

192  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"INFLUENCIA DE FACTORES DERIVADOS DEL  
TIMO DE BOVINO SOBRE LA PRODUCCION  
ENDOCRINA DEL TESTICULO *in vitro*".

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 N :  
CEYDE SILVA MADRID  
MARIA DEL CARMEN SOLANO AGAMA



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"INFLUENCIA DE FACTORES DERIVADOS DEL TIMO DE BOVINO  
SOBRE LA PRODUCCION ENDOCRINA DEL TESTICULO in vitro".

realizado por Ceyde Silva Madrid y  
María del Carmen Solano Agame.  
con número de cuenta 1631200-3 y, pasante de la carrera de Biología.  
8536746-3

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	
Propietario	Dra. Marta Cetzilina Romero Pardo.
Propietario	Dra. María Luisa Fanjul Peña.
Propietario	M. en I.B.B. Saúl Cano Colín.
Suplente	M. en C. Silvia Devars Remos.
Suplente	Biol. Víctor Manuel Coffe Ramírez.

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL  
DE BIOLOGIA

## *Reconocimiento*

El presente trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Marta C. Romano Pardo.

*Dedicatorias*

*A Dios que está presente en cualquier lugar, momento y circunstancia de la vida habitando muy dentro de mí...*

*A mis padres*

*Esperanza y Néstor, por su cariño y apoyo en todo momento, a ti mamá por ser un ejemplo a seguir en todos aspectos y por ser parte esencial de lo que soy, a ti papá por tu espíritu de lucha y responsabilidad ante los problemas cotidianos.*

*A mis hermanos*

*Saydee y Néstor porque a pesar de las circunstancias de la vida hay alguien muy importante para mí que me enseñó a quererlos desde muy pequeña, espero que siempre estemos juntos...*

*Cynthia, Antonio y Raymundo por lo que hemos pasado juntos, momentos tristes y felices, y que a pesar de todo está el amor que nos une..*

*A mis primos*

*Anrón y Verónica porque a pesar de la adversidad de la vida tienen que seguir adelante...*

*A la memoria de*

*mis abuelitos, Raúl y Nachita, por las vivencias con ellos a través del corto tiempo que pasé a su lado y siempre añorando este momento...*

*mi tío, Víctor, porque su recuerdo es una demostración de que aunque todo esté perdido siempre hay que luchar por la vida que se tiene...*

*Ceyde*

*A Dios, por darme siempre lo mejor, a ti te debo lo que soy*  
*Gracias Señor*

*A mis padres*  
*Especialmente a tí mamá, por tu cariño, ejemplo de lucha, por*  
*enseñarme y ayudarme siempre a salir adelante*

*Al padre José Luis González López (in memoriam),*  
*por su ejemplo, sus consejos y enseñanzas*

*A mis hermanos Jema, Ana Luisa, Graciela y Juan Pablo*

*A tí Héctor Guillermo*  
*por tu amistad incondicional, por los momentos que pasamos*  
*juntos en la Preparatoria, por tu ayuda y apoyo demostrándome*  
*SIEMPRE que eres mi mejor amigo*

*Carmen*

## *Agradecimientos*

Especialmente a nuestra directora de tesis la Dra. Marta C. Romano Bardo, por ser la guía para llevar a cabo este trabajo por su confianza, comprensión, consejo, apoyo moral y económico muchísimas gracias.

A la Dra. María Eugenia Mendoza Garrido por su disposición y atención, siempre amable, para ayudarnos ante cualquier situación.

Al Dr. Burstein del Instituto Weizmann, Rehovot Israel, por proporcionarnos el Factor Timico Humoral (T<sub>H</sub>1) utilizado en este trabajo.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández del Departamento de Biología Celular del UNIVESTAV-JM, por facilitarnos el equipo de ultrafiltración AMCCM.

A cada uno de los sinodales Dra. María Luisa Sanjul Peña, M en J.B.B. Saúl Cano Colín, M. en C. Silvia Devares Ramos y Biol. Víctor Manuel Coffe Ramírez por sus observaciones, comentarios y el tiempo dedicado en la revisión final de este trabajo.

*A Arturo Nieto por su paciencia, consejos, ayuda desinteresada en pocas palabras por ser un amigo incondicional..*

*A Paty y Manuel por la asesoría en cuanto al manejo de las técnicas utilizadas en este trabajo y sobre todo por su amistad*

*A Luz Ma., Mario, Raúl, Jesús, Yola, Carolina, Claudia, Armando, Martha Elena, Luis Enrique, Ricardo y Alfonso por su compañerismo durante la convivencia cotidiana en el laboratorio*

*A nuestro amigo, Ignacio Arnoz 'Macho' por su tiempo y paciencia para la realización de los esquemas y/o dibujos que se muestran en esta tesis*

*A nuestros amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias  
Generación 1989-1991*

*María Ana Ramírez, Oscar Osorio, Mabel Hernández,  
Martha Elena Cruz, María Luisa Aguilar, Guadalupe Santiago,  
Laura Zariñana, Betzabé Flores, Pablo Linares, Iris González,  
Omar Vences, Francisco Jurado, entre otros, por los momentos  
que compartimos*

*Finalmente, este trabajo fue apoyado por la Secretaría Académica del CONVESTAV UNAM a la cuenta de la partida de becas del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, y con el donativo de CONACYT a la Dra. Marta Romano con el número de proyecto 1276-N9204.*

## INDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCION .....	3
2.1. Sistema Neuroendocrino .....	5
2.1.1. Glándulas endocrinas .....	6
2.1.2. Clases de Hormonas .....	7
2.1.3. El sistema endocrino relacionado a la reproducción .....	15
2.1.4. Las hormonas esteroides sexuales .....	18
2.1.5. Biosíntesis de hormonas esteroides .....	25
2.2. Sistema Reproductor .....	33
2.3. Sistema Inmunológico .....	38
2.3.1. Relación de los Sistemas Inmunológico y Neuroendocrino .....	42
2.3.2. Efecto de la timectomía sobre el desarrollo de las gónadas .....	46
2.4. Antecedentes Experimentales .....	50
2.4.1. Factor Tímico Humoral (THF- $\gamma$ 2) .....	50
2.4.2. Fracción Tímica .....	51
2.4.2.1. Técnicas utilizadas en la purificación de la FT .....	52
a) Cromatografía de Filtración Molecular .....	53
b) Cromatografía de Afinidad .....	58
3. HIPOTESIS .....	60
4. OBJETIVOS .....	61
4.1. Objetivo general .....	61
4.2. Objetivos particulares .....	61
5. MATERIAL Y METODOS .....	63
5.1. Material biológico .....	63
5.2. Preparación del polvo acetónico de Timo .....	63
5.3. Cromatografía de Filtración Molecular .....	65
5.4. Efecto del Factor Tímico Humoral (THF- $\gamma$ 2) sobre la producción .....	66
de esteroides .....	66
5.5. Bioensayo de Células Testiculares .....	70
5.6. Radioinmunoanálisis de Testosterona .....	75
5.7. Cuantificación de proteínas .....	77
5.8. Cromatografía de Afinidad (Heparina-Sepharosa) .....	77
5.9. Estadística .....	78

6. RESULTADOS .....	80
6.1. Calibración de la Columna de Filtración Molecular. Obtención y cuantificación de proteínas de la FTB .....	80
6.1.1. Efecto de la FTB I.- Dependencia de la dosis utilizada .....	83
6.1.2. Efecto de la FTB II.- Dependencia del tiempo de aplicación .....	88
6.2. Curva Dosis-Respuesta al THF- y 2 .....	91
6.3. Cromatografía de Afinidad .....	92
7. DISCUSION .....	96
8. CONCLUSIONES .....	107
9. BIBLIOGRAFIA .....	108
10. APENDICE .....	118
10.1. Reactivos utilizados .....	118
10.2. Preparación de soluciones y reactivos .....	120

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Col</b>	Colesterol
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropinas
<b>DHT</b>	Dihidroxitestosterona
<b>E</b>	esteroide
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y de adenina
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>FT</b>	Fracción tímica
<b>FTB</b>	Fracción tímica de bovino
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
<b>GMP</b>	Monofosfato de guanosina
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>hCG</b>	Hormona gonadotropina coriónica humana
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta presión
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL-1 o 2</b>	Interleucina 1 o 2
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nucleótido de nicotinamida y de adenina oxidado
<b>NADPH</b>	Fosfato del dinucleótido de nicolinamida y de adenina reducido

<b>pH</b>	Concentración de iones hidrógeno
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>THF-<math>\gamma</math> 2</b>	Factor tímico humoral
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de la tiroides
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la tiroides

### Simbolos

<b>C</b>	Carbono
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio

### Simbolos del Sistema Internacional de Unidades (SI)

<b>Da</b>	Daltons	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>kDa</b>	kilodaltons	<b>IU</b>	Unidades Internacionales
<b>M</b>	molar		
<b>mM</b>	milimolar		
<b>nm</b>	nanómetro		
<b>PM</b>	Peso molecular		

### Otras

<b>DS</b>	Desviación estándar
<b><math>\bar{X}</math></b>	Media aritmética

## 1. RESUMEN

El Sistema Inmunológico está relacionado con otros sistemas del organismo, entre ellos, el Nervioso Central y el Endocrino. Están comunicados entre sí a través de neurotransmisores y hormonas, constituyendo uno solo: el Neuroinmunoendocrino.

El sistema inmunológico puede regular las funciones neuroendocrinas y, a su vez, el sistema neuroendocrino influye en el inmunológico, es decir, se establece una interacción bidireccional. Es así que, entre las hormonas del sistema endocrino que intervienen en la regulación del sistema inmunológico se pueden mencionar los glucocorticoides y las gonadotropinas, prolactina, estrógenos y andrógenos y, por otro lado, están los factores producidos por el sistema inmunológico que influyen en el sistema endocrino como las interleucinas, el interferón, timosinas y otros factores tímicos aún no caracterizados totalmente.

Se ha demostrado que el timo de la rata contiene una fracción que interfiere con la unión a la gonadotropina coriónica humana (hCG) al receptor testicular. La liberación de esta fracción al medio de incubación de timo varía con la edad del animal (Reyes-Esparza, J.A., y Romano, M.C. 1989) y son las células reticuloepiteliales del timo las responsables de su producción (Martín, D., y Romano, M.C. 1992). Dado que el timo produce hormonas que participan en la función inmunológica, se decidió investigar si se encuentran factores que regulan la esteroidogénesis testicular. Para ello se obtuvo una fracción tímica a partir de un extracto acetónico de timo de bovino (FTB) que se eluyó en una columna de filtración molecular (Sephadex G-75 superfino) obteniéndose fracciones cromatográficas a las cuales se les probó su actividad biológica en bioensayos de

células de testículo de rata adulta, previa concentración en un sistema de ultrafiltración AMICON dotado de membranas de corte de 10 000 Da. Para realizar el bioensayo, se obtuvieron los testículos y se disociaron con colagenasa, obteniéndose una suspensión celular de la cual se tomaron 100  $\mu$ l para cada matraz que contenía medio de cultivo DMEM+ABS+XANTINA+HEPES, diferentes dosis de la FTB y una dosis de hCG (1mU/ml) todo ésto se incubó a 34°C y en periodos de tiempo de acuerdo al protocolo establecido para cada experimento. Al finalizar los periodos de incubación correspondientes se obtuvo el medio en el cual se cuantificaron las concentraciones de testosterona por medio de Radioinmunoanálisis. Los resultados muestran que la FTB no modifica la secreción basal de testosterona secretada por las células de Leydig ya que se mantiene sin cambio alguno, de las dos hasta las seis horas de incubación; sin embargo, modifica la secreción estimulada con hCG, es decir, inhibe su respuesta. Además se observó que el efecto inhibitorio de la FTB era dependiente de la concentración de proteína, ya que a mayor cantidad de proteína mayor inhibición. El efecto inhibitorio de la FTB se observó a partir de las dos horas de incubación hasta las seis horas. Se investigó también el efecto del Factor Tímico Humoral (THF- $\gamma$  2). En presencia de THF- $\gamma$  2 en el medio de incubación no se modificó la secreción basal de testosterona. Sin embargo, en la secreción dependiente de hCG, se observó que a dosis altas de THF- $\gamma$  2 se presentó una ligera estimulación de la secreción de testosterona que es evidente entre las 3 y 5 horas de incubación, aunque no es estadísticamente significativo.

En este trabajo se demostró que en el timo de bovino existe una fracción (FTB) que modula la secreción de testosterona en células de testículo de rata adulta *in vitro* y que el THF- $\gamma$  2 no presenta el mismo efecto inhibitorio de la FTB.

## 2. INTRODUCCION

Históricamente, el campo de la inmunología y la reproducción se consideraron como disciplinas biológicas separadas. La relación entre estos campos y las primeras investigaciones que revelaron dicha relación se publicaron al final del siglo pasado, cuando todavía no se identificaban los órganos primarios y secundarios responsables de la inmunidad. Esos experimentos fueron repetidos varios años más tarde, confirmándose que el peso y la morfología del timo se modificaban significativamente después de practicar la castración de animales de laboratorio. En 1898 Calzolari observó que la castración del conejo producía hipertrofia del timo. En aquel tiempo, esto pareció no considerarse de mucha importancia. Sin embargo, setenta años después de la publicación de Calzolari, sus investigaciones habían empezado a reconocerse y a tomar énfasis las interacciones entre el sistema inmunológico y reproductivo. En 1938, Hugo Chiodi hizo un análisis de la influencia del timo sobre las gónadas y lo presentó en su libro "El Timo en relación con el crecimiento y la función sexual", concluyendo que la castración producía una hipertrofia del timo tanto en ratas albinas prepúberes como en adultas, ya que evitaba la involución fisiológica del timo que se produce alrededor de la pubertad. Demostró además que era un fenómeno dependiente de las hormonas esteroideas sexuales. A su vez, estudió la acción de la timectomía sobre los órganos sexuales, sin embargo Chiodi llegó a concluir que no quedaba todavía demostrado que la timectomía ejerciera alguna influencia sobre la función sexual, dado que no había conclusiones claras en los experimentos realizados hasta esa fecha.

Posteriormente, se han reportado varios trabajos que apoyan la interacción entre los tres sistemas: el nervioso central, endocrino e inmunológico,

constituyendo lo que se denomina sistema neuroinmunoendocrino. Se sugirió entonces que existe una compleja red constituida de diferentes estructuras y células capaces de emitir y recibir señales bidireccionales y que parecen ser reguladas por hormonas provenientes del eje hipotálamo-hipófisis, gónadas y timo.

Aunque este campo en parte fue definido en 1977, su origen es mucho más temprano ya que desde 1926, Metalnikov y Chorine mostraron que, para respuestas fisiológicas similares, las reacciones inmunológicas podrían ser condicionadas. La conclusión de estos estudios fue que el sistema nervioso central participa en la respuesta inmunológica. Con la integración de las neurociencias y la endocrinología y el desarrollo del concepto de stress se llega a una posible explicación del por qué el sistema inmunológico puede estar regulado por el sistema nervioso central. Dicha explicación en parte reside en las observaciones de Selye sobre la involución del timo durante el stress. El timo se reconoce actualmente como un importante órgano para la maduración de los linfocitos y por otra parte los glucocorticoides adrenales, que son liberados durante el stress, producen importantes cambios en el sistema inmunológico. Tal vez, el avance más importante en neuroinmunoendocrinología es el reconocimiento de que el sistema inmune puede modular las funciones neuroendocrinas, a través de una comunicación bidireccional entre ellos, que se mencionó anteriormente (Blalock, J.E., 1989).

## 2.1. Sistema Neuroendocrino

El Sistema Nervioso constituye a la vez el centro de regulación y la red de comunicaciones del cuerpo. En los seres humanos lleva a cabo diferentes funciones, una de ellas es la de estimular a los músculos para que produzcan el movimiento, regula el funcionamiento corporal, en unión con el sistema endocrino tiene como función el control de los mecanismos de adaptación que impiden que distintos factores ambientales perturben el equilibrio del organismo. Para cumplir con sus objetivos de funcionamiento, posee sectores con características funcionales específicas, sus órganos sensoriales se han especializado para percibir con extrema sensibilidad varias formas de energía que constituyen el estímulo adecuado de sus receptores (Ninomiya, J.G., 1991).

Se divide al Sistema Nervioso en dos partes principales: central y periférico. El Sistema Nervioso Central (SNC) es el centro de regulación de ambas partes del sistema nervioso, consiste en médula espinal y encéfalo (bulbo raquídeo, mesencéfalo, diencefalo, telencefalo y cerebelo). Todas las sensaciones que requieren interpretación y respuesta llegan desde los receptores al sistema nervioso central, y por este último pasan todos los impulsos nerviosos que desencadenan la contracción muscular y la producción de secreciones en las glándulas. Las prolongaciones nerviosas que conectan el encéfalo y la médula espinal con receptores, músculos y glándulas constituyen el sistema nervioso periférico (SNP).

Así, dentro del sistema nervioso central se encuentra el encéfalo, en el que una de sus divisiones es el diencefalo que consiste principalmente en dos estructuras: el tálamo y el hipotálamo, este último es una pequeña porción del diencefalo. A pesar de su pequeño tamaño, incluye núcleos que regulan muchas

actividades corporales, la mayor parte de ellas vinculadas con la homeostasis. Como funciones principales tenemos que es el intermediario principal entre el sistema nervioso y el endocrino, que son los dos sistemas de control más importantes del organismo. El hipotálamo se encuentra exactamente por arriba de la hipófisis; cuando el hipotálamo recibe señales de cambios corporales, libera sustancias químicas denominadas factores de regulación, que estimulan o inhiben, entre otras, la actividad del lóbulo anterior de la hipófisis. Este último liberará o retendrá las hormonas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, o las vinculadas con la actividad sexual.

Desde el punto de vista filogenético, el hipotálamo es una estructura antigua, que permanece constante en el cerebro de la mayoría de los vertebrados terrestres. En el hombre, constituye menos del 1% del volumen total cerebral, sin embargo, el gran número de circuitos neuronales que lo forman, participan en la mayor parte de las funciones vitales, como el control de la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la osmolaridad de la sangre y la ingestión de agua y alimentos. El hipotálamo es el sitio de integración de dichas funciones, para las cuales estos circuitos activan directamente a las neuronas del sistema nervioso autónomo. Posee además una integración con el sistema endocrino, a través de las neuronas hipotalámicas específicas comunicadas con la hipófisis (Ninomiya, J.G., 1991).

### **2.1.1. Glándulas endocrinas**

Hay dos tipos de glándulas, aquellas denominadas exocrinas, ya que liberan su secreción en conductos que la transportan hacia cavidades o hacia la superficie corporal; incluyen las glándulas sudoríparas, sebáceas, mucosas y digestivas. Y otras llamadas endocrinas que liberan su secreción en el espacio

digestivas. Y otras llamadas endocrinas que liberan su secreción en el espacio extracelular que rodea a las células secretorias, la que después pasa a los capilares y de ahí a la sangre; las glándulas de este tipo incluyen la hipófisis, suprarrenales, tiroides, paratiroides, páncreas, testículos, ovarios, timo. Consideradas en conjunto constituyen el Sistema Endocrino (Fig 1).

Las secreciones de las glándulas endocrinas reciben el nombre de hormonas, son moléculas sintetizadas y secretadas por células especializadas que viajan por el torrente sanguíneo para ejercer su efecto en las células blanco a cierta distancia de su lugar de origen; o bien actúan en forma paracrina o autocrina. La acción específica de una hormona está determinada por la presencia de receptores hormonales específicos en las células blanco. Sin embargo, la respuesta celular está determinada por la información genética de la célula en particular. Debido a esto, una misma hormona puede tener una acción diferente en tejidos diferentes.

### **2.1.2. Clases de Hormonas**

Las hormonas tienen diversos tamaños moleculares, desde péptidos pequeños hasta constituir proteínas. A partir de la relación de las propiedades químicas de las hormonas con su acción fisiológica, generalmente nos permite dividir las en:

- 1) proteínas y glicoproteínas
- 2) esteroides
- 3) aminas ó derivados de aminoácidos.

Las hormonas peptídicas que pueden poseer desde 3 hasta 200 restos de aminoácidos, incluyen a todas las hormonas del hipotálamo y de la hipófisis, así como la insulina y el glucagón del páncreas. Las hormonas esteroides, que son

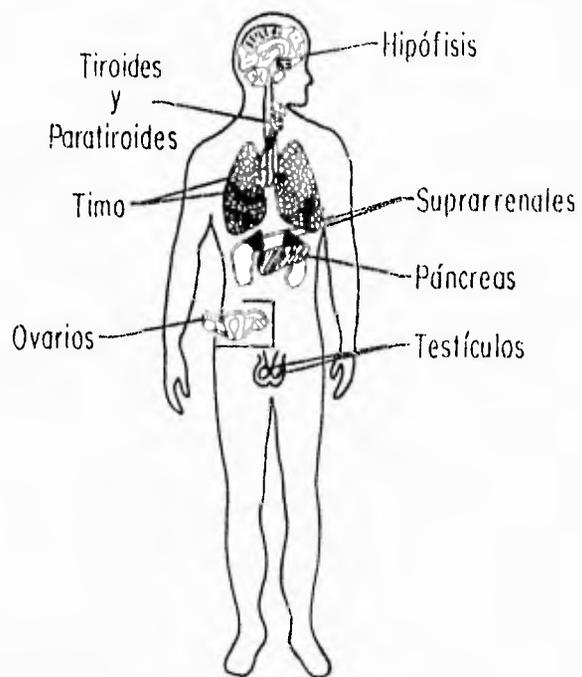


Fig 1. Ubicación de las glándulas endocrinas que, en conjunto, constituyen el Sistema Endocrino (Tomado de Ninomiya. Fisiología Humana. 1991).

liposolubles, comprenden a las hormonas adrenocorticales, los andrógenos y los estrógenos. Las hormonas con función amina, son compuestos pequeños, solubles en agua que contienen grupos amino, comprenden entre otras a las hormonas tiroideas (Tabla 1).

<b>Péptidos y Proteínas</b>			
<b>Glicoproteínas</b>	<b>Polipéptidos</b>	<b>Esteroides</b>	<b>Aminas</b>
Hormona Foliculo-estimulante (FSH)	Hormona Adrenocorticotropina (ACTH)	Aldosterona	Epinefrina
Hormona luteinizante (LH)	Oxitocina	Cortisol	Norepinefrina
Gonadotropina coriónica-humana (hCG)	Prolactina	Estradiol	Tiroxina (T <sub>4</sub> )
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	Glucagon	Testosterona	Dopamina
	Vasopresina (ADH)	Vitamina D	
	Somatostatina		
	Hormona paratiroides		
	Hormona estimulante de los melanocitos (MSH)		
	Insulina		
	Hormona de crecimiento		

Tabla 1. Clases de hormonas basadas en su estructura (Tomado de Greenspan. Basic and Clinical Endocrinology. 1986).

La hipófisis secreta hormonas que regulan tantas actividades corporales que se le ha llamado "glándula maestra". La hipófisis se localiza en el cerebro, inmediatamente detrás del quiasma óptico, como una prolongación del piso del hipotálamo. Es una estructura de forma casi esférica y de sólo 1.3 cm de diámetro. Se aloja en la silla turca del esfenoides y está unida al hipotálamo por medio del infundíbulo que tiene forma de tallo.

La hipófisis está dividida, desde el punto de vista estructural y funcional, en lóbulos anterior y posterior, ambos conectados con el hipotálamo. El lóbulo anterior o adenohipófisis deriva del endodermo, contiene numerosas células epiteliales glandulares y constituye la parte glandular de la hipófisis; un sistema de vasos sanguíneos la conecta con el hipotálamo. El lóbulo posterior o neurohipófisis deriva del ectodermo e incluye los extremos axónicos de neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en el hipotálamo, el tejido de sostén de dichas fibras consiste en células gliales (neuroglia). El lóbulo anterior de la hipófisis libera hormonas que regulan diversas actividades corporales, desde el crecimiento hasta la reproducción. Tal liberación es estimulada o inhibida por sustancias químicas secretadas por el hipotálamo, que reciben el nombre de factores de regulación, como anteriormente se mencionó. Desde la cuarta o quinta semanas del desarrollo en los embriones humanos se empiezan a encontrar algunos neuropéptidos hipotalámicos relacionados con el control de las secreciones de la hipófisis anterior; son factores liberadores o inhibidores de dichas secreciones (Fig 2).

A su vez la hipófisis anterior secreta una diversidad de hormonas que regulan a otras glándulas endocrinas (hormonas tróficas) o influyen de manera directa en el metabolismo de los tejidos blanco, no endocrinos. Así, la extirpación de la hipófisis es seguida por atrofia de glándulas y órganos sexuales, por involución de la tiroides, paratiroides y corteza suprarrenal y una consecuente

depresión de sus funciones. Además hay trastornos directos en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos.

