis-dependiente, ya que como se esperaba al aumentar la dosis de alfa-IFN, el efecto inhibitorio sobre la secreción de testosterona iba en aumento. Por otra parte, la secreción basal también se inhibe ligeramente en algunas de las dosis utilizadas, pero de ninguna manera en forma dosis-dependiente. Nuestros resultados concuerdan con los de Orava, quién en 1988 encontró que el alfa-IFN producía un efecto inhibitorio de la secreción estimulada por hCG sobre las células de Leydig de porcino pero no había alteraciones de la secreción basal. En otro estudio hecho por Kauppila en 1982 se observó también inhibición de la secreción estimulada por hCG de testosterona en células de Leydig de Hamster en cultivo.

Es importante hacer notar que el mecanismo por el cual se produce el efecto inhibitorio del alfa-IFN ha sido caracterizado por Orava en 1989. Este autor demostró que el alfa-IFN inhibe la producción de RNAm que codifica para las enzimas de los sistemas esteroidogénicos P-450<sub>scc</sub> y P-450<sub>c17</sub>, las cuales actúan en pasos limitantes de la producción de andrógenos en el testículo, por lo que está disminuida la producción de testosterona. En lo que respecta al efecto del alfa-IFN sobre el ovario, tenemos por un lado, la inhibición sobre la producción de testosterona y

por otro el efecto inhibitorio sobre la producción de estradiol, tanto en condiciones basales, como bajo estímulo con hCG.

La producción estimulada de testosterona por hCG está inhibida, como lo podemos observar en la figura 6b. El patrón parece ser dosis-dependiente aunque el efecto está muy acentuado desde la dosis menor, que es de 0.01U.I./ml. Si comparamos estos resultados con los de testículo, podemos observar que en ambos casos la respuesta al efecto del alfa-IFN se produce desde dosis muy bajas. El hecho de que el ovario en desarrollo responda a alfa-IFN podría indicar la presencia de receptores al mismo en el ovario desde estas etapas del desarrollo.

Por otro lado, el efecto de esta proteína sobre el animal íntegro se produce en dosis muy bajas, cuando se le inyecta de forma intravenosa directamente en el sitio donde se quiere ver su acción (Kauppila, 1982). Dado que las cantidades de IFN producidas en condiciones normales son muy pequeñas, es importante encontrar efectos tan marcados por parte del alfa-IFN desde dosis tan bajas.

Si observamos la figura 6a, vemos que el alfa-IFN produce una inhibición del estímulo de hCG sobre la secreción de testosterona que si es dosis-dependiente, y que produce una inhibición del 75% a la dosis de 1000 U.I./ml. Este punto podría ser una clave para ver que el posible mecanismo regulatorio del alfa-IFN es a nivel de la secreción estimulada que en condiciones fisiológicas in vivo sería por LH-hCG, y no a y no a nivel de un estado no estimulado. Dado este efecto sobre la secreción estimulada por hCG, se puede especular que además de posibles cambios en el proceso de esteroidogénesis el alfa-IFN interfiere con hCG, tal vez interactuando a nivel del receptor LH-hCG, o en los pasos posteriores de la esteroidogénesis regulados por estas gonadotropinas.

El hecho de que a dosis bajas el IFN no modifique la secreción basal sugeriría que esta proteína no está modulando importantemente la producción esteroidogénica no estimulada por LH-hCG in vitro.

En lo que concierne a la secreción basal y estimulada de estradiol los efectos son similares a los observados para testosterona, lo que sugiere que la inhibición en la producción de estradiol se puede dar a raíz de la disminución de aporte de precursor, o sea testosterona, que sería la primariamente afectada. Sería importante estudiar, sin embargo la capacidad de aromatización en ovario inmaduro en presencia de interferón, para observar si la regulación es a nivel de la aromatización de testosterona a estradiol o a nivel de otros pasos, como serían la alteración de los sistemas enzimáticos P-450scc y P-450c-17, que son claves en la esteroidogénesis.

Otro posible mecanismo regulador del alfa-IFN es a nivel de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, ya que en nuestro laboratorio Mendoza y Romano (1990), demostraron que el alfa-IFN leucocitario humano inhibe la secreción de LH y FSH en cultivo de hipófisis. El papel del alfa-IFN en la regulación de la secreción de gonadotrofinas puede ser clave para el desarrollo gonadal, aunado a su efecto directo sobre el ovario.

