



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE
TIMULINA EN EL HIPOTÁLAMO MEDIO E HIPÓFISIS DE
RATONES TIMECTOMIZADOS A LOS DIEZ DÍAS DE EDAD
SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA INDUCIDA POR LA
ADMINISTRACIÓN DE GONADOTROPINAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

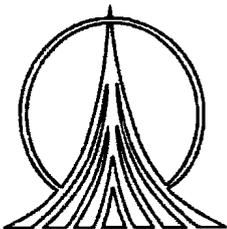
P R E S E N T A N

**MA. DE LA LUZ ADRIANA CABRERA PRADO
BÁRBARA GONZÁLEZ LÓPEZ**

Directora de tesis
Dra. Patricia Rosas Saucedo

MÉXICO, D. F.

Enero del 2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

* ZARAGOZA *

CARRERA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE
TIMULINA EN EL HIPOTÁLMO MEDIO E HIPÓFISIS DE
RATONES TIMECTOMIZADOS A LOS DIEZ DÍAS DE EDAD
SOBRE LA RESPUESTA OVULATORIA INDUCIDA POR LA
ADMINISTRACIÓN DE GONADOTROPINAS

Tesis presentada por: Ma. de la Luz Adriana Cabrera Prado
Bárbara González López

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 217301, IN 228005.

Dedicatorias

A mis padres: a ti Feliciano por inculcar en mí la superación, a ti Ana por darme los consejos, el cariño y apoyo que me permiten dar un paso en esta larga vida; y a ambos por tenerme la paciencia de concluir algo que apenas empieza.

A mi amor porque estando a mi lado le dio otro sentido a mi vida, el ayudarme a que esos tiempos difíciles se hicieran menos pesados y el apoyo en todo momento lo hacen una persona esencial en mi vida.

A mis hermanos Adriana, Félix, Georgina, Paola, Jesús, Xochitl y Oscar por el cariño que me han demostrado y porque sé que puedo contar con ellos en todo momento.

A mis cuñados Alejandra y Alejandro por ser nuevos miembros de la familia y nos regalaron esas alegrías y sonrisas a través de Gaby, Dany y Adrián.

A Adriana C. por su amistad y sin ella el concluir ésta tesis hubiera sido más difícil.

Y finalmente a mi abuelita Elena, tíos y primos por ese cariño demostrado.

Bárbara

Dedicatorias

A mis padres: Juana y Luis por todo el cariño y apoyo incondicional. Papá gracias por haberme querido tanto. Mamá no terminaría de escribir todo lo que me has dado y enseñado, pero sobretodo gracias por el cariño y paciencia, esta es una pequeña retribución a todo.

A mi sobrina Daniela por darme esos momentos agradables con sus sonrisas e inocencia.

A Bárbara por todos momentos que compartimos, el cariño, apoyo, paciencia y aunque el tiempo y la distancia nos separen siempre estaremos juntas.

A Yessica, Fátima, Claudia, Bertha, Israel, a mi hermanito mayor Edgar P. por su cariño y que de alguna manera fueron una luz en momentos difíciles.

Adriana

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por su asesoría, enseñanzas y paciencia que nos tuvo

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por sus valiosas sugerencias

A la Dra. Lorena García Meza por su asesoría y acertadas sugerencias

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo
M. C. Raúl Zavala Chavero
M en C. Rosalva Rangel Corona
Dra. Leticia Morales Ledesma
M. en IBSH Angélica Flores Ramírez

Por su colaboración y sus importantes 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.

A la MVZ Adriana Altamirano y al personal técnico del Bioterio de la FES-Zaragoza por el cuidado brindado a los ratones que se utilizaron en esta investigación.

Al Dr. Isaias Hazarmabeth Salgado Ugarte por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

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

Ésta página es para todas aquellas personas que de alguna manera
contribuyeron a la realización de esta tesis

A Guille, Daniel y Gerardo por todas las veces que nos esperaron, por su
amistad y cariño que nos brindaron

A Claudia Galicia, Angélica e Inés por su sincera amistad y apoyo moral

A Lore García e Hinojosa por compartir sus conocimientos, ayuda y
consejos

A Esteban por su amistad, ayuda incondicional y apoyo moral en todo
momento

A Naham y Claudia por sus agradables pláticas

A Dulce K., Dulce, Silvia, Daniel, Adan, Bety, Javier, Rosa y Gaby por
los momentos que convivimos e hicieron una mejor estancia en el
laboratorio

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
I. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	2
II. Pubertad	10
III. Características morfofuncionales del timo	14
IV. Relaciones funcionales entre el timo y el sistema reproductor	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	33
1. Efectos de la timectomía infantil sobre el desarrollo juvenil	33
2. Efectos de la timectomía infantil sobre la pubertad y ovulación espontáneas	33
3. Respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no hCG	37
4. Respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con timulina en el hipotálamo medio y tratados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no con hCG	42
5. Respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con timulina en la hipófisis y tratados con eCG	44
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

El timo participa en los mecanismos que regulan las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario por intermedio de las hormonas que sintetiza. Se ha mostrado que el ratón timectomizado a los diez días de edad (Tx-10) (etapa infantil) presenta a la pubertad una serie de alteraciones reproductoras que son normalizadas al administrar por vía subcutánea diariamente timulina (péptido sintetizado exclusivamente en el timo). También se ha mostrado en el ratón prepúber intacto (con timo) tratado con gonadotropinas, que la inyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis restaura la ovulación previamente bloqueada. Por lo anterior, en el presente estudio se decidió analizar las características que presenta el ratón Tx-10 cuando se encuentra en las etapas juvenil o puberal, evaluar su capacidad de respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico y analizar si la administración de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis anterior favorece su respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico.

Para analizar los efectos de la timectomía infantil sobre el desarrollo juvenil se utilizaron ratones Tx-10 e intactos que se sacrificaron a los 23 días de edad. Los resultados mostraron que ambos tipos de animales aún mantenían cerrada la vagina y no presentaron ovocitos en los oviductos. El peso corporal y del útero así como la concentración de 17β -estradiol fueron similares entre Tx-10 e intactos y el peso de los ovarios fue mayor en los Tx-10 (7.7 ± 0.4 vs. 5.4 ± 0.2 mg, $p<0.05$).

En el análisis de los efectos de la timectomía infantil sobre el desarrollo puberal se utilizaron ratones Tx-10 e intactos que se sacrificaron al 1^{er} estro vaginal espontáneo. En comparación con los animales intactos, los ratones Tx-10 presentaron retardo en la edad de la apertura vaginal (24.3 ± 0.4 vs. 26.7 ± 0.4 días, $p<0.05$), menor capacidad esteroidogénica (evaluada por la concentración de 17β -estradiol en suero) (79.9 ± 3.9 vs. 64.5 ± 3.0 pg/ml, $p<0.05$), menor peso corporal (21.4 ± 0.3 vs. 20.4 ± 0.3 g, $p<0.05$) y una tendencia de los ovarios y el útero a ser de menor peso (11.5 ± 0.4 vs. 9.3 ± 1.2 mg, NS; $94.1\pm 12.7\pm 75.3\pm 11.2$ mg, NS respectivamente).

La respuesta ovulatoria de los ratones Tx-10 frente al estímulo gonadotrópico se evaluó en animales que a los 20 días de edad se les inyectó por vía s.c. con 4 ó 2.5 u.i. de eCG o con 4 ó 2.5 u.i. de eCG y 54 h después 3 u.i. de hCG. Todos los animales se sacrificaron a los 23 días de edad. Los animales tratados con 4 ó 2.5 u.i. de eCG no ovalaron, sin embargo, cuando se les administraron 4 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG superovularon. Un efecto similar se observó al disminuir la concentración de eCG a 2.5 u.i., excepto por la presencia de superovulación.

Para analizar si la ausencia de ovulación en el Tx-10 está vinculada con la falta de timo, se evaluó la respuesta ovulatoria de animales intactos frente al mismo estímulo gonadotrópico. Todos los ratones intactos ovularon en respuesta a las 2.5 u.i. de eCG y liberaron 10.5 ± 1.0 ovocitos, mientras que los Tx-10 no respondieron. Para evaluar la respuesta del ovario, ratones intactos y Tx-10 previamente estimulados con 2.5 u.i de eCG se inyectaron con hCG. La respuesta ovulatoria de ambos tipos de animales fue del 100%, sin embargo la cuota ovulatoria de los ratones Tx-10 fue significativamente menor en comparación con los intactos (8.5 ± 0.6 vs. 14.3 ± 2.6 ovocitos, $p < 0.05$).

Análisis de los efectos de la inyección de timulina en el hipotálamo medio sobre la respuesta ovulatoria del ratón Tx-10. Se utilizaron ratones Tx-10 que a los 19 días de edad se les administró timulina o solución salina (SS) en el hipotálamo medio. 24 horas después, cada grupo experimental se dividió para inyectarles gonadotropinas en las siguientes concentraciones: 1) 4 u.i. de eCG; 2) 4 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG; 3) 2.5 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG. Todos los animales se sacrificaron a los 23 días de edad. En el grupo 1 ninguno de los animales ovuló independientemente de la inyección de SS o timulina. En los grupos 2 y 3, no se observaron diferencias significativas entre los animales con inyección intrahipotalámica de SS o timulina, ya que no se modificó la respuesta ovulatoria inducida por las gonadotropinas. Resultados similares se observaron en la concentración en suero de 17β -estradiol.

Análisis de los efectos de la inyección de timulina en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria en el ratón Tx-10. Ratones Tx-10 se inyectaron a los 19 días de edad con timulina o SS en la hipófisis y 24 h después se les administraron 2.5 u.i. de eCG. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes respecto a los animales tratados con solución salina, sin embargo, el número de ovocitos liberados se incrementó significativamente (10.6 ± 0.8 vs. 8.0 ± 0.6 , $p < 0.05$). No se observaron diferencias en la concentración de 17β -estradiol en suero.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el ratón, la timectomía realizada a los diez días de edad provoca deficiencias en el proceso de maduración sexual que se manifiestan al inicio de la pubertad. Además que la administración única de timulina en el eje hipotálamo-hipofisario no es suficiente para amplificar la respuesta ovulatoria inducida, lo que nos permite sugerir que la falta del timo desde la etapa infantil y por ende de timulina, modifica los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas.

INTRODUCCIÓN

En la hembra de los mamíferos la función reproductora es regulada por diversos mecanismos neuro-inmunohormonales en los que participa el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el timo, por lo que el éxito reproductor depende de la interacción entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico. Cuando existen alteraciones en esta complicada red, se presentan patologías en las que puede estar involucrado más de un componente de cada sistema, de ahí la importancia de conocer como se regula (McCann y cols., 1998; Savino, 1999).

Las funciones que desempeña el timo en el sistema inmunológico son bien conocidas en varias especies. Sin embargo, diversos estudios muestran que algunos de los péptidos que sintetiza esta glándula modulan las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Rebar, 1984; Uzumcu y cols., 1992). La interacción del timo con el sistema reproductor es mediada en parte por la timulina (hormona sintetizada exclusivamente por el timo). En el ratón prepúber que no es capaz de ovular en respuesta al estímulo con eCG, la administración diaria de timulina por vía sistémica iniciando 24 h antes de la inyección de eCG, induce e incrementa la respuesta ovulatoria (Hinojosa y cols., 1999). En el ratón con timectomía infantil que se caracteriza por presentar pubertad retardada, menor concentración de estradiol en suero y menor respuesta ovulatoria inducida por la administración de gonadotropinas, la administración diaria de timulina por vía sistémica restablece estos parámetros (García y cols., 2000). Estos resultados muestran que la timulina podría estar actuando sobre uno o más componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que finalmente culmina con la ovulación.

Por lo anterior en el presente estudio se decidió analizar los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis sobre la respuesta ovulatoria de ratones timectomizados a los 10 días de edad (etapa infantil) tratados con gonadotropinas.

MARCO TEÓRICO

I. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

Hipotálamo

La región hipotalámica, situada en la base del diencefalo, detrás del quiasma óptico y por encima de la hipófisis, forma las paredes inferior y lateral del tercer ventrículo. Contiene numerosas neuronas de tipo secretor. Sus cuerpos celulares forman varios grupos independientes y densos, altamente distinguibles, denominados núcleos (Ruiz, 1988).

