



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

11
1995
17B
02

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMECTOMÍA
REALIZADA EN LA ETAPA INFANTIL SOBRE EL
PROCESO DE PUBERTAD Y LA OVULACIÓN
EN EL RATÓN**

T E S I S

Que para obtener el título de

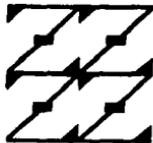
B I Ó L O G O

presenta

LORENA GARCÍA MEZA

Directora de tesis: Dra Patricia Rosas Saucedo

MÉXICO, D.F.



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

FALLA DE ORIGEN

1995



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMECTOMÍA REALIZADA EN LA
ETAPA INFANTIL SOBRE EL PROCESO DE PUBERTAD Y LA
OVULACIÓN EN EL RATÓN**

Tesis presentada por: Lorena García Meza

Directora de tesis: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Realizada en: Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del "Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación" de la Secretaría General de la UNAM y la DGAPA clave IN212394, UNAM.

A mis padres Juana e Isaías

Por inculcar en mí el deseo de la superación, por su amor, apoyo y confianza en todo momento.

A mis hermanos Nora, Edú, Janet y Overath

Por el amor que nos une

A mi tía Gloria

Por su ayuda invaluable

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por su apoyo constante, su asesoría y amistad.

Al Dr. Roberto Domínguez Casala por el interés mostrado y sus sugerencias tan acertadas.

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo
M. C. Raúl Zavala Chavero
Dra. María Elena Ayala Escobar
M. en I.B.S.H. Leticia Morales Ledesma
M. en I.B.S.H. José Luis Morán Perales

Por su cooperación en la revisión de esta tesis y sus sugerencias tan valiosas.

A mis hermanas **Nora y Janet** por ser mis amigas y por todas las rabietas que les he hecho pasar.

A susy, porque aún cuando la distancia y el tiempo nos separe, siempre recordaré los bellos momentos que pasamos juntas.

A Juanita, por su amistad y por todo lo que hemos compartido.

A caro, por su ayuda y amistad.

A todos mis familiares que de alguna manera ayudaron a la obtención de esta meta, a mi tía Gloria, a la familia Vargas Flores y a la familia Báez Miranda.

A cada uno de mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

A Ma. Luisa Illescas por su cooperación técnica y a todo el personal del Bioterio de la FES Zaragoza por su contribución en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
I. Pubertad	4
II. Desarrollo folicular y ovulación	10
III. Características morfofuncionales del timo	13
IV. Vinculación del timo con la función reproductora	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	28
I. Efectos de la timectomía realizada a los 10 días de edad, sobre la pubertad y la ovulación espontáneas	29
II. Efectos de la timectomía realizada a los 10 días de edad, sobre la pubertad y la ovulación inducidas por la administración de gonadotropinas	31
III. Efectos de la timectomía sobre el crecimiento folicular	36
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

Se ha mostrado que la timectomía realizada únicamente en la etapa neonatal desencadena una respuesta autoinmune que altera el desarrollo folicular, lo cual se traduce en modificaciones en la maduración sexual y disgénesis ovárica. Por otra parte, se ha descrito que los péptidos sintetizados por el timo tienen efectos sobre la secreción de las hormonas involucradas con el desarrollo del ovario. Con el fin de analizar el papel que juega la fase endócrina del timo independientemente de la inmune, en el proceso de pubertad, se estudiaron los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre la regulación de la pubertad, la ovulación y el crecimiento folicular. Se utilizaron ratones hembra timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), sometidos a una operación simulada (OS) e intactas (TA). Animales TA y Tx-10 se trataron con 5 ó 1 u.i. de gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG) a los 25 días de edad. Otros grupos de TA y Tx-10 se les trató en forma secuencial con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y 54 h después 3 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG). Todos los animales que recibieron tratamiento hormonal, se sacrificaron 72 h después de la PMSG y los demás grupos, el día del primer estro vaginal. A la autopsia se diseccionaron los ovarios, el útero y el timo. En los oviductos se contó el número de ovocitos. Se analizó la distribución de la población folicular en los ovarios de cada grupo experimental.

La operación simulada no modificó los parámetros evaluados, respecto al grupo TA. Los animales con Tx-10, en comparación con los intactos, presentaron retardo en la edad de la apertura vaginal (33.9 ± 0.9 vs 29.6 ± 0.2 días, $p < 0.05$) y ovarios de menor peso (8.7 ± 0.7 vs 10.9 ± 0.5 mg, $p < 0.05$). En las hembras TA y Tx-10, la administración de 5 u.i. de PMSG indujo la apertura vaginal a las 48 h postratamiento. La tasa ovulatoria, el número de ovocitos liberados y el peso de los ovarios fue similar entre ambos grupos, mientras que el peso del útero fue menor en los animales Tx-10 (62.1 ± 3.3 vs 81.6 ± 4.1 mg, $p < 0.05$).

La administración de 1 u.i de PMSG a los animales TA y Tx-10 provocó el adelanto en la edad de la apertura vaginal, pero no indujo la ovulación. El peso de los ovarios fue similar en ambos tipos de animales y el peso del útero fue menor en los Tx-10 (77.6 ± 5.5 vs 100.7 ± 8.1 mg, $p < 0.05$).

El tratamiento secuencial con PMSG y hCG indujo la ovulación en los grupos TA y Tx-10, pero el número de ovocitos liberados fue menor en los Tx-10 (6.1 ± 0.7 vs 10.9 ± 1.1 , $p < 0.05$). El peso de los ovarios del grupo TA con PMSG-hCG se incrementó respecto a los que sólo recibieron PMSG (12.6 ± 0.8 vs 9.5 ± 0.8 mg, $p < 0.05$), efecto que no se observó en los Tx-10. El peso del útero fue menor en los Tx-10 al adicionar hCG (58.8 ± 6.4 vs 77.6 ± 5.5 mg, $p < 0.05$).

En los animales Tx-10 el número total de folículos fue menor comparado con el TA (140.3 ± 27.4 vs 228.5 ± 19.8 , $p < 0.05$), presentándose una disminución significativa en los de 101-200 μ m de diámetro (77.0 ± 16.9 vs 143.3 ± 12.6 , $p < 0.05$). En el TA la administración de 5 u.i. de PMSG no modificó el número total de folículos, mientras que en el Tx-10 lo incrementó (236.1 ± 18.1 vs 140.3 ± 27.4 , $p < 0.05$). Con este tratamiento hormonal, el número de folículos sanos respecto al de atrésicos aumentó en los animales TA (152.3 ± 16.9 vs 57.8 ± 7.7 , $p < 0.05$), pero no así en los Tx-10. El tratamiento con 1 u.i. de PMSG en el grupo Tx-10 indujo un efecto similar al observado con 5 u.i. de esta hormona, incrementando el número total de folículos (236.8 ± 32.2 vs 140.3 ± 27.4 , $p < 0.05$), sin embargo el número de folículos sanos respecto al de atrésicos, fue similar tanto en los TA como en los Tx-10.

Estos resultados permiten concluir que la falta del timo desde los 10 días de edad, retrasa el inicio de la pubertad y altera el crecimiento folicular. Además provoca una disminución en la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.

El ratón timentomizado a los 10 días de edad resulta ser un buen modelo experimental para continuar con el estudio de la participación del timo en el desarrollo del ovario del animal prepúber por una vía endocrina independiente de la inmunológica.

INTRODUCCIÓN

Los primeros estudios en los que se evidenció una vinculación entre el timo y las gónadas fueron los realizados por Calzolari en 1898, quien observó en conejos, que el timo presentaba hipertrofia al castrar a los animales. Pasaron varias décadas antes de que se sugiriera la existencia de una relación funcional entre el timo y el sistema reproductor. Nishizuka y Sakakura en 1969, utilizando como modelo de estudio al ratón timectomizado en la etapa neonatal, sugieren que el timo además de ser el responsable de la respuesta inmune mediada por células, está involucrado con la función reproductora de la hembra.

Recientemente se ha descrito que en los ratones timectomizados durante los tres primeros días de vida posnatal (Tx-3) se desencadena una respuesta autoinmune sobre los folículos ováricos. La infertilidad que caracteriza al ratón adulto con timectomía neonatal es el resultado de la pérdida progresiva del compartimiento folicular (disgénesis ovárica), efecto que no se presenta cuando se timectomiza después del día siete de edad.

Actualmente el modelo Tx-3 es utilizado para estudiar los mecanismos que asocian al timo con la disgénesis ovárica autoinmune y la subsecuente formación de tumores.

Por otra parte se ha descrito que algunos de los péptidos sintetizados por el timo actúan sobre la secreción de las gonadotropinas. Dicha función endócrina del timo permite pensar que la extirpación de este órgano en una edad crítica del desarrollo posnatal puede tener efectos sobre el crecimiento del ovario y la maduración sexual.

Debido a lo anterior en este trabajo se estudiaron los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre el proceso de pubertad y la ovulación, utilizando como modelo al ratón timectomizado a los 10 días de edad (Tx-10).

MARCO TEÓRICO

1. Pubertad

La pubertad es el resultado de una serie de cambios neuroendócrinos que se suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, los cuales culminan con el inicio de la función reproductora, de ahí que se le defina como la etapa biológica del individuo que indica el paso de la inmadurez a la madurez sexual. (Ramírez, 1973; Ramaley, 1980; Ojeda y col, 1983; Ojeda y col, 1986).

El inicio de la pubertad está determinado genéticamente para cada especie, sin embargo algunos factores ambientales como el fotoperiodo y la temperatura, así como los estímulos sociales, pueden modificar el comienzo de este proceso (Reiter, 1980; Vandenberg, 1983).

En la hembra de los roedores se considera que la pubertad ha iniciado cuando se presenta en forma espontánea la canalización vaginal (Ramírez y McCann, 1963). En el ratón, ésta ocurre entre los 30 y 35 días de edad y en la rata entre los 35 y 45 días (Ramírez, 1973; Ojeda y col, 1986).

Ojeda y col. (1986) han clasificado el desarrollo posnatal de la rata hembra en cuatro diferentes fases, considerando parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas [Figura 1]. Algunos de los cuales se describen a continuación.

1) Fase neonatal.

Se inicia desde el nacimiento y termina el día 7 de vida posnatal. Esta etapa se caracteriza porque el ovario es relativamente insensible a las gonadotropinas debido a que los folículos no presentan receptores a estas hormonas, hasta los cuatro o cinco días de edad (Smith-White y Ojeda, 1981).

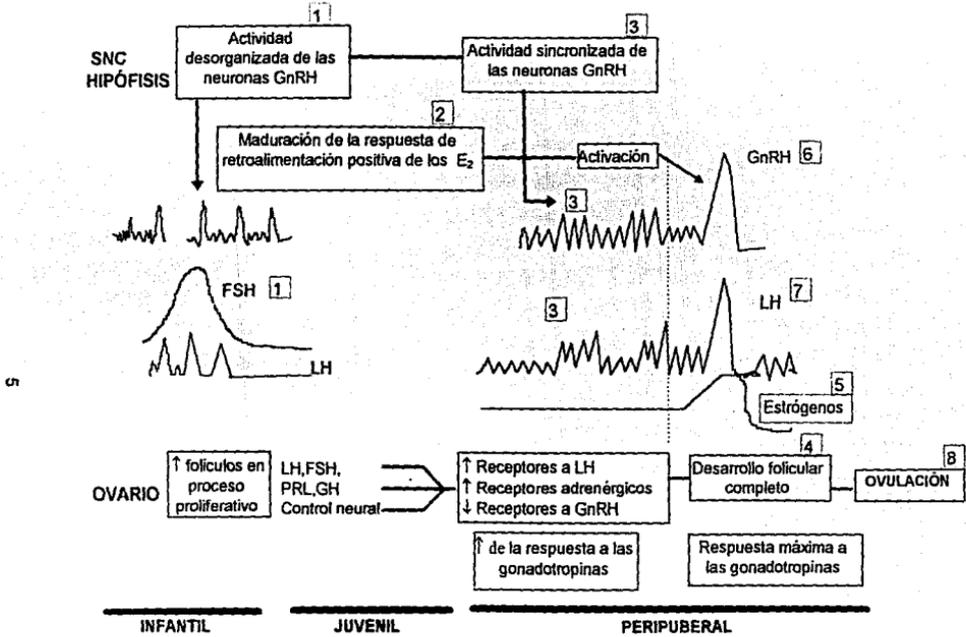


Figura 1. Secuencia de eventos que se suceden en el Sistema Nervioso Central (SNC), la hipófisis y el ovario previos al pico preovulatorio de las gonadotropinas en la ratona hembra. Los números indican la secuencia en la cual se producen estos eventos. La línea discontinua representa las 12:00 h del primer proestro. GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona estimulante del folículo, PRL: prolactina, GH: hormona de crecimiento (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Se presentan altas concentraciones de alfa fetoproteína en plasma, misma que se une a los estrógenos provocando su inactivación. Debido a esto, el mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos sobre el hipotálamo y la hipófisis no es funcional (Raynaud, 1973; Frawley y Henricks, 1979; Ojeda y col, 1983, 1986; Ojeda y Urbanski, 1988). La concentración sérica de la hormona estimulante del foliculo (FSH) empieza a aumentar, mientras que la concentración de la hormona luteinizante (LH) se mantiene baja (Döhler y Whuttke, 1974).