La secreción diferencial es la relación que hay entre la secreción basal y la secreción estimulada, y como se puede observar en las figuras correspondientes no siempre se presenta un claro patrón dosis-dependiente, ya que el efecto inhibitorio del alfa-IFN es siempre mayor sobre la secreción estimulada por hCG, que sobre la secreción basal.

Los resultados aquí reportados en ovario concuerdan con los encontrados por otros autores sobre otras células esteroidogénicas, como las de testículo. Vihko y colaboradores y Kaupila y colaboradores han demostra

do este efecto sobre células de cerdo (1989), de ratón (1989), y siempre han observado un efecto inhibitorio, no sólo con alfa-IFN, sino probando también gamma-IFN. Es importante remarcar que ellos caracterizaron el efecto, encontrando que disminuyen los mRNA que codifican para las enzimas de los sistemas P-450<sub>scc</sub> y P450-c-17, que actúan en pasos limitantes de la esteroidogénesis testicular. Por lo tanto será necesario seguir caracterizando el efecto del alfa-IFN en ovario, estudiando por ejemplo el número de receptores al mismo, la posible interacción competitiva con hCG y efectos sobre la expresión de información genética.

Por otra parte, es bien conocido que a nivel fisiológico existen mecanismos de regulación por retroalimentación positiva y negativa entre los esteroides ováricos y la secreción de gonadotrofinas y viceversa. Estas interrelaciones entre hormonas gonadales esteroides y gonadotrofinas hipofisiarias gobiernan la ciclicidad ovárica en mamíferos. El patrón de LH como el de FSH está caracterizado por niveles basales relativamente bajos, interrumpidos por un brusco incremento pre-ovulatorio de LH. Esta ciclicidad está regulada por una hormona ovárica: el estradiol. El pico de LH provoca que los niveles de estradiol aumenten, y a su vez un alto nivel de estradiol provoca una señal que disminuye la secreción de gonadotrofinas. Si el alfa-IFN regula directamente en ovario la secreción de esteroides, y actúa además a nivel de hipófisis regulando la secreción de gonadotrofinas, sería un nuevo elemento regulatorio en este eje hipófisis-gónada-hipófisis.

Además de su importancia fisiológica, estos estudios contribuirían al conocimiento de efectos colaterales endócrinos que pueden presentarse durante los tratamientos de procesos cancerosos en los que se utiliza

interferón, ya que se ha observado que tratamientos en cáncer cervicouterino con IFN disminuyen las concentraciones séricas de estradiol y progesterona, así como en procesos infecciosos virales, en los que se ven aumentados los niveles de esta proteína.

## CONCLUSIONES

Después del análisis de los datos obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

---La secreción "in vitro" de  $E_2$  del ovario de 21 días se dispara con la dosis más baja de hCG (2.5 ng/ml), alcanzando un máximo de secreción aparente a los 25 ng/ml, ya que estadísticamente hablando no hay diferencia significativa entre 10 y 25 ng/ml, después de lo cual la secreción disminuye conforme aumenta la dosis, sugiriendo fuertemente un mecanismo de regulación negativa por parte de la hCG y el  $E_2$ .

\_\_\_La secreción de  $T_4$  del ovario de 21 días va aumentando paulatinamente conforme se incrementa la dosis de hCG, alcanzando las células su máximo de respuesta a la dosis de 25 ng/ml, después de la cual también hay una caída en la producción de la hormona, lo que sugiere que la regulación negativa entre hCG y  $T_4$  también se puede estar llevando a cabo.

---En el modelo de ovario "in vitro" la secreción temporal de  $E_2$ , tanto basal como estimulada con 10 ng/ml de hCG va aumentando en una forma tiempo-dependiente, alcanzando un óptimo de actividad entre 4 y 6 hrs.

--- La secreción de  $T_4$  tanto basal como estimulada con hCG aumentó en forma lineal con el tiempo de incubación, alcanzando un pico máximo de actividad entre 4 y 6hrs, para disminuir marcadamente a las 10 hrs.

---E1. ISN leucocitario inhibe la producción de  $T_4$  estimulada por hCG

de las células de Leydig de testículo de rata en una forma dosis-dependiente, alcanzando un máximo de inhibición con 1000 U.I./ml. No se afecta la secreción basal, e incluso con 10 U.I./ml tiende a estimularla.