En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que es un decapeptido cuya estructura primaria es: pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (Charli y cols., 1991). La GnRH es secretada por neuronas especializadas denominadas GnRHérgicas. Dichas neuronas se ubican en el hipotálamo en las áreas preóptica medial y lateral, en el núcleo hipotalámico anterior, núcleo periventricular y la zona retroquiasmática, además del hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico. Aproximadamente dos tercios del total de las neuronas GnRHérgicas proyectan sus fibras hacia la eminencia media donde liberan la GnRH en los capilares que conforman el sistema portal hipotálamo-hipofisiario, y de esta manera llega a la hipófisis anterior (Merchenthaler y cols., 1989; Silverman y cols., 1994; Palkovits, 2000) (Fig. 1).

La GnRH es regulada por varias señales neuroendócrinas que estimulan o inhiben su liberación, la cual es de tipo pulsátil y regula a la secreción de las gonadotropinas (Domínguez, 1997).

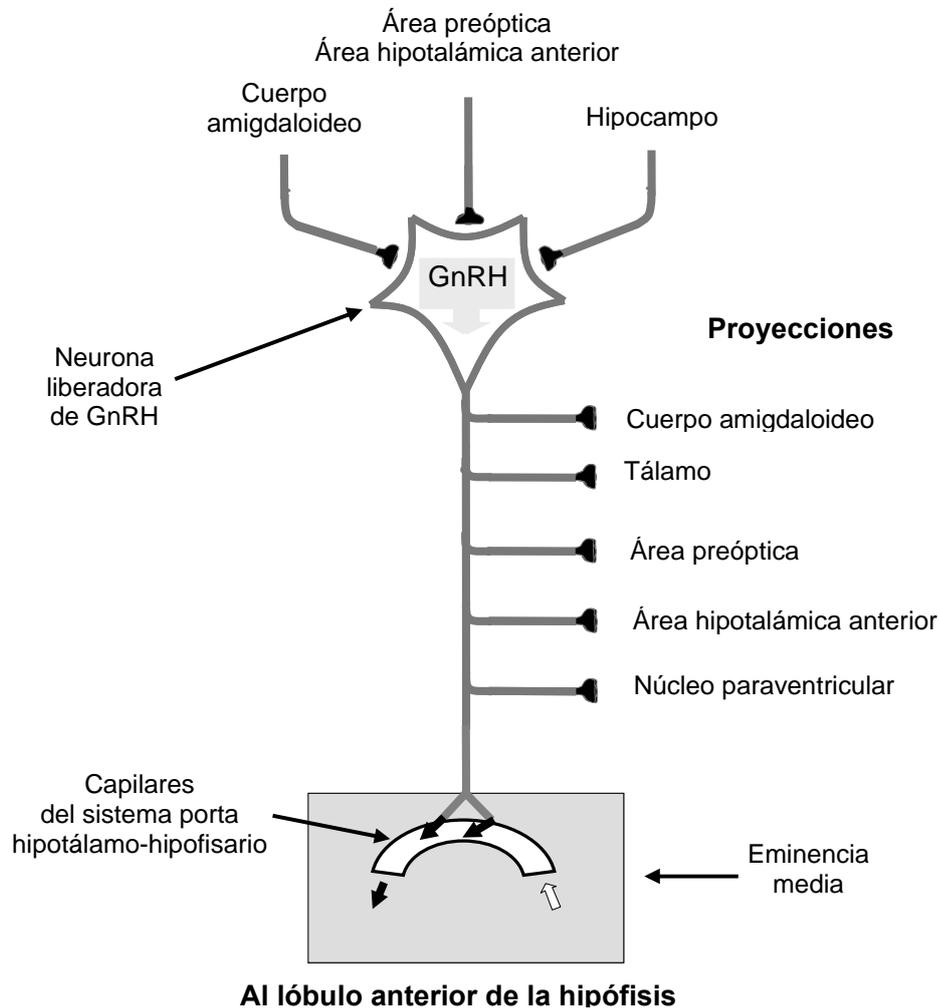


Figura 1. Esquema que muestra la neurona GnRHérgica cuyo soma proyecta su axón hacia la eminencia media, donde la terminal vacía su contenido (Tomado de Jänig, 1993).

Hipófisis

La hipófisis es una glándula situada en el hueco del hueso esfenoides, es relativamente pequeña y se encuentra unida al piso del cerebro por un tallo muy delgado. Topográficamente es uno de los órganos del cuerpo mejor protegido y más inaccesible (Hadley, 2000; Aguilar, 2003).

La hipófisis está compuesta por la adenohipófisis y la neurohipófisis, las cuales tienen un origen embriológico diferente: la adenohipófisis procede de una evaginación del ectodermo bucal (bolsa de Rathke) y la neurohipófisis procede de una evaginación de la base del tercer ventrículo del ectodermo neural (Hadley, 2000; Aguilar, 2003).

La adenohipófisis también llamada hipófisis anterior, está formada por las porciones intermedia, distal y tuberal; el conjunto de las dos últimas constituye el lóbulo anterior. La adenohipófisis secreta diversas hormonas entre las que se encuentran las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo [FSH], hormona luteinizante [LH] y prolactina [PRL]), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona tirotrópica (TSH) y la hormona del crecimiento (GH). La neurohipófisis está integrada por el lóbulo neural, el tallo infundibular y la eminencia media; las dos últimas integran el infundíbulo y el lóbulo neural y la porción intermedia forman el lóbulo posterior. En la región de la neurohipófisis se sintetizan la vasopresina y la oxitocina (Everett, 1994; Domínguez, 1997).

La adenohipófisis, bajo el estímulo de la GnRH, libera a la circulación tanto FSH como LH. En el ovario, la FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos y la LH promueve la ovulación y la luteinización del folículo. Ambas regulan la síntesis de progesterona, testosterona y estradiol en las células del ovario. A su vez, los estrógenos tienen un efecto dual (estimulante e inhibitorio) sobre la liberación de GnRH en el hipotálamo y sobre la sensibilidad de la adenohipófisis a la GnRH regulando así la liberación de las gonadotropinas (Bentley, 1982).

Ovario

Las funciones del ovario son la producción de gametos viables para la fecundación y de hormonas (Yeh y Adashi, 2001). Estas funciones son reguladas por las hormonas secretadas por la hipófisis, las adrenales, la tiroides y el timo (Domínguez, 1997).

El folículo ovárico es la unidad anatómica funcional del ovario, a partir del cual se originan los tres compartimentos del órgano: el folicular, el luteal y el intersticial. El desarrollo del compartimiento folicular da origen a los otros dos (Domínguez y cols., 1991) (Fig. 2).

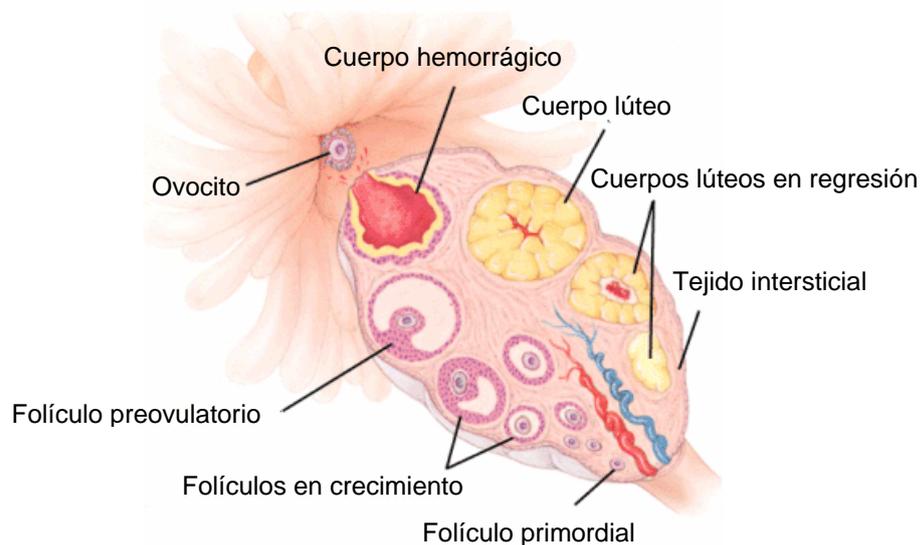


Figura 2. Esquema que muestra los diferentes compartimentos del ovario: el folicular, el luteal y el intersticial (Tomado de Audersik y Audersik, 1996).

Los folículos ováricos están constituidos por células foliculares o de la granulosa que forman una capa continua que rodea completamente al ovocito y junto con la lámina basal lo aíslan del resto del ovario. Estas células tienen gran capacidad proliferativa. Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito se empieza a observar la presencia de licor folicular, mismo que se origina por la acumulación de los productos de secreción de las células foliculares, así como de otros factores (proteínas, polipéptidos, gonadotropinas, gonadocrininas, neurotransmisores y factores de crecimiento). La acumulación de licor folicular forma el antro folicular (Domínguez y cols., 1991) (Fig. 3).

Mientras el folículo se encuentra en desarrollo, el estroma ovárico que rodea al mismo se organiza en una capa celular denominada teca. Las células de la teca envuelven al folículo y pronto se diferencian en dos capas. La capa más interna llamada teca interna está constituida por una gran cantidad de capilares y células epiteloides. La capa externa o teca externa esta formada predominantemente por células estromales fusiformes, tejido conjuntivo y no está tan vascularizada (Fawcett, 1995) (Fig. 3).

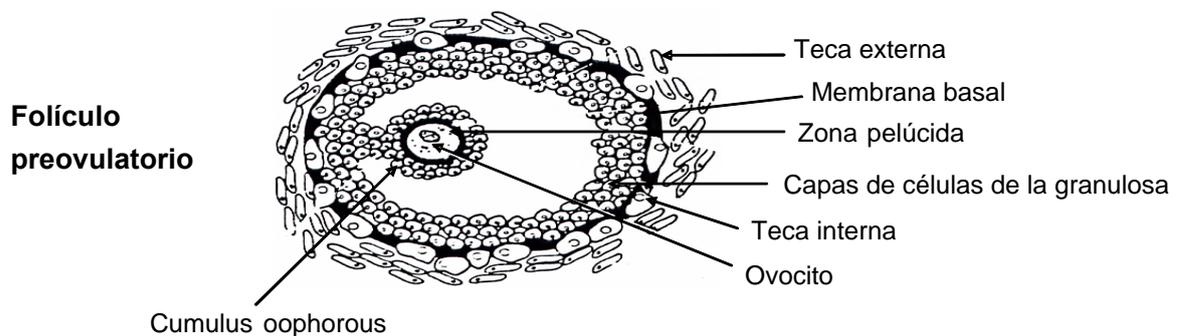


Figura 3. Esquema que muestra los diferentes componentes del folículo maduro o preovulatorio (Tomado de Van-Voorhis, 1998).

Durante el crecimiento folicular ocurren procesos de proliferación y diferenciación inducidos por la FSH, LH y los esteroides. Las células de la granulosa, aumentaran su capacidad de responder a las gonadotropinas y de producir estrógenos. A su vez los estrógenos actúan de manera sinérgica con la FSH estimulando la formación de receptores a LH necesarios para la ovulación y la luteinización (Hafez, 1989).

Después de la ovulación, el folículo se transforma en cuerpo lúteo, mientras que las células de la teca interna de aquellos folículos que no llegan a ovular, dan origen a la glándula intersticial (Domínguez, 1997).

En el ovario también se lleva a cabo la biosíntesis de hormonas esteroides, cuyo sustrato es el colesterol, mismo que se obtiene de varias fuentes entre ellas las lipoproteínas del plasma sanguíneo, el almacenado en las células esteroideogénicas como colesterol libre o en forma de ésteres y el que proviene de la síntesis de *novo* a partir del acetato (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1998; Hinshelwood, 1998; Ing, 1998; O' Malley y Strott, 2001).

En las células de la teca la LH induce la transformación de colesterol a pregnenolona, la cual sigue dos rutas biosintéticas para la producción de andrógenos, una es por efecto de la 17α -hidroxilasa dando como producto la 17-hidroxipregnenolona que a su vez es transformada por la enzima C_{17-20} liasa en dehidroepiandrosterona que por la acción de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se transforma en androstenediona. Otra vía es la oxidación de la pregnenolona catalizada por la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa para dar como producto la progesterona. La progesterona por la participación de la 17α -hidroxilasa es transformada en 17-hidroxiprogesterona que por la acción de la enzima C_{17-20} liasa lleva a la formación de la androstenediona que por intermedio de

la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se convierte en testosterona (Fig. 4) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1998; Hinshelwood, 1998; Ing, 1998; O' Malley y Strott, 2001).