La secreción hormonal de la hipófisis anterior es modulada por factores u hormonas reguladoras producidas en el hipotálamo. La eminencia media del hipotálamo está conectada directamente a la hipófisis por el tallo hipofisiario. Dentro de este tallo se encuentra un sistema porta de vasos sanguíneos necesarios para mantener la actividad secretoria normal de la glándula hipófisis. Los factores reguladores que se originan en las terminaciones de las fibras nerviosas hipotalámicas son transportados a través de los capilares de la eminencia media, que desembocan en los vasos porta que los conducen a la hipófisis anterior. Se han descrito factores reguladores que pueden afectar la síntesis, así como la secreción de hormonas hipofisiarias específicas.

La función más característica de la hipófisis anterior es la elaboración de hormonas que influyen sobre las actividades de otras glándulas endocrinas, principalmente las que tienen que ver con la reproducción y el stress. A estas hormonas se les ha llamado hormonas tróficas las que son transportadas por la sangre a otras glándulas blanco e intervienen en el mantenimiento del estado trófico de las mismas y regulan la producción de sus respectivas hormonas en el órgano blanco. Por esta razón, ocurre la atrofia y la declinación funcional de muchas glándulas endocrinas en el hipopituitarismo o después de la hipofisectomía.

Las hormonas secretadas por la adenohipófisis que estimulan las gónadas son llamadas gonadotropinas, entre ellas, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), sustancias tróficas que influyen sobre la función y maduración del testículo y del ovario. Su secreción es regulada por un solo factor liberador hipotalámico, la hormona liberadora de las hormonas

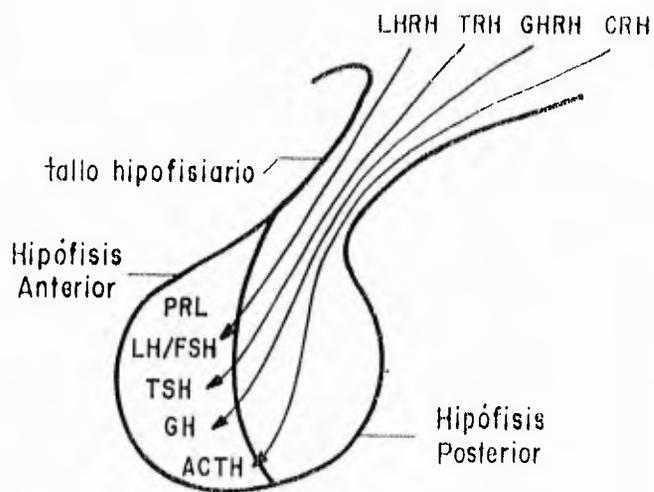


Fig 2. La hipófisis mostrando el lóbulo anterior y posterior en los cuales se divide (Tomado de Barr. El Sistema Nervioso Humano: un punto de vista anatómico. 1986).

luteinizante y estimulante del folículo (LH/FSH-RH) también llamada hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La LH/FSH-RH actúa directamente sobre la hipófisis para aumentar el monofosfato de adenosin cíclico (AMP<sub>c</sub>) y la liberación de las gonadotropinas.

A grandes rasgos, la FSH se une a receptores específicos sobre la membrana plasmática de sus células blanco, provocando la activación de la adenilato ciclasa y el aumento del AMP<sub>c</sub>. Promueve el desarrollo folicular, prepara al folículo para la acción de la LH y favorece la producción de estrógenos a través de la inducción de la aromatasa que convierte testosterona a estradiol. En el hombre, estimula el crecimiento del túbulo seminal y desempeña un papel importante en las etapas primarias de la espermatogénesis. La LH, por el contrario, estimula en la mujer la maduración final del folículo de De Graaf, la ovulación y el desarrollo del cuerpo amarillo. En el hombre estimula la producción de testosterona por el testículo, la cual con la dihidrotestosterona (DHT), producto de la biotransformación de testosterona, a su vez mantiene la espermatogénesis y activa el desarrollo y mantiene el trofismo de los órganos sexuales accesorios tales como los vasos deferentes, la próstata y las vesículas seminales.

La LH se une a receptores específicos para esta hormona, presentes en las células lúteas e intersticiales, que no son afectadas directamente por la hormona estimulante del folículo, porque no poseen receptores para la misma. La LH y la FSH pueden sensibilizar a las células blanco, aumentando el número de receptores específicos a los cuales se enlazan los esteroides sexuales y por lo tanto modifican indirectamente las acciones androgénica y estrogénica.

La relación entre el hipotálamo y las gónadas se demuestra cuando, al extirpar las gónadas, se produce una mayor cantidad de factores liberadores del hipotálamo, al punto de una hipertrofia de las células productoras de estos

factores. Por otra parte, cuando se aplican hormonas esteroides en cantidades elevadas, directamente al hipotálamo, éste reacciona produciendo menor número de factores liberadores.

Como ya se mencionó anteriormente, los sistemas nervioso y endocrino de los vertebrados actúan coordinadamente en los procesos reproductivos. El sistema nervioso regula al organismo por medio de la transmisión de impulsos eléctricos a través de las neuronas, en tanto que el otro sistema origina cambios en el funcionamiento corporal mediante la liberación de mensajeros químicos llamados hormonas. La percepción de estímulos ambientales se realiza a través del sistema nervioso e incluye el paso de la información desde los receptores sensoriales hasta el cerebro. Al llegar al hipotálamo, la información neural induce la actividad de las células neurosecretoras las cuales producen mensajeros químicos denominados factores liberadores. Estos llegan a la hipófisis y determinan la síntesis y liberación de las hormonas llamadas gonadotrópicas, cuyo destino es la gónada. Su efecto es estimular la producción de esteroides sexuales en la gónada que se comporta como órgano endocrino y de producción de gametos. Lo anterior constituye el llamado eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG).

### **2.1.3. El sistema endocrino relacionado a la reproducción**

El sistema endocrino es de capital importancia para la inducción de las características propias del sexo, requiriendo para esta finalidad de la instalación de mecanismos finos de regulación entre la glándula hipofisiaria y las gónadas. Por lo que, las hormonas de naturaleza proteica producto de la síntesis y secreción de la hipófisis, ejercen sus efectos a nivel de los órganos blanco a través del inicio de una serie de eventos bioquímicos que ocurren en la membrana

e interior de la célula y que resultan en la expresión de su actividad biológica. En particular, las gonadotropinas hipofisarias, LH, FSH y hCG son las responsables del desarrollo de los folículos ováricos, del ciclo menstrual y del aporte hormonal en el embarazo temprano en la mujer, así como del proceso espermatogénico y de la actividad hormonal del testículo en el varón y de los correspondientes procesos en los mamíferos, es decir, representan en ambos sexos, el principal estímulo para las funciones desempeñadas por el tejido gonadal.

La LH, también llamada hormona estimulante de las células intersticiales por su capacidad para estimular a las células intersticiales testiculares (células de Leydig) pertenece, como ya se mencionó, a la familia de hormonas glicoproteicas cuya estructura consiste de dos subunidades o dos cadenas polipeptídicas, designadas como  $\alpha$  y  $\beta$ . Las cadenas  $\alpha$  son idénticas en su estructura, sin embargo existen diferencias sustanciales en las cadenas  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  está constituida por 96 residuos de aminoácidos, al igual que la hormona estimulante de la tiroides (TSH), FSH y hCG; pero cada hormona tiene una diferente subunidad  $\beta$  que es específica en el momento de reconocer los receptores del tejido en el cual actúa la hormona. Si a dichas hormonas se les separa la subunidad  $\beta$  ésta es biológicamente inactiva y solo recupera su actividad después de combinarse con la subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\beta$  de LH tiene 115 residuos de aminoácidos, su peso molecular es de aproximadamente 28 000 Da, del cual 12-14 % son carbohidratos (glicoproteína). Estudios estructurales de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  indican que son producto de síntesis dependiente de diferentes genes, siendo la producción de las subunidades  $\beta$  el paso limitante en la biosíntesis de estas hormonas. Las subunidades  $\alpha$  de LH, FSH y hCG, al igual que las subunidades  $\beta$  de FSH y hCG contienen dos grupos de carbohidratos unidos a residuos de asparagina. Por su parte, la subunidad  $\beta$  de LH sólo contiene un grupo de oligosacáridos unido covalentemente a estos

aminoácidos. Por otra parte, la subunidad  $\beta$  de hCG contiene cuatro grupos adicionales de carbohidratos unidos a residuos de serina. Debido a la presencia de cinco pares de uniones disulfuro en las subunidades  $\alpha$  y de seis pares en las subunidades  $\beta$  las gonadotropinas hipofisarias son de naturaleza globular (Larrea *et al.*, 1988).

La LH es secretada a la circulación en episodios, por pulsos cuya frecuencia depende de cada especie, es decir, que la secreción de LH por pulsos ocurre aproximadamente cada 20 minutos en las ratas y cada 60 minutos en monos. La frecuencia de pulsos de LH es el reflejo de la frecuencia de pulsos liberados por la GnRH del hipotálamo.

La primera etapa en la acción de una hormona es su unión a una molécula específica o a un conjunto de moléculas llamado receptor, que se halla localizado sobre la superficie de la célula o en el citoplasma de la célula blanco. Este receptor posee una especificidad muy elevada y afinidad por su molécula hormonal (Leningher, A.L., 1989). Así tenemos que la secreción de testosterona por las células de Leydig es estimulada por LH. Los receptores para LH se encuentran en dichas células, y en la mayoría de los mamíferos un incremento en la secreción de LH es seguido por un aumento de la producción de testosterona. La acción de LH es mediada a través de la formación intracelular del AMP<sub>c</sub> el cual estimula, a través de la proteína cinasa c, la activación de numerosas reacciones celulares, una de las cuales es la secreción de testosterona.

Los receptores para LH/hCG, pueden ser cuantificables en el testículo de la rata en edades tan tempranas como los primeros 15 días de vida intrauterina. Esto indica la presencia, en la célula de Leydig del testículo fetal, de los elementos necesarios para la biosíntesis de la testosterona en respuesta a la estimulación con LH. La constante de asociación de hCG marcado con <sup>125</sup>I al receptor en el testículo es de aproximadamente  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , indicando su

elevado grado de afinidad por la gonadotropina coriónica. La cuantificación de los sitios de unión para LH/hCG en las células de Leydig utilizando análisis por saturación indican que la célula tiene la capacidad de unir en exceso a la LH/hCG en relación a su capacidad de estimulación y producción de testosterona existiendo alrededor de 20, 000 sitios de unión por célula (Dufau, M.L., 1988). Algunos estudios a este respecto han indicado que la ocupación de aproximadamente el 1% de los sitios totales de unión es suficiente para producir, ante el estímulo hormonal, la máxima respuesta en términos de producción de esteroides (Larrea *et al.*, 1988).

Específicamente en el macho, los receptores para LH y hCG se han identificado y caracterizado únicamente en la membrana plasmática de la célula de Leydig. Estos receptores no se han encontrado en otras células del testículo u otros tejidos del organismo (Catt, 1975). En la hembra, en cambio, se han localizado en las células intersticiales, de la granulosa, y de la teca del ovario. Los receptores a LH unen tanto LH como hCG con alta afinidad, sin haber diferencias entre ellas, pero no se unen a otras hormonas peptídicas como FSH.

#### **2.1.4. Las hormonas esteroides sexuales**

Las hormonas esteroides desempeñan un papel esencial en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, el dimorfismo sexual y la función reproductiva.

La mayor parte de estas hormonas se biosintetizan en las glándulas de secreción interna (suprarrenal, ovario y testículo) y en otros órganos que también tienen actividad esteroidogénica como la placenta, el hígado fetal y el hipotálamo.

Se clasifican de acuerdo con su actividad biológica en cinco grupos:

a) progestinas (C<sub>21</sub>), b) glucocorticoides (C<sub>21</sub>), c) mineralocorticoides (C<sub>21</sub>), d) andrógenos (C<sub>19</sub>), e) estrógenos (C<sub>18</sub>).

Los andrógenos participan en el desarrollo del fenotipo masculino durante la vida intrauterina y de la virilización, espermatogénesis y desarrollo de las estructuras sexuales secundarias masculinas en el adulto. Los principales andrógenos naturales son la androstenediona (A), la testosterona (T) y la DHT, los cuales se sintetizan fundamentalmente en el testículo, en la corteza suprarrenal y en el ovario (Williams, R.H., 1985). De los anteriores, la testosterona ejerce diversos efectos en el organismo, ya que regula el desarrollo, el crecimiento y la conservación de los órganos sexuales masculinos; estimula el crecimiento óseo, la conducta sexual, la maduración completa de los espermatozoides y la aparición de las características sexuales secundarias en el varón. Es producida principalmente por las células intersticiales o de Leydig del testículo. La testosterona es el principal andrógeno secretado por el testículo maduro. El hombre joven normalmente produce cerca de 7 mg por día. Esta cantidad disminuye con la edad, así que alrededor de los 70 años de edad la producción de testosterona disminuye a 4 mg por día. El testículo también secreta androstenediona, la cual se considera menos potente que la testosterona, así como algunos estrógenos. Al igual que otras hormonas esteroideas, la testosterona en sangre circula unida a proteínas del plasma, en tanto que solo cerca del 2% al 3% está presente como hormona libre. Cerca de 50% está unida a la albúmina y alrededor del 45% a la globulina unidora de hormonas sexuales (SHBG), la cual también es llamada globulina unidora de testosterona-estradiol (TeBG). Esta glicoproteína une tanto estrógeno como testosterona. Su concentración en el plasma se incrementa por estrógenos y disminuye por andrógenos. Consecuentemente, la SHBG es dos veces más abundante en la circulación de la

mujer que la del hombre. La testosterona que no se une a las proteínas del plasma pasa por difusión a los capilares hacia las células blanco.

En algunos aspectos, la testosterona puede ser considerada como una prohormona porque es convertida en tejidos extratesticulares a otros esteroides, que regresan al torrente sanguíneo. En la piel y las células blanco del tracto reproductivo masculino, la testosterona puede reducirse a un potente andrógeno, dihidrotestosterona, en la reacción catalizada por la enzima  $5\alpha$ -reductasa. La dihidrotestosterona en sangre tiene una abundancia del 5% comparada con la testosterona y se deriva del metabolismo periférico de la testosterona. También, parte de la testosterona es metabolizada a estradiol (Fig 3). Una variedad de células, incluyendo algunas del cerebro y tejido adiposo entre otros, puede convertir testosterona y androstenediona a estradiol y estrona. Estos estrógenos tal vez producen efectos celulares que son algunas veces opuestos o diferentes a los producidos por la testosterona. La concentración de estrógenos en sangre de un hombre normal es similar a la de mujer en la fase folicular temprana del ciclo menstrual. Alrededor de dos terceras partes de estos estrógenos son formados a partir de andrógenos fuera del testículo. No se conoce cómo se regula este proceso. En otros tejidos, incluyendo el hígado, la reducción catalizada por la  $5\beta$ -reductasa destruye la potencia androgénica. El hígado es el principal sitio de degradación de testosterona y la libera hacia la sangre en forma de sulfato soluble en agua o conjugados con ácido glucónico para luego ser excretados en la orina (Goodman, H.M., 1994).

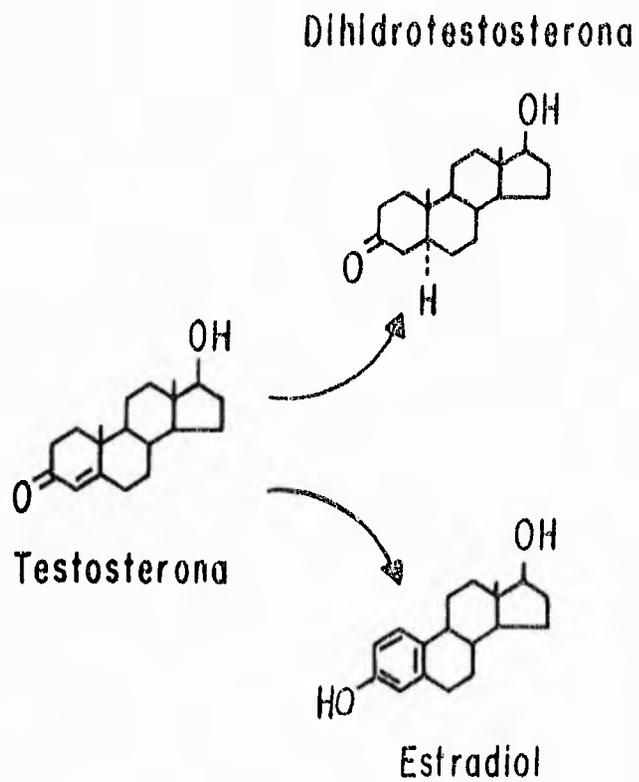


Fig 3. Estructura química de la testosterona, la cual puede ser reducida a dihidrotestosterona y metabolizada a estradiol (Tomado de Williams. Tratado de Endocrinología. 1986).

Las hormonas esteroides ejercen sus efectos en los órganos blanco, que poseen receptores intracelulares para las mismas; la comunicación química intercelular incluye entonces la unión de la molécula mensajera, en este caso una hormona esteroide, a un receptor que es una proteína. A diferencia de la mayoría de los mensajeros químicos que se unen a receptores localizados en la superficie celular, las hormonas esteroides son capaces de atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular. Las moléculas mensajeras pueden ser clasificadas, con base en su solubilidad en agua, en hidrofílicas (neurotransmisores, la mayoría de las hormonas, mediadores químicos locales) ya que no pueden cruzar la bicapa lipídica de la membrana, por lo que actúan uniéndose a proteínas receptoras específicas localizadas en la superficie de las células blanco. La unión a receptores membranales da por resultado la generación de los llamados segundos mensajeros como AMP<sub>c</sub>, GMP<sub>c</sub>, Ca<sup>2+</sup>, fosfatidilinositol, etc, que son moléculas intermediarias que transmiten el mensaje dentro de la célula (Alberts *et al.*, 1989). Las hormonas esteroides son, en cambio, moléculas hidrofóbicas, por lo que, una vez liberadas de sus proteínas acarreadoras que les confieren solubilidad, pueden atravesar fácilmente por difusión la membrana plasmática de las células blanco. Estas hormonas se unen a receptores intracelulares específicos y forman complejos esteroide-receptor en el núcleo celular o bien en el citoplasma y luego trasladados al núcleo, donde interaccionarán con la cromatina nuclear y provocarán cambios a nivel transcripcional, mismos que se traducen en cambios en la síntesis proteica, y que dan por resultado final la expresión del efecto celular de la hormona (Rodríguez-Manzo, G., 1993) (Fig 4).

Los estudios bioquímicos sugieren que los receptores a esteroides, a hormonas tiroideas y a ciertas vitaminas como la D3 y el ácido retinoico, pertenecen a una familia de proteínas reguladoras de genes que funcionan como transductores de señales y como factores de transcripción

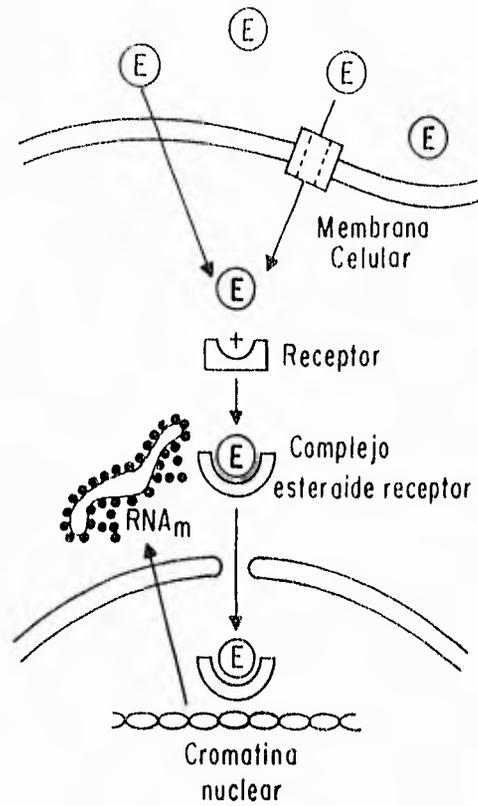


Fig 4. Unión de las hormonas esteroideas a receptores intracelulares específicos  
(Tomado de Greenspan. Basic and Clinical Endocrinology. 1986).

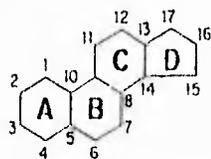
(Evans, R.M., 1988., Petkovich et al., 1987). La clonación molecular de estos receptores mostró que estas proteínas pertenecen a una superfamilia que parece actuar a través de un mismo mecanismo (Evans, R.M., 1988). Se cree que los receptores a esteroides son sintetizados en los microsomas citoplásmicos a partir de ARN mensajero. Los receptores a glucocorticoides, progesterona, testosterona y estrógenos pueden ser aislados del citosol en ausencia del ligando correspondiente, mientras que después de la adición de la hormona, estos receptores sólo pueden ser extraídos del núcleo. De acuerdo con estos datos, se propuso que los receptores citoplásmicos, al unirse a la hormona, son trasladados rápidamente al núcleo (Tuohimaa et al., 1988; Wikstrom et al., 1987). Por ello se consideró que los miembros de esta superfamilia podrían clasificarse en dos grupos: aquellos cuyo receptor estaba localizado en el citoplasma (hormonas esteroides) y en los que la unión a la hormona daba por resultado su traslocación al núcleo y aquellos en los que la unión ligando-receptor se llevaba a cabo directamente en el núcleo. Sin embargo, con el desarrollo de anticuerpos específicos antihormona se encontró que los receptores que habían sido clasificados como citoplásmicos, aparecían con estas técnicas, como predominantemente nucleares, aún en ausencia de la hormona, por lo que actualmente se considera que la mayoría de los receptores de esta familia son de hecho nucleares. De cualquier manera, lo que sí es claro, es que el complejo hormona-receptor reside en el núcleo (Rodríguez, M.G., 1993).

### 2.1.5. Biosíntesis de hormonas esteroides

La formación de hormonas esteroides a partir del colesterol, un compuesto de 27 átomos de carbono, implica una serie sucesiva de cambios inducidos enzimáticamente que resultan en su transformación a compuestos de 21 átomos de carbono (progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides), de 19 átomos de carbono (andrógenos) y de 18 átomos de carbono (estrógenos).

La estructura química es: el núcleo básico de los esteroides son cuatro anillos aromáticos, tres ciclohexanos (A,B,C) y un ciclo pentano (D), toda la molécula es conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno. Sobre este núcleo se agregan cadenas laterales que determinan las distintas clases de esteroides. El compuesto de 27 átomos de carbono ( $C_{27}$ ) con núcleo colestano y grupos metilo en posición  $C_{10}$  y  $C_{13}$  y una cadena de 8 carbonos en  $C_{17}$ , corresponde al colesterol. Partiendo de éste se forman los compuestos de 21 átomos de carbono ( $C_{21}$ ) correspondientes al núcleo pregnano, por pérdida de un segmento de la cadena lateral entre  $C_{20}$  y  $C_{22}$ . Estos compuestos por su actividad biológica se llaman progestinas, por ejemplo pregnenolona, progesterona, 17-OH progesterona, 20-dihidroprogesterona. La pregnenolona es importante porque es el primer paso de la biosíntesis de las hormonas esteroides. Las progestinas dan origen a los andrógenos por pérdida de la cadena en  $C_{17}$  lo que origina los compuestos con núcleo androstano ( $C_{19}$ ). Los estrógenos, por su parte, han perdido el grupo metilo del  $C_{10}$ , tienen 18 carbonos ( $C_{18}$ ), su anillo A está aromatizado y su núcleo básico es el estrano (Fig 5).

El testículo secreta una variedad de esteroides los cuales son sintetizados a partir del colesterol. Uno de los principales es la testosterona, producido específicamente por las células de Leydig. La testosterona, como ya se



Ciclopentanoperhidrofenantreno, núcleo químico básico de los esteroides.

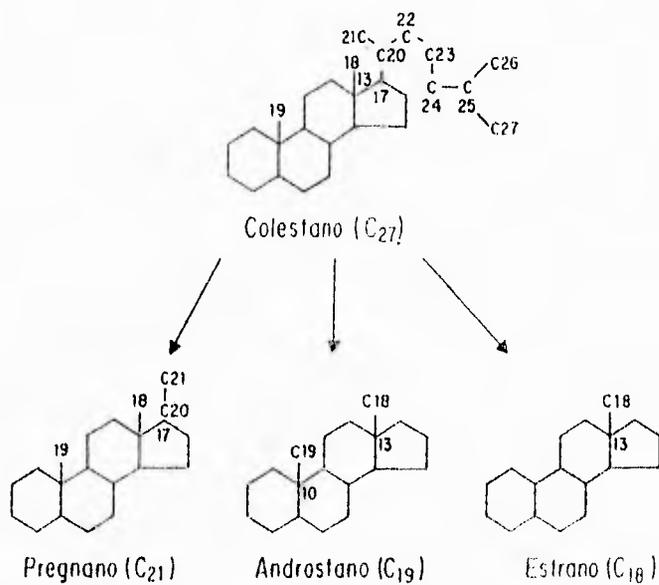


Fig 5. Estructura química de las hormonas esteroides (Tomado de Williams. Tratado de Endocrinología. 1986).

mencionó, está clasificada como un andrógeno puesto que estimula los caracteres sexuales secundarios en el macho. La síntesis de testosterona procede a través de una vía biosintética, parte de la cual es común para la mayoría de los esteroides secretados por las glándulas endocrinas, mientras que el producto final es determinado por la composición enzimática del tejido.

