



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA DEL TIMO QUE REGULA LA LIBERACION DE TESTOSTERONA EN CELULAS DE LEYDIG

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
AIDA GARCIA LOPEZ

U N A M
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
DE INVESTIGACION

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTA ROMANO PARDO

ASESOR DE TESIS

M. EN IBSH LETICIA MORALES LEDESMA

MEXICO, D. F.

1983

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
Estructura del Timo.....	5
Desarrollo del Timo:.....	7
Función del Timo.....	9
Relación funcional Timo-Gónada.....	14
Efecto de las Hormonas esteroideas sobre el Timo.....	19
Aislamiento y purificación de Hormonas Tímicas.....	21
Hormonas que actúan sobre la función testicular.....	25
Actividad endócrina del Timo.....	27
Métodos de purificación de proteínas	
I) Cromatografía de afinidad.....	28
II) Cromatografía de filtración.....	31
Electroforesis en Gel.....	32
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	33
- Determinación de peso molecular por geles de acrilamida-DSS	34
- Electroforesis en gel de acrilamida-DSS y agentes reductores.....	34
Determinación de hormonas por radioinmunoanálisis.....	36
Bioensayo en células de Leydig in vitro.....	37
Determinación de proteínas por la técnica de Lowry.....	38
HIPOTESIS.....	39
OBJETIVOS.....	40
MATERIAL Y METODOS.....	41
Obtención del polvo acetónico de Timo.....	41
Cromatografía de filtración.....	41
Cromatografía de afinidad.....	42
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	42

Electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturizante- DSS.....	44
Determinación del peso molecular de las proteínas.....	46
Bioensayo en células testiculares.....	46
Radioinmunoanálisis de testosterona.....	48
Determinación de proteínas.....	48
 RESULTADOS.	
Validación de las técnicas bioquímicas.....	50
Efecto de las diferentes fracciones obtenidas mediante cromatografía de filtración.....	52
Factor Tímico.....	56
Cromatografía de afinidad.....	56
Efecto de las fracciones eluidas en la columna de heparina-sefarosa.....	58
Análisis electroforético.....	66
 DISCUSION DE RESULTADOS.....	 68
 CONCLUSIONES.....	 71
 BIBLIOGRAFIA.....	 72

RESUMEN

El Timo es una glándula endócrina que desempeña una función importante en el sistema inmunológico.

Se ha demostrado que una fracción proteica derivada del timo de rata prepúber, obtenida por filtración molecular, modula la producción de testosterona en células de testículo de rata adulto "in vitro". La fracción tímica tiene un peso molecular de 28 Kd e interfiere con la unión de la 125 I-gonadotropina coriónica humana (hCG) a su receptor en dichas células.

Se preparó un homogenado de timos de ratas Wistar machos de 14 días de edad en presencia de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0.01mM, el cual se centrifugó a 26 000 g y luego a 62 000 g. El sobrenadante se procesó en una columna de Ultrogel ACA 54 que se equilibró previamente con NaCl 0.1M/Tris 50 mM a pH 7.4. La fracción obtenida de aproximadamente 30 Kd, se inyectó a una columna de cromatografía de afinidad (Heparina-Sefarosa CL 6B). Para eluir las proteínas adsorbidas se emplearon soluciones de fuerza iónica creciente. La actividad antigonadotrófica de las diferentes fracciones se probó en un bioensayo de células de testículo *in vitro*. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Lowry. Finalmente, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (DSS), se caracterizaron las diferentes bandas proteicas obtenidas de la columna de afinidad. Algunos geles se realizaron en presencia de 2-mercaptoetanol.

Se observó que la actividad antigonadotrófica de la proteína tímica no se altera después de los pasos efectuados; lográndose una purificación de 144 veces con respecto al homogenado, medido en términos de la actividad específica de la fracción correspondiente. El avance en la purificación se confirmó en la electroforesis, en donde se encontró una reducción del número de bandas en los pasos sucesivos utilizados en el proceso de purificación.

INTRODUCCION

Las especies animales incluyendo al ser humano, presentan un sistema inmunológico que es vital para la supervivencia. Este sistema inmunitario participa en la defensa ante la invasión de patógenos y el rechazo a células extrañas.

La respuesta inmunitaria engloba los fenómenos que resultan de la interacción de células específicas del sistema inmunitario con un antígeno. Como resultado de esta interacción aparecen células que participan en las respuestas inmunitarias celulares, al igual que células que sintetizan y secretan inmunoglobulinas. En este enunciado está establecido lo que se conoce como dualidad del sistema inmunitario, lo cual incluye dos mecanismos diferentes:

- a) Inmunidad celular: mediado por células, esta forma de inmunidad es la causa del rechazo a células extrañas y de la resistencia a infecciones, virus y hongos.
- b) Inmunidad humoral: depende de la síntesis de anticuerpos por las células plasmáticas como respuesta a la acción de un antígeno.

El componente principal celular de estas respuestas es el linfocito. Durante el desarrollo embrionario el linfocito adquiere su diferenciación en el timo rudimentario para dar origen a los linfocitos T, debido a este proceso el timo es considerado órgano linfoide primario. Los ganglios linfáticos y el bazo son estructuras dependientes del timo, ya que en la etapa más tardía de la vida fetal (momentos antes del nacimiento), son colonizados por dos poblaciones de linfocitos, una población que depende del timo y la otra del tejido linfoide del intestino (Stanley, 1975).

Esta función debe ser controlada para evitar patologías como las enfermedades autoinmunes y los procesos inflamatorios excesivos. Otros sistemas del organismo, entre ellos el endócrino, participan del control de la respuesta inmunitaria para que resulte efectiva y no dañe al sujeto.

ESTRUCTURA DEL TIMO

El timo es un órgano linfoide central, situado en la porción superior del mediastino anterior a nivel del mango esternal, y representa un papel fundamental en la inmunidad mediada por células (Ham, 1975; Roitt, 1980).

El timo es una glándula bilobular rodeado de una cápsula de tejido conectivo laxo. Se organiza en una serie de lóbulos constituidos esencialmente de una red de células epiteliales las cuales forman paquetes agregados de linfocitos. Cada lóbulo está dividido en lobulillos por tabiques fibrosos; en la periferia de cada lobulillo se encuentra la corteza la que rodea la médula central. La primera está constituida de células epiteliales tipo I y células dentríticas reticulares. La médula está constituida de células epiteliales tipo I, II III, macrófagos, células dentríticas interdigitales y corpúsculos de Hassall. La figura 1 nos muestra los tipos celulares y las estructuras que componen al retículo tímico. Las células epiteliales se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas en tipos I, II y III. (Nabarra y Andrianarison, 1987).

Células epiteliales tipo I. Se encuentran en todo el Tímo, y también se conocen como células epiteliales clásicas. Presentan núcleo oval con cromatina dispersa; el citoplasma es claro con una fina matriz de fibras, éste contiene cuerpos densos de tonofilamentos, organelos y vacuolas con gránulos densos. En cuanto a su función, estas células expresan antígenos de histocompatibilidad, son muy importantes para que los timocitos adquieran diversas funciones inmunológicas. No se han observado indicaciones de actividad fagocítica en estas células.

Células epiteliales tipo II. (Laberinto vacuolar). Se encuentran sólo en la médula del Tímo. Son globulares, ovals y más voluminosas que las del tipo I. Su núcleo es claro con escasa cromatina; el

Citoplasma es moderadamente denso; al compararla con otras células presentan la particularidad de que en el aparato de Golgi se encuentran sacos dilatados. Las vacuolas están constituidas por microvellosidades parecidas a la sección de una esponja. Estas células laberínticas muestran partículas de virus que comúnmente infectan ratones. Son células que probablemente secretan factores y hormonas tímicas.

Células epiteliales tipo III, también conocidas como células con cavidad intracitoplasmáticas. Se encuentran en la médula, son de forma oval y suelen ser muy escasas. El núcleo es excéntrico, presenta una cromatina clara y grumos en menor proporción en la periferia; el citoplasma suele ser más denso que el de las células descritas anteriormente. Su particularidad más notable es la presencia de una larga cavidad redonda, la cual ocupa una extensa parte de su citoplasma. Se considera que estas células tienen una función en la producción de factores tímicos y sus cavidades son centros de almacenamiento. Mandel (1970), observó que la diferenciación de este tipo de células ocurre relativamente tarde en la ontogenia murina del timo por lo cual sugiere que es la representación de un vestigio embriológico de epitelio faríngeo, que testifica el origen branquial del timo.

Corpúsculos de Hassall. En general se acepta, que son estructuras degenerativas. Murray y Woods (1967), y otros como Mandel (1968), proponen que en estas áreas es donde se encuentran los linfocitos lisados y que representan el sitio de destrucción de clonas prohibidas. Algunos autores tienden a considerar que estas estructuras intervienen en la regulación de la proliferación celular, en la lisis de timocitos y otras células tímicas (Hood y col. 1984).

Las células dentríticas, conocidas como interdigitales, presentan localizaciones específicas en el timo. Ambos tipos de células se derivan de los precursores hematolinfoides de la médula ósea. Están

involucradas en la presentación de antígenos y comparten esta función con los macrófagos (Hood y col. 1984).

Cavidades císticas. Se cree que éstas estructuras son vestigios de la paratiroides y que se adhieren al timo durante el desarrollo embrionario (Dunay C; citado por Nabarra y Andrianarison, 1987).

DESARROLLO DEL TIMO

El timo es de origen endodérmico y mesodérmico; proviene de la tercera y cuarta bolsas faríngeas. El endodermo anterior con ectodermo adherido penetra al mesodermo para iniciar la formación del timo. El rudimento del timo se separa y migra hacia la cavidad del tórax para localizarse en la cavidad pleural. Durante su migración es invadido por linfoblastos, precursores de los linfocitos T, que se originan en el tejido hematopoyético de la médula ósea. Durante el desarrollo embriológico del timo, los precursores de las células T se organizan dentro de la capa cortical, que tiene un grosor de 2 a 10 células, y se agranda a medida que las células se dividen para generar los diferentes tipos de linfocitos (Hood y col. 1984; Bockman y Kirby, 1985).

El desarrollo del tejido linfoide parece ser un proceso dependiente del timo (Miller, 1962; Parrot y col. 1966). Se postulan dos caminos en los cuales el timo influye el desarrollo del tejido linfoide periférico:

- a) El timo genera linfocitos que migran al tejido periférico.
- b) El timo produce un factor difusible el cual induce el desarrollo de linfocitos *in situ* en el tejido linfoide periférico (Weissman y col. 1967).

Cuando el timo madura está constituido de un 99% de linfocitos. Bajo condiciones normales el 5% de linfocitos tímicos se divide, el

85% de estos linfocitos están en la capa cortical y 10% son linfocitos medulares.

Los linfocitos T al madurar adquieren una especialización que cumple un papel muy importante en el sistema inmunitario. Hay diferentes tipos de linfocitos T, clasificados con base a la función que realizan y a las moléculas que se secretan en la superficie celular (Roitt, 1993):

1) Células T₈ (citotóxicas/supresoras). Se refieren a células efectoras que eliminan células extrañas (ej: otros linfocitos). Esta función la realizan cambiando la permeabilidad de su membrana. Además suprimen directamente o por vía de factores supresores la función de otras células (ej. suprimen la función de las células T₄). Los precursores de éstas células son activados por antígenos.

2) Células T₄ (ayudadoras/amplificadoras). Constituyen una tercera parte de la población de las células T; están programadas para amplificar la función de otras células (linfocitos B, otros linfocitos T y macrófagos), participando en su proliferación y diferenciación. Además activan moléculas de clase II en cultivos de linfocitos y amplifican la proliferación y diferenciación de las células T₈. Si las células se estimulan producen una variedad de sustancias solubles (ej. interleucinas).

3) Células T (asesinas naturales). Intervienen en la eliminación inespecífica (no necesitan ser activadas) de células transformadas y células infectadas por virus.

4) Células T responsables de la hipersensibilidad tardía (T_H).

En la pubertad el timo disminuye considerablemente de tamaño en respuesta a la liberación de hormonas esteroides adrenales y gonadales en ambos sexos (Hood, 1984). En el hombre alcanza un peso

máximo de 20 a 37 g, posteriormente sufre un proceso involutivo sustituyendo gran parte de su parénquima por tejido conjuntivo y adiposo disminuyendo su peso a 6 g a los 75 años.

FUNCION DEL TIMO

El timo juega una función importante en el sistema inmune. La amplia gama de trastornos del sistema inmunitario puede clasificarse en grupos:

- 1) Estados de deficiencia inmunitaria.
- 2) Reacciones de hipersensibilidad.
- 3) Enfermedades autoinmunitarias.
- 4) Proliferaciones anormales y neoplasias que nacen en el sistema inmunitario (Stanley, 1975).

La tabla 1 resume algunas de las funciones del timo y los desórdenes relacionados o deficiencias tímicas.

El desarrollo anómalo del timo en la etapa embrionaria puede dar como resultado atimia ó deficiencias combinadas del timo con otras estructuras de origen embriológico (glándula paratiroides, arco aórtico), produciendo una variedad de diversos síndromes como el de Di George.

Las anomalías pueden clasificarse en congénitas, hiperplasia y neoplasia. Entre las anomalías congénitas tenemos el Síndrome de DiGeorge, en el cual no hay timo (agenesia). Puede presentarse una hipoplasia con falta o disminución notable en el número de linfocitos pequeños, como ocurre en la alinfoplasia tímica (Síndrome de Good) y en la agamaglobulinemia de tipo suizo. La hiperplasia tímica causa aumento del volumen de la glándula, debido a la aparición de nuevos folículos linfoides. En cuanto a las anomalías causadas por deficiencia inmunológica se han descrito diversos síndromes como la

ataxia telangiectasia, deficiencia de Ig A. entre otros (Stanley, 1975).

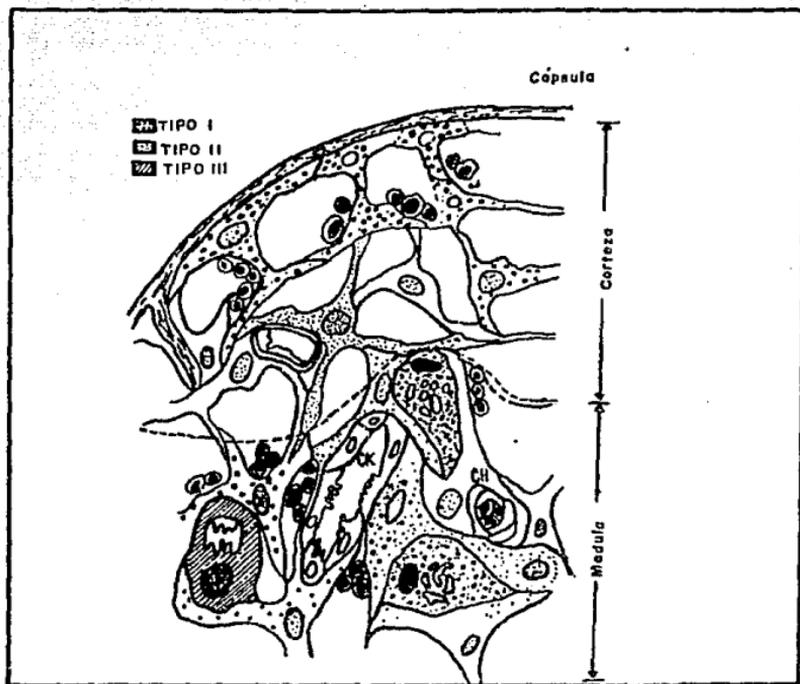
La remoción completa del timo en ratones durante el período neonatal induce generalmente diversos síndromes. Estos incluyen déficit en la ganancia de peso, deterioro de las condiciones físicas, deficiencia de linfocitos (expresada por una reducción en la población de células linfocíticas de los órganos linfoides y sangre periférica), deterioro de la capacidad inmunológica y muerte que se conoce como síndrome de desgaste (Cross y col. 1964).