A partir de los cuatro días de edad, las células de la granulosa y presentan receptores a la FSH y el número de éstos aumenta hasta el día 16, lo cual induce el incremento en la actividad del complejo enzimático aromatasa que permite la síntesis de estrógenos a partir de la testosterona (Ojeda y col, 1986; Ojeda y Urbanski, 1988).

Durante esta fase se inicia el proceso de foliculogénesis. En el ovario de animales de 2 días de edad se han observado folículos primordiales (Peters, 1978, Ojeda y Urbanski, 1994), mientras que para el día 4 de vida ya se encuentran folículos en desarrollo (primarios) (Peters, 1979).

2) Fase infantil.

Se extiende del día 8 al 21 de edad. La fase infantil se caracteriza por presentar un incremento en la concentración de FSH en plasma que alcanza su máximo entre los 12 y 15 días de edad, después disminuye significativamente. Se presentan picos esporádicos de LH (Döhler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col, 1976; Goldman, 1981; Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1988).

El pico de FSH que se observa en esta fase es fundamental para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad (Hage y col, 1978; Ojeda y col, 1980).

La respuesta hipofisaria a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es alta en la fase infantil (día 15), que se refleja en una mayor secreción de gonadotropinas. Durante este tiempo de maduración hipotalámica, la GnRH presenta descargas poco frecuentes, mismas que mantienen elevadas las concentraciones de la FSH y pulsos esporádicos de LH. El incremento en la frecuencia de los pulsos de GnRH y la sincronización de éstos (días 12-15), disminuye las concentraciones de la FSH (Ojeda y col, 1986).

El patrón de secreción de las gonadotropinas (FSH y LH) que caracteriza a la fase infantil es diferente. La FSH se secreta de forma tónica y la LH sigue un patrón de secreción pulsátil (Ojeda y col, 1986).

La concentración plasmática de la alfa fetoproteína disminuye para el día 16 y por ende la concentración de estrógenos libres empiezan a aumentar (Frawley y Henricks,1979). Se asume que en esta etapa, los esteroides juegan un papel definitivo en la maduración neural.

Durante la segunda semana de vida posnatal una gran número de folículos pequeños continúan su desarrollo bajo un fuerte control gonadotrópico que les permite entrar en estados de desarrollo más avanzados (Hage y col, 1978; Peters, 1979). Entre los días 14 y 21 de edad, se encuentran folículos pequeños, medianos y grandes, estos últimos ya poseen antro pero aún no hay folículos preovulatorios (Peters, 1969).

3) Fase juvenil o prepuberal.

Abarca desde el día 22 y termina alrededor de los 30 días de edad. En esta etapa se establece definitivamente la relación funcional entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, debido a que el mecanismo de retroalimentación negativa de los estrógenos se manifiesta regulando la

secreción tónica de las gonadotropinas (Andrews y col, 1981a,1981b). Los estrógenos continúan aumentando ya que la alfa fetoproteína disminuye aún más que en la fase infantil (Ojeda y col, 1986).

La concentración de la FSH ha disminuido significativamente en relación a la fase infantil. Al final de esta etapa, la concentración basal de LH comienza a incrementarse (Meijs-Roelofs y col, 1983) y el aumento de la amplitud de los pulsos vespertinos de esta hormona se hacen evidentes, estableciéndose el ritmo de secreción circadiano (Urbanski y Ojeda, 1985).

En el ovario la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH) facilitan los efectos de las gonadotropinas. La PRL estimula la formación y mantenimiento de los receptores a la LH en las células de la granulosa (Goldman, 1981; Richards y col, 1976; Advys y col, 1981 ; Ojeda y col, 1980) y la GH facilita la capacidad de la FSH para inducir la expresión de los receptores a la LH (Jia y col. 1985).

En el ovario se observa un aumento en el número de receptores a la LH y una disminución en los de la GnRH haciéndose más evidente durante los días que preceden al pico preovulatorio de las gonadotropinas(Ojeda y col, 1986).

En esta fase se presentan ondas de desarrollo folicular y de atresia, procesos que al parecer están bajo influencias hormonales y neurales que son reguladas por el Sistema Nervioso Central (SNC) (Ojeda y col, 1986). En la fase juvenil aún no se encuentran folículos preovulatorios (Peters, 1969).

4) Fase peripuberal.

Su duración es variable y está asociada con la primera ovulación. El número de receptores a la FSH y LH en el ovario llegan a un máximo, lo que

se refleja en una máxima esteroidogénesis. Por lo tanto las concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol aumentan (Ojeda y Urbanski, 1988).

Las concentraciones séricas de la PRL, la GH y de los estrógenos son mayores en esta fase comparadas con las de la fase juvenil, debido a que continúan aumentando. Al final del desarrollo juvenil y al inicio del peripuberal se genera el patrón diurno de liberación de la LH que se caracteriza por picos de secreción de mayor amplitud en la tarde. Bajo este ambiente hormonal, los folículos destinados a ovular en la pubertad, entran en la etapa final de maduración (Ojeda y col, 1983; Urbanski y Ojeda, 1985,1986; Ojeda y Urbanski, 1988).

La cascada de eventos que culminan con la pubertad es compleja y para su estudio se ha dividido en diferentes fases (Advis y col, 1979; Ojeda y col, 1986).

a) Anestro: Aquí se producen los cambios diurnos en la liberación de la LH (Urbanski y Ojeda, 1985); el útero no presenta líquido en su luz y su peso es bajo; en el ovario se observan folículos grandes y la vagina se encuentra cerrada.

b) Proestro temprano: La vagina aún permanece cerrada. El peso del útero aumenta debido a la presencia de líquido uterino.

c) Proestro tardío: Corresponde al día del primer proestro; el peso y la acumulación de líquido en el útero alcanzan su máximo; en los ovarios se observan folículos preovulatorios, la vagina generalmente está cerrada, el frotis vaginal se caracteriza por presentar un gran número de células epiteliales nucleadas. En el ovario el número de receptores a la FSH es máximo y aumentan los de la LH, mientras que los de la GnRH disminuyen entre el anestro y el proestro (Smith-White y Ojeda, 1983) lo que provoca un aumento de la esteroidogénesis. Las concentraciones de estradiol y progesterona en el

plasma alcanzan una magnitud y duración suficientes para estimular la aparición del primer pico preovulatorio de las gonadotropinas y como consecuencia ocurre la primera ovulación.

d) Estro: En este día se presenta la primera ovulación, el peso del útero es bajo y no presenta líquido en su luz, en el ovario se observan cuerpos lúteos recién formados; la vagina está abierta y el epitelio descamado se caracteriza por el predominio de células cornificadas o escamadas que no presentan núcleo.

II. Desarrollo folicular y ovulación.

Los ovarios son los órganos primarios del sistema reproductor de la hembra, en ellos se lleva a cabo la producción de gametos y la síntesis y liberación de hormonas esteroideas (Ross y col., 1992).

El ovario está constituido por los siguientes compartimientos [Figura 2]:

- 1) El folicular, formado por folículos en todas las etapas de desarrollo, desde primordiales hasta preovulatorios.
- 2) El luteal o cuerpo lúteo, que se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que han liberado al ovocito.
- 3) El intersticial o glándula intersticial, que está formado por células con actividad secretora, llamadas células intersticiales primarias en el ovario fetal y por las células de la teca interna de los folículos antrales atrésicos o células intersticiales secundarias (Harrison y Weir, 1977).

El folículo está formado por el ovocito I, las células de la granulosa, la membrana basal y las células de la teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras de colágena, células de tejido conectivo, sustancia

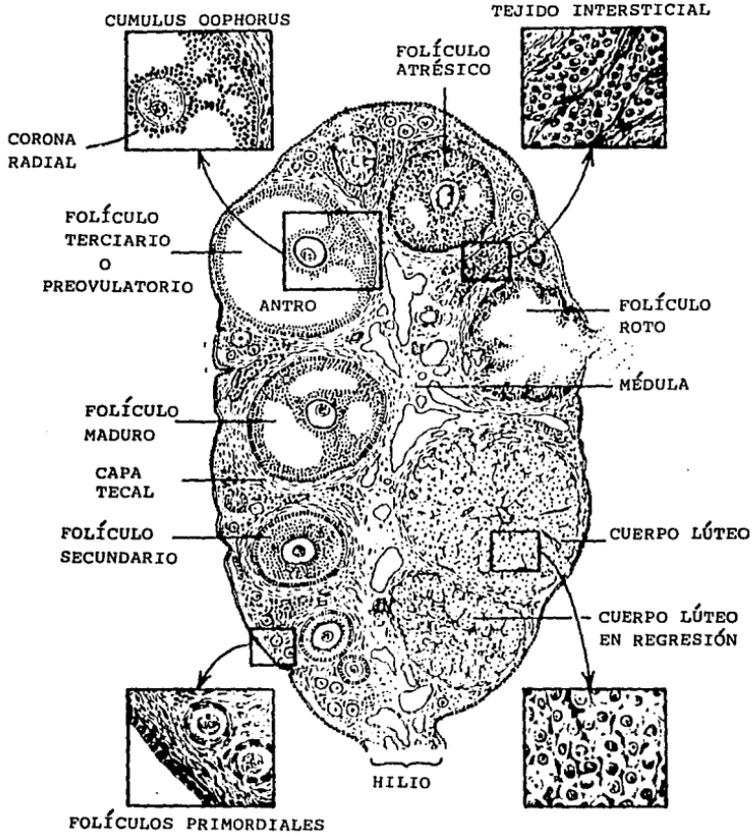


Figura 2. Esquema que muestra los diferentes compartimentos del ovario: el folicular, el luteal y el intersticial (Tomado de Freeman, 1994).

fundamental y fibras musculares lisas, todo ello recibe el nombre de teca externa. Todos estos elementos forman una vaina fibrosa, la que al disgregarse en un punto cercano a la superficie del ovario, forma un orificio por el cual saldrá el ovocito. El ovocito y las células de la granulosa no reciben riego sanguíneo ni inervación en forma directa (Domínguez y col, 1991).

Se conoce poco sobre la señal que promueve el inicio del crecimiento de los folículos primordiales, pero una vez que éste comienza, continúa hasta que los folículos ovulan o van a la atresia. El primer signo del crecimiento folicular es el aumento de tamaño del ovocito, seguido por la proliferación de las células de la granulosa (Domínguez y col, 1991). En las células de la teca interna la LH estimula la síntesis de andrógenos, mientras que en las células de la granulosa la FSH incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasas, lo que provoca un aumento en la síntesis y secreción de los estrógenos. Conforme el folículo madura, las células de la granulosa adquieren receptores a la LH por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos. El incremento en las concentraciones séricas de los estrógenos sensibilizan a la hipófisis provocando el primer pico preovulatorio de las gonadotropinas y por ende la ovulación (Richards, 1978; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La ovulación es un proceso que culmina con la expulsión del ovocito maduro (tipo II, en el que ha ocurrido la fase reduccional de la meiosis) (Franchimont y col, 1991; Domínguez y col, 1991). En este proceso se llevan a cabo diversos eventos regulados por señales neuroendócrinas en los que participan el SNC, la hipófisis y el ovario.

La ovulación ocurre entre 8 y 10 horas después del pico preovulatorio de la LH. Durante este lapso se suceden algunos eventos en el folículo tales como:

- a) Activación de enzimas proteolíticas por acción de la LH.
- b) Cambios en la densidad e interconexión celular en el *cumulus oophorus* y corona radial.
- c) Reinicio de la meiosis.
- d) El comienzo de la luteinización de las células de la granulosa.
- e) Incremento de la presión osmótica por el aumento en el fluido folicular.
- f) Reducción de los componentes que participan en la síntesis de tejido conectivo.

Todo lo anterior provoca la degradación de la colágena del tejido conectivo que mantienen unidas a las células de la granulosa, que conlleva a la ruptura de la pared del folículo y liberación del ovocito (Fink, 1986; Franchimont y col, 1991).

III. Características morfofuncionales del timo.

El timo es un órgano linfoepitelial primario que forma parte del sistema hematopoyético y es el responsable de la respuesta inmunológica mediada por células, ya que en él se lleva a cabo la diferenciación y maduración de los linfocitos inmunocompetentes o linfocitos T (Dabrowski y Drabrowska-Bernstein, 1990; Roitt y col, 1993).

En los mamíferos, el timo se encuentra ubicado en el tórax justo por debajo de la parte superior del esternón, su forma es triangular con la base apoyada en el pericardio y el ápice dirigido hacia el cuello. Está por delante de las venas tiroideas inferiores, la tráquea y los grandes vasos incluyendo el cayado aórtico (Ham, 1975; Lindner, 1990) [Figura 3].