Los andrógenos (testosterona y androstenediona) salen de las células de la teca, atraviesan la membrana basal y entran a las células de la granulosa. Ahí por estímulo de la FSH se incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasa P_{450} que provoca que la androstenediona se convierta en estrona y la testosterona en 17β -estradiol. Finalmente estos estrógenos se vierten al antro folicular y a la circulación sanguínea (Fig. 4) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1998; Hinshelwood, 1998; Ing, 1998; O' Malley y Strott, 2001).

En el ovario ocurre un fenómeno denominado atresia folicular que es el proceso normal por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que habiendo iniciado su crecimiento y diferenciación, no llegan a ovular. La atresia se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular, tanto en la vida fetal, como durante las etapas prepuberal, puberal y adulta (Domínguez y cols., 1991).

El inicio de la atresia folicular parece estar determinado por alteraciones del ovocito, el cual pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Esta alteración es seguida por modificaciones de las células de la granulosa, como pérdida gradual de los receptores a FSH y LH, lo que se traduce en disminución de la concentración de estrógenos e incremento de la atresia. Este sería uno de los pasos fundamentales en el desarrollo de la atresia, dado que la capacidad del folículo para mantener la síntesis de estrógenos es primordial para evitarla (Domínguez y cols., 1991; Greenwald y Roy, 1994).

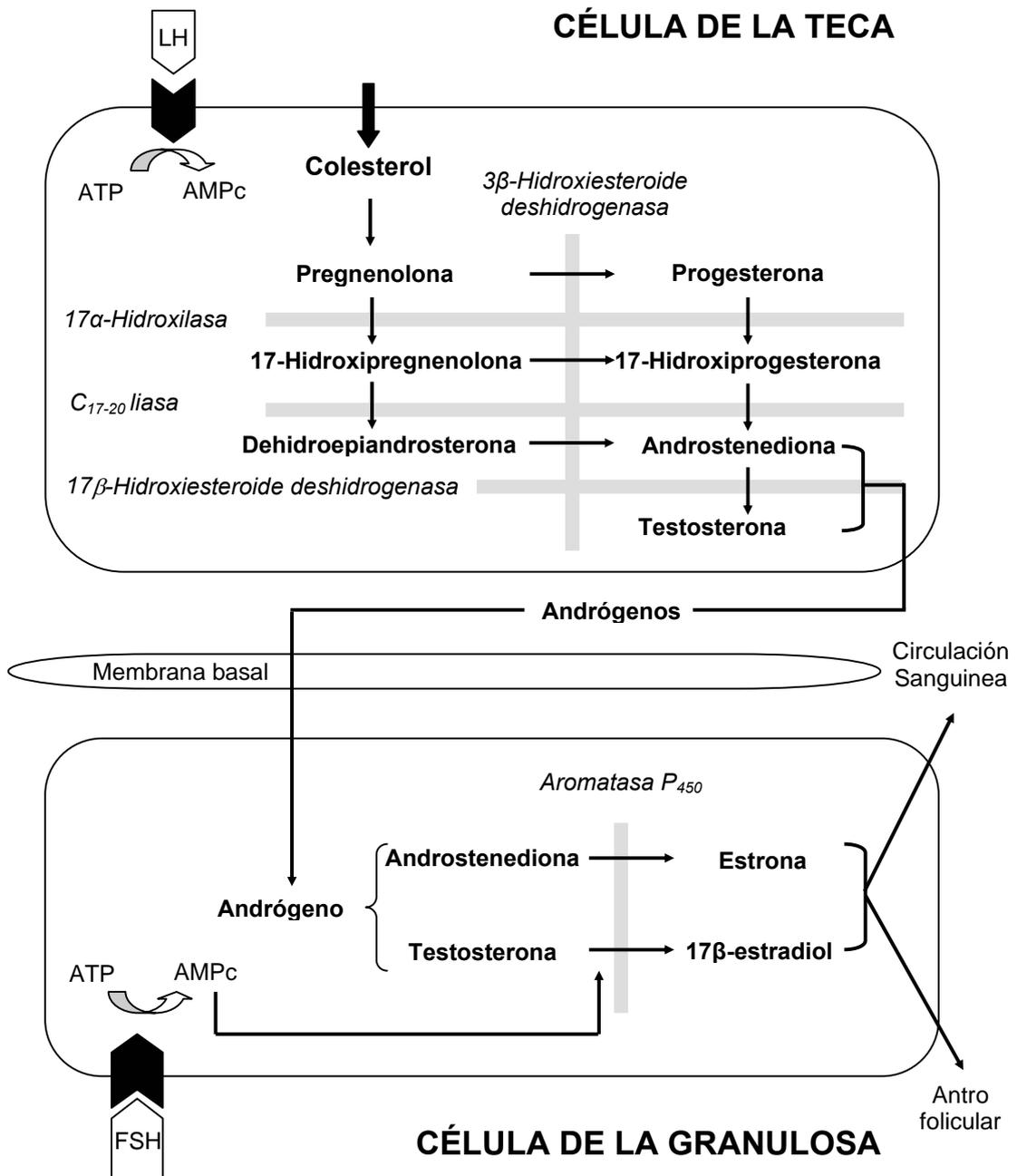


Figura 4. Esquema que muestra la biosíntesis de las hormonas esteroideas en las células de la teca y de la granulosa.

II. Pubertad

La hembra de los roedores ha sido ampliamente utilizada para estudiar los mecanismos neuroendócrinos que regulan la reproducción. Ojeda y colaboradores (1986) han aportado información sobre el desarrollo postnatal de la rata basándose en evidencias morfológicas, histológicas y fisiológicas relacionadas con los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Con base en estos estudios han dividido este desarrollo en cuatro etapas: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal (Ojeda y Urbanski, 1994).

Neonatal

El periodo neonatal inicia al nacimiento y termina en el día siete. Uno de los rasgos de este periodo es el incremento en la secreción de las gonadotropinas. Sin embargo, el ovario es relativamente insensible al efecto de éstas, es decir que el crecimiento folicular se inicia de forma independiente a las gonadotropinas (Peter, 1970); el control inhibitorio de la secreción gonadotrópica por estradiol es ineficiente debido a la presencia de α -fetoproteína que se une fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Raynaud, 1973). Al final del periodo neonatal comienzan a ser detectados los receptores a gonadotropinas en el ovario, pero en baja cantidad (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Infantil

El periodo infantil se extiende desde el día ocho hasta el 21. Este periodo se caracteriza por presentar concentraciones altas de FSH en suero, que son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a

ovular en la pubertad y por la presencia de incrementos esporádicos en la secreción de LH (Döhler y Wuttke, 1974; Hage y cols., 1978; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Este patrón de secreción de las gonadotropinas se debe a que la respuesta de la hipófisis a la GnRH es alta en un principio y decrece después del día 15 de edad.

La FSH en suero alcanza su concentración máxima cerca del día 12, posteriormente las concentraciones declinan de manera constante hasta llegar a su valor más bajo poco antes del primer proestro. Las causas de la elevación de la FSH y su posterior declinación en ésta etapa son varias, entre las que destacan que la retroalimentación inhibitoria de los estrógenos es baja y la ausencia de inhibina (Becú- Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Juvenil

El periodo juvenil inicia en el día 22 y termina cerca del día 30 ó 32. En esta etapa comienzan a ocurrir múltiples cambios que establecen definitivamente la conexión funcional entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La concentración de LH es baja y constante al inicio de la etapa juvenil e incrementa sus valores basales y la amplitud de sus pulsos hacia el final de la misma y la concentración de FSH continúa disminuyendo (Ojeda y cols., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

La disminución de la α -fetoproteína provoca el incremento del estradiol plasmático biológicamente activo. Las concentraciones bajas de gonadotropinas plasmáticas que caracterizan a esta etapa se deben a la disminución en la respuesta de la hipófisis a la GnRH (Ojeda y cols., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

Las concentraciones crecientes de GH y prolactina son funcionalmente importantes durante el desarrollo juvenil ya que la GH facilita la capacidad de la FSH para inducir la presencia de receptores a LH en el ovario y la prolactina ayuda a formar o mantener estos receptores, haciéndose este efecto más evidente durante los días que preceden a la liberación preovulatoria de las gonadotropinas (Ojeda y cols., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

Peripuberal

El periodo peripuberal tiene una duración variable e incluye los días que preceden a la primera ovulación. En esta fase se llevan a cabo una casada de eventos que culminan con el primer incremento preovulatorio de gonadotropinas y la primera ovulación. Su estudio se ha dividido en diferentes fases.

- 1.- Anestro: en esta fase la vagina se encuentra cerrada, el útero no presenta líquido en su luz y su peso es bajo; en el ovario se observan folículos grandes y se producen los cambios diurnos en la liberación de LH.
- 2.- Proestro temprano: la vagina permanece cerrada y el peso del útero aumenta debido a la acumulación de líquido.
- 3.- Proestro tardío: los animales aún muestran la vagina cerrada y el peso y la acumulación del líquido en el útero alcanzan su máximo; en los ovarios se observan folículos preovulatorios. Esta fase corresponde al primer día del proestro.
- 4.- Estro: la vagina está abierta y el epitelio descamado se caracteriza por el predominio de células cornificadas; el peso del útero es bajo y no presenta líquido en la luz. En este día se presenta la primera ovulación y en el ovario se observan cuerpos lúteos recién formados (Ojeda y cols., 1986) (Fig. 5).

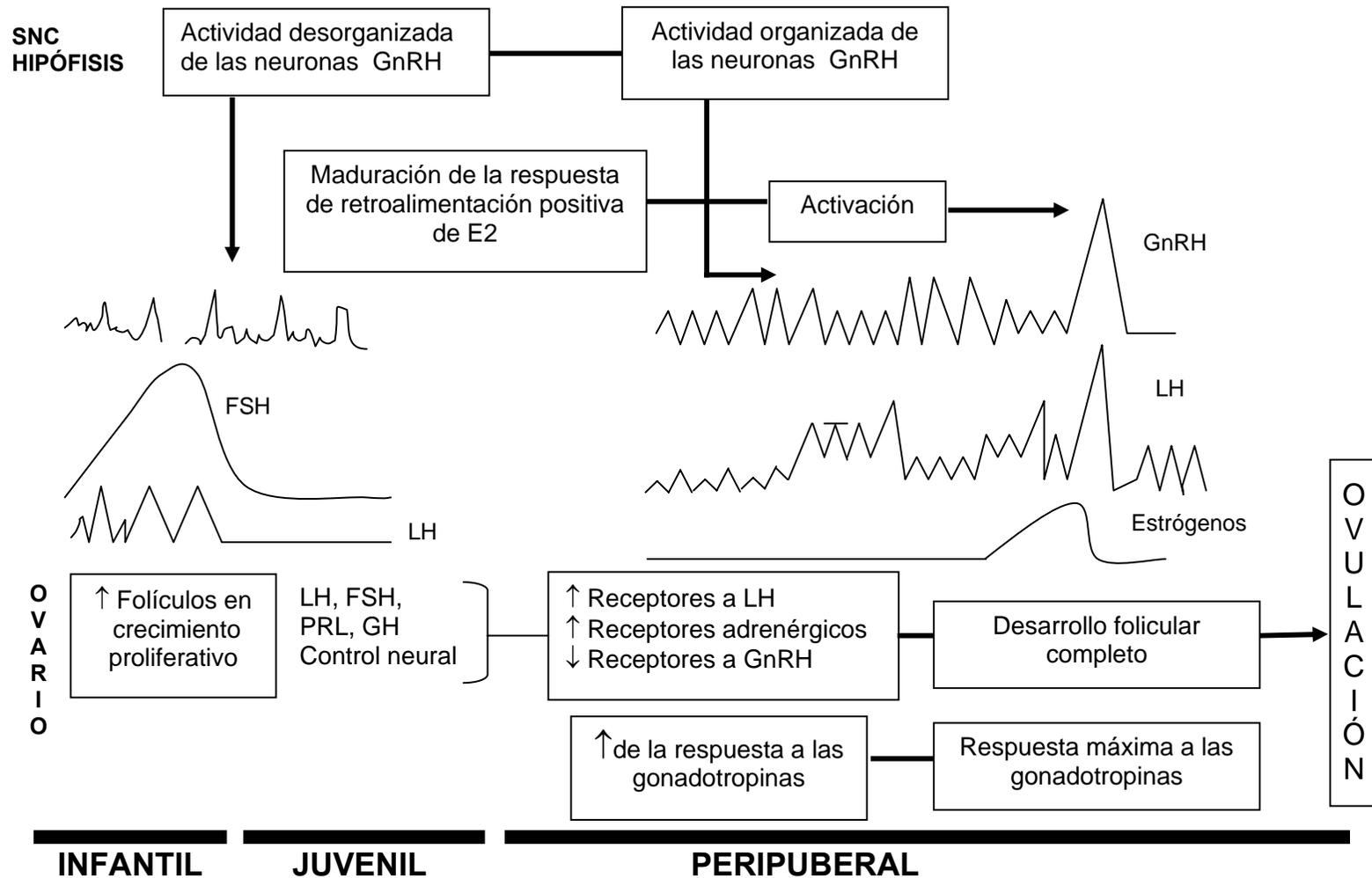


Figura 5. Secuencia de eventos que se suceden en el Sistema Nervioso Central (SNC), la hipófisis y el ovario previos al pico preovulatorio de las gonadotropinas en la ratona hembra. La línea discontinua representa las 12:00 h del primer estro. GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona estimulante del foliculo, PRL: prolactina, E₂: estradiol y GH: hormona de crecimiento (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

