

51262  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

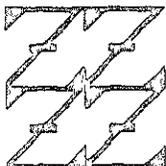
ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA EN LA  
PUBERTAD, LA OVULACION Y LA ESTEROIDOGENESIS DEL  
RATON TIMECTOMIZADO A LOS DIEZ DIAS DE EDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA  
(SISTEMAS HUMANOS)

P R E S E N T A  
LORENA GARCIA MEZA

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO VOTAMOS 4:25  
DE NUESTRA DELEGACION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

ZARAGOZA  
DIRECTOR DE TESIS  
DE POSGRADO E  
INVESTIGACION

MEXICO, D.F.

JUNIO DEL 2000



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 AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

\* ZARAGOZA \*

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA EN LA PUBERTAD,  
LA OVULACIÓN Y LA ESTEROIDOGÉNESIS DEL RATÓN  
TIMECTOMIZADO A LOS DIEZ DÍAS DE EDAD

Tesis presentada por: Lorena García Meza

Directora de tesis: Dra. Patricia Rosas Saucedo

Realizada en el Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo de la DGAPA-PAPIIT claves IN 212394, IN225598, del Programa de Becas de la DGAPA, del CONACyT clave 29006-N y del Programa Universitario de Investigación en Salud UNAM.

*A mis padres: Juana e Isaías por su amor y los valores que me han enseñado*

*A mis hermanos: Nora, Janet, Edu y Ove por su apoyo en todo momento*

*A mi tía Gloria: por su apoyo incondicional*

*A los niños: Alberto y Jorge por la ternura y sonrisas que me han brindado*

*A Juanita y Carolina, por la amistad que nos une.*

*A susana por que no importa el tiempo y la distancia que haya entre nosotras siempre estaremos juntas.*

## Agradecimientos

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

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por sus acertadas sugerencias

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Vicente Díaz Sánchez

Dr. Enrique Pedernera Asteguiano

Dr. Carlos Marcelo Timossi Baldi

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por su colaboración y sus valiosas aportaciones durante la revisión de esta tesis

Al Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biol. Roberto Chavira por su colaboración para la cuantificación de las hormonas por radioinmunoanálisis.

A María Luisa Illescas por su cooperación técnica en la realización de los cortes histológicos.

Al personal técnico del Bioterio de la FES-Zaragoza por el cuidado brindado a los ratones que se utilizaron en esta investigación.

A la Dra. Elia Roldán y al Dr. Mario Altamirano por su ayuda en la toma e impresión de las fotomicrografías

A cada uno de mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, por su contribución en la realización de esta tesis.

A la familia Báez-Miranda por su hospitalidad.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN .....	i
INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO .....	3
I. Pubertad .....	3
II. Características morfofisiológicas del ovario .....	8
III. Compartimento folicular y luteal .....	9
El crecimiento folicular .....	9
La atresia folicular .....	14
La ovulación .....	16
La luteinización .....	18
IV. Regulación de la esteroidogénesis en el folículo ovárico .....	20
V. Características y funciones del timo .....	25
Ubicación anatómica .....	25
Histología .....	25
Embriogénesis .....	29
Involución fisiológica del timo .....	29
El timo como glándula .....	31
VI. Participación del timo en la fisiología de la reproducción .....	31
Características de los ratones desnudos nu/nu y et/et .....	31
Efectos de la timectomía sobre el desarrollo del ovario .....	32
Efectos de las timosinas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas .....	34
Características de la timulina y sus efectos biológicos .....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	39
HIPÓTESIS .....	40
OBJETIVOS .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS .....	42

RESULTADOS .....	49
1. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos .....	49
2. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días de edad sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG a los 20 días de edad en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos .....	53
3. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG y hCG a los 25 días de edad en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos .....	62
DISCUSIÓN .....	66
CONCLUSIONES .....	76
PERSPECTIVAS .....	77
BIBLIOGRAFÍA .....	78

## RESUMEN

El timo es un órgano endócrino que secreta diversas hormonas llamadas timosinas, algunas de las cuales estimulan la secreción de las gonadotropinas y la esteroidogénesis ovárica. Para analizar si la timulina (timosina sintetizada exclusivamente en el timo) participa en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante el desarrollo prepuberal, se analizaron los efectos del reemplazo hormonal con timulina en ratones timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), sobre el proceso de pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis ovárica, espontáneas e inducidas por la administración de gonadotropinas.

Se utilizaron ratones Tx-10 e intactos tratados diariamente con timulina (12 ng/g pc) o solución salina desde los diez días de edad hasta el primer estro vaginal, y animales Tx-10 e intactos sin tratamiento. Los ratones Tx-10 presentaron retraso en la edad de la apertura vaginal ( $27.2 \pm 0.4$  vs  $24.9 \pm 0.2$  días,  $p < 0.05$ ) y disminución en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol ( $4.8 \pm 0.7$  vs  $14.3 \pm 2.1$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) respecto a los animales intactos. En los ratones Tx-10 el reemplazo con timulina restableció la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol a valores similares que un ratón intacto y provocó una disminución en el peso de los ovarios y del útero.

Para analizar si en los ratones Tx-10 el reemplazo con timulina inmediato a timectomía modifica la respuesta ovulatoria ante el estímulo con PMSG se utilizaron ratones intactos y Tx-10 tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad. Otros grupos de animales intactos y Tx-10 se inyectaron diariamente con timulina (12 ng/g de peso corporal) o solución salina a partir de los diez días de edad hasta el primer estro vaginal y con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad. El tratamiento con 5 u.i. de PMSG provocó en todos los grupos experimentales un adelanto de la apertura vaginal que se presentó alrededor de 48 h después de la inyección de la gonadotropina y el estro vaginal 24 h después, además de un incremento en el peso de los ovarios. Sin embargo en los ratones Tx-10 éste fue de menor magnitud en comparación con el de los intactos tratados de igual manera ( $16.2 \pm 1.0$  vs  $24.1 \pm 2.7$  mg,  $p < 0.05$ ).

En los animales tratados con 5 u.i. de PMSG no se observaron ovocitos en los oviductos al momento de la ovulación por lo que la ovulación se evaluó por la presencia de cuerpos lúteos en los cortes de los ovarios. Tomando en consideración este parámetro la respuesta ovulatoria (tasa de animales ovulantes y número de cuerpos lúteos) fue similar en los animales Tx-10 y en los intactos tratados con la

gonadotropina. En los ratones intactos tratados con timulina más PMSG, el número de cuerpos lúteos disminuyó, evento que no se observó en los ratones Tx-10 tratados de igual manera. En el 46% de estos últimos la ovulación se manifestó como ovocitos en los oviductos ( $21.8 \pm 6.2$ ).

En todos los grupos de animales que fueron tratados con PMSG, se presentaron folículos luteinizados. En los ratones timectomizados tratados con PMSG, la administración de timulina indujo un aumento en el número de éstos. En los ratones intactos la administración de solución salina indujo una disminución en el número de folículos luteinizados efecto que se agudizó con la administración de timulina.

Para analizar si en los ratones Tx-10 el reemplazo hormonal con timulina inmediato a timectomía restablece la ovulación inducida por la administración de PMSG+hCG, grupos de animales Tx-10 e intactos se trataron diariamente con 12 mg/g pc de timulina o con solución salina y a los 25 días de edad con 1 u.i. de PMSG y 64 h después 3 u.i. de hCG. Se contó con ratones intactos y Tx-10 que recibieron sólo la administración de las dos gonadotropinas.

Los animales Tx-10 tratados con PMSG+hCG respecto a los intactos tratados de igual manera, presentaron menor número de ovocitos liberados ( $6.9 \pm 1.5$  vs  $11.9 \pm 0.5$  mg,  $p < 0.05$ ) y menor peso del útero ( $58.8 \pm 6.4$  vs  $101.7 \pm 4.9$  mg,  $p < 0.05$ ). El reemplazo con timulina en estos animales restableció estos parámetros a valores similares que un ratón intacto tratado con timulina. En los ratones intactos tratados con ambas gonadotropinas, la timulina indujo una disminución en la concentración sérica de progesterona.

En resumen los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que la timulina es una de las señales de comunicación entre el timo y el ovario y es uno de los péptidos tímicos que participan de manera estimulante en las funciones del ovario (la esteroidogénesis y la ovulación) y modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas. Sin embargo en los animales intactos en los cuales el timo sintetiza su propia timulina, la administración adicional de esta hormona muestra un efecto inhibitorio sobre la ovulación (número de cuerpos lúteos) lo cual indica que su participación en la regulación de las funciones del ovario, probablemente dependen de su interacción con la timulina endógena, así como con las otras timosinas sintetizadas por el timo.

## INTRODUCCIÓN

El timo es un órgano que forma parte del sistema inmunológico en donde se lleva a cabo la diferenciación y maduración linfocítica. Sin embargo sus funciones no se limitan a este proceso, ya que existen numerosas evidencias experimentales que muestran su participación en el desarrollo y función gonadal.

La vinculación entre el timo y las gónadas se observó hace más de un siglo, cuando Calzolari en 1898 describió en conejos prepúberes que la castración provoca su hipertrofia. En 1969, Nishizuka y Sakakura observaron que la extirpación del timo en la etapa neonatal induce alteraciones en el desarrollo del ovario (disgénesis ovárica) y como consecuencia alteraciones en la función reproductora.

Utilizando el modelo del ratón timectomizado a los tres días de vida posnatal (Tx-3) Michael (1983) mostró que la disgénesis ovárica es el resultado de una respuesta autoinmune (síntesis de anticuerpos contra el ovocito) sobre los folículos ováricos, provocando la pérdida progresiva del compartimento folicular que conlleva a la infertilidad de los animales. Si la timectomía se realiza después del día siete de edad ya no se presenta disgénesis ovárica (Nishizuka y Sakakura, 1971), lo cual llevó a pensar que la participación del timo en el desarrollo del ovario se limitaba a un periodo muy corto de la vida del animal y como resultado de una disfunción inmunológica.

Sin embargo estudios de nuestro laboratorio muestran que al realizar la timectomía a los diez días de edad (Tx-10), los ratones presentan una serie de alteraciones como: pubertad retardada, disminución del peso de los ovarios, menor

cimiento folicular y menor respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico (García y Rosas, 1998).

Varios estudios muestran que las hormonas sintetizadas por el timo (timosinas) interactúan con el sistema reproductor de los mamíferos. Algunas de ellas tienen efectos en el Sistema Nervioso Central incidiendo sobre la secreción de gonadotropinas y en el ovario modificando la esteroidogénesis (Goldstein y col., 1981; Rebar y col., 1981a; Michael, 1983; Hall y col., 1992; Uzumcu y col., 1992).

Sin embargo algunas de las timosinas que han mostrado tener actividad biológica sobre las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios, también son sintetizadas por otros órganos (Dalakas y col., 1984; Horecker, 1984). Una de las timosinas que se caracteriza por ser sintetizada exclusivamente por las células del timo es la timulina. Esta hormona administrada de manera sistémica induce la ovulación en ratones prepúberes tratados con la gonadotropina del suero de la preñada (PMSG) (Hinojosa y col., 1999).

Lo anterior nos permite sugerir que las alteraciones reproductivas que presenta el ratón timectomizado a los diez días de edad son el resultado de la deficiencia de las hormonas tímicas y en particular de la timulina. Por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración sistémica de timulina en los ratones T $\times$ -10, desde los diez días de edad hasta el primer estro genital, sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis ovárica, espontáneas e inducidas por la administración de gonadotropinas.

## MARCO TEÓRICO

### I. Pubertad

Los roedores inician su madurez reproductiva cuando alcanzan la pubertad. En la hembra de la rata y el ratón la apertura vaginal es una manifestación externa característica asociada con el inicio de la pubertad. En el ratón la edad en la que ésta se presenta puede ocurrir entre los 30 y 35 días de vida y en la rata entre los 35 y 45 días, lo cual significa que la información genética es un factor determinante en la edad de inicio de la pubertad, sin embargo otros factores como el fotoperíodo, la temperatura y la alimentación también influyen (Ramírez, 1973).

La apertura vaginal es un evento regulado por los estrógenos ováricos y generalmente se observa un día después de que se presenta el incremento preovulatorio de las gonadotropinas. El frotis vaginal muestra células anucleadas en forma de escama correspondientes a un estro vaginal (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

El desarrollo de la rata desde el nacimiento hasta la pubertad, se ha dividido en cuatro etapas con base en los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Ojeda y col., 1986). Diversos autores han descrito los eventos que caracterizan a cada una de estas etapas (Ojeda y col., 1986; Ojeda y Urbanski, 1988, 1994; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990), los cuales se resumen a continuación.

Etapa neonatal (comienza desde el nacimiento y culmina en el día siete de vida).

Se inicia la foliculogénesis durante las primeras 48 horas de vida, incluso 24 h después del nacimiento ya se observa una gran cantidad de folículos primordiales. Hasta los cuatro o cinco días de edad el ovario es capaz de responder a las gonadotropinas dado que los folículos ya poseen receptores a estas hormonas. Por ende se asume que el inicio del crecimiento folicular en esta etapa ocurre de manera independiente a las gonadotropinas. Al parecer algunas neurotrofinas como el factor de crecimiento neural (NGF) podría ser uno de los factores que estimulan el comienzo de la diferenciación folicular.

En el plasma, la concentración de  $\alpha$ -fetoproteína se encuentra alta. Esta se une a los estrógenos provocando su inactivación, lo que se traduce en la ausencia del mecanismo de retroalimentación negativa de éstos sobre el hipotálamo y la hipófisis. La concentración sérica de la hormona luteinizante (LH) es baja, mientras que la concentración de la hormona estimulante del folículo (FSH) comienza a incrementarse.

En las células de la granulosa, los receptores a la FSH comienzan a aparecer desde los cuatro días de edad y su número se incrementa notablemente desde entonces hasta los 16 días de vida, evento que permite un incremento en la actividad del complejo de enzimas aromatasa y por ende la síntesis de estrógenos a partir de la testosterona.

Etapa infantil (comprende del día ocho al 21 de vida).

El evento que caracteriza a la fase infantil es el incremento en la concentración de la FSH en el plasma, el cual llega a su máximo entre los 12 y 15

días de edad, mientras que la secreción de la LH permanece baja y ocurre en picos esporádicos. Este aumento de la FSH es fundamental para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que ovularán en la pubertad.

Después del día 15 de vida, la concentración plasmática de la FSH baja y continúa disminuyendo gradualmente, mientras que los picos de la LH empiezan a desaparecer como consecuencia del incremento en la frecuencia de los pulsos de la GnRH y la sincronización de los mismos. En el día 16 se observa disminución en la concentración plasmática de  $\alpha$ -fetoproteína, lo cual permite que la concentración de estrógenos libres empiecen a incrementarse de manera que en esta etapa, los esteroides juegan un papel definitivo en la maduración neural.

En la fase infantil se establece el patrón de secreción tónica para la FSH y el pulsátil para la LH. Durante la segunda semana de vida posnatal un gran número de folículos pequeños continúan su desarrollo bajo la influencia de las gonadotropinas, en particular por la FSH, lo cual les permite seguir madurando. Entre los días 14 y 21 de edad, en el ovario se observan folículos en crecimiento primarios y secundarios (con antro) pero aún no hay folículos preovulatorios (Peters, 1969; Hage y col., 1978; Peters, 1979).

Etapa juvenil (abarca desde el día 22 y termina alrededor de los 30 días de edad).

Durante esta etapa la concentración de la FSH sigue disminuyendo pero en menor cantidad respecto a la etapa infantil, mientras que la de la LH permanece baja. Sin embargo la secreción de esta hormona es claramente pulsátil con un intervalo de 30 minutos entre cada pulso. Las concentraciones bajas de gonadotropinas plasmáticas que caracterizan a esta fase se deben en parte a la

disminución en la respuesta de la hipófisis a la GnRH, la cual no se incrementa hasta el día del primer proestro y también a que en esta etapa se establece definitivamente la relación funcional entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, debido a que el mecanismo de retroalimentación negativa de los estrógenos ya es funcional.

Los estrógenos libres o activos continúan aumentando, ya que la  $\alpha$ -fetoproteína disminuye aún más respecto a la fase infantil. Al final de la etapa juvenil, la concentración basal de la LH comienza a incrementarse y el aumento en la amplitud de los pulsos vespertinos de esta hormona se hace evidente, estableciéndose el ritmo circadiano de secreción.

Además de las gonadotropinas otras hormonas hipofisarias participan en el desarrollo del ovario. En las células de la granulosa la hormona de crecimiento (GH) facilita la capacidad de la FSH para inducir la expresión de los receptores a la LH y la prolactina (PRL) estimula la formación y el mantenimiento de los receptores a la LH, sobre todo durante los días que preceden al pico preovulatorio de las gonadotropinas.

Durante la fase juvenil se presentan ondas de desarrollo folicular y de atresia ya que el ovario se desarrolla con concentraciones bajas de gonadotropinas. Los folículos en ningún momento alcanzan el estado preovulatorio, probablemente por la falta de estos impulsos, ya que se ha mostrado que la administración de grandes cantidades de gonadotropinas inducen la ovulación en esta etapa (Peters, 1969).

Etapa peripuberal (su duración es variable ya que está asociada con la primera ovulación).

*a) Eventos que inician la etapa final de maduración.*

En el ovario, el número de receptores a la FSH y a la LH llegan a un máximo, lo cual se traduce en un incremento en la esteroidogénesis. Por lo tanto las concentraciones plasmáticas de progesterona, testosterona y estradiol aumentan aún más.

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

*b) Eventos finales que conllevan a la pubertad.*

La cascada de eventos que culminan con la pubertad es compleja y para su estudio se ha dividido en diferentes fases, tomando en cuenta principalmente características morfológicas.

**Anestro:** El tamaño y peso del útero es pequeño y no contiene líquido. La vagina siempre se encuentra cerrada. En el ovario se observan folículos grandes y una disminución en el número de receptores a la GnRH, mientras que los receptores de la LH aumentan.

**Proestro temprano:** En el útero se observa la presencia de líquido en la luz y en el espacio intersticial, lo que hace que aumente el peso del órgano. Estos eventos son

ducidos por el incremento en la concentración plasmática de estrógenos, sin embargo la vagina aún permanece cerrada.

**Proestro tardío:** Se le considera el primer proestro. El útero es grande debido a la acumulación de líquido por lo que su peso llega a un máximo. La vagina generalmente está cerrada, pero en los animales en los que ya se encuentra abierta el frotis vaginal se caracteriza por presentar un gran número de células epiteliales nucleadas. En los ovarios se observan folículos preovulatorios. En la tarde, se observa la máxima concentración plasmática de estrógenos que estimula la secreción de la GnRH y por ende el pico preovulatorio de la FSH y la LH, las cuales estimulan la maduración final de los folículos y la ovulación.