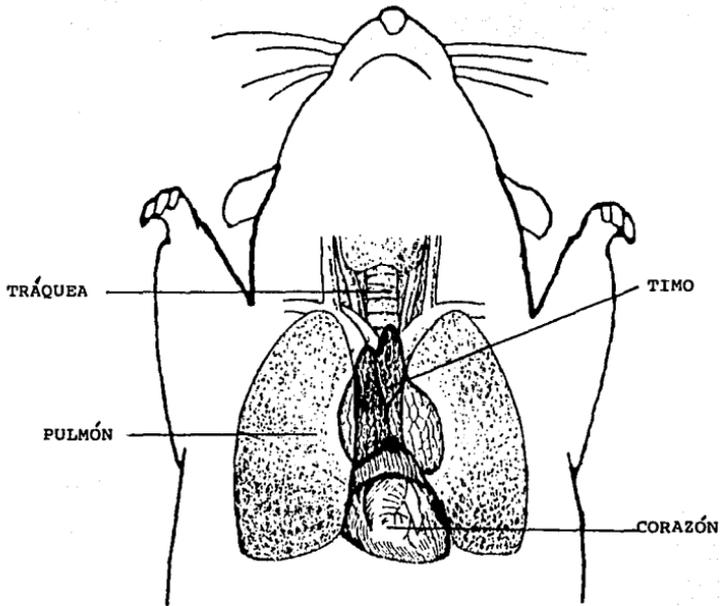


Figura 3. Esquema que muestra la ubicación anatómica del timo en el ratón.

El timo se desarrolla bilateralmente a partir del tercer par de bolsas faríngeas. Durante la embriogénesis el rudimento tímico crece caudalmente hacia el mediastino en forma de una prolongación tubular del epitelio endodérmico. Estos tubos epiteliales pronto se vuelven cordones que

proliferan y mandan hacia afuera ramas laterales precursoras de los núcleos de los lóbulos. El extremo de avance prolifera y al final pierde la conexión con el epitelio faríngeo. Las células epiteliales permanecen unidas por desmosomas localizados en los extremos de largas prolongaciones citoplasmáticas en forma de red (Ham, 1975; Ross y col, 1992).

Los linfocitos T indiferenciados o prelinfocitos se originan en el saco vitelino, después se dirigen a la médula ósea y por último migran al timo para depositarse en la red de células epiteliales, lugar donde crecen, proliferan y se diferencian en linfocitos T (Ham, 1975).

En los mamíferos el timo esta formado por dos lóbulos que están unidos por la parte media, cada lóbulo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo que penetra al interior del lóbulo formando tabiques que lo dividen en lobulillos. Cada lobulillo presenta una corteza con gran densidad de linfocitos y una médula con menor cantidad de estos y en la cual predominan células epiteliales dispuestas en forma de red. En la médula existe una estructura llamada Corpúsculo de Hassall, que es un agrupamiento de células reticulo-epiteliales engrosadas y dispuestas concéntricamente (Bellanti, 1986; Ross y col. 1992; Roitt y col. 1993) [Figura 4].

Una vez que los linfocitos T se han diferenciado en el epitelio tímico, migran por el torrente sanguíneo hacia el bazo y a los ganglios linfáticos, para depositarse en las zonas llamadas timo dependientes que existen en estos órganos y donde interaccionan con los linfocitos B para sintetizar anticuerpos (Bellanti, 1986; Roitt y col. 1993; Ross y col. 1992).

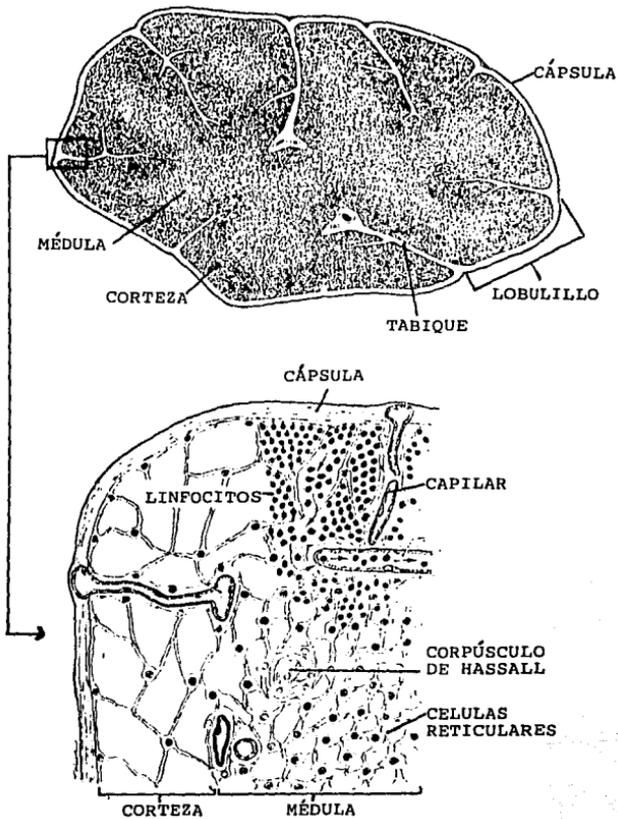


Figura 4. Representación esquemática de la histología y organización corticomedular del timo humano (Tomado de Bellanti, 1986).

Una característica muy peculiar del timo es que experimenta un proceso de involución que depende de la edad, denominada también "involución fisiológica". Este órgano crece desde el nacimiento hasta la pubertad, después de esta etapa reduce gradualmente su tamaño y su peso, lo cual se atribuye a la disminución en la tasa de proliferación linfocítica provocada principalmente por la elevación en las concentraciones de hormonas sexuales en plasma. A medida que avanza el proceso de involución, el tejido adiposo comienza a predominar en este órgano llegando a ser un pequeño cúmulo de grasa en la vejez (Grossman, 1984; Bellanti, 1986; Hall y Goldstein, 1987) [Figura 5].

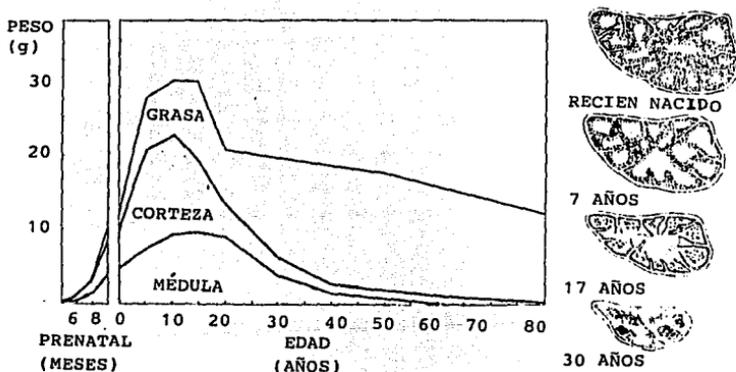


Figura 5. Representación esquemática que muestra los cambios de peso y composición del timo en el humano durante el proceso de involución (Tomado de Bellanti, 1986).

Se ha mostrado que la involución del timo puede acelerarse en respuesta a una serie de factores como las infecciones, el estrés y la desnutrición, entre otros (Raviola, 1989), así mismo se ha observado que la administración de progesterona, estrógenos, testosterona o corticoides provoca disminución en el peso del timo, mientras que la castración o la adrenalectomía inducen su hipertrofia (Ishidate y Metcalf, 1963; Chamber y Clarke, 1979; Grossman, 1984,1985). Los efectos que tienen los esteroides tanto adrenales como gonadales sobre el timo, son mediados por los receptores a estas hormonas que están presentes en las células retículo-epiteliales (Sholiton y col, 1980; Morgan y Grossman, 1985).

También durante la preñez se acelera la involución del timo, hecho que se ha explicado con base a la elevación de las concentraciones de progesterona y corticosterona que se observan en este tiempo (Carter, 1976; Chamber y Clarke, 1979; Grossman, 1984).

El timo es una glándula con gran actividad hormonal. Se ha descrito que en las células retículo-epiteliales se sintetizan polipéptidos a los que se les ha llamado timosinas, cuya función es estimular la maduración y diferenciación de los linfocitos T (Goldstein, 1984).

Una de las timosinas más estudiadas y mejor caracterizadas es la timosina fracción 5 (Timosina F5), está conformada por una familia de péptidos que se han clasificado con base a su punto Isoeléctrico como: timosina α 1, timosina α 5, timosina α 7, timosina β 1, timosina β 3, timosina β 4, timosina β 7, timosina β 8, timosina β 9, timosina β 10 y timosina γ 1 (Goldstein y col, 1981; Low y Goldstein, 1984).

También se han aislado otras hormonas del epitelio tímico como son el factor tímico humoral (THF), el factor tímico del suero o timulina (FTS), la timoestimulina, la timopoiétina y el factor tímico X (TFX) (Goldstein y col, 1981; Low y Goldstein, 1984).

IV. Vinculación del timo con la función reproductora.

Efectos de las timosinas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

El papel de las timosinas en la diferenciación y maduración de los linfocitos T y por ende en la regulación del sistema inmune no son la única función que puede atribuirse al timo ya que existen numerosas evidencias experimentales que indican que estos péptidos tienen efectos sobre la secreción de las hormonas involucradas con el desarrollo gonadal.

Se ha mostrado que el agregado de timosina F5 o timosina $\beta 4$ a un sistema de perfusión de hipotálamo-hipófisis incrementa la secreción de la GnRH y por ende la de LH (Rebar y col. 1981).

También se ha descrito que otro factor tímico de 28 kD potencia los efectos de la GnRH sobre la secreción *in vitro* de las gonadotropinas por la hipófisis. A su vez, este mismo factor inhibe el efecto estimulante que tiene la gonadotropina coriónica humana (hCG) sobre la esteroidogénesis *in vitro* tanto en el ovario como en el testículo, al interactuar competitivamente en la unión de la hCG con su receptor (Hiriart y Romano, 1986; Pedemera y col. 1986; Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989).

En el ratón prepúber la administración de timosina F5 o timosina $\alpha 1$ causa una disminución rápida y considerable del peso del ovario, adelanta la edad de la apertura vaginal, aumenta las concentraciones de estradiol e induce la involución del timo (Dardenne y Bach, 1981; Michael, 1983). Cuando la timosina F5 se adiciona a una medio de cultivo de adenohipófisis es capaz de incrementar las concentraciones de prolactina y GH pero no de la LH (Spangelo y col, 1987).

Se ha observado que la concentración de timosina $\beta 4$ en plasma varía a lo largo del ciclo estral del cerdo; se encuentra alta durante la fase

folicular y disminuye en la fase luteal cuando precisamente la concentración de progesterona se encuentra alta (Ford y col, 1990).

Otros resultados muestran que cuando se adicionan los péptidos tímicos liberados *in vitro* por las células reticulo-epiteliales, al cultivo de células de la granulosa, estimulan la esteroidogénesis (Uzumco y col, 1992).

Efectos de la timectomía neonatal sobre el desarrollo del ovario.

El ratón timectomizado a los 3 días de edad (Tx-3) ha sido el modelo biológico más ampliamente utilizado en el estudio de la vinculación del timo con el sistema reproductor.

La timectomía realizada en la etapa neonatal (2-4 días), provoca en el animal adulto, disgénesis ovárica que se caracteriza por infiltración de linfocitos, disminución en el número de ovocitos y de folículos, hipertrofia e hiperplasia de las células intersticiales, proliferación de tejido conectivo, ausencia de cuerpos lúteos y presencia de quistes (Nishizuka y Sakakura, 1969; Besedovsky y Sorkin, 1974; Hattori y Brandon, 1979; Michael y col., 1980; Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

Aunado a la disgénesis ovárica, los ratones Tx-3 presentan menores concentraciones plasmáticas de FSH, LH, GH, PRL, progesterona y estrógenos, retraso en la edad de la apertura vaginal (pubertad), infertilidad y menor peso de los ovarios y el útero (Nishizuka y Sakakura 1969, 1971; Sakakura y Nishizuka, 1972; Besedovsky y Sorkin, 1974; Michael y col, 1980, 1981, 1990; Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

Los ovarios de los ratones Tx-3 sintetizan *in vitro* mayores cantidades de 17-hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona y no producen estrógenos. Al parecer por el predominio de células intersticiales y estroma ovárico (Nishizuka y col, 1973).

Estudios de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia han mostrado que el animal Tx-3 presenta y produce anticuerpos anti-ovocitos, lo que indica que la disgénesis ovárica tiene una etiología autoinmune que sólo ocurre cuando se extirpa el timo entre los 2 y 4 días de edad (Michael, 1983).

Michael (1983) propone que en los animales Tx-3 los linfocitos T cooperadores han madurado, mientras que los linfocitos T supresores están ausentes, por lo que los T cooperadores interaccionan con los linfocitos B para producir anticuerpos en contra de los ovocitos, provocando así que el compartimiento folicular degenera paulatinamente.