El timo produce una gran cantidad de factores y hormonas que muestran actividad inmunológica. Para investigar ésta posible función de factores tímicos humorales se utilizan injertos de timo obtenidos de ratones (1 a 8 días de edad), y se implantan subcutáneamente dentro de una cámara Millipore a ratones timectomizados neonatalmente. Los resultados muestran que éstos animales presentan una recuperación de la capacidad inmunológica, por lo que se demuestra que la implantación del tejido tímico en animales timectomizados neonatalmente previene o hace reversible los cambios en el tejido linfoide y evita el síndrome de desgaste (Trainin, 1974).

El efecto de las hormonas tímicas en el sistema linfoide hipotéticamente puede darse a través de la estimulación de la linfopoyesis, por inducción de inmunocompetencia en linfocitos circulantes, o por la acción simultánea de ambos mecanismos. Además de otros, se sugieren dos factores tímicos; un factor que estimularía la linfocitosis y otro factor que induciría la competencia, capaces de actuar independientemente (Metcalf, 1964; Miller, 1965; Yunis y col. 1964).

Tabla 1. Síndromes clínicos causados por displasia del timo
(Luckey y col. 1973).

FUNCIONES NORMALES DEL TIMO.	MANIFESTACIONES PATOLÓGICAS DE DEFICIENCIAS.
Desarrollo de competencia inmunológica.	Síndrome de deficiencia inmunológica.
Regeneración de competencia inmunológica.	Enfermedades autoinmunes.
Mantenimiento de competencia inmune.	Neoplasia relacionada a la falta de reconocimiento.
Regulación de la actividad endócrina relacionada con el sexo.	No presenta.
Producción de factor estimu- lante de la médula ósea.	Timoma, amaglobulinemia con aplasia eritroide.
Producción del factor hipo- glucemiante.	Hipogluceamia en leucemia.
Producción del factor de permeabilidad.	Reacciones de hipersensi- bilidad retardada.
Producción de un factor inhibitorio de la trans- misión muscular.	Miastema grave.



Esquema de la parte epitelial del retículo tímico. Se representan células epiteliales tipo I, II y III; así como los corpúsculos de Hassal (CH) y la cavidad cística (CK).

Fig.1

(Nabarra y Andrianarison, 1987).

RELACION FUNCIONAL TIMO-GONADA

Se ha establecido en forma experimental que el timo, glándula principal de la inmunidad, es también un órgano endócrino importante. La relación entre el timo y las gónadas fue confirmada en 1969 por Nishizuka y Sakakura. Estos autores reportan que la timectomía neonatal (Tx) en el ratón hembra provoca la muerte a consecuencia del síndrome de desgaste. La timectomía entre los 2 a 4 días de edad trae como consecuencia una alta frecuencia de disgenesia ovárica, caracterizada por una rápida disminución en el número de ovocitos, con subsecuente disminución de folículos y cuerpos lúteos. Cuando la timectomía se realiza a los 7 días de edad no interfiere en la morfogénesis del ovario.

Los cambios en las gónadas se asocian con reducidas concentraciones séricas de Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo estimulante (FSH) y Hormona de crecimiento (GH). El útero del ratón timectomizado no se encontró hipoplásico y presentaron cambios atróficos en los folículos después de remover el ovario disgenético. Se encontró histológicamente una alta masculinización de la glándula submandibular en el ratón timectomizado.

Evidencias experimentales indican que el ovario disgenético del ratón timectomizado funciona bajo el control hormonal de la hipófisis. Estos resultados sugieren que dicho ovario, con predominancia de células intersticiales y estroma ovárico, tiene una función endócrina alterada que puede ser la responsable de la masculinización de las glándulas salivales que se observa en el ratón timectomizado. En efecto, estudios realizados *in vitro* sobre la conversión de [3H] pregnenolona a andrógenos demuestran que la masculinización de la glándula salival se debe a alteraciones metabólicas del ovario disgenético, que es capaz de formar grandes cantidades de andrógenos en comparación con el ovario control (Nishizuka, 1973).

La disgénesis ovárica en ratones timectomizados puede prevenirse mediante el trasplante del timo de donadores singénicos o por inoculación de células disociadas del timo, del bazo o de linfonodos. En estos órganos (a excepción de la médula ósea), se encuentra la población celular, capaz de prevenir la disgénesis. Estas células se supone derivan del timo; en el ratón timectomizado hay ausencia de dichas células en el bazo y en los linfonodos (Sakakura, y Nishizuka 1971; Nishizuka y Sakakura, 1971).

En el ratón macho timectomizado (realizado a los 3 días de edad) se presenta desarrollo normal del testículo y de órganos asociados con el aparato reproductor. Los testículos examinados histológicamente no presentan anomalías en las etapas de la espermatogénesis o en la morfología de las células de Leydig. Las vesículas seminales eran normales en apariencia y no se encontraron cambios en las glándulas salivales (Nishizuka y Sakakura, 1969). Sin embargo, macho y hembra son predominantemente infértiles (Hattori y Brandon, 1977).

Ratones congénitamente atímicos.

En el ratón hembra congénicamente atímico de genotipo recesivo homocigoto *nu/nu* (nude), existe una deficiencia en el número de folículos y generalmente desaparición del cuerpo lúteo (Shire y Pantelouris, 1974). Otros estudios demuestran que además se observa retraso en el desarrollo puberal, caracterizado por disminución en la producción de gonadotrofinas, apertura vaginal retardada y disminución en la fertilidad (Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y col. 1980).

En el estudio histológico de los testículos del ratón macho *nude* se observa que a los 20 días de edad el número de células de Leydig está disminuido y además presenta disminución en la fertilidad. A los 40 días de edad hay desarrollo de túbulos seminíferos con extensos grupos de células de Leydig esparcidos en el tejido intersticial

testicular. A esta edad no se puede detectar diferencias morfológicas o histológicas en el tejido del testículo y la espermatogénesis es normal. Estos resultados están relacionados con la secreción de gonadotrofinas, ya que se observa que en la etapa previa a la maduración sexual hay una marcada disminución de LH y FSH, y a los 40 días la LH tiene su máxima concentración que persiste en los adultos. La concentración de testosterona es marcadamente reducida a los 20 días de edad y a partir de los 30 días la concentración es elevada. (Lintern-Moore, 1975 a).

La disminución en la concentración de gonadotrofinas se puede prevenir con trasplantes de timo en el día del nacimiento (Rebar y col. 1980).

Timectomía en la rata.

Por otro lado, se ha demostrado que en ratas hembra Wistar después de 50 días de la timectomía neonatal (realizada 12 horas después del nacimiento), se produce disgénesis ovárica caracterizada por: a) reducción en el número de folículos primordiales, primarios y secundarios por degeneración; b) hipertrofia e hiperplasia de células intersticiales; c) proliferación de tejido conectivo intersticial, constituido por fibrocitos; d) presencia de vesículas dentro del cuerpo lúteo; e) ausencia, destrucción o ambos del cuerpo lúteo por proliferación de tejido conectivo intersticial.

En ratas macho Wistar timectomizados en la etapa neonatal (12 horas después del nacimiento) se observa que a los 130 días de la cirugía presentan atrofia en los testículos, caracterizado por: a) pequeños túbulos seminíferos, situados en la porción central periférica o ambos, que contienen células de Sertoli y un número reducido de espermatogonias, ausencia de espermatozoides y grandes espermatoцитos vacuolados. No se encontró infiltración de células

linfocíticas en el estroma y las células de Leydig son normales (Hattori y Brandon, 1977; Hattori y Brandon, 1979).

En resumen, los estudios con ratas timectomizadas neonatalmente sugieren que el timo modula la función reproductiva y secreta una variedad de péptidos los cuales afectan la secreción de las hormonas reproductivas. Además se ha demostrado que las hembras desarrollan anticuerpos contra ovocitos (Taguchi y col. 1980). Taguchi y Nishizuka (1981), mostraron en el macho la presencia de anticuerpos contra espermatozoides.

Efecto de la gonadectomía sobre el timo.

Calzolari (1998) fue el primero en afirmar que el timo de conejo se atrofia más lentamente en los animales castrados. Posteriormente Chiodi (1940) demostró que el efecto de la castración se podía revertir con la administración de andrógenos.

Castro (1974) observa que la orquidectomía en ratones prepúberes Balb C (4 a 6 semanas edad), causa hipertrofia del timo, la cual es máxima un mes después de la cirugía. Al realizar un estudio histológico del timo en estas condiciones se observa aumento en el tamaño de la corteza y la médula, con incremento de la población celular. Cuando la orquidectomía es postpuberal (10 a 12 semanas de edad), el tamaño del timo aumenta y el peso del linfonodo y bazo es menor a los cambios que se presentan cuando se realiza la cirugía prepupal; a los 3 meses de la cirugía la masa del linfonodo es muy grande en relación a los controles. La gonadectomía en ratones afecta la respuesta a los antígenos originando cambios en la producción de anticuerpos. La capacidad para rechazar injertos aumenta, siendo mayor el rechazo cuando el injerto es de piel; ésta respuesta puede prevenirse mediante la administración de andrógenos. Estos datos

sugieren que los andrógenos deprimen la respuesta inmune mediada por células y que la remoción de esteroides las activa. Por otro lado, cuando en los ratones se realiza de manera simultánea la orquidectomía y timectomía se observa que no hay rechazo al injerto de piel (Castro, 1974 b). Además previene la hipertrofia de los ganglios linfáticos, esto indica que los efectos de la orquidectomía sobre los ganglios fueron mediados a través del camino tímico (Castro, 1974 a).

Se sabe que el timo se atrofia progresivamente a partir de la pubertad y la función que se considera importante va retrocediendo hasta hacerse mínima o nula en la etapa adulta. En ratas Wistar el timo se atrofia a la edad de 12 a 15 meses. Al realizar la orquidectomía a ratas Wistar de esta edad se observa que el timo se restaura en tamaño 30 días después de la cirugía. El órgano regenerado es multilobular idéntico a un timo de rata púber (Greenstein y col. 1986).

Desde el punto de vista histológico el órgano de los animales mencionados anteriormente aparece normal, presenta una corteza y médula definidas, vascularizadas y llenas de timocitos. La regeneración del timo después de la orquidectomía es inhibida por testosterona (T), la cual se administra por implantes subcutáneos de una cápsula de liberación prolongada que produce concentraciones séricas de T dentro de los rangos fisiológicos. También se observa que hay un aumento de tamaño del timo a las 10 semanas después de realizar la orquidectomía; el agrandamiento del timo es inhibido por T. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el funcionamiento del sistema inmune durante el envejecimiento y las enfermedades, además de su importancia en la fisiología del sistema inmune y endócrino (Greenstein y col. 1986).

EFEECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE EL TIMO

Existen evidencias en las que se demuestra que los esteroides gonadales y adrenales ejercen una importante influencia sobre el desarrollo y la función del timo (Bockman y Kirby, 1985; Castro, 1974).

Es importante destacar que la acción de los esteroides sobre el timo es mediada por receptores específicos para estas hormonas (Fujii-Hanamoto y col. 1985; Sakabe y col. 1986; Grossman, 1984). Se han descrito receptores a glucocorticoides en la bolsa de Fabricio (Sullivan y Wira, 1979) y a andrógenos (Pearce y col. 1981) y estrógenos en timo (Screpanti y col. 1982). Estos son receptores específicos que muestran gran afinidad por sus ligandos; se les encuentra en el citosol de la fracción epitelial del timo. El receptor a estrógenos está presente en la cobaya y otras especies. En cuanto a los estrógenos se sabe que modulan la función inmune y afectan la morfología tímica, su efecto parece ser más crítico durante el periodo prenatal y neonatal (Screpanti, 1982).

Cuando se administra estradiol (E₂) a cobayas preñadas (36 a 68 días de gestación) y se obtienen los timos fetales, se observa que en el primer día de tratamiento el E₂ no modifica el tamaño del lóbulo tímico, corteza ó médula. En cuanto a la población celular hay una disminución en el número de células linfoides de la corteza. Los efectos estrogénicos (reducción en tamaño de lóbulos tímicos y disminución en el área linfoide cortical), aparecieron después de 2 días de tratamiento, siendo similares cuando éste se prolonga. Además se observa que el E₂ modifica la compartimentalización del receptor para estrógeno en el timo (Screpanti, Gulino y Pasqualini, 1983).

Se concluyó que el E₂ afecta a la subpoblación celular localizada en la corteza subcapsular tímica. La respuesta inducida por E₂ sobre el desarrollo del timo durante la vida fetal es antagonizada

por el antiestrógeno llamado Tamoxifén (Screpanti, Gulino y Pasqualini, 1983).

Grandes cantidades de progesterona producen también atrofia del timo en ratas macho, sin embargo dosis moderadas por 30 días no causan ningún efecto. (Dougherty, 1952). Se sabe que en ratas, los andrógenos inducen involución del timo (Sasson y Mayer; citado por Grossman y col. 1983). En el timo de estas se han encontrado receptores a dehidrotestosterona (DHT), éstos se encuentran localizados en las células retículo-epiteliales. Grossman y colaboradores (1983), demostraron la presencia de un receptor a DHT de alta afinidad y especificidad para el tejido tímico humano. Los receptores para DHT, se encuentran en los compartimientos citoplasmático y nuclear.

En otro estudio experimental se mostró que tanto la T como la DHT tienen actividad antigluco corticoide en timo de rata (Sasson y Mayer; citado por Grossman, y col. 1983). El receptor a DHT tímico humano puede formar parte de los desórdenes autoinmunes del sistema mediado por células, como es el caso del lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. Por otro lado, se ha demostrado que la administración de DHT no altera el peso del timo ni las concentraciones de andrógenos en ratones machos controles (Grossman y col. 1983). Sin embargo, la administración de esta hormona a animales castrados, previene la hipertrofia del timo e incrementa significativamente el contenido tímico total del receptor a andrógenos (Pearce y col. 1981).

Stimpson y Crilly (1981), confirmaron que los esteroides *in vitro* Ez, T, corticosterona, y no progesterona modulan la secreción de factores inmunorreguladores. Se han realizado estudios sobre receptores citosólicos a estrógenos en el timo de la rata, en el que se caracterizan las constantes de asociación y disociación, el número

de sitios de unión y el efecto del estradiol sobre dichos sitios (Morgan y Grossman, 1985).

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE HORMONAS TIMICAS

Estudios realizados con extractos tímicos con diferente grado de pureza sugieren que las funciones inmunes del timo se llevan a cabo al menos en parte por factores humorales (Goldstein y col. 1970; Law y Awnew, 1986).

Entre las diversas preparaciones parcialmente purificadas las más estudiadas son: fracción S de la timosina, factor tímico X, timoestimulina, factor tímico humoral, timopoyetina, factor tímico sérico y factor tímico homeostático (Dates y Goldstein (1984). Una de las preparaciones de la hormona del timo fue preparada por primera vez y a partir de ese momento se le designa el nombre de timosina (Goldstein y col. 1966). La purificación y la determinación de las propiedades químicas fue realizada por Goldstein en 1972.

Las fracciones obtenidas de la timosina disminuyen la incidencia de la enfermedad de "desgaste" en el ratón timectomizado prenatalmente (Asanuma y col. 1970), y facilitan el desarrollo de la respuesta inmune mediada por células, incluyendo la capacidad de células huéspedes para aceptar injertos (Law y col. 1968), e impiden el desarrollo de tumores después de la inoculación con virus del sarcoma de Moloney (Zisblatt y Goldstein, 1970).