III. Características morfofuncionales del timo

El timo es una glándula que se origina a partir del epitelio endodérmico del tercer par de surcos branquiales. Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales del timo emiten señales que atraen células madre del saco vitelino o del hígado y después del nacimiento, de la médula ósea. En el primordio tímico las células madre evolucionan a macrófagos y células dendríticas interdigitantes. Las células progenitoras de los linfocitos T invaden la corteza, donde se diferencian en linfocitos inmaduros también llamados timocitos; durante el proceso de maduración adquieren la capacidad para reaccionar específicamente con un antígeno determinado, siendo estas células inmunocompetentes las que son liberadas al torrente sanguíneo (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 6).

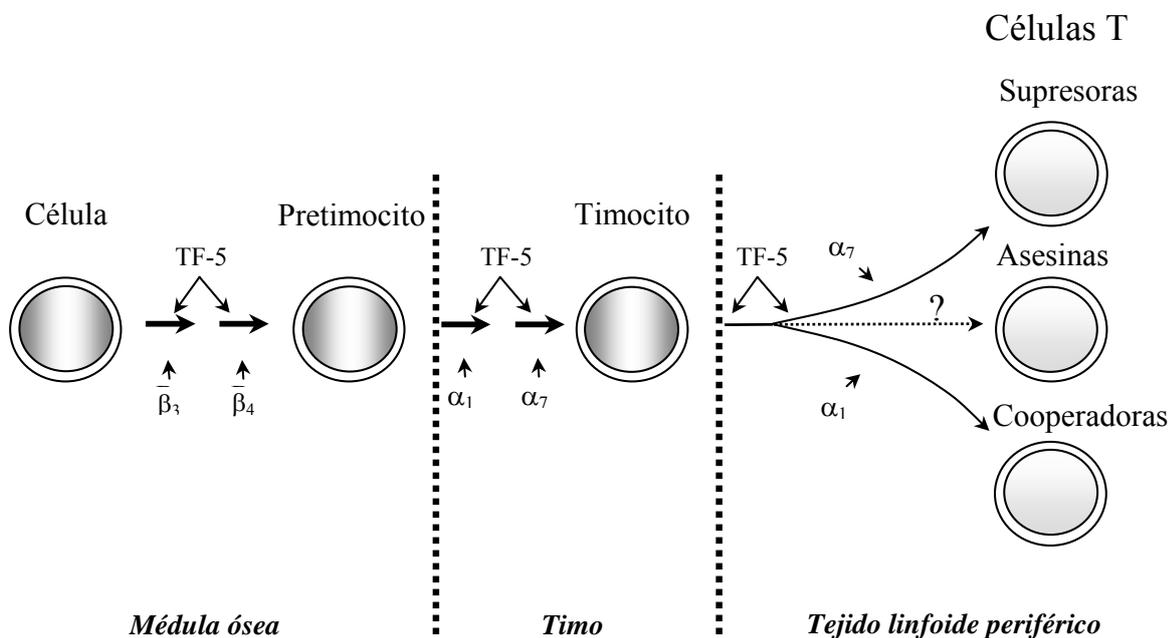


Figura 6. Esquema que muestra el proceso de maduración de los linfocitos T. Hormonas involucradas en este proceso: timosina fracción 5 (TF-5); timosina α_1 , α_7 , β_3 y β_4 (Tomado de Cruse y Lewis, 1995).

En los mamíferos el timo es un órgano que se encuentra ubicado en el tórax, inmediatamente por debajo de la parte superior del esternón. Es una masa de color rosado grisáceo, aplanada y triangular. Está formado por dos lóbulos unidos en la parte media, cada lóbulo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo derivada del mesénquima, la cual se extiende hacia el interior del órgano donde forma tabiques que dividen cada lóbulo en lobulillos (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 7).

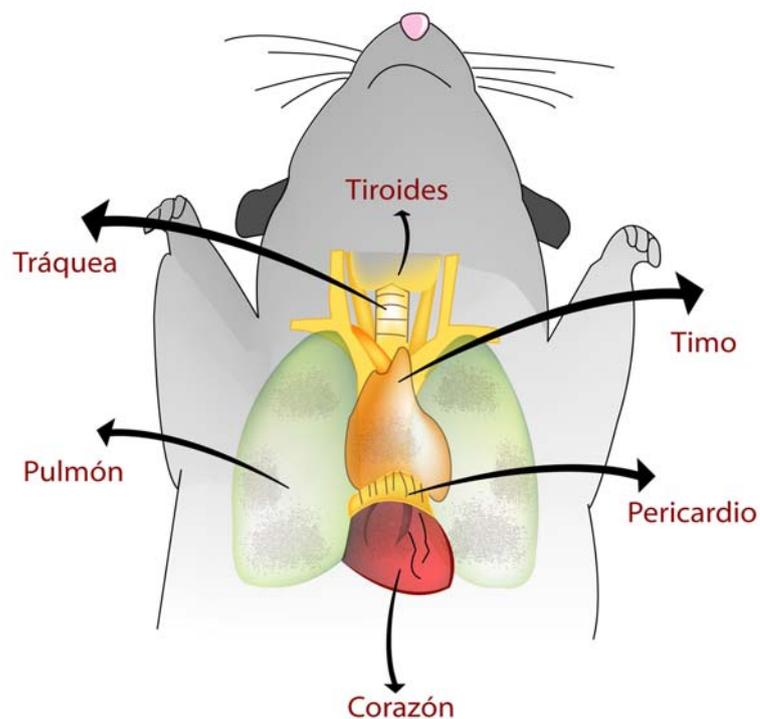


Figura 7. Esquema que muestra la ubicación anatómica del timo en el ratón.

La matriz del timo esta formada por células epiteliales dispuestas en forma de red (retículo-epiteliales) en cuyos espacios se depositan los linfocitos. En la parte periférica de cada lobulillo se encuentra gran cantidad de linfocitos, a esta zona se le denomina corteza y hacia la parte central con menor cantidad de linfocitos se encuentra la médula la cual presenta una mayor densidad de células retículo-epiteliales que la corteza y con menos proyecciones, además de pequeños grupos de células epiteliales distribuidas de manera concéntrica conocidos como corpúsculos de Hassall (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 8).

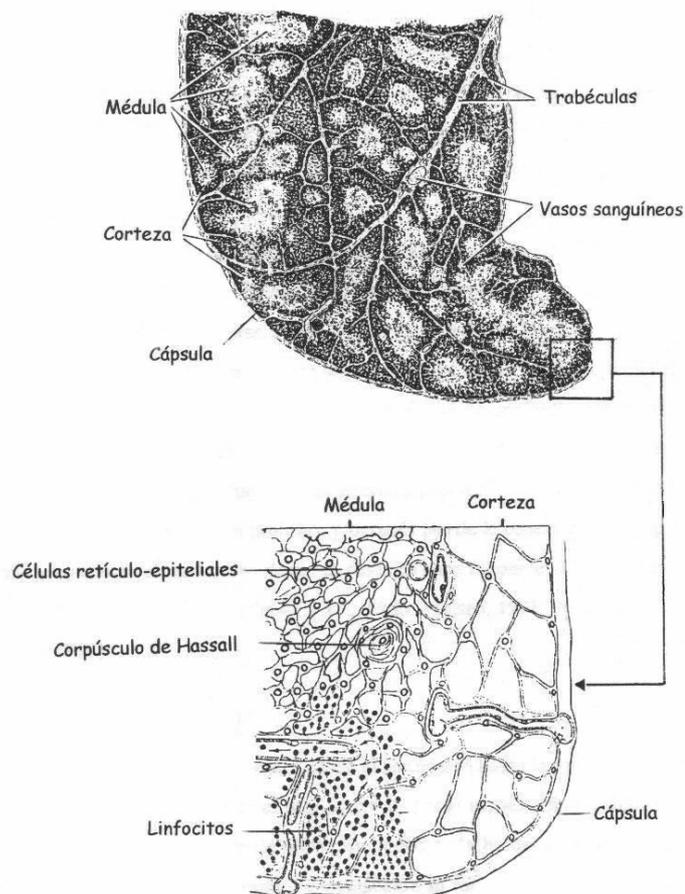


Figura 8. Esquema que muestra la histología y organización corticomedular del timo (Tomado de Bellanti y Kadlec, 1986).

Con el transcurso de la edad el timo muestra un proceso fisiológico de involución en el que descende la producción de linfocitos, la corteza se adelgaza y el parénquima es sustituido en su mayor parte por el tejido adiposo (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 9).

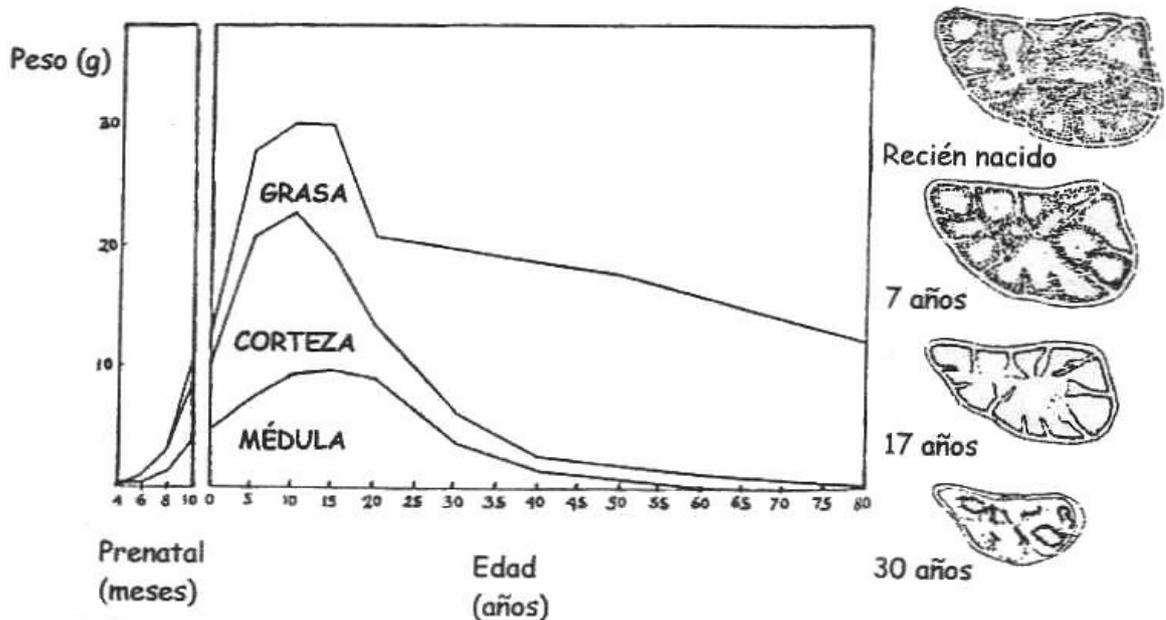


Figura 9. Esquema que muestra los cambios de peso y composición del timo durante el proceso de involución (Tomado de Bellanti y Kadlec, 1986).