---El IFN leucocitario inhibe la secreción tanto basal como estimulada por hCG de  $T_4$  en el ovario de 21 días, siendo el efecto observable desde la dosis de 0.01 U.I./ml.

---El IFN inhibe la secreción de  $E_2$  estimulada con hCG en ovario de 21 días en forma dosis-dependiente. Sobre la secreción basal se observa también un efecto inhibitorio, pero menos marcado que el producido sobre la secreción inducida por hCG.

## 9 LISTA DE ABREVIATURAS

T<sub>4</sub>= Testosterona

E<sub>2</sub>= Estradiol

P<sub>4</sub>= Progesterona

IFN's= Interferones

α-IFN = alfa-Interferón

P-450<sub>scc</sub>= enzima que rompe la cadena lateral del colesterol y está acoplada al sistema del citocromo P-450

P-450<sub>c17</sub>= enzima que rompe la cadena de colesterol en el carbono 17 y está acoplada al sistema del citocromo P-450

cAMP= Adenosin monofosfato cíclico

PKc= Proteina cinasa c

DGc= Diacilglicerol

Ca<sup>++</sup>= calcio

Mg<sup>++</sup>= magnesio

BSA= Albúmina de suero de bovino

X= 1,3-isobutil-metil xantina

DMEM= Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco

hCG= Gonadotropina coriónica humana

LH= Hormona Luteinizante

FSH=Hormona Folículo estimulante

GnRH= Hormona liberadora de gonadotropinas

ATP=Adenosin trifosfato

Prl=Prolactina

Adashi, E.Y., y Hsueh, A.J.W. (1982): Estrogens Augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 257: 6077-6083.

Aguilera G. y Romano M. (1989): Influence of Thymus on Steroidogenesis by Rat Ovarian Cells in vitro. *J. Endocrinol.* 3 (123): 367-373.

Alastair, J. Cunningham. *Understanding Immunology*. Academic Press, New York, pp. 254: 1978.

Allen S.L., Mc.Clure E.J., Goldstein L.A., Barkley S.M., y Michael D.S. (1984) Estrogen and Thymic hormone interactions in the female mouse. *J. of Reprod. Immunol.* 6: 25-37.

Banks, J.A., y Freeman, M.E. (1980): Inhibition of the daily LH release mechanisms by progesterone acting at the hypothalamus. *Biol. Reprod.* 22: 217-222.

Bellanti, Joseph, A. *Immunology II*. Primera Ed. Editorial: Interamericana, 1976.

Bishop, W., Kara, R.S., Fawcett, C.P., Krulich, L., y Mc.Cann, S.M. (1972): The effects of hypothalamic lesions on the release of gonadotropins and prolactin in response to estrogen and progesterone treatment in female rats. *Endocrinol.* 94: 1404-1410.

Bogdanove, E.M. (1964): Role of Brain in Regulation of pituitary gonado-

tropin secretion. *Vitam. Horm.* 22: 205-260.

Branca A.A., Franke M.A., Gluss P.M. y Reichert L.E. (1987)

Interferon inhibits FSH-stimulated oestradiol production in rat Sertoli cell cultures. *Med. Scie. Res.* 15: 739-749.

Brown-Grant, K., Exley, D., y Naftolin, F. (1970): Peripheral plasma estradiol and Luteinizing hormone concentrations during the estrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.*, 48: 295-299.

Butcher, R.L., Collins, W.E., y Fugo, N.W. (1974): Plasma concentration of LH, FSH, prolactin progesterone and estradiol 17-beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinol.* 94: 1704-1708.

Catt, K.J., Harwood, J.P., Aguilera, G., y Dufau M.L. (1979) Hormonal regulation of peptide receptors and target cells responses. *Nature*: 280 109-116.

Clemens, M.J., y Mc.Nurlan, M.A. (1985): Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *Biochem. J.* 226: 345-360.

Chiodi, H. (1940): The relationships between the Thymus and the sexual organs. *Endocrinol.* 26: 107-116.

Chowers, I., y Mc.Cann, S.M. (1985): Content of Luteinizing hormone releasing factor and Luteinizing hormone during the estrous cycle and after changes in gonadal steroids titers. *Endocrinol.* 76: 700-708.

Eckstein, B., y Nimrod, A. (1977): Properties of microsomal 5 $\alpha$ -reductase in immature rat ovary. *Biochem. Biophys. Acta.* 499:1-9.