El colesterol es un precursor obligado en la biosíntesis de hormonas esteroides. Existen tres orígenes del colesterol para ser utilizado por las células esteroidogénicas:

- síntesis del colesterol a partir del acetato (síntesis de novo)
- lipoproteínas
- pozas intracelulares de ésteres del colesterol (en las inclusiones de lípidos del citoplasma).

Todos los tejidos que sintetizan a las hormonas esteroides tienen la capacidad para producir colesterol de novo, sin embargo, estudios recientes han indicado que el colesterol extracelular, componente importante de las lipoproteínas plasmáticas, es el preferentemente utilizado para la biosíntesis de las diferentes hormonas esteroides. Bajo ciertas circunstancias la síntesis de novo del colesterol a partir de moléculas de acetato representa la principal fuente del precursor (colesterol) para la producción de las hormonas esteroides, ya que existen evidencias que indican que las células de Leydig de roedores utilizan el colesterol sintetizado endógenamente (a partir del acetato) como sustrato primario para la esteroidogénesis (Fig 6).

El primer paso en la ruta de biosíntesis de los andrógenos lo constituye la conversión, de colesterol a pregnenolona. El colesterol es hidroxilado en posición 22 y 20, lo que permite el corte de la cadena lateral formando un compuesto  $C_{21}$  y liberando aldehído isocaproico, dicho paso es selectivamente activado en el

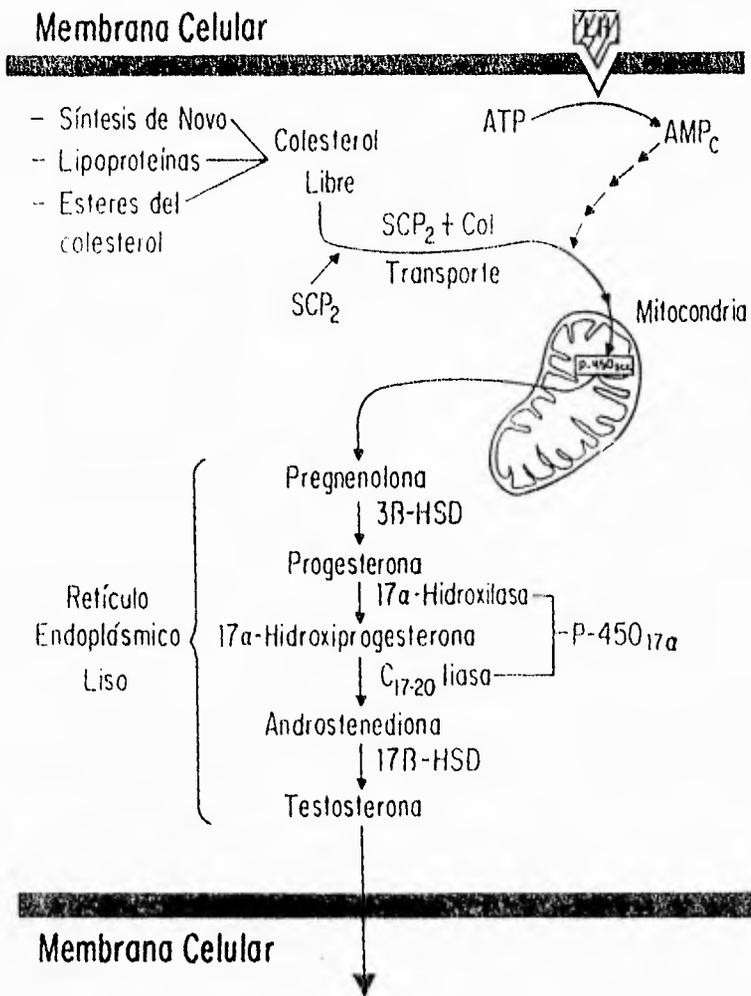


Fig 6. Diagrama general de la biosíntesis de hormonas esteroides (Tomado de Payne. Biology of Reproduction, 1990).

testículo del adulto por la LH de la hipófisis anterior, mientras que durante la vida embrionaria es activado por la hCG de origen trofoblástico. Este proceso implica la participación de los siguientes componentes: a) citocromo P-450, proteína de tipo hemo que hidroxila y puede cortar las uniones carbono-carbono ( $P-450_{SCC}$ ), b) una flavoproteína, flavina adenina dinucleótido (FAD) como transportadora de electrones, y c) una proteína de tipo hemo, que actúa como intermediario entre las dos primeras.

Se necesitan tres moles de  $O_2$  y de NADPH para formar un mol de pregnenolona. Todo este proceso se produce en la membrana interna de las crestas mitocondriales. Se considera que el colesterol se une a la  $P-450_{SCC}$  y sufre las dos hidroxilaciones sin que se liberen los compuestos intermedios hasta formar pregnenolona (Fig 7). La pregnenolona puede transformarse en dos compuestos, por dos diferentes rutas o vías metabólicas dependiendo del órgano endocrino y/o de la especie. Estas vías se han designado como  $\Delta^5$  (5-ene) y  $\Delta^4$  (4-ene) según la localización del doble enlace de los compuestos intermedios. Se ha podido establecer que la biosíntesis de testosterona, a partir de pregnenolona en las células de Leydig del testículo fetal y adulto de humano, conejo y del perro, opera fundamentalmente, aunque no en forma exclusiva, por la vía  $\Delta^5$ , mientras que el de la rata preferentemente utiliza la vía  $\Delta^4$  (Saez, J.M., 1994). Una alternativa es ser transformada a progesterona, este paso se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso y requiere la participación de un complejo enzimático microsomal, la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $\Delta^5$ - $4$  isomerasa ( $3\beta$ -HSD). La actividad de la deshidrogenasa y de la isomerasa no han podido ser separadas en células de mamíferos, por lo que se considera que una sola proteína tiene ambas funciones. La reacción es irreversible en condiciones fisiológicas y requiere  $NAD^+$  como aceptor de electrones. La otra alternativa es ser metabolizado por el complejo  $17\alpha$  hidroxilasa,  $C_{17,20}$  liasa. Esta es un

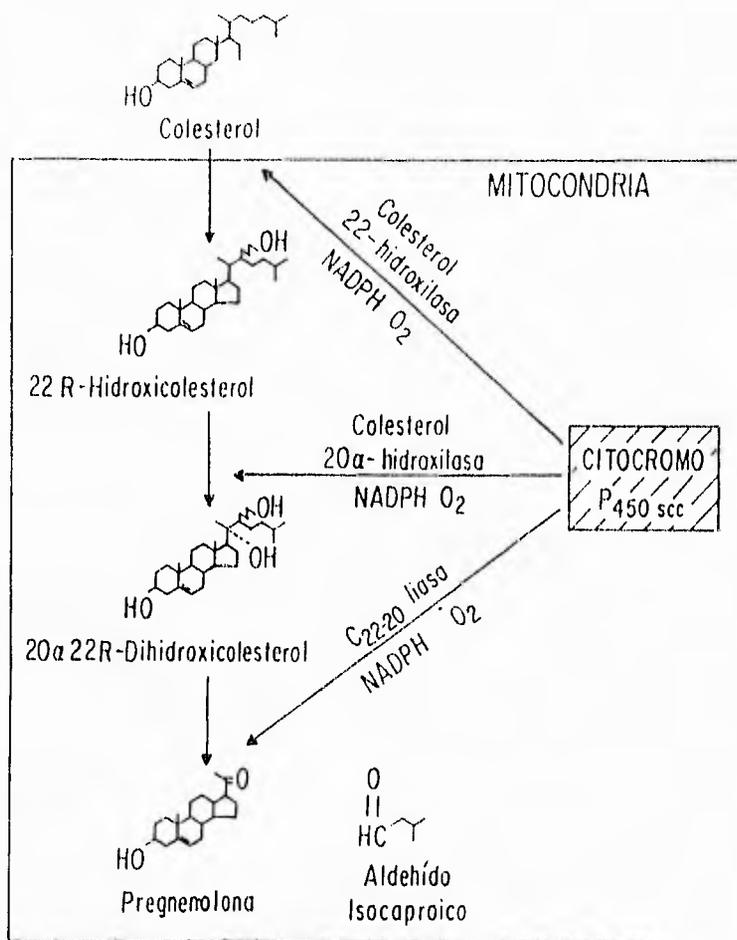


Fig 7. Diagrama en el que se muestran los primeros pasos en la biosntesis de hormonas esteroideas (Modificado de Pedernera. Comunicación Neuroendocrina. Bases celulares y moleculares. 1993).

citocromo P-450 (P-450 C<sub>17</sub>) que tiene la función de hidroxilar y cortar la unión carbono-carbono, tal como se describe para el caso del colesterol, pero en este caso la hidroxilación es en posición C<sub>17</sub> y el corte en la unión 17-20. La enzima es microsomal y requiere NADP<sup>+</sup> y sólo FAD como transportador de electrones. Los substratos de esta enzima pueden ser pregnenolona y progesterona y los productos serán dehidroepiandrosterona (DHEA) ó androstenediona, ambos andrógenos con C<sub>19</sub>. En este proceso se produce la liberación de acetaldehído. La DHEA puede ser transformada a androstenediona por acción de la 3β-HSD. La vía metabólica que va desde pregnenolona a DHEA se le conoce como Δ<sup>5</sup> (5-ene), mientras que la secuencia que pasa por progesterona para terminar en androstenediona como Δ<sup>4</sup> (4-ene).

Los andrógenos (4-ene-C<sub>19</sub>) son susceptibles de ser aromatizados y transformados a estrógenos (C<sub>18</sub>). El complejo enzimático aromatasa es un citocromo P-450 microsomal, que tiene función de hidroxilar en C<sub>19</sub>, eliminar el grupo metilo en C<sub>10</sub> y darle estructura aromática al anillo A. La reacción requiere tres moles de NADPH y de O<sub>2</sub> (Fig 8).



## 2.2. Sistema Reproductor

El concepto de que el testículo es dependiente de la función de la glándula hipófisis surge de los experimentos de Philip Smith entre los años de 1920 a 1930. El mostró que el tamaño del testículo disminuía rápidamente después de extirpar a la hipófisis, y que este proceso afectaba la función de ambos compartimientos del testículo, es decir de los túbulos seminíferos en la producción de espermatozoides y del tejido intertubular que contiene a las células de Leydig, las cuales producen hormonas esteroideas, principalmente testosterona.

Los testículos son un par de glándulas ovales, su desarrollo embrionario tiene lugar cerca de la pared posterior de la parte superior del abdomen, y unos dos meses antes del nacimiento descienden hacia el escroto. Están cubiertos por una densa capa de tejido fibroso blanco, la túnica albugínea, que se extiende en sentido interno y divide a cada testículo en un conjunto de compartimientos internos a los que se denomina lobulillos testiculares. Cada uno de estos incluye uno a tres túbulos seminíferos contorneados en donde se forman los espermatozoides mediante el proceso llamado Espermatogénesis. Un corte transversal de estos túbulos revela que en ellos se encuentran espermatozoides en diversas etapas de desarrollo como espermatogonias que se encuentran situadas sobre la membrana basal de estos conductos; hacia el centro del túbulo, se observan capas de células cada vez más maduras, los espermatocitos primarios y secundarios, y espermátides. En el momento en que las células han alcanzado su madurez se les denomina espermatozoides, se localizan entonces en el interior del túbulo e inician su desplazamiento por un conjunto de conductos. Las células sustentaculares o de Sertoli se encuentran incluidas entre los espermatozoides en desarrollo, en los túbulos, producen secreciones que aportan nutrientes a los propios espermatozoides.

Por otra parte, entre uno y otro túbulos seminíferos se observan agrupamientos de células intersticiales o células de Leydig, encargadas fundamentalmente de la secreción de la hormona sexual masculina denominada testosterona (Fig 9). Como ya se mencionó, la función principal de la célula de Leydig es la síntesis y secreción de testosterona en respuesta a la estimulación con LH.

La ontogenia de las células de Leydig de humano ha sido definida funcional e histológicamente. Con base en las características que éstas muestran al microscopio electrónico, se han identificado a las células de Leydig humanas como fetales, infantiles, prepuberales y adultas, considerando desde su nacimiento hasta los 31 años de edad. Se ha sugerido que las células de Leydig infantiles son el resultado de la involución de las células de Leydig fetales y que son incapaces de secretar cantidades significativas de testosterona. También se plantea la hipótesis de que la maduración de las diferentes etapas de la célula de Leydig está influenciada por las gonadotropinas.

En cambio, en la rata las células de Leydig pueden dividirse en dos poblaciones: fetales y adultas, las primeras están presentes en el testículo durante las tres últimas semanas de gestación hasta los primeros 10 a 15 días de vida posnatal, las segundas gradualmente se presentan después de este tiempo (Huhtaniemi *et al.*, 1982). La función de la célula de Leydig está regulada por hormonas de la hipófisis, factores paracrinos secretados por células de los túbulos seminíferos y factores autorregulatorios. Muchos de los estudios que conciernen a la regulación de la función de la célula de Leydig y la esteroidogénesis en general, se han hecho de células de Leydig y adrenocorticales de rata, sin embargo, no todos los parámetros son válidos para todas las células esteroidogénicas o todas las especies. El factor que regula

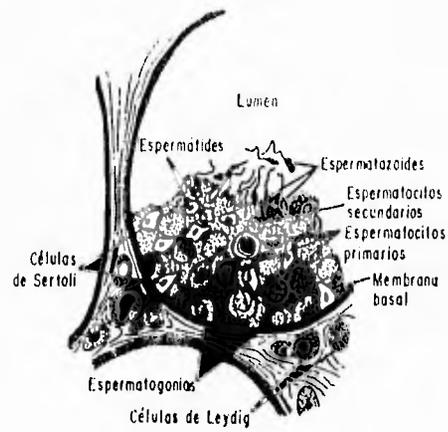
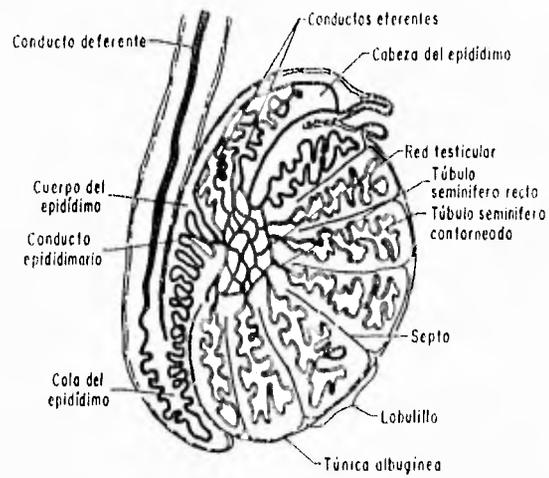


Fig 9. Estructura del testículo y ubicación de las células que lo constituyen (Tomado de Ninomiya. Fisiología Humana. 1991).

la función de la célula de Leydig es la LH. Ejerce diferentes efectos en ella, que varían cuando se administra en dosis altas, o durante periodos cortos o bien crónicamente. La LH influye en el aspecto bioquímico y morfológico de la célula de Leydig, ya que participa en la diferenciación y trofismo de la célula de Leydig adulta. Las enzimas necesarias para la producción de testosterona están asociadas con la mitocondria y el retículo endoplásmico liso de la célula de Leydig. La acción de la LH requiere de la unión específica a receptores de la membrana de la célula de Leydig. El efecto de LH o hCG en la célula de Leydig es dependiente del modo de administración de la hormona teniendo diferentes efectos en ciertas enzimas esteroidogénicas asociadas con el retículo endoplásmico liso, como se mencionó anteriormente, estos cambios en la actividad enzimática, por lo menos en parte, están relacionados con los cambios en la secreción basal y estimulada de testosterona *in vitro* (Payne *et al.*, 1985).

Existen estudios donde se ha reportado que dentro del testículo hay una serie de factores paracrinos que participan en la regulación de la función de la célula de Leydig, como angiotensina II, factor de crecimiento epidérmico, factores derivados de macrófagos, factores aún no definidos químicamente del fluido intersticial, interleucina-1 y factores de crecimiento tipo insulina (IGF-1).

Varios estudios se han establecido para entender la autorregulación de la célula de Leydig. Se ha planteado la hipótesis de que los estrógenos producidos en respuesta a la LH inhiben la actividad de la P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  en testículo de rata. El control estrogénico de la esteroidogénesis, tal vez participe en la desensibilización por LH de las células de Leydig cuando se administran dosis altas de esta hormona o la administración se realiza en tiempos prolongados. La acción autorreguladora de la testosterona se confirmó en investigaciones usando cultivos primarios de células testiculares de rata. Se presentaron datos apoyando la hipótesis de que la testosterona inhibe la P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  por inducción de un

incremento mediado por oxígeno, en la proporción de la degradación de P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  y en el que interviene un receptor androgénico que actúa en la biosíntesis (Payne *et al.*, 1985.; Payne, A.H., 1990).

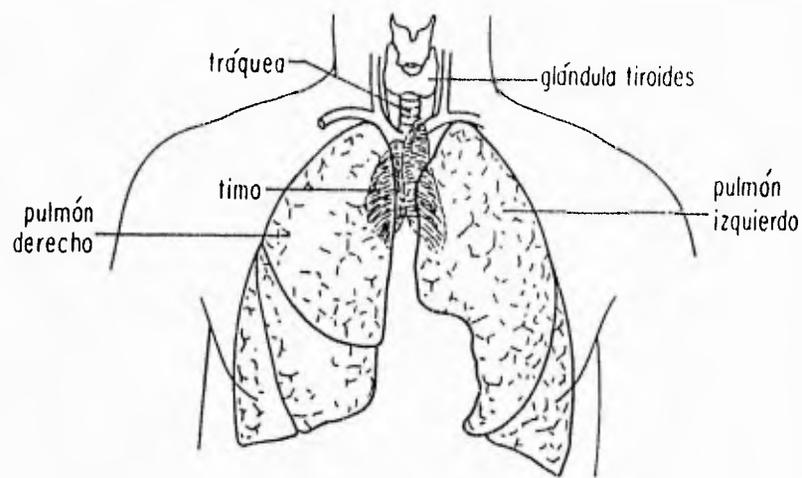
Las células de Leydig pueden ser identificadas por su ubicación dentro del intersticio del testículo donde generalmente se encuentran en grupos o racimos. Otros componentes del intersticio incluyen macrófagos, fibroblastos, células del tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. El poder de las hormonas esteroideas secretadas por las células de Leydig se ve reflejado en el pequeño porcentaje de testículo humano ocupado por la célula, dicho porcentaje se estima en 3 % del volumen testicular. Las células de Leydig humanas se distinguen por la presencia de un núcleo redondo con un prominente nucleolo, heterocromatina a lo largo de la membrana nuclear, cristales de Reinke en el citoplasma, gotas de lípidos, gran cantidad de vesículas de retículo endoplásmico liso, lisosomas, etc. Numerosas uniones de tipo comunicante permiten comunicación directa entre las células de Leydig. Las células de Leydig humanas contienen tres tipos de inclusiones. Las paracristalinas son las más frecuentes junto con los cristales de Reinke. En contraste con muchas especies, las inclusiones de lípidos son mínimas en las células de Leydig humanas, sin embargo los gránulos de lípidos se incrementan con la edad.

### 2.3. Sistema Inmunológico

El Sistema linfático está compuesto por la linfa, los vasos linfáticos, un conjunto de pequeñas masas de tejido linfoide que reciben el nombre de linfonodos y tres órganos: amígdalas, timo y bazo. Su función incluye el transporte de lípidos provenientes del aparato digestivo hacia la sangre, la producción de linfocitos y las respuestas inmunológicas.

El Timo es uno de los órganos linfoides más importantes del sistema inmunológico, durante el desarrollo desempeña un papel central en la manifestación de las capacidades inmunológicas del organismo. Generalmente es un órgano bilobular de tejido linfático situado en la parte superior de la cavidad torácica, por delante de la tráquea y detrás del esternón (Fig 10). El timo es de origen endodérmico y mesodérmico. Se forma a partir de la faringe embrionaria; la porción endodérmica se origina de la tercera y cuarta bolsas faríngeas las cuales penetran, junto con el ectodermo adherido, al mesodermo circundante iniciándose la formación del timo junto con las glándulas paratiroides. El rudimento de timo se desprende de la bolsa faríngea que le dió origen y migra hacia abajo para localizarse en la cavidad pleural; posteriormente células mesodérmicas lo penetran. Se transforma posteriormente, por la invasión de linfocitos, en un órgano linfoepitelial combinado (Fawcett, D.W., 1988).

Durante su migración, el timo es invadido por linfoblastos, precursores de los linfocitos T. Estas células precursoras provienen del tejido hematopoyético de la médula ósea. Se observa que durante el desarrollo posterior del timo, las precursoras de las células T se organizan dentro de la capa cortical, que tiene un grosor de 2 a 10 células y comienzan a dividirse para generar los diferentes tipos de linfocitos del timo. En la madurez del órgano, 99 % del tejido que forma el timo está constituido por linfocitos. Este órgano es pequeño en el lactante, alcanza su



©

Fig 10. Ubicación y forma del timo en el ser humano (Tomado de Ninomiya. Fisiología Humana. 1991).

tamaño máximo durante la pubertad y después involuciona hasta ser reemplazado en su mayor parte por tejidos conjuntivo y adiposo. El timo maduro histológicamente se compone de dos lóbulos, formados por una malla de células epiteliales, rodeados por una fina cápsula de tejido conjuntivo, que emite numerosas trabéculas que se extienden dentro del órgano desde la cápsula y dividen los lóbulos en lobulillos, estos últimos son poliédricos. Cada lóbulo está dividido en una zona periférica más oscura, la corteza, y una zona central más clara, la médula. Tanto la corteza como la médula están compuestos principalmente por linfocitos pequeños. La corteza está constituida por células epiteliales y células dendríticas reticulares, la médula está conformada por macrófagos, células dendríticas interdigitales y los llamados corpúsculos de Hassal que son redondos u ovals, compuestos por capas concéntricas de células epiteliales. La población de linfocitos puede separarse en grandes linfocitos de la corteza externa, linfocitos medianos de la médula y pequeños linfocitos o linfocitos maduros que se encuentran tanto en corteza como en médula. Los linfocitos T al madurar adquieren una especialización que determina el papel que desempeñarán en la respuesta inmunológica (Geneser, F., 1988).

El timo guarda relación con la inmunidad. El tejido linfoide consiste sobre todo en linfocitos, entre los que cabe distinguir dos poblaciones: células T y células B. Ambos se derivan, en la etapa embrionaria, de los linfoblastos de la médula ósea. Antes de emigrar a los órganos linfoides, los descendientes de los linfoblastos se diferencian en una de dichas líneas o poblaciones. Casi la mitad de ellas emigran al timo, en el cual sufren diversas transformaciones y constituyen los linfocitos timodependientes o células T, que son las encargadas de defender al organismo de una gran variedad de agentes patógenos (bacterias, virus, hongos, parásitos). Las células restantes siguen un proceso de maduración distinto, en áreas u órganos todavía no determinados en el mamífero pero que

posiblemente sean el bazo y el hígado fetales, y se transforman en células B. Las células T son responsables de la inmunidad celular y las células B se transforman en células plasmáticas, especializadas en la síntesis de anticuerpos y son las encargadas de conferir al organismo la inmunidad humoral. Con base en lo anterior, existen dos formas fundamentales distintas, pero muy relacionadas entre sí, de inmunidad específica, denominadas inmunidad mediada por anticuerpos o humoral e inmunidad mediada por células o celular. Por medio de la primera el organismo produce anticuerpos circulantes, que son inmunoglobulinas capaces de unirse específicamente con el antígeno correspondiente. En el proceso de desarrollo de inmunidad mediada por células se producen grandes cantidades de linfocitos, sensibilizados específicamente contra la sustancia extraña a la cual son capaces de destruir. La mayor parte de los antígenos estimula tanto la producción de una respuesta inmune humoral como celular. Ambas reacciones tienen lugar en el tejido linfoide, y tanto los anticuerpos como los linfocitos sensibilizados, capaces de reaccionar específicamente con el antígeno correspondiente, son liberados al torrente sanguíneo.

En las aves existe otro órgano del sistema inmune, que participa en la maduración de los linfocitos, la bursa de Fabricius. En este órgano los linfocitos provenientes de la médula ósea se diferencian a linfocitos B, los cuales se encargan de producir la respuesta humoral a los antígenos. La bursa es inmunológicamente activa durante la vida embrionaria y lo mismo que en el timo, en el ave joven púber comienza a involucionar. Con la administración exógena de testosterona se acelera este proceso y se pueden encontrar receptores para esta hormona esteroidea en el tejido bursal (Aguilar *et al.*, 1981).