Además, se han aislado a partir de extractos crudos del timo diversos carbohidratos, lípidos y proteínas homogéneas que tienen actividad biológica (Goldstein y col. 1970). La purificación y la determinación de las propiedades químicas de la timosina, fueron realizadas por Goldstein en 1972. La actividad biológica de esta

hormona se realiza mediante un ensayo de formación de roseta, el cual permite determinar la dependencia del timo de las células linfoides. La actividad biológica de la timosina se encuentra en una proteína homogénea de peso molecular de 12 600 daltones. En experimentos reportados por Klein y colaboradores (1965), se observa que el homogenado de timo estimula la linfocitopoyesis y la incorporación de precursores radioactivos al DNA, en linfonodos de conejos adultos.

Por otro lado Bach y col. (1971), demuestran que la timosina puede restaurar la población de células sensibles a azatioprina cuando se agregan a suspensiones de células de bazo de ratón timentomizado. Estas células sensibles a timosina están presentes en el bazo en número adecuado y requieren sólo de la influencia endócrina de la glándula del timo para convertirse a células activadas; estas células sensibles a timosina están también en la médula ósea.

La timosina purificada parcialmente (fracción 5) contiene proteínas estables al calor con pesos moleculares que están entre el rango de 1200 y 14 000 daltones. En 1975 fue estandarizada la fracción 5 de timosina, a partir de ella se han realizado purificaciones y caracterización de péptidos hormonales que han sido aislados del timo. Cuando se analiza por enfoque isoelectrico la fracción 5 de timosina revela la presencia de varios componentes en la preparación. Los polipéptidos se dividieron en tres regiones: La región α contiene polipéptidos con puntos isoelectricos abajo de 5.0, la región B entre 5.0 y 7.0 y la región r arriba de 7.0. Estos a la vez se subdividen en α_1 , α_2 , B, B₁, B₂. El subíndice es usado para designar los polipéptidos de cada región tal como fueron encontrados (Hooper y Goldstein, 1975).

Timosina α_1 : Es el primer polipéptido activo biológicamente en la amplificación de la inmunidad de células T (Low y col. 1979; Ahmed y col. 1979), y también es activo modulando la expresión de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Fue aislada por

cromatografía de intercambio iónico; su peso molecular es de 3108 daltones, compuesto por 28 residuos de aminoácidos y con un pI de 4.2. El amino terminal es bloqueado por un grupo acetil. Estudios de Freire y col. (1978), sugieren que esta timosina es producida por el timo como parte de una proteína grande de peso molecular de 16 000 daltones.

Timosina B: Es el primer polipéptido activo biológicamente de la región β completamente caracterizado (Low y col. 1981). Fue aislado por cromatografía de intercambio iónico. Está compuesto de 43 residuos de aminoácidos, con peso molecular de 4 982 daltones y un pI de 5.1. Esta molécula induce la expresión TdT en células de médula ósea, *in vitro* e *in vivo*. Además, incrementa la actividad TdT en timocitos de ratones inmunosuprimidos; también actúa en células linfoides e influye en estados tempranos sobre la maduración de linfocitos dependiente del timo (Goldstein y col. 1981).

Timosina 7: Fue aislada usando la misma técnica de las fracciones anteriores. Esta fracción es altamente ácida, con un pI de alrededor de 3.5 y está libre de carbohidratos y lípidos; tiene un peso molecular aproximado de 2 200 daltones. Demostró ser un potente inductor de células supresoras (Goldstein y col. 1981) y células T marcadoras (Ahmed y col. 1979). Por otra parte, se han aislado factores con actividad "tímico humoral" de la sangre y los tejidos. Estas preparaciones que incluyen la fracción 5 de la timosina son: Factor Tímico X (FTX), Timoestimulina, Factor Tímico Humoral (FTH), Timopoyetina, Factor Tímico Sérico (FTS) y Factor Tímico Homeostático (FTH) (Goldstein y col. 1981).

Factor Tímico X: Polipéptido con PM. de 4 200 daltones, *in vitro* restaura la sensibilidad a la azatioprina del ensayo de rosetas en células de ratones adultos timectomizados, incrementa en sangre el número de células linfocíticas y recupera la hipersensibilidad retardada *in vivo* (Aleksandrowicz y Skotnick, 1976).

Timoestimulina: Estudiada por Falchetti y col. (1977), es una mezcla de polipéptidos. Induce marcas y funciones específicas en linfocitos T en animales y en pacientes inmunosuprimidos; estimula la producción de interferón en las mismas especies.

Factor Tímico Humoral: polipéptido de peso molecular de 3 200 daltones, pI de 5.7. Un homogenado crudo de timo bovino se centrifuga a 105 000 g por una hora; se obtiene el sobrenadante activo y se encuentra que restaura la respuesta inmunológica del ratón timentomizado. Esta respuesta no se observa en animales deprovistos de timo que son inyectados con el músculo de ternera o de riñón preparado por similares procedimientos. Asimismo se demuestra que al aplicar inyecciones de factor tímico humoral se restaura la capacidad de las células linfoides de ratones timentomizados neonatalmente, para inducir en vivo esplenomegalia. (Trainin y col. 1967).

Timopoyetina: Durante el aislamiento de ésta hormona a partir de timo bovino surgieron dos polipéptidos timopoyetina I y II de peso molecular de 7 000 daltones; éstas son consideradas hormonas tímicas que inducen la diferenciación de protimocitos a timocitos. La especificidad en la inducción de la diferenciación de células T y no de células B, sugiere que es una hormona fisiológicamente inductora en el timo, ya que sus efectos de bloqueo intramuscular no se presentan con extractos de otros tejidos. Su aislamiento se realizó por cromatografía de filtración molecular y de adsorción (Goldstein y col. 1975). Se considera activa sólo una fracción, está formada por 49 residuos, peso molecular de 5 562 daltones con pI de 5.7 y secuencia determinada. (Goldstein y col. 1981).

Factor Tímico Homeostático (FTH): Su constitución química es aún desconocida. Se eluye de la columna de hidroxapatita y se divide arbitrariamente en 4 subfracciones durante la elución, éstas fueron bioensayadas separadamente por el método de Comsa (Bernardi y Comsa,

1965). Se supone que es un glicopéptido de 1 800 a 2 500 daltones; su tamaño se estima por ultracentrifugación (Luckey y col. 1973). En cuanto a sus efectos fisiológicos, suprime las consecuencias del deterioro ocasionado por la timentomía en cobayas púberes, y restaura la hipersensibilidad en ratas timentomizadas (Comsa, 1973). En el aislamiento de las hormonas tímicas, Metcalf (1959) utiliza un ensayo modificado por él mismo, en donde usa la relación radio L/P (linfocito/polimorfo), para aislar la hormona llamada estimulante de linfocitos (HEL). De ésta se han obtenido los polipéptidos LSH h (h de Hand), y LSH r (r de Robey), con peso molecular de 10 000 y 80 000 daltones respectivamente, ambos estables al calor. Estos compuestos participan en la producción de anticuerpos y eritrocitos e inducen linfocitosis. Se aísla por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía usando una columna de Sephadex (Luckey y col. 1973).

HORMONAS QUE ACTUAN SOBRE LA FUNCION TESTICULAR

Las células de Leydig son células altamente diferenciadas para la síntesis y secreción de andrógenos. Las enzimas participantes en la esteroidogénesis se encuentran en las mitocondrias y el citoplasma. El estado diferenciado de los organelos de las células de Leydig así como la inducción y mantenimiento de las enzimas esteroidogénicas está bajo el control trófico de la hipófisis (Catt y col. 1980).

El control de la producción de esteroides por las células de Leydig depende de la acción de las gonadotrofinas. La secreción de la LH mantiene la función esteroidogénica de las células de Leydig, éste efecto se realiza a través de la interacción con receptores específicos en la superficie celular, que llevan a la subsecuente estimulación de la producción de AMPc. La regulación positiva de receptores membranales y de la esteroidogénesis es causada por incrementos fisiológicos en la hormona endógena; una mayor elevación

en las concentraciones circulantes de gonadotropinas ocasiona regulación negativa de receptores homólogos y desensibilización de la respuesta en las células blanco (Catt y col. 1980; Dufau y Catt 1978 y Dufau y col. 1984)

La prolactina modula los efectos de la LH en la célula de Leydig potenciando el efecto de esta hormona en parte a través del control del número de receptores a LH (Chan y col. 1981).

La FSH, probablemente a través de efectos a nivel tubular induce la producción de factores y hormonas en el túbulo y juega una función importante en la diferenciación de las células de Leydig. Se ha observado que la FSH induce receptores a LH e incrementa la capacidad esteroidogénica del testículo y que ambas producen un efecto sinérgico en la función testicular. Además, la FSH induce cambios en la función de los macrófagos del testículo (Yee y Hutson, 1985).

La producción de andrógenos por la célula de Leydig es importante en el control de la espermatogénesis y en muchos aspectos de la función epididimal (Dufau y col. 1984). Asimismo, la testosterona influye en la diferenciación de los cordones testiculares y del sistema productor de esteroides de la célula de Leydig (Yee y Hutson, 1985).

ACTIVIDAD ENDOCRINA DEL TIMO

Se ha postulado que las interrelaciones entre el sistema inmune y reproductivo tiene efectos bidireccionales entre gónadas y timo. Un factor que se encuentra en el timo con peso molecular de 28 000 daltones es capaz de inhibir la producción de T inducida por la hormona gonadotrófica coriónica humana (hCG) en una suspensión de células de Leydig *in vitro* (Padernera y col. 1986).

Hiriart y Romano (1986). investigaron la actividad antigonadotrófica de una fracción del timo sobre los receptores para hCG en células de Leydig. El polvo acetónico obtenido de timos de rata Wistar de 14 días de edad es separado por cromatografía de filtración. Una fracción correspondiente a 27 000 - 28 000 daltones que fue llamado factor tímico (FT), compite con la hCG por el receptor en testículo; este efecto es dosis dependiente. Por análisis de Scatchard se demostró que la inhibición es de tipo competitivo. El valor de K_a (constante de asociación) disminuye en presencia del FT; no se detectaron cambios significativos en el número de sitios receptores.

Por otra parte se estudió el efecto del medio de incubación de timos de ratas Wistar machos prepúberes (MIT) sobre la secreción de la LH y FSH a partir de células cultivadas de hipófisis y se encuentra que con el MIT se incrementa la liberación de la LH y FSH inducida por LHRH, sin modificarse la secreción basal en el caso de la FSH y además estimula la secreción de la LH, aunque este efecto es de menor magnitud que el anterior. En relación a la secreción de FSH no se observa ningún cambio significativo en un medio de incubación de riñón. (Mendoza y Romano, 1985). Por otra parte se ensayó sobre las mismas células el efecto de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna (Ultrogel ACA 54). Una de estas fracciones de peso molecular de alrededor de 28 000 daltones potencia la respuesta a LHRH, produciendo un incremento significativo en la secreción estimulada de la LH y FSH (Mendoza y Romano, 1989).

Para el estudio de la influencia del timo sobre el funcionamiento del ovario, se realizaron experimentos en los que se midieron las concentraciones de P, E₂ y T, en el medio de incubación de células de ovario obtenido de ratas en proestro. Las células se dispersaron con colagenasa y se incubaron durante tiempos variables con y sin factor tímico obteniéndose la secreción basal y la estimulada con hCG. Los

resultados permiten afirmar que el factor tímico inhibe la secreción estimulada de estas hormonas por el ovario siendo la P y la T las más afectadas por el tratamiento (Aguilera y Romano, 1989).

Recientemente se ha demostrado que el medio de incubación de timo obtenido luego de incubar estos órganos en medio nutritivo contiene al FT que inhibe la liberación estimulada de T en las células de Leydig (Reyes y Romano, 1989).

Martín y Romano (1993), demostraron que una población enriquecida de células epiteliales de timo de rata neonatal secreta al medio una sustancia que modula la secreción de T en células de testículo del factor tímico.

Recientemente Porras (1988), llevó a cabo la purificación parcial del FT, usando dos métodos de purificación. El primero es por filtración molecular y columna de afinidad. El segundo se realiza obteniendo primero la proteína mediante precipitación con sulfato de amonio y luego por cromatografía de afinidad. Los resultados muestran que de los dos métodos, el más recomendable es el primero, ya que la purificación es mayor. El gel nativo muestra una banda única cuando se aplica la fracción más pura que es del orden de nanogramos, por lo que esta banda se hace evidente al utilizar la técnica de impregnación de plata (Sammons y col. 1981).

MÉTODOS DE PURIFICACION DE PROTEINAS

La purificación de proteínas se puede llevar a cabo utilizando los métodos clásicos considerando las ventajas y desventajas que éstos pueden presentar. La proliferación de técnicas cuya eficiencia ha sido demostrada para la separación de proteína, a menudo hace difícil la elección del método adecuado (Jacobi, 1971; Morris y Morris, 1963).

Las propiedades relevantes de la molécula a separar nos da un indicio de la elección del método. Además se debe considerar cuestiones prácticas tales como la complejidad del aparato y la escala sobre la cual se va a efectuar. Consideramos aquí los que se detallan a continuación:

I) Cromatografía de afinidad.

Método ampliamente utilizado en la purificación de proteínas, se basa en el reconocimiento biológico de algunas secuencias de residuos o bien de alguna determinada estructura (Lowe C.R. 1977).

En forma general la cromatografía de afinidad involucra un enlace covalente del ligando a un soporte sólido. Si un homogenado crudo o una suspensión proteica es pasada por una columna de afinidad, las macromoléculas que interactúan específicamente con el ligando serán retenidas. Estas moléculas pueden ser eluidas específicamente de la columna mediante la adición de un ligando al amortiguador de equilibrio o mediante el uso de sustancias que interfieran con la unión ligando-proteína tales como sales de distinta fuerza iónica (Farooqui, 1980). El proceso de este tipo de cromatografía depende ampliamente de las condiciones usadas en los experimentos o de las interacciones biológicas. La cromatografía de afinidad es una separación que presenta ventaja sobre otros métodos de purificación por su alta especificidad (Mulder y col. 1979).

Por este método han sido purificados una gran cantidad de proteínas tales como enzimas inhibidoras de las mismas hormonas de naturaleza glicoproteica, receptores de membrana y del citosol (Mulder, 1979 ; Gospodorowick y Chang, 1984). Katchalski-Katzir (1981), describe el reconocimiento de una molécula proteica en términos de complementaridad, especificidad y dinámica.

1.- Complementaridad: Está revelado por: a) la observación de la interferencia entre una enzima y su sustrato, de un anticuerpo y su correspondiente antígeno o entre dos proteínas; b) las formas de la enzima y sustrato o antígeno y anticuerpo está dado por una interferencia de paquete cerrado con agujeros internos; c) apareamiento de grupos cargados opuestamente siendo importante por razones de especificidad.

2.- Especificidad: Está dada a través de interacciones favorables entre un ligando y un soporte sólido altamente específico, compuesto por esta unión: a) la naturaleza de las fuerzas interatómicas dan ciertas fuerzas en la especificidad; b) los sustratos cargados pueden ser reconocidos con alta especificidad desde la unión entre cargas contrarias que son favorables para la interacción, porque dichas fuerzas entre cargas disminuye.

3.- Dinámica: Está dada por los siguientes puntos: a) el movimiento de los átomos es consecuencia inescapable de la energía termal a temperatura ordinaria; b) el reconocimiento preciso ocurre a pesar del movimiento atómico; c) en ciertos casos la dinámica puede jugar una función constructiva permitiendo un acceso de los sustratos a los sitios activos que son bloqueados en la estructura estática; d) bajo condiciones apropiadas alteraciones conformacionales pueden ocurrir en proteínas y otros biopolímeros.

II) Cromatografía de filtración.

La cromatografía de filtración es un método de separación que se basa en la discriminación por el tamaño molecular (Fischer, 1977; Osborn, 1972).

Este método separa sustancias de acuerdo a su tamaño molecular; de este modo las grandes saldrán primero, mientras que las pequeñas se

retienen. La resina que se utiliza no posee carga eléctrica, lo que impide el intercambio iónico.

