



2 es.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

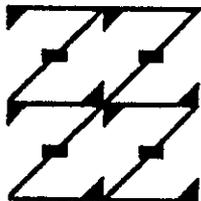
ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA
DE LA TIMULINA EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO
POSTNATAL DEL RATÓN EN LA PUBERTAD
Y LA OVULACIÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
ANA LILIA CERDA MOLINA

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

M. en C. LORENA HINOJOSA BACA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D.F.

JUNIO 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263 189



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

* ZARAGOZA *

CARRERA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN
SISTÉMICA DE LA TIMULINA EN DIFERENTES ETAPAS
DEL DESARROLLO POSTNATAL DEL RATÓN EN LA
PUBERTAD Y LA OVULACIÓN**

Tesis presentada por: Ana Lilia Cerda Molina

Dirigida por: Dra. Patricia Rosas Saucedo

M en C. Lorena Hinojosa Baca

La tesis fue desarrollada en el laboratorio de Neuroinmuno-endocrinología de la Reproducción de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. FES Zaragoza, UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA clave IN212394 y el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM.

A mis padres:
Por el apoyo, educación y cultura
que me han heredado

A mis hermanos:
Por los momentos agradables que hemos compartido y
esperando siempre "valoren lo que realmente tiene sentido en la vida"

A Luis Xavier:
Por tener la gran paciencia de comprenderme

A todos recuerden:
"todo lo que se hace por amor,
va más allá del bien y del mal"
F. Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

A *Patricia Rosas Saucedo* y a mi compañera *Lorena Hinojosa Baca* por su gran apoyo y valioso asesoramiento.

Al Dr. *Roberto Domínguez Casalá* por su contribución en el asesoramiento de este trabajo.

A los miembros del jurado:

M. en C. **Enrique Mendieta Márquez**

Dra. **Patricia Rosas Saucedo**

M. en C. **Lorena Hinojosa Baca**

M. en IBSH **Angélica Flores Ramírez**

Dra. **María Elena Ayala Escobar**

Por el tiempo e interés invertidos en la revisión de esta tesis y por sus sugerencias.

Al Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biol. Roberto Chavira por su colaboración en la realización del RIA.

A Ma. Luisa Illescas Vera por su colaboración técnica y al personal del Bioterio de la FES Zaragoza especialmente al señor Jorge Salgado por el cuidado y mantenimiento de los animales.

A mis compañeras *Norma, Claudia y Alejandra. A Patricia Navarrete.*

A los compañeros y profesores del laboratorio que de alguna manera apoyaron la realización de esta tesis.

Al Dr. Arcadio Monroy Ata.

RESUMEN	<i>i</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Características morfofuncionales del ovario	3
2.2 Pubertad	9
2.3 Relación funcional entre el timo y el sistema reproductor	15
a) Características morfofuncionales del timo	15
b) Vinculación funcional entre el timo y el sistema reproductor	17
c) Efecto de las hormonas tímicas sobre el sistema reproductor	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
6. MÉTODO	25
7. RESULTADOS	30
7.1 Efectos de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el primer estro vaginal sobre la pubertad y la ovulación espontáneas.	30
7.2 Efecto de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el primer estro vaginal sobre la pubertad y la ovulación inducidas.	32
7.3 Respuesta ovulatoria del animal prepúber tratado con timulina desde los 19 días de edad hasta el día del primer estro vaginal frente al estímulo de 8 u.i. de PMSG.	35

8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	49
10. PERSPECTIVAS	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

Se ha descrito para algunas de las hormonas sintetizadas por el timo que tienen efectos sobre la liberación de las gonadotropinas y las funciones del ovario, sin embargo estas hormonas también son sintetizadas por otros órganos y aun en el Sistema Nervioso Central. La timulina, que es una hormona de origen exclusivamente tímico, administrada al ratón prepúber, estimula la respuesta del ovario al tratamiento gonadotrópico pero estos efectos parecen depender de la etapa de desarrollo del animal. Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar los efectos de la administración sistémica de la timulina en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón en la pubertad y la ovulación.

Se utilizaron ratones hembra neonatos de la cepa CD1 a los que se les administró diariamente por vía sistémica timulina (12 ng/g) o solución salina hasta el día en que presentaron el primer estro vaginal. Se contó con un grupo de animales sin tratamiento (testigo). Los resultados mostraron diferencias significativas entre el grupo testigo y el tratado con solución salina (edad de la apertura vaginal 29.9 ± 0.8 vs. 27.2 ± 0.5 días, $p < 0.05$; peso corporal 24.2 ± 0.7 vs. 19.8 ± 1.1 g, $p < 0.05$; concentración sérica de estradiol 21.8 ± 4.6 vs. 42.5 ± 7.9 pg/ml, $p < 0.05$), lo que indica que el ratón es muy susceptible al efecto del estrés que provoca la inyección diaria desde el nacimiento. El tratamiento con timulina disminuyó la concentración sérica de estradiol respecto al grupo con solución salina (17.0 ± 3.2 vs. 42.5 ± 7.9 pg/ml, $p < 0.05$) y mostró un efecto trófico sobre el crecimiento del timo (105.5 ± 6.1 vs. 83.6 ± 8.0 mg, $p < 0.05$).

Otro grupo de ratones tratados de igual forma con timulina o salina se estimuló con 5 u.i. de PMSG al día 25 de edad. Además de un grupo tratado únicamente con la gonadotropina. Los animales con solución salina+PMSG presentaron diferencias significativas respecto a los inyectados sólo con PMSG (edad de la apertura vaginal 27.8 ± 0.2 vs. 26.7 ± 0.1 días, $p < 0.05$; lapso entre primer estro y apertura 0.5 ± 0.2 vs. 1.1 ± 0.1 días, $p < 0.05$; peso corporal 19.1 ± 1.1 vs. 22.0 ± 0.7 g, $p < 0.05$; útero 58.4 ± 4.1 vs. 86.2 ± 6.1 mg, $p < 0.05$). Estos resultados reflejan nuevamente la respuesta al estrés al que se sometieron los animales. El tratamiento con timulina+PMSG provocó el incremento en el peso del timo en comparación con el tratamiento de solución salina más la gonadotropina (89.2 ± 3.5 vs. 74.5 ± 6.1 mg, $p < 0.05$).

El tratamiento con 5 u.i. de PMSG indujo la ovulación en todos los grupos experimentales. No obstante la respuesta ovulatoria, evaluada por el número de cuerpos lúteos, fue mayor en los animales tratados desde el nacimiento con timulina (testigo 7.8 ± 2.0 , salina 7.6 ± 1.3 vs. timulina 11.7 ± 1.3 NS), aunque no llegó a valores estadísticamente significativos. Un evento que se presentó independientemente del tratamiento con solución salina o timulina, fue la presencia de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado que se incrementó con la administración de la timulina (12.1 ± 1.8 vs. 7.9 ± 1.7 NS).

En otra serie de experimentos se evaluaron los efectos de la administración sistémica diaria de la timulina (200 ng) o salina desde los 19 días de edad, sobre la respuesta ovulatoria inducida por la administración de 8 u.i. de PMSG al día 20 de edad. Se contó con un grupo de hembras tratadas únicamente con PMSG. Se evaluaron los mismos parámetros que en el experimento anterior y no se presentaron diferencias significativas entre el grupo con salina y el testigo, lo que indica que la respuesta al estrés a los 19 días de edad es diferente a la de la etapa neonatal. El tratamiento con timulina desde los 19 días+PMSG, disminuyó el número de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado respecto al grupo con salina (11.0 ± 2.2 vs. 31.0 ± 7.3 , $p < 0.05$), mientras que su administración 44 h después de la PMSG no lo modificó (36.5 ± 5.9 vs. 11.0 ± 2.2 , $p < 0.05$). Estos resultados indican que la timulina modula la respuesta del folículo a la PMSG ya que los animales estimulados de manera secuencial con PMSG+hCG superovularon (42.3 ± 5.4).

En conclusión, la timulina administrada en el ratón hembra no modifica el inicio de la pubertad, pero manifiesta dos tipos de efectos en la respuesta ovulatoria inducida por la administración de gonadotropinas que dependen de la edad del animal y de la magnitud del estímulo gonadotrópico.

1. INTRODUCCIÓN

El timo, además de ser el órgano donde se lleva a cabo la maduración y diferenciación de los linfocitos responsables de la respuesta inmune mediada por células, también participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la función reproductora.

Los animales congénita o quirúrgicamente atímicos, así como los hipotímicos, son los modelos biológicos que se han utilizado en el estudio de la relación entre el sistema inmune y el sistema reproductor. En la hembra del ratón, la timectomía en la etapa neonatal desencadena una respuesta de origen autoinmune sobre el ovario que altera las funciones del sistema reproductor. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que la timectomía realizada en la etapa infantil, merma el desarrollo folicular del ovario y retrasa la maduración sexual. Estas alteraciones no muestran signos de etiología autoinmune, lo que indica que este órgano está vinculado con la regulación del sistema reproductor.

Se ha postulado que el timo ejerce su acción sobre el sistema reproductor por intermedio de las hormonas que sintetiza (timosinas). Algunas de estas timosinas estimulan la liberación de las gonadotropinas y la esteroidogénesis ovárica. No obstante, estas hormonas no sólo son sintetizadas por el timo, sino que también lo son por otros órganos e incluso en el Sistema Nervioso Central, lo que debilita la participación endócrina del timo en la regulación del eje neuroendócrino de la reproducción.

Estudios recientes muestran que la timulina, también llamada factor tímico del suero (hormona sintetizada exclusivamente por el epitelio tímico), administrada a ratones durante la etapa peripuberal temprana, favorece la acción estimulante de las gonadotropinas exógenas. Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar la participación de la timulina en la pubertad y la ovulación al administrarla por vía sistémica en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón.

2. MARCO TEÓRICO

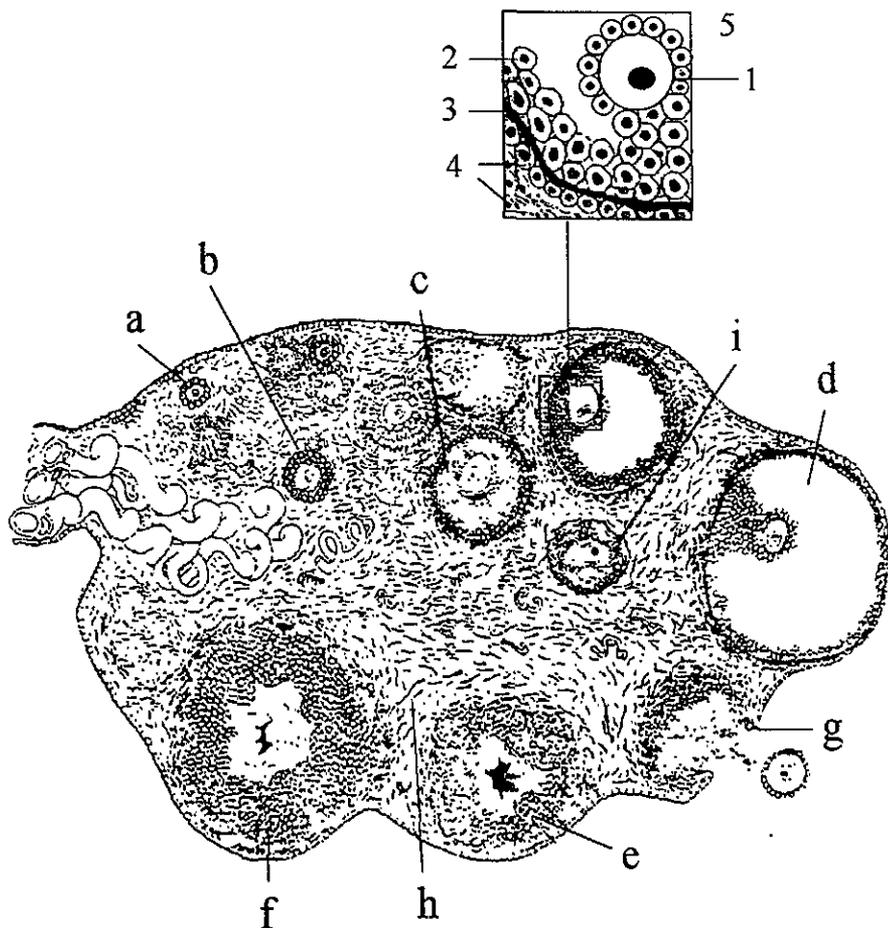
2.1 Características morfofuncionales del ovario

El ovario es el órgano reproductor femenino cuyas funciones son por una parte, la producción de gametos con las características para ser fecundados y por otra, la síntesis de hormonas de naturaleza esteroide que regulan el crecimiento y el desarrollo de los demás órganos sexuales de la hembra de los mamíferos como son, el útero, la vagina, la glándula mamaria, etc. (Clark y Shailaja, 1994).