### 2.3.1. Relación de los Sistemas Inmunológico y Neuroendocrino

El Sistema Inmunológico está regulado por los esteroides gonadales estrógenos, andrógenos y progesterona, y los niveles circulantes de esos esteroides pueden ser afectados por el sistema inmunológico (Grossman, C.J., 1985). Estas interacciones son controladas por el sistema nervioso, al cual se encuentran asociados los sistemas inmunológico y reproductor formándose así un solo sistema el neuroinmunoendocrino.

La relación del sistema nervioso y el inmunológico se establece a través de la presencia de nervios terminales en varios órganos y tejidos en el sistema inmunológico; esto incluye la inervación del timo, médula espinal, bazo y nódulos linfáticos (Blalock, J.E., 1984).

A través de varios años se ha demostrado la relación entre los sistemas endocrino e inmunológico con varios experimentos entre los que se encuentra la castración de animales de laboratorio, en los cuales el peso y la morfología del timo se modificaron significativamente (García, T.F., y Ocampo, L. A. 1991).

Se ha observado que después de la castración hay un incremento en la masa de los nódulos linfáticos periféricos, bazo y timo. La castración antes de la pubertad retrasa el inicio de la involución del timo (que normalmente comienza en la pubertad) y en cambio produce hipertrofia del timo.

Así mismo evidencias clínicas y experimentales apoyan la hipótesis de que los esteroides gonadales regulan la función inmunológica. Esta conclusión está basada en las siguientes observaciones:

- Existe un dimorfismo sexual en la respuesta inmunológica
- La respuesta inmunológica se altera por la gonadectomía y se normaliza por el reemplazo de hormonas esteroides sexuales

- La respuesta inmunológica se altera durante el embarazo en donde la cantidad de hormonas sexuales aumenta
- Los órganos responsables de la respuesta inmunológica contienen receptores específicos para los esteroides gonadales (Grossman, C.J., 1985).

Las hormonas del sistema endocrino que se ha demostrado regulan el sistema inmunológico son: gonadotropinas, prolactina, glucocorticoides, hormona de crecimiento, estrógenos y andrógenos. Las funciones de estas hormonas se detallan a continuación (Tabla 2).

Con respecto a los esteroides sexuales, se ha observado en varios experimentos con animales a los que se les administraban estrógenos que la dosis administrada y la edad son factores importantes en la producción de cambios inmunológicos mediados por estas hormonas. También influyen el estado inmunológico del organismo y la vía de administración de las hormonas.

Cuando se administran grandes dosis de andrógenos y estrógenos se observa una reducción del tamaño del timo (Chiodi, H., 1938). Como se mencionó anteriormente este efecto está relacionado con la edad del animal en el momento del experimento. Por ejemplo, después de practicar una orquiectomía, las alteraciones inmunológicas son evidentes sólo cuando la operación es realizada en animales prepúberes y no se observan cambios tan significativos en animales maduros. Sin embargo, la orquiectomía en ratas después de la madurez sexual provoca reaparición en el vestigio de timo, de linfocitos y organización típica del timo prepúber. La administración de esteroides sexuales en animales neonatos reduce considerablemente la producción de anticuerpos; este fenómeno no es observado cuando los animales reciben las mismas dosis después del destete o en su madurez (García, T.F., y Ocampo, L. A. 1991).

Nombre de la Hormona	Efecto sobre el sistema Inmunológico
FSH	Estimula la liberación de lactato en macrófagos aislados de testículo.
Prolactina	Induce la síntesis de timulina en el timo e induce receptores a IL-2 en linfocitos (Dardenne <i>et al.</i> , 1989).
Hormona de crecimiento	Estimula al sistema inmunológico modulando la función de los linfocitos T y la producción de anticuerpos (Deschaux <i>et al.</i> , 1980).
Testosterona	Acelera el tránsito de los linfocitos desde los órganos linfoides hacia la circulación periférica. Si se inyectan grandes dosis de andrógenos y estrógenos a animales de laboratorio se observa una reducción en el tamaño del timo (García, T.F., y Ocampo, L.M. 1991).

Tabla 2. Hormonas del sistema endocrino que regulan el sistema inmunológico.

La gonadectomía afecta la respuesta del animal al enfrentarse con antígenos, ocasiona un aumento en la producción de anticuerpos, así como el rechazo a aloinjertos. Cuando se combinan la castración con la timectomía no se presentan éstos cambios, lo que sugiere que los esteroides actúan a través del timo (Grossman, C.J., 1985).

La vía de administración de las hormonas influye para que algunos órganos linfoides sean estimulados y otros inhibidos. Las hormonas que se liberan de un implante o las que se administran por vía oral, intraperitoneal o subcutánea, presentan distribuciones y concentraciones tisulares diferentes. Esto es importante cuando se varía el momento de inoculación de un antígeno, antes o después del tratamiento hormonal.

La condición inmunológica del animal también es importante y puede ser decisiva en el momento de valorar los efectos de los esteroides gonadales sobre el sistema inmunológico. Cuando los animales son sometidos a tratamientos con hormonas, según sean sus linfocitos inmaduros, normales o envejecidos, se obtienen resultados diferentes (García, T.F., y Ocampo, L. A. 1991).

Se ha mencionado hasta ahora la influencia de las hormonas del sistema endocrino sobre el inmunológico, en adelante se comentará la influencia del sistema inmunológico sobre el endocrino.

Se ha demostrado ya fehacientemente la relación del timo con el estado inmunológico del sujeto. Asimismo la idea de que el timo funciona como un órgano endocrino ha sido sugerida por muchos trabajos en que han aislado productos de este órgano que se dice tienen la capacidad de restaurar las funciones inmunes perjudicadas por la timectomía neonatal. La involución del timo que se observa después de la pubertad sugiere que el mismo puede estar relacionado con los órganos endocrinos sexuales (Hattori, M., y Brandon, M.R. 1979).

En el sistema inmunológico se producen factores que influyen en el sistema endocrino y algunos de ellos se resumen en la Tabla 3.

### **2.3.2. Efecto de la timectomía sobre el desarrollo de las gónadas**

Se han reportado experimentos en los que se muestran los efectos que se presentan después de la timectomía neonatal sobre las gónadas. En ratones neonatos timectomizados se ha observado disgenesia en el ovario, caracterizada por disminución de folículos y del cuerpo lúteo, proliferación de tejido conjuntivo intersticial e hiperplasia de células intersticiales. Este fenómeno se presenta en una etapa cercana a la pubertad. Estos cambios sugieren que la timectomía neonatal puede afectar la esteroidogénesis del ovario (Nishizuka, Y., y Sakakura, T. 1969). Se han observado alteraciones similares en ratas timectomizadas de tres días de edad. También se han reportado modificaciones en regiones y funciones reproductivas en ratones timectomizados, tales como retraso en el comienzo de la pubertad, disminución del peso del útero e infertilidad (Basedovsky, H.O., y Sorkin, E. 1974).

Estudios realizados en ratas adultas mostraron alteraciones de la estructura testicular observándose lo siguiente: testículos pequeños, reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos, edema intersticial, la ausencia o disminución de espermatogénesis por alteración de células de Sertoli y germinales y la desaparición de espermatozoides del epidídimo. También se observaron hiperplasias de células intersticiales del ovario, con una producción anormal de antígenos (Hattori, M., y Brandon, M.R. 1979).

Asociados a los cambios gonadales, los ratones atímicos prepúberes presentan bajos niveles de gonadotropinas. Los cambios endocrinos descritos pueden prevenirse con injertos de timo, bazo o nódulos linfáticos en los primeros

Nombre	Función
Interleucina-1	<p>Altera funciones inmunológicas, neuroendocrinas y metabólicas.</p> <p>Se han reportado resultados contradictorios sobre la secreción de testosterona, ya que su acción sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig <i>in vitro</i> puede ser estimuladora, inhibitoria o no tener efecto alguno (Sun <i>et al.</i>, 1993).</p>
Interferón	<p>Se conocen tres tipos: <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math>.</p> <p>El <math>\alpha</math>-IFN humano estimula la secreción de LH y FSH en células de adenohipófisis en cultivo (Mendoza y Romano, 1995).</p> <p>La administración de <math>\gamma</math>-IFN en mujeres disminuye los niveles séricos de estradiol y progesterona sin afectar a las gonadotropinas séricas. Inhibe la secreción de testosterona en cultivos de células de Leydig de porcinos (Orava <i>et al.</i>, 1985).</p>
Factor Tímico Neuroendocrino Liberador	<p>Incrementa la liberación de hormona de crecimiento, prolactina y hormona luteinizante (Spangelo <i>et al.</i>, 1989).</p>
Timosinas	<p>La Fracción 5 de timosina estimula la producción de prolactina por las células lactotropas de la hipófisis.</p> <p>La Timosina <math>\alpha</math>-1 produce un incremento en los niveles séricos de estradiol y adelanta la apertura vaginal. TF5 y T<math>\beta</math>4 estimulan el factor liberador de LH en ratas (Rebar, R.W., 1981).</p>

Tabla 3. Factores del sistema inmunológico que influyen en el sistema endocrino.

días después de nacidos.

En el caso de las aves se ha observado que, cuando a un embrión se le extirpa tempranamente la bursa, éste nace con los testículos hipertrofiados y se encuentra una mayor producción *in vitro* de testosterona; estos fenómenos se revierten con la implantación del órgano inmune (Aguilar *et al.*, 1981).

El mecanismo a través del cual el timo influye sobre las gónadas no es totalmente claro, ya que algunos autores consideran que esta influencia es indirecta, a través de la hipófisis y otros dicen que no se trata sólo de una relación endocrina sino de un desbalance en el sistema inmunológico que se manifiesta por inflamación de tipo autoinmune de las gónadas, lo que conduciría a una alteración secundaria de su funcionamiento.

Sin embargo, estudios más recientes *in vitro* sugieren que productos del sistema inmunológico como las interleucinas pueden alterar directamente la función gonadal. Las alteraciones gonadales que se producen por ausencia del timo o por alteraciones del mismo se deben a la ausencia de factores tímicos reguladores del eje hipotálamo-hipófisis-gónada ya que se revierten con injertos de timo.

La función endocrina del timo se atribuye a la secreción de las células reticuloepiteliales y ha sido demostrada en varios diseños experimentales como la extirpación del órgano y la administración de extractos del mismo.

Las células reticuloepiteliales del timo producen una serie de factores u hormonas peptídicas entre las que se encuentran: Fracción 5 de Timosina,  $\alpha 1$ ,  $\beta 4$ , Factor Tímico Humoral (THF) y Factor Tímico Sérico (FTS). Las propiedades químicas y las funciones biológicas relacionadas al sistema inmunológico de estos productos del timo se muestran a continuación (Tabla 4).

Nombre	Propiedades Químicas	Funciones biológicas
Fracción 5 de Timosina	Familia de polipéptidos acídicos estables al calor, PM 1000-15000 (Hall <i>et al.</i> , 1985).	Induce la diferenciación y maduración de linfocitos.
Timosina $\alpha$ 1	Polipéptido de 28 aa PM 3108 Da., pl 4.2 secuencia determinada (Hall <i>et al.</i> , 1985).	Aumenta la inmunidad de las células T. Modula la actividad TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal).
Timosina $\beta$ 4	Constituida por 43 aa PM 4982 Da., pl 5.1 (Hall <i>et al.</i> , 1985).	Induce actividad TdT en células T.
THF- $\gamma$ 2	Péptido formado por 8 aminoácidos PM 918 Da., pl 5.1 (Burstein <i>et al.</i> , 1988).	Aumenta la actividad antitumoral de linfocitos Induce diferenciación y maduración de células T. Incrementa la producción de IL-2 y anticuerpos.

Tabla 4. Hormonas Tímicas.

## 2.4. Antecedentes Experimentales

### 2.4.1. Factor Tímico Humoral (THF)

El Factor Tímico Humoral (THF) es un octapéptido con peso molecular de 918 Da y su secuencia de aminoácidos es Leu-Glu-Asp-Gly-Pro-Lys-Phe-Leu.

Su secuencia no muestra homología con la secuencia de otras hormonas tímicas y no forma parte de ningún péptido o proteína de secuencia conocida.

El THF fue aislado de timos de ternera por técnicas de homogeneización y diálisis utilizando técnicas de cromatografía de filtración molecular, intercambio iónico y de alta presión (HPLC).

Este factor ya es producido sintéticamente y se conoce como THF- $\gamma$  2, conserva todas las propiedades biológicas y fisicoquímicas del extracto de timo del cual se derivó. Con este adelanto ahora es más económico obtenerlo ya que anteriormente se obtenían 5  $\mu$ g de THF de 1000 kg de timo (Burstein *et al.*, 1988).

Experimentos llevados a cabo con el objeto de determinar la identidad de las células blanco activadas por el THF, y el mecanismo por el cuál estas células adquieren competencia inmune, establecieron que el THF participa principalmente en la proliferación y diferenciación de células T tanto en la médula ósea y en el timo como en el sistema linfóide.

Otro efecto biológico del THF es la actividad antiviral. Por ejemplo, se sabe que muchos virus expresan su efecto patógeno dañando al sistema linfático. El virus Sendai ataca a ratones provocando la involución del timo, pero si se trata a estos animales con THF, se observa una gran mejoría.

El THF ejerce su efecto vía AMP<sub>c</sub> (vía bioquímica de la activación de las células T) y podría por lo tanto, ser considerado un primer mensajero que actuaría en una población de células blanco específicas de timocitos indiferenciados o

completamente diferenciados como las células T, mientras que el AMP<sub>c</sub> sería el segundo mensajero que actuaría a nivel intracelular y sería la herramienta para la diferenciación final de estas poblaciones celulares hacia papeles específicos.

Algunos datos clínicos han reportado que administrando THF se observa mejoría en pacientes con infecciones virales como herpes, varicela, sarampión.

También ha sido utilizado para restablecer el sistema inmune de pacientes que han recibido quimioterapia y radioterapia (Trainin *et al.*, 1985).

#### **2.4.2. Fracción Tímica**

Se ha demostrado que en el timo de la rata prepúber existe una fracción que modifica la respuesta de las células de Leydig al hCG compitiendo con el receptor para hCG. Se ha observado que la fracción de 30 kDa presente en extractos acetónicos de timos de ratas de machos prepúberes reduce la respuesta a hCG a través de la inhibición competitiva del receptor para LH-hCG en dichas células (Hiriart, M., y Romano, M.C. 1986).

Esta fracción tímica (FT) tiene un peso molecular de 28 kDa es de naturaleza proteica, ya que se inactiva con el calor y las proteasas. Tiene efecto sobre la esteroidogénesis inducida por hCG, esta inhibición es dosis-dependiente y no modifica la secreción basal de las células (Pedemera *et al.*, 1986).

La FT se secreta al medio de incubación de timo *in vitro* y la secreción al medio varía con la edad del animal (Reyes-Esparza, J.A., y Romano, M.C. 1989).

Para conocer qué células del timo producen esta fracción, se estudió el efecto de medios condicionados obtenidos de cultivos de células retículoepiteliales del timo, sobre la producción de testosterona inducida por hCG en suspensiones de células de testículo de rata adulta. Los datos obtenidos

sugieren fuertemente que la fracción tímica es producida por las células reticuloepiteliales del timo (Martín, D., y Romano, M.C. 1992).

Se han investigado también los efectos de la fracción de 30 kDa sobre la esteroidogénesis del ovario en modelos de células dispersas de ovario de rata. Los resultados mostraron que la fracción también modula la respuesta de las células de ovario a hCG, observándose efectos similares a los que se obtuvieron en el caso del testículo (Aguilera, G., y Romano, M.C. 1989).

Se ha avanzado además en la purificación de la fracción tímica de rata. Para ello se utilizó una columna de afinidad de heparina-Sepharosa, en la que las sustancias afines se pegaron y se eluyeron por fuerza iónica. Con esto se comprobó que la fracción tímica es afín a la heparina (Porrás, V.M.G., 1988).

También se ha estudiado el efecto de la fracción sobre la secreción de gonadotropinas por células de hipófisis en cultivo. Se observó que la FT potencia la acción de GnRH aumentando la producción de LH y FSH. La FT no modifica la secreción basal de las gonadotropinas (Mendoza, M.E., y Romano, M.C. 1989).

#### **2.4.2.1. Técnicas utilizadas en la purificación de la FT**

Se ha demostrado que la fracción tímica de rata con peso molecular de 28 kDa es una proteína ya que se inactiva con el calor y las proteasas. Esta fracción se obtuvo en principio a partir de un extracto acetónico de timo, la cual se sometió a cromatografía en una columna de filtración molecular (Pedernera *et al.*, 1986); y más recientemente se ha avanzado en su purificación utilizando cromatografía de afinidad (Porrás, V.M.G., 1988).

En el presente trabajo de tesis, para obtener la fracción tímica de bovino (FTB) utilizamos los dos tipos de cromatografía anteriormente mencionadas. A continuación se describen en general las técnicas mencionadas y en el capítulo

de Material y Métodos nos referimos a la aplicación de las mismas al caso específico de la fracción del timo que nos interesa.

#### **a) Cromatografía de Filtración Molecular**

Para purificar una proteína se ensayan distintos métodos de separación y se valora la eficacia de cada uno mediante el análisis de una propiedad característica de la proteína que se busca. Una de las separaciones más selectivas pueden conseguirse mediante la técnica de cromatografía de filtración por gel también llamada de filtración molecular. Este tipo de cromatografía separa sustancias en función de su tamaño molecular; las moléculas más grandes salen primero de la resina, mientras que las pequeñas se retienen; por lo que además una de sus aplicaciones más importantes es la determinación de pesos moleculares.

En la técnica de cromatografía de filtración molecular la fase estacionaria está representada por un gel, el cual se empaca en un tubo o columna de vidrio y la fase móvil es agua o cualquier solución electrolítica. Uno de los tipos de geles más utilizados para estos propósitos es el Sephadex. El Sephadex es un gel de dextrano, polímero ramificado de glucosa. Existen diferentes tipos de geles, dependiendo del contenido de dextrano y del grado de porosidad, lo que da la posibilidad de separar moléculas de tamaños muy diferentes. Las características y tipos de Sephadex se detallan a continuación (Tabla 5).

Sephadex	Diámetro de la partícula (μ)	Intervalo de fraccionamiento (PM)
G-10	40-120	50-700
G-15	40-120	< 1500
G-25	100-300	1000-5000
G-50	100-300	1500-30000
G-75	40-120	3000-70000
G-100	40-120	4000-150000
G-150	40-120	5000-400000
G-200	40-120	5000-800000

Tabla 5. Características de los geles de poli-dextrano.

El Sephadex G-25 y el G-50 son utilizados en la desalación o eliminación de las moléculas de bajo peso molecular. El Sephadex G-25 separa bien las sales y los aminoácidos de las proteínas.

Los geles más porosos han encontrado una gran aplicación al fraccionamiento y la purificación de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Por ejemplo, el Sephadex G-75 permite la limpia separación de ribonucleasa, tripsina, pepsina o proteínas de peso molecular más alto como albúmina sérica, hemoglobina, etc.

Los geles de polidextrano y poliacrilamida se suministran comercialmente en forma seca y deben ser hidratados posteriormente. Estos geles pueden hidratarse a temperatura ambiente (22 °C) aproximadamente en 24 horas. El tipo de gel y las dimensiones de la columna dependen del uso que se va a hacer de los mismos.

El mecanismo de separación de la cromatografía de filtración consiste en lo siguiente, suponiendo que sobre el lecho del gel se aplica una muestra con dos tipos de moléculas de distinto tamaño molecular, al añadir el eluyente, las moléculas con un radio grande que no puedan penetrar en el gel pasan por los espacios intersticiales o "huecos" que dejan entre sí los granos de gel, mientras que las moléculas con radios hidrodinámicos pequeños, además de recorrer los espacios intersticiales penetran en el grano del gel, recorriendo un camino más largo, por lo que su elución se producirá más tarde que la de las moléculas de peso molecular superior. De ésta forma, en la cromatografía de filtración molecular la elución se produce en orden decreciente de pesos moleculares (Fig 11a).

La separación de las moléculas en éste tipo de cromatografía viene dada por el espacio recorrido, y la resolución es, por tanto, función de la longitud de la

columna y del tamaño de la partícula del gel. El diámetro de la columna sólo determinará la cantidad de muestra que puede aplicarse.

Las variables utilizadas para caracterizar el lecho cromatográfico son las siguientes:

Vt.-Volumen total de la columna (volumen que ocupan las bolitas del gel más el espacio ocupado por el disolvente que rodea a las bolitas del gel).

Vo.-Volumen de exclusión (volumen de los huecos). Espacio ocupado por el disolvente que rodea a las bolitas del gel. Se determina eluyendo una muestra de peso molecular elevado. Frecuentemente se utiliza azul dextrán.

Vx.- Es el espacio ocupado por las bolitas del gel.

Ve.-Volumen de elución. Volumen al que eluye cada una de las proteínas (Fig 11b).

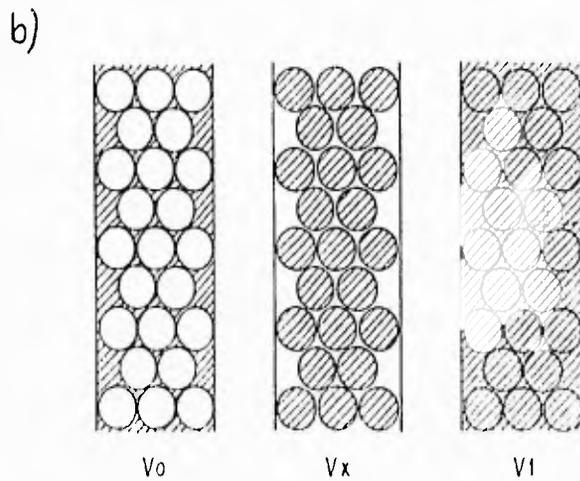
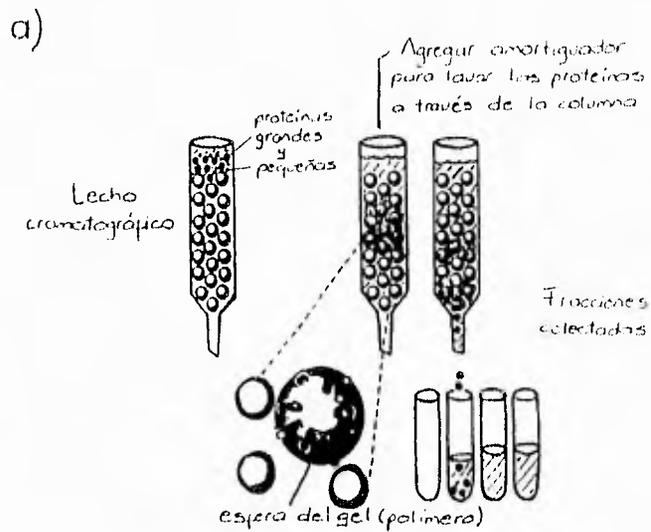


Fig 11. a) Mecanismo de separación de la cromatografía de filtración molecular (Tomado de Darnell. Molecular Cell Biology. 1995).

b) Parámetros utilizados para la columna de filtración molecular (Tomado de Cooper. Instrumentos y Técnicas de Bioquímica. 1984).

## b) Cromatografía de Afinidad

La característica principal de ésta técnica de purificación es su capacidad para remover selectivamente de una mezcla proteica compleja una proteína particular o, cuando más a un pequeño número de proteínas particulares. Este tipo de cromatografía es utilizada para el aislamiento de diversos tipos de macromoléculas utilizando las especificidades enzima-sustrato, enzima-inhibidor, antígeno-anticuerpo, etc.

Las matrices utilizadas en la cromatografía de afinidad son polímeros de acrilamida, vidrio, polisacáridos (celulosa, agarosa, dextrano), etc. La matriz se activa para que reaccione con el ligando. A la matriz activada se le ancla el ligando, y el conjunto interacciona con la especie molecular que se quiere separar. Una vez preparada la matriz con el ligando unido, la mezcla de macromoléculas se pasa por la columna donde interacciona la especie molecular específica con el ligando y queda fijada a la matriz. Las macromoléculas que no interaccionan se eluyen pasando una solución amortiguadora por la columna. La separación o elución de la macromolécula adsorbida se consigue alterando las condiciones experimentales por variación del pH o de la fuerza iónica, pasando un ligando semejante que compita con el unido a la matriz o pasando un ligando distinto al anclado en la columna por el que tenga mayor afinidad la macromolécula (Fig 12).

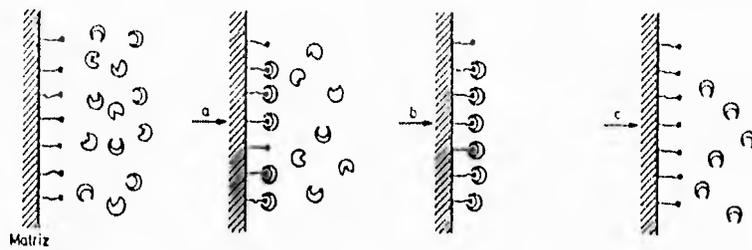


Fig 12. Esquema del mecanismo de la cromatografía de afinidad: a) interacción; b) lavado de las macromoléculas que no interaccionan; c) elución de la macromolécula que interacciona con la matriz (Tomado de Devars, R.S. y Sosa, A. Cap. 4 . Técnicas en Biología Celular. 1996).