El proceso de separación en una cromatografía de filtración en gel para propósitos prácticos pueden explicarse mediante el siguiente esquema : 1.- Las moléculas son llevadas a la parte inferior del lecho cromatográfico por el flujo del líquido entre las partículas del gel; 2.- Las moléculas grandes por impedimento estérico son incapaces de penetrar en el interior del gránulo del gel y viajan a la misma velocidad que el líquido de elución; 3.- Las moléculas pequeñas pueden penetrar al gránulo del gel; las moléculas que se encuentran en el interior de los gránulos se encuentran en un estado estacionario; 4.- La velocidad promedio del flujo es inversamente proporcional al tiempo que permanece el polielectrolito en el espacio entre los gránulos del gel. Las moléculas pequeñas en consecuencia viajarán a menor velocidad .

La matriz del gel en la cromatografía generalmente no causa desnaturalización de las proteínas durante la cromatografía.

Con la cromatografía de filtración se ha conseguido resolver algunos problemas como la desalación de soluciones de proteínas, y otras sustancias de peso molecular alto y la determinación de los pesos moleculares de macromoléculas, particularmente proteínas. El lecho cromatográfico usualmente no necesita regeneración y puede ser usado por años, siempre y cuando se eviten las alteraciones que puedan causar la contaminación microbiana (Fischer, 1977). En forma general, el lecho cromatográfico está formado por partículas pequeñas usualmente empaquetadas en un tubo; estas partículas se extienden en una capa sobre un soporte sólido. El espacio entre las partículas es ocupado por un líquido que fluye a través del gel. La fase estacionaria retarda el progreso de las moléculas mediante la

generación de diferentes velocidades. Para muchos grupos de sustancias se encuentra una correlación entre el peso molecular y el volumen de elución; y en la práctica el volumen de elución es determinado por la masa molecular, este método es explicado por Flodin (1962).

De acuerdo a ese método el coeficiente de partición del soluto entre las fases del gel y la fase líquida es determinado por efectos estéricos. El modelo explica el comportamiento de elución de muchas sustancias, sin embargo se ha observado ciertas excepciones. Algunos sustratos se retienen fuertemente lo que dificulta su elución; dentro de estos sustratos están las sustancias aromáticas, moléculas orgánicas hidrofóbicas, aniones inorgánicos y cationes cuya elución se retarda por efectos de interacción hidrofóbica (Fischer, 1977).

III) ELECTROFORESIS EN GEL.

Por otro lado si se desea separar una mezcla de proteínas es conveniente la aplicación de un análisis electroforético que proporcionará información acerca de las características de los elementos constituyentes de dicha mezcla (Davies, 1964).

En la electroforesis los componentes cargados migran separándose en un campo eléctrico a diferentes velocidades, que son gobernadas principalmente por la carga y por la fuerza del campo eléctrico (Takacs, citado por Istvan Kerese, 1984).

El gel de acrilamida está formado de largas cadenas de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y al adicionar la N-N'-metilen-bisacrilamida forman matrices de poli(acrilamida) por el efecto de polimerización (Fawcett y Morris, 1977). La mezcla del monómero con un agente de entrecruzamiento, la bisacrilamida, se polimeriza a través de un proceso de oxidación. A través de la concentración y pureza del

monómero se pueden determinar propiedades de firmeza y transparencia al tiempo de la polimerización (Takacs; citado por Istvan Kerese, 1984).

Para que se lleve a cabo la polimerización es necesario la existencia de radicales libres que se inician con agentes oxidantes como el persulfato de amonio o peróxido de hidrógeno, en ausencia de oxígeno atmosférico, cuya función es la de terminador de cadena. Después de dicho proceso, las moléculas que se siembran pasan a través de la malla de gel, cuyos orificios pueden tener diferente tamaño y forma (Charambach, 1969).

Electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis en gel de acrilamida es un método sencillo y económico que requiere de muy pequeñas cantidades de muestra (0.1 mg si se trata de extracto crudo y 0.005 mg si es proteína pura). Afortunadamente, al menos con proteínas, las interacciones tales como la adsorción en el gel son tan raras que las mezclas de toda clase de proteínas incluyendo histonas y nucleoproteínas pueden ser separadas satisfactoriamente (aplicación analítica Davies, 1964).

i) Amortiguadores apropiados para la electroforesis en gel.

Para obtener un resultado satisfactorio en la separación electroforética de tipo zonal, en la cual los constituyentes del gel están en presencia de muchas otras moléculas que no son de interés, es importante mantener el pH uniforme, al menos en la parte del gel en la cual ocurre la separación. Asimismo, es importante elegir un sistema amortiguador adecuado para la electroforesis.

ii) Características del gel analítico.

Las características del gel residen en: i.-la variación controlada del tamaño del poro con el objeto de incrementar la

resolución de iones basado en las diferencias dimensionales y 2.- Un paso electroforético para la concentración de la muestra en una zona inicial previa a la separación electroforético entre sí.

Determinación de peso molecular por geles de acrilamida-DSS.

El detergente dodecil sulfato de sodio (DSS) disocia proteínas en sus cadenas polipeptídicas constituyentes. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de DSS separa las cadenas polipeptídicas de acuerdo a sus pesos moleculares. El método es fidedigno y reproducible y los resultados que se obtienen dentro de un rango de pesos moleculares de 15 000 a 200 000 daltones son generalmente muy aproximados a los obtenidos por otras técnicas. La movilidad de una cadena polipeptídica durante la electroforesis en gel con DSS depende primariamente de sus pesos moleculares (Weber y Osborn, 1975).

De acuerdo a los estudios realizados se han establecido diferentes concentraciones adecuadas para los diferentes rangos de pesos moleculares. Se sugiere que se obtiene una buena separación para rangos de pesos moleculares entre 10 000 - 70 000 daltones con gel a una concentración del 10%; entre 25 000 - 200 000 daltones con una concentración del 5% y una concentración del 3.3% permite la separación de componentes de altos pesos moleculares; hasta de 1 000 000 daltones. Los geles conteniendo 15% de poliacrilamida se sugieren para pesos moleculares menores de 50 000 daltones.

El valor constante de movilidad electroforética en gel DSS indica que el complejo de la proteína DSS actúa de tal manera que su movilidad libre es independiente de carga y tamaño (Peacock y Dingman, 1968).

Estudios de una variedad de diferentes proteínas, indican que existe un alto nivel de unión de éstas al DSS. La medida de unión al

DSS indica que el porcentaje de DSS como monómero libre o como micelas varía con la fuerza iónica y que la unión depende de la concentración de equilibrio del monómero y no del DSS total (Pitt-Rivers y Impiombato, 1968). Las relaciones establecidas empíricamente entre movilidad electroforética y peso molecular de cadenas polipeptídicas en el complejo proteína-DSS son : 1.- La carga por unidad de masa es aproximadamente constante y 2.- El radio de carga efectiva para el coeficiente friccional es aproximadamente constante e independiente del peso molecular. Esta técnica es particularmente útil para el análisis de sistemas multiconformados tales como complejos enzimáticos, virus y membranas los cuales son a menudo difíciles de disociar por otros métodos. Las proteínas separadas en DSS pueden ser sujetas a una caracterización posterior, eluyendo de los geles las cadenas polipeptídicas separadas. La elución de sólo una parte de gel produce generalmente nanomoles de los componentes individuales. Estas cantidades de proteínas pueden ser suficientes para un análisis de aminoácidos y carboxilo terminales o para la caracterización de fragmentos de bromuro de cianógeno (Weber y Osborn, 1975).

Sin embargo, pueden presentarse algunos problemas con esa técnica en los siguientes casos: 1.- Unión anormal al DSS; 2.- Contribución de la carga neta intrínseca de la proteína; 3.- Proteínas de bajo peso molecular y 4.- Presencia de enzimas proteolíticas (Tung y Knight, 1971).

IV) ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA-DSS Y AGENTES REDUCTORES

Como se mencionó anteriormente las proteínas de peso molecular alto tienen una mayor influencia sobre las proteínas más pequeñas. En estas proteínas la carga intrínseca y la conformación de pequeñas cadenas polipeptídicas pueden ser más importantes en su movilidad sobre geles con DSS, que para el caso de proteínas mayores. Si se incrementa la concentración de bisacrilamida y se agrega urea 8 M los

resultados parecen mejorar, ya que las uniones por puente de hidrógeno desaparecen en soluciones que contienen una alta concentración de urea. Además el agregado posterior de agentes reductores como 2-mercaptoetanol seguida de un agente alquilante como yodoacetamida o ácido yodoacético, previene la formación de puentes disulfuro en la separación electroforética y de esta manera se hace posible la obtención de subunidades (Weber y col. 1972; Weber y Osborn, 1975).

Tinción del gel.

a) Técnica de azul de Coomassie. El azul de Coomassie es más sensible que otros tintes como el amino negro (Weber y col. 1972). El uso de tinción seguida de la destinción del gel ofrece máxima sensibilidad. Una técnica más rápida pero de menor sensibilidad de tinción fue descrita por Charambach y col. (1967); en este procedimiento el gel se sumerge en azul de Coomassie con ácido tricloroacético, el colorante actúa sobre sitios de la proteína, por lo que se dice que es relativamente insoluble en esta solución. Si está presente bastante proteína en cada banda, aparece después de un procedimiento corto de tinción y no será necesario un procedimiento desteñidor.

b) Técnica de nitrato de plata. Con el objeto de mejorar la resolución de la tinción se utiliza el método de impregnación de plata para el cual se requiere que el gel esté completamente desteñido. Esto se logra mediante dos pasos de alcohol-acético que se aplican luego de la tinción con Coomassie y previo a la tinción completa (Sammons y col. 1981).

Destinción de gel.

Para desteñir el gel se utiliza la misma solución de la técnica de azul de Coomassie, pero sin el colorante (Shapiro y col. 1967).

DETERMINACION DE HORMONAS POR RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

El RIA está basado en el principio de que el antígeno no marcado compete con el antígeno marcado por el sitio de unión del anticuerpo. Los datos desconocidos se comparan con una curva estándar derivada de diluciones de una cantidad conocida de antígeno puro. La sensibilidad, especificidad y precisión del ensayo están dados por el anticuerpo. La sensibilidad del RIA depende de tres factores: especificidad, afinidad y manejo del anticuerpo (Benade, 1982).

BIOENSAYO EN CELULAS DE LEYDIG *in vitro*.

Esta técnica ha sido empleada como bioensayo de preparaciones de LH y hCG purificadas, así como de sus subunidades, y de gonadotrofinas radioiodinadas. Mediante esta técnica se obtiene una población enriquecida en células intersticiales o de Leydig. Se utiliza colagenasa para la dispersión de las células ya que durante la investigación de mecanismos de acción de gonadotrofinas sobre células de Leydig, se ha demostrado la eficiencia de esta enzima para dispersar las células intersticiales de la rata sin alterar la secreción espontánea de testosterona y sin dañar los receptores de gonadotrofinas (Dufau y col. 1974).

DETERMINACION DE PROTEINAS POR LA TECNICA DE LOWRY.

Desde 1922 este método fue propuesto por Wu, usando folin Fenol como reactivo para la determinación de proteínas. El reactivo es recomendable por su gran sensibilidad y la simplicidad del procedimiento de uso. Ha sido estudiado considerando efectos de variaciones en pH, tiempo de reacción y concentración de reactivos

comúnmente usados en el manejo de proteínas y sustancias que interfieren con la reacción.

El procedimiento ha sido descrito para determinar proteínas en solución o después de una precipitación con ácidos u otros agentes. Sirve para determinar pequeñas cantidades de proteínas del orden de microgramos (Lowry y col. 1951).

JUSTIFICACION

En estudios anteriores se ha demostrado que del timo se deriva una fracción proteica con peso molecular aproximado de 28 Kd que inhibe la liberación de T en células testiculares estimuladas con la hCG. Resulta conveniente que este factor se tenga en forma pura ya que de esta manera podríamos identificarlo bioquímicamente y nos permitiría conocer el mecanismo de acción por el que lleva a cabo su efecto a nivel sistémico y a nivel celular. En la actualidad existe muy poca información sobre los mecanismos subyacentes mediante los cuales el timo puede afectar la estructura y función de las gónadas. Michael S.D. y col. (1983), explican las interacciones timo-gónadas a través de dos mecanismos distintos pero que guardan relación entre sí. Con el objeto de conocer más sobre este mecanismo se hace necesario intentar la purificación de la proteína existente en la fracción que hemos llamado " factor tímico ".

HIPOTESIS

Si el factor tímico que nos interesa es afín a la heparina, se espera que el fraccionamiento del homogenado completo de timo a través de una cromatografía de afinidad en heparina-sefarosa permita una mayor purificación y un incremento de la inhibición en la liberación de testosterona. Si se logra avanzar en la purificación, entonces se encontrarán menos bandas en la electroforesis en geles de poliacrilamida.

OBJETIVO GENERAL:

-Describir las características de una proteína del timo que regula la liberación de testosterona en células testiculares en respuesta a la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Caracterización del "factor tímico" en sus diferentes pasos de purificación.
- b) Determinar el grado de purificación mediante el método de electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturizante con dodecil sulfato de sodio, y comparar los resultados observados usando el mismo método en presencia de 2-mercaptoetanol.
- c) Determinar la cantidad de proteína existente en las fracciones obtenidas por el método de Lowry.
- d) Estudiar la actividad biológica de las preparaciones obtenidas midiendo la producción de T en células de Leydig *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS.

Obtención del polvo acetonico del timo.

Se extrajo el timo de ratas Wistar macho de 14 ± 1 días de edad, los animales se anestesiaron previamente en una cámara saturada de éter. Los timos se colocaron en acetona con hielo seco para mantenerlos a 15°C , y luego se homogenizaron en un homogenizador con motor (Kinematica CH-6010 kriens-lu, 110v; 60Hz). El homogenado resultante se centrifugó a 26 000 g por 10 minutos; esta operación se realizó dos veces. El sobrenadante se desechó y el precipitado se colocó en un desecador a 4°C , hasta obtener el polvo acetónico. Este se resuspendió en amortiguador Tris 50 mM /NaCl 0.1 M (AT) a pH 7.0 (100 mg de polvo/ ml de amortiguador), que contienen fenil-metil sulfonil fluoruro (PMSF) 0.1mM, y se homogenizó. El homogenado resultante se centrifugó nuevamente a 28 000 g por 30 minutos a 4°C y el precipitado se desechó. El sobrenadante, que es el extracto crudo y contiene el factor proteico que se pretendía purificar. se mantuvo de aquí en adelante a una temperatura de 4°C .

Cromatografía de filtración.

Se utilizó una columna de gel de acrilamida-agarosa (Ultrogel ACA 54) de 2.6×100 cm. Esta columna fue calibrada con estándares de proteína de pesos moleculares conocidos. En estas condiciones se inyectó a la columna 5 ml de extracto acetónico y se eluyó la proteína adsorbida con AT a 4°C . Se unieron las dos fracciones de peso molecular aproximado de 30 Kd, obtenidas en esta columna después de la aparición de la media hemoglobina (Pedernera y Calcagno, 1984), y se procedió a liofilizar y dializarlas para concentrar la proteína de interés. Una parte de esta proteína concentrada se destinó para la

prueba de actividad en el bioensayo de células de Leydig. Otra parte de ésta se eluyó en la columna de afinidad (Figura 2).

Cromatografía de afinidad.

Para este proceso se utilizó una columna hecha con una jeringa de plástico con un lecho de 10 ml de resina sefarosa-heparina, la cual se reactiva a 4° C, con soluciones de NaCl 2.0 M a pH de 2, 7 y 9. Posteriormente se equilibró toda la noche con solución amortiguadora de tris-HCl 100 mM, pH 7.0. Para la elución se utilizaron tres soluciones amortiguadoras de diferente fuerza iónica: tris-HCl 100 mM; tris-HCl 10 mM/NaCl 0.6 M, tris 10 mM/NaCl 1.0 M y tris HCl 10 mM/NaCl 2.0 M, las tres a pH 7.0 (Figura 2).