Las hormonas esteroides que secreta el ovario, como producto de su actividad endócrina, son principalmente los estrógenos y la progesterona. La mayoría de los cambios característicos de la pubertad son regulados por estas hormonas (Ramírez, 1973).

El ovario esta formado por tres compartimentos que se muestran en el esquema 1: el folicular conformado por folículos en las diferentes etapas de crecimiento (a-d); el luteal (e, f), que se desarrolla a partir de los folículos que ya expulsaron el ovocito (g); el compartimento intersticial (h) derivado de las células de la teca interna de los folículos que no llegaron a ovular y que culminaron en la atresia (i) (Mori y Matsumoto, 1973; Harrison y Weir, 1977).

La unidad anátomo-funcional del ovario, es el folículo, ya que en él se madura el ovocito y se lleva a cabo la esteroidogénesis (Esquema 1). A su vez, el folículo está formado por: el ovocito I (1) que se encuentra detenido en la primera fase de la división meiótica; las células de la granulosa (2); la membrana basal (3) que aísla a las células de la granulosa del resto de los



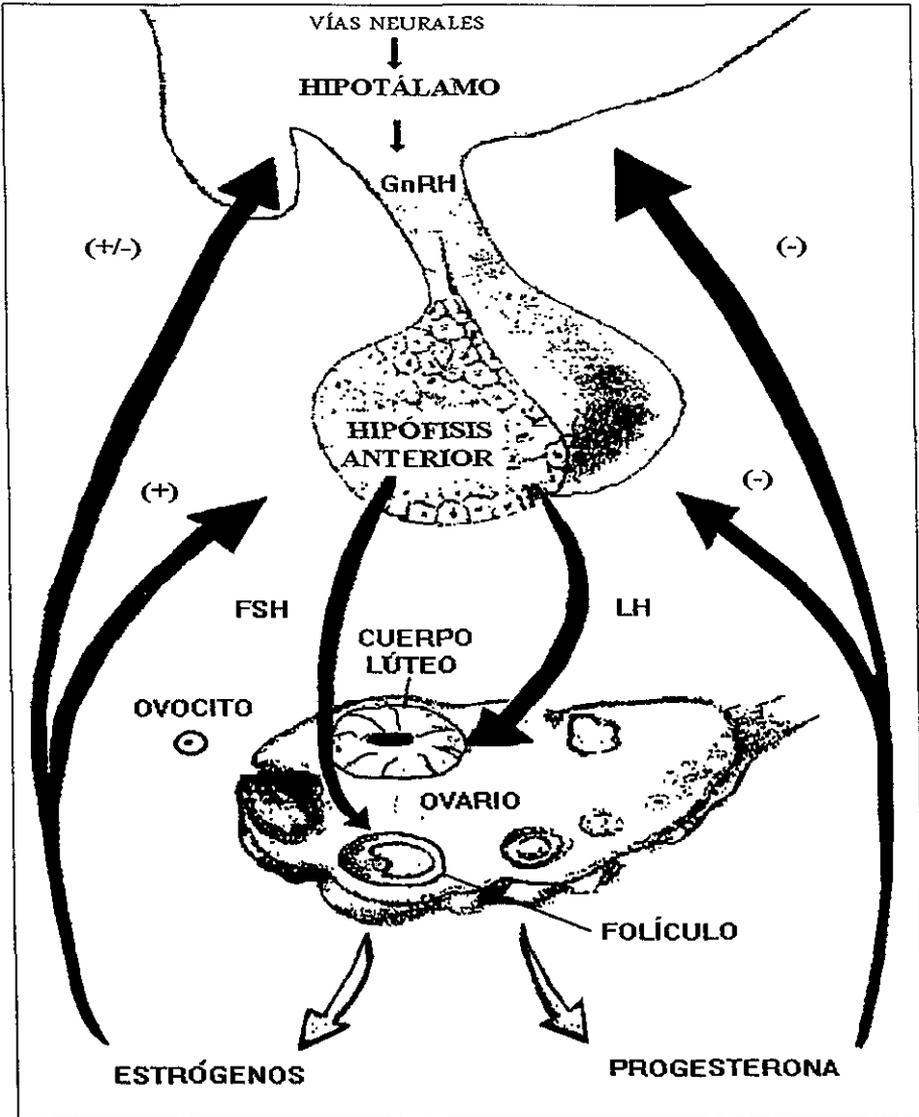
Esquema 1. Representación de un corte de ovario donde se muestran los diferentes compartimentos. *a*. folículo primordial, *b*. folículo primario, *c*. folículo secundario, *d*. folículo preovulatorio, *e*. cuerpo lúteo recién formado, *f*. cuerpo lúteo maduro, *g*. expulsión del ovocito, *h*. tejido intersticial, *i*. folículo atrésico. Componentes del folículo: *1*. ovocito, *2*. células de la granulosa, *3*. membrana basal, *4*. células de la teca (modificado de Ross y col., 1992).

componentes del ovario; las células tecales (4) que rodean a la membrana basal. En los folículos antrales, la cavidad se encuentra ocupada por el líquido folicular (5) (Ross, 1990; Domínguez y col., 1991; Freeman, 1994).

Las funciones del ovario, y por ende la maduración sexual y la reproducción, son reguladas por un complejo sistema de interrelaciones neuroendócrinas en las que participan principalmente el hipotálamo, la hipófisis y el mismo ovario (Everett, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994).

En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés). Esta hormona es liberada en la eminencia media, de donde pasa a la sangre del sistema portal hipotálamo-hipofisiario para llegar a la parte anterior de la hipófisis, llamada también adenohipófisis, donde se une a receptores específicos localizados sobre las membranas de los gonadotropos y estimula la síntesis de la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) y de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). Ambas gonadotropinas, al ser liberadas a la circulación, llegan al ovario y estimulan su crecimiento y diferenciación (Esquema 2) (Ojeda y col., 1990; Charli y col., 1991; Everett, 1994; Domínguez, 1995).

Las gonadotropinas ejercen sus efectos sobre el ovario mediante su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. De esta forma, la LH actúa sobre las células de la teca interna, estimulando la síntesis de andrógenos y la FSH actúa sobre las células de la granulosa, donde estimula la aromatización de los andrógenos a estrógenos y la proliferación de las células de la granulosa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Larrea y col., 1991).

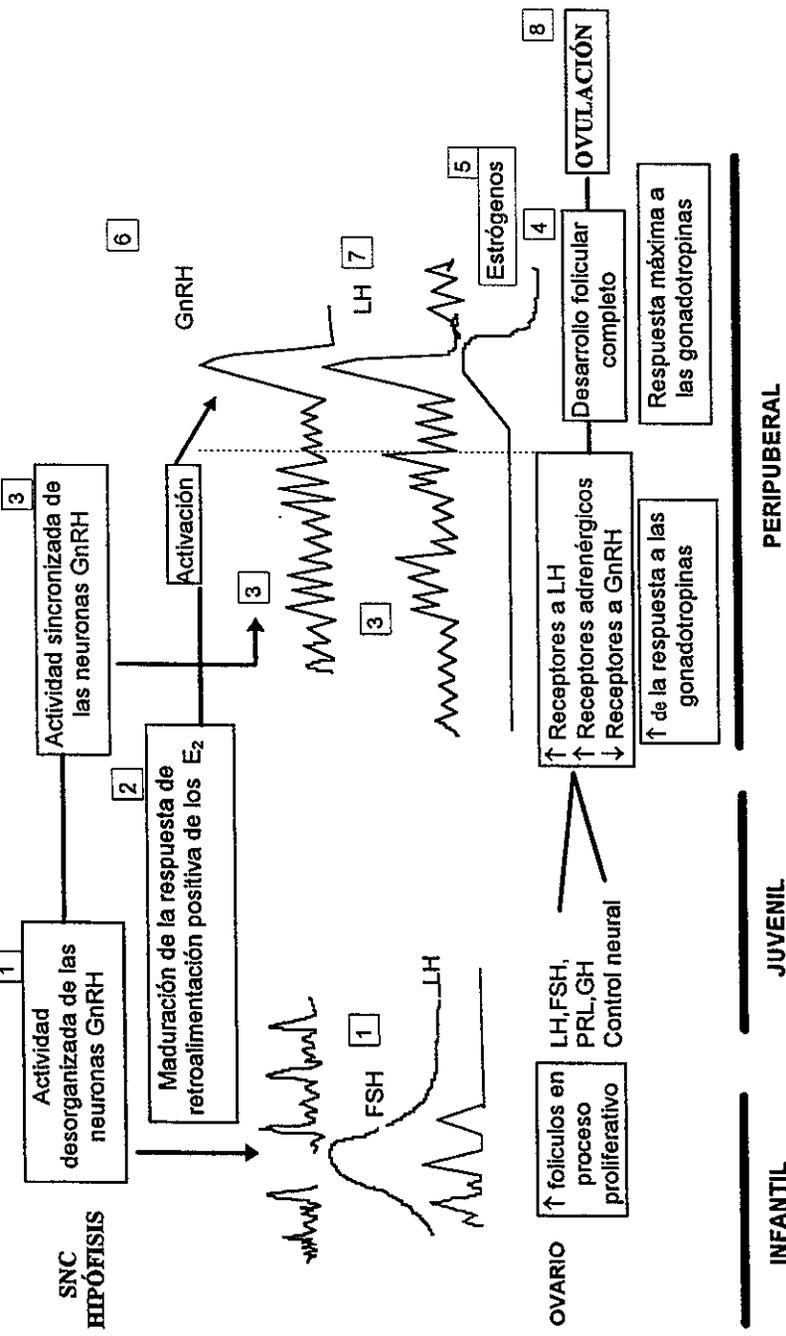


Esquema 2. En este esquema se muestra el eje de regulación neuroendócrina de la reproducción, donde se muestran algunas de las vías neuro-hormonales de comunicación entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario (los signos positivos indican estimulación hormonal y los negativos inhibición) (modificado de Mader, 1992).

Las hormonas esteroides sintetizadas por el ovario ejercen su acción modulando la secreción de las gonadotropinas tanto a nivel de la hipófisis como del hipotálamo. Sin embargo, los estrógenos controlan indirectamente la liberación de la GnRH, ya que las neuronas que sintetizan dicha hormona (neuronas GnRH-érgicas) en el hipotálamo no poseen receptores a los estrógenos, por lo que su acción se ejerce mediante el estímulo o la inhibición de otras vías neurales entre las que se encuentran las catecolaminérgicas, las colinérgicas y las serotoninérgicas entre otras (Esquema 2) (Fink, 1986; Brown, 1994).

En la hembra de los roedores, como es el caso de la rata, se ha mostrado que las concentraciones séricas de la FSH y la LH permanecen bajas durante la etapa prepuberal debido al efecto inhibitorio que ejercen los esteroides sexuales. Durante la etapa peripuberal se presenta un aumento brusco en la frecuencia y amplitud de los pulsos de la GnRH, lo que provoca que las concentraciones de gonadotropinas se incrementen abruptamente. Los esteroides gonadales y la GnRH, sensibilizan a la hipófisis para que ocurra esta descarga preovulatoria de las gonadotropinas, misma que sucede en la tarde del primer proestro (Ojeda y col., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994). Este aumento en las concentraciones de gonadotropinas, permite que el ovocito continúe la meiosis, proceso que culmina con su expulsión, dando como resultado la primera ovulación (Esquema 3) (Domínguez y col., 1991; Ojeda y col., 1986, 1990).

Una vez que el folículo inicia su crecimiento puede seguir dos vías: una donde el folículo se desarrolla hasta culminar con la ovulación y otra donde el folículo degenera por un proceso denominado atresia.



Esquema 2 Secuencia de eventos que se suceden en el Sistema Nervioso Central (SNC), la hipófisis y el ovario previos al pico preovulatorio de las gonadotropinas en la rata hembra. Los números indican la secuencia en la cual se producen estos eventos. La línea discontinua representa las 12:00 h del primer proestro. GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona estimulante del folículo, PRL: prolactina, GH: hormona de crecimiento (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Al respecto, no se conoce el mecanismo de selección de aquellos folículos que irán a la atresia y sobre el momento en que inicia dicho proceso; sin embargo, algunos autores utilizan como indicadores la presencia de picnosis (fragmentación del ácido desoxirribonucleico o ADN) en los núcleos de las células de la granulosa. Estas células pierden gradualmente los receptores a la FSH y a la LH, lo que da como resultado disminución de la actividad de la aromataza y por lo tanto el folículo pierde su capacidad funcional (Greenwald y Shyamal, 1994). Hsueh y col. (1994), describen que en los roedores los andrógenos y la GnRH son factores que inducen la atresia en el ovario.