### 3. HIPOTESIS

Dado que se han propuesto circuitos de retroalimentación entre el timo y las gónadas y que se sabe que el testículo, mediante las hormonas esteroides regula la función tímica, es posible que en el timo existan factores que modulen la esteroidogénesis testicular. Si es así, estos factores derivados del timo podrían alterar la secreción de esteroides en el testículo, ya sea modificando la secreción espontánea de testosterona o bien alterando el efecto de LH o hCG sobre la producción de este esteroide.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

-Evaluar el efecto de los derivados tímicos: la fracción tímica de bovino (FTB) y del péptido THF- $\gamma$  2, sobre la secreción de testosterona en las células de testículo de rata adulta mantenidas *in vitro*.

### 4.2. Objetivos particulares

-Mediante cromatografía de Filtración Molecular separar una fracción tímica que influye sobre la producción de testosterona en células de Leydig de rata adulta.

-Cuantificar la proteína existente de las fracciones eluidas de la columna de Filtración Molecular por el método de Bradford.

-Evaluar la actividad biológica de la FTB en un bioensayo *in vitro* con células de Leydig, midiendo su producción de testosterona en condiciones basales y estimulada con hCG por medio de radioinmunoanálisis.

-Estudiar la influencia de la dosis de la FTB en la respuesta de las células, así como la temporalidad de este efecto.

-Comparar el efecto de la FTB con el del THF- $\gamma$  2 en la preparación de células de testículo *in vitro*.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1. Material biológico

Se utilizaron timos de bovino adulto sacrificados en el rastro de Milpa Alta, Distrito Federal. Asimismo, ratas macho adultas (90 días) de 250-300 gr de peso de la cepa Wistar proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

### 5.2. Preparación del polvo acetónico de Timo

Se pesaron 3.8 g de Timo de bovino y se agregaron 10 ml de acetona analíticamente pura (Merck), con la finalidad de extraer el exceso de grasa del tejido. Se homogeneizó el tejido, en un homogeneizador Brinkmann Polytron, en tubos cónicos especiales para el Rotor SS-36 de la centrifuga Sorvall Instruments Dupont Mod RC5C. La homogeneización se hizo a una temperatura aproximada a 4°C, la cual se logró manteniendo los tubos dentro de un vaso de precipitado que contenía hielo seco más acetona de uso comercial.

El homogenado se centrifugó a 15 000 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se homogeneizó nuevamente con acetona y se centrifugó, esto se repitió por una vez. El precipitado resultante se almacenó en un desecador a -4°C hasta utilizarse (Fig 13).



Fig 13. Preparación del polvo acetónico de timo.

### 5.3. Cromatografía de Filtración Molecular

Se utilizó una columna de vidrio de 2.5 cm de diámetro por 123 cm de largo. La resina que se ocupó fue Sephadex G-75 super fino (Pharmacia), la cual se hidrató con Amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M pH 7.4 y se empacó en la columna anteriormente mencionada.

El volumen total de la columna (Vt) fue de 524 ml, el volumen de gel empacado (Vx) de 340 ml y el volumen intergel (Vo) de 184 ml.

Esta columna se calibró con marcadores de PM conocido disueltos en 3 ml de amortiguador de elución (TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M pH 7.4) los que se inyectaron a la columna. Los marcadores fueron Azul Dextrán PM 2 000 000 y Anhidrasa Carbónica PM 30 000. La columna se conectó a una bomba peristáltica (LKB, mod. 2132) con un flujo de elución de 6 ml / 30 min, se colectaron 6 ml por cada tubo o fracción. Todo el procedimiento se realizó en cuarto frío a 4°C.

Una vez calibrada la columna, se obtuvo el homogenado crudo de la siguiente manera: se pesaron 2.0 g de polvo acetónico y se homogeneizaron en 20 ml de amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M más 8.71 mg de PMSF (Sigma, pH 7.7, disuelto previamente en 1 ml de etanol) tomando en consideración una solución al 10% P/V. Se centrifugó a 18 000 rpm por 20 minutos, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 45 000 rpm por 45 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-M con Rotor 50TI serie 4398; se recuperó el sobrenadante, llamándolo "Homogenado Crudo". Para finalizar todo este procedimiento, el homogenado se pasó primero por filtros Millipore de 0.45 y luego de 0.22  $\mu$ m, y se tomaron 10 ml del mismo y se inyectó en la columna de filtración molecular a una temperatura de 4° C. Se colectaron 6 ml por fracción.

Posteriormente, se tomó una alícuota del homogenado para cuantificar proteínas por el método de Bradford.

Se obtuvieron 90 fracciones de la columna de filtración molecular y se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU-650 a 280 nm para detectar los picos de proteína. Las fracciones 43-51 que correspondían a un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, ubicadas mediante la calibración de la columna de filtración molecular con anhidrasa carbónica, se conservaron a 0° C previo a realizar una poza del pico correspondiente. A esta fracción se le denominó fracción tímica de bovino (FTB) (Fig 14).

Para probar la actividad de la FTB sobre la esteroidogénesis inducida con hCG se dividió a ésta en dos:

- 1) una parte se concentró usando una unidad de ultrafiltración AMICON, Modelo -402,75 PS1 MAX, con un filtro de corte de 10 000 Da
- 2) y la otra se probó sin concentrar (Fig 15).

Se cuantificó la proteína de las dos fracciones por el método de Bradford y se realizó el bioensayo de las mismas. Posteriormente se hizo el radioinmunoanálisis, como se describe más adelante. De esta manera, tomando en cuenta los resultados del bioensayo se procedió a la realización de las Curvas Dosis-Respuesta y Temporal y el resto de la FTB se procesó en la Columna de Afinidad de Heparina-Sepharosa, como se describe posteriormente.

#### **5.4. Efecto del Factor Tímico Humoral (THF- $\gamma$ 2) sobre la producción de esteroides**

Por otro lado la actividad del Factor Tímico Humoral, (THF- $\gamma$  2 Donación del Dr. Burstein del Instituto Weizmann, Rehovot Israel), se probó también en bioensayos de testículo de rata preparados como se describe a continuación.

Las dosis o concentraciones del THF- $\gamma$  2 utilizadas en cada uno de los experimentos fueron:

a partir de dos alícuotas denominadas 1\* y 2\* de 10  $\mu$ l, cada una con una concentración de  $10^{-3}$  M se hicieron diluciones para obtener concentraciones finales entre  $10^{-6}$  y  $10^{-10}$  M en el medio de incubación de las células.

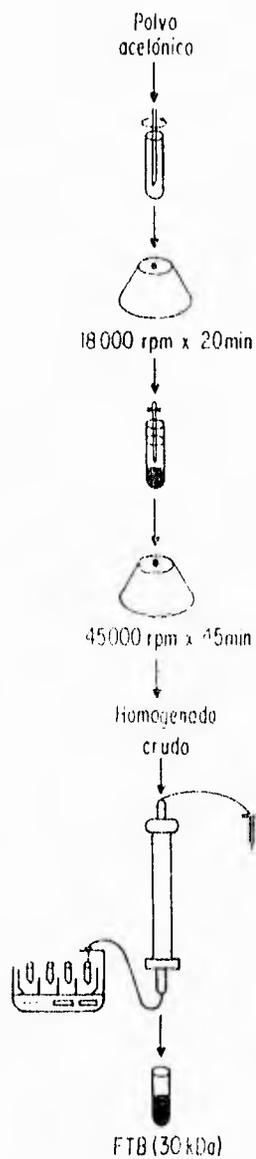


Fig 14. Obtención del homogenado crudo y aplicación para la cromatografía de filtración molecular.

	Número de Placas	hCG (IU/ml) (μl)	DHEMABE-ORAC (μl)	Células (μl)	Amortiguador TPIS 50mM NaCl 0.1M (μl)	Tiempo de Incubación (min)
Control Basal	1-3	---	700	100	200	160
	4-6	10	700	100	200	160
huestra FTB (μl)						
FTB s/concentrar Basal	7-8	---	700	100	200	160
	9-10	10	700	100	200	160
FTB concentrado Basal	11-12	---	700	100	200	160
	13-14	10	700	100	200	160

Fig 15. Protocolo utilizado para probar la actividad de la FTB sin concentrar y concentrada, sobre la esteroidogénesis inducida con hCG. Se incluyen los controles basal y tratado con hCG, así como los de la FTB.

## 5.5. Bioensayo de Células Testiculares

Antes de llevar a cabo los experimentos se realizó una curva dosis-respuesta para elegir la dosis más adecuada de hCG para estimular la secreción de testosterona en la suspensión de células testiculares, para lo cual, se utilizaron concentraciones de 0.1, 1.0, 4.0, 10 y 20 mU/ml. En la Fig 16 se observa la máxima respuesta con la dosis de 1.0 mU/ml de hCG y se obtuvo una estimulación de aproximadamente 7 veces con respecto a la basal como era lo esperado (Moger, W.H., 1979.; Reyes-Esparza, J.A., 1991). Después de esta dosis se inició un descenso en la magnitud de la respuesta.

Para realizar el bioensayo, el procedimiento que se utilizó fue una modificación de la técnica propuesta por Moger (1979), que permite obtener una suspensión de células testiculares enriquecida en células de Leydig, ya que se obtiene aproximadamente un 30% de células de Leydig. El resto de la población está compuesta por células de Sertoli, espermatozoides en sus diferentes estadios de crecimiento y macrófagos, entre otros tipos celulares.

Se utilizaron ratas Wistar adultas de 250-300 gr de peso, se anestesiaron con cloroformo y se extrajeron los testículos mediante una incisión escrotal, se colocaron en solución amortiguadora libre de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  se les retiró la túnica albugínea y se disociaron durante 15 minutos a 34°C en 20 ml de DMEM (Gibco) que contenía ASB, (Sigma) al 0.1%, 3 mg de Colagenasa (Sigma) y HEPES (Sigma) 10 mM con agitación máxima (90 ciclos por minuto).

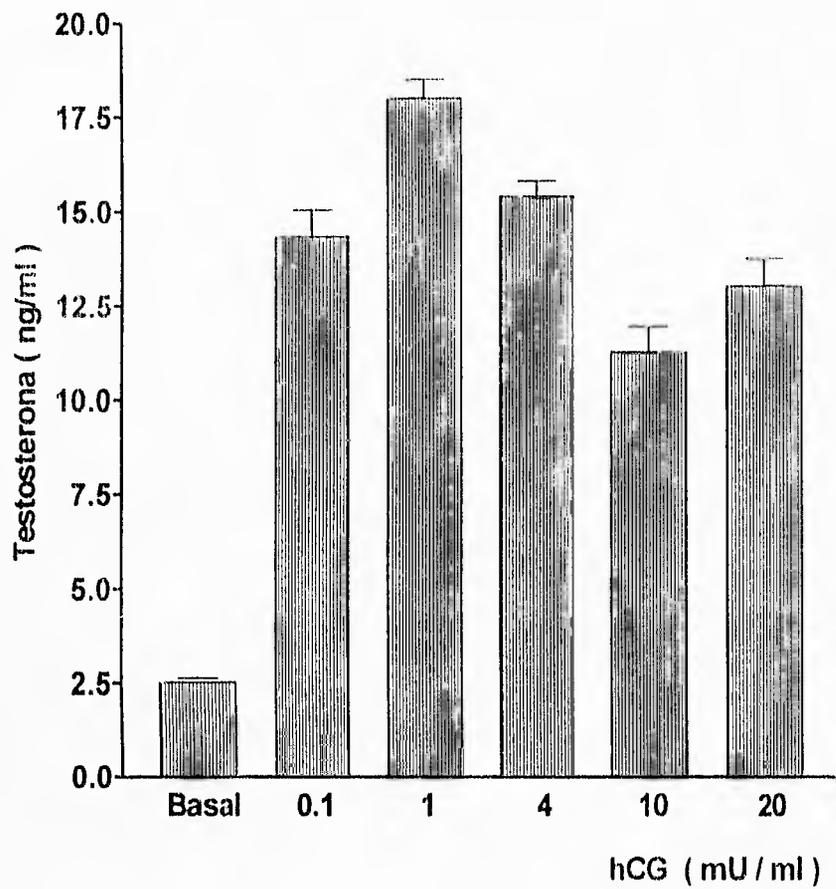


Fig 16. Curva Dosis-Respuesta de hCG. Las células se obtuvieron del testículo de rata adulta y se incubaron 3 h a 34°C. Los datos expresan  $X \pm DS$  de un experimento realizado por triplicado.

Al finalizar el período de disociación, se dejó sedimentar la masa tubular y se agregaron 20 ml de DMEM que contenía Albúmina al 0.1% y Hapes 10 mM para diluir la acción de la colagenasa y se filtró la suspensión por una malla de nylon para separar los túbulos seminíferos. Esta suspensión celular se centrifugó a 600 rpm por 5 minutos a 20°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en el último medio. Se centrifugó la suspensión celular nuevamente a 600 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió finalmente en DMEM que contenía Albúmina al 0.1%, Hapes 10 mM y 1.12 mg de Xantina (Sigma) en una proporción de 1 ml de medio de cultivo por cada 100  $\mu$ l de pastilla celular. Se procedió a contar las células en la cámara de Neubauer o hemocitómetro y se ajustó la densidad aproximadamente a  $2.6 \times 10^6$  células en cada 100  $\mu$ l de medio de cultivo (Moger, W.H., 1979). (Fig 17).

Se procedió a sembrar las células en los matraces control y tratados de acuerdo al protocolo establecido para cada experimento (Fig 18).

Posteriormente, se incubaron durante diferentes periodos de tiempo a 34°C con agitación de 20 ciclos. Se recogieron los medios y se centrifugaron a 3 500 rpm por 15 minutos. Se guardó el sobrenadante a -4 ° C para la cuantificación de testosterona por radioinmunoanálisis.

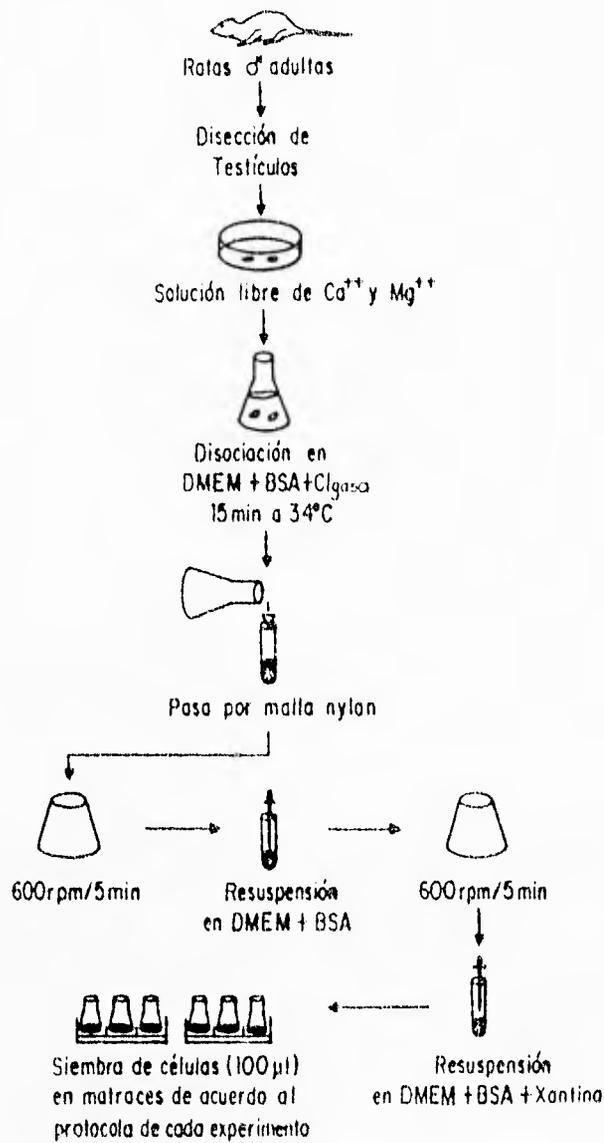


Fig 17. Metodología utilizada para el bioensayo de células testiculares.

	Número de Plastraz	hCG (1 mU/ml) ( $\mu$ l)	DMEM+ASE+YANT ( $\mu$ l)	Celulas ( $\mu$ l)	Amortiguador TRIS 50mM/NaCl 0.1M ( $\mu$ l)	PBS ( $\mu$ l)	Tiempo de Incubación (min)
Control Basal	1-3	---	700 (690)	100	200	10	180
Control hCG	4-6	10	700 (690)	100	200	10	180
					Nuestra ( $\mu$ l)		
					FTB	THF	
Conc. A 250 $\mu$ g/ml	Basal	7-9	700 (690)	100	200	(10)	180
	hCG	10-12	700 (690)	100	200	(10)	180
Conc. B 130 $\mu$ g/ml	Basal	13-15	700 (690)	100	200	(10)	180
	hCG	16-18	700 (690)	100	200	(10)	180
Conc. C 65 $\mu$ g/ml	Basal	19-21	700 (690)	100	200	(10)	180
	hCG	22-24	700 (690)	100	200	(10)	180
Conc. D 33 $\mu$ g/ml	Basal	25-27	700 (690)	100	200	(10)	180
	hCG	28-30	700 (690)	100	200	(10)	180
Conc. E 16 $\mu$ g/ml	Basal	31-33	700 (690)	100	200	(10)	180
	hCG	34-36	700 (690)	100	200	(10)	180
Conc. C 65 $\mu$ g/ml	Basal	37-39	700 (690)	100	200	(10)	30-360
	hCG	40-42	700 (690)	100	200	(10)	30-360

Fig 18. Protocolo utilizado para la realización de las curvas Dosis-Respuesta y Tiempo-Dependiente de la FTB y el THF- $\gamma$  2. Se muestran las cantidades requeridas para cada experimento realizado por triplicado con sus controles basal y hCG, así como para cada una de las diferentes dosis de la FTB y el THF- $\gamma$  2.

## 5.6. Radioinmunoanálisis de Testosterona

La técnica de radioinmunoanálisis (RIA) permite conocer la cantidad de hormona, en éste caso testosterona, que han secretado las células al medio de incubación durante el bioensayo. Consiste en la competencia de un antígeno marcado con un isótopo tritiado ( $^3\text{H}$ ) y del mismo sin la marca (frio) por un anticuerpo específico.

Para esta técnica se utilizaron tubos de poliestireno los cuales se numeraron de acuerdo al protocolo que se muestra en la Fig 19 el cual indica las cantidades requeridas para cada uno de los parámetros empleados en dicha técnica: cuentas totales (CT), unión inespecífica (UI), unión total (UT), curva patrón de testosterona, estándar interno (SI) y las muestras problema.

La reacción se incubó de 18 a 24 horas en cuarto frío a  $4^{\circ}\text{C}$ , el exceso de testosterona tritiada se eliminó con carbón activado, posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se vertieron en viales y se les agregó líquido de centelleo. Las muestras se leyeron en un contador de centelleo (Packard, Mod. 2000CA) con una eficiencia del 60% aproximadamente, las cuentas por minuto (cpm) son inversamente proporcionales a la cantidad de testosterona fría presente en el sobrenadante. La linearización de la curva patrón y el análisis de los datos se realizó mediante un programa de computadora diseñado para este fin. Dicho programa se basa en el procedimiento de logit Y (Bedolla *et al*, 1984). El coeficiente de variación (CV) intra-análisis del radioinmunoanálisis fue de 2.7% y el inter-análisis de 3.6%.

	Número de tubo	Anticuerpo (μl)	Muestra (μl)	Amortiguador H <sub>2</sub> O (μl)	Testosterona tritiada (μl)	Carbon activado (μl)
CT	1-2	----	----	200	50	----
UT	3-4	----	----	200	50	500
VT	5-6	100	----	100	50	500
<b>Curva patrón (pg/ml)</b>						
100	7-8	100	100	----	50	500
50	9-10	100	100	----	50	500
25	11-12	100	100	----	50	500
12.5	13-14	100	100	----	50	500
6.25	15-16	100	100	----	50	500
Estándar interno	17-18	100	100	----	50	500
Muestras del bioensayo para cuantificación de testosterona	19-20	100	100	----	50	500
	21-22	100	100	----	50	500
	23-24	100	100	----	50	500
	25-26	100	100	----	50	500
	27-28	100	100	----	50	500
	"	"	"	"	"	"
	"	"	"	"	"	"
	Número "y"	"	"	"	"	"
	de muestra					

Fig 19. Protocolo utilizado para el radioinmunoanálisis.

## **5.7. Cuantificación de proteínas**

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas se tomó como referencia el método descrito por Bradford (1976).

Se preparó una solución base de ASB en la proporción de 1 mg/ml de amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M, a partir de ésta se realizó la curva patrón (10, 20, 40, 80 y 100  $\mu$ l de ASB por triplicado). Se completó cada volumen hasta 0.1 ml con amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M. De las muestras problema se tomaron 100  $\mu$ l. Finalmente se agregaron 5 ml del Reactivo de Bradford (Ver Apéndice).

Una vez agregado el reactivo se mantuvieron los tubos en la oscuridad durante 10 minutos y posteriormente se leyó cada muestra en el espectrofotómetro a 595 nm. Se graficó la cantidad de proteína de cada punto de la curva patrón contra la absorbencia correspondiente. Se tomaron como referencia los datos anteriores para conocer la cantidad de proteína de las muestras problema, esto, mediante la ayuda de un programa de computación GraphPad Inplot Copyright (c) 1992.

## **5.8. Cromatografía de Afinidad (Heparina-Sepharosa)**

Para obtener la FTB con un mayor grado de pureza, se utilizó la columna de Heparina-Sepharosa. Se inyectó en ésta la FTB correspondiente a 30 kDa obtenida de la columna de filtración molecular. La columna y la muestra se trataron de la siguiente manera:

Con amortiguador TRIS HCl 100 mM pH 7 se equilibró la columna y también se calibró el detector Gilson; se continuó la elución primeramente con TRIS HCl 10mM / NaCl 0.6 M y luego con TRIS HCl 10 mM / NaCl 2 M, ambos a

pH 7. En cada caso se decidió el cambio de amortiguador cuando la lectura de absorbencia a 280 nm para detección de proteínas se hizo ilegible. En cada cambio de amortiguador se colectaron fracciones de 6 ml, cada 10 minutos, y al mismo tiempo se graficaron los picos de proteína eluída mediante un graficador Gilson.

### **5.9. Estadística**

Se analizaron los datos de cada uno de los experimentos mediante las siguientes pruebas estadísticas: Análisis de Varianza (ANOVA), Prueba de Tukey-Kramer, Coeficiente de Correlación Lineal de Pearson y la prueba "t" de Student.

En la Fig 20 se muestra en resumen la metodología utilizada en esta tesis.

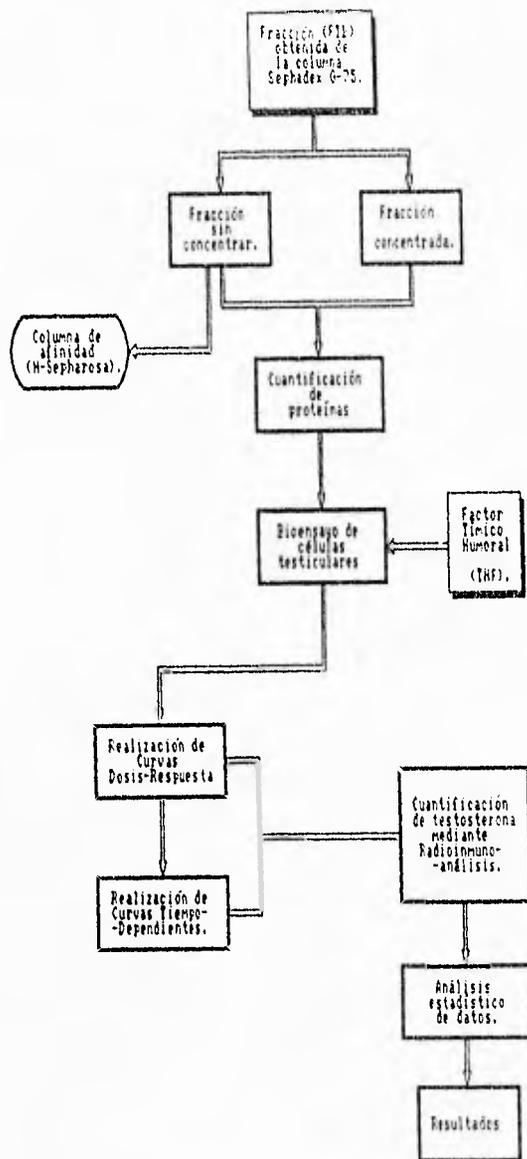


Fig 20. Metodología general

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Calibración de la Columna de Filtración Molecular. Obtención y cuantificación de proteínas de la FTB

Una vez empacado el Gel Sephadex G-75 en la columna de filtración molecular se procedió a calibrarla con marcadores de peso molecular conocido:

-Azul Dextrán	2,000,000.
-Anhidrasa Carbónica	30,000.