En estudios recientes Kosiewicz y Michael (1990) muestran que en el modelo Tx-3 se presenta una pérdida aguda de los folículos primordiales antes de los 10 días de edad y una subsecuente disminución en el número de folículos en crecimiento a los 20 días. Sin embargo, no se observan linfocitos en el ovario ni anticuerpos anti-ovocitos en circulación hasta los 25 días de edad. Con estos resultados los autores proponen que el daño inicial que provoca la timectomía sobre el desarrollo folicular no es un efecto directo de la respuesta autoinmune y sugieren que la función endócrina del timo esta involucrada.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios realizados con el modelo del animal timectomizado en la etapa neonatal (Tx-3) ponen de manifiesto la existencia de un efecto bifásico sobre el ovario: una fase temprana que involucra al eje hipotálamo-hipófisis-ovario y que probablemente influye en el desarrollo de la población folicular y otra fase tardía, que involucra la disfunción inmunológica que da como resultado la destrucción del ovario.

Al parecer en el modelo del ratón timectomizado a los 3 días de edad, la respuesta autoinmune estaría enmascarando el papel hormonal del timo. Es por esto que en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre la pubertad, la ovulación y el desarrollo folicular, así como la respuesta a la estimulación gonadotrópica.

HIPÓTESIS

En el animal prepúber, la información hormonal que proviene del timo participa de manera estimulante sobre el desarrollo folicular, por lo que la extirpación de este órgano a los 10 días de edad retrasa el inicio de la pubertad y disminuye la respuesta ovulatoria.

OBJETIVOS

-Analizar los efectos de la timectomía realizada a los 10 días de edad sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro vaginal y la ovulación espontánea e inducida en ratones hembra.

- Analizar el desarrollo folicular de los ovarios de animales timectomizados a los 10 días de edad y su respuesta al tratamiento gonadotrópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 mantenidos desde el nacimiento en fotoperiodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y agua y alimento *ad libitum*. Las crías se distribuyeron en camadas de siete teniendo libre acceso a la madre desde el nacimiento hasta el destete (30 días de edad). Para cada grupo experimental el número de animales utilizado fue mayor o igual a ocho.

Timectomías.

Las timectomías se realizaron bajo el microscopio estereoscópico, anestesiando a los animales por enfriamiento sobre una cama de hielo. Se hizo una incisión de piel a la altura del segundo par de costillas, se cortó el esternón, se introdujo una pipeta pasteur conectada a un sistema de vacío y se succionaron ambos lóbulos del timo. Posteriormente se suturó la herida y se aplicó alcohol yodado. Como grupo de operación simulada (OS) se utilizaron animales que fueron anestesiados de igual forma, se les realizó la incisión de piel y esternón y se suturó la herida.

Después de la operación, los animales fueron colocados en un ambiente a $36\text{-}37^{\circ}\text{C}$ durante una hora para acelerar la recuperación de la temperatura corporal.

Procedimiento de autopsia.

Todos los animales fueron sacrificados en una cámara de éter entre las 10:00 y 11:00 h. A la autopsia se disecaron los ovarios, los oviductos,

el útero y el timo (en aquellos animales que lo presentaron) y se pesaron en balanza de precisión.

En los oviductos se buscó la presencia de ovocitos y en cuyo caso se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Se verificó si la timectomía fue completa por observación al microscopio estereoscópico en el momento de la autopsia y posteriormente por análisis histológico de la región. Para el análisis de los resultados sólo se consideraron los datos de los animales con timectomía completa.

Procesamiento del material histológico.

Tanto los ovarios como el tejido extraído de la región tímica, se fijaron en solución de Bouin, se deshidrataron gradualmente en alcohol y finalmente en cloroformo y se incluyeron en parafina. Los órganos se cortaron en serie a 10 μm y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina. La organización cortico-medular característica del timo normal se utilizó como criterio para el análisis de los cortes del tejido extraído de la región tímica.

Análisis morfométrico.

El análisis morfométrico de la población folicular se realizó en el ovario izquierdo y derecho de 4 animales de cada grupo experimental, para lo cual se utilizó un ocular micrométrico filar. En todos los cortes y para cada uno de los folículos mayores de 70 μm de diámetro que presentaron ovocito, núcleo y nucléolo, se midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste. Se calculó el diámetro promedio por folículo y se clasificaron en los siguientes rangos 101-200 μm , 201-300 μm , 301-400 μm y >400 μm (Rosas e Hinojosa, 1993).

Los folículos también fueron clasificados en sanos y atrésicos, siendo estos últimos los que presentaron al menos una de las siguientes características:

- 1) Picnosis en las células de la granulosa.
- 2) Descamación de las células de la granulosa en el antro folicular.
- 3) Engrosamiento de la teca.
- 4) Alteraciones del ovocito.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron de la siguiente manera: la edad de la apertura vaginal, del primer estro, del peso corporal y de los órganos se sometieron a la prueba de análisis de varianza multivariado (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. El número de ovocitos y el número de folículos se analizaron por la prueba de "U" de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes (TAO) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TAO} = \frac{\text{número de animales que ovulan}}{\text{número total de animales}}$$

Los resultados de la TAO se compararon por la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. En los casos en los que se compararon pares de datos se usó la prueba de "t" de Student. La comparación de la proporción de folículos sanos y atrésicos se realizó usando la prueba de χ^2 . En todos los casos, sólo se consideraron como significativos los resultados cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1

Estudio de los efectos de la timectomía realizada en ratones de diez días de edad, sobre la edad de la apertura vaginal, la edad del primer estro y la ovulación espontánea.

Se utilizaron grupos de animales que fueron timectomizados a los diez días de edad (Tx-10) o sometidos a una operación simulada (OS) a la misma edad y animales prepúberes intactos (TA).

Todos los animales se revisaron diariamente entre las 10 y 11 h y se registró el día en que se presentó la canalización espontánea de la vagina (pubertad). Se tomaron frotis vaginales diarios hasta la presencia del estro, día en el cual se sacrificaron.

Experimento 2

Estudio de los efectos de la timectomía realizada en ratones de diez días de edad, sobre la pubertad y la ovulación inducidas por la administración de gonadotropinas.

Se utilizaron ratones hembra prepúberes timectomizados a los diez días de edad e intactos, los cuales se inyectaron con 5 ó 1 u.i de PMSG (Sigma Chemical Co., EE.UU.) por vía subcutánea a los 25 días de edad entre las 9:00 y 10:00 h. A otros grupos de ratones Tx-10 y TA de la misma edad se les administró 1 u.i. de PMSG y 54 h después 3 u.i. de hCG (Sigma Chemical Co., EE.UU.). Se contó con un grupo de hembras intactas autopsiadas a los 28 días de edad.

A los animales de todos los grupos experimentales se les registró el día de la apertura vaginal y se tomaron frotis vaginales diarios.

Todos los ratones tratados con gonadotropinas se sacrificaron 72 h después de la administración de la PMSG. Las hembras que no recibieron tratamiento hormonal se sacrificaron el día del primer estro vaginal. A la autopsia se procesaron como ya se indicó.

Experimento 3

Estudio del crecimiento folicular de los ovarios de ratones timectomizados a los diez días de edad y su respuesta a la estimulación gonadotrópica.

En los ovarios izquierdo y derecho de cuatro animales de los grupos Tx-10 y TA con o sin estimulación gonadotrópica se analizó la distribución de la población folicular, para lo cual los ovarios se procesaron como ya se describió.

RESULTADOS

De 226 animales que fueron timectomizados a los 10 días de edad, 135 (60%) superaron el periodo crítico de supervivencia a las 96 horas y 44 (33%) de éstos presentaron timectomía completa.

Dado que no se observaron diferencias significativas en la edad de la apertura vaginal, el primer estro vaginal, la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y el peso corporal y de los órganos entre los animales intactos (TA) y los sometidos a una operación simulada (OS), los datos se reunieron en un sólo grupo llamado testigo (T) [Tabla 1].

Tabla 1. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV), el primer estro vaginal, el número de ovocitos liberados, el peso corporal (g) y el peso de los órganos (mg) de ratones testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) y testigo (T), sacrificados el día del primer estro vaginal.

	TA (n=10)	OS (n=11)	T (n=21)
Edad de AV (días)	29.8 \pm 0.5	29.2 \pm 0.7	29.6 \pm 0.4
Primer estro *	3.4 \pm 0.6	2.5 \pm 0.9	3.2 \pm 0.5
TAO	0/10	1/11	1/21
Nº de ovocitos	0	3	3
Peso corporal	23.8 \pm 0.8	23.3 \pm 1.0	23.5 \pm 0.6
Ovarios	10.3 \pm 0.8	11.4 \pm 0.7	10.9 \pm 0.5
Utero	70.0 \pm 12.0	67.2 \pm 14.3	68.5 \pm 9.2
Timo	149.4 \pm 4.2	132.1 \pm 9.8	140.3 \pm 5.7

* días posteriores a la AV

I. Efectos de la timectomía realizada a los 10 días de edad, sobre la pubertad y la ovulación espontáneas.

La edad de la apertura vaginal espontánea de los ratones timectomizados a los 10 días de edad, mostró un retraso significativo al compararse con la del grupo T [Figura 6], mientras que el primer estro vaginal fue similar entre ambos grupos experimentales (3.7 ± 1.5 vs 3.2 ± 0.5 , NS).

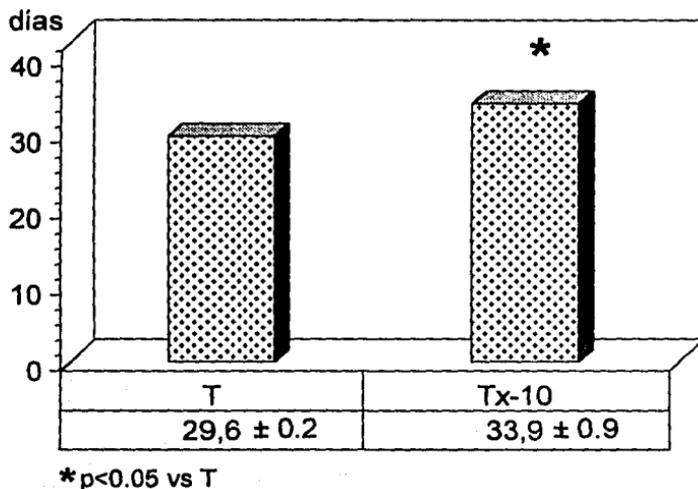


Figura 6. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal de ratones testigo (T) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), sacrificados el día del primer estro vaginal.

En los animales Tx-10 (n=10), el peso corporal y del útero no se modificaron de manera significativa respecto al grupo T (n=21) (peso corporal 23.4 ± 0.5 vs 23.5 ± 0.6 g; útero 76.6 ± 11.0 vs 68.6 ± 9.2 mg, NS), en tanto que el peso de los ovarios fue menor comparado con el del testigo [Figura 7].

La ovulación espontánea sólo se presentó en uno de los animales del grupo testigo [Tabla 1] y en ninguno de los animales timectomizados a los 10 días de edad.

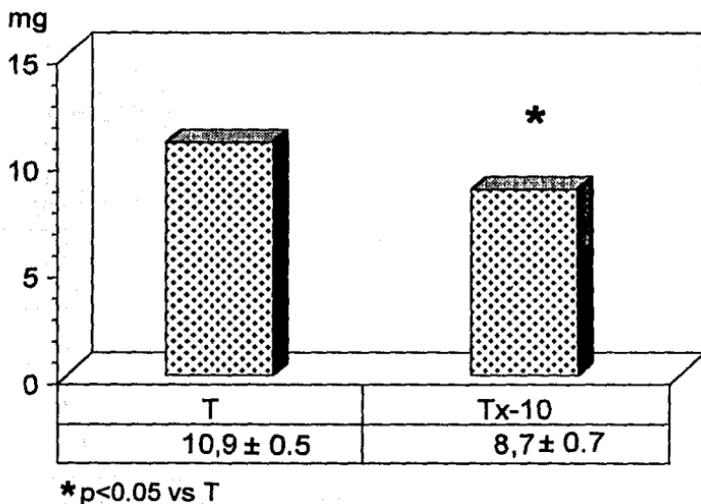


Figura 7. Media \pm e.e.m. del peso de los ovarios de ratones testigo (T) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), sacrificados el día del primer estro vaginal.

II. Efectos de la timectomía realizada a los 10 días de edad, sobre la pubertad y la ovulación inducidas por la administración de gonadotropinas.

a) Respuesta ovulatoria a la administración de 5 u.i. de PMSG.

Tanto los animales intactos (TA) como los timectomizados tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad adelantaron la edad de la apertura vaginal, presentándose ésta, en la mayoría de los animales 48 horas después de la administración gonadotrópica y el primer estro vaginal 72 h después de PMSG.

El tratamiento hormonal indujo la ovulación en el 100% de los animales intactos y timectomizados (14/14 vs 10/10, NS). En ambos tipos de ratones, el número de ovocitos liberados fue similar [Figura 8].