Cuando en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario todas estas señales neuroendócrinas tienen una respuesta sincronizada, indica que ha alcanzado la madurez y es un evento que marca el inicio de la pubertad (Ojeda y col., 1986, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

2.2 Pubertad

La pubertad es la fase biológica del individuo en la cual, el sistema reproductor alcanza su madurez para comenzar a ser funcional. El cambio fenotípico asociado al inicio de la pubertad de la hembra de los roedores, es la canalización de la membrana vaginal, que permite su apertura y es un evento regulado por los estrógenos sintetizados por el ovario (Ramírez, 1973; Fink, 1990; Ojeda y col., 1990).

En la rata, se describe que a partir del día 12 de gestación ya se han establecido las conexiones vasculares de la hipófisis así como sus componentes celulares, por lo que la GnRH comienza a participar en la síntesis de las gonadotropinas aproximadamente al día 17 y permanece baja su concentración

hasta el día del nacimiento (Ojeda y col., 1986).

Ojeda y colaboradores (1986) dividieron el desarrollo postnatal de la rata hembra en cuatro etapas, en las que toman en consideración tanto parámetros fisiológicos como morfológicos que se observan durante el desarrollo del eje de regulación neuroendócrino de la reproducción, a nivel de sus tres componentes básicos: el hipotálamo, la hipófisis y el ovario.

1) *Etapa neonatal*. Esta etapa abarca desde el nacimiento del animal hasta el día siete postnatal. Durante este tiempo, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario no es completamente funcional. Los ovarios son relativamente insensibles a las gonadotropinas los primeros cuatro o cinco días de vida postnatal y el efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos no opera. El proceso de foliculogénesis ocurre después de haber transcurrido las primeras 48 horas posteriores al nacimiento (Peters y col., 1975; Ojeda y Urbanski, 1994). Por lo tanto, la concentración de los estrógenos en esta etapa son bajas, en parte porque el ovario posee pocos receptores a la FSH y a la LH y porque el suero de los animales contiene alta concentración de la α -fetoproteína, proteína transportadora que se une fuertemente a los estrógenos inhibiendo su actividad (Funkenstein y col., 1980; Fink, 1989).

A partir del día cuatro postnatal aumentan los receptores a la FSH en el ovario y la concentración sérica de esta gonadotropina comienza a incrementarse gradualmente (Ojeda y col., 1986).

2) *Etapa infantil*. Esta etapa se presenta desde el día ocho hasta el día 21 de edad. Durante este tiempo, el eje de regulación neuroendócrino lleva a cabo

cambios funcionales que se van a ver reflejados en su capacidad de control sobre el inicio de la pubertad.

En esta etapa, la concentración de la FSH presenta una elevación brusca para el día 12, después de la cual disminuye gradualmente y no se modifica hasta la tarde del primer proestro, momento en que se presenta la primera oleada preovulatoria de gonadotropinas. La disminución gradual en la concentración de FSH es debida al efecto inhibitorio que ejercen los estrógenos, mismos que se encuentran en forma libre al disminuir la concentración plasmática de la α -fetoproteína alrededor del día 16 de vida (Ojeda y col., 1986).

En el ovario se observan folículos en desarrollo, en los cuales ocurren cambios estructurales que dan como resultado su capacidad para sintetizar hormonas sexuales en respuesta a las gonadotropinas. Asimismo, el aumento de la FSH observado al día 12 es necesario para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que culminarán con la ovulación (Fink, 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Al inicio de esta etapa, los folículos sólo poseen receptores a la FSH. Esta gonadotropina estimula a las células de la granulosa para llevar a cabo la activación coordinada de genes y por lo tanto la expresión de proteínas y enzimas necesarias para la aparición de sus propios receptores. El posterior aumento en las concentraciones de la FSH y de los estrógenos conducen a la adquisición de los receptores a la LH en las células de la granulosa como resultado de un efecto sinérgico entre ambas hormonas (Zelevnik y Fairchild-Benyo, 1994).

3) *Etapa juvenil o prepuberal*. Comienza desde el día 21 hasta el día 30 ó 32 de vida. Para este tiempo, el control hormonal está bien definido y el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es capaz de responder al efecto estimulante ejercido por los estrógenos sintetizados por el ovario (Urbanski y Ojeda, 1986). De esta forma, el incremento en la concentración de los estrógenos estimula los pulsos de la LH y de la GnRH, así como una mayor receptividad de los gonadotropos en la hipófisis. Sin embargo, a pesar de la funcionalidad de este sistema de regulación durante la etapa prepuberal, los estrógenos aún no alcanzan concentraciones suficientes para inducir la primera ovulación (Fink, 1986; Ojeda y col., 1986).

En el ovario, se observa un aumento en el número de receptores a la LH que junto con su patrón de secreción pulsátil, incrementan el proceso de la esteroidogénesis. Este proceso se acompaña de una onda de desarrollo folicular, por lo que es posible observar durante esta etapa folículos preovulatorios pero también en degeneración o atrésicos. Al inicio de la etapa juvenil los pulsos de secreción de la LH son de baja amplitud, pero al final estos pulsos se incrementan en las tardes, lo que permite un patrón de secreción diurno que a su vez representa la señal para que los estrógenos estimulen la oleada preovulatoria de las gonadotropinas, evento que es determinante para que continúe el desarrollo folicular y para que se presente el proceso de pubertad (Andrews y Ojeda, 1981; Fink, 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Además de la participación de las gonadotropinas en la regulación del desarrollo del ovario, también participan otras hormonas sintetizadas en la hipófisis como son la prolactina (PRL, por sus siglas en inglés) y la hormona

del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) que modulan el efecto de las gonadotropinas sobre el ovario y facilitan el aumento en el número de receptores a la LH (Andrews y Ojeda, 1981). La concentración de estas hormonas también incrementa a partir de la etapa juvenil (Ojeda y col., 1986).

4) *Etapa peripuberal*. Esta etapa no tiene una duración exacta ya que puede variar en función del día en que se presente la apertura vaginal y la ovulación. Morfológicamente se reconoce por la acumulación de fluido intrauterino y funcionalmente por el incremento en los pulsos de secreción de la LH, responsable del estímulo ovárico para una mayor producción de estrógenos. El aumento en la concentración de estrógenos induce la descarga de GnRH y por ende de las gonadotropinas, proceso que culmina con la primera ovulación (Ojeda y col., 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

La cascada de eventos que conducen a la pubertad se ha dividido en varias fases que permiten su estudio:

~ *Anestro*, en el cual el peso del útero es bajo y no hay fluido uterino. La vagina se encuentra cerrada y no se presentan folículos preovulatorios, por lo que aún no hay señales de ovulación. En esta fase, la magnitud de los pulsos de secreción de la LH se incrementa en la tarde (Urbanski y Ojeda, 1985; Ojeda y col., 1986, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

~ *Proestro temprano*, el peso del útero comienza a aumentar debido a la acumulación del fluido uterino; la vagina aún permanece cerrada. La respuesta de la hipófisis a la GnRH para que ocurra la descarga de gonadotropinas,

permanece baja hasta la mañana del proestro tardío (Ojeda y col., 1980; Urbanski y Ojeda, 1985; Ojeda y col., 1986, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

- *Proestro tardío*, el útero es grande ya que presenta gran cantidad de fluido (útero balonado). La vagina puede aún permanecer cerrada. En el ovario se observan folículos preovulatorios. En esta fase se observa la primera oleada preovulatoria de gonadotropinas (Andrews y Ojeda, 1981; Ojeda y col., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

- *Primer estro*, en el útero ya no hay fluido. La vagina se encuentra abierta y en su citología hay predominancia de células cornificadas. En este día ocurre la primera ovulación, y los pulsos de secreción de la LH han disminuido. En el ovario se presentan cuerpos lúteos recién formados (Ojeda y col., 1986, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

- *Primer diestro*, aparece uno o dos días después del estro. La citología vaginal se caracteriza por la predominancia de leucocitos. La concentración de gonadotropinas es baja, pero se observa un aumento en la concentración de progesterona como reflejo de la funcionalidad de los cuerpos lúteos maduros presentes en el ovario (Ojeda y col., 1980, 1986, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

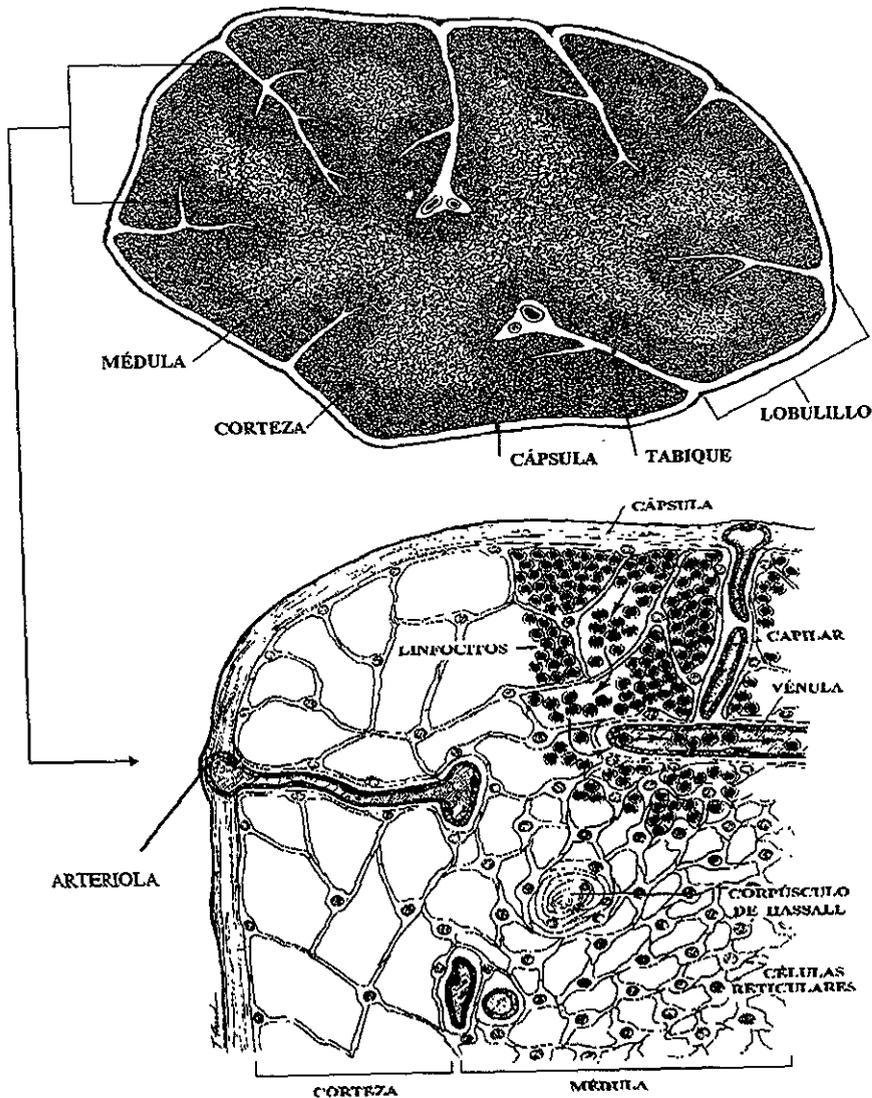
En la maduración del sistema reproductor, además de las señales neuroendócrinas anteriormente descritas, también participan las hormonas secretadas por el timo (Rebar y col., 1981a; Mendoza y Romano, 1989; Uzumcu y col., 1992).

2.3 Relación funcional entre el timo y el sistema reproductor

a) Características morfofuncionales del timo

El timo es un órgano linfoide de forma triangular y de color blanquecino que se localiza en el tórax, inmediatamente atrás de la parte superior del esternón. Su base se ubica por encima del corazón y su ápice se extiende hacia el cuello (Ham, 1975). Este órgano se origina del tercer par de bolsas faríngeas y en él se lleva a cabo la maduración y diferenciación de los linfocitos inmunocompetentes o linfocitos T, que intervienen en la respuesta inmune mediada por células (Bach, 1984; Bellanti, 1986; Roitt, 1994; Spangelo, 1995).

El timo está formado por dos lóbulos unidos por la parte media y rodeados por una delgada cápsula de tejido conectivo, que penetra y forma tabiques que dividen parcialmente los lóbulos en lobulillos. La matriz del timo está formada por células epiteliales dispuestas en forma de red en la cual se depositan los linfocitos. La parte periférica o corteza de cada lobulillo se halla muy infiltrada de linfocitos, mientras que la porción central o médula contiene menos. En la médula se encuentran también células retículo-epiteliales ordenadas de manera concéntrica que dan origen a los corpúsculos de Hassall (Esquema 4) (Bellanti, 1986).