Erickson, G.F., y Hsueh, A.J.W. (1978): Secretion of "inhibin" by rat

granulosa cells in vitro. Endocrinol. 103: 1960-1963.

Everett, J.W. (1965): Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. Endocrinol. 43: 389-405.

Farrel, P.J., Sen, G.C., Dubois, M.F., Ratner, L., Sattery, E., y Lengyel, P. (1978): Interferon action: Two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 5893-5897.

Farookhi R., Wesolowski E., Trasler J.M. y Robaire B. (1988): Modulation by Neonatal Thymectomy of the Reproductive Axis in Male and Female rats during Development. Biol.Rep.38: 91-99:

Fentiman, I.S., Thomas, B.S., Balkwill, F.R., Rubens, R.D., y Hayward J.L. (1985): Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer. Lancet, I: 1166.

Gay, V.L. y Tomacari, R.L. (1974): Follicle stimulating hormone in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. Science, 184: 75-77.

Goldstein D., Cockerman J., Krishnan R., Ritchie J., Tso C.Y., Hood L.E., Ellinwood E. y Laszlo J. (1987): Effects of gamma-IFN on endocrine system: results from a phase I study. Cancer Res. 47: 6397-6401.

Greenstein B.D., Fitzpatrick F.T.A., Adcock I.M. Kendall M.D. y Wheeler M.J. (1986): Reappearance of the Thymus in old Rats after

Orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. J. End., 83: 101-111.

Gresser Ivanovich : Interferon, Vol. I Editorial: Academic Press., London, pp. 29-33. 1979.

Grossman J. Charles. (1984):

Regulation of the immune system by sex steroids. Endocrine Reviews, 5: 3: 435-455.

Hamm W. Arthur : Tratado de Histología, Séptima ed. Editorial: Interamericana, 1975.

Hattori M. y Brandon M.R. (1971): Thymus and the endocrine system: Ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. J. Endocr. 83: 886-893.

Heape, W. (1920): The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. Q.J. Micr. Sci., 44: 1-70.

Hicks, J.J. Bioquímica e Inmunología. Vol. II, U.N.A.M., México Cap.1-6, 1988.

Hillier, S.G. y Ross, G.T. (1979): Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats Biol. Reprod., 20: 261-268.

Hiriart M. y Romano M.C. (1986): Human Chorionic Gonadotropin binding

to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor.

Life Sciences 38: 789-795.

Holsboer F., Stalla G.K. y Hamman K. (1988): Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma-IFN in human controls. Life Sciences 42: 1-5.

Kauppi A., Cantell K., Janne O., Kokko E. y Vihko R. (1982): Serum sex steroid and peptide hormone concentrations and endometrial estrogen and progestin receptor levels during administration of human leukocyte interferon. Int. J. Cancer 29: 291-294.

Khan, M.I., y Gibori, G. (1984): Catechol estrogens and their role in luteal steroidogenesis. Biol. Reprod., 30(Suppl.1):127 (abstr. 194).

Knobil, E., Neill, J.D. The Physiology of Reproduction. Vol. I, Raven Press. New York. 1988. Cap. 3 pp. 53-63, Cap. 10 pp. 331-350, Cap. 11 pp. 357-400.

Knobil, E., and Neill, J.D. The Physiology of Reproduction. Vol. II, Raven Press., New York. 1988 Cap. 37-39 pp. 1699-1743. Cap. 45 pp. 1893-1900, Cap. 46 pp. 1929-1953.

Koide, Y., Ina, Y., Nezu, N. y Yoshida, T.O. (1988): Calcium influx and the  $Ca^{2+}$ -Calmodulin complex are involved in interferon-gamma induced expression of HLA class II molecules on HL-60 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 3120-3124.

Kruisbeek Ada M., Krse, Tonny, C.J.M., y Zijistra Jelly, J. (1977): Increase in T Cell Mitogen Responsiveness in Rat Thymocytes by Thymic Epithelial Culture Supernat. Eur. J. Immunol, 7: 375-381.

Langman Jan. Embriologia Médica, Tercera edición, Editorial: Interamericana, 1976.

Lebon P., Giriard S., Thepot F. y Chany C. (1982): The presence of alfa-interferon in human amniotic fluid. J. Gen. Virol. 59: 396-406.