El peso corporal de los animales TA tratados con PMSG, fue mayor que el de los animales TA sin tratamiento autopsiados a los 28 días de edad (TA-28), lo que no se observó en los Tx-10 con el mismo estímulo gonadotrópico. El peso del resto de los órganos fue significativamente mayor en ambos modelos experimentales comparados con el TA-28 [Tabla 2].

Entre los grupos TA+PMSG y Tx-10+PMSG, sólo el peso del útero mostró diferencias significativas [Tabla 2].

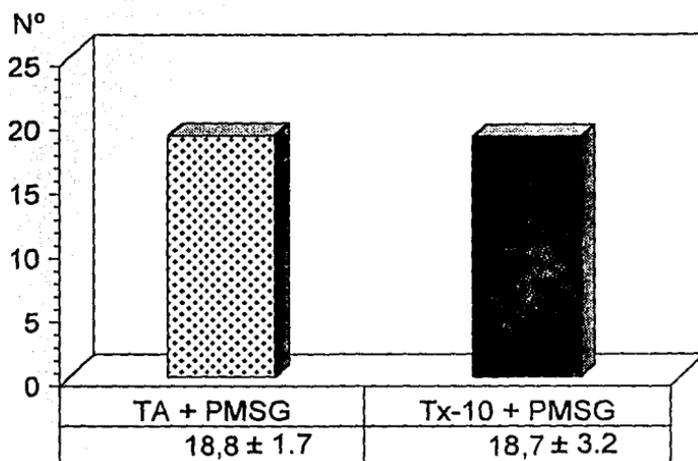


Figura 8. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días (Tx-10), tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y sacrificados 72 h después de la administración gonadotrópica.

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del peso corporal (g) y de los órganos (mg) de ratones testigo absoluto (TA) y timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados a los 25 días de edad con 5 u.i. de PMSG y sacrificados 72 h después de la administración gonadotrópica, comparados con ratones testigo absoluto sacrificados a los 28 días de edad (TA-28).

	TA-28 (n=9)	TA+PMSG (n=14)	Tx+PMSG (n=10)
Peso corporal	19.3 \pm 0.5	22.0 \pm 0.7 ^a	20.2 \pm 0.7
Ovarios	10.9 \pm 0.7	19.1 \pm 1.2 ^a	18.6 \pm 1.5 ^a
Útero	39.5 \pm 2.7	81.6 \pm 4.1 ^a	62.1 \pm 3.3 ^{a,b}

a, $p < 0.05$ vs TA-28 b, $p < 0.05$ vs TA+PMSG

b) Respuesta ovulatoria a la administración de diferentes concentraciones de PMSG.

Se administraron concentraciones de PMSG menores de 5 u.i. con el objeto de encontrar aquella que provocara la apertura vaginal, pero no la ovulación y utilizarla como modelo para estudiar la respuesta de los ovarios de los animales intactos y Tx-10 al tratamiento secuencial de PMSG y hCG.

Los resultados obtenidos en las hembras intactas tratadas con diferentes concentraciones de PMSG, se muestran en la Tabla 3. La edad de la apertura vaginal se presentó alrededor de las 48 h postratamiento en todos los grupos experimentales independientemente de la concentración de PMSG. La tasa de animales ovulantes mostró un ligero decremento conforme disminuyó la concentración de PMSG y sólo fue significativamente menor con 1 u.i. de esta gonadotropina. El número de ovocitos liberados por animal ovulante, disminuyó con concentraciones de PMSG menores comparado con 5 u.i.

El peso corporal y del útero fue similar en todos los grupos experimentales, mientras que el peso de los ovarios de los animales tratados con 1 u.i. de PMSG fue menor al observado con el resto de las concentraciones de la hormona [Tabla 3].

Tabla 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV), del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios (mg) de animales intactos tratados a los 25 días de edad con diferentes concentraciones de PMSG y sacrificados a las 72 h después de la administración hormonal.

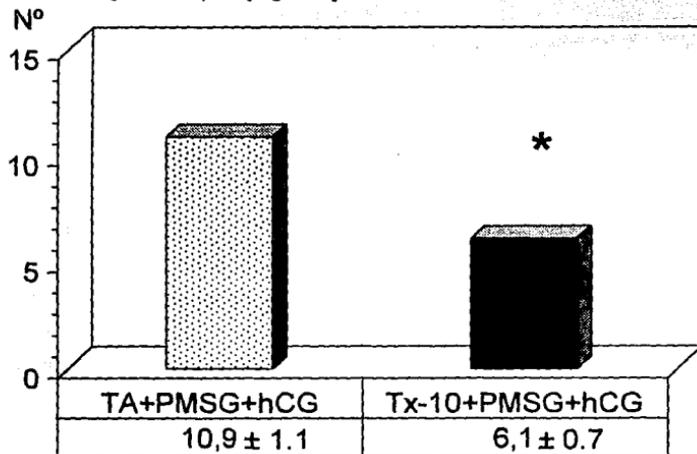
	Concentraciones de PMSG			
	5.0 u.i.	2.0 u.i.	1.5 u.i.	1.0 u.i.
Edad de AV (días)	27.0 \pm 0.0	27.1 \pm 0.2	26.8 \pm 0.2	26.8 \pm 0.1
TAO	14/14	8/9	4/6	1/9a
Nº de ovocitos	18.8 \pm 1.7	11.5 \pm 1.5b	10.0 \pm 2.0b	11
Ovarios	19.1 \pm 1.2	16.4 \pm 1.4	20.9 \pm 0.9c	9.5 \pm 0.8a

a, $p < 0.05$ vs todas las concentraciones b, $p < 0.05$ vs 5 u.i. c, $p < 0.05$ vs 2 u.i.

En los animales Tx-10 tratados con 1 u.i. de PMSG también se presentó un adelanto en la edad de la apertura vaginal, no ovularon (0/12) y el peso de los ovarios no se incrementó.

c) Respuesta ovulatoria a la administración de 1 u.i. de PMSG y 3 u.i. de hCG.

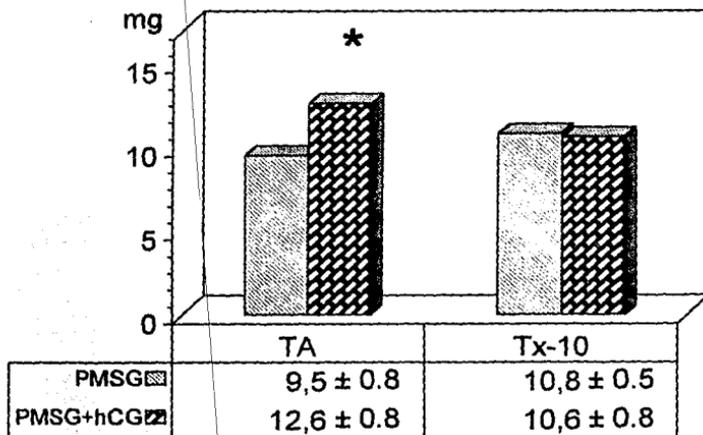
El tratamiento secuencial de 1 u.i. de PMSG y 3 u.i. de hCG, indujo la ovulación en todos los testigos absolutos y en la mayoría de los animales timectomizados (10/10 vs 7/8, NS), sin embargo el número de ovocitos liberados fue menor en los Tx-10 respecto a los TA con el mismo tratamiento gonadotrópico [Figura 9].



* $p < 0.05$ vs TA+PMSG+hCG

Figura 9. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad más 3 u.i. de hCG 54 h después, sacrificados 72 h posteriores a la PMSG.

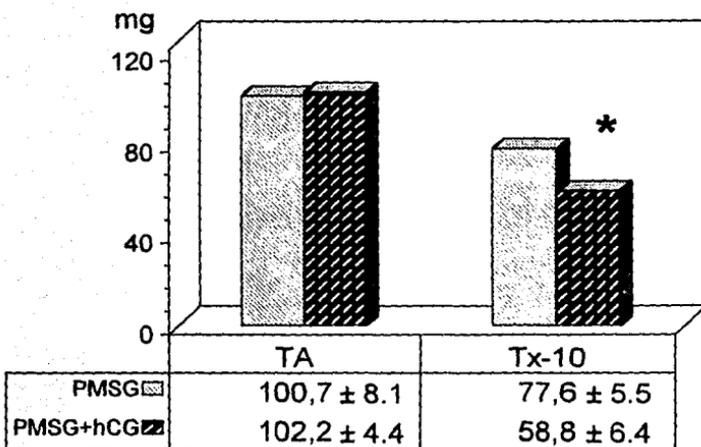
Las hembras Tx-10 inyectadas con 1 u.i. de PMSG presentaron menor peso corporal que las tratadas con ambas gonadotropinas (19.7 ± 1.0 vs 23.9 ± 0.4 , $p < 0.05$). El peso de los ovarios de los animales intactos tratados con PMSG y hCG se incrementó significativamente respecto a los que sólo recibieron PMSG, efecto que no se observó en los Tx-10 con la misma administración hormonal [Figura 10].



* $p < 0.05$ vs PMSG

Figura 10. Media \pm e.e.m del peso de los ovarios (mg) de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad o con 1 u.i. de PMSG y 54 h después 3 u.i. de hCG, sacrificados 72 h posteriores a la PMSG.

El peso del útero fue similar en los animales intactos independientemente del tratamiento gonadotrópico, mientras que en los Tx-10 fue menor al administrar ambas hormonas [Figura 11].



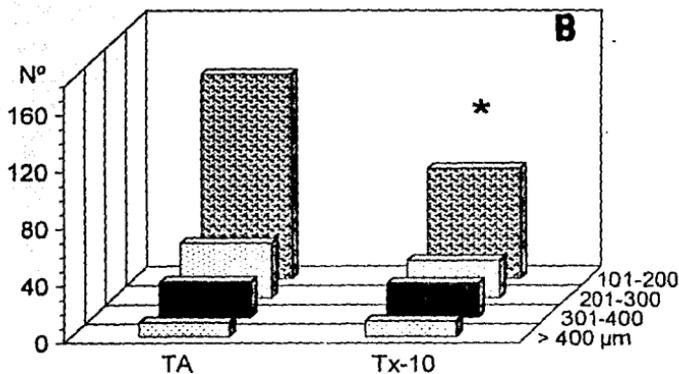
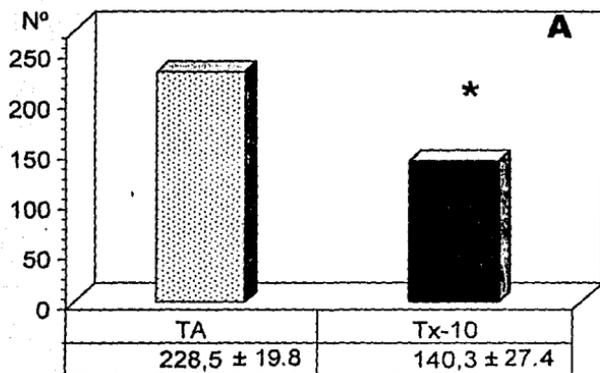
* $p < 0.05$ vs PMSG

Figura 11. Media \pm e.e.m del peso del útero (mg) de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad o con 1 u.i. de PMSG y 54 h después 3 u.i. de hCG, sacrificados 72 h posteriores a la PMSG.

III. Efectos de la timectomía sobre el crecimiento folicular.

a) Sin tratamiento hormonal.

El análisis morfométrico de la población folicular de los ovarios mostró que en el animal Tx-10 el número total de folículos fue menor que el de los TA. La distribución de los folículos por rango mostró un decremento significativo en los de 101-200 μm de diámetro [Figura 12].



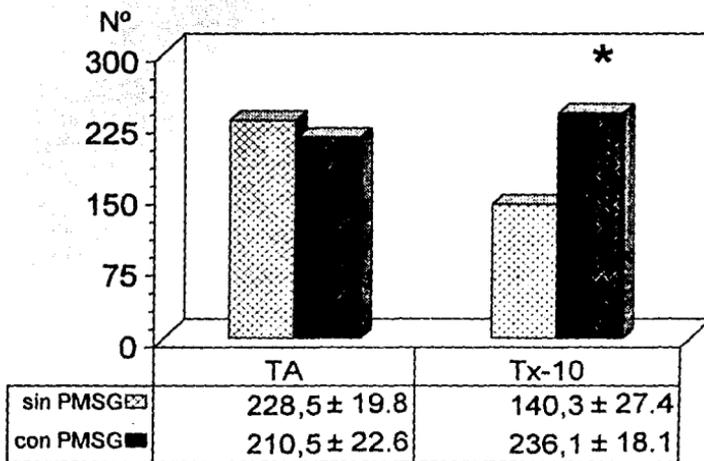
* $p < 0.05$ vs TA

Figura 12. Media \pm e.e.m. del número total de folículos (A) y media del número de folículos por rango (B) de los ovarios de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), sacrificados el día del primer estro vaginal.