Esquema 4. En la parte superior de la figura, se observa la estructura lobular del timo y en la parte inferior un fragmento ampliado donde se aprecia la organización córtico-medular del órgano (tomado de Bellanti, 1986).

b) Vinculación funcional entre el timo y el sistema reproductor

La existencia de una relación funcional entre el timo y el sistema reproductor, fue sugerida inicialmente por Calzolari en 1898. Más adelante, esta relación se vio apoyada por las observaciones de diversos eventos fisiológicos, tales como:

1. El timo presenta un proceso de involución fisiológica que ocurre después de la pubertad y durante la preñez (Carter, 1976; Roitt, 1994).
2. El timo se hipertrofia en respuesta a la castración (Fitzpatrick y col., 1985; Rosas y col., 1992).
3. La administración de esteroides gonadales resulta en la disminución del peso del timo (Chambers y Clarke, 1979).
4. La respuesta inmune se incrementa con la gonadectomía y disminuye al realizar el reemplazo de hormonas sexuales (Grossman, 1985).

Los efectos que tienen los esteroides gonadales sobre el timo, quedaron corroborados al describir la presencia de receptores a estas hormonas en las células retículo-epiteliales del timo (Grossman y col., 1979; Grossman, 1984; Morgan y Grossman, 1985).

El uso de modelos biológicos espontáneos como el ratón alopecico y congénitamente atímico (nu/nu), el ratón alopecico-hipotímico (et/et) y los modelos experimentales como el ratón con timectomía neonatal, así como el ratón timectomizado a los 10 días de edad (Tx-10), han aportado evidencias de la vinculación del timo con el sistema reproductor (Rebar y col., 1981b; Michael, 1983; Rosas y col., 1989; García, 1996).

En el ratón nu/nu, se describen deficiencias en la función reproductora tales como: retraso en la edad en la que se presenta la apertura vaginal (pubertad), acelerada atresia folicular, infertilidad y alteraciones en el desarrollo ovárico, bajas concentraciones de gonadotropinas en el suero y en la hipófisis, así como bajas concentraciones séricas de andrógenos y estrógenos (Flanagan, 1966; Besedovsky y Sorkin, 1974; Lintern-Moore y Pantelouris, 1975, 1976; Rebar y col., 1981b, 1983).

El ratón alopecico et/et es un mutante que presenta alteraciones en el desarrollo del timo, razón por la cual se le llama también hipotímico. Las hembras de este ratón presentan algunas deficiencias reproductoras como son: retardo en la pubertad, menor peso de los ovarios y el número de folículos es menor. Además, presenta disminución de la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas (Hinojosa, 1994, Rosas, 1990).

Nishisuka y Sakakura (1969) mostraron en el ratón que la timentomía realizada entre los dos y cuatro días de edad, provoca retraso de la pubertad y disgénesis ovárica que se caracteriza por infiltración linfocítica, pérdida de ovocitos, disminución subsecuente del número de folículos, ausencia de cuerpos lúteos y disminución en el peso del ovario. La extirpación del timo después del día siete de edad, no induce estas alteraciones en el ovario.

Se ha descrito que la disgénesis ovárica que se presenta en el ratón timentomizado a los tres días de vida postnatal es de origen autoinmune, ya que se han detectado anticuerpos anti-ovocitos en la sangre de estos animales. Sin embargo, estudios realizados posteriormente, muestran que en este modelo experimental existe disminución del número de folículos antes de los 10 días de

edad y los anticuerpos-antiovocitos se presentan en la circulación hasta los 25 días de edad (Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

Con base en lo anterior, se ha sugerido que la timectomía tiene un efecto bifásico sobre el ovario, uno sería el resultado de una posible acción hormonal temprana sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-timo, que afecta el crecimiento de los folículos primordiales antes de los 20 días de edad y el otro sería un efecto tardío, ocasionado por un desbalance inmune evidente entre los 25 y 30 días de edad, que tiene como resultado la disgénesis del ovario (Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

García (1996) mostró que la ausencia del timo a partir de los 10 días de edad no provoca disgénesis ovárica de origen autoinmune, pero se describen algunas alteraciones como son retardo en la pubertad, disminución en el número de folículos en crecimiento principalmente de los primarios, menor desarrollo de los ovarios y disminución en la respuesta ovulatoria inducida por la administración de gonadotropinas.

c) Efecto de las hormonas tímicas sobre el sistema reproductor

El epitelio tímico produce varios factores u hormonas que actúan en la diferenciación de las células T y en la regulación de la respuesta inmune mediada por células. Algunas de estas hormonas son: la timulina, la timopoiétina, la timoestimulina, el factor tímico humoral y la timosina fracción 5. Esta última es una familia de polipéptidos los cuales, han sido secuenciados y clasificados según su punto isoeléctrico en timosinas: α_1 , α_5 , α_7 , β_1 , β_3 , β_4 , β_7 , β_8 , β_9 , β_{10} y γ (Low y Goldstein, 1984; Spangelo, 1995). Se ha mostrado, que algunos de estos péptidos participan en los mecanismos que regulan la

reproducción (Grossman, 1984).

Se tienen evidencias de que la timosina fracción 5 y la timosina β_4 , estimulan *in vitro* la secreción de la GnRH en el hipotálamo. Rebar y colaboradores (1981a), utilizaron un sistema de perfusión de hipotálamo e hipófisis y observaron que, cuando se administra la timosina fracción 5 al hipotálamo en cultivo se eleva la concentración de la LH secretada por la hipófisis, mientras que cuando se adiciona este péptido únicamente a la hipófisis, la LH permanece en concentración basal. Al administrar el péptido solamente al hipotálamo, se observa un aumento significativo en la concentración de la GnRH. De igual forma ocurre al utilizar la timosina β_4 en el mismo sistema. En estudios *in vivo* se ha observado que la administración de estos péptidos tímicos a ratones normales prepúberes conduce a la apertura vaginal prematura (Michael, 1983).

Experimentos similares han permitido mostrar que la timosina fracción 5 y la timosina β_4 no son sintetizadas solamente por el timo, sino que también lo son por el sistema nervioso central (SNC) y otros órganos como el bazo, el hígado y en el caso de la timosina β_4 , por macrófagos peritoneales, pulmones, riñón y en piel (Dalakas y Hubbard, 1984; Bernard, 1984; Dardenne y Bach, 1988).

La timulina es un nonapéptido cuya función es promover la diferenciación de las células T (Bach y col., 1977, 1978; Bach, 1979). Diversos estudios han mostrado que esta hormona es sintetizada exclusivamente por el epitelio tímico, principalmente en dos estructuras: en las células retículo-epiteliales y en los corpúsculos de Hassall (Monier y col., 1980; Jambon y col.,

1981; Savino y col., 1982). En el ratón congénitamente atímico nu/nu, la timulina está ausente y en el ratón normal esta hormona desaparece de la circulación después de realizar la timectomía y su concentración se restaura al realizar un injerto de timo (Safieh y col., 1990).

En el humano, la timulina es un inmunomodulador que puede ser detectado a partir de las 16 semanas de vida fetal. Su concentración depende de la edad y disminuye en forma proporcional al peso del timo (Jambon y col., 1981). En el ratón adulto, la concentración sérica de esta hormona comienza a disminuir a partir de los 15 ó 18 meses (Bach, 1984; Dardenne y col., 1984).

Experimentos *in vitro* han mostrado que cuando se realiza la castración y la adrenalectomía a ratones adultos, se observa una disminución temporal de la timulina en el suero, pero un aumento en el número de células tímicas que contienen la hormona. Dicha disminución, ha sido explicada por la aparición de inhibidores de la timulina y se ha sugerido que posiblemente los esteroides tanto de origen adrenal como gonadal, actúan en el timo controlando la síntesis o liberación de estos inhibidores, sin descartar una posible señal de autorregulación (Dardenne y col., 1986).

Se ha descrito que el ratón de la cepa CD1 de 20 días de edad no ovula ante el estímulo de 5 u.i. de gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG, por sus siglas en inglés). Sin embargo, cuando esta hormona se administra al día 25 el 100% de los animales ovulan (Rosas, 1990; Hinojosa y Rosas, 1997). Estudios recientes realizados en esta cepa, han mostrado que la administración diaria de la timulina por vía sistémica desde el día 19 de edad hasta el día del primer estro vaginal, más PMSG al día 20, favorece la acción

estimulante de esta hormona, al inducir la ovulación e incrementar el peso de los ovarios, mientras que si se administra timulina desde los 24 días de edad y PMSG al día 25, la respuesta ovulatoria inducida por la PMSG no se modifica, pero se manifiesta un aumento en la masa ovárica (Hinojosa y Rosas, 1997; Hinojosa, 1998). Estas evidencias permiten sugerir que la timulina modula la respuesta de los ovarios del animal prepúber a las gonadotropinas y que sus efectos dependen de la etapa del desarrollo en que se encuentra el animal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias de que los péptidos tímicos están vinculados con la función reproductora. Estas timosinas actúan de manera estimulante en la liberación de las gonadotropinas, de forma que regulan el desarrollo del ovario y el proceso de pubertad.

Algunos de estos péptidos son sintetizados en otros órganos e incluso en el SNC, mientras que la timulina es sintetizada exclusivamente por el epitelio tímico. Estudios recientes han mostrado que en los ratones prepúberes, el tratamiento con timulina favorece la acción estimulante de las gonadotropinas exógenas. Sin embargo, estos efectos parecen depender de la etapa de desarrollo del animal.

Por lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la administración sistémica de la timulina en el proceso de pubertad y en la respuesta ovulatoria frente al tratamiento gonadotrópico, en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón.

4. HIPÓTESIS

La administración de timulina favorece el efecto estimulante de las gonadotropinas en el ovario en etapas del desarrollo prepuberal más tempranas, por lo que el tratamiento con timulina desde el nacimiento adelantará la pubertad y la ovulación.

5. OBJETIVOS

- Estudiar los efectos de la administración sistémica diaria de la timulina desde el nacimiento hasta el día del primer estro vaginal sobre la pubertad (edad de la apertura vaginal y presencia del primer estro) y la ovulación espontánea e inducida por la administración de gonadotropinas.
- Estudiar los efectos de la administración sistémica diaria de la timulina desde los 19 días de edad hasta la pubertad sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.

4. HIPÓTESIS

La administración de timulina favorece el efecto estimulante de las gonadotropinas en el ovario en etapas del desarrollo prepuberal más tempranas, por lo que el tratamiento con timulina desde el nacimiento adelantará la pubertad y la ovulación.

5. OBJETIVOS

- Estudiar los efectos de la administración sistémica diaria de la timulina desde el nacimiento hasta el día del primer estro vaginal sobre la pubertad (edad de la apertura vaginal y presencia del primer estro) y la ovulación espontánea e inducida por la administración de gonadotropinas.
- Estudiar los efectos de la administración sistémica diaria de la timulina desde los 19 días de edad hasta la pubertad sobre la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas.

6. MÉTODO

Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 recién nacidos, mantenidos en condiciones controladas de fotoperíodo con 14 horas de luz (05:00 a 19:00 h) y 10 horas de obscuridad, temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y libre acceso al agua y al alimento. Las crías se distribuyeron en camadas de seis por madre con libre acceso a ella hasta el momento del destete (21 días).

Procedimiento de autopsia

Los animales fueron sacrificados por decapitación en la mañana del primer estro vaginal entre las 9:00 y las 11:00 h. Se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. El suero se almacenó a -4°C hasta que se realizó la cuantificación hormonal por radioinmunoanálisis de fase sólida (Coat-A-Count, Los Ángeles, California, EE.UU.) (Kubasik y col., 1984). A la autopsia, se disecaron y pesaron los ovarios, el útero y el timo. En los oviductos, se buscó la presencia de ovocitos y en su caso se les contó con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin para su posterior procesamiento histológico y realizar la cuantificación de los cuerpos lúteos.

Procesamiento de los ovarios y análisis de los cuerpos lúteos

Los ovarios fijados en líquido de Bouin, se deshidrataron gradualmente en alcohol y finalmente en cloroformo, se incluyeron en parafina y

posteriormente se cortaron de manera seriada cada 10 μm . Los cortes se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina. En la cuantificación de los cuerpos lúteos sólo se consideraron los de formación reciente con base en las siguientes características bajo el microscopio de luz: células grandes esféricas o polihédricas con citoplasma teñido ligeramente con núcleo grande bien definido y células pequeñas en forma de huso con citoplasma más intensamente teñido, distribuidas de manera dispersa o alineadas formando cordones, ausencia de cavidad antral y de ovocito (Ham, 1975; Niswender y Nett, 1994).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente de la siguiente forma:

- El peso corporal y de los órganos, por análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) seguido de la prueba de Tukey.
- La edad de la apertura vaginal, los días transcurridos hasta la presencia del primer estro y el número de ovocitos liberados por animal ovulante por la prueba U de Mann Whitney o Kruskal Wallis.
- La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan entre el número total de animales) se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones.
- Cuando se compararon parejas de datos se utilizó la prueba de "t" de Student.