**Proestro:** El peso del útero es bajo y no presenta líquido en la luz. La vagina está abierta y el epitelio vaginal se caracteriza por el predominio de células anucleadas en forma de escamas. En este día ocurre la primera ovulación por lo que el ovario presenta cuerpos lúteos recién formados. La concentración plasmática de estrógenos y de la LH es menor con relación al proestro. La concentración de la FSH presenta un segundo pico y la de progesterona aumenta.

**Primer diestro:** La citología vaginal muestra el predominio de leucocitos. En el ovario se observan cuerpos lúteos maduros. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos y de gonadotropinas continúan bajas con relación al proestro.

## **I. Características morfofisiológicas del ovario.**

El ovario es el órgano primario del sistema reproductor cuyas funciones son producir gametos viables para la fecundación y la secreción de hormonas (esteroides y polipeptídicas) las cuales regulan el desarrollo del mismo y de otras estructuras como el útero y la vagina. En los mamíferos, los ovarios son órganos pares de forma ovoide, ligeramente apianados que se localizan en la pared lateral de la cavidad

pélvica. Cada ovario está unido por uno de sus bordes llamado hilio, al ligamento ancho del útero por medio del mesovario, que es un repliegue del peritoneo (Leeson y Leeson, 1992; Ross y col., 1992).

En la corteza del ovario se encuentran los folículos ováricos, que son la unidad anátomo-funcional del órgano, ya que a partir de éstos se forman los tres compartimentos del ovario [Figura 1] (Ham, 1975; Leeson y Leeson, 1992; Ross y col., 1992; Audesirk y Audesirk, 1996).

- 1) El folicular, formado por folículos en todas las etapas de desarrollo como son primordiales, en crecimiento (primario y secundarios) y preovulatorios.
- 2) El luteal o cuerpo lúteo, que se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito.
- 3) El intersticial o glándula intersticial, que está formado por las células de la teca interna de los folículos antrales atrésicos que poseen receptores a la LH.

### III. Compartimentos folicular y luteal.

#### *El crecimiento folicular*

La foliculogénesis es un proceso que se inicia un poco antes del nacimiento o en los primeros días de vida posnatal (como en la rata y el ratón) y posiblemente termina en la primera semana de vida (Peters, 1978); durante este proceso los ovocitos (desnudos) que miden aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, son rodeados por una sola capa de células foliculares o de la granulosa de forma aplanada y de una lámina basal que los aísla del resto del ovario, lo que da lugar a la formación de los folículos primordiales. Los ovocitos que no son rodeados por estas células en general mueren y son eliminados. Existen evidencias que permiten sugerir que las neurotropinas, una familia de factores de crecimiento, entre los que se encuentra el

factor NGF, pueden ser las responsables del inicio de este evento (Dominguez y col., 1991; Leeson y Leeson, 1992; Hsueh y col., 1994; Ojeda y Urbanski, 1994).

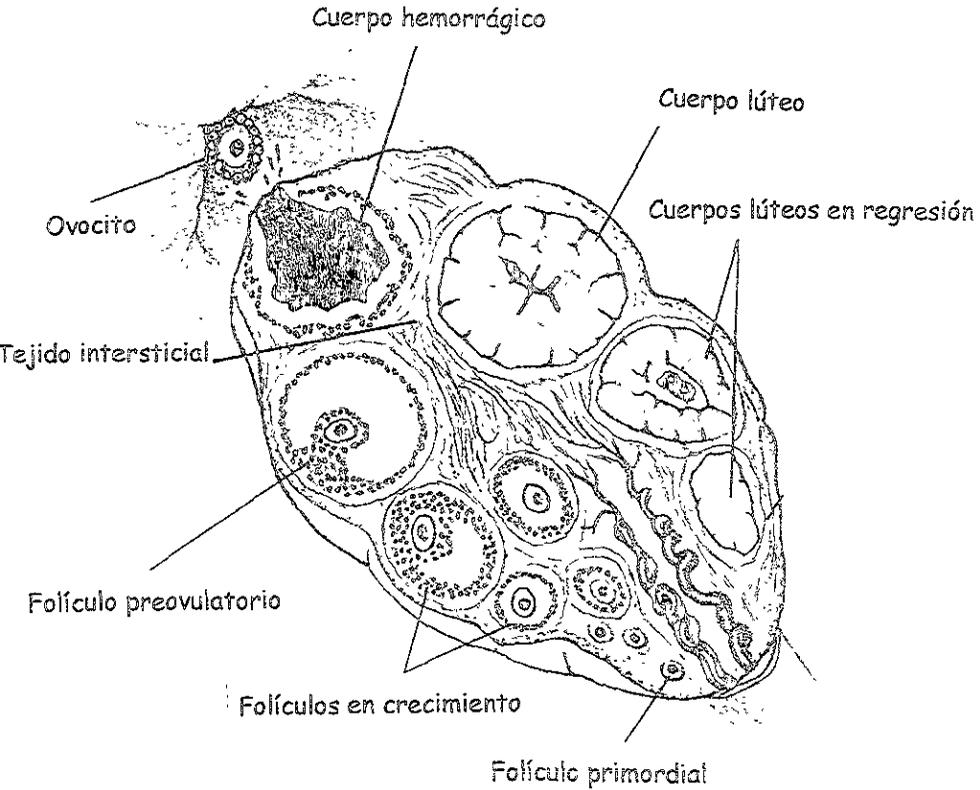


Figura 1. Esquema que muestra los diferentes compartimentos del ovario: el folicular, el luteal y el intersticial (Tomado de Audesirk y Audesirk, 1996).

La diferenciación de los folículos primordiales inicia con el crecimiento del ovocito y con la proliferación de las células de la granulosa. Durante el desarrollo de los folículos primordiales estos pueden seguir dos caminos: ovular o culminar en la

atresia. Este último proceso es el más frecuente y puede presentarse en cualquier etapa del desarrollo folicular (Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994).

Cuando las células de la granulosa aplanadas adquieren una forma cúbica, los folículos se denominan folículos primarios (en crecimiento). Estas células proliferan rápidamente por acción de la FSH y los estrógenos, que actúan de manera sinérgica; a su vez estas últimas estimulan la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que el número de receptores vaya en aumento conforme el folículo madura. En un principio las células foliculares se encuentran en contacto directo con el ovocito, pero a medida que continúa el desarrollo folicular se empieza a depositar sobre la superficie del ovocito una capa de mucopolisacáridos y glicoproteínas que sintetiza tanto el ovocito como las células foliculares y que conforman la zona pelúcida y (Sadler, 1990; Domínguez y col., 1991; Leeson y Leeson, 1992; Greenwald y Roy, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994).

En el momento en que las células de la granulosa forman tres o más capas alrededor del ovocito, se inicia la diferenciación de las células de la teca a partir de las células del estroma ovárico que rodean al folículo y que se ubican exactamente por fuera de la membrana basal de las células de la granulosa. La teca está conformada por dos capas, una capa profunda muy vascularizada con células secretoras (teca interna) y una capa superficial con células de tejido conectivo (teca externa). En las células de la teca la LH estimula la síntesis de andrógenos, los que sirven de sustrato a las células de la granulosa para la síntesis de estrógenos (Sadler, 1990; Domínguez y col., 1991; Leeson y Leeson, 1992; Greenwald y Roy, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994).

Cuando las células de la granulosa forman de seis a doce capas alrededor del ovocito, se observa la presencia de líquido entre las células, mismo que se va acumulando hasta formar una cavidad llamada antro folicular; los folículos en esta fase de desarrollo se les denomina secundarios o antrales. Las células de la granulosa que se encuentran en contacto directo con el ovocito forman el *cumulus oophorus*. Después de la ovulación las células del *cumulus* que permanecen con el ovocito forman la corona radiada. Las células de la granulosa de los folículos secundarios están en constante proliferación, se incrementa la cantidad de nexos y desmosomas que son las uniones entre las células de la granulosa, lo que acentúa la intercomunicación celular (Sadler, 1990; Domínguez y col., 1991; Leeson y Leeson, 1992; Greenwald y Roy, 1994).

Durante la mayor parte del desarrollo folicular, las células de la granulosa sólo poseen receptores a la FSH y las de la teca a la LH. Conforme el folículo madura las células de la granulosa adquieren receptores a ambas gonadotropinas por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos. A su vez estas células adquieren funciones diferentes, las adyacentes al ovocito le proporcionan soporte físico y nutrientes; las más cercanas a la membrana basal contienen gran cantidad de receptores a la LH por lo que son más activas en la producción de hormonas esteroideas que las que están cerca de la cavidad antral mismas que se distinguen por poseer un número mayor de receptores a la prolactina (Domínguez y col., 1991; Moore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994).

A medida que avanza la maduración folicular la cavidad antral crece aún más y acumula una serie de hormonas polipeptídicas (FSH, LH, prolactina) y esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos), neurotransmisores (noradrenalina,

serotonina) y factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, EGF; factor de crecimiento transformante alfa, TGF $\alpha$ ; factores de crecimiento parecidos a la insulina, IGF-I, IGF-II) (Domínguez y col., 1991; Hillier, 1994; Domínguez, 1997).

En el ovario de la rata, los folículos alcanzan la etapa preovulatoria alrededor de los 17 ó 19 días después de haber iniciado el crecimiento. Este tipo de folículo está formado por el ovocito I o primario, las células de la granulosa, la membrana basal y las células de la teca interna. Además está rodeado por un sistema de fibras de colágeno, células de tejido conectivo y fibras musculares lisas que conforman la teca externa. Todos estos elementos forman una vaina fibrosa, que en el momento de la ovulación se disgregan para permitir la salida del ovocito (Domínguez y col., 1991; Leeson y Leeson, 1992).

En los folículos, los vasos sanguíneos y las fibras de tipo colinérgico, noradrenérgico y peptidérgico llegan hasta la teca interna y no penetran a las capas de células de la granulosa ni alcanzan al ovocito (Domínguez y col., 1991).

En el folículo preovulatorio el ovocito completa la primera fase de la meiosis y se convierte en un ovocito II o secundario. La pérdida de la vesícula germinal y del nucleólo indican el reinicio de la división celular, lo cual ocurre dos horas después de que se produce el pico preovulatorio de LH; la culminación de la primera división meiótica ocurre aproximadamente seis horas después del mismo. En el folículo preovulatorio la proliferación de las células de la granulosa disminuye y se pierde la capacidad de síntesis de estrógenos y se comienza a sintetizar progesterona (Domínguez y col., 1991).

## Atresia folicular

A lo largo del desarrollo folicular la mayoría de los folículos ováricos (70-99.9%) entran en un proceso degenerativo llamado atresia. En el ratón de los 5,000 oocitos presentes al nacimiento, más del 50% se pierde durante las dos primeras semanas de vida (Greenwald y Roy, 1994). El mecanismo molecular fundamental de la atresia es la apoptosis o muerte celular programada que inicia generalmente con la activación de endonucleasas entre otros eventos, lo cual resulta en la fragmentación del ADN (Hsueh y col., 1994; Tilly, 1996; Terranova y Taylor 1998).

Conforme el folículo crece se incrementa la posibilidad de entrar en atresia, de tal manera que es mayor la frecuencia de folículos antrales atrésicos que los preantrales. Con base en criterios morfo-fisiológicos se ha dividido la atresia de los folículos antrales en tres etapas (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994).

Etapa I. Aproximadamente el 10% del total de las células de la granulosa presentan núcleos picnóticos, generalmente aquellas que se encuentran cerca del antro. La tasa de proliferación disminuye ya que se observa menor incorporación de timidina  $^3\text{[H]}$ .

Etapa II. Entre el 10 y el 30% de las células de la granulosa presentan picnosis. Muchas de ellas pierden la comunicación por lo tanto se observan dispersas en el antro folicular. La membrana basal pierde su integridad y hay infiltración de linfocitos T citotóxicos en las capas de células de la granulosa. Los folículos en esta etapa ya no pueden escapar de la atresia y degeneran.

Etapa III. Se caracteriza por una disminución masiva en el número de células de la granulosa resultado de la muerte de las células picnóticas y de la ausencia de mitosis. Las células de la teca se hipertrofian y hay separación y fragmentación de la membrana basal.

En el ovocito puede ocurrir rompimiento de la vesícula germinal (núcleo), alineación de los cromosomas en metafase y probablemente expulsión del primer cuerpo polar, alteración en los mucopolisacáridos y mucoproteínas que componen la zona pelúcida, disminución de las uniones GAP entre el ovocito y las células del *cumulus oophorus* (Greenwald y col., 1994). Además de los cambios morfológicos que se observan durante la atresia, se han identificado algunos marcadores bioquímicos. En las células de la granulosa hay disminución en la síntesis de estrógenos, incremento en la producción de progesterona (disminución de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa) y decremento en el número de receptores a las gonadotropinas. En las células de la teca se observa incremento en la síntesis de andrógenos (Hsueh y col., 1994).

Se ha mostrado que algunas hormonas como las gonadotropinas, los estrógenos y factores de crecimiento como el EGF, el  $TGF\alpha$ , el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el IGF-I, inhiben la fragmentación del ADN, por lo que se les ha considerado factores de supervivencia folicular; en cambio aquellas sustancias que favorecen la atresia como los andrógenos, la interleucina 6 (IL-6) y la GnRH se les llama factores atretogénicos (Hsueh y col., 1994).

- Las gonadotropinas son consideradas los principales factores de supervivencia folicular. Su administración rescata a los folículos de la atresia en etapas tempranas de este proceso, mientras que el bloqueo del incremento preovulatorio de éstas induce atresia folicular en los folículos que se encuentran listos para ovular
- El sistema de factores de crecimiento EGF/TGF, el factor bFGF y el IGF-I, inhiben el inicio de la fragmentación del ADN en células de la granulosa. Así

mismo se ha observado que el tratamiento con estrógenos incrementa la mitosis en las células de la granulosa y por ende el crecimiento folicular, mientras que los andrógenos inducen disminución en la actividad aromataasa, estimulan la producción de progesterona e incrementan el número de células picnóticas.

La GnRH de origen ovárico parece tener efectos inhibitorios en la diferenciación folicular. En ratas hipofisectomizadas el tratamiento con agonistas de la GnRH induce fragmentación del ADN en las células de la granulosa.

La inhibina y la activina son dos péptidos que también participan en la atresia folicular. Se ha mostrado que la inyección de inhibina en la bursa ovárica de ratas prepúberes incrementa el número de folículos antrales medianos, en cambio la inyección de activina provoca atresia folicular y bloquea los efectos estimulantes de la PMSG en el desarrollo folicular.

La IL-6 es una citocina que se sintetiza en las células de la granulosa y es un factor inductor de atresia folicular. La adición de IL-6 en un medio de cultivo de células de la granulosa obtenidas de ratas tratadas con PMSG, provoca fragmentación del ADN.

### *La ovulación*

La ovulación es un proceso que culmina con la expulsión del ovocito II. Justo antes de la ovulación se completa la primera fase de la meiosis. El momento en que el ovocito II es expulsado del folículo se produce la segunda división meiótica que se detiene en metafase y termina cuando el ovocito es fecundado, entonces se expulsa el segundo cuerpo polar (Ross y col., 1992).

La ovulación es un proceso que está regulado por diversas señales neuroendócrinas que provienen del Sistema Nervioso Central, la hipófisis y del mismo ovario (Domínguez y col., 1991; Franchimont y col., 1991). Se le ha considerado como un proceso inflamatorio ya que está mediado por agentes vasoactivos como la histamina, kininas y prostaglandinas las cuales provocan hiperemia en la pared folicular. La ovulación ocurre en respuesta al pico preovulatorio de las gonadotropinas y es parte integral del proceso de luteinización, más no indispensable dado que puede ocurrir luteinización sin ovulación (Espey y Lipner, 1994).

El intervalo entre el pico de la LH y la ovulación es corto y está asociado con cambios morfológicos en el ápice de la pared folicular. En la mujer el contenido de colágeno y proteoglicanos (componentes de la teca folicular) disminuye de 6-10 h después de la liberación de la LH debido a la activación de enzimas proteolíticas como el activador del plasminógeno, la colagenasa y la  $\beta$ -glucuronidasa. La ruptura folicular ocurre de 8-10 h después (Franchimont y col., 1991).

Antes de que ocurra la ovulación se observa disminución en la densidad e interconexión celular en el *cumulus oophorus* y la corona radiada, comienza la luteinización en las células de la granulosa y se incrementa la presión osmótica por el aumento en el líquido folicular. Todo lo anterior contribuye a la degradación del colágeno del tejido conectivo que mantiene unidas a las células de la granulosa y conlleva a la ruptura de la pared del folículo y liberación del ovocito. En el área por donde saldrá el ovocito (estigma o mácula pelúcida) se detiene el flujo sanguíneo justo antes de la ovulación (Fink, 1986; Franchimont y col., 1991).

### La luteinización

El proceso de luteinización inicia con cambios bioquímicos y morfológicos en las células de la teca interna y en la membrana de las células de la granulosa de los folículos listos para ovular. Después del incremento preovulatorio de LH pero antes de la ovulación existe hipertrofia de las células de la granulosa y activación nuclear. Una vez que ocurre la ovulación la membrana basal se rompe y los vasos sanguíneos invaden al folículo y se forma un cuerpo hemorrágico [Figura 1] (Braden y col., 1994; Niswender y Nett, 1994).

Durante el proceso de luteinización las células de la teca presentan una considerable actividad mitótica, mientras que las células de la granulosa prácticamente no se dividen. En estas últimas los receptores a la FSH desaparecen después de la ovulación, probablemente por que se internalizan además de que disminuye su expresión. Los receptores a la LH comienzan a incrementarse 48 horas después del pico preovulatorio de las gonadotropinas (Braden y col., 1994).

Durante la luteinización se incrementan la cantidad de retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi y el número de mitocondrias, estas últimas tienen una estructura tubular característica de las células productoras de hormonas esteroideas. Estos cambios estructurales y funcionales dan origen al cuerpo lúteo cuya función primaria es secretar grandes cantidades de progesterona que prepara al útero para la preñez (Braden y col., 1994; Niswender y Nett, 1994).

El cuerpo lúteo está formado por dos tipos de células morfológicamente distintas: las células grandes y las células pequeñas. Las primeras tienen forma poliédrica o esférica, su citoplasma se tiñe ligeramente y poseen un núcleo grande,

el complejo de Golgi está poco desarrollado, poseen muchas mitocondrias y abundante retículo endoplásmico liso, además de gránulos secretores que pueden contener oxitocina y relaxina. Comprenden alrededor del 25 al 35% del cuerpo lúteo (Braden y col., 1994; Niswender y Nett, 1994).

Las células pequeñas tienen forma de huso con citoplasma muy teñido con gotas grandes de lípidos y un núcleo irregular que con frecuencia presenta inclusiones citoplasmáticas, contienen un número moderado de mitocondrias de tamaño variable, el retículo endoplásmico liso tubular es muy abundante aún cuando también poseen retículo endoplásmico rugoso; el complejo de Golgi es menos pronunciado que en las células grandes. Es característico de estas células la ausencia de gránulos secretorios. Representan cerca del 12 al 18% del volumen del cuerpo lúteo, mientras que la vascularización ocupa aproximadamente el 11%, el tejido conectivo del 22 al 29% y los fibroblastos del 7 al 11% (Braden y col., 1994; Niswender y Nett, 1994).