Se mezclaron 1 mg de azul dextrán y 2 mg de anhidrasa carbónica en amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M. Se colectaron las fracciones según se explica en la metodología y se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm.

El azul dextrán eluyó entre los 150 y 168 ml (No.de fracción: 25-28) y la anhidrasa carbónica, con peso molecular cercano a la proteína que nos interesaba, eluyó entre los 270 y 306 ml (No.de fracción: 45-51) (Fig 21). De esta manera, la columna quedó calibrada y lista para procesar la muestra (homogenado crudo).

Así, del "Homogenado Crudo" obtenido por el procedimiento descrito anteriormente se tomaron 10 ml y se inyectaron a la columna; además se separó una alícuota de 500  $\mu$ l para cuantificar proteínas.

Se colectaron las fracciones tal y como se indica en la metodología y se leyó cada fracción en el espectrofotómetro. Tomando en cuenta la calibración anterior se eligieron las fracciones con peso molecular equivalente al de la anhidrasa carbónica. La FTB eluyó en general entre los 250 y 300 ml (No.de fracción: 43-51 de la Fig 22). Posteriormente, se probó la actividad de la FTB en bioensayos de células testiculares.

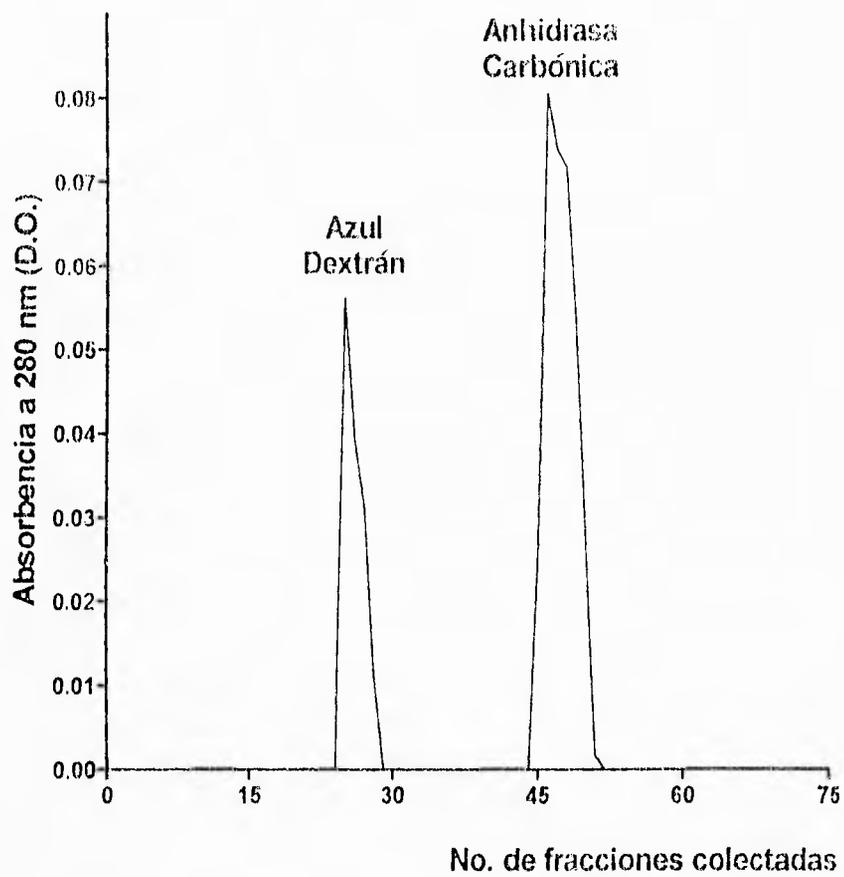


Fig 21. Calibración de la columna de Filtración Molecular con marcadores de peso molecular conocido, en este caso, azul dextrán y anhidrasa carbónica.

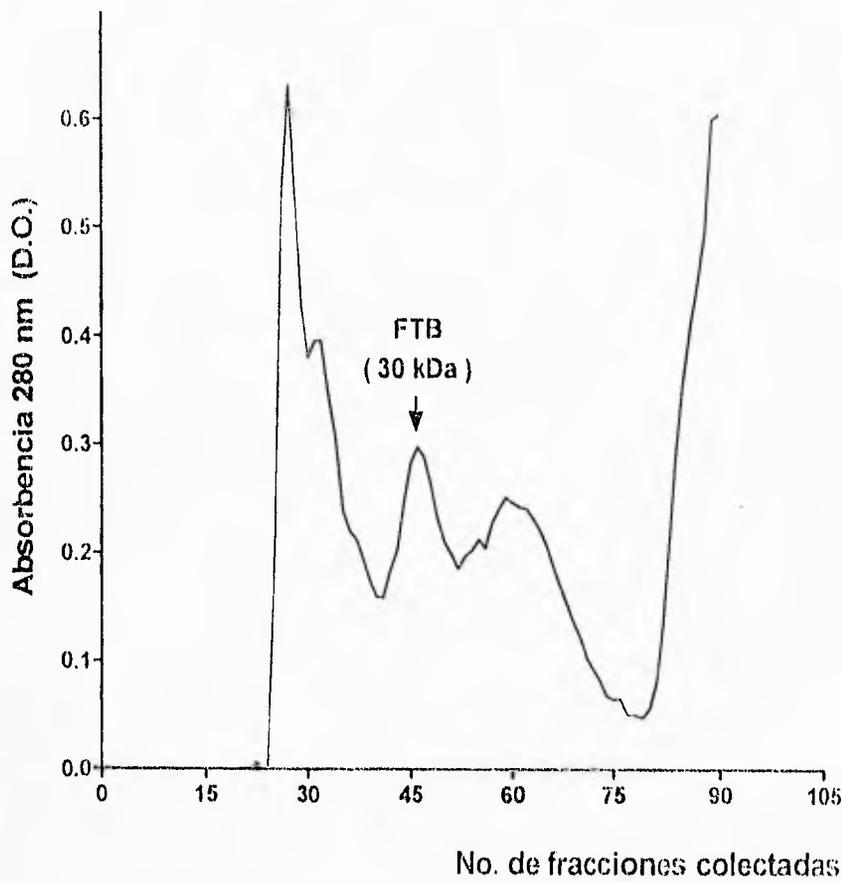


Fig 22. Perfil de elución del homogenado de timo de bovino de donde se obtuvo la fracción de 30 kDa. Se colectó cada fracción como se indica en métodos, y se registró su absorbancia a 280 nm.

Lo anterior se hizo con la finalidad de conocer, de una manera general, la cantidad de proteína del homogenado crudo al momento de inyectarlo en la columna de filtración molecular. Se realizó la cuantificación de proteínas, la que indicó que en 2 g de polvo acetónico que se pesaba, había 3.40 mg de proteína por 1 ml de homogenado crudo. El pico correspondiente a la FTB tuvo, en el caso de la figura que se presenta, una concentración de proteínas de 2 034 mg en 50 ml (0.040 mg/ml).

#### **6.1.1. Efecto de la FTB I.- Dependencia de la dosis utilizada**

Se probó la actividad biológica de la FTB que se obtuvo de la columna, mediante bioensayos que indicaron la actividad de la misma en la esteroidogénesis inducida con hCG. Se concentró tres veces en la unidad de Ultrafiltración AMICON que tenía una membrana de corte de 10 000 Da, la cual permitió separar las moléculas mayores a este tamaño para realizar el estudio de su actividad biológica y desechar las menores a ésta. Se realizó el bioensayo para probar la actividad de la FTB sin concentrar y concentrada; posteriormente se procedió a cuantificar la testosterona en el medio de incubación de las células por Radioinmunoanálisis (Fig 23).

Los resultados se muestran en la Fig 24 en la cual se observa que la fracción concentrada produjo una mayor inhibición de la secreción de testosterona dependiente de hCG que la fracción sin concentrar; ambas comparadas con el grupo control, por lo que se decidió utilizar la fracción concentrada para los experimentos subsecuentes. Además, cabe destacar que ni la FTB sin concentrar ni la concentrada afectaron significativamente la secreción basal de testosterona

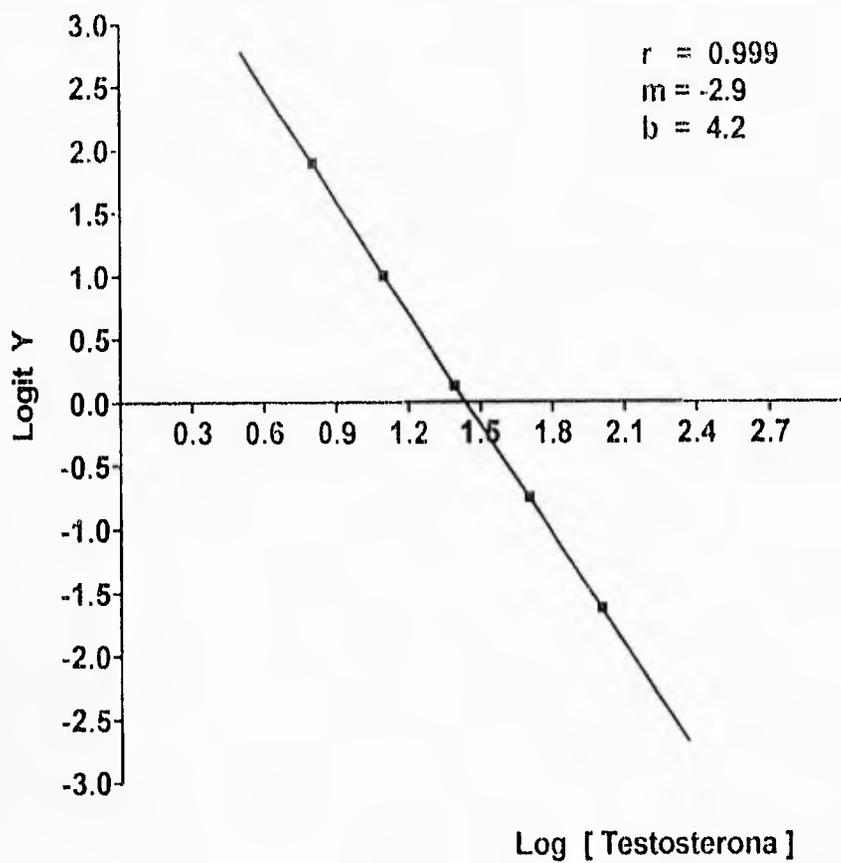


Fig 23. Para llevar a cabo el radioinmunoanálisis de los experimentos se realizó una curva patrón de testosterona de este tipo, la cual fue linearizada por el método de Logit Y. Cada punto se hizo por duplicado. Se muestra una de las gráficas obtenidas durante el desarrollo del proyecto.

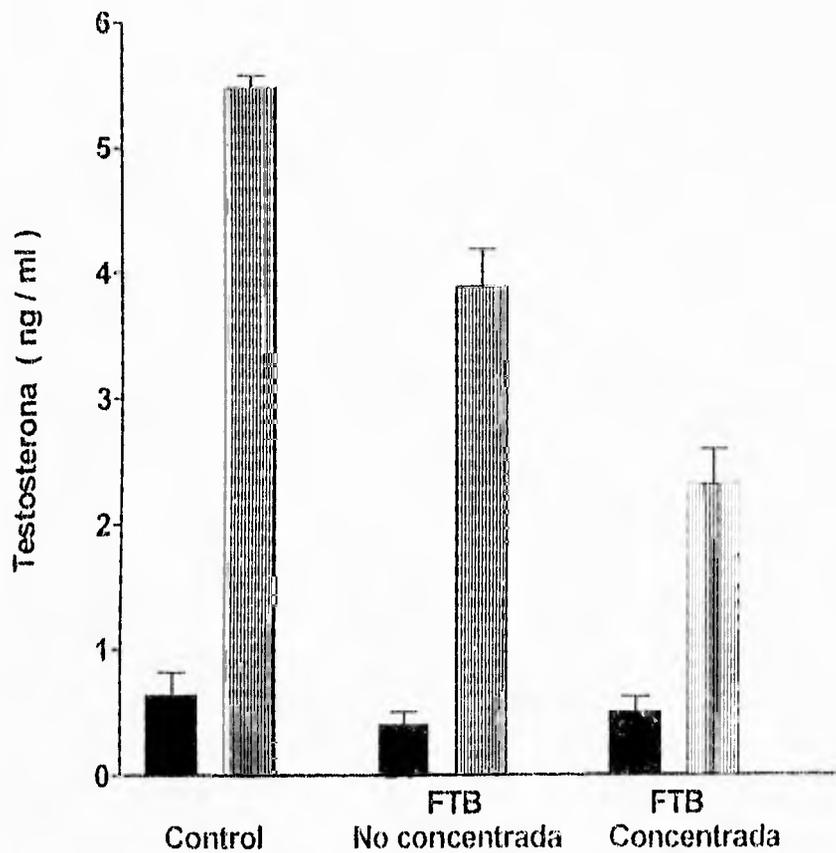


Fig 24. Efecto de la FTB que se obtuvo de la columna de filtración molecular (FTB no concentrada) y de la misma, pero utilizando una unidad de ultrafiltración AMICON (FTB concentrada) sobre la esteroidogénesis inducida con hCG en células testiculares mantenidas por 3 horas a 34 ° C.

Se muestra la secreción basal ■ y estimulada con hCG ▨ de un experimento representativo realizado por triplicado. Cada dato expresa  $\bar{X} \pm DS$ .

Para la realización de la curva dosis-respuesta a la FTB se hizo previamente la cuantificación de proteínas, que fue para este caso, de 780  $\mu\text{g}$  en un volumen de 1.5 ml de fracción concentrada. A partir de ella se hicieron las diluciones y se determinó la cantidad de proteínas de cada dilución siendo los resultados los siguientes:

-Dosis A: 52  $\mu\text{g}$ , Dosis B: 26  $\mu\text{g}$ , Dosis C: 13  $\mu\text{g}$ , Dosis D: 6.5  $\mu\text{g}$ , Dosis E: 3.25  $\mu\text{g}$ , en 200  $\mu\text{l}$ , o sea 260, 130, 65, 33 y 16  $\mu\text{g}$  en 1 ml.

Después de 3 h de incubación de las células del testículo en presencia de diferentes dosis de la FTB, y en presencia o ausencia de hCG, se procedió a cuantificar la producción de testosterona.

Los resultados mostraron que al comparar el grupo control, que incluía la secreción basal y estimulada con hCG, con cada una de las dosis de la FTB, la producción basal de testosterona se mantenía constante. Por el contrario, la secreción dependiente de hCG fue inhibida en forma dosis-dependiente, con respecto a la cantidad de proteína, ya que a menor concentración de la FTB menor inhibición y a mayor concentración de éste mayor inhibición en la secreción de testosterona. Esto se observa claramente en la Fig 25 en donde la Dosis A con 260  $\mu\text{g/ml}$  de la FTB provocó una inhibición a la respuesta con hCG, ( $1.19 \pm 0.03$  ng/ml), de aproximadamente 3 veces con respecto al control hCG ( $4.87 \pm 0.68$  ng/ml). De igual manera, pero en menor magnitud se presentó inhibición en las dosis B, C, D y E, siendo la respuesta a la hCG de cada dosis de  $2.45 \pm 0.26$ ,  $3.18 \pm 0.10$ ,  $3.16 \pm 0.02$  y  $4.22 \pm 0.34$  ng/ml comparadas con el control hCG. La respuesta de las células a la estimulación con hCG fue de 4 veces con respecto a la basal.

Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas de cada uno de los grupos se aplicó la Prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) con su respectiva prueba *a posteriori*, en este caso, la

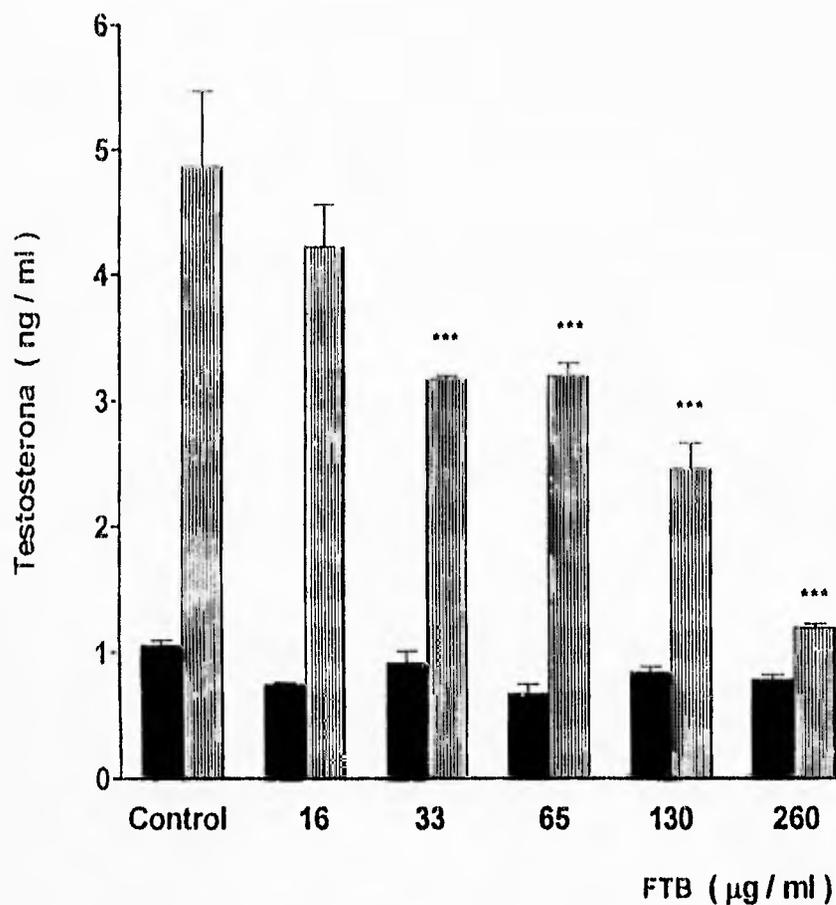


Fig 25. Efecto de diferentes dosis de FTB sobre la secreción basal ■ y estimulada con hCG ▨ de testosterona acumulada en los bioensayos de células testiculares de rata adulta mantenidas por 3 horas a 34 ° C. Se observa una respuesta dependiente de la concentración utilizada de fracción tímica de bovino (FTB) en los grupos tratados con hCG. En condiciones basales no se observa cambio alguno. Se muestra  $\bar{X} \pm DS$  de un experimento representativo realizado por triplicado que se repitió al menos tres veces. La diferencia con respecto al control se considera significativa cuando  $p < 0.001$  (...).

Prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple, la cual nos indicó que en el caso de la secreción basal entre el grupo control basal y aquellos que contenían diferentes dosis de la FTB no se presentaron diferencias. Sin embargo, entre el grupo control hCG y los de diferentes dosis de la FTB en presencia de hCG sí se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$  (\*\*\*)). Por otro lado, se hizo la comparación entre cada dosis por medio del Coeficiente de Correlación Lineal de Pearson, el cual estableció que sí había diferencias significativas en cuanto a la secreción de testosterona dependiente de hCG entre las diferentes dosis. Finalmente para validar lo anterior, se aplicó la razón t (de Student) la cual confirmó una vez más lo anteriormente mencionado.

#### **6.1.2. Efecto de la FTB II-. Dependencia del tiempo de aplicación**

Tomando como referencia la curva dosis-respuesta se eligió la dosis C (65  $\mu\text{g/ml}$ ) la cual se probó en los bioensayos, con el fin de conocer si el efecto inhibitorio de la FTB se presentaba de una manera dependiente del tiempo de exposición de las células al mismo. Se hizo el radioinmunoanálisis de cada experimento y los resultados mostraron que comparando la producción basal en el grupo control contra el tratado con la FTB en los diferentes tiempos (30, 60, 120, 180, 240 y 360 minutos) no se observaron cambios significativos de la secreción de testosterona inducidos por la FTB. Es importante destacar que tanto en el grupo control como en el tratado con la fracción tímica hubo incremento de la secreción de testosterona basal a través del tiempo y hasta los 360 minutos que fue el periodo más largo de incubación. Por otro lado, la secreción de testosterona dependiente de hCG no fue afectada por el tratamiento con la FTB a los 30 y 60 minutos de incubación. En cambio, a partir de los 120 minutos dicho

efecto se hizo presente, y se mantuvo hasta los 360 minutos, tiempo en el que se interrumpió el experimento (Fig 26).

La secreción de testosterona estimulada con hCG en los controles *versus* los grupos que reciben hCG + FTB fue la siguiente: 120 min ( $5.20 \pm 0.21$ ; vs  $3.44 \pm 0.16$  ng/ml), 180 min ( $10.80 \pm 0.07$ ; vs  $4.88 \pm 0.51$  ng/ml), 240 min ( $12.51 \pm 0.21$ ; vs  $7.66 \pm 0.58$  ng/ml), 360 min ( $18.61 \pm 1.14$ ; vs  $11.22 \pm 1.05$  ng/ml), los cuales indicaron que el efecto de la fracción es tiempo-dependiente en cuanto a la actividad inhibitoria. Durante los experimentos se observó que la respuesta de las células a la estimulación con hCG comenzó a ser evidente a partir de los 120 minutos de incubación en presencia de la hormona, y fue 7 veces mayor que la secreción basal de testosterona.

Se recurrió nuevamente al ANOVA y a la prueba de Tukey-Kramer, la cual indicó que no existen diferencias significativas en la secreción basal entre el grupo control y el de las células tratadas con la FTB, en ninguno de los periodos de incubación estudiados. Con respecto a la secreción estimulada con hCG, no se presentaron diferencias entre los controles y los tratados con la FTB a los 30 y 60 minutos de incubación, pero a partir de los 120 y hasta los 360 minutos los datos del grupo tratado con la FTB difirieron significativamente ( $p < 0.01$  (\*\*)). Para corroborar si existían diferencias significativas en cuanto a la secreción de testosterona con las dosis de la FTB utilizadas con respecto al tiempo se recurrió además al análisis de los datos por medio del Coeficiente de Correlación Lineal de Pearson y la razón t (de Student), los cuales corroboraron que a los 120, 180, 240 y 360 minutos sí se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

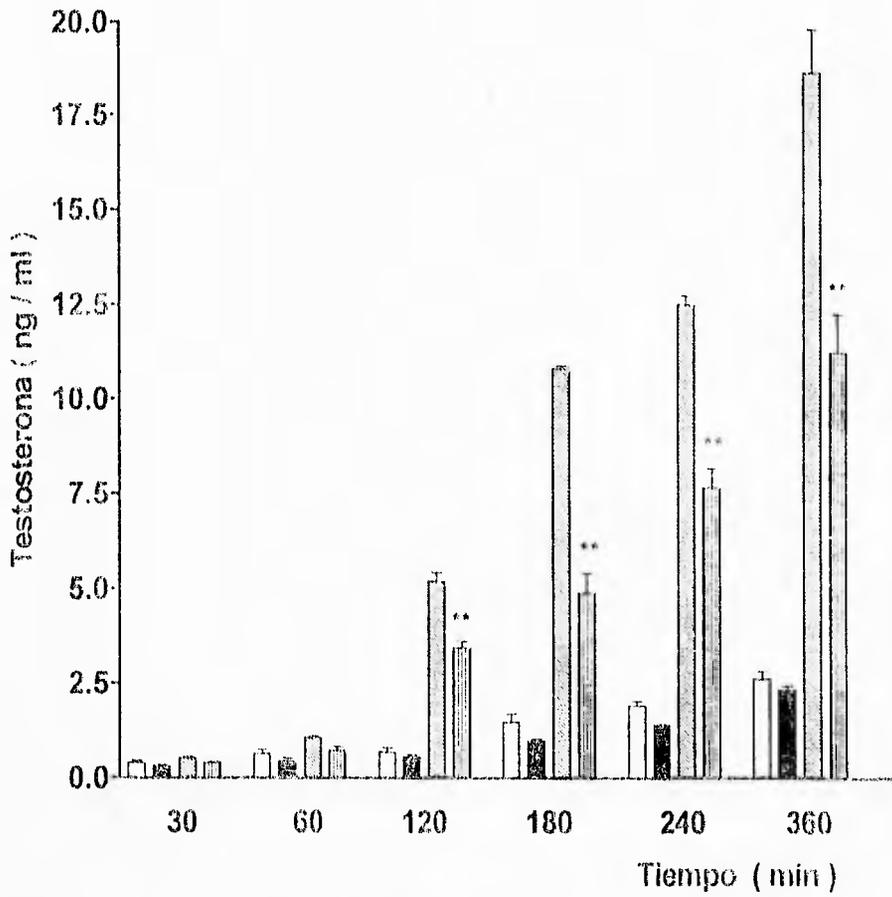


Fig 26. Efecto de la dosis de 65  $\mu$ g de proteína de FTB sobre la secreción de testosterona basal  $\square$ , basal + FTB  $\blacksquare$ , y estimulada con hCG  $\square$  y hCG + FTB  $\blacksquare$  en bioensayos de células testiculares de rata adulta, durante diferentes tiempos de incubación a 34 ° C . Se muestra  $\bar{X} \pm DS$  de un experimento representativo realizado por triplicado y repelido al menos tres veces. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.01$  (\*\*).