En todos los casos sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

Diseño experimental

Experimento 1. Efectos de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el primer estro vaginal sobre la pubertad y ovulación espontáneas.

Para analizar si la timulina participa en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se utilizaron ratones hembra a los cuales se les administraron diariamente 12 ng/g de peso corporal de timulina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EE.UU.) por vía subcutánea (s.c.), desde el día del nacimiento hasta el momento del sacrificio. Como grupo de comparación se utilizaron animales inyectados de igual forma pero con solución salina y otro grupo de animales sin tratamiento denominado testigo.

La dosis de timulina empleada se calculó con base en estudios previos realizados en ratones prepúberes entre 19 y 24 días de edad, con un peso promedio de 18 ± 3 g y tratados diariamente con una concentración de 200 ng de la hormona tímica (Hinojosa y Rosas, 1997).

Todos los animales se revisaron diariamente entre las 9:00 y 10:00 h y se registró el día en el que se presentó la apertura vaginal (pubertad), momento en el cual se inició la toma diaria de frotis vaginales y se sacrificaron en la mañana del primer estro vaginal. A la autopsia, los animales fueron procesados como se indicó anteriormente.

Experimento 2. Efectos de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el día del primer estro vaginal sobre la pubertad y ovulación inducidas por gonadotropinas.

Para estudiar si la administración de timulina desde el nacimiento modifica la respuesta del ovario del animal prepúber a las gonadotropinas, se utilizó un grupo de animales tratados con 12 ng/g de peso corporal de timulina o solución salina desde el día del nacimiento, hasta el momento del sacrificio. Ambos grupos fueron inyectados por vía s.c. con 5 u.i. de PMSG (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EE.UU.) a las 10:00 h del día 25 de edad. Se contó con un grupo de hembras a las cuales sólo se les administró la gonadotropina a los 25 días de edad.

Los animales fueron revisados diariamente para registrar el día de la apertura vaginal, se inició la toma diaria de frotis vaginales y se sacrificaron en la mañana del primer estro. Se siguió el mismo procedimiento de autopsia. En los ovarios se evaluó la presencia de cuerpos lúteos.

Experimento 3. Respuesta ovulatoria del animal prepúber tratado con timulina desde los 19 días de edad hasta el día del primer estro vaginal, frente al estímulo de 8 u.i. de PMSG.

Estudios antecedentes muestran que la timulina favorece la acción estimulante de la PMSG en el ratón de 19 días de edad. Sin embargo sólo el 50% de los animales ovula. Para evaluar si los efectos de la timulina sobre la ovulación inducida están en función de la capacidad de respuesta del animal inmaduro al estímulo gonadotrópico se decidió utilizar un grupo de ratones de

19 días de edad a los cuales se les administraron diariamente 200 ng de timulina o solución salina. A los 20 días de edad, todos los animales fueron inyectados con 8 u.i. de PMSG por vía s.c. a las 10: 00 h. Otro grupo de animales de 20 días de edad sólo se trataron con la gonadotropina. En ambos casos se registró el día de la apertura vaginal y los animales se sacrificaron el día del primer estro vaginal, mediante el mismo procedimiento de autopsia. En los ovarios se evaluó la presencia de cuerpos lúteos.

7. RESULTADOS

7.1 Efectos de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el primer estro vaginal sobre la pubertad y la ovulación espontáneas.

Se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre el grupo intacto (testigo) y el grupo con solución salina. Los animales tratados con salina presentaron un adelanto significativo en la edad de la apertura vaginal, menor peso corporal y aumento en la concentración sérica de estradiol, en comparación con los animales intactos. No se observaron diferencias en el resto de los parámetros evaluados. En ninguno de éstos grupos experimentales se presentó la ovulación de manera espontánea (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), primer estro vaginal, peso corporal y de los órganos, concentraciones séricas de estradiol y de progesterona de ratones testigo o tratados con solución salina desde el nacimiento y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Testigo	Solución Salina
Número de animales	9	12
Edad de la apertura vaginal	29.9 \pm 0.8	27.2 \pm 0.5*
Primer estro (días)*	1.2 \pm 0.5	1.9 \pm 0.5
Tasa de animales ovulantes	0/9	0/12
Peso corporal (g)	24.2 \pm 0.7	19.8 \pm 1.1*
Peso de los ovarios (mg)	8.7 \pm 0.8	10.4 \pm 0.5
Peso del útero (mg)	43.9 \pm 7.8	32.2 \pm 2.5
Peso del timo (mg)	104.3 \pm 7.0	83.6 \pm 8.0
Estradiol (pg/ml)	21.8 \pm 4.6 (6)	42.5 \pm 7.9 (5)*
Progesterona (ng/ml)	0.4 \pm 0.1 (5)	0.4 \pm 0.1 (6)

*Días posteriores a la apertura vaginal

* $p < 0.05$ vs. Testigo

() Número utilizado de animales

En los animales tratados con timulina desde el nacimiento no se modificó la edad de la apertura vaginal con respecto a las hembras que recibieron salina. Sin embargo, se presentó un adelanto significativo en la presencia del primer estro vaginal en el grupo que recibió la hormona tímica. En ninguno de los animales se presentó la ovulación. La concentración de estradiol disminuyó significativamente en los animales tratados con timulina respecto al grupo con salina mientras que la concentración de progesterona no se modificó (Tabla 2).

El peso corporal y de los órganos no mostraron diferencias significativas en los animales que recibieron timulina. Sin embargo, el peso del timo de estas hembras fue significativamente mayor al de las tratadas con solución salina (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), primer estro vaginal, peso corporal y de los órganos, concentraciones séricas de estradiol y de progesterona de ratones tratados con solución salina o timulina desde el nacimiento y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Solución Salina	Timulina
Número de animales	12	11
Edad de la apertura vaginal	27.2 \pm 0.5	28.5 \pm 0.7
Tasa de animales ovulantes	0/12	0/11
Primer estro (días)*	1.9 \pm 0.5	0.4 \pm 0.2*
Peso corporal (g)	19.8 \pm 1.1	21.1 \pm 1.0
Peso de los ovarios (mg)	10.4 \pm 0.5	9.9 \pm 0.4
Peso del útero (mg)	32.2 \pm 2.5	40.5 \pm 4.0
Peso del timo (mg)	83.6 \pm 8.0	105.5 \pm 6.1*
Estradiol (pg/ml)	42.5 \pm 7.9 (5)	17.0 \pm 3.2 (6)*
Progesterona (ng/ml)	0.4 \pm 0.1 (6)	0.7 \pm 0.3 (2)

*Días posteriores a la apertura vaginal

* $p < 0.05$ vs. Solución salina

() Número utilizado de animales

7.2 Efectos de la administración de timulina desde el nacimiento hasta el día del primer estro vaginal sobre la pubertad y la ovulación inducidas por gonadotropinas.

En la mayoría de los animales la administración de 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad adelantó la edad de la apertura vaginal al presentarse 48 horas posteriores al tratamiento gonadotrópico y el primer estro 24 horas después. En este experimento, se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y el grupo con solución salina ambos con la gonadotropina en la mayoría de los parámetros evaluados. Los animales tratados con salina más la PMSG, presentaron retraso significativo en la edad de la apertura vaginal, adelanto en la aparición del primer estro, menor peso corporal y disminución en el peso del útero y del timo (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), primer estro vaginal, peso corporal y de los órganos y concentraciones séricas de estradiol y progesterona de ratones testigo o tratados con salina desde el nacimiento e inyectados con 5 u.i. de PMSG el día 25 de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Testigo + PMSG	Salina + PMSG
Número de animales	11	12
Edad de la apertura vaginal	26.7 \pm 0.1	27.8 \pm 0.2*
Primer estro (días) [†]	1.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2*
Peso corporal (g)	22.0 \pm 0.7	19.1 \pm 1.1*
Peso de los ovarios (mg)	13.9 \pm 0.9	13.6 \pm 0.9
Peso del útero (mg)	86.2 \pm 6.1	58.4 \pm 4.1 *
Peso del timo (mg)	105.5 \pm 5.1	74.5 \pm 6.1 *
Estradiol (pg/ml)	21.8 \pm 5.9 (5)	17.9 \pm 4.2 (8)
Progesterona (ng/ml)	1.6 \pm 0.4 (5)	-----

[†] Días posteriores a la apertura vaginal

* $p < 0.05$ vs. Testigo + PMSG

() Número utilizado de animales

No fue posible cuantificar la concentración de progesterona más que en un sólo animal cuyo valor fue de 4.6 ng/ml.

La administración de 5 u.i. de PMSG al día 25 de edad, indujo la ovulación tanto en los animales testigo (10/11) como en los inyectados con solución salina (12/12). La cuantificación de los cuerpos lúteos en los ovarios de ambos grupos no mostró diferencias significativas (Figura 1).

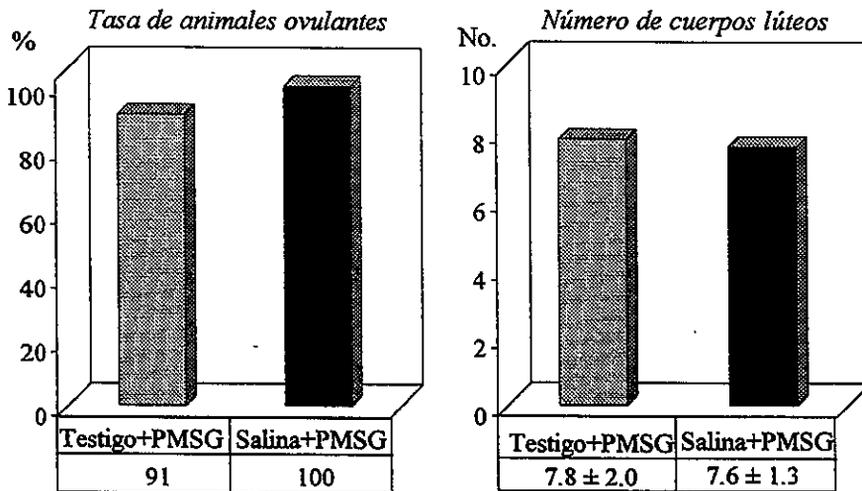


Figura 1. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos de ratones testigo o tratados con solución salina desde el nacimiento, inyectados con 5 u.i. de PMSG el día 25 de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

En los animales a los que se les administró la timulina desde el nacimiento y se inyectaron con PMSG, el peso del timo se incrementó significativamente en comparación con los animales tratados con solución salina. El resto de los parámetros evaluados no se modificó, independientemente del tratamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), el primer estro vaginal, peso corporal y de los órganos y concentraciones de estradiol y de progesterona de ratones tratados con solución salina o timulina desde el nacimiento e inyectados con 5 u.i. de PMSG el día 25 de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Salina + PMSG	Timulina + PMSG
Número de animales	12	11
Edad de la apertura vaginal	27.8 \pm 0.2	27.8 \pm 0.1
Primer estro (días)*	0.5 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1
Peso corporal (g)	19.1 \pm 1.1	21.0 \pm 0.5
Peso de los ovarios (mg)	13.6 \pm 0.9	14.9 \pm 0.9
Peso del útero (mg)	58.4 \pm 4.1	66.5 \pm 5.5
Peso del timo (mg)	74.5 \pm 6.1	89.2 \pm 3.5*
Estradiol (pg/ml)	17.9 \pm 4.2 (8)	28.3 \pm 6.3 (11)
Progesterona (ng/ml)	----	3.3 \pm 0.4 (3)

*Días posteriores a la apertura vaginal

* $p < 0.05$ vs. Salina + PMSG

() Número utilizado de animales

La ovulación se presentó tanto en los animales tratados con solución salina (12/12) como en los inyectados con timulina (10/11) más la PMSG. La cuantificación de los cuerpos lúteos no mostró diferencias significativas entre estos grupos (Figura 2). En ambos tratamientos se presentaron cuerpos lúteos con el ovocito atrapado, evento que se incrementó con la administración de timulina, aunque no llegó a valores estadísticamente significativos (12.1 \pm 1.8 vs. 7.9 \pm 1.7).