Tanto en los animales intactos como en los Tx-10, el número de folículos sanos respecto al de los atrésicos fue similar (TA, 135.0 ± 18.2 vs 93.8 ± 15.8 ; Tx-10, 71.0 ± 18.8 vs 69.3 ± 10.8 , NS).

b) Tratamiento con 5 u.i. de PMSG.

En los animales Tx-10 la administración de 5 u.i. de PMSG incrementó el número total de folículos, efecto que no se observó en los animales TA con el mismo tratamiento [Figura 13].



* $p < 0.05$ vs Tx-10

Figura 13. Media \pm e.e.m. del número total de folículos de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días (Tx-10), tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y sacrificados 72 h después de la administración gonadotrópica.

Cuando se analizó la distribución de los folículos por rango de los animales Tx-10 se observó que el tratamiento hormonal indujo un aumento en los de 101-200 μm de diámetro [Figura 14].

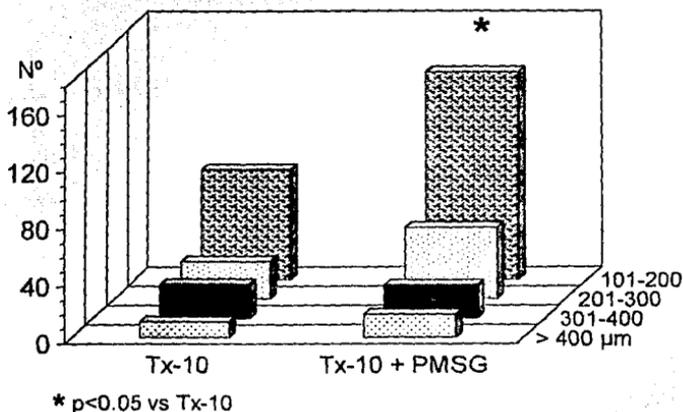
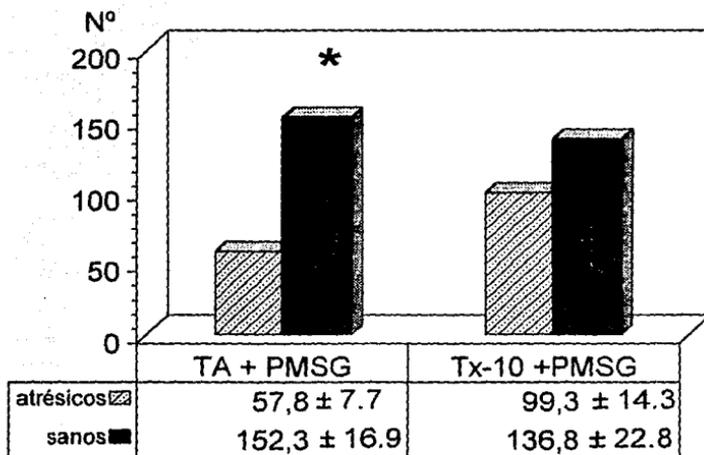


Figura 14. Media del número de folículos por rango de los ovarios de animales timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad o sin tratamiento.

En los animales TA, la administración de 5 u.i. de PMSG incrementó el número de folículos sanos en relación a los atresicos, mientras que en los Tx-10 el mismo tratamiento hormonal no modificó de manera significativa la proporción de ambos tipos de folículos [Figura 15].



* $p < 0.05$ vs atrésicos

Figura 15. Media \pm e.e.m. del número de folículos sanos y atrésicos de los ovarios de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10) tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad, sacrificados 72 h después de la administración gonadotrópica.

En los animales TA el número de folículos sanos fue similar al de los atrésicos en todos los rangos, excepto en el de 101-200 μm , en este rango el tratamiento con 5 u.i. de PMSG disminuyó el número de folículos atrésicos y en el rango de 201-300 μm incrementó el de sanos, mientras que los folículos mayores de 400 μm fueron en su mayoría atrésicos [Tabla 4].

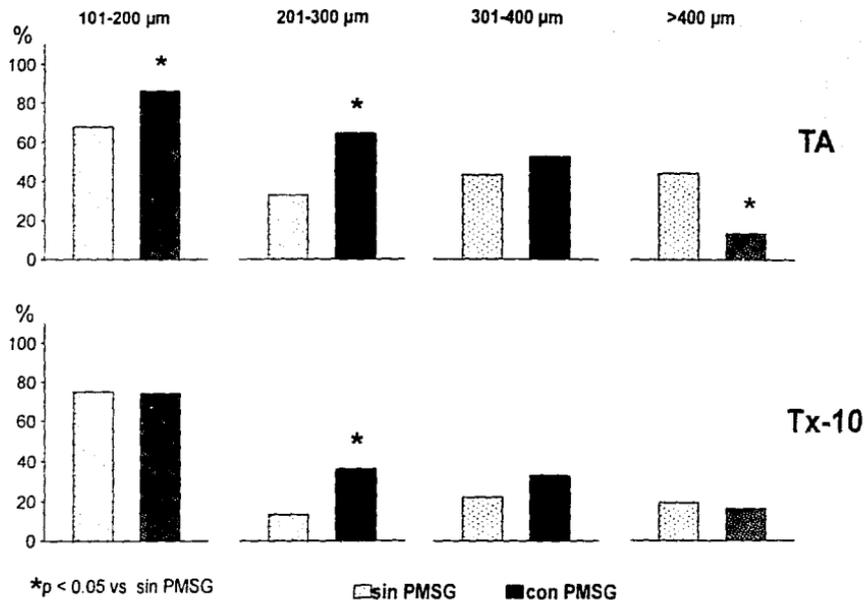
A diferencia de los animales intactos, en los Tx-10, el número de folículos atrésicos fue significativamente mayor a partir de las 201 μm de diámetro. El tratamiento con PMSG modificó esta distribución siendo estadísticamente significativa en el rango de 101 a 200 μm [Tabla 4].

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del número de folículos sanos y atrésicos por rango de los ovarios de animales testigo absoluto (TA) y de timentomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 5 u.i. de PMSG o sin tratamiento.

Grupo		101-200 μm	201-300 μm	301-400 μm	>400 μm
TA	sanos	96.8 \pm 11.0	12.8 \pm 1.5	10.5 \pm 2.2	4.3 \pm 0.6
	atrésicos	46.5 \pm 6.6*	25.8 \pm 7.1	14.0 \pm 4.9	5.5 \pm 2.6
TA+PMSG	sanos	100.3 \pm 13.4	33.3 \pm 6.0	15.3 \pm 4.1	1.3 \pm 0.6
	atrésicos	16.8 \pm 5.9*	18.5 \pm 2.2*	14.0 \pm 2.1	8.3 \pm 0.6*
Tx-10	sanos	57.5 \pm 15.4	3.5 \pm 1.7	5.3 \pm 1.8	2.0 \pm 0.4
	atrésicos	19.5 \pm 2.6*	22.5 \pm 6.8*	18.3 \pm 2.8*	8.8 \pm 1.1*
Tx-10+PMSG	sanos	107.5 \pm 17.4	18.0 \pm 5.1	7.5 \pm 1.0	2.5 \pm 1.9
	atrésicos	38.0 \pm 9.2*	31.8 \pm 4.2	15.3 \pm 3.3	13.5 \pm 3.3*

* $p < 0.05$ vs folículos sanos

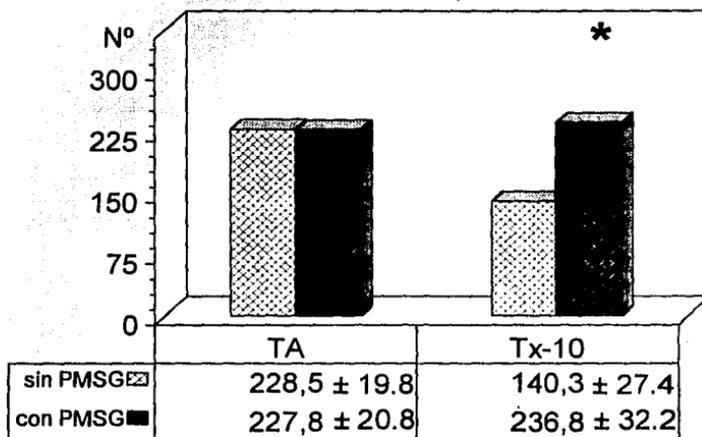
El análisis de la proporción de folículos sanos y atrésicos por rango mostró que en los ovarios de los animales intactos, el tratamiento con 5 u.i. de PMSG incrementó la proporción de folículos sanos en los rangos de 101-200 y 201-300 μm de diámetro, mientras que en el Tx-10 este efecto sólo se observó en el rango de 201-300 μm [Figura 16].



*p < 0.05 vs sin PMSG □ sin PMSG ■ con PMSG
Figura 16. Proporción de folículos sanos por rango de los ovarios de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad o sin tratamiento

c) Tratamiento con 1 u.i. de PMSG.

En los animales Tx-10 la administración de 1 u.i. de PMSG indujo un incremento en el número total de folículos, mientras que en el TA no se observó esta diferencia [Figura 17].



* $p < 0.05$ vs Tx-10

Figura 17. Media \pm e.e.m. del número total de folículos de animales intactos (TA) y de tiemctomizados a los 10 días (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y sacrificados 72 h después de la administración gonadotrópica.

La distribución de los folículos por rango mostró un aumento en el número de folículos de 101 a 200 y de 201 a 300 μ m de diámetro, aunque no llegó a valores estadísticamente significativos [Figura 18].

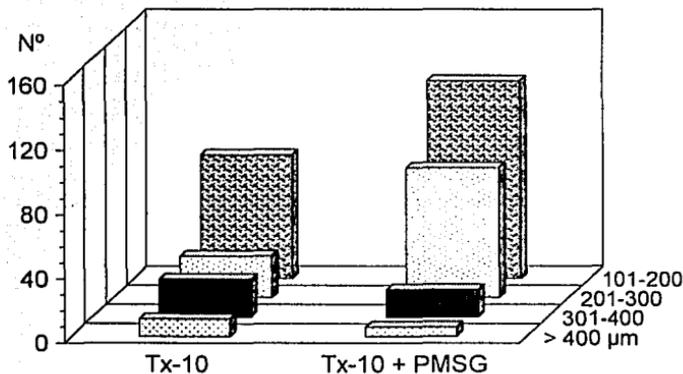


Figura 18. Media del número de folículos ováricos por rango de animales timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG o sin tratamiento.

Cuando se administró 1 u.i. de PMSG en los animales TA el número de folículos sanos respecto a los atrésicos no presentó cambios (124.8 ± 9.2 vs 103.0 ± 14.8 , NS), resultados similares se observaron en el Tx-10 con el mismo tratamiento hormonal (124.3 ± 20.0 vs 112.5 ± 18.1 , NS).

El análisis del número de folículos por rango mostró que en el grupo TA, la administración de 1 u.i. de PMSG indujo un aumento significativo en el número de folículos atrésicos sólo en el rango de 201-300 µm de diámetro, mientras que en el Tx-10 el mismo tratamiento incrementó ambos tipos de folículos en todos los rangos [Tabla 5].

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del número de folículos sanos y atrésicos por rango de los ovarios de animales testigo absoluto (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG o sin tratamiento.

Grupo		101-200 μ m	201-300 μ m	301-400 μ m	>400 μ m
TA	sanos	96.8 \pm 11.0	12.8 \pm 1.5	10.5 \pm 2.2	4.3 \pm 0.6
	atrésicos	46.5 \pm 6.6*	25.8 \pm 7.1	14.0 \pm 4.9	5.5 \pm 2.6
TA+PMSG	sanos	79.0 \pm 6.9	20.0 \pm 3.7	5.3 \pm 2.1	4.5 \pm 1.3
	atrésicos	52.3 \pm 10.8	41.5 \pm 5.3*	5.5 \pm 1.8	1.8 \pm 0.6
Tx-10	sanos	57.5 \pm 15.4	3.5 \pm 1.7	5.3 \pm 1.8	2.0 \pm 0.4
	atrésicos	19.5 \pm 2.6*	22.5 \pm 6.8*	18.3 \pm 2.8*	8.8 \pm 1.1*
Tx-10+PMSG	sanos	72.3 \pm 8.0	30.0 \pm 10.3	8.8 \pm 2.8	4.0 \pm 2.7
	atrésicos	50.5 \pm 5.2*	51.0 \pm 11.9	8.3 \pm 3.0	1.5 \pm 0.3

* $p < 0.05$ vs folículos sanos

El análisis de la proporción de folículos sanos y atrésicos por rango mostró que en los ovarios de los animales intactos, el tratamiento con 1 u.i. de PMSG incrementó la proporción de los folículos sanos mayores de 400 μ m de diámetro, mientras que en el Tx-10 este efecto se observó desde el rango de 201 μ m [Figura 19].