## 6.2. Curva Dosis-Respuesta al THF- $\gamma$ 2

Para probar la actividad del THF- $\gamma$  2 sobre la esteroidogénesis inducida con hCG, y compararla con la producida en presencia de la FTB se investigó el efecto de diferentes dosis de THF- $\gamma$  2.

Se hizo el radioinmunoanálisis de cada experimento y los resultados se muestran en la Fig 27 en la cual se observa que la secreción basal de testosterona no se modificó con ninguna de las dosis de THF- $\gamma$  2, durante las tres horas de incubación que duró el experimento, comparándola con el grupo control basal. Sin embargo, en la secreción estimulada con hCG, se produce una ligera estimulación con dosis altas de THF- $\gamma$  2, en este caso, con  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M respectivamente. Las dosis de  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M no ejercen efecto alguno sobre dicha secreción. Se observó que en el grupo control la producción de testosterona dependiente de hCG fue en el caso de estos experimentos 5 veces mayor que la secreción basal.

Con el Análisis de Varianza y la prueba de Tukey-Kramer se estableció que no hubo diferencias significativas entre la secreción basal del grupo control y la de los grupos basales tratados con diferentes dosis de THF- $\gamma$  2. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estimulados con hCG y con hCG más THF- $\gamma$  2. Se hicieron asimismo las pruebas del Coeficiente de correlación lineal de Pearson y la "t" de Student, las cuales indicaron que no hubo diferencias entre cada una de las dosis estudiadas.

Al no observar un comportamiento dosis-dependiente muy claro se decidió hacer experimentos con un tiempo de incubación de cinco horas. La Fig 28 muestra los resultados de un experimento representativo y se observa que al igual que en los experimentos de 3 horas las diferentes dosis de THF- $\gamma$  2 no tuvieron efecto sobre la producción basal de testosterona. Sin embargo en la secreción

dependiente de hCG se manifestó una ligera estimulación con todas las dosis de THF- $\gamma$  2 utilizadas, pero ahora las dosis más bajas  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  produjeron una estimulación ligeramente mayor que las dosis  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$ . Estas comparaciones se hicieron tomando como referencia sus respectivos controles de secreción basal, o bien en presencia de hCG. En estos experimentos la secreción dependiente de hCG fue aproximadamente 6 veces mayor que la secreción basal.

Al analizar los datos con las pruebas estadísticas mencionadas anteriormente se observó que no hubo diferencias significativas entre la secreción basal de testosterona del grupo control y la de los grupos tratados con las diferentes dosis de THF- $\gamma$  2. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el grupo control que recibió hCG y aquellas tratadas con hCG y el THF- $\gamma$  2.

No se insistió con la temporalidad del fenómeno ya que no se observó una curva dosis-respuesta clara.

### **6.3. Cromatografía de Afinidad**

En la Fig 29 se observan claramente los dos picos de proteína contenidos en la FTB proveniente de la columna de filtración molecular después de eluir la columna con amortiguadores de fuerza iónica creciente. El primer pico corresponde a la fracción eluida con amortiguador TRIS 10 mM / NaCl 0.6 M y el segundo a la que eluyó con amortiguador TRIS 10 mM / NaCl 2 M.

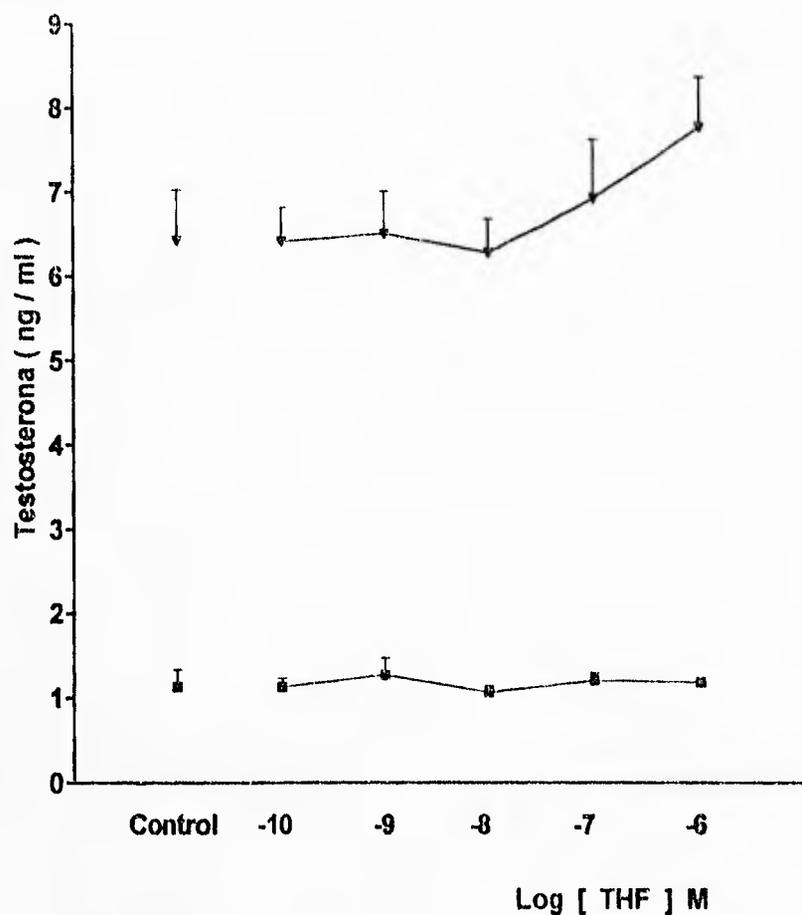


Fig 27. Efecto de diferentes dosis de THF sobre la secreción de testosterona en bioensayos de células testiculares de rata adulta. Se muestra la secreción basal  $\blacksquare$  y estimulada con hCG  $\blacktriangledown$  durante 3 horas de incubación a 34 ° C . Los datos expresan  $\bar{X} \pm DS$  de un experimento representativo realizado por triplicado repetido al menos tres veces.

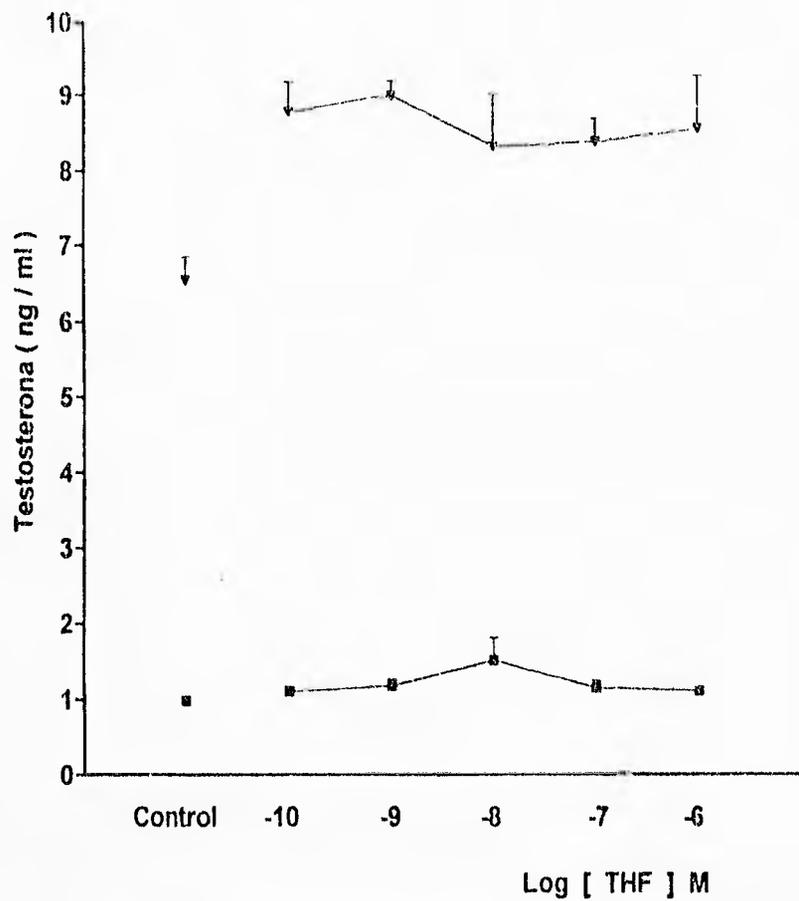


Fig 28. Efecto de las dosis de THF sobre la secreción basal  $\blacksquare$  y estimulada con hCG  $\blacktriangledown$  de testosterona secretada por las células de Leydig, durante 5 horas a  $34^{\circ}\text{C}$ . Se muestra el  $\bar{X} \pm \text{DS}$  de un experimento representativo realizado por triplicado y repetido al menos tres veces.

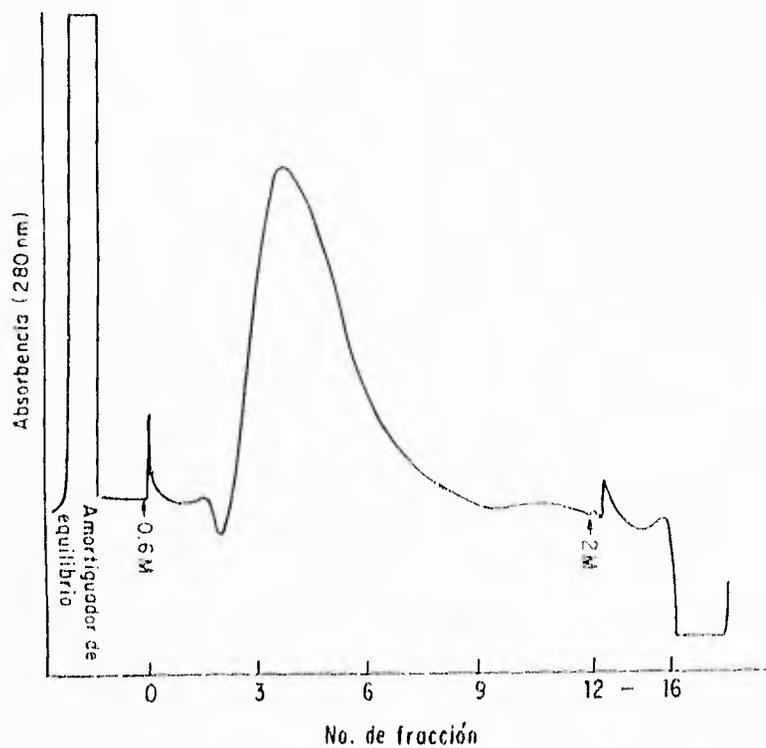


Fig 29. La fracción correspondiente a 30 KDa (FTB) proveniente de la columna de filtración molecular, Sephadex G-75 superfino, se procesó en una columna de heparina-sepharosa. Las fracciones eluyeron con amortiguador TRIS 10 mM / NaCl 0.6 y 2 M

## 7. DISCUSION

Las proteínas desempeñan importantes funciones en prácticamente todos los procesos biológicos. En la célula viva hay miles de ellas realizando funciones diferentes con la perfecta armonía característica de la vida. Son moléculas de gran tamaño, complejidad y diversidad. Uno de los objetivos principales en su estudio ha sido descifrar la estructura de las mismas y, con ello, descubrir cómo funcionan. Un análisis estructural completo constituye un gran trabajo, por lo que, hasta ahora, los bioquímicos sólo han alcanzado a comprender en profundidad una pequeña fracción de las proteínas conocidas. No obstante, se han revelado algunos principios generales, como por ejemplo se admite hoy la existencia de subestructuras compartidas por diversas proteínas, que probablemente desempeñen funciones similares en muchas de ellas (Doolittle, 1989). El mismo interés presenta la cuestión de cómo han evolucionado y se han diversificado los millares de proteínas de cualquier organismo. Uno de los grandes logros de la bioquímica ha sido el averiguar cómo las secuencias de los aminoácidos determinan la conformación de las proteínas, a su vez, cómo se unen a sustratos específicos y a otras moléculas, participan en la acción catalítica y transducen energía e información.

Para llevar a cabo estos estudios es necesario la purificación de la proteína en cuestión, y para saber las funciones de la misma conviene investigar ampliamente su contexto fisiológico. De aquí deriva el objetivo principal de este trabajo, en el cual, en primera instancia se estudia el efecto de una fracción de naturaleza proteica derivada del timo de bovino sobre la secreción basal y estimulada con hCG de testosterona, en una suspensión de células testiculares *in*

*vitro*, todo esto en el contexto de la interacción inmunoendocrina entre el timo y las gónadas.

Estudios preliminares indican que el timo de rata macho (15 días de edad) posee una fracción con PM cercano a 28 kDa que compite por la unión de la hCG al receptor correspondiente en células testiculares (Hiriart, M., y Romano, M.C. 1986) y que además inhibe la secreción de testosterona dependiente de hCG en una suspensión de células de testículo (Pedemera *et al.*, 1986). A su vez, se ha determinado que las células reticuloepiteliales del timo de rata prepúber son productoras de esta fracción (Martín, D., y Romano, M.C. 1992), y por otra parte se demostró que la secreción de la fracción tímica involucrada en la modulación de la función testicular depende de la edad del animal y que esta fracción se encuentra presente desde etapas tempranas, como en el caso de la rata recién nacida y hasta en la adulta, reproduciendo el efecto inhibitorio ya mencionado (Reyes-Esparza, J.A., y Romano, M.C. 1989).

Posteriormente, se llevaron a cabo diferentes técnicas de purificación de la fracción proveniente del timo de ratas prepúberes (Porrás, V.M.G., 1988). Se realizaron estudios electroforéticos para caracterizarla, no solo en timo de rata, sino también en bovino y humano, con el propósito de avanzar en su purificación y lograr su secuenciación (Porrás, V.M.G., 1991).

Con base en lo anterior, en este trabajo se decidió utilizar timo de bovino, ya que por su tamaño permitiría disponer de una mayor cantidad de proteína, que en los primeros estudios con timo de rata había sido un factor limitante, pues los timos de rata son muy pequeños y se tiene que sacrificar a una gran cantidad de animales para obtener apenas cantidades detectables de proteína (Porrás, V.M.G., 1991). Por otra parte, era importante corroborar si esta especie presentaba también una fracción tímica con las mismas características de actividad biológica que la de rata, ya que las hormonas de naturaleza proteica que

se han aislado del timo que presentan actividad, sobre todo en el sistema inmunológico, son de origen bovino. En este sentido se realizó un estudio profundo de la actividad biológica de la fracción tímica que fue motivo de esta tesis, en la cual se demostró que dicha fracción es capaz de inhibir la secreción de testosterona dependiente de hCG. Por último, era necesario corroborar si el efecto inhibitorio se presentaba en una especie que no es homóloga, es decir, obtener la fracción y probar su actividad biológica en bioensayos de células testiculares de rata adulta, a lo que se le llama reacción cruzada entre especies, encontrándose que la fracción obtenida del timo de bovino es capaz de modular la esteroidogénesis en el testículo de la rata, sin alterar la secreción basal de testosterona.

Para realizar estos estudios en primer lugar se calibró la columna con marcadores de peso molecular conocido. La separación de dichos marcadores en la cromatografía indicó que la columna separó adecuadamente ya que se obtuvieron dos picos bien definidos como se espera en este tipo de columna (Fig 21). Tomando como referencia esta calibración se obtuvo el perfil de elución del homogenado de timo de bovino, a partir del cual se identificó el volumen de elución en el que se ubica la FTB con peso molecular aproximado a 30 kDa (Fig 22). La fracción de 30 kDa fue dividida en dos partes, una sin concentrar y la otra concentrada y se probó su actividad biológica como se menciona en material y métodos. Al concentrar la fracción se elimina agua así como moléculas menores a 10 kDa que pudieran tener otros efectos sobre las células del testículo.

Como era de esperarse la FTB concentrada produjo una mayor inhibición que la FTB sin concentrar. Es interesante destacar que el procesamiento por estos dos métodos preservó su actividad o efecto inhibitorio sin alterar la secreción basal de testosterona (Fig 24).

Las dosis obtenidas a partir de la FTB concentrada y utilizadas en la curva dosis-respuesta muestran que ninguna de las cinco dosis modifica la secreción basal de testosterona durante las tres horas de incubación que duró la prueba.

Este comportamiento fue similar a los resultados que se obtuvieron con la fracción tímica derivada de rata. Sin embargo, se observó un efecto de la FTB de tipo inhibitorio sobre la secreción estimulada con hCG, que depende de la dosis de fracción tímica utilizada expresada como cantidad de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) en 200  $\mu\text{l}$  de la FTB. Se realizaron experimentos para estudiar la temporalidad del fenómeno inhibitorio producido por la FTB observándose que el efecto se presenta a partir de los 120 y se prolonga hasta los 360 minutos y probablemente durante más tiempo. La incubación de las células se hizo en un máximo de 360 minutos ya que se ha comprobado que si se administra hCG durante largos periodos de tiempo se desensibilizan las células de Leydig y dejan de responder a la hormona por lo cual ya no se podría estudiar el efecto de la FTB. Además 6 horas es un periodo razonable para conservar la viabilidad celular, debido a que las condiciones bajo las cuales se encuentran las células no son las de cultivo en medios enriquecidos que implica ciertos parámetros distintos a los que se tienen para el bioensayo. Aunque se han llevado a cabo estudios con células de Leydig de rata adulta en cultivo mantenidas por periodos largos de incubación, se ha observado que, en general, no son los modelos ideales para evaluar o estudiar algún efecto hormonal, ya que al permanecer en medios sin suero y hormonas las células normalmente pierden sus receptores a LH después de 1-3 días de cultivo, y en paralelo a este hecho disminuye la actividad de las enzimas  $17\alpha$ -hidrolasa y la  $17,20$  desmolasa. Consecuentemente, estos cultivos no producen testosterona y otros esteroides, aunque se ha visto que se mantienen niveles significativos en cuanto a la producción de pregnenolona y progesterona por más de 15 días de cultivo. En contraste con la situación anterior, las células de Leydig fetales pueden

mantenerse en cultivo por largos periodos de tiempo (por arriba de 78 días) sin que se produzca regulación negativa y lesiones esteroidogénicas, además no se ha demostrado que el proceso de desensibilización se presente en este tipo de células, de esta manera, las células de Leydig fetales proporcionan un buen modelo para estudios de acción hormonal en el testículo (Dufau, M.L., y Knox, G.F. 1985). Por lo anterior, sería factible realizar experimentos en cultivos de células de testículo adulto, (dentro del límite de tiempo mencionado anteriormente), y fetal con la finalidad de corroborar si el efecto inhibitorio de la FTB se prolonga por más de 6 horas.

Los resultados obtenidos de la curva tiempo-dependiente, sugieren que el timo de bovino posee una fracción de naturaleza proteica que provoca un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona dependiente de hCG en células del testículo. Acerca del mecanismo por el cual se produce este fenómeno sólo podemos especular que podría ser similar al descrito para la fracción del timo de rata, en el que se ha demostrado que la inhibición se debe a que la FT compete con la hCG por los sitios de unión al receptor localizados en la célula de Leydig (Hiriart, M., y Romano, M.C. 1986) sin descartar los posibles efectos que la fracción pudiera tener en algún paso de la ruta esteroidogénica. Por lo que se investigó el efecto de la fracción con un compuesto análogo a LH como la forskollina, que es un fármaco que estimula directamente a la adenilato ciclasa y por consiguiente eleva los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub> actuando en un paso posterior al receptor LH/hCG, indicando que se produce el mismo efecto inhibitorio que cuando la esteroidogénesis es estimulada con hCG. En este mismo estudio se cuestionó si solamente la adenilato ciclasa estaba inactivada y por esto disminuía su capacidad para elevar los niveles de AMP<sub>c</sub> y si este mismo era incapaz de estimular la síntesis de testosterona en presencia de la fracción tímica, por lo anterior, se utilizó 8-Bromo AMP<sub>c</sub> que es un compuesto que puede

penetrar a la célula y elevar los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub>, y se observó que hubo una respuesta de tipo inhibitorio, lo que indicó que el efecto de la fracción no se debe a una disminución del AMP<sub>c</sub> por inactivación del complejo adenilato ciclasa, lo que sugiere que la FT de rata además de competir en el sitio receptor para hCG, tal vez afecte la cascada de señalización de la ruta esteroidogénica en algún paso posterior a la activación de AMP<sub>c</sub> (Reyes-Esparza, J.A., 1991).

Un fenómeno similar llamado de regulación negativa, se ha descrito para LH-hCG en células de testículo de rata adulta, en las que la LH induce un doble control en la función de la célula de Leydig, ya que a bajas dosis de LH mantiene a los receptores y enzimas esteroidogénicas en un estado de regulación máximo o positivo, mientras que altas dosis de la hormona ocasionan que el receptor presente regulación negativa y desensibilización (Dufau, M.L., 1988). Esta reducción en la unión al receptor o regulación negativa, demostrada en detalle *in vivo* se ha presentado también en cultivos de células de Leydig de rata adulta *in vitro* y en células de Leydig de ratón, y está asociada en la rata con una sensibilidad alterada de la célula blanco debido a lesiones de la vía esteroidogénica. Esto se debe a que las gonadotropinas inducen lesiones esteroidogénicas en las células de rata adulta, las cuales se caracterizan por la disminución en la conversión de progesterona al andrógeno siguiente, lo que ocasiona una baja producción de testosterona en respuesta a la estimulación con LH *in vitro*, a lo que se le llama "lesión tardía". Además, con dosis supramáximas de hCG también se observa que se produce una disminución de la conversión de colesterol a pregnenolona y a testosterona en respuesta a la hCG *in vitro*, a lo que se le denomina "lesión temprana". Por lo anterior, sería interesante continuar con el estudio de los efectos de la FTB sobre la ruta esteroidogénica, para conocer en qué paso se produce la inhibición en la secreción de testosterona después de que el factor se ha unido al sitio del receptor a hCG.

Por otro lado, aunque todavía no se conoce cómo está constituido químicamente la FTB se descarta la posibilidad de que esta fracción sea alguna de las hormonas proteicas denominadas citocinas, como la Interleucina-1 (IL-1) o Interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), que también producen inhibición de la secreción de testosterona y que son liberadas, en el caso del timo, por las células que lo constituyen como son linfocitos, macrófagos y células reticuloepiteliales, entre otras. Con respecto a la IL-1 su actividad biológica reside en dos especies de polipéptidos, cada uno aproximadamente de 17 kDa, pero con puntos isoeléctricos distintos de 5.0 a 7.0, los dos polipéptidos de la IL-1 se sintetizan como precursores de unos 33 kDa (Abbas *et al.*, 1995) por lo que en algún momento se podría pensar que se trata de la FTB por su peso molecular tan cercano. Además la IL-1 se separa mediante proteólisis para generar proteínas de 17 kDa maduras, es decir, el precursor de la IL- $\alpha$  de 33 kDa es biológicamente activo mientras que el de IL- $\beta$  debe procesarse a la forma de 17 kDa antes de ejercer sus funciones biológicas (Abbas *et al.*, 1995). Los datos publicados de la acción de la IL-1 sobre la esteroidogénesis en las células de Leydig son contradictorios. Se ha reportado que la IL-1  $\beta$  y en menor grado la IL-1  $\alpha$  inhiben la producción de testosterona estimulada con hCG en cultivos de células de Leydig de ratas recién nacidas, prepúberes y adultas después de un periodo de 24 horas de incubación (Calkins *et al.*, 1988; 1990; Fauser *et al.*, 1989; Verhoeven *et al.*, 1988). La IL-1  $\beta$  estimula la secreción basal de testosterona en cultivos de células de Leydig de ratas prepúberes (Verhoven *et al.*, 1988), pero sin afectar a los cultivos de células de ratas recién nacidas y adultas (Calkins *et al.*, 1988; 1990; Fauser *et al.*, 1989). En otro estudio, se reporta que la IL-1  $\alpha$  estimula la secreción basal de andrógenos liberada por las células de Leydig de rata adulta e inhibe la estimulada con LH (Moore, C. y Moger, W.H. 1991) También se ha reportado que la IL-1  $\beta$  estimula tanto la secreción basal como la estimulada con

LH de células de Leydig de rata adulta cultivadas por 48 horas (Warren *et al.*, 1990). En conjunto estos resultados sugieren que la acción de la IL-1 sobre la esteroidogénesis de células de Leydig *in vitro* puede ser estimuladora, inhibitoria o no tener efecto alguno dependiendo de las condiciones experimentales (Sun *et al.*, 1993). Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  inhiben la secreción basal de testosterona de células de testículo de rata adulta en cultivos de 48 horas, mientras que la secreción estimulada con hCG no es alterada (Sánchez *et al.*, 1995).

En general, el efecto de IL-1 sobre la producción de testosterona dependiente de hCG requiere de al menos 24 horas para observarse y en muchos casos estimula la secreción basal de testosterona, mientras que el efecto de la FTB se comienza a observar a las 2 horas de incubación y no altera los niveles basales de testosterona, inhibiendo sistemáticamente la producción de testosterona dependiente de hCG.