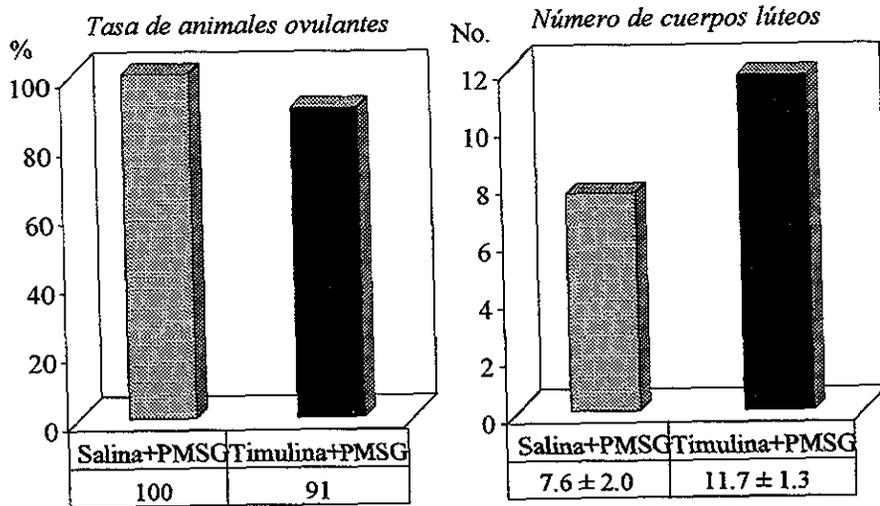


Figura 2. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos de ratones tratados desde el nacimiento con solución salina o timulina e inyectados con 5 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

7.3 Respuesta ovulatoria del animal prepúber tratado con timulina desde los 19 días de edad hasta el día del primer estro vaginal, frente al estímulo de 8 u.i. de PMSG.

En los animales intactos y con solución salina tratados a los 20 días de edad con 8 u.i. de PMSG, la canalización vaginal se presentó alrededor de las 48 h posteriores al tratamiento gonadotrópico y el estro se observó 24 h después. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los demás parámetros evaluados entre ambos grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), primer estro vaginal, peso corporal y de los órganos de ratones testigos o tratados con solución salina a partir de los 19 días de edad e inyectados con 8 u.i. de PMSG a los 20 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Testigo + PMSG	Salina + PMSG
Número de animales	8	9
Edad de la apertura vaginal	22.1 \pm 0.1	22.2 \pm 0.1
Primer estro (días)*	1.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1
Peso corporal (g)	17.0 \pm 0.5	18.0 \pm 0.1
Peso de los ovarios (mg)	24.9 \pm 3.7	23.6 \pm 1.8
Peso del útero (mg)	73.0 \pm 2.0	80.9 \pm 3.2
Peso del timo (mg)	82.4 \pm 6.8	85.2 \pm 8.2

*Días posteriores a la apertura vaginal

La ovulación se presentó en todos los animales testigo tratados con PMSG, evento que no se modificó con la inyección de solución salina desde los 19 días de edad. El número de cuerpos lúteos fue similar entre ambos grupos experimentales (Figura 3).

Los animales que recibieron la timulina a partir de los 19 días de edad más PMSG al día 20, presentaron menor peso corporal y una tendencia al aumento en la masa ovárica que no llegó a valores estadísticamente significativos con respecto a los tratados con salina. Los demás parámetros evaluados fueron similares (Tabla 6).

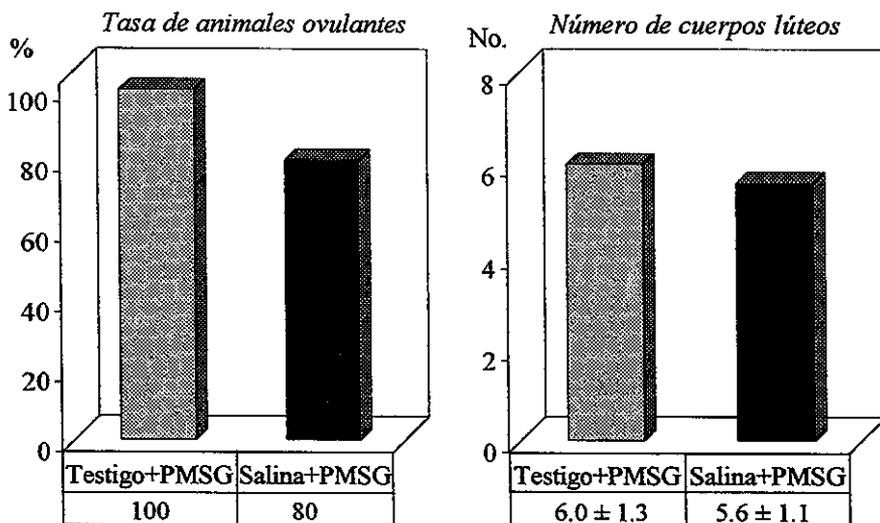


Figura 3. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos de ratones testigos o tratados con solución salina a partir de los 19 días de edad e inyectados con 8 u.i. de PMSG a los 20 días de edad y sacrificados el día del primer esto vaginal.

Tabla 6. Media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (días), del primer esto vaginal, peso corporal y de los órganos de ratones tratados con solución salina o timulina desde los 19 días de edad e inyectados con 8 u.i. de PMSG a los 20 días de edad, sacrificados el día del primer esto vaginal.

Parámetro	Salina + PMSG	Timulina + PMSG
Número de animales	9	9
Edad de la apertura vaginal	22.2 \pm 0.1	22.4 \pm 0.2
Primer esto (días)*	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
Peso corporal (g)	18.0 \pm 0.1	16.1 \pm 0.4 *
Peso de los ovarios (mg)	23.6 \pm 1.8	27.5 \pm 1.9
Peso del útero (mg)	80.9 \pm 3.2	81.4 \pm 5.7
Peso del timo (mg)	85.2 \pm 8.2	70.4 \pm 4.0

*Días posteriores a la apertura vaginal

* $p < 0.05$ vs. Salina+PMSG

El análisis histológico de los ovarios, mostró que la tasa de animales ovulantes y el número de cuerpos lúteos no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las hembras con administración de timulina respecto a las de solución salina (Figura 4).

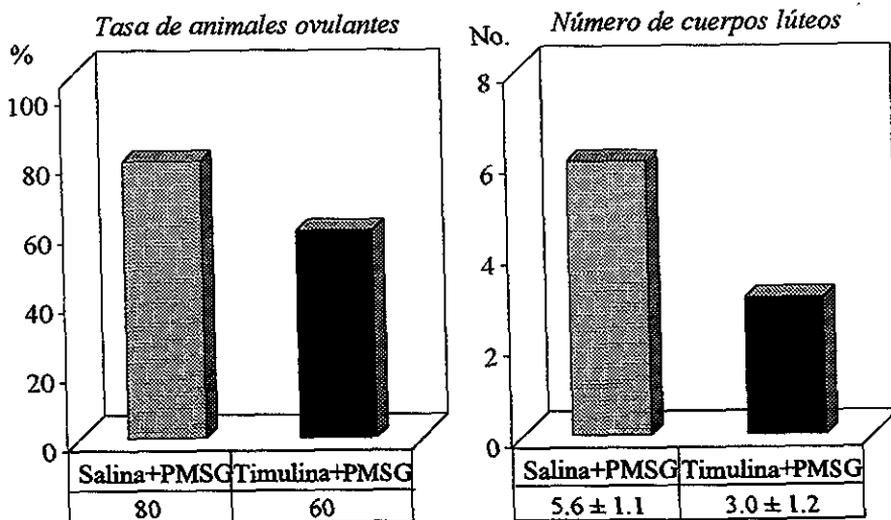
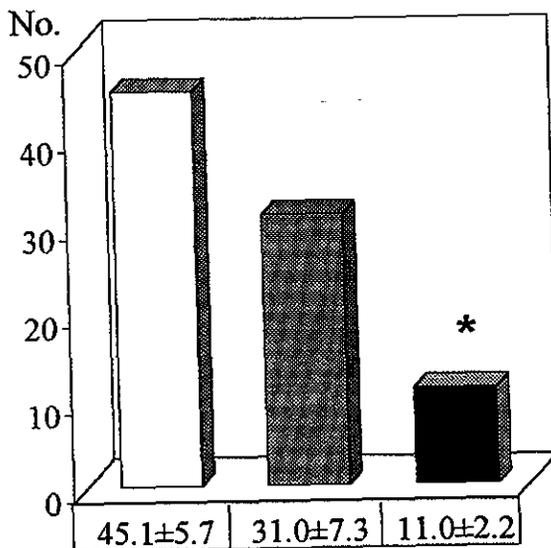


Figura 4. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos de ratones tratados con solución salina o con timulina desde los 19 días de edad e inyectados con 8 u.i. de PMSG a los 20 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

El análisis histológico de los ovarios de los animales tratados con solución salina, mostró un incremento en el número de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado, evento que disminuyó significativamente al administrar la timulina (Figura 5).



* $p \leq 0.05$ vs. Testigo+PMSG y Salina+PMSG

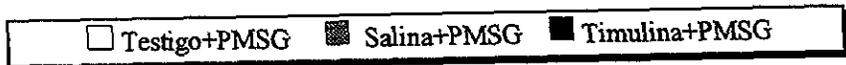


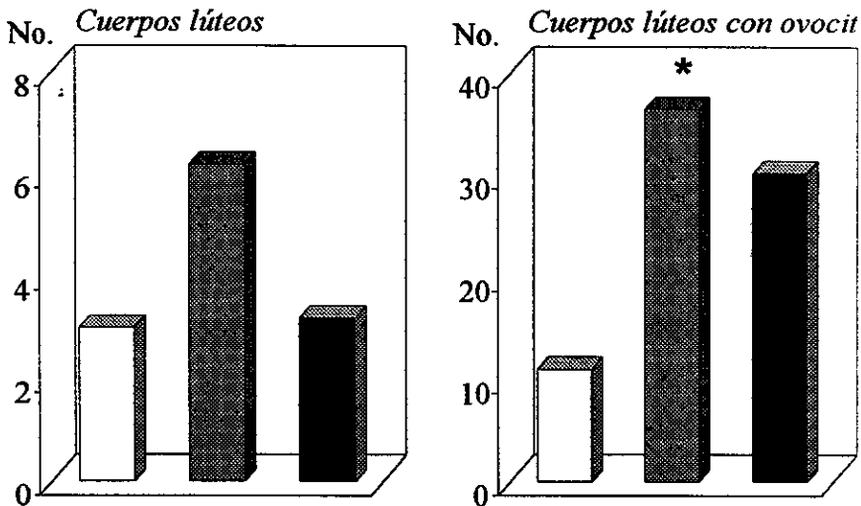
Figura 5. Media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado en los ovarios de ratones testigo, tratados con solución salina o con timulina desde los 19 días de edad e inyectados con 8 u.i. de PMSG a los 20 días de edad y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Con el objeto de analizar si la alta frecuencia de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado en los animales sin timulina y sólo estimulados con 8 u.i. de PMSG está vinculada con la inmadurez del ovario o con la falta de LH, se decidió realizar una prueba de ovulación inducida en animales intactos tratados

con 8 u.i. de PMSG al día 20 de edad y 54 h más tarde 3 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés) y los animales se sacrificaron 20 h después. A la autopsia, se observó que el 100% de los animales ovularon y presentaron una media de 42.3 ± 5.4 ovocitos contados en oviductos.

Para analizar si la disminución en el número de cuerpos lúteos con ovocito atrapado es un efecto de la timulina sobre la acción de la PMSG o es de la gonadotropina, se decidió utilizar hembras de 20 días de edad inyectadas con 8 u.i. de PMSG, las cuales se dividieron en dos grupos, el primero fue inyectado con una dosis única de 200 ng de timulina 44 h después de la PMSG y el segundo recibió la hormona tímica 54 h después. Ambos grupos se sacrificaron a las 74 h de haberse administrado la gonadotropina.

En la figura 6 se muestran los resultados de este experimento, donde se observa que el número de cuerpos lúteos no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, independientemente del momento en que se trataron con timulina, mientras que el número de cuerpos lúteos con ovocito atrapado se incrementa significativamente al administrar la timulina después de la PMSG.



Grupo	n	Cuerpos lúteos	Cuerpos lúteos con ovocito
□ Timulina+PMSG	9	3.0 ± 1.2	11.0 ± 2.2
▨ PMSG+Timulina (44h)	11	6.2 ± 1.5	36.5 ± 5.9 *
■ PMSG+Timulina (54h)	9	3.2 ± 0.9	30.0 ± 11.0

* $p \leq 0.05$ vs. Timulina+PMSG

Figura 6. Media \pm e.e.m. del número de cuerpos lúteos y de cuerpos lúteos con ovocito atrapado en los ovarios de ratones prepúberes de 20 días de edad tratados con 8 u.i. de PMSG y timulina 44 ó 54 h después de la gonadotropina comparados con animales tratados con timulina desde los 19 días y estimulados con 8 u.i. de PMSG al día 20 y sacrificados 74 h después de PMSG.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en el ratón hembra, la timulina administrada desde el nacimiento no altera el inicio de la pubertad espontánea ni la inducida por la administración de gonadotropinas. Sin embargo, modifica la respuesta ovulatoria, efecto que depende de la etapa de desarrollo en que se encuentre el animal y del estímulo gonadotrópico.