Estudios de inmunohistoquímica han mostrado que las hormonas del timo son producidas por las células epiteliales y están implicadas en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T (Dardenne y cols., 1986) (Fig. 6). A estas hormonas se les ha llamado timosinas, entre las que se encuentran la timosina fracción 5 (TF-5), timosina α_1 , timosina β_4 ; timopoyetina II (TP), factor tímico humoral (THF), factor tímico X (TFX) y timulina o factor tímico del suero (FTS por sus siglas en francés) (Goldstein y cols., 1981).

Diversos estudios muestran que algunas timosinas modulan las funciones del eje neuroendócrino que regula la reproducción en la hembra. Rebar (1984) describe *in vitro* que la TF-5 y la timosina β_4 son capaces de inducir la secreción de la GnRH en el hipotálamo de rata. Uzumcu y colaboradores (1992) y Uzunmcu y Lin (1994) mostraron que los factores tímicos estimulan la esteroidogénesis *in vitro* en las células de la granulosa de ovario de rata en cultivo. Sin embargo, algunas de estas timosinas son secretadas también por los riñones, el bazo, hígado, pulmón y aún en el SNC, excepto la timulina cuya síntesis se lleva a cabo sólo en las células retículo-epiteliales del timo (Savino y cols., 1982; Dalakas y cols., 1984; Horecker, 1984).

Timulina

La timulina es un nonapéptido cuya secuencia de aminoácidos es pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH y participa en la regulación de la maduración y diferenciación de los linfocitos T (Bach y cols., 1977). Estudios realizados con anticuerpos monoclonales anti-timulínicos muestran que la timulina está presente únicamente en las células epiteliales del timo. Esta hormona tímica no es detectada en el suero de ratones congénitamente atímicos nu/nu y en ratones timectomizados desaparece de la circulación después de la operación (Dardenne y Bach, 1981; Savino y cols., 1982).

La timulina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, ya que se ha observado la aparición de rosetas en el líquido cerebro espinal de pacientes con esclerosis múltiple inyectados con timulina por vía subcutánea (Bach y Dardenne, 1984).

Experimentos *in vitro* utilizando fragmentos de hipófisis anterior de rata, muestran que la timulina participa en la regulación de la secreción de LH, al aumentar la liberación de la hormona de forma parecida a los efectos de la GnRH (Zaidi y cols., 1988).

En cultivo de células de adenohipófisis de rata se ha mostrado que la timulina estimula la liberación de FSH y LH. Cuando estas células son incubadas con timulina y GnRH se observa un efecto aditivo sobre la secreción de FSH y un efecto sinérgico sobre la liberación de LH (Brown y cols., 2000).

En estudios *in vitro* las células de adenohipófisis provenientes de ratas hembra o macho muestran que los efectos de la timulina sobre la secreción de gonadotropinas pueden ser inhibitorios o estimulantes, que dependen del sexo del donador, de los esteroides sexuales y en el caso de la hembra del día del ciclo estral en el que fueron sacrificadas (Hinojosa y cols., 2003; Hinojosa y cols., 2004; Ortega y cols., 2004).

IV. Relaciones funcionales entre el timo y el sistema reproductor

Calzolari (1898) es el primero en sugerir la existencia de una relación entre el timo y la función reproductora, al observar la hipertrofia del timo en conejas castradas. Posteriormente, Flanagan (1966) describe un ratón mutante que se caracteriza por ser alopécico y congénitamente atímico (símbolo genético nu/nu). Aunado a su atimia este ratón presenta retardo en la edad de la apertura vaginal, deficiencia en el desarrollo ovárico, acelerada atresia folicular, concentraciones bajas de gonadotropinas en suero e infertilidad. Estudios posteriores sustentan la relación entre el timo y el sistema reproductor, al mostrar que en los ratones nu/nu,

el injerto de timo al nacimiento normaliza sus funciones reproductoras (Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y cols., 1980).

Nishizuka y Sakakura (1969) muestran en el ratón que la timectomía realizada en la etapa neonatal, es decir en las primeras 72 horas de vida posnatal, resulta en disgénesis ovárica evaluada en la etapa adulta (dos o tres meses de edad), e infertilidad. A partir de estos resultados este modelo experimental fue el más utilizado en el estudio de las relaciones funcionales entre el timo y el sistema reproductor.

En 1980 y 1981 Michael y colaboradores muestran otras características asociadas a la extirpación del timo en el día tres de vida (Tx-3) como son el retraso en la edad de la apertura vaginal, disminución en el peso del útero, concentraciones bajas de FSH, LH, GH, estradiol y progesterona en plasma. En 1983, Michael describe en el suero de los ratones adultos Tx-3 la presencia de anticuerpos antiovocitos, lo que indica que la disgénesis ovárica tiene una etiología autoinmune. Posteriormente, Kosiewicz y Michael (1990) proponen que la timectomía neonatal tiene un efecto bifásico en el desarrollo del ovario: un efecto temprano que involucra la interrupción en la comunicación hormonal establecida en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-timo, que afecta a los folículos primordiales y en crecimiento antes de los 20 días de edad y un efecto tardío de tipo inmunológico que se evidencia por la formación de anticuerpos antiovocitos después de los 25 días de edad.

Sin embargo, el modelo Tx-3 no permite analizar la participación hormonal del timo en la regulación de la función reproductora de manera independiente al efecto inmunológico. Por lo que en nuestro laboratorio se diseñó el modelo del ratón timectomizado a los diez días de edad (Tx-10) (etapa infantil) que se

caracteriza por no presentar disgénesis ovárica de origen autoinmune durante el desarrollo prepuberal. La ausencia del timo desde la etapa infantil provoca retraso en el inicio de la pubertad, disminución en el crecimiento folicular y aumento de la atresia, así como un decremento en el peso del útero, en las concentraciones de estradiol en suero y en la respuesta ovulatoria inducida por las gonadotropinas (García, 1996; García y cols., 2000).

En el ratón Tx-10, la administración diaria de timulina por vía subcutánea iniciando inmediatamente después de la cirugía hasta la pubertad, revierte los efectos ocasionados por la ausencia del órgano, lo que indica que esta hormona está involucrada con los mecanismos que regulan la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (García y cols., 2000).

Estudios recientes de nuestro laboratorio utilizando como modelo al ratón prepúber intacto (con timo) tratado con gonadotropinas, muestran que la inyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis restaura la ovulación previamente bloqueada (García, 2005; García y cols., 2005), lo que sugiere que los efectos estimulantes de esta hormona tímica están vinculados con los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ratón timectomizado a los diez días de edad presenta a la pubertad una serie de alteraciones relacionadas con la endocrinología del timo y el desarrollo del ovario, desórdenes que son normalizados al administrar timulina por vía subcutánea. Lo que nos lleva a cuestionar ¿en dónde actúa la timulina? ¿en el hipotálamo estimulando la secreción de la GnRH? ¿en la hipófisis estimulando la liberación de la FSH y la LH? ¿directamente en el ovario incrementando la esteroidogénesis y el desarrollo folicular? ¿o una combinación de éstas?, finalmente la estimulación de estas vías puede culminar con la ovulación.

Estudios realizados en el ratón prepúber intacto indican que la timulina inyectada en el hipotálamo medio o en la hipófisis anterior es capaz de restablecer la respuesta ovulatoria. A partir de estos resultados es factible pensar que en el ratón timectomizado en la etapa infantil, la administración intracerebral de timulina también podría estimular la función hipotálamo-hipofisaria y favorecer la respuesta ovulatoria.

Por lo anterior, en el presente estudio se decidió analizar las características que presenta el ratón Tx-10 cuando se encuentra en las etapas juvenil o puberal, evaluar su capacidad de respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico y analizar si la administración de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis anterior modifica su respuesta ovulatoria al tratarlos con gonadotropinas.

HIPÓTESIS

Dado que en los ratones timectomizados a los diez días de edad, el reemplazo hormonal de timulina por vía subcutánea inmediatamente después de la timectomía, modula de manera estimulante las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, entonces la administración de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis favorecerá su respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico.

OBJETIVOS

- Analizar las características reproductoras que presenta el ratón Tx-10 en las etapas juvenil (23 días de edad) y puberal (primer estro vaginal).
- Analizar la respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con diferentes concentraciones de gonadotropinas.
- Analizar los efectos de la administración de timulina en el hipotálamo medio sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones Tx-10 tratados con gonadotropinas.
- Analizar los efectos de la administración de timulina en la hipófisis anterior sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones Tx-10 tratados con gonadotropinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1, de diez días de edad distribuidos desde el nacimiento en camadas de cinco o seis por madre, con alimentación materna hasta el destete (21 días de edad) y agua y alimento *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en fotoperiodo controlado de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 17:00 h) y temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Timectomía

Animales de diez días de edad fueron anestesiados por enfriamiento sobre una cama de hielo. Se realizó un corte longitudinal de piel a la altura de la parte superior del esternón y se cortó la primera costilla izquierda. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se ubicó el timo e inmediatamente se introdujo una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío para extraer los dos lóbulos del timo. La herida se suturó y se frotó con alcohol yodado. Finalmente se colocó al animal en una cámara de recuperación con temperatura entre 36 y 37 °C. Las timectomías siempre se iniciaron a las 10:00 h.

Microinyección

A los 19 días de edad los ratones con timectomía a los diez días de edad (Tx-10) se anestesiaron con éter y se montaron en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Modelo 900). Se realizó el corte de piel de la parte superior de la cabeza y se expuso el cráneo para ubicar el punto Bregma (definido como la unión de las suturas sagital y coronal) mismo que se tomó como cero. A partir de éste se ajustaron las reglillas milimétricas del aparato estereotáxico con las coordenadas antero posterior (AP) y lateral (L) necesarias para tener acceso al hipotálamo medio o a la hipófisis. Con la ayuda de una fresa odontológica se realizó un orificio

craneal por donde se introdujo una aguja del No. 29 conectada a una jeringa Hamilton de 50 μ l, acoplada a una bomba de microinyección (Bioanalytical Systems, BAS, Modelo CMA/100) calibrada para inyectar un volumen de 0.3 μ l de solución salina o timulina en 2 min (Fig. 9).

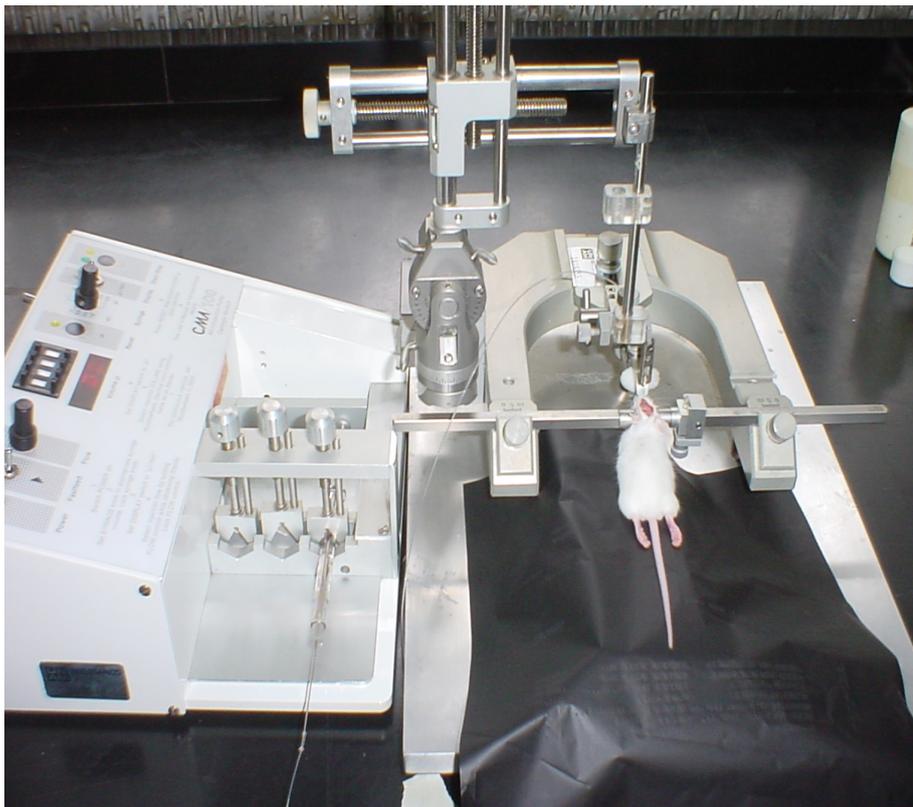


Figura 9. Fotografías que muestran al ratón montado en un aparato estereotáxico para realizar la inyección intracerebral.