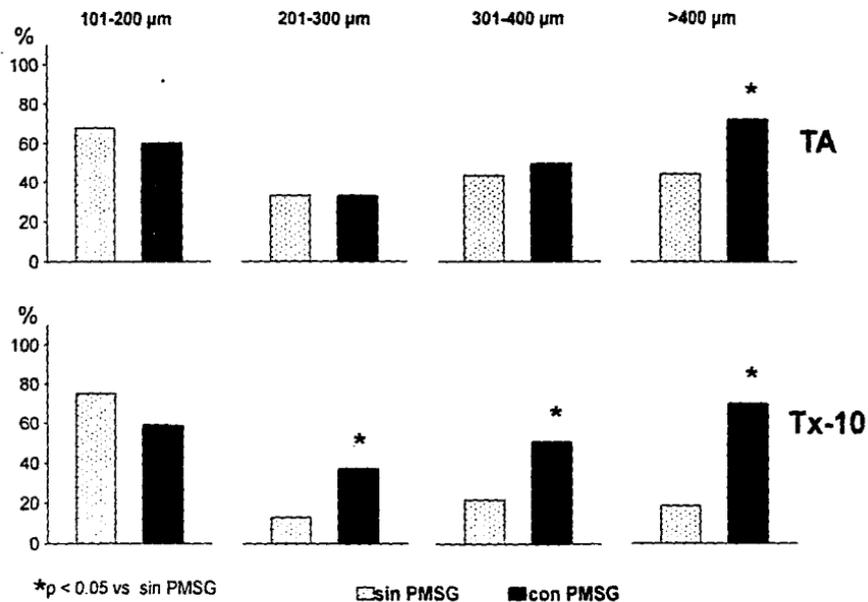


Figura 19. Proporción de folículos sanos por rango de los ovarios de animales intactos (TA) y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad o sin tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en el ratón hembra la ausencia del timo a partir de los 10 días de edad provoca retraso en la pubertad, alteraciones en el crecimiento folicular y menor desarrollo de los ovarios, lo que indica que el timo participa, desde la etapa infantil, en la cascada de eventos neuroendócrinos que culminan con la pubertad.

El modelo Tx-10 implementado en este trabajo, no mostró signos de disgénesis ovárica de origen autoinmune, lo cual coincide con lo descrito cuando se timectomiza después del día siete de vida posnatal (Nishizuka y Sakakura, 1971). Con el uso del Tx-10 se evitó la desventaja que representa la degeneración total del ovario, lo que permitió el análisis del crecimiento folicular en ausencia del timo. Probablemente también se modificaron las características neuroendócrinas del animal con timectomía neonatal, ya que son en parte el resultado de la pérdida progresiva del compartimiento folicular (Michael, 1983).

En el Tx-3 se ha propuesto que el decremento en el número de folículos en crecimiento se debe al daño que provoca la timectomía sobre el grupo de folículos primordiales antes de los 10 días de edad, interfiriendo probablemente con el proceso de foliculogénesis (Kosiewicz y Michael, 1990). La timectomía al día 10 descarta esta posibilidad, ya que se ha descrito que la foliculogénesis en el ratón se inicia alrededor del día dos de vida posnatal y probablemente culmina alrededor del día cinco (Peters, 1978; Kosiewicz y Michael, 1990).

Al realizar las timectomías se presentó una alta mortalidad durante la intervención quirúrgica, así como en las primeras 96 horas postoperatorias, lo cual se debió en gran parte, a la ubicación anatómica del timo que hace difícil

el acceso al mismo e incrementa el riesgo de mortalidad. Algunas de las causas que probablemente ocasionaron la muerte pudieron ser, hemorragia de los grandes vasos, descompensación en la presión de la caja torácica y paro respiratorio. Esta idea es apoyada por el hecho que en los animales sometidos a una operación simulada la supervivencia fue del 100%.

Otro factor importante que probablemente influyó en la disminución de la tasa de supervivencia postoperatoria fue la edad de los animales. En experiencias preliminares se ha observado que la tolerancia quirúrgica y posterior recuperación, es mayor mientras más cerca estén los animales de la etapa neonatal. En este caso que se utilizaron animales de 10 días de edad se dificultó la extracción completa del timo sin dañar los órganos adyacentes ya que es un órgano muy grande en proporción al peso corporal. Al respecto, la mayoría de los estudios en los que se utiliza como modelo al animal timectomizado, no mencionan cual es la supervivencia durante los primeros días después de la operación y sólo el grupo de Nishizuka y Sakakura (1971) mencionan que la tasa de mortalidad inmediatamente después de la operación no excedió el 5%, sin embargo no señalan si hubo mortalidad durante la intervención quirúrgica y en que proporción.

En la exploración de la región tímica que se llevó a cabo durante la autopsia, se tuvieron animales que presentaron restos de tejido. El análisis histológico mostró que en la mayoría de los casos fueron ganglios linfáticos por lo que se consideraron como animales con timectomía completa.

El estrés quirúrgico provocado por la operación simulada, no modificó el proceso de pubertad ni indujo cambios significativos en el peso del timo, del cual se ha descrito que es muy susceptible a situaciones de estrés (Roitt y col., 1993; Hinojosa, 1994).

El retraso observado en la pubertad de las hembras timectomizadas a los 10 días de edad, probablemente se debe a una modificación temporal en la secreción de estrógenos por el ovario y no a una disminución en la concentración de los mismos como se ha descrito en el ratón timectomizado en los primeros días de vida (Michael, y col. 1980). La similitud del peso del útero de los animales Tx-10 con el del útero de los animales intactos, ambos al primer estro vaginal, apoyan esta interpretación. Al respecto se ha descrito que los estrógenos en el útero (órgano blanco) promueven el crecimiento del endometrio e inducen cambios en la permeabilidad, provocando la acumulación de líquido en el espacio intercelular y el consecuente aumento en el peso del órgano (Steinetz, 1973).

Se ha descrito que la administración de la Timosina F5 a ratones prepúberes, incrementa las concentraciones de estradiol y adelanta la apertura vaginal (Michael y col., 1981; Michael, 1983). Uzumcu y col. (1992) observan que los factores protéicos liberados *in vitro* por las células retículo-epiteliales del timo, estimulan la esteroidogénesis cuando se adicionan al cultivo de células de la granulosa. Esta información permite sugerir que la falta del estímulo tímico desde la etapa infantil, retrasa la secreción de estrógenos.

La extirpación del timo a los 10 días de edad indujo un decremento en el peso de los ovarios a la pubertad y una considerable disminución del crecimiento folicular, lo que podría ser el reflejo de modificaciones en el patrón de secreción de las gonadotropinas. El hecho que la respuesta ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico (5 u.i. de PMSG) haya sido semejante entre las hembras timectomizadas y las intactas, apoyan esta posibilidad.

Una posible explicación de los efectos de la timectomía sobre el crecimiento folicular, podría ser la falta del estímulo hormonal (timosina F5) que tiene este órgano sobre la liberación de la GnRH en el hipotálamo (Rebar

y col. 1981). Se ha mostrado que la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH juegan un papel substancial para determinar el patrón de secreción de la FSH durante la fase infantil (Ojeda y col., 1986). En esta fase, la secreción de la FSH es necesaria para mantener y formar sus propios receptores en el ovario y para inducir un substancial incremento en la actividad del complejo enzimático aromatasa, ejerciendo así un fuerte control sobre el desarrollo folicular y la esteroidogénesis (Schwartz, 1974; Smith-white y Ojeda, 1986; Ojeda y col, 1986).

La atresia es un proceso por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que habiendo iniciado su crecimiento, no ovulan (Dominguez y col, 1991; Husueh y col, 1994). En este caso, no obstante que la respuesta ovulatoria ante el estímulo con 5 u.i. de PMSG fue similar entre los animales intactos y los timectomizados, el desarrollo de los folículos ováricos fue diferente. En la hembra Tx-10, la PMSG promovió el crecimiento folicular incrementando principalmente el número de folículos pequeños, mientras que en los animales intactos, esta hormona redujo la proporción de atresia sin cambios en el crecimiento folicular. Peters y col. (1975) describen en el ratón adulto tratado con PMSG, que el incremento en el número de folículos preovulatorios se debió a una disminución en la proporción de folículos atrésicos grandes, más que a un aumento en el número total de estos folículos. Resultados similares han sido descritos en la rata prepúber en la cual la administración de PMSG permite que los folículos en crecimiento escapen de la atresia (Braw y Tsafirri, 1980; Villavicencio y Domínguez, 1993). El hecho que en los ratones Tx-10 no se presente un efecto similar al administrar 5 u.i. de PMSG sugiere que el timo participa en los mecanismos que modulan el proceso de atresia en respuesta a las gonadotropinas.

La respuesta ovulatoria observada tanto en los animales intactos como en los timectomizados al administrarles 5 u.i. de PMSG, parece ser el reflejo de una sobre estimulación gonadotrópica, sin embargo, las diferencias observadas en la dinámica de la población folicular entre los dos tipos de animales abrió la posibilidad de que esta respuesta en el ratón Tx-10 fuera diferente a la del intacto ante un estímulo gonadotrópico menor.

En hamsters se ha mostrado que el tratamiento con concentraciones supra-fisiológicas de FSH induce la maduración de un número supra-normal de folículos, mientras que con concentraciones bajas de esta hormona el número de folículos que maduran es menor (Moore y Greenwald, 1974). Un efecto similar pudo haber ocurrido en los animales intactos, ya que la administración de concentraciones decrecientes de PMSG provocó la disminución progresiva de la respuesta ovulatoria.

Hage y col. (1978) postulan que las altas concentraciones de FSH presentes en la etapa infantil son necesarias para que los folículos reclutados maduren, adquieran mayor capacidad esteroidogénica y posteriormente algunos de estos ovulen en la pubertad. Tomando en consideración que la disminución en el número de folículos en crecimiento que se induce con la timectomía infantil, probablemente es el reflejo de una deficiencia gonadotrópica, se puede sugerir que el grado de maduración que alcanzan los folículos en el ratón Tx-10 con 1 u.i. de PMSG es menor que en el intacto. El hecho que en los animales Tx-10 la cuota ovulatoria haya sido menor a la de los intactos, ambos tratados en forma secuencial con PMSG y hCG, apoyan esta interpretación.

También se ha descrito en la rata que existe un estado crítico durante el desarrollo folicular (200 a 400 μm de diámetro) cuando los folículos requieren de altas concentraciones de FSH para continuar su crecimiento y

responder al pico de LH subsecuente. Los folículos que no reciben la suficiente FSH durante este estado crítico, están destinados a la atresia (Hirshfield y Midgley, 1978; Hsueh y col. 1994). El análisis de la población folicular de ambos tipos de animales tratados con 1 u.i. de PMSG, indica que en el ratón Tx-10 este estímulo gonadotrópico indujo la entrada de un mayor número de folículos hacia el estado crítico de desarrollo (incremento en el número de folículos de 100 a 300 μm de diámetro), mientras que en el animal intacto provocó el reclutamiento de folículos preovulatorios sanos ($>400 \mu\text{m}$). Este efecto pudo ser el responsable de la disminución en la respuesta ovulatoria observada en el animal timectomizado.

Otra posibilidad es que los folículos ováricos del animal Tx-10 presenten modificaciones en la reactividad a la LH ya que el aumento de la FSH en la etapa infantil también está estrechamente relacionado con la aparición de receptores a la LH (Ojeda y col, 1980).

En resumen el decremento en la población folicular en crecimiento que caracteriza al animal timectomizado a los 10 días sugiere que la falta de timo provoca una deficiencia gonadotrópica misma que puede ser la causa inicial de que los folículos, aunque crezcan ante el estímulo gonadotrópico exógeno, no pueden completar su maduración, efecto que traduciría en una menor respuesta ovulatoria.

Ojeda y col. (1986) mencionan que la serie de eventos que se suceden en la etapa infantil tienen relevancia directa en el inicio de la pubertad. Con base en esto es posible sugerir que las alteraciones que provoca la timectomía realizada a los diez días de edad, son las responsables de las modificaciones observadas en la pubertad.

CONCLUSIONES

En el ratón hembra la ausencia de timo a partir de los diez días de edad:

- retrasa el inicio de la pubertad.
- disminuye el crecimiento folicular, siendo los folículos pequeños los más susceptibles.
- modifica el proceso de atresia en respuesta a las gonadotropinas exógenas.
- disminuye la respuesta ovulatoria inducida.

El ratón timectomizado a los diez días de edad es un buen modelo experimental para continuar con el estudio de la participación del timo en el desarrollo del ovario del animal prepúber, por una vía endócrina más que inmunológica.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, L.A. y STEINER, R.A. (1988). Puberty. *Rev. of Reproductive Biology* **10**, 1-52.

ADVIS, J.P., ANDREWS, W.W. y OJEDA, S. R. (1979). Changes in ovarian steroidal and prostaglandin e responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinol.* **104**, 653-658.

ADVIS, J.P., SMITE-WHITE, S. y OJEDA, S.R. (1981). Activation of growth hormone short loop negative feedback delay puberty in the female rat. *Endocrinol.* **108**, 1343-1352.

AGUILERA, G. y ROMANO, M. (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **123**, 1124-1129.