Hiroshige y Sato (1970) describen que la respuesta al estrés cambia dependiendo de la madurez del animal. En este caso los ratones tratados desde el nacimiento con solución salina, muestran una alta susceptibilidad al estrés que representa la inyección diaria, ya que presentaron adelanto en la edad de la apertura vaginal e incremento en la concentración de estradiol, lo que no ocurre con los animales inyectados a partir de los 19 días de edad, en los que no se observaron modificaciones en los parámetros evaluados. Estos resultados permiten sugerir que la respuesta al estrés (probablemente el aumento en la concentración de corticosterona) modifica los mecanismos que regulan la síntesis y secreción de los estrógenos (Hiroshige y Sato, 1970).

Diversos estudios han mostrado que los glucocorticoides están relacionados con la biosíntesis de esteroides tanto de origen adrenal como gonadal. Estudios realizados en cultivo de células de la granulosa de ovario de rata, muestran que los glucocorticoides tienen un efecto sinérgico sobre la producción de progesterona estimulada por la FSH (Adashi y col., 1981). El ratón hipotímico cuya alopecia congénita lo mantiene en condiciones de estrés crónico, se caracteriza por presentar concentraciones altas de glucocorticoides

y de progesterona (Rosas y col., 1989; Rosas, 1990; Hinojosa, 1998). Con base en esto es posible pensar que la respuesta del ratón prepúber al estrés de la inyección diaria, incrementó inicialmente la concentración de progesterona, misma que pudo ser transformada a andrógenos, los que son substrato indispensable para la secreción de estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1994). El hecho que la concentración de estradiol se haya incrementado al doble, apoya esta interpretación.

Se ha observado que el retardo en la apertura vaginal está vinculado con la concentración sérica de progesterona. Macfarland y Mann (1977) mostraron que en la rata prepúber, la administración de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés) provoca retardo en la edad de la apertura vaginal, asociado con incremento en las concentraciones de corticosterona y progesterona. En el ratón normal, cuando se retrasa el inicio de la pubertad, se presenta un aumento en la concentración sérica de progesterona en el día del primer estro vaginal sin que ocurra la ovulación; resultados similares se han observado en los ratones hipotímicos (Hinojosa, 1998). En este caso, el adelanto en la edad de la apertura vaginal indica una acción estrogénica, lo que a su vez refuerza la hipótesis antes propuesta.

La disminución en el peso corporal de los animales tratados con solución salina desde el nacimiento y estimulados o no con gonadotropinas, puede ser el reflejo del estrés que provoca la inyección. Según Plotsky (1988), el término estrés se refiere a una variedad de respuestas fisiológicas que se desencadenan en un organismo como consecuencia de alguna alteración en su medio ambiente (estresor). Se ha descrito que condiciones repetidas de estrés, estimulan la

síntesis y liberación de glucocorticoides, los cuales promueven una serie de eventos fisiológicos tales como disminución de la síntesis de proteínas, incremento en la degradación de estas, disminución de la glucosa, incremento en la movilización de lípidos, etc., mismas que conllevan a la pérdida de peso corporal (Axelrod y Reisine, 1984; Tilders y col., 1988; Brown, 1994).

En condiciones de estrés agudo, el timo involuciona debido a los efectos citolíticos que ejercen los esteroides sobre los linfocitos corticales (Janardana y Sirsi, 1961; Roitt, 1994). El decremento en el peso del timo que se presenta en los animales inyectados con solución salina tratados o no con gonadotropinas, puede ser el reflejo de modificaciones en las concentraciones séricas tanto de esteroides gonadales como adrenales que se desencadenan por efecto del estrés. Cuando a los animales se les administra timulina, el peso del timo se incrementa, independientemente de la edad de inicio del tratamiento y aun en presencia de PMSG, lo que confirma lo previamente descrito por Hinojosa (1998) sobre el papel trófico que tiene este factor sobre el órgano.

Diversos estudios han mostrado que la timosina F5 participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal a diferentes niveles. Ensayos *in vitro* indican que este factor tímico tiene actividad biológica similar a la de la hormona liberadora de adrenocorticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) (Healy y col., 1983); inyectado en ratas, incrementa la concentración de corticosterona circulante a valores similares a los obtenidos cuando se administra ACTH (Hall y col., 1984); adicionado al cultivo de células de adrenal, disminuye la concentración de corticosterona (Vahouny y col., 1983). Con estas evidencias se puede sugerir que la timulina es otro de los péptidos

tímicos involucrados con los mecanismos que regulan la respuesta al estrés, lo que podría explicar que la concentración de estradiol en los animales tratados con esta hormona sea similar a la del animal intacto.

Como ya ha sido descrito para la rata y el ratón prepúberes, la administración de PMSG adelanta los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la pubertad (Rosas y col., 1989; Ojeda y Urbanski, 1994). No obstante, la inyección diaria de solución salina desde el nacimiento y PMSG al día 25 de edad retarda este parámetro, resultado que se puede interpretar como una modificación temporal en la activación de los mecanismos que regulan la secreción de los estrógenos. Una posible explicación sería que el incremento en la concentración de glucocorticoides debido al estrés, pudo ocasionar un retraso en el patrón de secreción de la GnRH y la LH, ya que como se ha descrito, estos esteroides reducen los efectos estimulantes de los estrógenos para sensibilizar a la hipófisis a la acción de la GnRH, lo que disminuye la liberación de la LH (Suter y Schwartz, 1985; Kamel y Kubajak, 1987).

Se ha mostrado que la timosina F5 y uno de sus componentes, la timosina β_4 , inducen la liberación *in vitro* de la GnRH, lo que se traduce en un aumento de la secreción de la LH (Rebar y col., 1981a). Estudios realizados en el ratón prepúber tratado con PMSG indican que la timulina incrementa el efecto estimulante de las gonadotropinas e induce la ovulación probablemente al favorecer la liberación de la LH (Hinojosa, 1998). Los resultados del presente estudio, sugieren que la timulina administrada desde el nacimiento es incapaz de inducir la cascada de eventos hormonales para que ocurra la ovulación.

Cuando a los animales se les trató con timulina desde el nacimiento y PMSG a los 25 días de edad, se observó un aumento en el número de cuerpos lúteos, lo que confirma lo descrito por Hinojosa (1998) que la acción de la timulina sobre la respuesta ovulatoria, depende de que las condiciones neuroendócrinas sean semejantes a las de la etapa preovulatoria, situación que sólo ocurre en el ratón prepúber cuando se le administra PMSG.

En una etapa previa a la ovulación, el útero presenta gran acumulación de líquido en la luz y en el intersticio, efecto que es inducido por los estrógenos durante el proestro. Cuando ocurre la ovulación, la progesterona provoca la pérdida de agua y el volumen del útero decrece considerablemente (Steinetz, 1978). En este caso, el peso del útero de los animales con inyección de solución salina o timulina desde el nacimiento y estimulados con PMSG fue menor que el observado en el animal intacto, lo que puede estar vinculado con las altas concentraciones de progesterona que presentan.

Dentro de los efectos de la PMSG, se ha descrito que en el ovario de los roedores previene la entrada de los folículos a la atresia o los rescata de la misma (Peters y col., 1975; García, 1996). Sin embargo, el tratamiento con dosis altas de PMSG provoca el reclutamiento de un mayor número de folículos sanos, pero no ocurre la ovulación sino hasta que se administra hCG, ya que las altas concentraciones de estrógenos que se alcanzan por acción de la gonadotropina, inhiben la liberación de la LH y se bloquea la ovulación (Welschen y Rutte, 1971). En este caso, los resultados indican que 8 u.i. de PMSG no bloquean la ovulación; sin embargo, el hecho que los animales tratados de manera secuencial con hCG hayan superovulado, sugiere que la

liberación preovulatoria de LH se retardó.

Estudios previos (Hinojosa, 1998) muestran que en el ratón, la timulina administrada a partir de los 19 días de edad, incrementa la respuesta ovulatoria frente al estímulo de 5 u.i. de PMSG y se propone que este péptido actúa de manera semejante a la GnRH sobre la función hipotálamo-hipofisaria. En este caso, el tratamiento con la hormona tímica a partir de los 19 días, disminuyó significativamente el número de cuerpos lúteos en los animales estimulados con 8 u.i de PMSG. Estos resultados indican que en el animal prepúber, la timulina juega un papel diferente en la respuesta ovulatoria inducida, en función de la edad (recién nacido ó 19 días) y de la magnitud del estímulo gonadotrópico (5 u.i. u 8 u.i.). Con base en lo anterior es posible pensar que los resultados obtenidos sean el reflejo de la acción inhibitoria de la timulina sobre el ovario tal y como ocurre con la GnRH (Tsafiri y Adashi, 1994).

Un evento que se presentó en todos los grupos con PMSG, tratados o no con timulina, fue la presencia de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado. El número de estos se incrementó considerablemente con la concentración de 8 u.i de PMSG. Al respecto, se ha descrito que en el ovario de vaquillas la PMSG disminuye la atresia folicular pero induce una mayor frecuencia de folículos que no liberan al ovocito y que se luteinizan después de la descarga preovulatoria de LH (Moniaux y col., 1984). Un efecto similar pudo ocurrir en los ratones tratados con PMSG.

El tratamiento con timulina previo a la administración de 8 u.i. de PMSG disminuyó la frecuencia de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado en

aproximadamente el 70%, efecto que no se reflejó en un aumento en la cuota ovulatoria (número de cuerpos lúteos sin ovocito). Es probable que la timulina disminuya la expresión del receptor a LH de manera indirecta, ya que si tiene un efecto similar a la GnRH (Tsafriri y Adashi, 1994), modificaría la síntesis de estradiol, que como se sabe actúa de manera sinérgica con la FSH para inducir la expresión del receptor a la LH (Rani y col., 1981; Zeleznik y Fairchild-Benyo, 1994). El hecho que el número de cuerpos lúteos con ovocito atrapado no se haya modificado al administrar la timulina 44 ó 54 h después de la PMSG apoya esta idea.

En resumen, se puede sugerir que la administración sistémica de la timulina en el ratón prepúber, manifiesta dos tipos de efectos que dependen de la edad del animal y del estímulo gonadotrópico: uno central (administración desde el nacimiento) que estimularía la ovulación inducida (PMSG 5 u.i.) al favorecer la liberación de la LH; y otro a nivel ovárico (19 días de edad) donde modificaría la respuesta esteroidogénica al estímulo gonadotrópico (PMSG 8 u.i.) reduciendo así la respuesta ovulatoria.

9. CONCLUSIONES

- La timulina administrada en el ratón hembra desde el nacimiento, no modifica el inicio de la pubertad.
- La timulina juega un papel estimulante en la respuesta ovulatoria inducida por la administración de gonadotropinas que depende de la edad del animal y de la magnitud del estímulo gonadotrópico.
- La timulina estimula el crecimiento del timo.
- La timulina revierte los efectos ocasionados por el estrés de la inyección diaria.

10. PERSPECTIVAS:

De los resultados obtenidos en este trabajo, surgieron varias preguntas:

- El efecto estimulante que ejerce la timulina sobre la ovulación ¿es el resultado de una acción similar a la de la GnRH sobre la secreción de gonadotropinas por la hipófisis?
- El hecho que la timulina disminuya la frecuencia de cuerpos lúteos con el ovocito atrapado que se presenta con una dosis alta de PMSG ¿está relacionado con modificaciones en la secreción de estradiol?
- Las hembras tratadas con 8 u.i. de PMSG más hCG ovulan ¿el tratamiento previo con timulina reducirá esta respuesta?
- El aumento en la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos) en los ratones tratados con timulina desde el nacimiento y PMSG ¿son el resultado de cambios en la dinámica del crecimiento folicular?

11. BIBLIOGRAFÍA

Adashi, E., P. Jones y A. Hsueh (1981). Synergistic effect of glucocorticoids on the stimulation of progesterone production by follicle-stimulating hormone in cultures rat granulosa cells. *Endocrinology* 109: 1888-1894.

Andrews, W. y S. Ojeda (1981). A detailed analysis of the serum luteinizing factor hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology* 109: 2032-2039.

Axelrod, J. y T. Reisine (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.

Bach, J. (1979). Thymic hormones. *Int. J. Immunopharmacol.* 1: 227-285.

Bach, J. (1984). *Inmunología*. Limusa. México. pp: 24.

Bach, J., M.A. Bach, D. Blanot, E. Bricas, J. Charreire, M. Dardenne, C. Fournier y J.M. Pléau (1978). Serum thymic factor. *Bull. Inst. Pasteur* 76: 325.

Bach, J., M. Dardenne, J.M. Pléau y J. Rosa (1977). Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* 266: 55.

Becú-Villalobos, e I. Lacau-Mengido. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40: 1-17.

Bellanti, A. (1986). *Inmunología*. Interamericana. México. pp: 42.