Ambos tipos de células que conforman al cuerpo lúteo secretan progesterona, sin embargo las células grandes sintetizan de dos a 40 veces más que las células pequeñas, es decir contribuyen con más del 80% de la progesterona que sintetiza el cuerpo lúteo. Existen evidencias bioquímicas que apoyan la propuesta de que las células grandes se originan de las células de la granulosa y que las células pequeñas se diferencian a partir de las células de la teca, sin embargo en el cuerpo lúteo maduro es posible que algunas células grandes provengan de células de la teca y tampoco se descarta la posibilidad que algunas células pequeñas puedan transformarse en células grandes (Braden y col., 1994).

La secreción de progesterona y el mantenimiento del cuerpo lúteo está regulado principalmente por la LH y la prostaglandina  $F2\alpha$ . Sin embargo existen una serie de factores que sintetiza el cuerpo lúteo y modulan de manera parácrina este proceso. Entre ellos se encuentra la oxitocina, la vasopresina y la relaxina; factores de crecimiento como el IGF-I, IGF-II; péptidos similares a la GnRH y algunos eicosanoides, además de la noradrenalina, la serotonina y la dopamina (Braden y col., 1994).

Cuando la fecundación no ocurre el cuerpo lúteo disminuye de volumen y simultáneamente disminuye la síntesis de progesterona, lo cual en la mujer desencadena la menstruación (Sadler, 1996). La regresión del cuerpo lúteo coincide con la infiltración de linfocitos, incremento en el contenido de  $20\alpha$ -hidroxidehidrogenasa que cataliza la conversión de progesterona en su metabolito la  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona y aumento en el contenido de colesterol (Freeman, 1994).

#### IV. Regulación de la esteroidogénesis en el folículo ovárico.

La secreción de hormonas esteroideas en el folículo ovárico depende de la etapa de crecimiento y maduración del mismo y su regulación está dada por un conjunto de señales neuroendócrinas que involucra principalmente a las gonadotropinas y a los mismos esteroideos gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterinas) (Greenwald y Roy, 1994; Hillier, 1994).

En la esteroidogénesis ovárica, participan las células de la teca y las células de la granulosa. El precursor inicial en la biosíntesis de hormonas esteroideas es el colesterol que se obtiene de la sangre a partir de lipoproteínas, del almacenado en

forma de ésteres o de la síntesis de *novο* a partir de acetato. En las células de la teca, la LH se une a su receptor membranal formando el complejo hormona-receptor que actúa sobre el sistema de la adenilato ciclasa y provoca el aumento del AMPc. Éste estimula la síntesis y la actividad de la enzima citocromo P450<sub>sc</sub> que induce la formación de pregnenolona. La pregnenolona puede transformarse en dos compuestos, por dos vías diferentes de biosíntesis. En la vía  $\Delta^5$ , el complejo enzimático 17 $\alpha$ -hidroxilasa y C17-20 liasa cataliza la conversión de la pregnenolona en 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y a continuación en dehidroepiandrosterona. La otra vía alternativa es la  $\Delta^4$  y aquí la pregnenolona se transforma a progesterona por acción de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerasa (3 $\beta$ -HSD). La progesterona después se convierte a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y posteriormente a androstenediona gracias a las enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilasa y C17-20 liasa, respectivamente. Finalmente la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza la transformación de androstenediona en testosterona; estos dos andrógenos atraviesan la membrana basal y se incorporan al citoplasma de las células de la granulosa. En éstas la FSH se une a su receptor en membrana y estimula la actividad del complejo enzimático P450 aromatasa la cual induce la aromatización de los andrógenos a estrógenos (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994) [Figura 2].

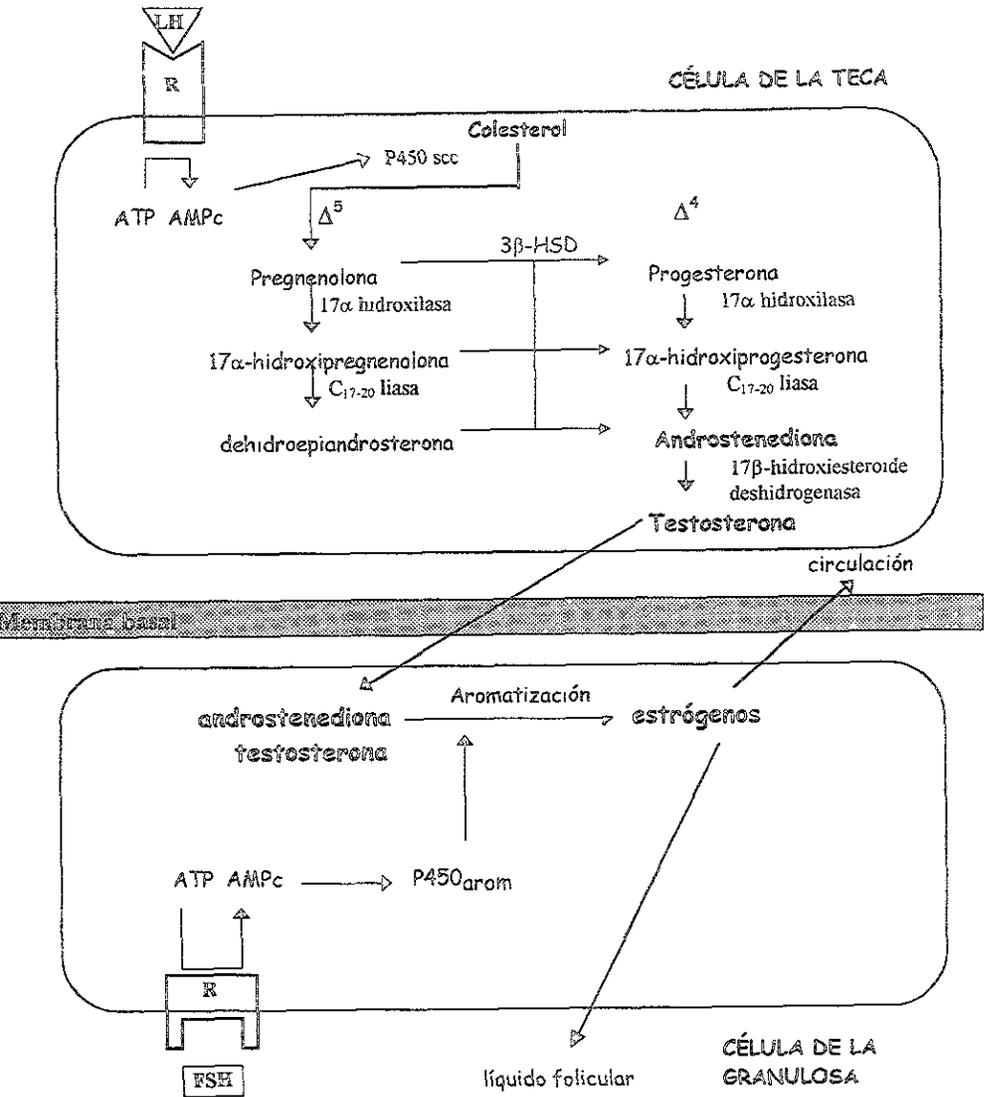


Figura 2. Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario. En la célula de la teca la LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol, por dos vías diferentes. En la célula de la granulosa la FSH estimula la actividad del complejo enzimático aromatasa que cataliza la conversión de los andrógenos en estrógenos (modificado de Erickson, 1994 y Gore-Langton, 1994).

Se ha mostrado que los andrógenos y los estrógenos potencian el efecto de la FSH en la inducción de la aromatasa, sin embargo este efecto se inhibe por los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos y por la progesterona. Los estrógenos inhiben la secreción de progesterona, también limitan la síntesis de andrógenos por que inhiben el sistema enzimático 17 $\alpha$ -hidroxilasa: C17-20 liasa. La acción parácrina de los estrógenos funciona como un sistema de retroalimentación negativo que bloquea su propia síntesis regulando la disponibilidad de su sustrato (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En el ovario, la esteroidogénesis es regulada, además de las gonadotropinas y de los propios esteroides por una serie de factores de crecimiento y hormonas que sintetiza el propio órgano y que modulan la acción de las gonadotropinas actuando de manera parácrina, autócrina e incluso en la hipófisis (Domínguez y col., 1991; Hillier, 1994).

- La teca interna del ovario sintetiza el EGF y los factores de crecimiento transformantes  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ). El tratamiento con EGF/TGF $\alpha$  *in vitro* estimula la proliferación de las células de la granulosa e inhibe los efectos de la FSH en diversos procesos como la expresión de receptores a la LH, actividad aromatasa y en la síntesis de progesterona e inhibina. El TGF $\beta$  se sintetiza en las células de la teca y en las células de la granulosa, es un factor autócrino que estimula la proliferación de las células de la granulosa *in vitro* y modula los efectos estimulantes de la FSH (síntesis de AMPc, receptores a la LH y la esteroidogénesis), además inhibe los efectos del sistema EGF/TGF $\alpha$  en la síntesis de los receptores a la LH y en la esteroidogénesis. En las células de la

teca el TGF $\alpha$  inhibe la síntesis de andrógenos y provoca acumulación de progesterona.

En las células de la granulosa, la FSH incrementa el número de receptores al IGF-I, el cual potencia los efectos de la FSH en la esteroidogénesis y en el crecimiento y diferenciación celular. En las células de la teca el IGF-I potencia los efectos de la LH en la síntesis de andrógenos. El IGF-II se sintetiza en las células de la granulosa y estimula su proliferación.

La GnRH de origen ovárico inhibe la síntesis de andrógenos en las células de la teca e inhibe los efectos estimulantes de la FSH sobre la actividad aromatasa en las células de la granulosa, además estimula la secreción de progesterona y de la prostaglandina E. La oxitocina, inhibe la actividad de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa. La vasopresina y la arginina-vasopresina (secretadas por el cuerpo lúteo), también inhiben la secreción de estrógenos por un mecanismo semejante al de la oxitocina.

La activina se sintetiza en los todos los folículos en crecimiento, sin embargo en los folículos preovulatorios disminuye significativamente su secreción. En los folículos primarios y secundarios la activina inhibe la síntesis de andrógenos inducida por la administración de LH/IGF y aumenta la actividad de la aromatasa debido a que sensibiliza a las células de la granulosa a la acción de la FSH.

La inhibina disminuye selectivamente la secreción de la FSH en la hipófisis y es producida en grandes cantidades por las células de la granulosa de folículos preovulatorios. En las células de la teca facilita la acción de la LH en la síntesis de andrógenos y por ende incrementa la secreción de estrógenos.

- Los estrógenos y los corticoides de origen adrenal inhiben la síntesis y la secreción de estradiol en el ovario al modificar en las células de la teca la síntesis de andrógenos. En las células de la granulosa los corticoides bloquean la aparición de los receptores a la LH, inducidos por la FSH.

#### *V. Características y funciones del timo.*

El timo es un órgano linfoepitelial primario que forma parte del sistema hematopoyético, en él ocurren la diferenciación y la maduración de los linfocitos inmunocompetentes o linfocitos T, que se encargan de mediar la inmunidad celular (Dabrowski y Drabrowska-Bernstein, 1990; Roitt y col., 1993).

##### *Ubicación anatómica*

En los mamíferos, el timo es un órgano de color rosáceo y de forma triangular. Está ubicado en el tórax por debajo de la parte superior del esternón, encima del corazón y al centro de los pulmones. En la parte posterior del órgano se encuentran las venas tiroideas inferiores, la tráquea y los grandes vasos como el cayado aórtico (Ham, 1975; Lindner, 1990) [Figura 3].

##### *Histología*

El timo está formado por dos lóbulos unidos en la parte media por tejido conectivo. Cada lóbulo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo que penetra formando tabiques o trabéculas que lo dividen en lobulillos. Está formado por una matriz de células epiteliales dispuestas en forma de red por lo que se le denomina retículo-epiteliales, entre las cuales se depositan los linfocitos (Bellanti, 1986; Ross y col., 1992; Roitt y col., 1993) [Figura 4].

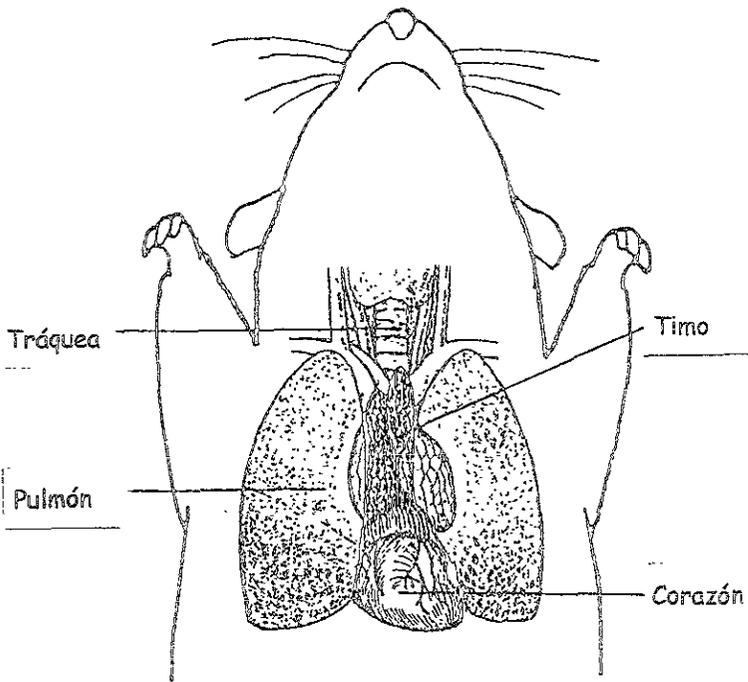


Figura 3. Esquema que muestra la ubicación anatómica del timo en el ratón.

El timo presenta una organización cortico-medular. Cada lóbulo presenta una corteza discontinua (lobulillos) y una médula continua (Copenhaver y col., 1985; Bellanti, 1986; Ross y col., 1992; Roitt y col., 1993). En la corteza las células retículo-epiteliales están distribuidas más espaciadamente que en la médula. Consta de abundantes linfocitos pequeños con núcleos hiper cromáticos. Se caracteriza por presentar exclusivamente capilares sanguíneos. Las arterias siguen los tabiques de tejido conectivo hasta la unión de la corteza y la médula, donde envían ramas a los tejidos cortical y medular (Copenhaver y col., 1985; Ross y col., 1992) [Figura 4].

A diferencia de la corteza, la médula posee una mayor proporción de células retículo-epiteliales y menor cantidad de linfocitos los cuales son grandes con núcleos menos teñidos y citoplasma más abundante. En la médula se observan los corpúsculos de Hassall que son estructuras esféricas u ovals características del timo y que aparecen durante la primera mitad de la vida fetal. Cada uno de ellos está formado por células reticulares dispuestas concéntricamente cuyo centro puede presentar indicios de queratinización (Copenhaver y col., 1985; Bellanti, 1986; Ross y col., 1992; Roitt y col., 1993) [Figura 4].

El tejido conectivo del timo posee una cantidad variable de granulocitos, mastocitos, adipocitos y macrófagos, además de fibras de colágeno y fibroblastos. La cápsula y los tabiques tienen vasos sanguíneos, vasos linfáticos eferentes (pero no aferentes) y nervios (Ross y col., 1992).

En el timo una gran cantidad de linfocitos que degeneran durante el proceso de maduración y diferenciación, principalmente los de la corteza. Los que maduran migran a la sangre y se depositan en las zonas timo-dependientes que se encuentran en los órganos linfoides periféricos (bazo y ganglios linfáticos), aquí los linfocitos T se encargan de la repuesta inmune mediada por células y cooperan con los linfocitos B en la repuesta inmune humoral (Bellanti, 1986; Ross y col., 1992; Roitt y col., 1993).

El timo está irrigado por las arterias mamaria interna y tiroideas inferiores. En el órgano existe una barrera hematotímica cortical que impide la entrada de macromoléculas o partículas circulantes, por lo cual la proliferación y diferenciación de los linfocitos corticales ocurre en un medio ausente de antígenos (Copenhaver y col., 1985).

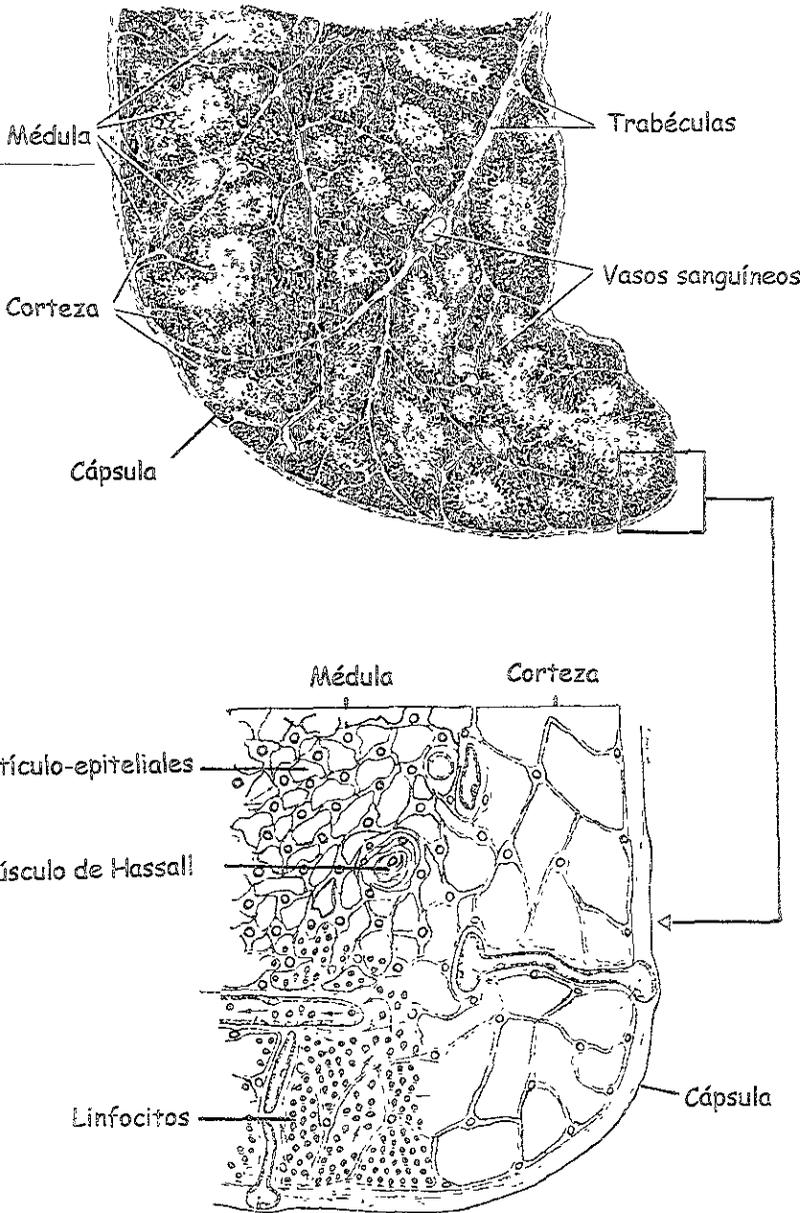


Figura 4. Representación esquemática de la histología y organización corticomedular del timo humano (Tomado de Bellanti, 1986).