ANDREWS, W.W., ADVIS, J.P y OJEDA, S.R. (1981a). The maturation of estradiol-negative feedback in female rats: Evidence that the resetting of the hypothalamic "Gonadostat" does not precede the first preovulatory surge of gonadotropins. *Endocrinol.* **109**, 2022-2031.

ANDREWS, W.W., MIZEJEWSK, G.J. y OJEDA, S.R. (1981b). Development of estradiol positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat. A quantitative study. *Endocrinol.* **109**, 1404-1413.

BRAW, R.H. y TSAFRIRI, A. (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reproduc. Fert.* **59**, 267-272.

BESEDOVSKY, H.O y SORKIN, E. (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.

BELLANTI, J.A. (1986). *Inmunología*. 3a ed. Edit Interamericana. México. 662 pp.

CALZOLARI, A. (1898). Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch. Ital. Biol. Torino* **30**, 71-77.

CARTER, J. (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J. Reproduction Fert.* **46**, 211-216.

CHAMBERS, S.P. y CLARKE, A.G. (1979). Measurement of thymus weigh, lumbar node weigh and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* **55**, 309-315.

DABROWSKI, M.P. y DRABROWSKA-BERNSTEIN, B.K. (1990). Immunoregulatory Role of Thymus. Eds. CRC Press, Inc. Florida. 225 p.p.

DARDENNE, M., y BACH, J.F. (1981). Thymic hormones. En: The thymus glands. Kendall, M.D. Eds. Academic Press, New York, 113-131p.p.

DÖHLER, K.D. y WUTTKE, W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinol.* **94**, 1003-1008.

DOMÍNGUEZ, R., CHÁVEZ, R. y CRUZ M.E. (1991). La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: Tópicos selectos en Biología de la Reproducción. Editor: Roberto Domínguez. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 396 pp.

FINK, G. (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog. Oxf.* **70**, 403-423.

FORD, J., VAKHARIA, D., ANDERSON, L y KLINDT, J. (1990). Thymosin- β 4 concentrations during the estrous cycle and after hypophyseal stalk transection of female pigs. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **193**, 185-189.

FRANCHIMONT, P.M., HAZEE-HAGELSTEIN, T.C., CHARLEST-RENAR, J., JASPAR, M. y HENNEN, G. (1991). Some basic mechanisms of ovulation. En: The study of ovulation. Boutaleb, Y. y Gzoull, A.. Eds. Parthenon Publishing Group, New Jersey , 3-8.

FRAWLEY, L.S. y HENRICKS, D.M. (1979). Mode of gonadotropin secretion in infantil female rats and the role of estrogen in feedback regulation. *Endocrinol.* **105**, 1064-1072.

FREEMAN, M.E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a. ed. Knobil, E. Neill, J. y col. Eds. New York, 1699-1737.

GOLDMAN, B.D. (1981). Puberty. En: *Neuroendocrinology of Reproduction*, Alder, N.T. Plenum Press. New York y London., 229-239.

GOLDSTEIN, A.L. (1984). Thymic hormones and Lymphokines. Plenum Press, New York, 669.

GOLDSTEIN, A.L., LOW, T., THURMAN, G., ZATZ, M., HALL, N., CHEN, J., HU,S-K., NAYLOR, P. y McCLURE, J. (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* **37**, 369-415.

GROSSMAN, C.J. (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* **5**, 435-455.

GROSSMAN, C.J. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.

GORE-LANGTON, R.E. y ARMSTRONG, D.T. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a ed. Eds. Knobil, E. Neill, J. y col. Eds. New York, 571-627.

HAGE, A.J., GROEN-KLEVANT, A.C. y WELSCHEN, R. (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta endocr.* **88**, 375-382.

HALL, N.R y GOLDSTEIN, A.L. (1987). Thymosin modulation of the immune system. En: *The Neuro-Immune-Endocrine Connection*. Cotman, C.W., Brinton, R.E., Galaburda, A., McEwen, B., Schneider, D.M., Eds. Raven Press, New York, 59-69.

HAM, A.W. (1975). Tratado de histología. 7a ed. Interamericana S.A de C.V. México. 935 pp.

HARRISON, R.J. y WEIR, B.J. (1977). Structure of the mammalian ovary. En: *The ovary*. Zuckerman, L. y Weir, B.J. Eds. Academic Press, New York, 113-227.

HATTORI, M. y BRANDON, M.R. (1979). Thymus and the endocrine system: ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J. Endocrinol.* **83**, 101-111.

HINOJOSA, L.B. (1994). Estudio de los efectos del injerto de timo sobre la pubertad espontánea e inducida en el ratón alopecico-hipotímico. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 47pp.

HIRSHFIELD, A.N. y MIDGLEY Jr. R. (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biol. Reprod.* **19**, 606-611.

HIRIART, M. y ROMANO, M.C. (1986). Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor. *Life Sci.* **38**, 789-795.

HSUEH, A.J.W. BILLING, H. y TSAFRIRI, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonal controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* **15**, 707-724.

ISHIDATE, M. y METCALF, D. (1963). The pattern of lymphopoiesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **41**, 637-649.

JIA, X.C., KALMIJIN, J. y HSUEH, A.J. W. (1985). Growth hormone enhances follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* **118**, 1401-1409.

KOSIEWICZ, M.M. y MICHAEL, S.D. (1990). Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J. Reprod. Fert.* **88**, 427-440

LINDNER, M.D. (1990). Anatomía clínica. El Manual Moderno S.A de C.V. México. 706 pp.

LOW, T. y GOLDSTEIN, A.L. (1984). Thymosins: Structure, function and therapeutic applications. *Thymus* **6**, 27-42.

MACKINNON, P.C.B., MATTOCK, J.M. y TER HAAR, M.B. (1976). Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. *J. Endocrinology* **70**, 361-371.

MEIJS-ROELOFS, H.M.A., KRAMER, P. y SANDER, H.J. (1983). Changes in serum concentrations of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. *J. Endocrinology* **98**, 241-249.

MENDOZA, M.E. y ROMANO, M. (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus*, **14**, 233-242.

MICHAEL, S.D. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: Factors Regulating Ovarian Function. Greenwald, G.S y Terrenova, P.F. Eds. Raven Press, New York, 445-464 pp.

MICHAEL, S.D., DE ANGELO, L. y KAIKIS-ASTARAS, A. (1990). Plasma protein and hormone profiles associated with autoimmune oophoritis and ovarian tumorigenesis in neonatally thymectomized mice. *Autoimmu.* **6**, 1-12.

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

MICHAEL, S.D., TAGUCHI, O., NISHIZUKA, Y., McCLURE, J.E., GOLDSTEIN, A.L. y BARKLEY, M.S. (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin alfa I. En: Dynamics of Ovarian Function. Schwartz, N.B y Hunzicker-Dunn, M. Eds. Raven Press, New York, 279-284 pp.

MOORE, P.J. y GREEWALD, G.S. (1974). Effect of hypophysectomy and gonadotropin treatment on follicular development and ovulation in the hamster. *Am. J. Anat.* **139**, 37-48

MORGAN, D.D. y GROSSMAN, C.J. (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* **7**, 279-286.

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

NISHIZUKA, Y. y SAKAKURA, T. (1971). Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinol.* **89**, 886-893.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

NISHIZUKA, Y., SAKAKURA, T., TSUJIMURA, T. y MATSUMOTO, K. (1973). Steroid biosynthesis *in vitro* by dysgenetic ovaries induced by neonatal thymectomy in mice. *Endocrinol.* **93**, 786-792.

OJEDA, S.R., AGUADO, L.I. y WHITE, S.S. (1983). Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: the rats as a model. *Neuroendocrinol.* **37**, 306-313.

OJEDA, S.R., ANDREWS, W.W., ADVIS, J.P. y SMITH-WHITE, S. (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Rev* **1**, 228-257.

OJEDA, S.R. y URBANSKI, H.F. (1988). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. Neill, J. y col. Eds. New York, 1699-1737.

OJEDA, S.R. y URBANSKI, H.F. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a.ed. Knobil, E. Neill, J. y col. Eds. New York, 1699-1737.

OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. y AHMED, C.E. (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Recent Progress in hormone Research* **42**, 382-442.

PEDERNA, E., DIAZ-OSUNA, J. y CALCAGNO, M. (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sci.* **38**, 779-787.

PETERS, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Act. endocrinologica* **62**, 98-116.

PETERS, H. (1978). Folliculogenesis in mammal. En: *The vertebrate ovary. Comparative Biology*. Jones, R.E. New York. Plenum Press, 121-145.

PETERS, H. (1979). Some aspects of early follicular development. En: *Ovarian Follicular Development and Function*. Midgley, A.R. y Sadler, W.A. Eds. New York. Raven Press, 1-13.

PETERS, H., BYSKOV, A.G., HIMELSTEIN-BRAW, R. y FABER, M. (1975). Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fert.* **45**, 559-566.

RAMALEY, J.A. (1980). Biological clocks and puberty onset. *Federation Proc.* **39**, 2355-2359.

RAMIREZ, V.D. (1973). Endocrinology of puberty. En: Handbook of physiology. American Physiological Society. Washington, D.C. 1-29.

RAMIREZ, V. y Mc CANN. (1963). A comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinol.* **72**, 1158-1168.

RAYNAUD, J.P. (1973). Influence of rat estradiol binding plasma protein (EPB) on uterotrophic activity. *Steroids* **21**, 249-258.

RAVIOLA, E. (1989). Timo. En: Bloom Fawcett Tratado de Histología. Fawcett, D.W. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México, 441-450 pp.

REBAR, R.W., MIYAKE, A., LOW, T.L.K. y GOLDSTEIN, A.L. (1981). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* **214**, 669-671.

REITER, R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammalian. *Endocrinol. Rev.* **1**, 109-131.

RICHARDS, J.S. (1978). Hormonal control of follicular growth and maturation in mammalian. En: The vertebrate ovary. Ed, Richards J.S. Plenum Press, New York, 331-360.

RICHARDS, J.S., IRELAND, J.J., RAO, M.C., BERNATH, G.A. MILDLEY, A.R. y REICHERT, L.E. (1976). Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinol.* **99**, 1562.

ROITT, I., BROSTOFF, J. y MALE, D. (1993). Inmunology. 3a ed. Editorial Consultant, Inglaterra, 3.1-3.6.

ROSAS, P. e HINOJOSA, L. (1993). Efectos de la estimulación gonadotrópica sobre el crecimiento folicular en el ovario de ratones prepúberes normales e hipotímicos. XIII Reunión de ALIRH. Buenos Aires, Argentina. L 44.

ROSS, M.H., REITH, E.J. y ROMRELL, L.J. (1992). Histología. 2a. ed. Panamericana. México, 749 p.p.

SAKAKURA, T. y NISHIZUKA, Y. (1972). Thymic control mechanism in ovarian development: reconstitution of ovarian dysgenesis in thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissues. *Endocrinol.* **90**, 431-437.

SCHWARTZ, N.B. (1974). The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol. Repro.* **10**, 236-272.

SHOLITON, L.J. GROSSMAN, C.J. y TAYLOR, B.B. (1980). Rat thymic homogenates convert testosterone to androgenic metabolites. *J. Steroid Biochem* **13**, 1365-1369.

SMITH-WHITE, S. y OJEDA, S.R. (1981). Changes in luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of rat. *Endocrinol.* **109**, 152-161.

SMITH-WHITE, S. y OJEDA, S.R. (1983). Peripubertal decline in ovarian LHRH receptor content: Characterization and distribution. *Neuroendocrinol.* **36**, 449-456.

SMITH-WHITE, S. y OJEDA, S.R. (1986). Neonatal release of gonadotropin is essential for development of ovarian FSH receptors. *Biol. Reprod.* **34**, 219-228.

SPANGELO, B.L., JUDD, A.M., ROSS, P.C., LOGIN, I.S., JARVIS W.D., BADAMCHIAN, M., GOLDSTEIN, A.L. y MACLEOD, R.M. (1987). Thymsin Fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinol.* **121**, 2035-2043.

STEINETZ, B.G. (1973). Secretion and function of ovarian estrogen. En: Handbook of Physiology. Greep, R. O. y Astowood. American Physiological Society, Washington. 439-466.

URBANSKI, H.F. y OJEDA, S.R. (1985). The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinol.* **117**, 644-649.

URBANSKI, H.F. y OJEDA, S.R. (1986). The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats in ovary dependent. *Endocrinol.* **118**, 1187-1193.

UZUMCU, M., AKIRA, S. y LIN, Y.C. (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Sciences* **51**, 1217-1228.

VANDENBERGH, J.G. (1983). Phomonal regulation of puberty. En: *Pheromones and Reproduction in Mammals*. Vandenberg, J.G Ed. Academic Press, London, 95-112.

VILLAVICENCIO, J. y DOMÍNGUEZ, R. (1993). Differences in follicular growth and atresia induced by gonadotrophin stimulation in pre-pubertal rats are age-dependent. *Med. Sci. Res.* **21**, 361-362.