Lengyel, P. (1987): Double-stranded RNA and interferón acción. J. Interferons Res. 7: 511-519.

Leung, P.C.K., Goff, A.K. Kennedy, T.G. y Armstrong, D.T. (1978): An intraovarian inhibitory action of estrogen and androgen production in vivo. Biol. Reprod. 19: 641-647.

Linter-Moore S. y Panterlouis E.M. (1975): Ovarian development in athymic nude mice. I. The size and composition of follicle population. Mech. Ageing Develop. 4: 385-390.

Long, J.A., y Evans, H.M. (1962): The Oestrus Cycle in the Rat and its Associated Phenomena. Memoirs of the University of California Press., Berkeley.

Louvet, J.P., Harman, S.M., Schreiber, J.R. y Ross, G.T. (1977): Progesterone production by cultured preantral rat granulosa cells: stimulation by androgens. Endocrinol. 100: 128-133.

Lloyd, W.Ch. Endocrinology of Reproduction. Academic Press. New York and London, 12ava. Ed. 1979. Chap. 3 pp 53-63, Chap. 5 165-178.

Mannering, G.J., y Deloria, L.B. (1986): The pharmacology and toxicology of the interferons: an overview. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol

26: 455-515.

Michael Sandra D. (1979): The Role of the Endocrine Thymus in female reproduction., *Arthritis and Rheumatism*, 22: 11: 1241-1245.

Michael S.D., Taguchi O. y Nishizuka Y. (1980): Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.*, 22: 343-350.

Nagayama, Y., Izumi, M., Ashizawa, K., Kiriya, T., Yokoyama, N., Morita, S., Ohtakara, S., Fukuda, T., Eguchi, K., Marimoto, I., y Nakataki, S. (1987): Inhibitory effect of interferon-gamma on the response of human thyrocytes to thyrotropin stimulation: relationships between the response to TSH and the expresion of DR antigen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 949-953.

Neta Ruth, Schuartz Gretchen N., McVittie J. y Douthett Susan D. (1985): Thymic Hormones in Thymus Recovery from Radiation injury. *Experimental Hematology Today*. Edited by S.J. Baun, D.H. Pluzink, L.A. Rozenzajin. Springer-Verlag, New York Inc.

Nishizuka Y. y Sakakura T. (1969): Thymus and Reproduction: Sex Linked Disgenesia of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science*, 166: 753-755.

Nishizuka Y. y Sakakura T. (1971): a.-) Ovarian Disgenesis Induced By Neonatal Thymectomy in the mouse. *Endocrinol.* 89: 886-893.

Nishizuka Y. y Sakakura T. (1971): b.-) Effect of Combinated Removal of Thymus and Pituitary on Postnatal Ovarian Follicular Development in th

mouse. *Endocrinol.* 89: 902-906.

Ojeda, S.R., Negro-Vilar A., y Mc. Cann, S.M. (1979): Release of prostaglandin E (PGE<sub>2</sub>) by hypothalamic tissue: Evidence for their involvement in catecholamine-induced LHRH release. *Endocrinology*, 104: 617-624.

Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P. y Smith-White, S. (1980): Recent Advances in Endocrinology of Puberty. *Endocr. Rev.* 1: 228-257.

Ojeda, S.R. y Campbell, W.B. (1982): An increase in hypothalamic capacity to synthesize progesterone precedes the first preovulatory surge of gonadotrophins. *Endocrinol.* 111: 1031-1037.

Ojeda, S.R., Smith (White), S.S., Urbansky, H.F. y Aguado, L.I. (1984) The Onset of Female Puberty: Underlying Neuroendocrine Mechanisms. In: *Neuroendocrine Perspectives*, Elsevier, Amsterdam. Vol. 3, pp 225-263.

Ojeda, S.R., Urbansky, H.F., Katz, K.H., y Costa, M.E. (1985): Stimulation of cyclic adenosine 3'5' monophosphate production enhances hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release without increasing prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis: Studies in prepubertal female rats. *Endocrinol.* 117: 1175-1178.

Ojeda, S.R., Urbansky, H.F., y Katz, K.H. (1986): The activation of estradiol positive feedback at puberty: estradiol sensitizes the LHRH releasing system at two different biochemical steps. *Neuroend.* 43: 259-265.

Orava, M., Cantell, K., Kauppila, A., y Vihko, R. (1983): Interferon

and serum thyroid hormones. *Int. J. Cancer* 31: 671-675.