Las fracciones en donde se obtuvieron picos de proteínas se dializaron contra solución amortiguadora tris-HCl 50 mM/NaCl 0.1 M, pH 7.0 a 4° C, por 24 horas cambiando por dos veces la solución. La diálisis se realiza usando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 800 Da. Las fracciones se concentraron en tubos de Centricell (Polyscience), que retienen las proteínas de más de 10 Kd. Las fracciones dializadas se probaron posteriormente con un bioensayo de células de Leydig para verificar su actividad.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

a) Preparación de las muestras:

Las muestras se dializaron contra la solución amortiguadora del gel concentrador diluido 1:4, este paso es necesario para las fracciones que tienen sales de alta concentración.

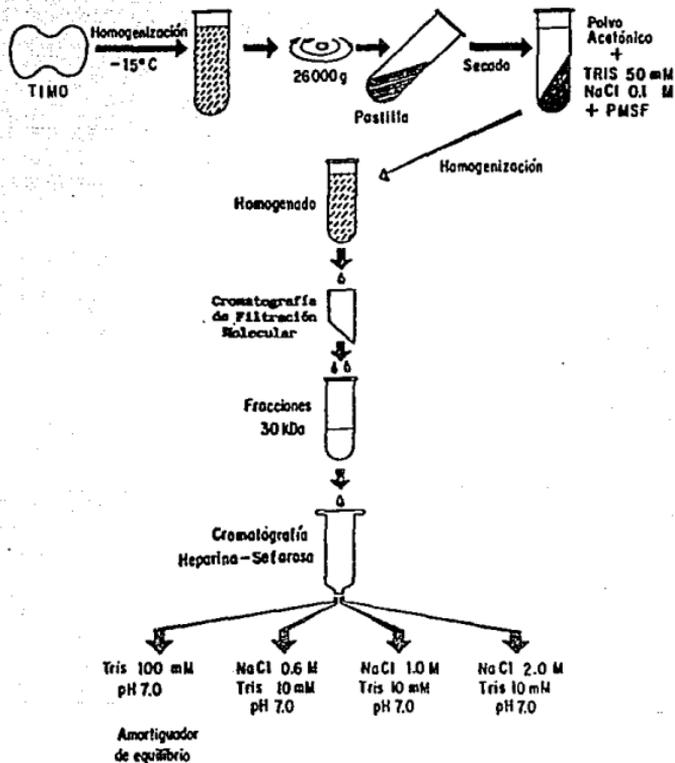


Figura 2.- Esquema de las etapas a seguir para la purificación del factor tímico.

b) Aparatos utilizados:

La corrida de las muestras se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis (Aparato para microelectroforesis Mod. ES-50); que consta de una cámara rectangular con dos placas de vidrio, en donde se efectuó la polimerización. Las placas están protegidas por un capuchón que consta de dos polos donde se aplicó el voltaje para llevar a cabo la electroforesis. El tamaño de la cámara fue de 11 x 8.5 cm de altura.

c) Preparación del gel:

La aplicación del gel se realizó inmediatamente después de su preparación. Se prepara el gel resolvente (al 12% de acrilamida), que contiene los siguientes reactivos: 2.4 ml de acrilamida (8%); 1.5 ml de amortiguador Tris pH 8.8; 2.1 ml de agua; 16 μ l de persulfato de amonio (10%) y 5 μ l de N-N'-N'-N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El tris amortiguador contiene DSS, a una concentración de 0.25%.

Después de 30 minutos de realizada la polimerización se aplicó el gel concentrador (al 12%). que contiene los siguientes reactivos: 1.25 ml de acrilamida (8%); 0.625 ml de Tris pH 6.8; 0.625 ml de agua; 1.25 μ l de persulfato de amonio (10%); y 2.5 μ l de TEMED. Las dimensiones de los geles fueron de 0.8 x 6.0 cm para el gel concentrador y de 5 x 6 cm para el gel separador ambos con un espesor de 0.75 mm.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturizante DSS.

Se realizó el procedimiento mencionado anteriormente sólo que en este caso al preparar el gel se adicionó DSS al 20% y las muestras se hirvieron durante un período de 3 min, a 100°C, con 2 mercaptoetanol al 5%. La tinción se realizó como se describe más adelante.

d) Corrida electroforética:

Las muestras y proteínas estándar se diluyeron en solución buffer que contiene glicerol 50%, azul de bromofenol 0.5% o en su defecto pironina 2% y tris HCl 0.5 M pH 6.8. La cantidad de muestra aplicada de proteína es de 25 µg. La corrida electroforética de las muestras en la cámara se realizó con una corriente constante de 15 mA y voltaje variable (30 - 70 V), hasta la salida del colorante por la parte inferior del gel, a 5 mm del borde inferior.

e) Tinción del gel:

- Técnica de azul de Coomassie. Se sumergió durante dos horas el gel en la siguiente solución: metanol 25%, ácido acético 10% y colorante de azul brillante de Coomassie al 0.05%. Si la coloración fue excesiva o se requirió desteñir completamente dicho gel para aplicarle otra técnica de tinción, se utilizó la misma solución, pero sin el colorante.

- Técnica de plata. Se utilizó este método con el objeto de mejorar la resolución. Se requiere que el gel esté completamente desteñido; esto se logra mediante dos pasos de alcohol previos a la tinción: 1.- Se colocó el gel por dos horas en una mezcla de etanolacético (50 - 10% respectivamente); 2.- Se pasó por 10 minutos a una segunda solución etanol - acético (1 - 5% respectivamente), 3.- Se colocó el gel en la solución de nitrato de plata al 0.1% por dos horas; 4.- Se realizó un enjuague con agua desionizada; 5.- Se reveló con una solución de NaOH al 3% en medio reductor, con formaldehído al 0.5% por 10 minutos y 6.- Se fijó de 5 a 10 minutos en solución de NaCO₃ al 0.72%.

Determinación del peso molecular de las proteínas.

El peso molecular de la proteína de la muestra se obtuvo por comparación con los patrones electroforéticos de proteínas estándares: fosforilasa b (97 Kd), albúmina sérica bovina (BSA. 66 Kd), ovalbúmina (45 Kd), anhidrasa carbónica (31 Kd), inhibidor de tripsina (21 Kd) y lisozima (14 Kd).

Bioensayo de células testiculares.

Se obtuvieron testículos de ratas Wistar adultas (250 - 300g de peso), previamente anestesiadas con éter. Se retiró la capa albugínea y se lavaron en solución libre de calcio y magnesio. Se incubaron a 34°C en una solución que contiene medio nutritivo (Dulbecco MEM) con albúmina de suero bovino (BSA de Sigma), al 0.1% y colagenasa al 0.015% con agitación vigorosa de 160 ciclos/min durante 15 minutos. Después de este tiempo se diluyó la acción de la enzima agregando un volumen igual de solución Dulbecco MEM más BSA 0.1%. se pasó la suspensión obtenida por una malla de nylon y se centrifugó a 405 g por 10 minutos. El sobrenadante se decantó, la pastilla celular que contiene a las células de Leydig, se resuspendió en medio de incubación que contiene DMEM, albúmina de suero bovino al 0.1% y 1-metil-3-isobutilxantina 0.1 mM (D+A+X), en una proporción de 1 ml por cada 100 μ l de pastilla celular. La suspensión celular se gaseó con 95% de aire y 5% de CO₂, para obtener un pH similar al del medio celular. A cada matriz que contuvo 1.8 ml de medio de incubación se le agregó una alícuota de la suspensión celular más 200 μ l de la muestra que va a ser probada, más 1 mUI/ml de la hCG. Algunos matraces no recibieron hCG, con el propósito de evaluar la liberación basal de T. Se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación de 90 ciclos, se recogieron los medios y luego de centrifugarlos a 6800 g por 10 min se guardó el sobrenadante para la determinación de T por radioinmunoanálisis (Figura 3).

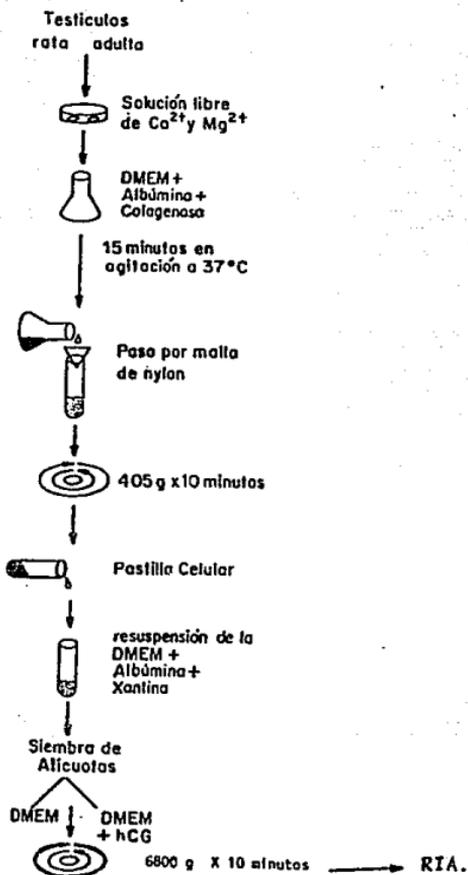


Figura 3.- Metodología seguida para el bioensayo
bioensayo en células testiculares.

Radioinmunoanálisis de testosterona.

Se empleó anticuerpo contra T (de RadioAssay), que tiene una reacción cruzada del 18.75% con 5-DHT; utilizando la [3H]-T (Amersham) como trazador. Las concentraciones de la hormona en las muestras se cuantificaron contra una curva estándar de [3H]-T, con concentraciones que estuvieron entre 12.5 y 200 Pg/ml. Se graficó el logaritmo de las concentraciones conocidas de los estándares de T contra el logaritmo de Y, donde Y es la relación entre la unión total y la unión en presencia de la hormona fría (Bedolla y col. 1984). Por cada 200 μ l de muestra se agregaron 100 μ l del trazador radioactivo y 200 μ l de anticuerpo antitestosterona. La mezcla se incubó por 24 horas a 4°C, al final de la incubación se agregaron 500 μ l de una suspensión de carbón activado (8%) para adsorber la hormona libre en amortiguador RIA (sal monosódica y disódica de sodio 0.04 y 0.06 M respectivamente, gelatina y azida de sodio 0.5% y NaCl 0.15M a pH 7.0). Después de 10 minutos se centrifugaron los tubos a 4500 g durante 10 minutos el sobrenadante se vació en viales de vidrio, se le agregó líquido de centelleo. Las muestras se contaron en un contador beta Packard (Modelo 2405), con una eficiencia del 30% para tritio.

Determinación de proteínas por la técnica de Lowry.

Se obtuvo una curva estándar, utilizando albúmina a diferentes concentraciones entre 0 y 50 μ g/ml; completando volúmenes con agua bidestilada, finalmente se le adicionó 600 μ l de solución D (sulfato cúprico, tartrato de sodio y potasio, carbonato de sodio e hidróxido de sodio), y luego de 10 minutos se le agregó 100 μ l de solución E (disolución 1:1 folin ciocalteu); se procedió asimismo con las alícuotas de las fracciones cromatográficas. Después de 30 minutos se tomó una alícuota y se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman.

Análisis estadístico de los datos.

La concentración de proteínas se calculó a través de una regresión lineal de los datos obtenidos a partir de un patrón. (Remigton y Schork, 1970). Los datos obtenidos se compararon mediante un análisis de varianza y una "t" de Student (Remigton y Schork, 1970).

Los datos del radioinmunoanálisis se analizaron con un programa Logit-RIA. La curva estándar se linealizó por regresión lineal, y los datos obtenidos se compararon mediante un análisis de varianza y una "t" de Student (Bedolla y col. 1984; Wayne, 1979).

La actividad específica se realizó calculando una diferencia entre la secreción de T de la fracción control (F₁) estimulado con hCG y de la secreción de T de la muestra problema estimulado con hCG; el valor obtenido de esta operación se divide entre la concentración total de proteínas que presentó cada muestra. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por una Ji-cuadrada (Wayne, 1979).

Los datos se consideraron diferentes estadísticamente cuando la probabilidad fue menor o igual del 5%.

RESULTADOS

VALIDACION DE LAS TECNICAS BIOQUIMICAS.

Para conferir validéz de los resultados obtenidos en el RIA, se procedió a la validéz de la curva estándar linealizada utilizando la transformación logit-log. Los coeficientes de regresión de la recta son $r = 0.99998$, $m = -2.398$ y $b = 4.694$.

En la estandarización de la curva que se realizó para calcular la concentración de proteínas los valores fueron $r = 0.9987$, $m = -2.423$ y $b = 4.760$.

Se realizaron tres experimentos para conocer la dosis de hCG a la que las células de Leydig responden de forma submáxima. En la figura 4 se muestra una gráfica representativa de una curva dosis-respuesta, en la que se determinó que una dosis de 1 mU/ml se emplearía en adelante en los bioensayos que se utilizaron para valorar el efecto del factor tímico con tiempos de incubación de dos horas. Se consideró una respuesta adecuada a la hCG cuando la producción de T en presencia de la hormona fue aproximadamente 4 veces mayor en relación a la producción basal. Se observa que en dosis mayores de 1.5 mU/ml decrece la producción de T.

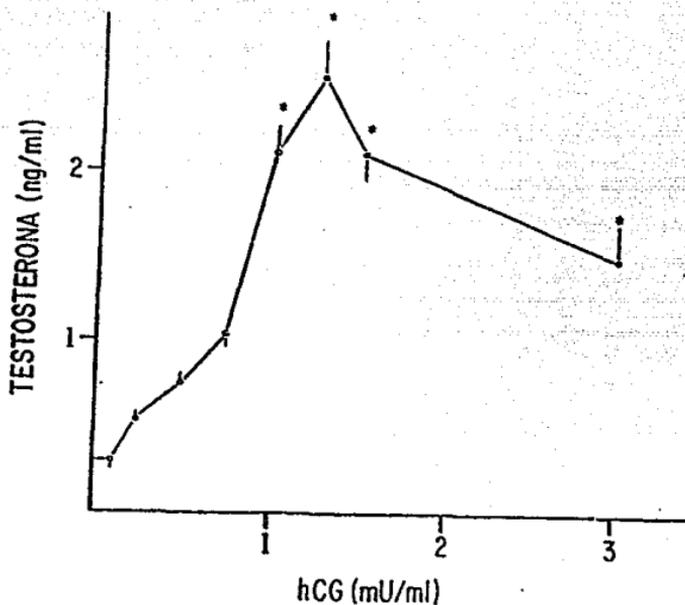


Figura 4.- Efecto de diferentes dosis de hCG sobre la producción de T. En el bioensayo (n=3) se utilizaron células de testículo de rata incubadas por un período de 2 horas a 37°C. Cada punto representa $(\bar{X} \pm D.S.M)$.

* Diferente al grupo control basal ($P < 0.05$) Prueba de ANDEVA.

EFFECTO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE FILTRACION.

El homogenado (extracto crudo), se hizo pasar a través de la columna de filtración molecular que fue previamente calibrada como se indicó en la metodología. La cantidad de homogenado aplicado fue de 11 ml equivalente al volumen que ésta puede aceptar para evitar su saturación (el volumen aceptado es del 4% del volumen total). Después de realizar el rastreo de columna las fracciones seleccionadas (34-39) se utilizaron para determinar la cantidad de T que se produce en las células de Leydig. La fracción control (F₁), fue colectada de una de las primeras fracciones que eluyeron de la columna que es la que se considera como blanco.

En la figura 5 y la tabla 2 se muestra la producción basal de T por las células de testículo *in vitro* y a continuación la respuesta de los mismos ante el estímulo gonadotrófico. Puede observarse que las fracciones 34 a 36 en presencia de hCG tienden a inhibir la producción de T, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas. Es en las fracciones 37 y 38 donde se observa una mayor inhibición en la producción estimulada de T. Se realizó un pool de éstas fracciones y se determinó la producción de T, obteniéndose una inhibición con respecto al grupo control estimulado con hCG. Estas fracciones inhibitorias corresponden a un peso molecular aproximado de 28 Kd (Figura 6).