Con respecto a otra citocina, el IFN- $\alpha$ , se ha demostrado que ejerce un efecto de tipo inhibitorio sobre la secreción estimulada con hCG de células de Leydig en cultivo de cerdos de 4 semanas de edad, además, se inhibe la producción basal de testosterona en presencia de altas dosis de IFN- $\alpha$  (100-1000 IU/ml). Esta inhibición no está mediada por una reducción en los sitios de unión al receptor en las membranas de las células de Leydig (Orava *et al.*, 1985), efecto que sí se observa con la FT de rata; también el IFN- $\alpha$  difiere en cuanto al peso molecular y al punto isoeléctrico con la FT que es de 18 kDa y 6.9 para el primero.

Para comparar el efecto de la FTB con factores ya conocidos y secuenciados, derivados del timo de bovino, se utilizó un octapéptido con PM de 918 Da denominado THF- $\gamma$  2 que es un factor secretado por las células

reticuloepiteliales del timo (donado por el Dr. Burstein del Instituto Weissmann de Rehovot, Israel) y se probó su efecto en el mismo modelo empleado para la FTB.

Los resultados en este modelo experimental no muestran un efecto consistente del THF- $\gamma$  2 sobre la producción de testosterona estimulada con hCG durante 3 y 5 horas de incubación, por el contrario, a diferencia de la FTB el THF- $\gamma$  2 tiende a estimular la producción de testosterona en las primeras horas de incubación (Fig 27 y 28). Esto a pesar de que las condiciones experimentales fueron las mismas que las utilizadas con la FTB y la respuesta de las células a la estimulación con hCG fue la esperada. Se utilizó asimismo otro modelo experimental que permite ver efectos prolongados, 24 horas o más para determinar si el posible efecto del THF- $\gamma$  2 requería más tiempo para producir cambios. Se cultivaron las células de testículo durante 24, 48 y 72 horas y se observó que el tiempo no fue el factor limitante para que se presentara alguna respuesta de las células al THF- $\gamma$  2 (datos no mostrados).

Ante estos resultados se podría pensar que tal vez el THF- $\gamma$  2 no tenga un efecto directo sobre las células de Leydig o bien que esté actuando sobre otros tipos celulares del testículo y que por esta razón se esté viendo una suma algebraica de efectos que podrían ocultar posibles modificaciones inducidas por el THF- $\gamma$  2. Para descartar esta posibilidad sería necesario trabajar por ejemplo con células de Leydig purificadas.

Los datos obtenidos con THF- $\gamma$  2 indican que no necesariamente todos los factores u hormonas proteicas liberadas por los diferentes tipos de células que constituyen el timo producen un efecto inhibitorio, a nivel de las células que constituyen el testículo. Y asimismo sugieren que el elemento activo en la FTB es probablemente diferente al THF- $\gamma$  2.

Finalmente, para continuar con la purificación de la FTB se empleó la técnica de cromatografía de afinidad a la heparina. Esta técnica ha sido utilizada

para purificar factores de crecimiento de células endoteliales, cerebro, hipófisis y retina de bovino empleando amortiguadores de fuerza iónica creciente (Lobb, R.R., y Fett, J.W. 1984). También este método se empleó para purificar parcialmente la FT de rata, utilizando los amortiguadores mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos indicaron que la FT de rata es afín a la heparina y que eluye con 1 y 2 M, lo que indica que las proteínas así obtenidas tienen alta afinidad por la heparina (Porras, V.M.G., 1988).

Con base en lo anterior, en la Fig 29 se utilizó un amortiguador de equilibrio para facilitar la salida de las impurezas presentes en la muestra que no tenían afinidad por la heparina y después se utilizaron dos concentraciones de sales (0.6 y 2 M) en la solución amortiguadora, que se aplicaron a la columna de manera creciente. De la aplicación de cada concentración de amortiguador se obtuvo un pico y el perfil de elución fue muy similar al obtenido utilizando la FT de rata. En otros experimentos del laboratorio que no son motivo de esta tesis se observó que las proteínas del timo de bovino que eluyeron con 1 y 2 M inhibieron la respuesta de las células a hCG, sin alterar la secreción basal de testosterona.

En resumen, en esta tesis se ha demostrado que el timo de bovino contiene una fracción que modula la esteroidogénesis en células de testículo *in vitro*. La FTB no altera la secreción basal de testosterona, en cambio tiene un efecto de tipo inhibitorio sobre la producción de testosterona estimulada con hCG.

El efecto de la FTB sobre la secreción de testosterona dependiente de hCG es a su vez dependiente del tiempo y de la dosis de fracción utilizada. Por otra parte, se demostró que el efecto de la FTB no es reproducido por el THF- $\gamma$  2, ya que la incubación de las células del testículo en presencia del mismo no modifica significativamente ni la secreción basal de testosterona ni la respuesta a la estimulación con hCG.

Finalmente los resultados de esta tesis sugieren que en el timo de bovino se encuentra una fracción capaz de modular la producción de esteroides en el testículo. Estos datos reafirman la relación entre los sistemas inmunológico y neuroendocrino.

## 8. CONCLUSIONES

El timo de bovino contiene una fracción de aproximadamente 30 kDa que modula la secreción de testosterona dependiente de hCG en células de testículo de rata adulta, sin alterar la secreción basal de esta hormona.

La FTB inhibe la respuesta a hCG en forma dependiente de la concentración del mismo. La respuesta de las células de testículo es significativa a partir de las 2 horas de incubación en presencia de la fracción.

El THF- $\gamma$  2 no reproduce el efecto de la fracción tímica de 30 kDa. Por el contrario produce una discreta estimulación de la respuesta a hCG durante 3 horas de incubación, sin alterar la secreción basal de testosterona, mientras que a las 5 horas ya no se observa esta tendencia, ambos resultados estadísticamente no son significativos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. 1995. Inmunología celular y molecular. Edit Interamericana de España Mc Graw-Hill. Barcelona, España. 517 pp.
- Aguilar, M.C., Romano, M.C., Pedemera, E. 1981. Ultrastructure of Leydig cells in the testis of chicken submitted to early embrionic surgical bursectomy. *J.Anat.* 133: 543-553.
- Aguilera, G., and Romano, M.C. 1989. Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells in vitro. *J. of Endocrinology.* 123: 367-373.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1989. Molecular Biology of cell. Garland Publishing Inc, New York and London. p. 681-726.
- Ansar, A.S., Penhale, W.J., y Talal, N. 1985. Sex Hormones, Immune Responses, and Autoimmune Diseases. Mechanisms of Sex Hormone Action. *Am. J. Pathol.* 121: 531-551.
- Austin, C.R., Short, R.U. 1989. Reproduction in mammals: 3 hormonal control of reproduction. 2da. edicion. Ed. Cambridge University Press. Great Britain. 76-90 pp.
- Bach, J.F., Goldstein, G. 1980. Newer concepts of thymic hormones. *Thymus.* 2: 1-4.
- Barr, M.L. y Kierman, J.A. 1986. El Sistema Nervioso Humano: un punto de vista anatómico. Edit. Harla. México. pp 210-219.
- Bedolla, T.N., Ulloa-Aguirre, A., Landeros, V.J., y Perez-Palacios, G. 1984. Analisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. *Rev. Invest. Clín. (Méx).* 36: 179-192.
- Besedovsky, H.O. y Sorkin, E. 1974. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 249: 356-358.

- Besedovsky, H.O., del Rey, A., y Sorkin, E. 1985. Immune-Neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 135: 750-754.
- Besedovsky, H.O., del Rey, A. 1992. Immune-Neuroendocrine Circuits: Integrative Role of Cytokines. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 13: 61-94.
- Blalock, J.E. 1984. The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.* 132: 1067-1070.
- Blalock, J.E. 1989. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 69: 1-32.
- Blalock, J.E., and Costa, O. 1989. Immune neuroendocrine interactions: implications for reproductive physiology. *Annals New York Academy of Sciences.* 564: 261-266.
- Bowman, W.C. 1985. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Edit. Interamericana. México. Cap 20.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- Brines, R. 1994. Neuroendocrinologytoday. *Immunology Today.* 15(11): 503-517.
- Burstein, Y., Buchner, V., Pecht, M., and Trainin, N. 1988. Thymic Humoral Factor  $\gamma$ -2: an amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus. *Biochemistry* 27: 4066-4071.
- Catt, K.J., Dufau, M.L., Neaves, W.B., Walsh, P.C., Wilson, J.D. 1975. LH-hCG Receptors and Testosterone Content During Differentiation of the Testis in the Rabbit Embryo. *Endocrinology* 97: 1157-1165.
- Calkins, J.H., Sigel, M.M., Nankin, H.R., Lin, T. 1988. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology.* 123: 1605-1610.
- Calkins, J.H., Guo, H., Sigel, M.M., Lin, T. 1990. Differential effects of recombinant interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  on Leydig cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 167: 548-553.

- Comsa, J. 1957. Effect of thymectomy upon the functional condition of the adrenal cortex in guinea pigs. *Nature* 179: 872-873.
- Comsa, J., Leonhardt, H., Ozminski, K. 1979. Hormonal influences on the secretion of the thymus. *Thymus*. 1: 81-93.
- Cooper, G.T. 1984. Instrumentos y técnicas de Bioquímica. Ed. Reverté. Barcelona, España. 442 pp.
- Chard, T. 1978. Laboratory techniques in biochemistry and Molecular biology. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. Amsterdam. The Netherlands. Cap 1.
- Chiodi, H. 1938. El Timo en relacion con el crecimiento y la función sexual. Buenos Aires. El Ateneo. 159 pp.
- Dardenne, M., Savino, W., Gagnerault, M.C., Ithoh, T. y Bach, J.F. 1989. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates "in vivo" and "in vitro" the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology*. 125: 3-12.
- Darnell, J.E. 1995. Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc. USA. 1344 pp.
- De Kretser, D. 1993. Molecular Biology of the Male Reproductive System. Academic Press, Inc. U.S.A. 483 pp.
- Denney, W.N. 1992. Human Sexuality. Mosby Year Book. U.S.A. 760 pp.
- Deschaux, P., Ulrich, T., and Golstein, A. L. 1980. *In vitro* effects of thymosin, testosterone and growth hormone on antibody formation in murine spleen cells. *Thymus*. 1: 287-291.
- Dufau, M.L., Watanabe, K., Catt, K.J. 1973. Stimulation of Cyclic AMP Production by the Rat Testis during incubation with hCG in vitro. *Endocrinology*. 92: 6-11.
- Dufau, M.L. 1988. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 483-508.

- Dufau, M.L., Knox, G.F. 1985. Fetal Leydig cell culture an *in vivo* system for the study of trophic hormone and GnRH receptors and actions. *J. Steroid Biochem.* 23: 743-755.
- Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895.
- Ewing, L.L., y Robaire, B. 1989. Regulation of Testicular function. Signaling molecules and cell-cell communication. *Annals New York Academy of Sciences.* 564: 210-260.
- Fauser, B.C.J.M., Galway, A.B., Hsueh, A.J.W. 1989. Inhibitory actions of interleukin-1  $\beta$  on steroidogenesis in primary cultures of neonatal rat testicular cells. *Acta Endocrinol.* 120: 401-408.
- Fawcett, D.W. 1988. Tratado de Histología. Edit. Interamericana. México. 1026 pp.
- Fischer, L. 1980. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Gel filtration chromatography. Amsterdam, The Netherlands. Cap 1.
- Fitzpatrick, F.T.A., Kendall, M.D., Wheeler, M.J., Adcock, I.M., and Greenstein, B.D. 1985. Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. of Endocrinology.* 106: 17-19.
- García, T.F., y Ocampo, L.A. 1991. Interacciones entre los sistemas inmunitario y gonadal. *Ciencia.* 42: 155-169.
- Geneser, F. 1988. Histología. Edit. Médica Panamericana, S.A. México. pp
- González, M.G. 1996. Técnicas en Biología Celular. AGT Editores. México. Cap. 4.
- Goodman, H.M. 1994. Basic Medical Endocrinology. 2da Edicion. Raven Press. New York. Cap 1 y 11.
- Greenspan, F.S. and Forsham, P.H. 1986. Basic and Clinical Endocrinology. 2da edicion. Lange Medical Publications/Los Altos, California. U.S.A. 697 pp.
- Grossman, C.J. 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* 227: 257-261.

- Grossman, C.J., Roselle, G.A., and Mendenhall, C.L. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40: 649-659.
- Hall, P.F. 1985. Cytochrome P-450: Physiology of Steroidogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 458: 203-215.
- Hall, N.R. 1985. Evidence that thymosins and other biologic response modifiers can function as neuroactive immunotransmitters. *J. of Immunology.* 135: 806-811.
- Hattori, M., and Brandon, M.R. 1979. Thymus and the endocrine system: ovarian dysgenesis in neonatally thymectomized rats. *J. Endocrinology.* 83: 101-111.
- Hedger, M.P., Robertson, D.M., Kretser, D.M., y Risbridger, G.P. 1990. The quantification of steroidogenesis-stimulating activity in testicular interstitial fluid by an in vitro bioassay employing adult rat leydig cells. *Endocrinology.* 127: 1967-1977.
- Hiriart, M., and Romano, M.C. 1986. Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor. *Life Sciences.* 38: 789-795.
- Hogarth, P.J. 1982. Immunological aspects of Mammalian Reproduction. Edit. Praeger. New York, U.S.A. Cap 2-5.
- Huhtaniemi, J.T., Nozu, K., Warren, D.W., Dufau, M.L., and Catt, K.J. 1982. Acquisition of Regulatory Mechanisms for Gonadotropin Receptors and Steroidogenesis in the Maturing Rat Testis. *Endocrinology.* 111: 1711-1720.
- Huhtaniemi, I. 1993. Hormonal control mechanisms of Leydig Cells. *Molecular Biology of the Male Reproductive System.* Academic Press. 383-410 pp.
- Johnson, A.D., and Somes, W.R. 1977. The Testis. Academic Press. New York. U.S.A.
- Kook, A.I., Yakir, Y., Trainin, N. 1975. Isolation and partial chemical characterization of THF, a thymus hormone involved in immune maturation of lymphoid cells. *Cellular Immunology.* 19: 151-157.

- Lalau, J.D., Aubert, M.L., Carmignac, D.F., Gregoire, I., Dupouy, J.P. 1990. Reduction in testicular function in rats. *Neuroendocrinology*. 51: 284-288.
- LaPolt, P.S., Jia, X-Chi., Sincich, C., y Hsueh, A.J.W. 1991. Ligand-Induced Down-Regulation of Testicular and Ovarian Luteinizing Hormone (LH) Receptors is preceded by tissue-specific inhibition of alternatively processed LH receptor transcripts. *Molecular Endocrinology*. 5: 397-403.
- Larrea, F., Oliart, R.M., Escorza, A., Valencia, X., Ulloa-Aguirre, A. 1988. Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisarias y regulación hormonal de esteroidogénesis. *Rev. Invest. Clín. (Méx)*. 40: 33-45.
- Lehninger, A.L. 1989. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1104 p.
- Leung, P.C.K., y Steele, G.L. 1992. Intracellular Signaling in the Gonads. *Endocrine Reviews*. 13: 476-498.
- Lipshultz, L. 1990. Infertility in the Male. Mosby Year Book. Cap 1-6.
- Lobb, R.R., Fett, J.W. 1984. Purification of Two Distinct Growth Factors from Bovine Neural Tissue by Heparin Affinity Chromatography. *Biochemistry*. 23: 6295-6299
- Luckey, Ph. D. 1973. Thymic Hormones. University Park Press, U.S.A. Cap 1-3.
- Martín, D., and Romano, M.C. 1992. Effect of thymic conditioned medium on testosterone secretion by rat testicular cells in vitro. *Steroid Biochem. (Life Sci. Adv.)* 11: 81-88.
- Mendoza, M.E. y Romano, M.C. 1989. Prepuberal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14: 233-242.
- Mendoza, M.E. y Romano, M.C. 1995. Modulation of luteinizing hormone secretion in cultured rat pituitary cells by interferon- $\alpha$ . *Med. Sci. Res.* 23: 119-121.

- Moger, W.H. 1979. Production of testosterone 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol and androsterone by dispersed testicular interstitial cells and whole testes in vitro. *Journal of Endocrinology*. 80: 321-332.
- Moore, C., Moger, W.H. 1991. Interleukin-1 $\alpha$ -induced changes in androgen and cyclic adenosine 3-5 monophosphate release in adult rat Leydig cells in culture. *J. Endocrinol.* 129: 381-390.
- Negro-Vilar, A., y Valenca, M.M. 1988. Male Neuroendocrinology and Endocrine Evaluation of Reproductive Disorders. Physiology and Toxicology of Male Reproduction. Cap 5.
- Ninomiya, J.G. 1991. Fisiología Humana: Neurofisiología. Ed. El Manual Moderno. México. 411-431 pp.
- Nishizuka, Y., and Sakakura, T. 1969. Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 166: 753-755.
- Orava, M., Cantell, K. Y. y Vihko, R. 1985. Human leukocyte interferon inhibits human chorionic gonadotropin stimulated testosterone production by porcine Leydig cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 809-815.
- Payne, A.H., Quinn, P.G., y Sheela, R.C.S. 1985. Regulation of Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes and Testosterone Production in Leydig Cells. *Recent Progress in Hormone Research*. 41: 153-197.
- Payne, A.H. 1990. Hormonal Regulation of Cytochrome P450 Enzymes, Cholesterol Side-Chain Cleavage and 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17-20 Lyase in Leydig Cells. *Biology of Reproduction*. 42: 399-404.
- Pedemera, E., Díaz-Osuna, J., Calcagno, M. 1986. A thymus factor influences the in vitro testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sciences*. 38: 779-787.
- Pedemera, E., Mendoza, H., Aguilar, M.C., Romano, M.C. 1987. Postnatal development of Leydig cells in the testis of the domestic fowl. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 513: 340-343.

- Pedernera, A.E. 1993. Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Comunicación Neuroendocrina. Bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. CONACYT. México.
- Pérez, T.H.E. 1987. Estadística para ciencias del comportamiento. Edit. Harla, S.A. de C.V. México. p 69-90.
- Peterson, G.L. 1983. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*. 91: 95-119.
- Pelkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., Chambon, P. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. 330: 444.
- Porras, V.M.G. 1988. Purificación parcial de una proteína del timo que modula la liberación de testosterona en el testículo de rata. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. 76 pp.
- Porras, V.M.G. 1991. Estudio de una proteína del timo que modula la esteroidogénesis gonadal *in vitro*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. 137 pp.
- Quinn, P.G., and Payne, A.H. 1984. Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured leydig cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 259(7): 4130-4135.
- Rebar, R.W. 1981. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science*. 214: 669-671.
- Reyes-Esparza, J.A., and Romano, M.C. 1989. An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *J. Steroid Biochem.* 34: 541-545.
- Reyes-Esparza, J.A. 1991. Influencia del timo en la función testicular. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. 120 pp.
- Risbridger, G.P., Jenkin, G., and Kretser, D.M. 1986. The interaction of hCG, hydroxysteroids and interstitial fluid on rat Leydig cell steroidogenesis *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 77: 239-245.
- Rodríguez, M.G. 1993. Receptores intracelulares y mecanismo de acción de hormonas esteroideas. Comunicación Neuroendocrina. Bases celulares y

moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. CONACYT. México.

- Ruiz, D.F. 1988. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. U.N.A.M. México. 374 pp.
- Saez, J.M. 1994. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. *Endocrine Reviews*. 15: 574-626.
- Sánchez, G.M., Solano-Agama, M.C., Silva-Madrid, C., Romano, M.C. 1995. Efecto de la IL-1 sobre la incorporación de timidina y la producción de testosterona de células de testículo de rata adulta en cultivo. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas A.C. Querétaro, Qro. México*.
- Segaloff, D.L. and Ascoli, M. 1993. The Lutropin/Choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocrine Reviews*. 14(3): 324-347.
- Skinner, M.K. 1991. Cell-Cell Interactions in the Testis. *The Endocrine Reviews*. 12: 45-77.
- Scopes, R.K. 1982. Protein Purification Principles and Practice. Edit. Springer Verlag. New York. Cap 1.
- Scouten, W. 1981. Affinity Chromatography. Edit. Wiley J. Sons. New York. Cap 1.
- Stryer, L. 1988. Bioquímica. Edit. Reverté. Barcelona España. 549 pp.
- Sun, X.R., Hedger, M.P., Risbridger, G.P. 1995. The effect of testicular macrophages and Interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat leydig cells cultured under *in vitro* maintenance conditions. *Endocrinology*. 132: 186-192.
- Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L.J., Huhtaniemi, I. 1984. Rat testicular endogenous steroids and number of leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biology of Reproduction*. 31: 1027-1035.
- Trainin, N., Handzel, Z.T., and Pecht, M. 1985. Biological and clinical properties of THF. *Thymus*. 7: 137-150.

- Trainin, N. 1974. Thymic Hormones and the Immune Response. *Physiological Reviews*. 54: 272-315.
- Tuohimaa, P., Niemela, A., Ylikomi, T. 1988. Immunological similarities between chick oviduc. *J. Steroid Biochem.* 30: 1.
- Verhoeven, G., Cailleau, J. van Damme J., Billiau, A. 1988. Interleukin-1 stimulates steroidogenesis in culture rat Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 57: 51-60.
- Warren, D.W., Pasupuleti, V., Lu, Y., Platter, B.W., Horton, R. 1990. Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells *in vitro*. *J. Androl.* 11: 353-360.
- Wikstrom, A.C., Bakke, O., Okret, S., Bronnegard, M., Gustafsson, J.A. 1987. Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology.* 120: 1232.
- Wilson, D.W., Griffiths, K., Kemp, K.W., Nix, A.B.J., y Rowlands, R.J. 1979. Internal quality control of Radioimmunoassays: monitoring of error. *J. Endocr.* 80: 365-372.
- Williams, R.H. 1985. Tratado de Endocrinología. 7a edicion. Ed. Interamericana. México.

## 10. APENDICE

### 10.1. Reactivos utilizados

- \* Acetona (Merck-México, S.A ).
- \* Acetona (uso comercial) .
- \* Acido fosfórico (Merck-México, S.A.).
- \* Albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Anhidrasa carbónica (PM 29 000) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Anticuerpo-Antitestosterona (ICN Biomedicals, Inc. Diagnostics Division. Costa Mesa, CA. U.S.A ).
- \* Azida de Sodio (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Azul Coomassie G-250 (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, U.S.A.)
- \* Azul Dextrán (PM 2 000 000) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Bicarbonato de Sodio,  $\text{NaHCO}_3$  (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Carbón activado (Merck, Darmstadt, F.R. Germany).
- \* Cloroformo (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Cloruro de Potasio,  $\text{KCl}$  (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Cloruro de Sodio,  $\text{NaCl}$  (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Colagenasa (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Etanol (Merck-México, S.A.).
- \* Fosfato dibásico de Sodio (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Fosfato monobásico de Sodio (T.Baker, Xalostoc México).
- \* Gelatina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Glucosa (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).

- \* Heparina Sepharosa (Pharmacia, Suecia ).
- \* HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* hCG (Chorionic Gonadotropin from Human Pregnancy Urine) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium ( DMEM ) (Gibco Laboratories. Life Technologies, Inc. Grand Island, N.Y. U.S.A ).
- \* PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A ).
- \* POPOP ( 1,4-bis[5-Phenyl-2-oxazolyl] benzene; 2,2'-p-Phenylene-bis [5-phenyloxazole] ) (Merck-Darmstadt, F.R. Germany).
- \* PPO (2,5-Diphenyl-oxazole) (Merck-Darmstadt, F.R. Germany).
- \* Rojo fenol (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Sephadex G-75 super fino (Pharmacia, Suecia).
- \* Testosterona frla (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
- \* Testosterona tritiada (New England Nuclear Boston, M.A.).
- \* Trizma Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A).
- \* Trizma Hydrochloride (Tris[hydroxymethyl]-aminomethane hydrochloride) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A).
- \* Tolueno (J.T.Baker, Xalostoc México).
- \* Triton X 100
- \* Xantina (3-isobutil-1-metilxantina) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A ).

• 10.2. Preparación de Soluciones y Reactivos

• Amortiguador para Radiolnmuoanálisis

Fosfato dibásico de Sodio	8.5	gr
Fosfato monobásico de Sodio	5.4	gr
Azida de Sodio	1.0	gr
NaCl	9.0	gr
Gelatina	1.0	gr

• Amortiguador TRIS 50 mM / NaCl 0.1 M pH 7.4

Trizma Base	1.94	gr
Trizma HCl	13.22	gr
NaCl	11.688	gr

• hCG (Gonadotropina coriónica humana)

hCG	0.0006	gr
Agua bidestilada	4.3	ml

$$\text{hCG ( 600 } \mu\text{g ) + 2.3 ml de H}_2\text{O = 0.01 u/ ml}$$

Tomar

$$20 \mu\text{l + 2 ml de = 1 mU/ 10 } \mu\text{l}$$