El timo está innervado por las ramas del nervio vago y del simpático cervical. Las fibras se distribuyen en las paredes de los vasos sanguíneos. Algunas de las fibras terminan libres en la corteza y en la médula. La información neural que llega al timo es principalmente de tipo colinérgico y noradrenérgico (Copenhaver y col., 1985).

### *Embriogénesis*

El timo se origina como una invaginación endodérmica de las porciones medial y ventral del tercer par de bolsas faríngeas cuyo revestimiento endodérmico da origen a las células epiteliales. Al principio, cada invaginación contiene una luz estrecha que pronto es obstruida por la proliferación de las células epiteliales. El timo crece caudalmente hacia el mediastino en forma de una prolongación tubular del epitelio endodérmico. Estos tubos epiteliales pronto se vuelven cordones que proliferan y mandan hacia afuera ramas laterales precursoras de los núcleos de los lóbulos. El extremo de avance prolifera y después pierde la conexión con el epitelio faríngeo y migran al mediastino donde se fusionan para formar en forma parcial los lóbulos (Ham, 1975; Copenhaver y col., 1985; Paulsen, 1991; Ross y col., 1992; Gadler, 1996).

### *Involución fisiológica del timo*

El timo es un órgano que crece desde el nacimiento hasta la pubertad. Alcanza su tamaño máximo, con relación al peso corporal, poco después del nacimiento. En la pubertad se inicia un proceso de involución al que se le ha denominado "involución fisiológica" en el cual el timo reduce gradualmente su tamaño y su peso conforme el individuo avanza en edad (Grossman, 1984, 1985; Bellanti, 1986; Hall y Goldstein, 1987; Paulsen, 1991).

Durante la involución del timo la corteza se hace más delgada dado que se observa disminución en la tasa de proliferación linfocítica la cual al parecer es provocada principalmente por el incremento en las concentraciones plasmáticas de hormonas sexuales (Grossman, 1984; Bellanti, 1986; Hall y Goldstein, 1987; Pausel, 1991), al mismo tiempo aumenta el área relativa de la médula y crecen los corpúsculos de Hassall (Pausel, 1991). A medida que avanza el proceso de involución, el timo adquiere cada vez mayor cantidad de tejido adiposo de manera que llega a ser un pequeño cúmulo de grasa en la vejez [Figura 5]. Esta involución puede acelerarse en respuesta a una serie de factores como el estrés, la desnutrición y las infecciones, entre otros (Raviola, 1989).

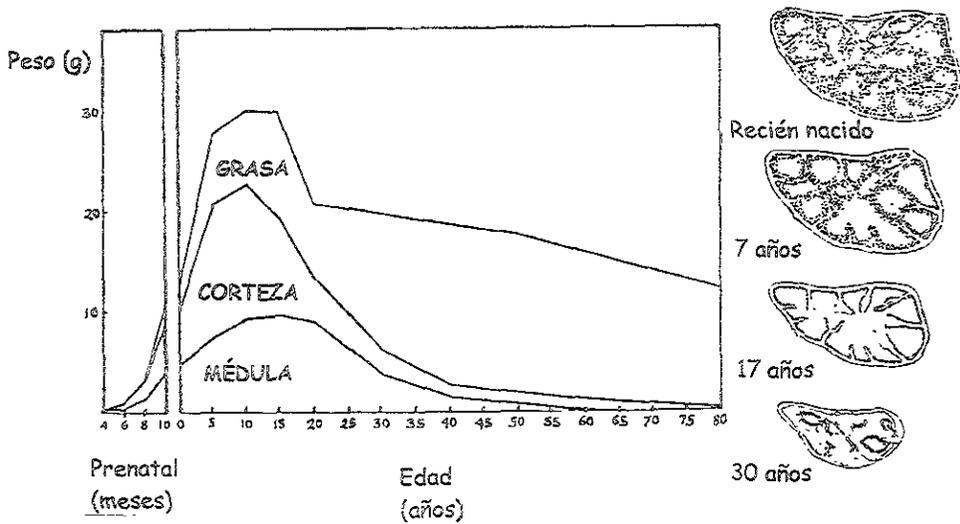


Figura 5. Representación esquemática que muestra los cambios de peso y composición del timo en el humano durante el proceso de involución (Tomado de Bellanti, 1986).

### *El timo como glándula*

Las células retículo-epiteliales del timo sintetizan una serie de polipéptidos llamados timosinas, cuya función es estimular la maduración y la diferenciación de los linfocitos T (Goldstein, 1984). A partir de uno de los extractos tímicos como la timosina fracción 5 (Timosina F5) se han aislado varios polipéptidos con diversas funciones biológicas, los cuales se han clasificado en familias, tomando como base su punto isoeléctrico: timosina  $\alpha 1$ , timosina  $\alpha 5$ , timosina  $\alpha 7$ , timosina  $\beta 1$ , timosina  $\beta 3$ , timosina  $\beta 4$ , timosina  $\beta 7$ , timosina  $\beta 8$ , timosina  $\beta 9$ , timosina  $\beta 10$  y timosina  $\gamma 1$  (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984). En la misma fracción 5 podemos encontrar otras hormonas como por ejemplo el factor tímico humoral (THF), el factor tímico del suero o timulina (FTS), la timoestimulina, la timopoiétina y el factor tímico X (TFX) (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

### VI. Participación del timo en la fisiología de la reproducción.

La aparición de modelos biológicos espontáneos como el ratón congénitamente atímico (*nu/nu*), el ratón alopecico-hipotímico (*et/et*) y los trabajos realizados en el modelo del ratón timectomizado en la etapa neonatal, han permitido estudiar de manera sistematizada la participación del timo en la fisiología de la reproducción.

#### *Características de los ratones desnudos nu/nu y et/et*

El mutante *nu/nu* se caracteriza por presentar retraso en la pubertad (edad de la apertura vaginal), menor desarrollo folicular, atresia acelerada, menor peso de los ovarios y el útero, menor concentración de gonadotropinas y esteroides gonadales e infertilidad; además son inmunodeficientes (Flanagan, 1966, Besedovsky y Sorkin, 1974; Shire y Pantelouris, 1974; Eaton y col., 1975; Linter-Moore y col.,

1976; Linter-Moore, 1977; Rebar y col., 1981b; Chesnokova y col., 1983). Cuando a los ratones *nu/nu* se les realiza al nacimiento el injerto de timo, se previenen las alteraciones descritas anteriormente (Rebar y col., 1980; Chesnokova y col., 1983).

Los ratones alopécicos *et/et* presentan alteraciones en el desarrollo del timo que se manifiestan después de los diez días de vida posnatal, de tal manera que en la etapa adulta el peso del órgano es aproximadamente la mitad del de uno normal, por lo cual se les denomina hipotímicos. Las hembras *et/et* presentan pubertad retardada, menor peso de los ovarios y del útero, mayor peso de adrenales y bazo, mayor índice de atresia folicular, menor respuesta ovulatoria al estímulo con gonadotropinas y su fertilidad es similar a la un ratón normal pero decrece prematuramente. En estos animales el injerto de timo al nacimiento previene el retardo en la pubertad y las alteraciones ocasionadas por el estrés (Rosas y col., 1987; 1989; Rosas y Hinojosa, 1993; Hinojosa, 1994; Hinojosa y Rosas, 1994; Rosas y col., 1995).

#### *Efectos de la timectomía sobre el desarrollo del ovario.*

La timectomía realizada en la etapa neonatal (2-4 días), provoca en el animal adulto, disgénesis ovárica que se caracteriza por infiltración de linfocitos, disminución en el número de ovocitos y de folículos, hipertrofia e hiperplasia de las células intersticiales, proliferación de tejido conectivo, ausencia de cuerpos lúteos y presencia de quistes. Se ha descrito que cuando la timectomía se realiza después de los siete días ya no se desencadena la disgénesis ovárica (Nishizuka y Sakakura, 1969; Besedovsky y Sorkin, 1974; Hattori y Brandon, 1979; Michael y col., 1980; Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

La disgénesis ovárica, que se presenta en los ratones timectomizados a los tres días de edad (Tx-3) se acompaña de bajas concentraciones plasmáticas de FSH, LH, GH, PRL, progesterona y estrógenos, retraso en la edad de la apertura vaginal, infertilidad y menor peso de los ovarios y del útero. En los ovarios de los ratones Tx-3 predominan células intersticiales y estroma ovárico por lo que sintetizan *in vitro* mayores cantidades de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona y al parecer no sintetizan estrógenos (Nishizuka y Sakakura 1969, 1971; Sakakura y Nishizuka, 1972; Nishizuka y col, 1973; Besedovsky y Sorokin, 1974; Michael y col.,1980, 1981,1990; Michael, 1983; Kosiewicz y Michael, 1990).

La disgénesis ovárica sólo se presenta cuando se extirpa el timo en los primeros días de vida posnatal. Taguchi y col., (1980) propusieron que las alteraciones que se producen en este lapso, son el resultado de disfunciones en el sistema inmunológico, el cual se encuentra en vías de maduración. Se planteó que la diferenciación de los linfocitos T-cooperadores ocurre antes que la de los linfocitos T-supresores, por lo que al momento de la timectomía, los primeros ya están presentes, mientras que estos últimos aún no. Durante la interacción de los linfocitos T-cooperadores con los linfocitos B se producen anticuerpos en contra de los ovocitos (respuesta autoinmune), sin que haya un freno a este efecto, provocando así que el compartimiento folicular degenera paulatinamente.

Por estudios de inmunofluorescencia se ha mostrado que los animales Tx-3 sintetizan anticuerpos contra el ovocito, lo que indica que la disgénesis ovárica tiene una etiología de tipo autoinmune (Michael, 1983).

En los ovarios de los animales Tx-3 en diferentes etapas del desarrollo se observa una pérdida masiva de folículos primordiales antes de los diez días de edad y una subsecuente disminución en el número de folículos en crecimiento hacia los 20 días, sin que se presente infiltración de linfocitos en el ovario ni anticuerpos contra el ovocito en la sangre, sino hasta los 25 días de edad. Debido a esto, Kosiewicz y Michael (1990) proponen que el timo tiene una participación bifásica en el desarrollo del ovario: un efecto directo o indirecto de tipo hormonal que afecta a los folículos primordiales y en crecimiento (efecto temprano) y uno de tipo inmunológico que resulta en una respuesta autoinmune que se evidencia después de los 25 días (efecto tardío).

En el modelo del ratón Tx-3 la degeneración progresiva del compartimento folicular no permite el estudio de la participación endócrina del timo en el desarrollo del ovario. Debido a esto, en nuestro laboratorio hemos utilizado como modelo al ratón timentomizado a los diez días de edad (Tx-10), cuyos ovarios no muestran signos de disgénesis a la pubertad. Estos ratones presentan una serie de alteraciones como son: retardo en la pubertad, disminución en el número de folículos en crecimiento (en particular de los folículos pequeños) y menor respuesta ovulatoria cuando se les estimula con gonadotropinas (García, 1996; García y Rosas, 1998).

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

Los polipéptidos sintetizados por el timo participan en la secreción de las hormonas que regulan el desarrollo gonadal. La adición de timosina F5 o timosina  $\beta$ 4 a un sistema de perfusión de hipotálamo-hipófisis incrementa la secreción de la GnRH y por ende la de la LH (Rebar y col., 1981a).

Un factor tímico de 28 kD cuando se adiciona a un medio de cultivo de hipófisis potencia los efectos de la GnRH sobre la secreción de las gonadotropinas. Este mismo factor inhibe la esteroidogénesis *in vitro* inducida por la hCG en el ovario y en el testículo, al parecer por que éste interactúa competitivamente en la unión de la hCG con su receptor (Hiriart y Romano, 1986; Pedernera y col., 1986; Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989).

En el ratón prepúber la administración de timosina F5 o de timosina  $\alpha 1$  induce una disminución en el peso de los ovarios, adelanta la edad de la pubertad, aumenta la concentración plasmática de estradiol e induce la involución del timo (Dardenne y Bach, 1981; Michael, 1983). Cuando la timosina F5 se adiciona a una medio de cultivo de adenohipófisis incrementa las concentraciones plasmáticas de la PRL y de la GH (Spangelo y col., 1987). El responsable de tal efecto es una fracción de la F5 llamada MB-35 que potencia los efectos del factor liberador de la GH o del TRH (Badamchian y col., 1991).

La adición de los polipéptidos tímicos liberados *in vitro* por las células retículo-epiteliales, al cultivo de células de la granulosa del ovario de rata, estimulan la secreción de progesterona (Uzumco y col., 1992).

#### *Características de la timulina y sus efectos biológicos.*

La timulina es un péptido que consta de nueve aminoácidos (<Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn). Es sintetizada por las células retículo-epiteliales del timo, principalmente las de la zona cortical y las de los corpúsculos de Hassall (Monier y col., 1980; Jambon y col., 1981; Savino y col., 1982). La timulina se caracteriza porque se sintetiza exclusivamente en el timo; en el suero de individuos

congénitamente atímicos como el ratón nu/nu y en los pacientes con el Síndrome Di George no se detecta en la circulación sanguínea y en los modelos de animales timectomizados desaparece inmediato a la operación. En todos estos modelos la timulina sólo se detecta en la sangre después de que se hace un injerto de timo (Dardenne y Bach, 1981; Savino y col., 1982; Dardenne, 1984).

En el ratón, la timulina se puede detectar en el suero desde los 14 días de vida prenatal. Después del nacimiento y entre los cinco y siete meses de edad la concentración de timulina permanece constante, a partir de esta edad comienza a disminuir significativamente de manera proporcional a la involución del timo, de tal forma que en ratones viejos desaparece de la circulación sanguínea (Dardenne y Bach, 1981).

La timulina atraviesa la barrera hematoencefálica ya que se ha observado actividad de rosetas (los linfocitos T o B poseen receptores específicos que se unen a eritrocitos de oveja y forman estructuras en rosetas, la aparición de estos receptores son timo dependiente por lo que sólo la timulina estimula dicho efecto) en el líquido cerebroespinal de pacientes con esclerosis múltiple tratados con timulina por vía subcutánea (Bach y Dardenne, 1984).

Los mecanismos o factores que regulan la secreción de la timulina son poco conocidos. Los esteroides de origen gonadal y adrenal participan en este proceso, dado que la castración y la adrenalectomía en ratones adultos inducen una disminución temporal en la concentración plasmática de timulina pero incrementa el número de células epiteliales que la contienen. Esta disminución se ha tratado de explicar por la probable existencia de inhibidores para la timulina cuya secreción sería regulada por dichos esteroides (Dardenne y col., 1986). También se ha

propuesto que la timulina tiene un mecanismo de autorregulación ya que la administración de esta timosina a ratones prepúberes disminuye el número de células retículo-epiteliales que la producen (Savino y col., 1983). Otros factores como la GH y la PRL (Goff y col., 1987; De Mello-Coelho y col., 1998) el IGF-I (Mocchegiani y col., 1996) y algunos opiodes (Savino y col., 1990) estimulan la secreción de timulina.

La timulina participa en la diferenciación y maduración de los linfocitos (Dardenne y Bach, 1981) activando segundos mensajeros como el AMPc, el GMPc y la prostaglandina PGE<sub>2</sub>. La síntesis de estos mensajeros depende de la etapa de diferenciación del linfocito, esto es en los inmaduros la timulina activa AMPc y GMPc y en los maduros estimula la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Rinaldi-Garaci y col., 1985).

Zaidi y col. (1988) mostraron que la timulina incrementa la secreción de LH en hipófisis en cultivo de manera semejante a cuando se adiciona GnRH.

En células de la granulosa de porcino en cultivo la timulina incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasa. Si estas células son previamente estimuladas con FSH, la timulina incrementa la secreción de progesterona y no modifica la actividad de la aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). La timulina estimula la proliferación de células germinales en el testículo y ovario de fetos de rata (Prépin, 1991,1993).

*In vitro*, la timulina incrementa la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la hipófisis (Hadley y col., 1997) y en el testículo incrementa la esteroidogénesis estimulada con hCG, el mismo efecto se observó *in vivo* al administrarla a ratas de 30 días de edad (Wise, 1998).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que los ratones prepubéres de 20 días de edad no ovulan cuando se les administran 5 u.i. de PMSG. En este modelo, el tratamiento diario con timulina por vía sistémica desde los 19 días de edad induce superovulación en el 50% de los animales en respuesta a la administración gonadotrópica (Rosas, 1990; García, 1996; Hinojosa y Rosas 1996, 1997; Hinojosa y col., 1999). Si la timulina se inyecta desde los 24 días de edad hasta el primer estro vaginal y se administra 5 u.i. de PMSG al día 25, la respuesta ovulatoria no se modifica y sólo se observa un aumento en la masa ovárica (Hinojosa y Rosas, 1997; Hinojosa, 1998). Estos resultados indican que la timulina ejerce un efecto estimulante sobre la ovulación modulando la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas y al parecer sus efectos dependen de la etapa de desarrollo en la que se encuentra el animal.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ratón la timectomía a los diez días de edad provoca retraso de la pubertad, disminución en el crecimiento folicular y disminución en la respuesta ovulatoria inducida por el tratamiento gonadotrópico. En el ratón intacto, la administración de timulina durante la etapa peripuberal, incrementa la respuesta ponderal de los ovarios al estímulo con gonadotropinas e induce la ovulación. Estos resultados nos indican por un lado, que la presencia del timo es necesaria durante el desarrollo prepuberal de la hembra del ratón y por otro que la timulina parece jugar un papel estimulante en los mecanismos que regulan la pubertad y la primera ovulación, lo que nos lleva a pensar que las alteraciones observadas en el ratón Tx-10 son en parte el reflejo de la falta de timulina. Es por ello que en este estudio se analizaron los efectos del remplazo hormonal con timulina en ratones timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10), sobre el proceso de pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis espontáneas e inducidas por la administración de gonadotropinas.