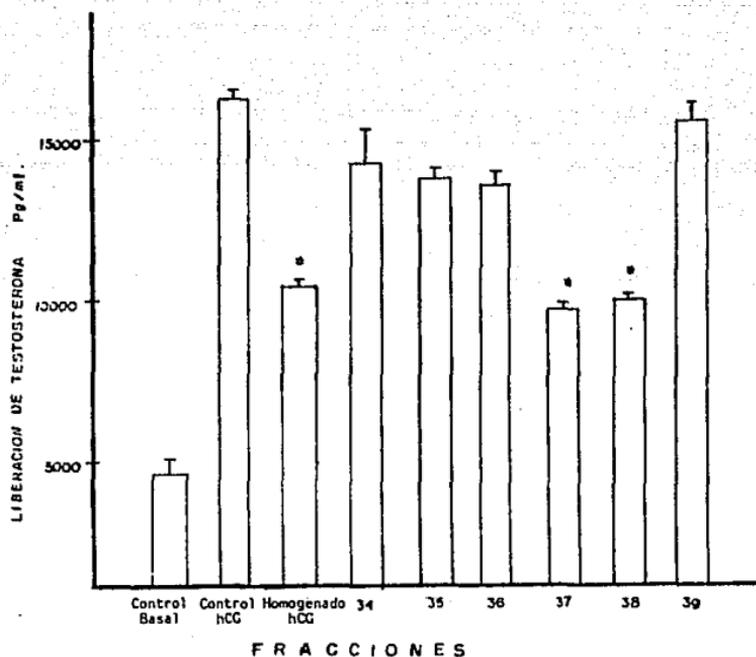


Figura 5.- Producción de testosterona ($\bar{x} \pm$ p.s.m.) en células de Leydig, incubadas en presencia de homogenado completo de timo y de las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas por filtración molecular en presencia de hCG (n=3).

* Diferente al control estimulado con hCG (P<0.05) Prueba de "t" de Student.

Tabla 2.- Secreción basal y estimulada de testosterona por células de testículo incubados en DMEM más isobutilmetil Xantina (0.1 mM) en presencia de homogenado de timo y de fracciones obtenidas de la columna de filtración molecular (Fr).

PREPARACION		$\bar{X} \pm$ D.S.M. DE LA CONCENTRACION DE TESTOSTERONA (Pg/ml).
Secreción basal de testosterona	Fracción control (F ₁)	4625 \pm 495
	Homogenado de timo	2972 \pm 139 *
Secreción de testosterona estimulada con hCG.	Fracción control (F ₁)	16252 \pm 385
	Homogenado de timo	10007 \pm 137 +
	Fracción Factor Timico (Fr).	8840 \pm 552 •

* (P < 0.05), vs la fracción control (F₁) en condiciones basales.

+ (P < 0.05), vs la fracción control (F₁) estimulando con hCG.

• (P < 0.05), vs la fracción control (F₁) estimulando con hCG.

(P<0.05) Prueba de "t" de Student.

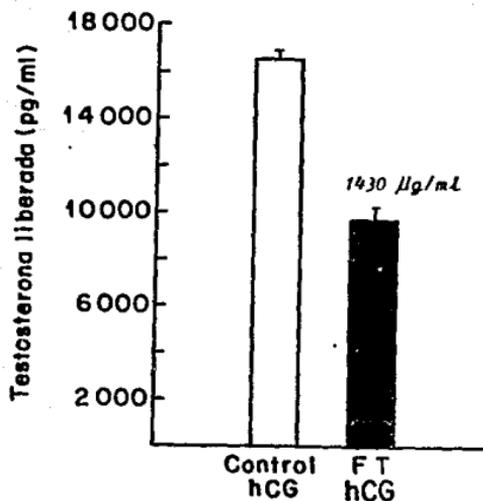


Figura 6.- Experimento tipo que muestra la actividad biológica de la fracción correspondiente al polipeptido de 28 Kd obtenida por filtración molecular (Fr). En ambos grupos las células fueron estimuladas con 1 mUI de hCG/ml de medio y el grupo representado en la columna FT_{hCG} recibió además 100µl de la fracción cromatográfica. La concentración total de proteína fue de 1430 µg/ml. (n = 3).

* Diferente al control estimulado (P < 0.05) Prueba de "t" de Student.

FACTOR TIMICO.

Se considera que la fracción de 28 kd, es la que contiene al factor tímico y produjo una inhibición de 45% en la respuesta de las células a la hCG con respecto al control (Figura 7A). Considerando la concentración de proteína para esta fracción como 1430 $\mu\text{g/ml}$, se calculó la inhibición específica en términos de unidades de inhibición (cantidad de proteína que es capaz de disminuir un ng la cantidad de T sintetizada en respuesta a la dosis de hCG). Para esta preparación la actividad específica se consideró como de 5.18 U/ng de proteína (Figura 7B).

En comparación, el homogenado completo produjo una inhibición del 38% y la actividad específica fue de 0.781 U/ng, considerando que la concentración de proteínas del mismo fue de 8000 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total.

Una muestra de la fracción que contiene al factor tímico, fue utilizada para realizar el segundo método o etapa de purificación mediante cromatografía de afinidad.

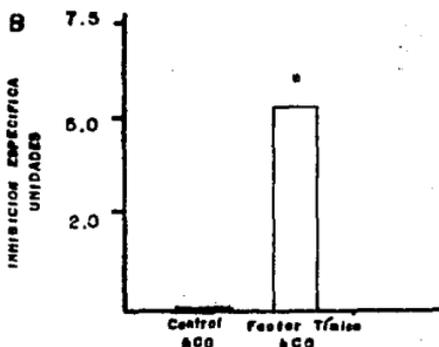
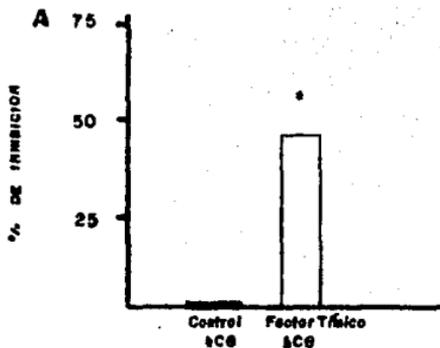


Figura 7 A.- Inhibición de la producción de testosterona en células de testículo de rata tratados con una fracción de aproximadamente 28 Kd, obtenida por filtración molecular más hCG (1 mUI/ml), respecto al grupo control que sólo recibió hCG.

Figura 7 B.- Inhibición específica o unidad de actividad, definida como la cantidad de proteína que produce la inhibición de un nanogrammo de testosterona en respuesta a la hCG.

* Diferente al grupo control estimulado con hCG
($P < 0.05$) Prueba de Ji-cuadrada.

EFEECTO DE LAS FRACCIONES ELUIDAS EN LA COLUMNA DE HEPARINA-SEFAROSA.

Después de obtener la fracción que contiene el factor tímico de la columna de filtración molecular se procedió a efectuar la segunda etapa de purificación descrita en la metodología: Cromatografía de afinidad utilizando una columna de heparina-sefarosa.

En las fracciones eluidas de esta columna se obtuvieron tres picos de proteínas como lo muestra el perfil de elución de la figura 8.

En el primer pico es donde se encuentra la mayor cantidad de proteínas: este pico corresponde a las fracciones 5, 6 y 7 que eluyeron con baja fuerza iónica, la suma de la concentración de las tres fracciones de proteínas fue de 317 $\mu\text{g/ml}$. El segundo pico corresponde a las fracciones 16, 17, y 18 que eluyeron con Tris HCl/NaCl 0.6 M. En este caso se encontró en total una cantidad de proteína de 85 $\mu\text{g/ml}$ y por último en el tercer pico que corresponde a las fracciones 27 a 30 que eluyeron con alta fuerza iónica (2.0 M), se encontró una concentración proteica de 64 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9).

Las fracciones eluidas de la columna de heparina-sefarosa se dializaron contra solución amortiguadora Tris HCl/NaCl 0.1 M y pH de 7.4. Posteriormente se incubaron las células de testículo en presencia de 1000 $\mu\text{l/ml}$ de las fracciones proteicas para determinar su actividad biológica y mostraron el comportamiento ilustrado en la figura 10.

Las barras claras muestran la secreción de testosterona en condiciones basales y las oscuras nos muestran la secreción de testosterona en condiciones estimuladas con hCG. Se observa que las diferentes fracciones de la columna de heparina-sefarosa no produjeron modificaciones significativas en la producción basal de testosterona.

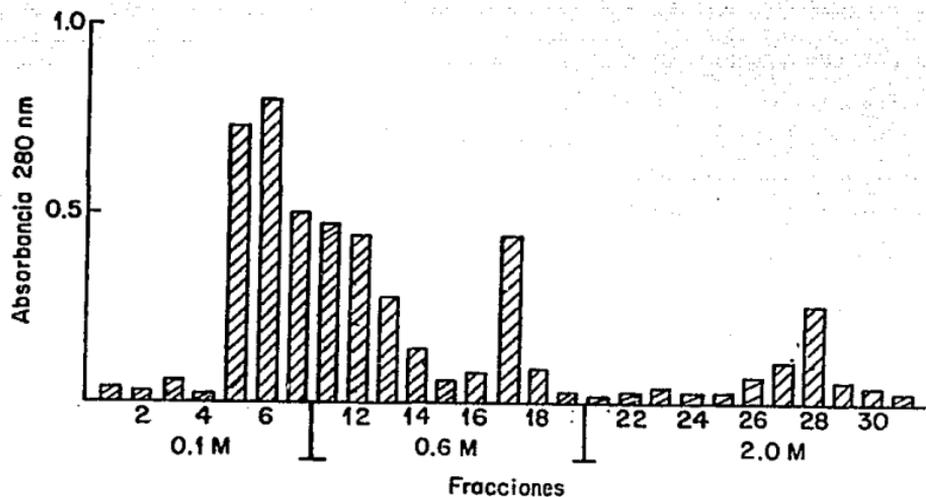


Figura 8.- Perfil de elución de las fracciones obtenidas de la columna de heparina-sefarosa. La fracción eluida contiene el factor tífico (con peso molecular de 28 Kd). La elución se efectuó con soluciones de fuerza iónica creciente NaCl 0.1 M, 0.6 M y 2.0 M todos con Tris HCl/ NaCl 0.1 M a pH 7.4 El volumen de elución fue de 20 ml.

(n=3).

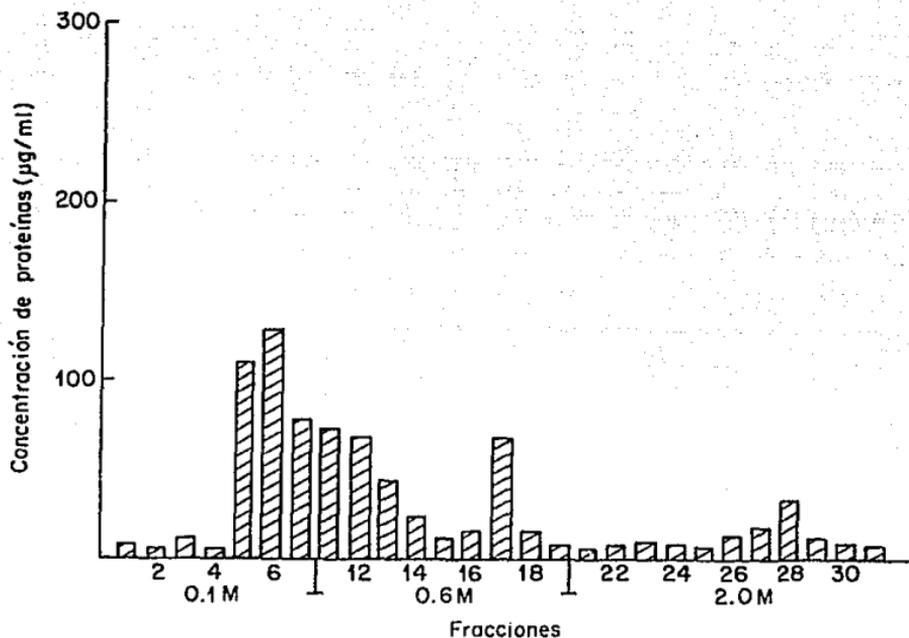


Figura 9.- Concentración de proteínas de las fracciones procesadas a través de la columna de heparina-sefaraosa. Estas fracciones corresponden a la elución de la fracción que contiene el factor tímico (Fr) obtenido de la columna de filtración molecular con un PM de 28 Kd. Los volúmenes recogidos en esta etapa fueron de 3.5, 5.0 y 7.0 ml para cada una de las fracciones de 0.1, 0.6 y 2.0 M que contenían mayor cantidad de proteínas (n=3).

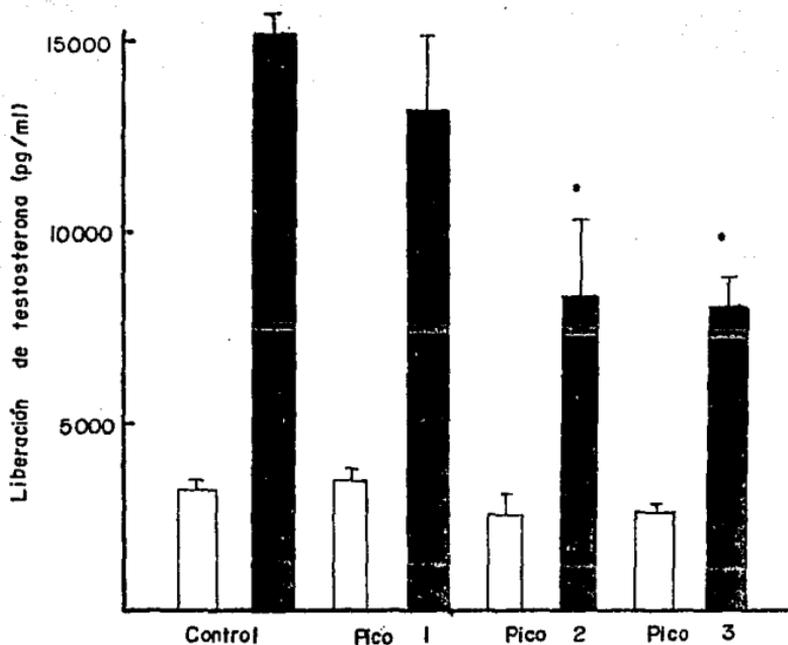


Figura 10.- Actividad biológica de las fracciones procesadas en la columna de heparina-sefarosa. Las barras claras muestran el grupo control ($\bar{x} \pm \text{D.S.M.}$) de las tres fracciones eluidas con solución amortiguadora 0.1, 0.6 y 2.0 M de NaCl en condiciones basales y las barras oscuras representan las mismas fracciones estimuladas con hCG.

* Diferente al grupo control estimulado con hCG ($P < 0.05$). Prueba de "t" de Student.

De igual manera la proteína eluida con solución amortiguadora de equilibrio Tris HCl/NaCl (0.1 M), no alteró la respuesta a hCG. En cambio la proteína eluida con una solución salina de 0.6 M (pico 2) redujo la respuesta a hCG en las células *in vitro* y un efecto similar se observó cuando las células se incubaron en presencia de hCG y una alícuota de la fracción eluida con alta fuerza iónica (pico 3).

El porcentaje de inhibición producido para cada muestra proteica con respecto al control que se consideró como 100% fue el siguiente: pico 1 (eluido a 0.1 M) 13.41%; pico 2 (eluido a 0.6 M) 45.69% y pico 3 (eluido a 2.0 M) 47.78% (Figura 11). Al calcular el efecto específico de las proteínas se observó que el pico 1 tuvo una actividad específica de 7 U/ng de proteína, el pico 2 de 81 U/ng y el tercer pico de 113 U/ng como se muestra en la figura 12.