Orava, M. y Vhiko R. (1985): Interferon and its action on other tissues. *Int. J. Cancer*, 31: 671-672.

Orava M. : Inhibition of Testicular Androgen Production by Interferon. Tesis Doctoral. Acta Universitatis Oulensis, Finlandia, 1989.

Orava M. (1989): Comparission of the Inhibitory Effects of Interferon alfa and gamma on Testosterone Production in Porcine Leydig Cell Culture *J. Inter. Res.* 9: 135-141.

Orava M. (1989): Interferon-gamma Inhibits Steroidogenesis and Accumulation of mRNA of the Steroidogenic Enzymes P<sup>450</sup> scc and P<sup>450</sup> c17 in Cultured Porcine Leydig Cells. *Mol. Endocrinol.* 88: 1: 887-895.

Pedernera E., Diaz-Osuna J. y Calcagno M. (1986): A thymus Factor Influences the in vitro Testosterone Secretion of Leydig Cells in the Rat .*Life Sciences*, 38: 779-787.

Pencharz, R.I. (1940): Effect of estrogens and androgens alone and in combination with chorionic gonadotropin on the ovary of the hypophysectomized rat. *Science*, 91: 554-556.

Petska, S. (1983): Human interferons- from protein purification and sequence to clonning and expression in bacteria: before, betwen and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 1-37.

Playfair, J.H.L. : La inmunología en esquemas. Primera edición. Editorial: Alhambra, España, 1983.

Rebar R. W., Miyaake A., Low T.K.L. y Goldstein A.L. (1981): Thymosin

Stimulates Secretion of Luteinizing hormone-releasing factor. Science, 214: 669-671.

Reyes-Esparza y Romano M. (1989): An Age-Dependent Thymic Secretion Modulates Testicular Function. J. Steroid Biochem. 2: 68-72.

Rubinstein, M., y Orchansky, P. (1987): The interferon Receptors. CRC Crit. Rev. Biochem. 21: 249-275.

Sakakura T. y Nishizuka Y. (1972): Thymic Control Mechanism in Ovarian Development: Reconstitution of Ovarian Dysgenesis in Thymectomized Mice by Replacement with Thymic and other Lymphoid Tissues. Endocrinol. 90: 431-437.

Schilsky, R.L., Davidson, H.S., Magid, D., Daiter, S., y Golomb, H.M. (1987): Gonadal and sexual function in male patients with hairy cell leukemia: lack of adverse effects of recombinant alfa-2-interferon treatment. Cancer Treatm. Rep. 71: 179-181.

Smith, B.D. (1961): The effect of diethylstilbestol on the immature rat ovary. Endocrinol. 69: 239-245.

Smith, M.S.A., Freeman, M.E., y Neill, J.D. (1975): The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum. Endocrinol. 96: 219-226.

Stimson W. H. y Crilly P.J. (1981): Effects of Steroids on the Secretion of Immunoregulatory factors by Thymic Epithelial Cell

Cultures. *Immunol.* 44: 401-487.

Terada, N., Takada, T., Yamamoto, R., Taniguchi, H. Takatsuka, D. Li, W. y Matsumoto, K. (1990): Aromatase activity in cultured ovaries from fetal and neonatal golden Hamsters. *Experimental and clinical Endocrinology.* 94: 3, 227-231.

Trainin, N. (1974): Thymic Hormones and the Immune Response . *Physiological Reviews* 54: 2 : 272-315.

Vihko R., Orava M., Haour F., Leinonen P. y Ruokonen (1986) A.: Relationships between unconjugated and sulphated steroids and their inhibition by Interferon in Porcine Primary Leydig Cell Cultures. *Inter. Res.* 22: 4: 324-329.

Weniger, J.P., Chovaqui, J., y Zeiz, A. (1983): Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. *J. Steroid. Biochem.* 21: 3, 347-349.

Zhuang, L.Z., Adashi, E.Y., y Hsueh, A.J. W. (1982): Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate. *Endocrinol.* 110: 2219-2221.

Zuckerman, S. *The ovary of vertebrates. Vol. I, Academic. Press. London 1962, Chap. I,II,III, pp. 1-189.*

Zuckerman, S. *The ovary of vertebrates Vol. II, Academic. Press. London 1962, Chap. II-IV pp. 38-140.*