## HIPÓTESIS

En el ratón timectomizado a los diez días de edad, la falta de las hormonas que sintetiza el timo retrasa el inicio de la pubertad espontánea y disminuye la ovulación inducida por la administración de gonadotropinas. En el ratón intacto prepuber tratado con PMSG, la administración previa de timulina estimula la respuesta ovulatoria. Por esto en el ratón timectomizado el reemplazo con timulina inmediato a la extirpación del órgano, revertirá las alteraciones observadas.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del reemplazo hormonal con timulina en los ratones timectomizados a los diez días de edad, sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis espontáneas e inducidas por la administración de gonadotropinas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar los efectos de la administración sistémica de timulina en ratones timectomizados a los diez días de edad, sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro vaginal, la ovulación y las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona.
- Analizar los efectos de la administración sistémica de timulina en ratones timectomizados a los diez días de edad, sobre la ovulación inducida por la administración de PMSG a los 20 días de edad y sobre las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona.
- Analizar los efectos de la administración sistémica de timulina en ratones timectomizados a los diez días de edad, sobre la ovulación inducida por la administración de PMSG-hCG a los 25 días de edad y sobre las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Animales*

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura de  $24 \pm 2$  °C y agua y alimento *ad libitum*. Las crías se distribuyeron en camadas de cinco hembras por madre, con libre acceso a ella desde el nacimiento hasta el destete (21 días de edad).

### *Timectomías*

Las timectomías se realizaron bajo el microscopio estereoscópico. Los animales se anestesiaron por enfriamiento con hielo. Se hizo una incisión de piel a la altura del segundo par de costillas, se cortó el esternón, se introdujo una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío y se succionaron ambos lóbulos del timo. Posteriormente se suturó la herida y se aplicó alcohol yodado. Después de la operación, los animales se colocaron en un ambiente a  $36 \pm 1$  °C durante una hora para acelerar la recuperación de la temperatura corporal.

### *Procedimiento de sacrificio y autopsia*

Todos los animales se sacrificaron por decapitación entre las 10:00 y 11:00 h, se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular a temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos, después se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta la cuantificación de esteroides gonadales por radioinmunoanálisis (RIA). A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en una balanza de precisión. En los oviductos se buscó

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

En el momento de la autopsia se realizó la exploración al microscopio estereoscópico del área torácica para verificar si la timectomía fue completa. En los casos en los que se encontraron restos tímicos, éstos se procesaron para su análisis histológico utilizando como criterio de exclusión la organización córtico-medular característica del timo. En los resultados sólo se consideraron los datos de los animales con timectomía completa.

#### *Procesamiento de los ovarios y cuantificación de los cuerpos lúteos*

Los ovarios de los animales tratados con gonadotropinas que no presentaron ovocitos en los oviductos, se fijaron en solución de Bouin y se deshidrataron gradualmente en alcohol y posteriormente en cloroformo. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  que se tñieron con la técnica de hematoxilina-eosina. En el seriado de cada ovario se cuantificó el número de cuerpos lúteos, cuyo análisis se realizó con base en las siguientes características: células grandes de forma poliédrica o esférica y ligeramente teñidas, células pequeñas en forma de huso con citoplasma muy teñido distribuidas entre las células grandes formando cordones y ausencia de la cavidad antral y del ovocito (Figura 7 A y B) (Ham, 1975; Braden y col., 1994; Niswender y Nett, 1994).

#### *Cuantificación de hormonas*

Las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona se cuantificaron por RIA de fase sólida. Para cada hormona se utilizó un estuche Coat-A-Count (Los Angeles, California, EUA), el cual incluye tubos de polipropileno que

contienen el anticuerpo específico para el esteroide obtenido de suero de coneja, iguales con la hormona marcada con  $^{125}\text{I}$  y estándares para realizar la curva patrón. En cada tubo se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de suero (para testosterona) ó 100  $\mu\text{l}$  de suero (para  $17\beta$ -estradiol y progesterona) y 1000  $\mu\text{l}$  de la hormona marcada, se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se secaron las paredes de los tubos. La cuantificación de las cuentas por minuto se realizó en un contador de centelleo gamma (Packard Instrument Co.). Las concentraciones se expresaron en pg/ml para  $17\beta$ -estradiol y en ng/ml para progesterona y testosterona.

### *Análisis estadístico*

El peso corporal, el peso de los órganos y las concentraciones de las hormonas se analizaron con la prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. La edad de la apertura vaginal, la presencia del primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal), el número de cuerpos lúteos y el número de ovocitos liberados se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn's. La tasa de animales ovulantes (TAO) se calculó de la siguiente manera:

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

Los resultados de la TAO se compararon por la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. En los casos en los que se compararon pares de datos se usó la prueba de "t" de Student o la prueba de "U" de Mann-Whitney. En todos los casos, sólo se consideraron como significativos los resultados cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

1. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

Con el fin de estudiar si la timulina es uno de los factores tímicos que participa en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante el desarrollo prepupal, se analizaron los efectos del reemplazo hormonal con timulina en ratones timectomizados a los diez días de edad. Para analizar si los efectos de la timulina en el Tx-10 dependen de su interacción con las otras hormonas de origen tímico y de la presencia de la propia timulina, se utilizaron ratones intactos tratados con esta última.

A grupos de ratones intactos y Tx-10 se les administró diariamente timulina (Sigma, EUA) (12 ng/g de peso corporal) (Cerde, 1998) o solución salina (NaCl al 0.9%) (Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V.) por vía subcutánea, desde los diez días de edad hasta el día en que presentaron el primer estro vaginal. Se contó con animales intactos y Tx-10 que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

Los animales se revisaron diariamente entre las 09:00 y 10:00 h para registrar la edad de la apertura vaginal, momento en el que se inició la toma diaria de frotis vaginales. Los animales se sacrificaron el día del primer estro vaginal y se autopsiaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días de edad sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG a los 20 días de edad en ratones ovariectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

En estudios previos observamos que los ratones intactos de 20 días de edad no son capaces de ovular al administrarle 5 u.i. de PMSG. Sin embargo cuando se les inyectó diariamente timulina a partir del día 19 y se les estimuló con PMSG a los 20 días de edad, los animales ovularon (Hinojosa y Rosas, 1996, 1997).

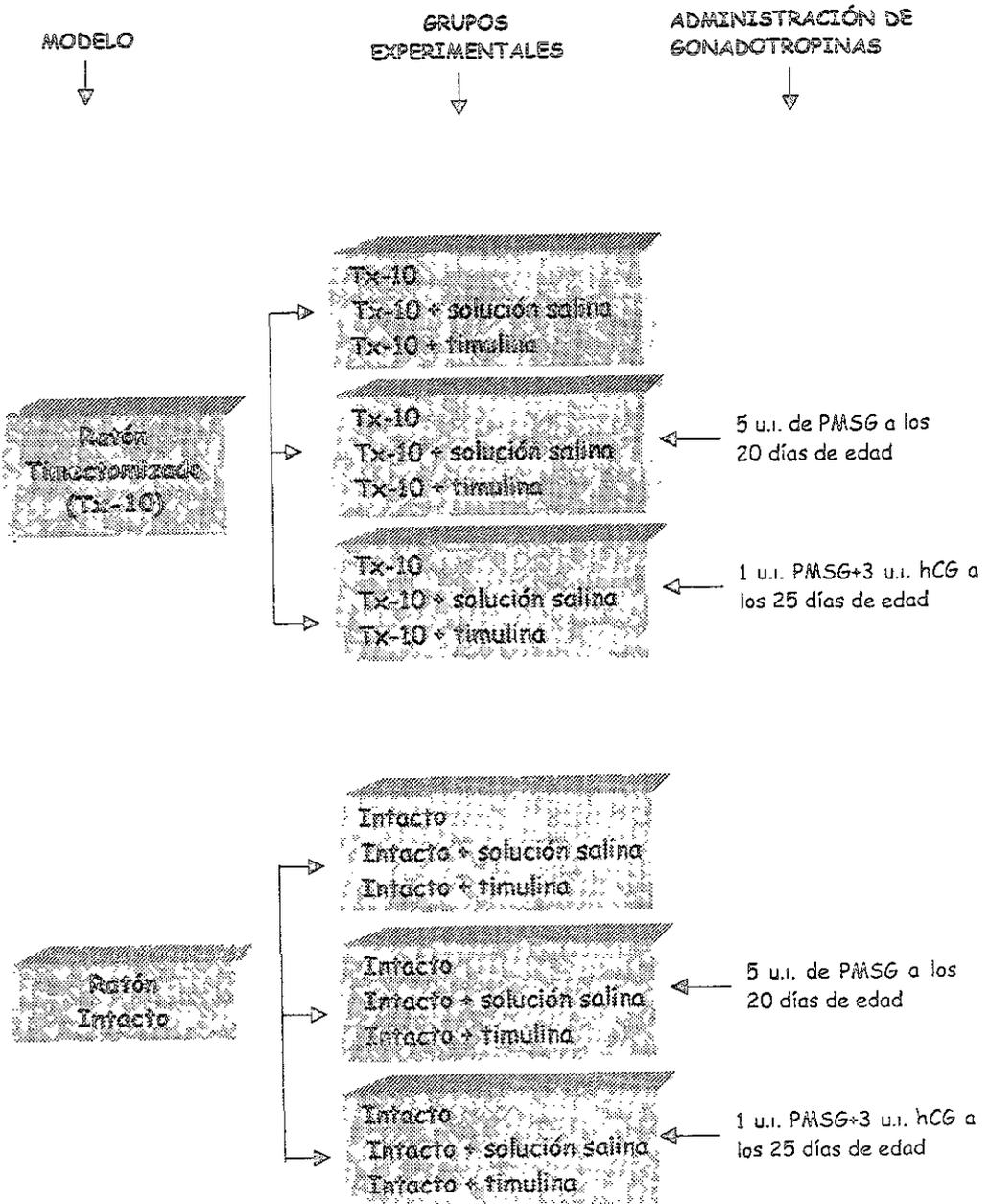
Con base en lo anterior se decidió analizar si en los ratones Tx-10 el reemplazo hormonal con timulina inmediato a la cirugía, modifica la respuesta ovulatoria ante el estímulo con PMSG (Sigma, EUA). Para lo cual se utilizaron ratones intactos y Tx-10 a los que se les administraron 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad. Otros grupos de animales intactos y Tx-10 se inyectaron diariamente con timulina (12 ng/g de peso corporal) (Cerdeira, 1998) o solución salina a partir del día diez de vida y 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad.

Se realizó el seguimiento de los animales para registrar la edad de la apertura vaginal y el día de primer estro. Al sacrificio se procesaron igual que en el experimento anterior.

3. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG y hCG a los 25 días de edad en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

Previamente mostramos que los ratones Tx-10 de 25 días de edad presentan disminución en la capacidad ovulatoria en respuesta al tratamiento secuencial con ambas gonadotropinas (1 u.i. de PMSG más 3 u.i. de hCG) (Sigma, EUA), en comparación con los animales intactos tratados de igual manera (García, 1996; García y Rosas, 1998).

Utilizando como base el modelo anterior se decidió analizar si en el ratón Tx-10, el reemplazo hormonal con timulina desde los diez días de edad, es capaz de restablecer la respuesta ovulatoria inducida por PMSG+hCG. Para esto se utilizaron ratones intactos y Tx-10 a los cuales diariamente a partir de los diez días de edad se les administraron 12 ng/g de peso corporal de timulina (Cerdeña, 1998) o solución salina. A los 25 días de edad se les inyectó 1 u.i. de PMSG y 54 h después 3 u.i. de hCG. Se contó con grupos de animales intactos y Tx-10 a los que únicamente se les administraron las gonadotropinas. Todos los animales se sacrificaron 20 h después de la administración de hCG. A la autopsia se siguió el procedimiento descrito anteriormente.



## RESULTADOS

1. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

Los ratones timectomizados a los diez días de edad presentaron un retraso en la edad de la apertura vaginal y una disminución en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol, en comparación con los animales intactos. Ninguna de las hembras ovuló al primer estro vaginal. El peso corporal, de los ovarios y del útero, así como las concentraciones séricas de progesterona y testosterona no mostraron diferencias significativas entre los animales intactos y los timectomizados (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal, presencia del primer estro vaginal, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos y de timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Intactos	Tx-10
Nº de animales	16	10
Apertura vaginal	24.9 $\pm$ 0.2	27.2 $\pm$ 0.4 <i>a</i>
Primer estro vaginal $\diamond$	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.3
TAO	0/16	0/10
Peso corporal (g)	22.8 $\pm$ 0.3	24.0 $\pm$ 0.6
Ovarios (mg)	12.5 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 1.0
Útero (mg)	56.9 $\pm$ 4.8	55.4 $\pm$ 4.1
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	14.3 $\pm$ 2.1 (11)	4.8 $\pm$ 0.7 (4) <i>b</i>
Progesterona (ng/ml)	1.4 $\pm$ 0.3 (7)	1.5 $\pm$ 0.3 (7)
Testosterona (ng/ml)	0.09 $\pm$ 0.01 (8)	0.07 $\pm$ 0.02 (10)

$\diamond$  días posteriores a la apertura vaginal

*a*,  $p < 0.05$  (prueba "U" de Mann-Whitney)

*b*,  $p < 0.05$  (prueba "t" de Student)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En los ratones timectomizados a los diez días de edad la inyección diaria de solución salina adelantó significativamente la edad de la apertura vaginal y el peso corporal fue menor. En comparación con los animales Tx-10 con solución salina, el tratamiento con timulina provocó retraso en la edad de la apertura vaginal, incremento en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol y disminución en el peso de los ovarios y del útero. Cuando se compararon los efectos de la timulina con los parámetros de las hembras Tx-10 sin tratamiento sólo se observaron diferencias en el peso de los ovarios y en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol. Ninguno de los animales de los tres grupos experimentales ovuló al primer estro vaginal (Tabla 2).

Dado que los ratones Tx-10+solución salina fueron de menor edad y de menor peso que los Tx-10, se realizó el análisis del peso de los órganos en función del peso corporal. El peso relativo de los ovarios no mostró diferencia significativa entre los grupos de Tx-10 con y sin solución salina ( $7.0 \pm 0.5$  vs  $5.6 \pm 0.5$  mg/10 g pc, NS), sin embargo el peso relativo del útero fue mayor en los animales Tx-10 que recibieron solución salina respecto a los Tx-10 sin tratamiento ( $29.9 \pm 2.1$  vs  $23.2 \pm 1.9$  mg/10 g pc,  $p < 0.05$ ). Las diferencias observadas en el peso de los ovarios y del útero entre los grupos Tx-10+timulina y Tx-10+solución salina se conservaron cuando se analizaron en función del peso corporal.

Tabla 2. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal, presencia del primer estro vaginal, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10) sin tratamiento y de ratones Tx-10 tratados con solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad, sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Tx-10	Tx-10+SS	Tx-10+Timulina
Nº de animales	10	19	13
Apertura vaginal (días)	27.2 $\pm$ 0.4	22.5 $\pm$ 0.5 a	25.3 $\pm$ 0.3 b
Primer estro vaginal $\diamond$	1.4 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2
TAO	0/10	0/19	0/13
Peso corporal (g)	24.0 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 1.0 c	22.5 $\pm$ 0.6
Ovarios (mg)	13.4 $\pm$ 1.0	13.4 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.7 c,d
Útero (mg)	55.4 $\pm$ 4.1	57.6 $\pm$ 4.1	44.4 $\pm$ 2.7 d
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	4.8 $\pm$ 0.7 (4)	8.8 $\pm$ 2.0 (10)	17.3 $\pm$ 2.4 (6) c,d
Progesterona (ng/ml)	1.5 $\pm$ 0.3 (7)	1.2 $\pm$ 0.2 (8)	1.1 $\pm$ 0.3 (5)
Testosterona (ng/ml)	0.07 $\pm$ 0.02 (10)	0.09 $\pm$ 0.03 (7)	0.11 $\pm$ 0.03 (8)

$\diamond$  días posteriores a la apertura vaginal

a,  $p < 0.05$  vs Tx-10 b,  $p \leq 0.05$  vs Tx-10+SS (prueba Kruskal-Wallis)

c,  $p < 0.05$  vs Tx-10 d,  $p \leq 0.05$  vs Tx-10+SS (prueba ANDEVA seguida de Tukey)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En los ratones intactos, la inyección de solución salina desde los diez días de edad provocó un retraso significativo en la presencia del primer estro vaginal, efecto que no se modificó por el tratamiento diario con timulina. Sin embargo la administración de esta hormona provocó un incremento en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol en comparación con la del grupo de animales intactos tratados con solución salina. No se observaron diferencias en el resto de los parámetros evaluados entre ambos grupos experimentales. Ninguno de los animales ovuló al primer estro vaginal (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal, presencia del primer estro vaginal, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos en tratamiento y de ratones intactos tratados con solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad, sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Intactos	Intactos+SS	Intactos+Timulina
Nº de animales	16	14	14
Apertura vaginal (días)	24.9 $\pm$ 0.2	25.1 $\pm$ 0.2	25.4 $\pm$ 0.3
Primer estro vaginal $\diamond$	1.1 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.4 a	2.4 $\pm$ 0.7 a
TAO	0/16	0/14	0/14
Peso corporal (g)	22.8 $\pm$ 0.3	23.9 $\pm$ 0.9	22.7 $\pm$ 0.4
Ovarios (mg)	12.5 $\pm$ 0.6	13.9 $\pm$ 0.9	11.8 $\pm$ 0.8
Útero (mg)	56.9 $\pm$ 4.8	56.4 $\pm$ 5.1	49.5 $\pm$ 4.0
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	14.3 $\pm$ 2.1 (11)	8.9 $\pm$ 1.6 (8)	18.4 $\pm$ 3.6 (6) $\hat{b}$
Progesterona (ng/ml)	1.4 $\pm$ 0.3 (7)	0.9 $\pm$ 0.2 (8)	1.4 $\pm$ 0.2 (6)
Testosterona (ng/ml)	0.09 $\pm$ 0.01 (8)	0.11 $\pm$ 0.03 (4)	0.07 $\pm$ 0.02 (7)

$\diamond$  días posteriores a la apertura vaginal

a,  $p < 0.05$  vs Intactos (prueba Kruskal-Wallis)

$\hat{b}$ ,  $p < 0.05$  vs Intactos+SS (prueba ANDEVA seguida de Tukey)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

El análisis comparativo de los parámetros evaluados en los animales Tx-10 y en los intactos, ambos tratados con timulina, no mostró diferencias significativas (Tablas 2 y 3). Cabe señalar que el incremento en la concentración de  $17\beta$ -estradiol que se observó en los animales timectomizados tratados con timulina, llegó a valores similares a los observados en el animal intacto sin tratamiento (17.3  $\pm$  2.4 vs 14.3  $\pm$  2.1 pg/ml, NS).

7. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG a los 20 días de edad en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

En los animales intactos el tratamiento con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad adelantó la edad de la apertura vaginal, la cual se presentó alrededor de los 22 días de edad y el primer estro vaginal 24 horas después. Los animales a los cuales se les extirpó el timo a los diez días de edad, presentaron la misma respuesta al tratamiento gonadotrópico.