Bernard, L. (1984). Thymosin β 4: Distribution and biosynthesis in Vertebrate cells and tissues. En: *Thymic Hormones and Lymphokines*. Goldstein, L. (Ed.). Plenum Press. New York. pp: 77-88.

Besedovsky, A. y S. Sorkin (1974). Thymus involvement in sexual maturation. *Nature* 249: 356-358.

- Brown, R.** (1994). *An Introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge, University Press. pp: 3, 96.
- Calzolari, A.** (1898). Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus celles des testicules. *Arch. Ital. Biol. Torino*. 30: 71-77.
- Carter, J.** (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J. Reprod. Fert.* 46: 211-216.
- Chambers, S. y A. Clarke** (1979). Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in sinergeically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* 55: 309-315.
- Charli, J-L., G. Ponce y P. Joseph-Bravo** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Domínguez, R. (Ed.). UNAM. pp: 57-72.
- Clark, J. y H. Shailaja** (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y J.D. Neil (Eds.). Raven Press. New York. pp: 1011-1012.
- Dalakas, M. y R. Hubbard** (1984). Thymosin β 4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: *Thymic Hormones and Lymphokines*. Goldstein, L. (Ed.). Plenum Press. New York. pp: 119-126.
- Dardenne, M. y J. Bach** (1988). Functional biology of thymic hormones. En: *Thymus Update I*. Kendall, M. (Ed.). Harwood Academic Publishers. London. pp: 111.
- Dardenne, M., W. Savino, L. Gastinel, y J. Bach** (1984). Thymulin: new biochemical aspects. En: *Thymic Hormones and Lymphokines*. Goldstein, L. (Ed.). Plenum Press. New York. pp: 37-42.
- Dardenne, M., W. Savino, D. Duval, D. Kaiserlian, J. Haissais y J. Bach** (1986). Thymic hormones-containing cells. VII. Adrenals and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *The Journal of Immunology* 136: 1303-1307.

- Domínguez, R.** (1995). La Regulación neuroendócrina de la ovulación. En: *Temas Selectos de Neurociencias*. Velázquez, J. (Ed.). UAM-Iztapalapa. México, pp: 203-213.
- Domínguez, R., R. Chávez y M.E. Cruz** (1991). La Regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Domínguez, R. (Ed.) Miguel Angel Porrúa. México, pp:163-168.
- Everett, J.** (1994). Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill, (Eds.). Raven Press. New York. pp:1509-1525.
- Fink, G.** (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog., Oxf.* 70: 403-423.
- Fink, G.** (1990). Developmental aspects of the control of gonadotropin secretion before and during puberty. En: *Control of the Onset of Puberty*. Sizonenko, P. y M. Aubert (Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore, USA. Pp:321-335.
- Fitzpatrick, F., M. Kendall, M. Wheeler, I. Adcock, B. Greenstein** (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrinol.* 106: R17-R19.
- Flanagan, S.** (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* 8: 295-309.
- Freeman, M.** (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 613-658.
- Funkenstein, B., A. Nimrod y H. Linder** (1980). The development of steroideogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* 106: 98-106.

- García, L.** (1996). Estudios de los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre el proceso de pubertad y la ovulación en el ratón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Gore-Langton, R. y D. Armstrong** (1994). Follicular Steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 571-627.
- Greenwald, S. y K. Shyamal** (1994). Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y Neill, J. (Eds.). Raven Press. New York. pp:629-724.
- Grossman, C.** (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* 5: 435-455.
- Grossman, C.** (1985). Interactions between the gonadal steroids and immune system. *Science* 227: 257-261.
- Grossman, C., L. Sholiton y P. Nathan** (1979). Rat thymic estrogen receptor. I. Preparation, location and physiochemical properties. *J. Steroid Biochem.* 11: 1233-1240.
- Ham, A.** (1975). *Tratado de Histología. 7ª Ed.* Interamericana. México. pp:303-308, 799.
- Harrison, R. y B. Weir** (1977). Structure of the mamalian ovary. En: *The Ovary*. Zuckerman, L. y B. Weir (Eds.). Academic Press, New York, pp:113-217.
- Hall, N., J.P. McGillis, B. Spangelo, G. Vahouny y A. Goldstein** (1984). Modulatory interactions between the central nervous system and the immune system. En: *Thymic Hormones and Lymphokines*. Goldstein L. (Ed.). Plenum Press. New York. pp: 313-323.
- Healy, D., G. Hodgen, H. Schulte, G. Chrousos, D. Loriaux, N. Hall y A. Goldstein** (1983). The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* 222: 1353-1355.

- Hinojosa, L.** (1994). Estudio de los efectos del injerto de timo sobre la pubertad espontánea e inducida en el ratón alopécico-hipotímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Hinojosa, L.** (1998). Estudio de la participación de la timulina en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad y la ovulación en los ratones hembra normal e hipotímico. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Hinojosa, L. y P. Rosas** (1997). Evidencias de la participación de la timulina en el proceso de pubertad. Ratones eutímicos e hipotímicos como modelos de estudio. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. XXII Reunión Anual. pp: 36-46.
- Hiroshige, T. y T. Sato** (1970). Circadian rhythm and stress-induced changes in hypothalamic content of corticotropin-releasing activity during postnatal development in the rat. *Endocrinology* **86**: 1184-1186.
- Hsueh, A., H. Billig y A. Tsafriri** (1994). Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Review*. **15**: 707-724.
- Jambon, B., P. Montagne, M-C. Bene, M-P. Brayer, G. Faure y J. Duheille** (1981). Immunohistologic localization of "facteur thymique serique" (FTS) in human thymic epithelium. *J. Immunol.* **127**: 2055-2059.
- Janardana-Sarma, T. y M. Sirsi** (1961). Comparison of the effect of ovariectomy and adrenalectomy on the thymus in young female rats, and a study of the part played by the thymus in body growth. *J. Endocrinol.* **22**: 117-182.
- Kamel, F. y C. Kubajak** (1987). Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology* **121**: 561-568.
- Kosiewicz, M. y S. Michael** (1990). Neonatal thymectomy affects follicle population before the onset of autoimmune in B6 mice. *J. Reprod. Fert.* **88**: 427-440.

- Kubasik, N., G. Hallauer y R. Brodows** (1984). Evaluation of a direct solid-phase radioimmunoassay for progesterone, useful for monitoring luteal function. *Clin. Chem.* 30: 284-286.
- Larrea, F., R.M. Oliart, A. Escorza, A. Ulloa-Aguirre, X. y X. Valencia** (1991). Fisiología y mecanismos de acción de las gonadotropinas hipofisarias. En: *Tópicos Seectos de Biología de la Reroducción*. Domínguez, R. (Ed.). UNAM. pp: 105-124.
- Lintern-Moore, S. y E. Pantelouris** (1975). Ovarian developmente in athymic nude mice. I. The size and composition of the follicle population. *Mechanism of Ageing and Development* 4. 385-390.
- Lintern-Moore, S. y E. Pantelouris.** (1976). Ovarian developmente in athymic nude mice. III. The efect of PMSG and oestradiol upon the size and composition of the ovarian follicle population. *Mechanism of Ageing and Development* 5: 33-38.
- Low, T. y A. Goldstein.** (1984). Thymosins: Structure, function and therapeutic applications. *Thymus* 6:27-42.
- Macfarland, L. y D. Mann.** (1977). The inhibition effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats. *Biol. Reprod.* 16: 306-314.
- Mader, S.** (1992). *Human Reproductive Biology*. 2ª Brown Publisher, USA. Pág. 79.
- Mendoza, E, y M. Romano.** (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor which modulates gonadotropin in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14: 3-242.
- Michael, S.** (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Raven Press. Greenwold, G. y Terranova, P. (Ed.) New york. pp: 156-163.
- Moniaux, D., J. Mariana y W. Gibson.** (1984). Action of PMSG on follicular population in the heifer. *J. Reprod. Fertil.* 70: 243-253.

Monier, J., M. Dardenne, J. Pleau, D. Schmitt, P. Deschaux y J. Bach (1980). Characterization of facteur thymique sérique (FTS) in the thymus. I. Fixation of anti-FTS antibodies on thymic reticuloepithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 42: 470-476.

Morgan, D. y C. Grossman (1985). Studies on cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* 7: 279-286.

Mori, H. y K. Matsumoto (1973). Development of the secondary interstitial gland in the rabbit ovary. *J. Anat.* 116: 417-429.

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

Niswender, G.D. y T. M. Nett (1994). Corpus luteum and its control in infraprimates species. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 781-816.

Ojeda, S, J. Advis y W. Andrews. (1980). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proc.* 39: 2365-2371.

Ojeda, S. y H. Urbanski. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 363-409.

Ojeda, S., H. Urbanski. y C. Ahm(Ed.) (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Rec. Prog. Horm. Res.* 42: 385-442.

Ojeda, S, Smith, S., Advis, J., Andrews, W. y L. Aguado. (1990). First preovulatory gonadotropin surge in the rodent. En: *The Onset of Puberty*. Grumbach, M., P. Sizonenko y M. Aubert (Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp: 156-163.

Peters, H., A. Byskov, R. Himelestein-Braw y M. Faber. (1975). Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fert.* 45: 559-566.

Plotsky, P. (1988). Regulation of the adrenocortical axis: hypophysiotropic coding, catecholamines and glucocorticoids. En: *The control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Rose, C. (Ed.). International University Press. USA. pp: 131-146.

Ramírez, V. (1973). Endocrinology of puberty. En: *Handbook of Physiology*. Greep, R y E. Astwood. (Eds.). Vol. II. Pp:1-28.

Rani, O. A. Salhanick y D. Armstrong (1981). Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultures rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology* 108: 1379- 1385.

Rebar, R., A. Miyaki, T. Low y L. Goldstein (1981a). Thymosin stimulates secreción of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214. 669-671.

Rebar, R., C. Morandini, G. Erickson y J. Petze (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 108: 120-126.

Rebar, R., A. Miyaki, T. Low y L. Goldstein (1983). The influence of the thymus gland on reproductive function: a hypothalamic site of action. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Greenwald, G. y P. Terranova (Eds.). Raven Press, New York, pp: 465-469.

Roitt, I. (1994). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp: 34.

Rosas, P. (1990). Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias.

Rosas, P., M. Argüello y R. Domínguez (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothymic hairless females mice. *Med. Sci. Res.* 17: 285-286.

Rosas, P., R. De Paz, V. Hernández-Ehlers y U. Quiroz (1992). Sex differences in the effects of gonadectomy and hemigonadectomy on the weight of the thymus in adult mice. *Med. Sci. Res.* 20: 509-510.

Ross, G. (1990). Follicular development: the life cycle of the follicle. En: *Control of the Onset of Puberty*. Grumbach, P., M. Sizonenko y M. Aubert (Eds.). Williams & Wilkins. Baltimore. USA. pp:376-386.

Ross, M., E. Reith y L. Romrell (1992). *Histología*. 2ª Edición. Panamericana. México. pp: 224.

Safieh, B., M. Kendall, J. Norman, E. Dardenne, J-F. Bach y J-M Pleau (1990). A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *Journal of Immunological Methods* 127: 255-262.

Savino, W., M. Dardenne, M. Papiernik y J-F. Bach. (1982). Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *J. Exp. M(Ed.)* 156: 628-633.

Spangelo, B. (1995). The Thymic-Endocrine Connection. *J. Endocrinol.* 147: 5-10.

Steinetz, B. (1978). Secretion and function of ovarian estrogens. En: *Handbook of Physiology*. (Eds.). Greep, R. y E. Astwood. American Physiological Society, Washington, pp: 439-466.

Suter, D. y N. Schwartz (1985). Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 117: 849-854.

Tilders, F., D. de Goeij y F. Berkenbosch. (1988). Turnover of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the median eminence, and control of pituitary-adrenal activity. En: *The control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Rose, C. (Ed.). International University Press. USA. pp: 7-24.

Tsafriri, A. y E. Adashi. (1994). Local nonsteroidal regulators of ovarian function. *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 817-860.

Urbanski, H. y S. Ojeda (1986). The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal females rats is ovary dependent.

Uzumcu, M., S. Akira y Y. Lin. (1992). Stimulatory effect of thymic factor (s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cell. *Life Sciences* 51: 1217-1228.

Vahouny, G., E. Kyeyune-Nyombi, J.P. McGillis, N. Tare, K. Huang, R. Tombes, A. Goldstein y N. Hall. (1983). Thymosin peptides and lymphokines do not directly stimulate adrenal corticosteroid production *in vitro*. *J Immunol.* 130:791.

Welschen, R. y M. Rutte. (1971). Ovulation in adults rats after treatment with pregnant mare serum gonadotrophin during oestrus. *Acta Endocrinol.* 68: 41-49.

Zeleznik, J. y D. Fairchild-Benyo. (1994). Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y J. Neill (Eds.). Raven Press. New York. pp: 751-782