Estos resultados indican que la fracción que eluye con mayor fuerza iónica de la columna de heparina - sefarosa es la que tiene mayor capacidad de inhibir la respuesta a la hCG.

La tabla 3 nos muestra de forma comparativo de los resultados obtenidos con los métodos utilizados para realizar la purificación del factor tímico. Se constata que la purificación aumentó en cada etapa del proceso siendo de 6 veces más la correspondiente al factor tímico de la fracción de Ultrogel, con respecto al homogenado; de 9 veces para el pico eluido con solución amortiguadora de fuerza iónica 0.1 M; 103 veces de purificación para el pico eluido con solución amortiguadora de fuerza iónica 0.6 M; y de 144 veces para el pico eluido con una fuerza iónica de 2.0 M.

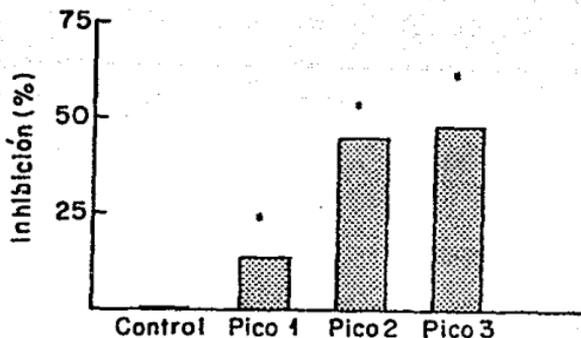


Figura 11.-Porcentaje de inhibición de la respuesta a la hCG en células de testículo producida por fracciones eluidas con soluciones amortiguadoras de fuerza iónica creciente (n=3).

* Diferente al grupo control estimulado con hCG
($P < 0.05$) Prueba de Ji-cuadrada.

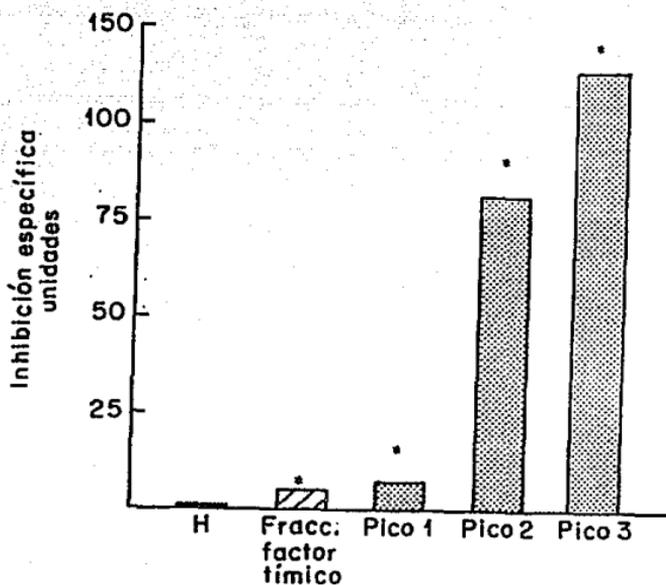


Figura 12.-Inhibición de las proteínas eluidas a diferentes concentraciones: 0.1 M, 0.6 M y 2.0 M, en la columna de afinidad heparina - sefarosa (barras punteadas), y de la fracción de Ultrogel que contiene el factor tímico (Fr). La inhibición específica se obtiene de la diferencia de testosterona de la fracción control y de la fracción entre la concentración de proteína de cada fracción.

* Diferentes al grupo control estimulado con hCG
($P < 0.05$) Prueba de Ji-cuadrada.

MUESTRA	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (µg/ml)	ACTIVIDAD INHIBITORIA ESPECIFICA (U/ng de prot.)	FACTOR DE PURIFICACION
Extracto acetónico	10	8000	0.781	—
Fracción de Ultrogel (Fr).	5	1430	5	6
Fracción 1 de heparina-sef.	3	317	7	9
Fracción 2 de heparina-sef.	4.6	85	81	103
Fracción 3 de heparina-sef.	5.65	64	113	144

Tabla 3.- Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en los distintos pasos de purificación de la proteína tímica llamada Factor Tímico (Fr), que modula la producción de testosterona en el testículo.

ANALISIS ELECTROFORETICO

El análisis electroforético del homogenado completo y de la fracción que contiene el factor tóxico (Fr), obtenida de la columna de filtración molecular en geles de poliacrilamida-DSS al 12% con y sin agentes reductores, permitió estudiar el patrón de las proteínas contenidas en estas fracciones.

En la figura 13 se muestra la migración electroforética de las proteínas contenidas en las fracciones eluidas de la columna de heparina-sefarosa a diferentes fuerzas iónicas, del factor tóxico de la columna de Ultrogel y del homogenado. Las muestras se aplicaron por duplicado; las señaladas como (B) fueron tratadas con DSS y 2-mercaptoetanol.

En el homogenado podemos observar que al tratar las muestras con mercaptoetanol las bandas se hicieron más nítidas en comparación al que no fue tratado con este agente reductor. En este carril que corresponde al señalado con la letra H, se observan múltiples bandas que corresponden a pesos moleculares entre los 20 y 35 Kd.

En los carriles 1A y 1B se muestra la fracción que eluye a 2.0 M de NaCl en la columna de heparina-sefarosa, y en el primer carril podemos observar que hay dos bandas definidas en un rango de 45 y 66 Kd, y que esta misma fracción con mercaptoetanol muestra una serie de bandas definidas y que entre ellas podemos resaltar que existe una proteína de peso molecular cercano a los 30 Kd; dos bandas se localizan aproximadamente a 18 kd y 24 kd, y otra más a 55 Kd.

En cuanto a la fracción que contiene la fracción obtenida de la columna de Ultrogel podemos observar que en ambos carriles (3A y 3B), se encuentran bandas bien definidas y que entre ellas tenemos una proteína que tiene un peso molecular aproximado de 30 Kd. Esta proteína se hace aún más visible en la fracción tratada con mercaptoetanol; además se observan múltiples bandas de peso molecular mayor a los 37 Kd.

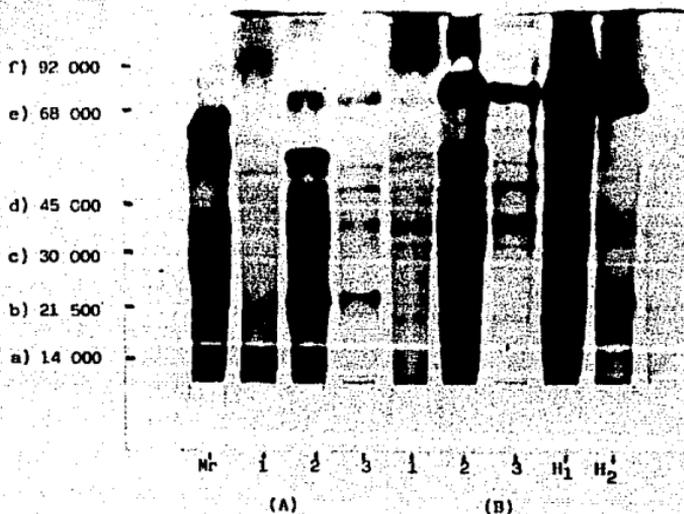


Figura 13.- Separación de proteínas estándar y fracciones preparadas en poliacrilamida SDS al 12% con y sin agentes reductores (mercaptoetanol). (M_r): Proteínas de peso molecular conocido (estándar bajo) a) lisosima; b) inhibidor de la tripsina; c) anhidrasa carbónica; d) ovalbúmina; e) suero albumina de bovino (BSA); y e) fosforilasa. Las fracciones (A) no fueron tratadas con mercaptoetanol, las señaladas (B) fueron tratadas con mercaptoetanol. Las fracciones corresponden a: 1) fracción eluida con 2.0 M de NaCl; 2) fracción eluida con 0.6 M (ambas en la columna de heparina-sefarosa). 3) factor tímico obtenido de la columna de filtración molecular H_2 , homogenado sin mercaptoetanol y H_2 , con mercaptoetanol.

DISCUSION DE RESULTADOS

Al realizar diferentes rastreos de la actividad del eluido de la columna de filtración molecular, se observó que todos ellos mostraban un comportamiento similar, y de esta manera se obtuvo un perfil tipo.

En los bioensayos realizados con las fracciones cromatográficas se observó que las fracciones tomadas como control para cada etapa de purificación no produjeron modificaciones en la secreción de testosterona, por lo tanto en los procesos experimentales posteriores, sólo se procedió a incluir una fracción control.

El efectuar bioensayos nos permitió comparar la actividad biológica entre las fracciones que se obtenían, y conocer el efecto fisiológico de cada una de ellas, en las diferentes etapas de purificación.

El primer paso en el proceso experimental fue la aplicación del extracto crudo a través de la columna de filtración molecular (Ultrogel ACA 54), obteniéndose una fracción que inhibe la liberación de testosterona con peso molecular de aproximadamente de 30 kd. El uso de este método nos permitió tener en cuenta que éste es un método efectivo y que el gel usado cuya composición es de 5% de acrilamida y 4% de agarosa, tiene un rango efectivo de separación de 5 000 - 70 000 daltons siendo estable en las condiciones que se llevaron a cabo en el laboratorio. Los datos de la electroforesis indican que con esta metodología se obtiene un enriquecimiento de las bandas que están alrededor de 30 000 daltones.

Procesando la fracción obtenida de la columna de filtración molecular por cromatografía de afinidad en la columna de heparina-sefarosa, se obtuvieron tres fracciones con diferente

concentración de proteínas, siendo la de mayor efecto inhibitorio la fracción eluida con mayor fuerza iónica (2.0 M), lo cual sugiere que la proteína que nos interesa presenta una alta afinidad por la heparina. Asimismo se logra un aumento en las unidades de actividad específica o inhibitoria de 6 (Pg de testosterona/ μ g de proteína probada) a 113 (Pg de testosterona/ μ g de proteína probada), esto significa un aumento de 18 veces en la actividad específica.

Comparando esta eficiencia en la purificación con la obtenida en la separación de inhibina, por ejemplo (Franchimont y col. 1975) puede considerarse aceptable. Con estos resultados podemos decir en cuanto al método usado (cromatografía de afinidad), que es eficaz ya que separa más finamente las moléculas, enriqueciendo y aumentando al mismo tiempo la actividad específica.

Con el aumento en la actividad específica y el factor de purificación (6 para la fracción obtenida por filtración molecular y 144 para el de heparina sefarosa), podemos decir que existen 3 sitios de afinidad 0.6 M, 1.0 M y 2.0 M de NaCl para el factor tímico. El primer sitio es de baja afinidad pero de alta capacidad, sin embargo el segundo y tercero es de alta afinidad pero de baja capacidad. La proteína que se une a la heparina con más alta afinidad es la de 2.0 M, y está fue la que presentó mayor actividad biológica y se obtuvo más pura. Esto lo podemos constatar en el gel de poliacrilamida-SDS bajo condiciones reductoras, en el que se observa una banda definida aproximadamente con un peso molecular de 30 kd una banda semejante se observa bajo condiciones normales sólo que se observa más difusa.

Con esto podemos decir que la proteína (Factor Tímico), se desplaza de manera adecuada en el gel; por lo tanto es eficiente para determinar cadenas polipeptídicas de acuerdo a sus pesos moleculares y que estos son determinados por comparación de su movilidad

electroforética sobre proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Asimismo que se logra una buena separación cuando la electroforesis se realiza en presencia de un agente reductor como el mercaptoetanol ya que este previene la formación de puentes intercatenarios en la separación electroforética y de ésta manera es posible la obtención de subunidades.

Por otro lado experimentalmente, si hay una afinidad entre el factor tímico y la heparina, no se descarta la posibilidad de que pase lo mismo en el medio extracelular, ya que el factor tímico se secreta en este medio y por lo tanto esto podría tener implicaciones en cuanto a la vida del factor tímico.

CONCLUSIONES

- 1.- Por cromatografía de filtración seguida de una cromatografía de afinidad, se ha logrado purificar parcialmente una proteína que inhibe la respuesta a la hCG en células de Leydig.
- 2.- La inhibición específica aumenta en las etapas de purificación siendo en la columna de afinidad de 113 (Pg de testosterona/ μ g de proteína), mientras que en el paso de cromatografía de filtración molecular es de 0.781 (pg de testosterona./ μ g de proteína).
- 3.- La fracción que inhibe el efecto de hCG en la célula de Leydig eluye de la columna de heparina-sefarosa, con una solución de alta fuerza iónica. Esto indica que el factor tímico presenta una alta afinidad por la heparina.
- 4.- El factor tímico que eluye a 2.0 M presenta mayor actividad biológica.
- 5.- La heparina suele ser una resina eficaz para esta purificación, ya que la calidad de la separación era la deseada, sin embargo la cantidad es muy escasa, ya que de un total de 85% de proteína inyectada solo un 10% de proteína se adsorbe.
- 6.- La electroforesis de poliacrilamida DSS al 12% con agentes reductores, da una mejor caracterización del factor tímico.

BIBLIOGRAFIA

AGUILERA G. and ROMANO M.C. 1989 Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells in vitro. J Endocrinol 123:367-373.

AHMED A, WONG D.M, THURMAN G.B, LOW T.L, GOLDSTEIN A.L, SHARKIS S.J, and GODSCHEINER J. 1979 Current status of thymosin. Ann N Y Acad Sci 332:81-94.

ALEKSANDROWICZ J, and SKOTNICKI A.B. 1976 The role of the thymus and thymic humoral factors in immunotherapy of aplastic and proliferative disease of the hematopoietic system. Acta Med Pol 17:1-5.

ASANUMA Y, GOLDSTEIN A.L. and WHITE A. 1970 Reduction in the incidence of wasting disease in neonatally thymectomized CBA/W mice by the injection of thymosin. Endocrinology 86:600-610.

BACH J.R.M, DARDENNE A.L, GOLDSTEIN A.G. and WHITE. 1971 Appearance of T-cell markers in bone marrow after incubation with purified thymosin a thymic hormone. Proc Natl Acad Sci USA 68:2734-2738.

BEDOLLA N.T, ULLOA A.A, LANDEROS J.V. Y PEREZ P.G. 1984. Análisis de datos de control de calidad en el radioinmunoanálisis I: Guía para la evaluación de resultados. Rev Invest Clin Mex 36:179-192.

BENADE LEONARD. 1982. Principles of radioimmunoassays and related Technique. En: Antibody as a Tool. Chapter 6.J.J. Marchalonis and G. W. Warr (eds) John Wiley & Sons Ltd. Bethesda USA pp 163-187.

BERNARDI G. and COMSA J. 1965. Purification de l' hormone thymique par chromatographie sur colonne. Experientia 21:416-417.

BESEDEVSKY H.O. and SORKIN E. 1974. Thymus involvement in sexual maturation. *Nature* 249:356-359.

BOCKMAN D.E. and KIRBY M.L. 1985. Neural crest interactions in the development of the immune system. *J. Immuno.* 135:765-768.

CALZOLARI A. 1898. Recherches experimentales sur un rapport probably between the function du thymus et celle des testicules aromatization in immature rats. *Endocrinology* 104:285-293.

CASTRO J.E. 1974. Immunological and anti tumour effects of orchidectomy. *J Immunological Method* 4:213-216

CASTRO J.E. 1974 a. Orchidectomy and the immune response I. Effect of orchidectomy on lymphoid tissue of mice. *Proc Roy Soc Lond* 185:425-436.

CASTRO J.E. 1974 b. Orchidectomy and the immune response II. Response of orchidectomized mice to antigens. *Proc Roy Soc Lond* 185:437-440.

CATT K.J, HARWOOD J.P, CLAYTON R.N, DAVIES T.T, CHAN V, DUFAU M.L. and KATIKIMENI. 1980. Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog Horm Res* 36:557-562.