Las coordenadas que se utilizaron para realizar la microinyección en el hipotálamo medio fueron $AP=0.4$, $L=\pm 0.4$, ventral (V)=5.7 y para la hipófisis $AP=0.9$, $L=0.3$, $V=7.3$, mismas que fueron previamente determinadas para el animal prepúber con base en el Atlas estereotáxico para el cerebro del ratón adulto (Franklin y Paxinos, 1997). Este procedimiento se hizo de manera bilateral para el hipotálamo (Fig. 10) y unilateral para la hipófisis (Fig. 11). Finalmente se suturó la herida y se aplicó alcohol yodado.

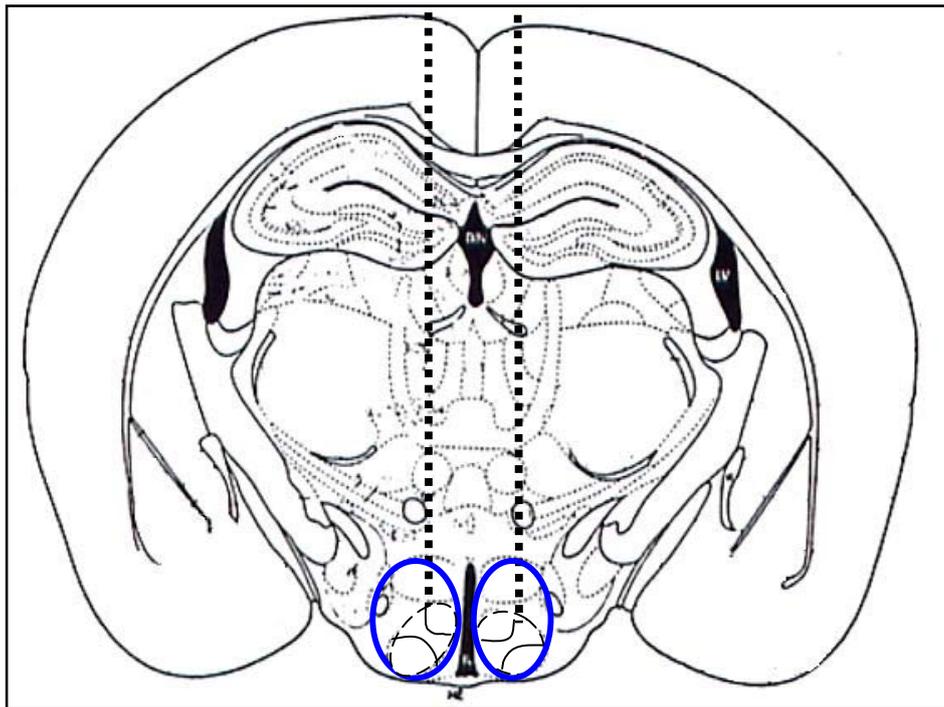


Figura 9. Esquema que muestra un corte coronal de cerebro de ratón donde se observa la trayectoria de la aguja (.....) hasta el hipotálamo medio (○).

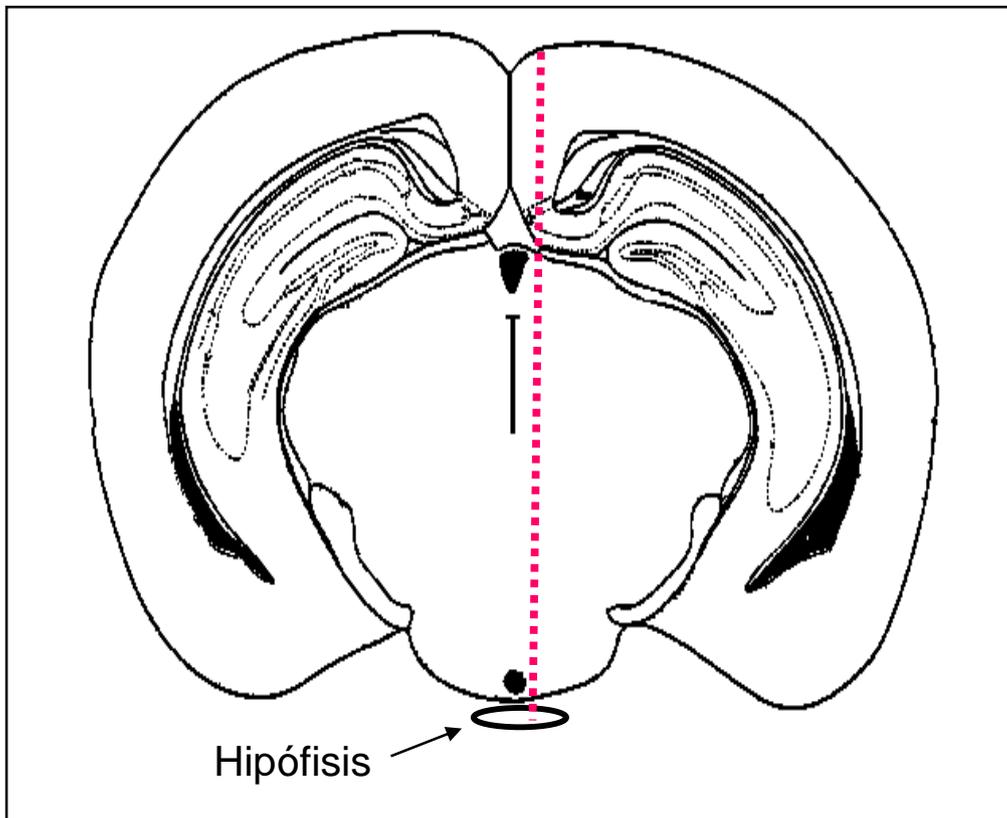


Figura 10. Esquema que muestra un corte coronal de cerebro de ratón donde se observa la trayectoria de la aguja (•••••) hasta la hipófisis (○).

Administración de hormonas

La inyección de gonadotropinas se realizó por vía subcutánea. La administración de eCG (Sigma Chemical Co., E.U.A) (4.0 ó 2.5 u.i.) siempre se realizó a las 10:00 h del día 20 de edad y según lo indique el diseño experimental, la administración de hCG (Sigma) (3.0 u.i.) se realizó 54 h después del tratamiento con eCG.

Autopsia

Los animales se sacrificaron por decapitación entre las 10:00 y 11:00 h a los 23 días de edad o al primer estro vaginal, según como se indique en el diseño experimental. Se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente y después se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. El suero se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la medición de 17β -estradiol. A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en balanza de precisión. En los oviductos se buscó la presencia de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico, en cuyo caso se procedió a contarlos. En todos los animales sometidos a una timectomía se verificó bajo el microscopio estereoscópico si ésta fue completa.

Los cerebros de todos los animales que recibieron inyección intracerebral se fijaron en formol al 9% durante un periodo mínimo de 24 h. Posteriormente en el vibrátomo (Technical Products International Inc. Serie 3000) se realizaron cortes seriados con un grosor de 100 micras que se analizaron bajo el microscopio estereoscópico para corroborar que la inyección se localizara en el hipotálamo medio. Cuando la inyección se realizó en la hipófisis, al momento de la autopsia se verificó la existencia de la marca de la aguja en la adenohipófisis.

Cuantificación de hormonas

Las concentraciones séricas de 17β -estradiol se cuantificaron por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida. 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 a determinar, obtenido de suero de conejo, viales con la hormona marcada con I^{125} y estándares para realizar la curva patrón. En cada tubo se adicionaron 100 μl de suero para 17β -estradiol y 1000 μl 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 de 17β -estradiol se expresaron en pg/ml y la sensibilidad del método fue de 5.0 pg/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 6.9 y 10.8 respectivamente.

Análisis estadístico

El número de ovocitos liberados, la edad de la apertura vaginal, la presencia del primer estro vaginal (días posteriores a la apertura vaginal), el peso corporal y de los órganos y las concentraciones hormonales se expresaron como la media \pm e.e.m. y se analizaron por la prueba de la t de Student. Para analizar las diferencias entre las medias de los valores en porcentaje, se utilizó la escala logarítmica y los datos del peso corporal, de los ovarios y el útero y las concentraciones de 17β -estradiol que presentaron los animales de la etapa juvenil a la puberal, se compararon por la prueba de t de Student. La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovularon entre el número total de animales) se comparó utilizando la prueba de probabilidad exacta de Fisher para proporciones. En todos los casos sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Análisis de los efectos de la timectomía infantil sobre el desarrollo juvenil.

Debido a que en los ratones timectomizados a los diez días de edad, la administración intracerebral de timulina se llevó a cabo al final de la etapa infantil (19 días) y los animales fueron sacrificados para su análisis al inicio de la etapa juvenil (23 días), se decidió evaluar el peso corporal, de los ovarios y del útero, así como las concentraciones de 17β -estradiol en el suero de ratones Tx-10 sacrificados a los 23 días de edad y compararlos con los parámetros obtenidos de ratones intactos sacrificados a la misma edad.

Experimento 2. Análisis de los efectos de la timectomía infantil sobre la pubertad y la ovulación espontáneas.

Con el objeto de analizar los efectos de la timectomía realizada a los diez días de edad sobre el inicio de la pubertad, se utilizaron animales Tx-10 e intactos los cuales se revisaron diariamente entre 10:00 y 11:00 h para registrar el día en que se presentó la apertura vaginal espontánea (pubertad). A partir de este momento se inició la toma diaria de frotis vaginales hasta la presencia del estro, día en el que se sacrificaron. A la autopsia los animales se procesaron como se indicó anteriormente.

Experimento 3. Análisis de la respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no con hCG.

Se ha descrito que el ratón con timectomía a los diez días de edad presenta

una menor capacidad de respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico (García, 1996), por lo que se decidió evaluar la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por animal ovulante en ratones Tx-10 inyectados a los 20 días de edad con 4 u.i. de eCG o con 4 u.i. de eCG y 54 h después 3 u.i. de hCG. Bajo el mismo esquema de administración gonadotrópica se realizaron otros grupos de ratones Tx-10 a los que se les inyectaron 2.5 u.i. de eCG sola o en combinación con hCG.

Todos los animales se sacrificaron 72 h después de la administración de eCG y a la autopsia se procesaron como se describió anteriormente.

Experimento 4. Análisis de la respuesta ovulatoria y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones Tx-10 inyectados con timulina en el hipotálamo medio y tratados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no con hCG.

A los 19 días de edad ratones Tx-10 se inyectaron en el hipotálamo medio con timulina (Sigma) (1 pg/0.3 μ l/2 min). Al día siguiente se les administraron 4 u.i. de eCG. Los animales se sacrificaron 72 h después de la administración gonadotrópica.

Como grupo de comparación se utilizaron ratones Tx-10, que a los 19 días de edad se inyectaron en el hipotálamo medio con solución salina (NaCl al 0.9%) (Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V.) (0.3 μ l/2 min), por ser el diluyente de la timulina. A los 20 días de edad se inyectaron con 4 u.i. de eCG y se sacrificaron 72 h después.

Otros grupos de ratones Tx-10 se inyectaron a los 19 días de edad en el hipotálamo medio con timulina o con solución salina. Al día siguiente se les administraron 4 ó 2.5 u.i. de eCG y 54 h después 3 u.i. de hCG. Los animales se sacrificaron 20 h después de la administración de hCG.

A la autopsia los animales se procesaron como se indicó anteriormente.

Experimento 5. Análisis de la respuesta ovulatoria y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones Tx-10 inyectados con timulina en la hipófisis y tratados con eCG.

A los 19 días de edad ratones Tx-10 se inyectaron en la hipófisis con timulina o con solución salina. Al día siguiente se les administraron 2.5 u.i. de eCG. Los animales se sacrificaron a los 23 días de edad y a la autopsia se procesaron como se indicó anteriormente. Como grupo de comparación se utilizaron ratones Tx-10, a los cuales se les inyectó solución salina en la hipófisis y se procesaron de igual forma que el grupo anterior.