Tanto en los ratones intactos como en los timectomizados, tratados con PMSG, no se observaron ovocitos en los oviductos al momento de la autopsia. Sin embargo, el análisis de los cortes histológicos de los ovarios mostró la presencia de cuerpos lúteos (Figura 7 A y B), evento que indica que ocurrió la ovulación. Tomando en consideración este parámetro, la respuesta ovulatoria (tasa de animales ovulantes y número de cuerpos lúteos) al estímulo gonadotrópico fue similar entre ambos grupos experimentales (Tabla 4).

El peso de los ovarios de las hembras Tx-10, en respuesta al tratamiento gonadotrópico fue menor en comparación con el de los animales intactos tratados de igual manera (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de animales ovulantes (TAO) evaluada por la presencia de ovocitos en los oviductos y por la presencia de cuerpos lúteos (CL) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos y del número de CL, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos y de timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10) tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad, sacrificados el primer día del primer estro vaginal.

Parámetros	Intactos+PMSG	Tx-10+PMSG
Nº de animales	14	11
TAO (ovocitos) <sup>1</sup>	0/14	0/11
TAO (CL) <sup>2</sup>	11/14	11/11
Nº de ovocitos	0	0
Nº de CL	6.7 $\pm$ 1.5	6.6 $\pm$ 1.0
Peso corporal (g)	17.5 $\pm$ 0.2	17.9 $\pm$ 0.3
Ovarios (mg)	24.1 $\pm$ 2.7	16.2 $\pm$ 1.0 *
Útero (mg)	70.7 $\pm$ 3.9	67.2 $\pm$ 2.7
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	9.7 $\pm$ 1.8 (4)	5.9 $\pm$ 1.6 (4)
Progesterona (ng/ml)	2.5 $\pm$ 1.1 (5)	4.6 $\pm$ 1.1 (4)
Testosterona (ng/ml)	0.23 $\pm$ 0.05 (7)	0.21 $\pm$ 0.05 (5)

Evaluada por la presencia de ovocitos en los oviductos a la autopsia

Evaluada por la presencia de cuerpos lúteos en los cortes histológicos de los ovarios

\*  $p < 0.05$  (prueba "t" de Student)

(4) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En los ratones timectomizados tratados con solución salina y PMSG, la tasa de animales ovulantes evaluada por la presencia de cuerpos lúteos (ya que no presentaron ovocitos en los oviductos), no se modificó en comparación con las hembras que sólo recibieron PMSG, lo mismo se observó en el resto de los parámetros evaluados (Tabla 5).

Tabla 5. Tasa de animales ovulantes (TAO) evaluada por la presencia de cuerpos lúteos (CL) y media  $\pm$  e.e.m. del número de CL, del peso corporal y de los órganos y de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones timectomizados a los diez días de edad (Tx-10) tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad, o con solución salina (SS) desde los 10 días de edad más PMSG a los 20 días, sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Tx-10+PMSG	Tx-10+SS+PMSG
Nº de animales	11	14
TAO (CL)	11/11	9/14
No. de CL	6.6 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 1.9
Peso corporal (g)	17.9 $\pm$ 0.3	17.5 $\pm$ 0.6
Ovarios (mg)	16.2 $\pm$ 1.0	16.1 $\pm$ 1.1
Útero (mg)	67.2 $\pm$ 2.7	75.2 $\pm$ 3.2
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	5.9 $\pm$ 1.6 (4)	7.9 $\pm$ 1.7 (4)
Progesterona (ng/ml)	4.6 $\pm$ 1.1 (4)	4.4 $\pm$ 2.1 (4)
Testosterona (ng/ml)	0.2 $\pm$ 0.05 (5)	0.19 $\pm$ 0.04 (6)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

Dado que seis de los 13 animales tratados con timulina más PMSG presentaron ovocitos en los oviductos al momento de la autopsia, los parámetros de las hembras de este grupo experimental se analizaron en función de la presencia de ovocitos o de cuerpos lúteos en los cortes de ovario (Tabla 6).

En los ratones Tx-10 que presentaron ovocitos en los oviductos, el peso corporal y de los ovarios, así como la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol fueron significativamente mayores que los observados en los animales cuya ovulación se evaluó por la presencia de cuerpos lúteos (Tabla 6).

Tabla 6. Tasa de animales ovulantes (TAO) evaluada por la presencia de cuerpos lúteos (CL) en los cortes de ovario o por ovocitos en los oviductos y media  $\pm$  e.e.m. del número de CL y de ovocitos; del peso corporal y de los órganos y de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones timectomizados a los diez días de edad (Tx-10) tratados con timulina desde los 10 días de edad más PMSG a los 20 días, sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Tx-10+Timulina+PMSG	
	Ovulantes por CL	Ovulantes por ovocitos
Nº de animales	7	6
TAO	7/7	6/6
No. de CL	6.0 $\pm$ 1.6	—
No. de ovocitos	0	21.8 $\pm$ 6.2
Peso corporal (g)	16.8 $\pm$ 0.9	21.2 $\pm$ 0.3 *
Ovarios (mg)	16.4 $\pm$ 0.9	21.9 $\pm$ 3.2 *
Útero (mg)	73.2 $\pm$ 6.5	79.8 $\pm$ 4.8
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	2.3 $\pm$ 0.9 (5)	26.8 $\pm$ 8.6 (3) *
Progesterona (ng/ml)	3.5 $\pm$ 1.0 (4)	3.4 $\pm$ 1.5 (4)
Testosterona (ng/ml)	0.23 $\pm$ 0.04 (2)	0.14 $\pm$ 0.01(3)

\* p < 0.05 (prueba "t" de Student)

( ) N° de animales en los que se cuantificó la hormona

El grupo de animales Tx-10 tratados con timulina+PMSG en los que se cuantificaron cuerpos lúteos, el número de éstos no se modificó en comparación con el de los ratones Tx-10 tratados con PMSG o con solución salina+PMSG (6.0  $\pm$  1.6 vs 6.6  $\pm$  1.0; 6.3  $\pm$  1.9 respectivamente, NS), mientras que la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol fue significativamente menor respecto a los animales Tx-10+solución salina+PMSG (2.3  $\pm$  0.9 vs 7.9  $\pm$  1.7 pg/ml, p < 0.05).

En comparación con las hembras intactas tratadas sólo con PMSG, la inyección de solución salina previa al tratamiento gonadotrópico, no modificó ninguno de los parámetros evaluados, incluyendo la tasa de animales ovulantes evaluada por el número de cuerpos lúteos (Tabla 7).

Los animales intactos tratados con timulina más PMSG no presentaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes, pero sí una disminución en el número de cuerpos lúteos y en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol, en comparación con las hembras que recibieron solución salina más PMSG (Tabla 7).

*Tabla 7. Tasa de animales ovulantes (TAO) evaluada por la presencia de cuerpos lúteos (CL) y media  $\pm$  e.e.m. del número de CL, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad, o con solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad más PMSG a los 20 días, sacrificados el día del primer estro vaginal.*

Parámetros	Intactos+PMSG	Intactos+SS +PMSG	Intactos+Timulina +PMSG
Nº de animales	14	11	15
TAO (CL)	11/14	11/11	15/15
Nº de CL	6.7 $\pm$ 1.5	8.8 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Peso corporal (g)	17.5 $\pm$ 0.2	17.6 $\pm$ 0.8	17.2 $\pm$ 0.3
Ovarios (mg)	24.1 $\pm$ 2.7	22.5 $\pm$ 2.3	20.9 $\pm$ 1.2
Útero (mg)	70.7 $\pm$ 3.9	81.8 $\pm$ 4.0	74.3 $\pm$ 3.3
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	9.7 $\pm$ 1.8 (4)	21.8 $\pm$ 9.7 (3)	5.8 $\pm$ 0.9 (10) <sup>b</sup>
Progesterona (ng/ml)	2.5 $\pm$ 1.1 (5)	2.3 $\pm$ 0.8 (4)	2.0 $\pm$ 0.7 (4)
Testosterona (ng/ml)	0.23 $\pm$ 0.05 (7)	0.26 $\pm$ 0.05 (5)	0.28 $\pm$ 0.04 (5)

<sup>a</sup>,  $p < 0.05$  vs Intacto+SS+PMSG (prueba Kruskal-Wallis)

<sup>b</sup>,  $p < 0.05$  vs Intacto+SS+PMSG (prueba ANDEVA seguida de Tukey)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

El análisis comparativo de los efectos de la timulina en los ratones Tx-10 y en los intactos, ambos tratados con PMSG mostró que estos últimos no presentaron ovocitos en los oviductos y tuvieron una disminución en el número de cuerpos lúteos (Figura 6).

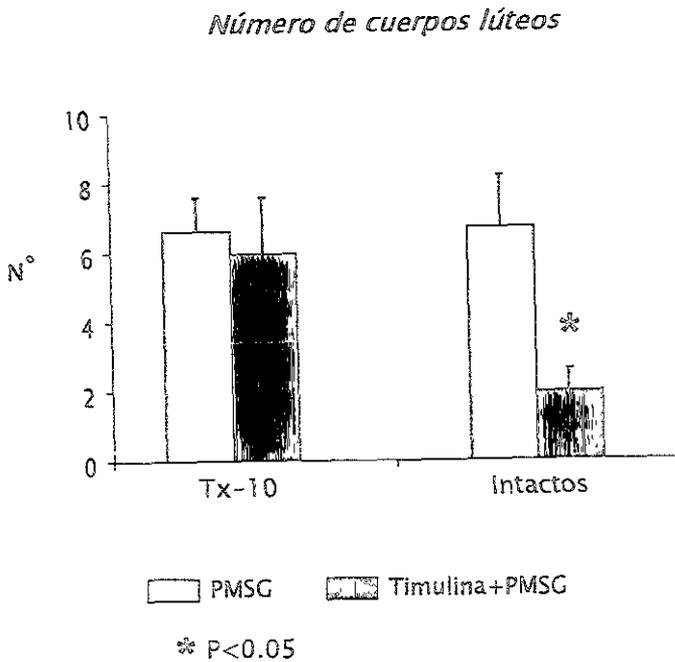


Figura 6. Media  $\pm$  e.e.m. del número de cuerpos lúteos cuantificados en los ovarios de ratones timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10) y de intactos tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad o con timulina desde los 10 días de edad más PMSG, sacrificados el día del primer estro vaginal.

En los cortes histológicos de los ovarios de todos los animales tratados con PMSG, tanto intactos como Tx-10, se observaron folículos grandes, sin antro y con el ovocito rodeado de células que presentaban las características histológicas de células luteales. A estos folículos se les consideró como folículos luteinizados (Figura 7 A y B).

El análisis histológico mostró que el número de folículos luteinizados fue significativamente menor en los animales Tx-10 que recibieron PMSG respecto a los intactos con el mismo tratamiento ( $6.5 \pm 1.5$  vs  $21.2 \pm 5.9$ ,  $p < 0.05$ ).

En los ratones Tx-10 tratados con PMSG la inyección de solución salina no modificó el número de folículos luteinizados, sin embargo en los que recibieron el tratamiento con timulina lo incrementó en comparación con este grupo (Tabla 8).

*Tabla 8. Tasa de animales que presentaron folículos luteinizados (TAFL) y media  $\pm$  e.e.m. del número de folículos luteinizados (FL) de ratones timectomizados a los diez días de edad (Tx-10) tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad o que recibieron solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad más PMSG a los 20 días, sacrificados el día del primer estro vaginal.*

Grupo	n	TAFL	No. de FL
Tx-10+PMSG	11	11/11	$6.5 \pm 1.5$
Tx-10+SS+PMSG	14	10/14	$3.5 \pm 0.9$
Tx+10+Timulina+PMSG	13	10/13	$8.8 \pm 1.6^*$

\*  $p < 0.05$  vs Tx-10+SS+PMSG (prueba Kruskal-Wallis)

En los ratones intactos la inyección de solución salina redujo considerablemente el número de folículos luteinizados, efecto que se agudizó por el tratamiento con timulina (Tabla 9).

Tabla 9. Tasa de animales que presentaron folículos luteinizados (TAFL) y media  $\pm$  e.e.m. del número de folículos luteinizados (FL) de ratones intactos tratados con 5 u.i. de PMSG a los 20 días de edad o que recibieron solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad más PMSG a los 20 días, sacrificados el día del primer estro vaginal.

Grupo	n	TAFL	No. de FL
Intactos+PMSG	14	14/14	21.2 $\pm$ 5.9
Intactos+SS+PMSG	11	9/11	10.1 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
Intactos+Timulina+PMSG	15	14/15	2.0 $\pm$ 0.7 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>,  $p < 0.05$  vs Intacto+PMSG (prueba Kruskal-Wallis)

<sup>b</sup>,  $p < 0.05$  vs Intacto+SS+PMSG (prueba Kruskal-Wallis)

3. Estudio de los efectos de la administración sistémica de timulina desde los diez días edad sobre la ovulación y la esteroidogénesis inducidas por el tratamiento con PMSG y hCG a los 25 días de edad en ratones timectomizados a los diez días de edad y en ratones intactos.

La administración secuencial de PMSG y hCG a los 25 días indujo la ovulación en todos los animales intactos y en la mayoría de los timectomizados (Tabla 10).

El número de ovocitos liberados por animal ovulante así como el peso del útero de los ratones Tx-10 tratados con PMSG+hCG fueron menores en comparación con los de los animales intactos tratados de igual forma. El resto de los parámetros evaluados entre ambos grupos experimentales no mostraron diferencias significativas (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos y de timectomizados a los diez días de edad (Tx-10) tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y 54 h después con 3 u.i. de hCG, sacrificados 20 horas después de la hCG.

Parámetros	Intactos+PMSG+hCG	Tx-10+PMSG+hCG
Nº de animales	9	8
TAO	9/9	7/8
Nº de ovocitos	11.9 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
Peso corporal (g)	23.6 $\pm$ 0.6	23.9 $\pm$ 0.4
Ovarios (mg)	12.6 $\pm$ 0.9	10.6 $\pm$ 0.8
Útero (mg)	101.7 $\pm$ 4.9	58.8 $\pm$ 6.4 <sup>b</sup>
17 $\beta$ -estradiol (pg/ml)	23.2 $\pm$ 14.6 (2)	7.0 $\pm$ 1.8 (5)
Progesterona (ng/ml)	9.4 $\pm$ 0.9 (5)	8.3 $\pm$ 1.1 (5)
Testosterona (ng/ml)	0.23 $\pm$ 0.05 (3)	0.15 $\pm$ 0.04 (7)

<sup>a</sup>, p < 0.05 (prueba "U" de Mann-Whitney)

<sup>b</sup>, p < 0.05 (prueba "t" de Student)

( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En los ratones timentomizados tratados con PMSG+hCG a los 25 días la inyección diaria de solución salina sólo provocó una disminución en la concentración sérica de progesterona (Tabla 11).

El reemplazo con timulina en los ratones Tx-10 tratados con ambas gonadotropinas indujo un incremento en el número de ovocitos liberados y en el peso del útero en comparación con los animales que se les inyectó diariamente solución salina más PMSG+hCG o únicamente las gonadotropinas. El efecto observado en la concentración de progesterona por la inyección de solución salina no se modificó con la administración de timulina (Tabla 11).

Tabla 11. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones timentomizados a los diez días de edad (Tx-10) tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y 54 h después con 3 u.i. de hCG, o con solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad y PMSG+hCG a los 25 días, sacrificados 20 después de la hCG.

Parámetros	Tx-10	Tx-10+SS	Tx-10+Timulina
	+PMSG+hCG	+PMSG+hCG	+PMSG+hCG
Nº de animales	8	9	10
TAO	7/8	8/9	10/10
Nº de ovocitos	6.9 $\pm$ 1.5	7.6 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 0.6 a, b
Peso corporal (g)	23.9 $\pm$ 0.4	22.7 $\pm$ 0.9	23.4 $\pm$ 0.7
Ovarios (mg)	10.6 $\pm$ 0.8	12.5 $\pm$ 0.9	13.0 $\pm$ 1.0
Útero (mg)	58.8 $\pm$ 6.4	50.0 $\pm$ 2.9	84.9 $\pm$ 4.6 c, d
$\beta$ -estradiol (pg/ml)	7.0 $\pm$ 1.8 (5)	7.6 $\pm$ 3.3 (2)	14.0 $\pm$ 2.7 (6)
Progesterona (ng/ml)	8.3 $\pm$ 1.1 (5)	3.3 $\pm$ 0.6 (4) c	3.3 $\pm$ 0.3 (6) c
Testosterona (ng/ml)	0.15 $\pm$ 0.04 (7)	0.24 $\pm$ 0.04 (8)	0.12 $\pm$ 0.04 (5)

a)  $p < 0.05$  vs Tx-10+PMSG+hCG (Kruskal-Wallis)

b)  $p < 0.05$  vs Tx-10+SS+PMSG+hCG (Kruskal-Wallis)

c)  $p < 0.05$  vs Tx-10+PMSG+hCG (ANDEVA seguida de Tukey)

d)  $p < 0.05$  vs Tx-10+SS+PMSG+hCG (ANDEVA seguida de Tukey)

) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En los ratones intactos tratados con PMSG+hCG la inyección de solución salina no modificó ninguno de los parámetros evaluados. La administración de timulina en estos animales indujo una disminución en la concentración sérica de progesterona, en comparación sólo con el grupo de ratones intactos tratados con ambas gonadotropinas (Tabla 12).

Tabla 12. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos, de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona de ratones intactos tratados con 1 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y 54 h después con 3 u.i. de hCG, o con solución salina (SS) o timulina desde los 10 días de edad y PMSG+hCG a la misma edad, sacrificados 20 horas después de la hCG.