COMSA and OZMINSKI K. 1973. Thymus replacement and HTH, the homeostatic thymic hormone. In: *Thymic hormones*. Luckey T. D. (ed) Baltimore University Park Press. pp. 16-20.

CROSS A.M, LEUCHARS E. and MILLER F.A.P. 1964. Studies on the recovery of the immune response in irradiated mice thymectomized in adult life *J Exptl Med* 119:837-850.

CHAN V.K, DAVIES T.F. and CATT K.J. 1981. Hormonal of testicular luteinizing hormone and prolactin receptors. *Endocrinology*. 108:1607-1612.

CHAMBARACH A, RESFIELD R and ZACACARI J. 1967. Electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Anal Biochem* 20:150-162.

CHIODI H. 1940. The relation between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology* 26:107-112.

DAVIES B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121:404-423.

DOUGHERTY T.F. 1952. Efectt of hormones on lymphatic tissue. *Physiol Rev* 32:379-401.

DUFAU M.L, CAROLE R.M. and KEVIN J. 1974. A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells *J Clin Endocrinol Metab* 39:610-613.

DUFAU M.L, CATT K.J. 1978. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in testis in ovary. *Vitamin Horm N Y* 36:461-600.

DUFAU M.L, WARREN D.W, KNOX G.F, LOUMAYE E, CASTELLON M and CATT K.J. 1984. Receptors and inhibitory actions of gonadotropin releasing hormone in the fetal Leydig cell. *J Biol Chem* 259:2896-2899.

FALCHETI R, BERGESI G, EISHFOF A, CAFIERO A.L, CAPRINO L. 1977. Purification and chemical characterization of thymosin and its composite peptides *Exp Clin Res*3:39-51.

FARJOUJI A. 1980. Purification of enzymes by heparin-sheparose affinity chromatography. *Chromatogr Rev* 135:335-343.

FAWCETT J.S. and MORRIS C.J. 1977. An introduction to gel chromatography. *En: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. E. Work (ed) North-Holland Corp. pp. 214-220.

- FISCHER L. 1977. An introduction to gel chromatography. En: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. E. Work (ed) North-Holland Publishing Comp. 1:1-37.
- FLODIN P. 1962. Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. J Chromatography. 5:103-115.
- FREIRE M, CRIVELLARD O, ISSACS C, MOSCHERA J and HORECKER B.L. 1978. Thymosin α Proc Natl Acad Sci USA 75:6007-6012.
- FUJII-HANAMOTO H, SEIKI K, SAKABE and OGAWA H. 1985. Progesterin receptor in the thymus of ovariectomized immature rats. J Endocrinol 107:223-229.
- GOLDSTEIN A.L, SLATER F.D, and WHITE A. 1966. Preparation assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (Thymosin). Proc Nat Acad Sci 56:1010-1017.
- GOLDSTEIN A.L, ASANUMA Y, BATTISTO J.R, HARDY M.A, QUINT J and WHITE A. 1970. Influence of thymosin on cell mediated and humoral immune response on normal and immunologically deficient mice. J Immunol 104:359-366.
- GOLDSTEIN A.L. 1972. Purification and biological activity of thymosin a hormone of the thymus gland. Proc Nat Acad Sci 69:1800-1803.
- GOLDSTEIN A, SLATER F.D. and WHITE A. 1975. Preparation assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor. Proc Nat Acad Sci 56:1010-1017.
- GOLDSTEIN A.L, LAW T, THURMAN G.B. and NAYLOR P.B. 1981. Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. Recent Prog Horm. Res 37:369-415.

GOSPODOROWICZ D. and CHANG J. 1984. Isolation of grain-fibroblast growth factor by heparin-sepharosa affinity chromatography. Identity with pituitary fibroblast growth factor. Proc Nat Acad Sci 81:6963-6967.

GREENSTEIN F.T.A, FITZPATRICK I.M, ADCOCK M.D, KENDALL and WHEELER M.J. 1986. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy inhibition of regeneration by testosterone. J Endocrinol 110:417-422.

GROSSMAN C.J. 1979. Rat thymic estrogen receptor I. Preparation, location and physicochemical properties. J Steroid Biochem 11:12-13.

GROSSMAN C.J, SHOLITON J.L. and HELMSWORTH A.J. 1983. Characteristics of the cytoplasmic and nuclear dihydrotestosterone receptors of human thymic tissue. Steroids 42:11-22.

GROSSMAN C.J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroid. Endocr Rev 5:435-455.

HAM A.W. 1975. Tratado de Histología. Sistema Linfoide. Cap. 13. 7a. edición Edit. Interamericana. México D.F. pp. 303-342.

HATTORI M. and BRANDON M.R. 1977. Infertility in rats induced by neonatal thymectomy. En: Immunological influence in human fertility Boettcher (ed), Academic Press, New York pp. 311-322.

HATTORI M. and BRANDON M.R. 1979. Thymus and the endocrine system ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. Endocrinol 3:101-111.

HIRIART M. and ROMANO. M.C. 1986. Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors inhibited by thymus factor. Life Sci 38:789-795.

HOOD L.E. WEISSMAN I.L, WOOD W.B. and WILSON J.H. 1984. Development of the immune system. En: Immunology. Cap. 5 The Benjamin Cummings Publishing Company 2a edición pp. 260-265.

HOOPER J.A. and GOLDSTEIN A.L. 1975. Purification and properties of bovine thymosin. Ann N Y Acad Sci 249:125-144.

ISTVAN KENESSE. 1984. Electrophoretic methods. En: Methods of protein analysis. Cap. 3 Ellis Horwood Limited pp 87-100.

JACOBI W.B. 1971. Methods in enzymology. Ed. Jacobi W.B. Academic Press N Y 22:19-28.

KATCHALSKI E-KATZIR. 1981. Some general considerations of the recognition by and of proteins. En: Affinity chromatography and biological recognition Ed. Chaiken I.M. Acad Press Inc pp. 6-25.

KLEIN J.J, GOLDSTEIN A.L. and WHITE A. 1965. Enhancement of *in vivo* incorporation of labeled precursors in DNA and total protein of mouse lymph nodes after administration of thymic extracts. Proc Natl Acad Sci USA 53:812-817.

LAW L.W. and AGNEW H.D. 1985. Effect of thymic extracts on restoration of immunological competence in thymectomized mice. Proc Soc Exptl Biol Med 127:953-956.

LINTER MOORE S. 1975. Ovarian development in athymic nude mice I. The size and composition of the follicle population. 4:385-390.

LINTER MOORE S. 1975(a). Ovarian development in athymic nude mice II. The growth of oocyte and follicle. Mechanism of ageing and development. 4:391-398.

LOW T.L., THURMAN G.B., Mc ADDO M., CLURE J.E., ROSSIO J., GOLDSTEIN A.L. and NAYLOR P.H. 1979. The chemistry and biology of thymosin II. Amino acid sequence analysis of thymosin I and polypeptide. J Biol Chem 254:987-998.

LOWE C.R. 1977. Affinity chromatography: The current status J Biochemistry. 8:177-181.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.

LUCKEY T.D., ROBEY W.G. and CAMPBELL B.J. 1973. Factor Tímico homeostático (FTH) en: Thymic hormones. Luckey T.D. (ed) University Park Press. Baltimore pp. 167-183.

MANDEL T. 1970. Ultrastructure of epithelial cells in the medulla of the guinea pig thymus. Aust J Exp Biol Med Sci 46:755.

MARTIN D and ROMANO M.C. 1993. Effect of thymic conditioned medium on testosterone secretion by rat testicular cells *in vitro*. Life Sci Advances (in press).

MENDOZA E. and ROMANO M.C. 1985. A thymus fraction modulates the response of pituitary cells to LH - releasing hormone. 67 Th Annual Meeting of the endocrine society.

MENDOZA E. and ROMANO M.C. 1989. Prepubertal rat thymus secretes a factor which modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. Thymus 14(4): 233-242.

METCALF D. 1959. Long term effects of whole body irradiation on lymphocyte homeostasis in the mouse. Radiation Res 10:313- 332.

METCALF D. 1964. The thymus and lymphopoiesis. In: the thymus in immunobiology by R.A. Good and A.E. Gabrielsen (eds) New York Hoeber Harper pp.150-179.

MICHEL S.D. 1983. Interactions of the thymus and the ovary. In: factors regulating ovarian function Greenwald G.S. and Terranova P.F. (eds) N Y Raven press. pp.453-456.

MILLER J.F.A.P. 1962. Role of the thymus in transplantation immunity. Ann N Y Acad Sci 99:340-354.

MILLER J.F.A.P. 1965. A humoral thymus mechanism responsible for immunological maturation. Ann N Y Acad Sci 124:95-104.

MORRIS C.J. and MORRIS B. 1963. Separation methods in biochemistry, 2nd (ed) Pitman & Sons, London. pp. 271-310.

MORGAN D.D. and GROSSMAN CH.J. 1985. Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. Thymus 7:279-286.

MULDER F, FOEKENS A, PETERS M.J and VENDERMOLEN H.J. 1979. A comparison of heparin agarose and DNA cellulose for characterization and partial purification of androgen receptors from rat prostate. FEBS Lett 97:260-264.

MURRAY R.G and WOODS P.A. 1967. Studies on the fetus of lymphocytes III. The migration and metamorphosis of *in vivo* labelled thymic lymphocytes. Anat Record 150:113-125.

NABARRA B. and ANDRIANARISON I. 1987. Ultrastructural studies of thymic reticulum I. Epithelial component. Thymus 9:95-121.

NISHIZUKA Y. and SAKAKURA T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice . Science 166:753-755.

NISHIZUKA Y. and SAKAKURA T. 1971. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. Endocrinology 89:886-893.

NISHIZUKA Y and SAKAKURA T. 1971 (a). Effect of combined removal of the thymus and pituitary on postnatal ovarian follicular development in the mouse . Endocrinology 89:902-903.

NISHIZUKA Y, SAKAKURA T, TANAKA Y and KOJIMA A. 1973. Steroid biosynthesis *in vitro* by dysgenetic ovaries induced by neonatal thymectomy in mice. Endocrinology 93:786-792.

DATES K and GOLDSTEIN A. 1984. Thymosins, hormones of the thymus gland. Elsevier Science Publishers B. V. (eds) Amsterdam. Tratado Pharmacol Sci 347-350.

OSBORN AND WEBER T. 1972. Interaction of proteins and SDS. En: Methods in enzymology. C.H.W. Hirs and S.N. Timashe (eds) Acad. Press. N Y 26:6-11.

PARROT D.M.V, DeSOUSA M.A.B, and EAST J. 1966. Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. J Exp Med 123:171-205.

PEARCE P, KHALIS B. A. K. and FUNDE J.W. 1981. Androgens and the thymus. Endocrinology 109:1073-1077.

PEACOCK A.C. and DINGMAN C.W. 1986. Electrophoresis. Interaction of proteins and SDS. Biochemistry 7:668-682.

PEDERNERA E. DIAZ D.E. and CALCAGNO M. 1986. A thymus factor influence the in vitro testosterone secretion of Leydig cells in the rat. Life Sci 38:779-787.

PITT R.R. and IMPIOMBATO F.S.A. 1968. Interaction of proteins whit proteins. Biochem J 109:825-829..

PORRAS V.G.M. 1988. Purificación parcial de una protefna del timo, que modula la liberación de testosterona en el testículo de rata. (Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias, CINVESTAV-IPN.) 86 pp.

REBAR R.W, MORANDINI I.C, BENIRSCHKE K, PETZE J.E. 1980. Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. Endocrinology 107(6):2130-2132.

REBAR R.W, MORANDINI I.C, ERICKSON G.F. and PETZE J.E. 1981. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice. Diminished gonadotropin secretion in prepubertal females. Endocrinology 108:120-126.

REBAR R W., MORANDINI I.C. ERICKSON G.F. and PETZE J.E. 1982. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice. Reduced gonadotropins and testosterone in males. Biol of Reprod 27:1267-1276.

REMINGTON D.R. and SCHORK A.M. 1970. Statics with applications to the biological and health sciences. Prentice-Hall Inc, 1137 pp.

REYES- ESPARZA, J.A. and ROMANO M.C. 1989. An age - dependent thymic scretion modulates testicular function. J Steroid biochem 34:541-545.

ROITT I.M. 1993. The immune response I. En: Essential Immunology Butler and Tanner Ltd. 4a. edición pp. 51-86.

SAKABE K, SEIKI K. and FUJII-HANAMOTT H. 1986. histochemical localization of progesterin receptor cells in the rat thymus. Thymus 8:97-107.

SAKAKURA T. and NISHIZUKA Y. 1971. Thymic control mechanisms in ovarian development: reconstitution of ovarian dysgenesis in the thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissue. Endocrinology 90:431-437.

SAMMONS D.W. ADAMS L.D. and NISHIZAWA E.E. 1981. Molecular weight determinations on SDS gels. Electrophoresis Biochemic 2:135-141.

SCREPANTI I, GULINO A. and PASQUALINI J.R. 1982. The fetal thymus of guinea pig as an estrogen target organ. Endocrinology 111:1552-1561.

SCREPANTI I, GULINO A. and PASQUALINI J.R. 1983. Estrogen and antiestrogen effects on different lymphoid cell populations the developing fetal thymus of guinea pig. Endocrinology 113: 1754-1762.

SHAPIRO A.L. VINUELA E. and MAIZEL J.V. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. Biochem Biophys Res Commun 28:815-829.

SHIRE J.G.M. and PANTELIDOURIS E.M. 1974. Comparison of endocrine function in normal and genetically athymic mice. J Comp Biochem Physiol 47A: 93-100.

STANLEY L. R. 1975. Patología estructural y funcional. Edit. Interamericana, México 1515 pp.

STIMPSON W.H. and CRILLY P.J. 1981. Effects of steroids on the secretion of immunoregulatory factors by thymic epithelial cell cultures. *Immunology* 44:401-407.

SULLIVAN D.A. and WIRA CH. R. 1979. Sex hormone and glucocorticoid receptors in the bursa of fabricius of immature chicks. *J Immunol* 122: 2617-2623.

TAGUCHI O, NISHIZUKA Y. SAKAKURA T. and KOJIMA A. 1981. Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin Exp Immunol* 40:540-553.

TRAININ N. 1974 Thymic. hormones and the immune response. *Physiol Rev* 54:272-315.

TRAININ N. BURGER M. and KAYE A. 1967. Some characteristics of a thymic humoral factor determined by assay in vivo of DNA synthesis in lymph nodes of thymectomized mice. *Biochem Pharmacol* 16:711-719.

TUNG J.S. and KNIGHT C.A. 1971. Effects of charge on the determination of molecular weight of protein by gel electrophoresis in SDS. *Biochem Biophys Res Commun* 42:117-126.

WAYNE W: DANIEL: 1979. *Biostatística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* Edit. Limusa 485 pp.

WEBER K. PRINGLE R.J. and OSBORN M. 1972. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS acrilamide gel. *Methods in enzymology.* 26:3-27.

WEBER K. and OSBORN M. 1975. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *En: The proteins.* Neurath H and Hill R (eds) Acad Press 1:170-214.

WEISSMAN I.L. 1967. Thymus cell migration. J Exp Med 126:291-304.

YEE J. B. and HUTSON J. C. 1985. Effects of testicular macrophage conditioned medium on testosterone production by Leydig cells. Biol of Reprod Suppl 45 Abstract 32:291-303.

YUNIS E.J, MARTINEZ C. and GOOD R.A. 1964. Failure to reconstitute neonatally thymectomized mice by "successful" rat thymus transplantation. Nature 204:664-666.

ZISBLATT M. and GOLDSTEIN A.L. 1970. Acceleration by thymosin of the development of resistance to murine sarcoma virus induced tumors in mice. Proc Nat Acad Sci USA 66:1170-1174.