RESULTADOS

1. Efectos de la timentomía infantil sobre el desarrollo juvenil.

En la etapa juvenil, tanto los animales intactos como los Tx-10 tuvieron la vagina cerrada y no presentaron ovocitos en los oviductos. El peso corporal fue similar en ambos tipos de animales y el peso de los ovarios fue mayor en los ratones Tx-10 respecto a los intactos. En el resto de los parámetros evaluados no se observaron diferencias significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17 β -estradiol en el suero de ratones intactos o timentomizados a los diez días de edad (Tx-10), sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	Intactos	Tx-10
Número de animales	10	10
Peso corporal (g)	15.5 \pm 0.7	15.3 \pm 0.9
Ovarios (mg)	5.4 \pm 0.2	7.7 \pm 0.4 *
Útero (mg)	27.0 \pm 3.2	33.2 \pm 3.8
17 β -estradiol (pg/ml)	55.1 \pm 2.4 (5)	63.6 \pm 1.2 (2)

() número de animales en los que se cuantificó la hormona

* $p < 0.05$ vs intacto (Prueba de t de Student)

2. Efectos de la timentomía infantil sobre la pubertad y la ovulación espontáneas.

La timentomía realizada a los diez días de edad provocó retraso en la edad de la apertura vaginal espontánea y adelanto en la presencia del primer estro vaginal en comparación con los ratones intactos. En ambos grupos, sólo un animal de siete ovuló espontáneamente. Los ratones Tx-10 alcanzaron menor peso corporal que los animales intactos y los pesos de los ovarios y el útero mostraron una tendencia al menor crecimiento ponderal, tanto en valores absolutos como expresados en

función del peso corporal (ovarios: 4.5 ± 0.5 vs 5.4 ± 0.2 ; útero: 36.7 ± 5.3 vs 43.9 ± 6.0 mg/10g pc, NS). La concentración de 17β -estradiol en el suero de los Tx-10 fue significativamente menor a la de los intactos (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de la edad de la apertura vaginal, de la presencia del primer estro vaginal, del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones intactos o timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), sacrificados el día del primer estro vaginal.

Parámetros	Intactos	Tx-10
Número de animales	7	7
Apertura vaginal (días)	24.3 ± 0.4	26.7 ± 0.4 *
Primer estro (días) ♦	5.4 ± 0.8	2.3 ± 0.5 *
TAO	1/7	1/7
Número de ovocitos	11	3
Peso corporal (g)	21.4 ± 0.3	20.4 ± 0.3 *
Ovarios (mg)	11.5 ± 0.4	9.3 ± 1.2
Útero (mg)	94.1 ± 12.7	75.3 ± 11.2
17β -estradiol (pg/ml)	79.9 ± 3.9 (5)	64.5 ± 3.0 (5) *

♦ días posteriores a la apertura vaginal

() número de animales en los que se cuantificó la hormona

* $p < 0.05$ vs intacto (Prueba de t de Student)

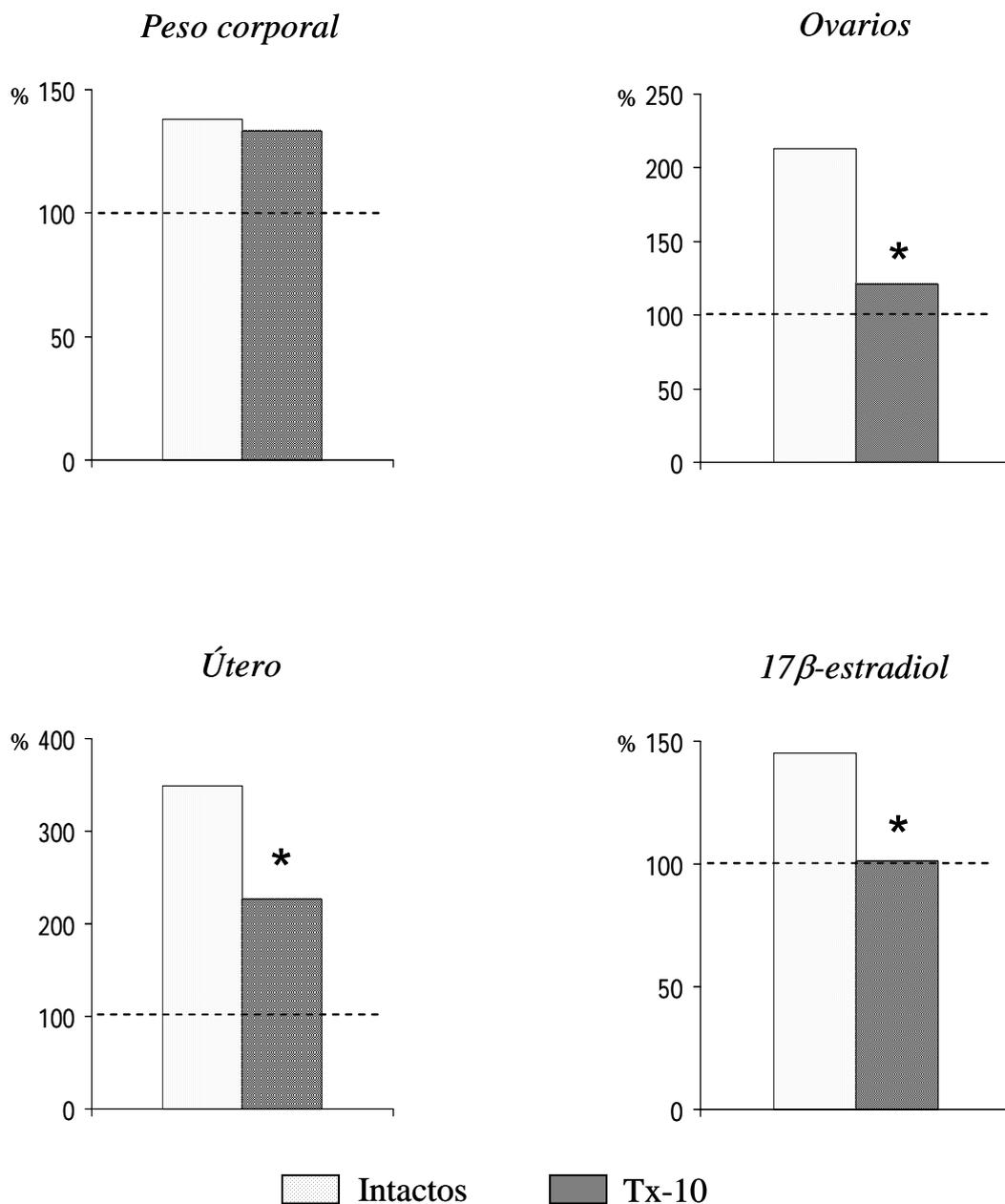
El análisis comparativo del peso de los ovarios y el útero y de la concentración de 17β -estradiol en el suero, en las etapas juvenil y puberal de los ratones intactos o Tx-10, mostró que en el animal intacto todos los parámetros se incrementaron de una etapa a otra, mientras que en el ratón Tx-10 sólo el peso del útero aumentó de manera significativa (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. del peso de los ovarios y el útero (mg/10g pc) y de la concentración de 17β -estradiol (pg/ml) en el suero de ratones intactos o timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), sacrificados a los 23 días de edad (etapa juvenil) o el día del primer estro vaginal (etapa puberal).

Parámetros	Intactos		Tx-10	
	Juvenil (n=10)	Puberal (n=7)	Juvenil (n=10)	Puberal (n=7)
Ovarios	3.5 \pm 0.1	5.4 \pm 0.2 *	5.1 \pm 0.3	4.5 \pm 0.5
Útero	17.0 \pm 1.3	43.9 \pm 6.0 *	21.3 \pm 1.8	36.7 \pm 5.3 *
17β -estradiol	55.1 \pm 2.4	79.9 \pm 3.9 *	63.6 \pm 1.2	64.5 \pm 3.0

* $p < 0.05$ vs etapa juvenil correspondiente (Prueba de t de Student)

En la figura 11 se muestran los parámetros evaluados en los ratones intactos o Tx-10 expresados en porcentaje, donde se observa el incremento que se presenta de la etapa juvenil a la puberal. No obstante que ambos tipos de animales alcanzaron proporcionalmente el mismo peso corporal, el incremento en el peso de los ovarios y el útero así como la concentración de 17β -estradiol en el suero de los Tx-10 fueron significativamente menores respecto a los alcanzados por los animales intactos.



* $p < 0.05$ (Prueba de t de Student)

Figura 11. Media expresada en porcentaje del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones intactos o timectomizados a los diez días de edad (Tx-10). Por arriba de la línea punteada se observa el incremento que presentaron ambos tipos de animales de la etapa juvenil a la puberal ($p < 0.05$ de la media geométrica en escala logarítmica).

3. Respuesta ovulatoria de los ratones Tx-10 inyectados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no con hCG.

En la tabla 4 se observa que uno de los cuatro animales Tx-10 tratados con 4 u.i. de eCG ovuló. Sin embargo, cuando se administró esta concentración de eCG y posteriormente 3 u.i. de hCG, todos los animales ovularon el doble de la cuota ovulatoria que presenta el animal adulto (10.7 ± 0.6) (Rosas y cols., 2005) por lo que se considera superovulación. No se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros evaluados.

Tabla 4. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones timectomizados a los diez días de edad, tratados con 4 u.i. de eCG o con 4 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	4 u.i. eCG	4 u.i. eCG + 3 u.i. hCG
Número de animales	4	6
TAO	1/4	6/6 *
Número de ovocitos	14	19.7 ± 3.7
Peso corporal (g)	12.0 ± 2.9	13.9 ± 0.8
Ovarios (mg)	10.2 ± 1.9	9.8 ± 1.0
Útero (mg)	60.5 ± 12.8	65.3 ± 4.4
17β -estradiol (pg/ml)	69.3 ± 3.7 (2)	61.6 ± 6.8 (3)

* $p < 0.05$ vs 4 u.i. de eCG (Prueba exacta de Fisher)

Un efecto similar al tratamiento anterior se observó en la tasa de animales ovulantes y en la respuesta ovulatoria de los animales Tx-10 al disminuir la concentración de eCG a 2.5 u.i., excepto la presencia de superovulación. El peso corporal de los animales inyectados con eCG y hCG fue significativamente mayor al de los animales tratados sólo con eCG. El resto de los parámetros no mostraron

diferencias significativas (Tabla 5). El análisis del peso de los órganos en función del peso corporal mostró que el peso del útero de los animales tratados con 2.5 u.i. de eCG + hCG fue menor que el del grupo con eCG (45.8 ± 1.0 vs 57.8 ± 3.0 mg/10g pc, $p < 0.05$) y en el peso de los ovarios no se observaron diferencias (5.9 ± 0.3 vs 6.5 ± 0.3 mg/10g pc, NS)

Tabla 5. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones timentomizados a los diez días de edad, tratados con 2.5 u.i. de eCG o con 2.5 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	2.5 u.i. eCG	2.5 u.i. eCG + 3 u.i. hCG
Número de animales	9	10
TAO	0/9	10/10 <i>a</i>
Número de ovocitos	0	8.5 ± 0.6
Peso corporal (g)	11.8 ± 0.3	14.6 ± 0.4 <i>b</i>
Ovarios (mg)	7.6 ± 0.3	8.7 ± 0.5
Útero (mg)	67.9 ± 3.6	66.9 ± 1.7
17β -estradiol (pg/ml)	55.4 ± 1.3 (3)	62.1 ± 6.1 (4)