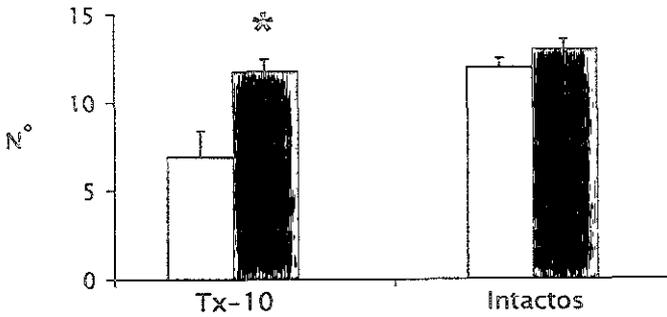
Parámetros	Intactos +PMSG+hCG	Intactos+SS +PMSG+hCG	Intactos+Timulina +PMSG +hCG
Nº de animales	9	8	10
TAO	9/9	8/8	10/10
Nº de ovocitos	11.9 $\pm$ 0.5	13.8 $\pm$ 1.3	13.0 $\pm$ 0.5
Peso corporal (g)	23.6 $\pm$ 0.6	23.9 $\pm$ 1.0	23.5 $\pm$ 0.8
Ovarios (mg)	12.6 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 1.1	13.7 $\pm$ 1.3
Útero (mg)	101.7 $\pm$ 4.9	95.4 $\pm$ 11.7	96.8 $\pm$ 9.6
$17\beta$ -estradiol (pg/ml)	23.2 $\pm$ 14.6 (2)	21.2 $\pm$ 7.2 (5)	8.4 $\pm$ 2.0 (7)
Progesterona (ng/ml)	9.4 $\pm$ 0.9 (5)	7.9 $\pm$ 0.3 (2)	6.1 $\pm$ 0.7 (6) *
Testosterona (ng/ml)	0.23 $\pm$ 0.05 (3)	0.13 $\pm$ 0.05 (6)	0.14 $\pm$ 0.02 (6)

\*p < 0.05 vs Intactos+PMSG+hCG (ANDEVA seguida de Tukey)

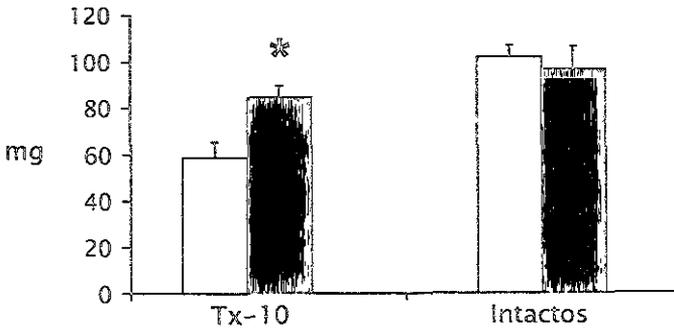
( ) Nº de animales en los que se cuantificó la hormona

En la figura 8 se muestra que el reemplazo con timulina en los animales ovariectomizados tratados con PMSG+hCG indujo un incremento en el número de ovocitos liberados y en el peso del útero, mientras que en los ratones intactos+PMSG+hCG la administración de timulina no provocó ningún cambio significativo en estos parámetros.

## Número de ovocitos



## Peso del útero



□ PMSG      ▨ Timulina+PMSG+hCG

\*  $P < 0.05$

Figura 8. Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados y del peso del útero de ratones timectomizados a los 10 días de edad (Tx-10) y de intactos tratados con 3 u.i. de PMSG a los 25 días de edad y 54 h después con 3 u.i. de hCG, o con timulina desde los 10 días de edad y PMSG+hCG, sacrificados 20 h después de administrar hCG.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que en el ratón, las alteraciones inducidas por la timectomía realizada a los diez días de edad (pubertad retrasada, disminución en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol y menor respuesta ovulatoria al tratamiento con PMSG+hCG) son restauradas por el tratamiento con timulina, lo que nos permite sugerir que esta hormona tímica participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad, la esteroidogénesis y la ovulación.

El hecho que en el ratón intacto prepúber, la administración sistémica diaria de timulina haya disminuido la respuesta ovulatoria (evaluada por el número de cuerpos lúteos) al tratamiento con PMSG, permite plantear que los efectos de la timulina en la regulación de las funciones del ovario, probablemente dependen de su interacción con la timulina endógena, así como con las otras timosinas sintetizadas por el timo.

Previamente se había propuesto que el retardo en la edad de la apertura vaginal espontánea que presenta el ratón timectomizado a los diez días de edad podría estar relacionado con modificaciones en la secreción de estrógenos (García, 1996). Los resultados del presente trabajo confirman esta interpretación ya que en los animales Tx-10 la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol, al primer estro vaginal, mostró un decremento del 66%, respecto a las hembras intactas. Esta disminución podría explicar el retraso en la canalización espontánea de la vagina al ser éste un evento dependiente de los estrógenos (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

La baja concentración de estradiol que se observó al timectomizar a los diez días de edad podría deberse en parte a una deficiencia gonadotrópica inducida por la ausencia de timosinas. Existen evidencias que muestran que la timulina estimula la secreción de LH en la hipófisis en cultivo (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997), resultados similares tanto *in vitro* como *in vivo* se han descrito para la timosina  $\beta 4$  (Rebar y col., 1981a; Hall y col., 1982), aunque no podemos descartar una alteración a nivel del ovario ya que también se ha mostrado que la timulina actúa directamente en la gónada incrementando la actividad aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990); por lo que es probable que la ausencia de estos estímulos tímicos desde la etapa infantil resultó en una disminución de la esteroidogénesis. Estas evidencias apoyan la idea de que el timo puede estar regulando la actividad esteroidogénica del ovario por dos vías, a nivel hipotálamo-hipofisario sobre la liberación de gonadotropinas y directamente en el ovario sobre la actividad aromatasa.

La participación del timo en las funciones del ovario se ha mostrado en modelos biológicos como el ratón congénitamente atímico nu/nu, el cual se caracteriza por presentar apertura vaginal retrasada y disminución en las concentraciones séricas de estrógenos a la pubertad (Rebar y col., 1981b), estos resultados son similares a los obtenidos en los ratones Tx-10 del presente estudio (no obstante que la medición de  $17\beta$ -estradiol se haya obtenido en un tamaño de muestra reducido) sin embargo éstos a diferencia de los nu/nu poseen su timo durante los primeros diez días de vida; lo anterior nos permite sugerir que la relación funcional entre el timo y el ovario se mantiene aún después de la etapa neonatal.

El retardo en el inicio de la pubertad y el decremento en la concentración de  $17\beta$ -estradiol que presentan los ratones Tx-10 posiblemente también están vinculados con la participación del timo en la regulación de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Al respecto se ha descrito que la ausencia de timo desde los tres días de vida posnatal disminuye la concentración plasmática de estradiol e incrementa la de timosina  $\alpha 1$  de origen extratímico (Michael y col., 1981). La administración de esta timosina en primates prepúberes es capaz de incrementar la secreción de ACTH (Healy y col., 1983). Resultados similares se han observado al adicionarla *in vitro* a hipófisis de rata (Milenkovic y McCann, 1992). Estas evidencias indican que la falta de timo provoca hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Con lo anterior es posible especular que el ratón Tx-10 presenta condiciones semejantes a las de un animal sometido a estrés constante, lo que explicaría el retardo en la edad de la apertura vaginal y las bajas concentraciones de estradiol, como resultado del efecto inhibitorio que ejerce el estrés sobre la secreción de las gonadotropinas (Welsh y Johnson, 1981; Padmanabhan y col., 1983; Li, 1987; Ferin, 1993).

Los ratones timectomizados a los diez días de edad fueron más susceptibles al estrés que representa la inyección diaria de solución salina en comparación con los ratones intactos. Esta diferencia puede estar relacionada con las características que presentan los ratones Tx-10 similares a las de un animal sometido a estrés constante como se planteó anteriormente. Se ha descrito en ratones tratados de manera crónica con corticosterona que su respuesta a un estresor, provoca inicialmente un incremento mayor en la concentración plasmática de glucocorticoides para después inmediatamente (Jones y col., 1972). Por lo tanto es

Es posible sugerir que la inyección diaria en el ratón Tx-10 pudo haber disminuido la concentración de glucocorticoides dando como consecuencia la reactivación del mecanismo de secreción de las gonadotropinas. Esto podría explicar en parte el adelanto en la edad de la apertura vaginal.

En los ratones Tx-10 el reemplazo con timulina revirtió los efectos de la inyección de solución salina sobre el inicio de la pubertad y además provocó la disminución en el peso de los ovarios y del útero. Resultados semejantes se han descrito en ratas y ratones tratados con ACTH (Christian, 1964; Pasley y Christian, 1972; Macfarland y Mann, 1977), por lo que es posible sugerir que nuestros resultados están vinculados con el efecto estimulante de la timulina sobre la secreción de ACTH en hipófisis, de manera similar a como se ha mostrado en cultivo (Hadley y col., 1997).

No obstante los cambios observados en el peso de los ovarios y el útero, la inyección de timulina en los ratones Tx-10 provocó que la concentración sérica de estradiol se incrementara a valores similares a los del ratón intacto. Al respecto se ha descrito que la adición de timulina al cultivo de células de la granulosa de cerda estimula la actividad del complejo enzimático aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). Lo anterior nos permite sugerir que ésta puede ser la vía por la cual en los animales Tx-10 el reemplazo con timulina incrementó la concentración de estradiol. El incremento en la concentración de estradiol que se observó en los animales intactos tratados con timulina apoya esta interpretación.

Los ratones intactos así como los Tx-10 (cepa CD1) se caracterizan por no ovular de manera espontánea al primer estro vaginal (Rosas y col., 1987; Rosas, 1990, García, 1996; Rosas y col., 1996; Hinojosa, 1998; Cerda, 1998; Hinojosa y col., 1999). La administración de timulina en ambos modelos experimentales no modificó esta característica lo que sugiere que la timulina no promueve la cascada de eventos neuroendócrinos que culminan con la primera ovulación y que en los ratones Tx-10 sólo colaboró en compensar su deficiencia estrogénica.

Un hecho que señala la madurez del eje hipotálamo-hipofisario a los 20 días de edad es que tanto las hembras timectomizadas como las intactas ovulan ante el estímulo con PMSG (evaluado por la presencia de cuerpos lúteos), siendo la respuesta ovulatoria similar entre ambos modelos.

Dado que solamente en la mitad de los ratones Tx-10 tratados con timulina más PMSG se observaron ovocitos en los oviductos, el análisis de los resultados se realizó en función de la presencia de ovocitos en los oviductos o de cuerpos lúteos en los ovarios. Dicho análisis mostró un incremento en la cuota ovulatoria evaluada como ovocitos en los oviductos, lo cual nos indica que la timulina incrementa el efecto estimulante de la PMSG sobre la ovulación. Este hecho posiblemente está relacionado con un aumento en la receptividad folicular a las gonadotropinas como reflejo del efecto estimulante de la timulina sobre la esteroidogénesis (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990) provocando un aumento de estradiol que indujo la liberación preovulatoria de LH y probablemente también un adelanto de la misma. No podemos descartar que la timulina al actuar a nivel de hipotálamo-hipofisis esté favoreciendo los mecanismos neuroendócrinos que culminan en la ovulación. El mayor peso de los

ovarios y la mayor concentración sérica de estradiol que se observó en los ratones TX-10 tratados con timulina y PMSG que presentaron ovocitos en comparación con los animales con cuerpos lúteos apoyan estas ideas.

Los ratones timectomizados tratados con PMSG+hCG, presentaron una disminución en la cuota ovulatoria respecto a los ratones intactos, lo cual puede deberse a un decremento tanto en el número de folículos en crecimiento y en los preovulatorios así como en la receptividad de los mismos a las gonadotropinas. El hecho que en este modelo el reemplazo con timulina desde los diez días de edad haya restaurado el número de ovocitos liberados a valores similares a los del ratón intacto tratado de igual forma, permite sugerir que la timulina participa en el crecimiento y maduración folicular.

En los ratones intactos, la timulina muestra un efecto inhibitorio sobre la acción estimulante de la PMSG, ya que disminuye el número de cuerpos lúteos. Estos resultados podrían explicarse por la acción que se describió que tiene la timulina sobre la secreción de ACTH (Hadley y col., 1997), lo que se traduciría en un decremento en la liberación de gonadotropinas (Welsh y Johnson, 1981; Li, 1987).

En los ratones intactos el tratamiento con PMSG+hCG indujo la ovulación, esta respuesta no se modificó por la administración de timulina, sin embargo provocó una disminución en la concentración sérica de progesterona. Se ha descrito que la timulina inhibe la secreción de prolactina (Hadley y col., 1997); mientras que Davis y col. (1980) observaron que la hipoprolactinemia en ratas prepúberes disminuye la secreción de progesterona por el ovario inducida por hCG, lo cual

resulta en la disminución del sustrato para la síntesis de  $17\beta$ -estradiol; un mecanismo similar pudo ocurrir en los ratones intactos tratados con rimulina y ambas gonadotropinas.

Se ha descrito en vacas que la PMSG rescata a los folículos de la atresia e incrementa el número de folículos en crecimiento, sin embargo éstos se luteinizan sin liberar al ovocito, después de que ocurre el incremento preovulatorio de LH (Moniaux y col., 1984). El ratón prepúber tratado con dosis altas de PMSG (8 u.i.) presenta una alta frecuencia de folículos luteinizados al primer estro vaginal, sin embargo si se administra hCG 54 horas después de la PMSG se induce la liberación de los ovocitos antes de que los folículos se luteinicen (Cerde, 1998), lo cual indica que la formación de los folículos luteinizados posiblemente está vinculado con un retraso en la secreción preovulatoria de la LH. Un efecto similar pudo ocurrir en los animales intactos tratados con 5 u.i. de PMSG en los cuales se observó una gran incidencia de folículos luteinizados.

En los ratones intactos tratados con PMSG, el estrés provocado por la inyección diaria de solución salina provocó una disminución del 50% en el número de folículos luteinizados, sin cambios en la cuota ovulatoria. Estos resultados pueden estar vinculados con una disminución en el crecimiento folicular provocada por el efecto inhibitorio del estrés sobre la secreción de las gonadotropinas (Ferín, 1993).

Los ratones Tx-10 tratados con PMSG, también presentaron folículos luteinizados pero en una proporción considerablemente menor a la observada en los animales intactos estimulados de igual forma, lo cual podría deberse a una

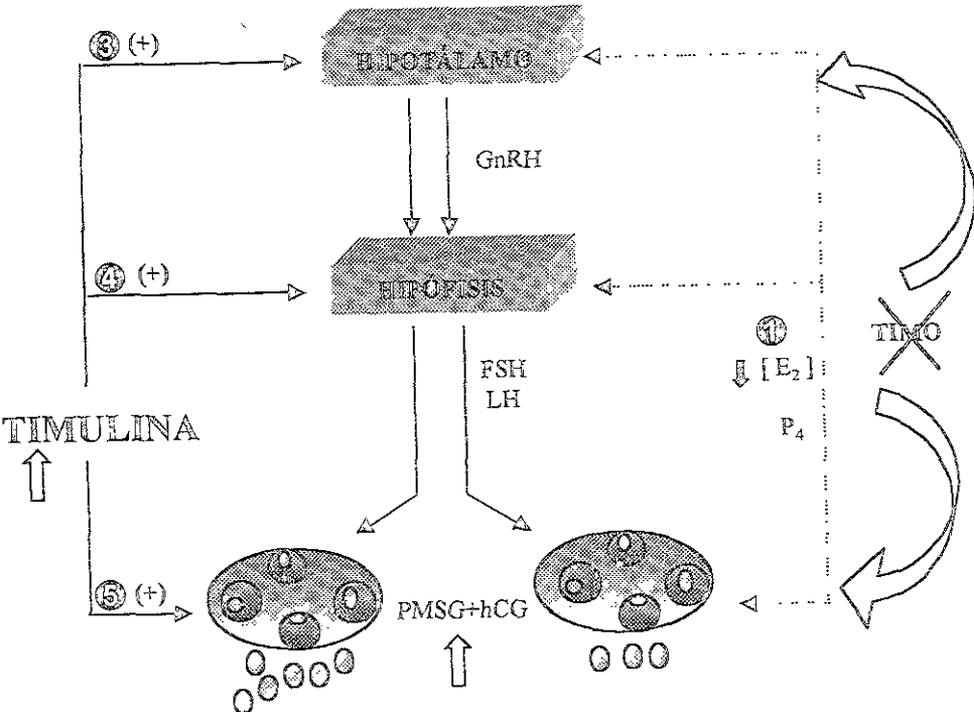
disminución en el crecimiento folicular o bien a un decremento en la receptividad de los folículos en crecimiento al estímulo gonadotrópico. El menor aumento de la masa ovárica que alcanzan estos ratones al estímulo con PMSG podría ser el reflejo de dicho efecto.

En resumen los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que la timulina es una de las señales de comunicación entre el timo y el ovario y es uno de los péptidos tímicos que participan de manera estimulante en las funciones del ovario (la esteroidogénesis y la ovulación) y modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas. Sin embargo en los animales intactos en los cuales el timo sintetiza su propia timulina, la administración adicional de esta hormona muestra un efecto inhibitorio sobre la ovulación (número de cuerpos lúteos) lo cual indica que su participación en la regulación de las funciones del ovario, probablemente dependen de su interacción con la timulina endógena, así como con las otras timosinas sintetizadas por el timo.

En la figura 9, se muestra el modelo hipotético de los efectos del reemplazo con timulina desde los diez días de edad, en los ratones Tx-10.

Figura 9. Modelo que explica la acción de la timulina administrada desde los diez días de edad sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, en el ratón timectomizado a los diez días de edad (Tx-10). La ausencia de timo desde los diez días de edad provoca disminución en la secreción de  $17\beta$ -estradiol ① y menor respuesta ovulatoria al tratamiento con PMSG+hCG ②. En el ratón Tx-10, la administración de timulina estimula la secreción de GnRH en el hipotálamo ③, en la hipófisis incrementa la sensibilidad de los gonadotropos a la GnRH induciendo la secreción de LH ④ y en el ovario estimula el crecimiento folicular y la secreción de estrógenos ⑤ dando como resultado el restablecimiento en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol al primer estro vaginal y la respuesta ovulatoria inducida ⑥.

ACCIÓN DE LA TIMULINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO



Normaliza pubertad

Pubertad retrasada

- ⑥ ↑ 17β-estradiol
- ↑ cuota ovulatoria

- ② ↓ cuota ovulatoria

- ↶ Regulación hormonal tímica
- ↑ Restablecimiento de la respuesta hormonal
- △ Disminución de la respuesta hormonal
- ↑ Administración subcutánea

## CONCLUSIONES

- La timulina estimula la esteroidogénesis en el ovario de los ratones Tx-10 ya que la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol se incrementa a valores normales por el reemplazo hormonal inmediato a la timectomía.
- La timulina no induce la ovulación de manera espontánea este o no presente el tino.
- La timulina estimula el desarrollo folicular y favorece el efecto estimulante de las gonadotropinas sobre la ovulación ya que el reemplazo con timulina en los ratones Tx-10 tratados con PMSG ó PMSG-hCG incrementa la cuota ovulatoria.

## PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este estudio surgieron las interrogantes que se plantean a continuación.

- El incremento en la secreción de  $17\beta$ -estradiol observada en los ratones Tx-10 tratados con timulina desde los diez días de edad, ¿es el resultado de un incremento en la actividad aromatasasa en el ovario o de su acción a nivel hipotálamo-hipofisario sobre la secreción de las gonadotropinas? ¿Este efecto se acompaña de modificaciones en la dinámica del crecimiento folicular?
- El efecto estimulante de la timulina sobre la ovulación ¿se debe a su acción sobre la secreción de GnRH en el hipotálamo o directamente en la hipófisis sobre la secreción de las gonadotropinas?

## BIBLIOGRAFÍA

- ADVIS JP, RICHARD JS y OJEDA SR (1981). Hyperprolactinemia-induced precocious puberty: studies on the mechanism(s) by which prolactin enhance ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats. *Endocrinology* 103, 1333-1343.
- AGUILERA G y ROMANO M (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells in vitro. *J. Endocrinology* 123, 1124-1129.
- AUDESIRK T y AUDESIRK G (1996). Biology life on earth. 4ª edición. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey USA. 772 p.
- BACH JF y DARDENNE M (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: Thymic hormones and Lymphokines. Plenum Press, New York, 593-600.
- BADAMCHIAN M, SPANGELO BL, DAMAVANDY T, MACLEOD y GOLDSTEIN AL (1991). Complete amino acid sequence analysis of a peptide isolated from the thymus that enhances release of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 128, 1580-1588.
- BECÚ-VILLALOBOS D y LACAU-MENGIDO IM (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Act. Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40, 1-17
- BELLANTI JA (1986). Inmunología. 3a ed. Edit Interamericana. México. 662 pp.
- BESEDOVSKY HO y SORKIN E (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 249, 356-358.
- BRADEN TD, BELIFIORE CJ y NISWENDER GD (1994). Hormonal control of luteal function. En: Molecular biology of the female reproductive system. Edited by Findlay JK. Academic Press, Inc., New york, 259-287 pp.

- CALZOLARI A (1898). Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch. Ital. Biol. Torino* 30, 71-77.
- CARTER J (1976). The effect of progesterone, oestradiol and hCG on cell-mediated immunity in pregnant mice. *J. Reproduction Fert.* 46, 211-216.
- CERDA MA (1998). Estudio de los efectos de la administración sistémica de la timulina en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón en la pubertad y en la ovulación. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 60 pp.
- CHAMBERS SP y CLARKE AG (1979). Measurement of thymus weigh, lumbar node weigh and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J. Reprod. Fert.* 55, 309-315.
- CHESNOKOVA VM, IVANOVA IN y GRUNTENKO EV (1983). Effects of the thymus on endocrine functions of the gonads and adrenals in mice. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 96, 89-91.
- CHRISTIAN JJ (1964). Actions of ACTH in intact and corticoid-maintained adrenalectomized female albino mice with emphasis on the reproductive tract. *Endocrinology* 75, 653-669.
- COPENHAVER WM, KELL Y DG y WOOD RL (1985). Tratado de Histología. 17a edición. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. 779 pp.
- DABROWSKI MP y DRABROSWKA-BERNSTEIN BK (1990). Immunoregulatory Role of Thymus. Eds. CRC Press, Inc. Florida. 225 pp.
- DALAKAS MC, HUBBARD R, CUNNINGHAM G, TRAPP B, SEVER JL y GOLDSTEIN AL (1984). Thymosin  $\beta_4$  is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: Thymic hormones and lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications Goldstein AL De., Plenum Press, New York, 119-125.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

- DARDENNE M (1984). Evaluation of blood levels of thymic hormones in health and disease. En: Thymic factor therapy. NA Byrom y JR Hobbs JR, Eds. Academic Press, New York, 43-51 pp.
- DARDENNE M y BACH JF (1981). Thymic hormones. En: The thymus glands. MD Kendall, Ed. Academic Press, New York, 113-131 pp.
- DARDENNE M, SAVINO W, DUVAL D, KAISERLIAN D, HASSID J y BACH JF (1986). Thymic hormones-containing cells. VII Adrenal and gonads control the in vivo secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J. Immunol.* 136, 1303-1308.
- De MELLO-COELHO V, SAVINO W, POSTEL-VINAY MC y DARDENNE M (1998). Role of prolactin an growth hormone on thymus physiology. *Dev. Immunol.* 6, 317-323.
- DOMÍNGUEZ R (1997). Endocrinología de las gónadas. En: Actualización en fisiología. Curso Internacional precongreso. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 271-280.
- DOMÍNGUEZ R, CHÁVEZ R y CRUZ ME (1991). La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: Tópicos selectos en Biología de la Reproducción. Editor: Roberto Domínguez. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 396 pp.
- EATON GJ, OUTZEN HC, CUSTER RP y JOHNSON FN (1975). Husbrandry of the "nude" mouse in conventional and germfree environments. *Lab. An. Sci.* 25, 309-314
- ERICKSON GF, NAKATANI A, LIU XJ, SHIMASAKI S y LING N (1994). Role of Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins in folliculogenesis. En: Molecular biology of the female reproductive system. Edited by Findlay JK. Academic Press, Inc., New york, 101-125.

- ESPEY LL y LIPNER H (1994). Ovulation. En: The physiology of reproduction. Edited by Knobil E. y Neill JD Raven Press, Ltd, New York, 725-780 pp.
- FERIN M (1993). Neuropeptides, the stress response, and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the female rhesus monkey. En: Corticotropin-releasing factor and cytokines: role in the stress response. Edited by Taché Y y Rivier C. Annals of the New York Academic of Sciences, vol 697, 106-116.
- FINK, G (1986). The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog. Oxf.* 70, 403-423.
- FLANAGAN SP (1966). "Nude" , a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* 8, 295-309.
- FRANCHIMONT PM, HAZEE-HAGELSTEIN TC, CHARLEST-RENAR J, JASPAR M y HENNEN G (1991). Some basic mechanisms of ovulation. En: The study of ovulation. Boutaleb, Y. y Gzouli, A.. Eds. Parthenon Publishing Group, New Jersey , 3-8.
- FREEMAN M (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: The physiology of reproduction. Edited by Knobil E. y Neill JD Raven Press, Ltd, New York, 613-658 pp.
- GARCÍA L (1996). Estudio de los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre el proceso de pubertad y la ovulación. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 60 pp.
- GARCIA L y ROSAS P (1998). Alteraciones en el proceso de pubertad, la ovulación y el crecimiento folicular provocadas por la timectomía en la etapa infantil en el ratón. XXIII Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR), 148- 157.

- GOFF BL, ROTH JA, ARP LH y INCEPY GS (1987). Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin. Exp. Immunol.* 68, 580-587.
- GOLDSTEIN AL (1984). Thymic hormones and Lymphokines. Plenum Press, New York, 669.
- GOLDSTEIN AL, LOW T, THURMAN G, ZATZ M, HALL N, CHEN J, HU SK, NAYLOR P y McCLURE J (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent. Prog. Horm. Res.* 37, 369-415.
- GORE-LANGTON RE y ARMSTRONG DT (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. Edited by Knobil E. y Neill JD Raven Press, Ltd, New york, 571-627 pp.
- GREENWALD GS y ROY SK (1994). Follicular development and its control. En: *The physiology of reproduction*. Eds. Knobil, E. y Neill JD Raven Press, Ltd, New york, 629-721.
- GROSSMAN CJ (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* 5, 435-455.
- GROSSMAN CJ (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227, 257-261.
- HADLEY AJ, RANTLE CM y BUCKINGHAM JC (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 4, 62-69.
- HAGE AJ, GROEN-KLEVANT AC y WELSCHEN R (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta endocr.* 88, 375-382.
- HALL NR y GOLDSTEIN AL (1987). Thymosin modulation of the immune system. En: *The Neuro-Immune-Endocrine Connection*. Edited by Cotman, C.W.,

Brinton, R.E., Galaburda, A., McEwen, B. y Schneider, D.M.. Raven Press, New York, 59-69.

HALL NR, MCGILLIS JP, SPANGELO B, PALAZYNNSKI E, MOODY T y GOLDSTEIN AL (1982). Evidence for neuroendocrine-thymus axis mediated by thymosin polypeptides. En: *Current Concepts in Human Immunology and Cancer Immunomodulation*. Edited by Serrou B. Elsevier Press, New York, 563.

HALL NRS, O'GRADY MP y MENZIES RA (1992). Thymic regulation of the Hypothalamic-Pituitary-gonadal axis. *Int. J. Immunopharmac* 14, 353-359.

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

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

HEALY DL, HODGEN GD, SCHULTE HM, CHROUSOS GP, LORIAUX DL, HALL NR y GOLDSTEIN AL (1983). The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* 222, 1353-1355.

HILLIER SG (1994). Hormonal control of folliculogenesis and luteinization function. En: *Molecular biology of the female reproductive system*. Edited by Findlay JK. Academic Press, Inc., New York, 1-37 pp.

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 hipofímico. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 79 pp.

- HINOJOSA L y ROSAS P (1994). Estudio de la respuesta del ratón hembra hipotímico al injerto de timo sobre la regulación de la pubertad espontánea. XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, O145.
- HINOJOSA L y ROSAS P (1996). Effects of the serum thymic factor (FTS) on the gonadotropin-induced ovulation in normal and hypothyroid mice. *Biol. Reprod.* 54 Suppl. 1, Abs 115.
- HINOJOSA L y ROSAS P (1997). Evidencias de la participación de la timulina en el proceso de pubertad. Ratones eutímicos e hipotímicos como modelos de estudio. XXII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, 36-46.
- HINOJOSA L, CHAVIRA R, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (1999). Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J. Endocrinology* 163, 000-000.
- HIRIART M y ROMANO MC (1986). Human chorionic gonadotropin binding to rat testis receptors is inhibited by a thymus factor. *Life Sci.* 38, 789-795.
- HORECKER BL (1984). Thymosin. Distribution and Biosynthesis in vertebrate cell and tissues. En: *Thymic hormones and lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications* Goldstein AL De., Plenum Press, New York, 77-88.
- HSUEH AJW, BILLING H y TSAFRIRI A (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonal controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* 15, 707-724.
- ISHIDATE M y METCALFD (1963). The pattern of lymphopoiesis in the mouse thymus after cortisone administration or adrenalectomy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 41, 637-649.
- JAMBON B, MONTAGNE P, BENE MC, BRAVER MP, FAURE G y DUHEILLE J (1981). Immunohistologic localization of "facteur thymique serique" (FTS) in human thymic epithelium. *J. Immunol.* 127, 2055-2059.

- ONES MT, BRUSH FR y NEAME RLB (1972). Characteristics of fast feedback control of corticotrophin release by corticosteroids. *J. Endocrinology* **55**, 489-497.
- OSIEWICZ MM y MICHAEL SD (1990). Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J. Reprod. Fert.* **88**, 427-440
- DWITZ-RIGBY FL y SCHEID PG (1990). Thymulin (Serum Thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins in vitro. VIII Ovarian Workshop, July 12-14, Maryville, Tennessee. 473-478.
- ESON CR y LEESON TS (1992) Histología. 4ª edición. Interamericana, México. 602 pp.
- PS (1987). Effect of cortisol or adrenocorticotropic hormone on luteinizing hormone secretion by pig pituitary cells in vitro. *Life Science* **41**, 2493-2501.
- NDNER MD (1990). Anatomía clínica. El Manual Moderno S.A de C.V. México. 706 pp.
- ENTER-MOORE S (1977). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.* **17**, 155-161.
- ENTER-MOORE S, MOORE GPM y PANTELOURIS EM (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic "nude" mice. *Exptl. Cell Res.* **97**, 430-432.
- DW T y GOLDSTEIN AL (1984). Thymosins: Structure, function and therapeutic applications. *Thymus* **6**, 27-42.

- MACFARLAND IA y MANN DR (1977). The inhibition effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats. *Biol. Reprod.* 16, 306-314.
- MENDOZA ME y ROMANO M (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus*, 14, 233-242.
- MICHAEL SD (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Edited by Greenwald, G.S y Terrenova, P.F. Raven Press, New York, 445-464 pp.
- MICHAEL SD, DE ANGELO L y KAIKIS-ASTARAS A (1990). Plasma protein and hormone profiles associated with autoimmune oophoritis and ovarian tumorigenesis in neonatally thymectomized mice. *Autoimmunity* 6, 1-12.
- MICHAEL SD, TAGUCHI O y NISHIZUKA Y (1980). Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.* 22, 343-350.
- MICHAEL SD, TAGUCHI O, NISHIZUKA Y, McCLURE JE, GOLDSTEIN AL y BARKLEY MS (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin alfa I. En: *Dynamics of Ovarian Function*. Edited by Schwartz, N.B y Hunzicker-Dunn, M. Raven Press, New York, 279-284 pp.
- MILENKOVIC L y McCANN SM (1992). Effects of thymosin alpha-1 on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology* 55, 14-19.
- MIREILLE D y SAVINO W (1994). Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol. Today* 15, 518-523.

- MOCHEGIANI E, SARTORIO A, SANTARELLI L, FERRERO S y FABRIS N (1996). Thymulin, zinc and insuline-like growth factor-I (IGF-I) activity before and during recombinant growth hormone (rec-GH) therapy in children and adults with GH deficiency. *J. Endocrinol. Invest.* 19, 630-637.
- MONIAUX D, MARIANA J y GIBSON W (1980). Action of PMSG on follicular population in the heifer. *J. Reproduc. Fertil.* 70, 243-253.
- MONIER JC, DARDENNE M, PLEAU JM, SCHMITT D, DESCHAUX P y BACH, JF (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.
- NISHIZUKA Y y SAKAKURA T (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166, 753-755.
- NISHIZUKA Y y SAKAKURA T (1971). Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* 89, 886-893.
- NISHIZUKA Y, SAKAKURA T, TSUJIMURA T y MATSUMOTO K (1973). Steroid biosynthesis in vitro by dysgenetic ovarie induced by neonatal thymectomy in mice. *Endocrinology* 93, 786-792.
- NISWENDER GD y NETT TM (1994). Corpus Luteum and Its control in infrapimate species. En: *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E. y Neill JD Raven Press, Ltd, New york, 781-816.
- OJEDA SR y URBANSKI HF (1988). Puberty in the rat En: *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil, E. y Neill, JD. New York, 1699-1737.
- OJEDA SR y URBANSKI HF (1994). Puberty in the rat En: *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil, E. y Neill, JD. New York, 363-409.

- OJEDA SR, URBANSKI HF y AHMED CE (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Recent Progress in hormone Research* 42, 382-442.
- PADMANABHAN V, KEECH C Y CONVEY EM (1983). Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 112, 1782-1787.
- PASLEY JN y CHRISTIAN JJ (1972). The effects of ACTH, group caging, and adrenalectomy in *Peromyscus leucopus* with emphasis on suppression of reproductive function. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 139, 921-925.
- PAULSEN DF (1991). Histología básica. El Manual Moderno. México, D.F. 265-269.
- PEDERNERA E (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: Comunicación neuroendócrina. Bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 33-46.
- PEDERNERA E, DIAZ-OSUNA J y CALCAGNO M (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sciences* 38, 779-787.
- PETERS H (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Act. endocrinologica* 62, 98-116.
- PETERS H (1978). Folliculogenesis in mammal. En: The vertebrate ovary. Comparative Biology. Edited by Jones, R.E. New York. Plenum Press, 121-145.
- PETERS H (1979). Some aspects of early follicular development. En: Ovarian Follicular Development and Function. Edited by Midgley A.R. y Sadler W.A. New York. Raven Press, 1-13.

- PRÉPIN J (1991). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire foetal de rat *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 313, 407-411.
- PRÉPIN J, VIGOUROUX P Le y DADOUNE JP (1993). Effects of thymulin on *in vitro* incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into gonocytes of newborn rat testes. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 289-294.
- RAMÍREZ VD (1973). Endocrinology of puberty. En: Handbook of physiology. American Physiological Society. Washington DC, 1-29.
- RAVIOLA E (1989). Timo. En: Tratado de Histología. Edited by Fawcett, D.W. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México, 441-450 pp.
- REBAR RW, MIYAKE A, LOW TLK y GOLDSTEIN AL (1981a). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214, 669-671.
- REBAR RW, MORANDINI IC, BENIRSCHKE K y PETZE JE (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by athymic transplantation. *Endocrinology* 107, 2130-2132.
- REBAR RW, MORANDINI IC, ERICKSON GF y PETZE JE (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal female. *Endocrinology* 108, 120-126.
- RINALDI-GARACI C, JEZZI T, BALDASSARRE AN, DARDENNE M BACH JF y GARACI E (1985). Effects of thymulin on intracellular cyclic nucleotides and prostalandins  $\text{E}_2$  in peanut agglutinin-fractionated thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 15, 548-552.
- ROITT I, BROSTOFF J y MALE D (1993). Immunology. 3a ed. Editorial Consultant, Inglaterra, 3.1-3.6.

- 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, UNAM.
- ROSAS P, ARGUELLO MS, y DOMÍNGUEZ R (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Medical Science Research* 15, 553-554.
- ROSAS P, CASTELLANOS P y DOMÍNGUEZ R (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyroid mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med.Sci. Res.* 15, 553-554.
- ROSAS P y HINOJOSA L (1993). Efectos de la estimulación gonadotrófica sobre el crecimiento folicular en el ovario de ratones prepúberes normales e hipotímicos. XIII Reunión de ALIRH. Buenos Aires, Argentina. L 44.
- ROSAS P, HINOJOSA L y GARCIA L (1995). Evidence for the participation of the thymus on the regulation of ovarian development in the prepubertal mouse. *Biol. Reprod.* 52, suppl. 1 Abs 296.
- ROSS MH, REITH EJ y ROMRELL LJ (1992). Histología. 2a. edición. Editorial Panamericana. México, 623-633.
- SADLER TW (1996). Embriología médica. 7ª edición. Médica Panamericana, México D.F. 11-25.
- SAKAKURA T y NISHIZUKA Y (1972). Thymic control mechanism in ovarian development: reconstitution of ovarian dysgenesis in thymectomized mice by replacement with thymic and other lymphoid tissues. *Endocrinology* 90, 431-437.
- SAVINO W, DARDENNE M y BACH JF (1983). Thymic hormone containing cells. III. Evidence for a feedback regulation of the secretion of the serum

- thymic factor (FTS) by thymic epithelial cells. *Clin. exp. Immunol.* 52, 7-12.
- AVINO W, DARDENNE M, PAPIERNIK M y BACH JF (1982). Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum Thymic Factor in young mouse thymus studies by monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 156, 628-633.
- AVINO W, GAGNERAULT, BACH JF y DARDENNE M (1990). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. *Life Sciences* 46, 1687-1697.
- HIRE JGM y PANTELOURIS EM (1974). Comparison of endocrine function in normal and genetically athymic mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 47 A, 93-100.
- PANGELO BL, JUDD, AM, ROSS PC, LOGIN IS, JARVIS WD, BADAMCHIAN M, GOLDSTEIN AL y MACLEOD RM (1987). Thymosin Fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 121, 2035-2043.
- AGUCHI O, NISHIZUKA Y, SAKAKURA T y KOJIMA A (1980). Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 40, 540-533.
- ERRANOVA PF y TAYLOR CC (1998). Apoptosis (cell death). En: *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. I. Edited by Knobil E y Neill JD. Academic Press New York, 261-273.
- ILLY JL (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* 1, 162-172.

- UZUMCU M, AKIRA S y LIN YC (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Sciences* 51, 1217-1228.
- WELSH TH Y JOHNSON BH (1981). Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in bulls. *Endocrinology* 109, 185-190.
- WISE T (1998). In vitro and In vivo effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 66, 253-264.
- ZAIDI SA, KENDALL MD, GILLHAM B y JONES MT. (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 89, 253-264.