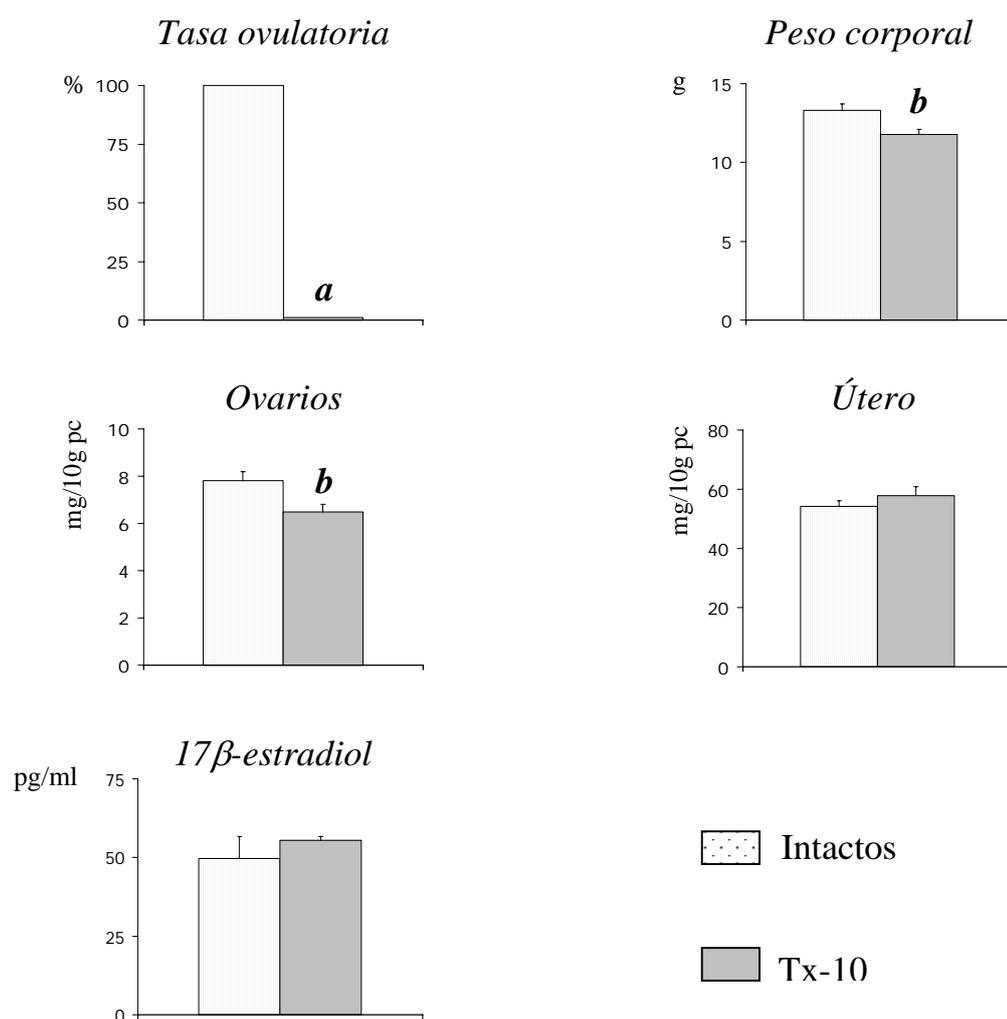
a, $p < 0.05$ vs 2.5 u.i. de eCG (Prueba exacta de Fisher)

b, $p < 0.05$ vs 2.5 u.i. de eCG (Prueba de *t* de Student)

Con base en estos resultados se decidió analizar si la ausencia de ovulación está vinculada con la falta de timo, por lo que se evaluó la respuesta ovulatoria de animales intactos frente al mismo estímulo gonadotrópico.

Los resultados se muestran en la figura 12 donde se observa que todos los ratones intactos ovularon en respuesta a las 2.5 u.i. de eCG, liberando un promedio de 10.5 ± 1.0 ovocitos, mientras que los Tx-10 tratados de igual forma no respondieron. El peso corporal fue menor en los animales Tx-10 respecto a los

intactos. El análisis del peso de los órganos en función del peso corporal, mostró que los ovarios tuvieron un menor crecimiento ponderal, lo que no se observó con el peso del útero. La concentración en suero de 17β -estradiol fue similar entre ambos tipos de animales.

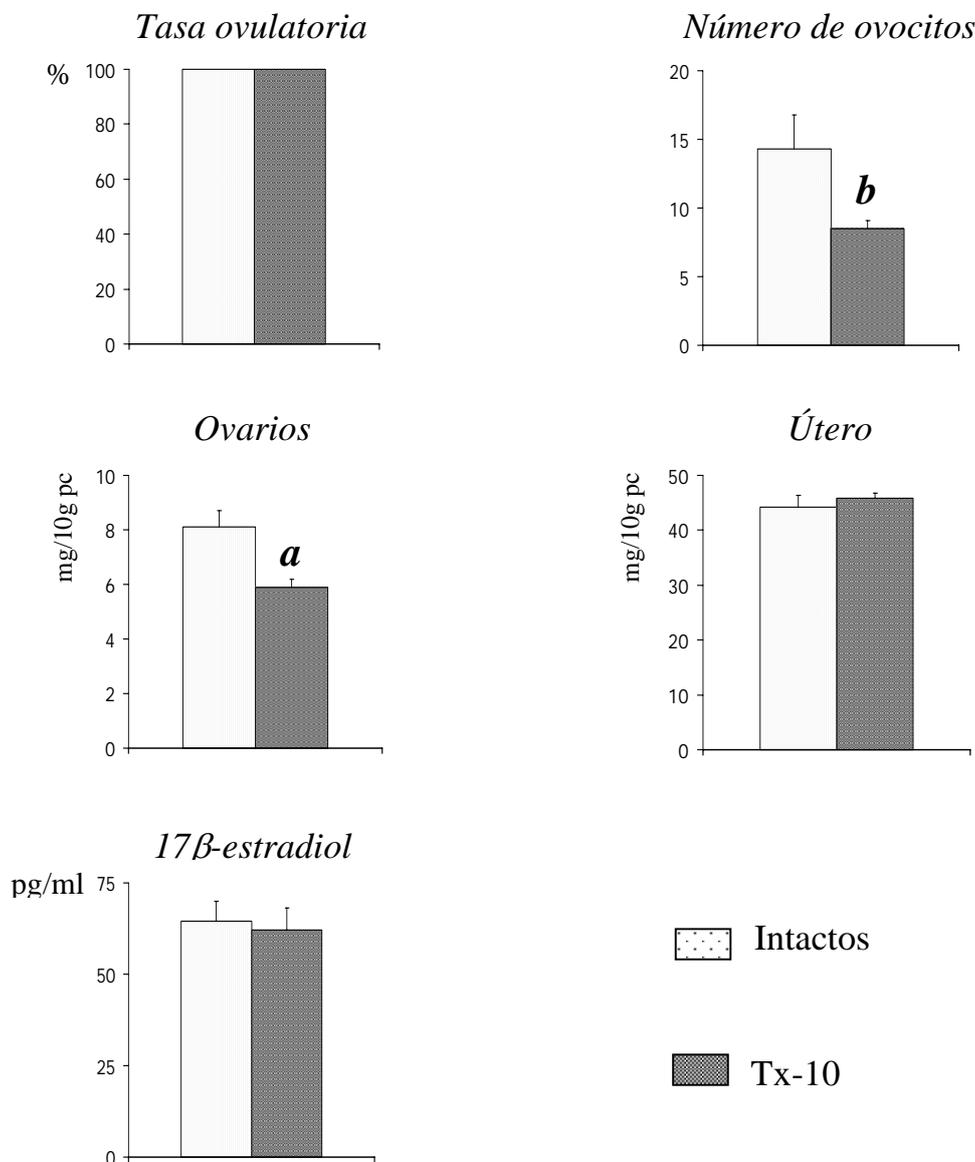


a, $p < 0.05$ vs intacto (Prueba exacta de Fisher)
b, $p < 0.05$ vs intacto (Prueba de *t* de Student)

Figura 12. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones intactos o timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), tratados con 2.5 u.i. de eCG y sacrificados a los 23 días de edad.

Los resultados anteriores nos llevan a proponer que el ratón Tx-10 no tiene la capacidad de secretar la LH necesaria para ovular, por lo que se decidió inyectar con hCG tanto a ratones intactos como Tx-10 previamente estimulados con eCG.

En la figura 13 se observa que la respuesta ovulatoria de ambos tipos de animales tratados con 2.5 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG fue del 100%, sin embargo la cuota ovulatoria de los ratones Tx-10 fue significativamente menor comparada con la de los intactos. El peso corporal de los animales Tx-10 fue mayor que el de los intactos (14.6 ± 0.4 vs. 11.6 ± 0.6 g, $p < 0.05$). En función del peso corporal, el peso de los ovarios de los animales Tx-10 tuvieron un menor crecimiento ponderal, mientras que el peso del útero fue similar y la concentración de 17β -estradiol en el suero de los animales Tx-10 no presentó diferencias significativas respecto a los intactos.



a, $p < 0.05$ vs intacto (Prueba de *t* de Student)

b, $p < 0.05$ vs intacto (Prueba *t* de Student de 1 cola)

Figura 13. Tasa de animales ovulantes y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso de los ovarios y del útero y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones intactos o timectomizados a los diez días de edad (Tx-10), tratados con 2.5 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG y sacrificados a los 23 días de edad.

4. Respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con timulina en el hipotálamo medio y tratados con diferentes concentraciones de eCG y estimulados o no con hCG.

Con base en los resultados anteriores se decidió analizar si la timulina administrada en el hipotálamo medio era capaz de estimular o incrementar la tasa de animales ovulantes, así como la cuota ovulatoria del ratón Tx-10 tratado con diferentes concentraciones de gonadotropinas.

En la tabla 6 se observa que ninguno de los animales Tx-10 tratados con solución salina (SS) y 4 u.i. de eCG logró ovular, respuesta que no fue modificada al inyectar timulina intrahipotalámica. Los pesos corporal y de los órganos y la concentración en suero de 17 β -estradiol no presentaron diferencias significativas.

Tabla 6. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17 β -estradiol en el suero de ratones timectomizados a los diez días de edad, inyectados en el hipotálamo medio con solución salina (SS) o timulina a los 19 días de edad, tratados con 4 u.i. de eCG a los 20 días de edad y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	SS	Timulina
Número de animales	7	5
TAO	0/7	0/5
Número de ovocitos	0	0
Peso corporal (g)	13.5 \pm 0.5	12.6 \pm 1.2
Ovarios (mg)	11.5 \pm 0.9	12.5 \pm 1.4
Útero (mg)	73.6 \pm 3.5	71.9 \pm 5.1
17 β -estradiol (pg/ml)	51.2 \pm 2.0 (4)	58.9 \pm 4.0 (3)

() número de animales en los que se cuantificó la hormona

* p<0.05 vs SS (Prueba de *t* de Student)

Al no haber respuesta ovulatoria en los animales inyectados con timulina en el hipotálamo medio y posteriormente estimulados con 4 u.i. de eCG, se realizó un grupo de ratones Tx-10 con microinyección de timulina en el hipotálamo medio y estimulados de manera secuencial con 4 u.i. de eCG+3 u.i. de hCG.

Todos los animales Tx-10 inyectados con SS o timulina en el hipotálamo medio ovularon en respuesta a 4 u.i. de eCG+3 u.i. de hCG. El número de ovocitos liberados, así como el resto de los parámetros evaluados no presentaron diferencias significativas (Tabla 7). Debido a que el número de ovocitos liberados fue mayor al de la cuota ovulatoria del animal adulto normal, se decidió disminuir la concentración de eCG a 2.5 u.i.

Tabla 7. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17β -estradiol en el suero de ratones timectomizados a los diez días de edad, inyectados con solución salina (SS) o timulina en el hipotálamo medio a los 19 días de edad, tratados con 4 u.i. de eCG a los 20 días de edad y 54 horas después con 3 u.i. de hCG y sacrificados a los de 23 días de edad.

Parámetros	SS	Timulina
Número de animales	5	9
TAO	5/5	9/9
Número de ovocitos	22.4 \pm 3.6	16.6 \pm 1.7
Peso corporal (g)	12.3 \pm 0.7	12.5 \pm 0.3
Ovarios (mg)	12.6 \pm 1.5	11.2 \pm 0.9
Útero (mg)	55.6 \pm 3.1	60.4 \pm 1.9
17β -estradiol (pg/ml)	60.2 \pm 5.3 (3)	61.1 \pm 5.3 (4)

() número de animales en los que se cuantificó la hormona

La respuesta ovulatoria de los ratones Tx-10 tratados con SS o timulina en el hipotálamo medio fue similar al administrar 2.5 u.i. de eCG + 3 u.i. de hCG. La concentración en suero de 17 β -estradiol, así como los pesos de los órganos, no presentaron diferencias significativas (Tabla 8).

Tabla 8. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados, del peso corporal y de los órganos y de la concentración de 17 β -estradiol en el suero de ratones timectomizados a los diez días de edad, inyectados con solución salina (SS) o timulina en el hipotálamo medio a los 19 días de edad, tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad y 54 horas después 3 u.i. de hCG y sacrificados a los de 23 días edad.

Parámetros	SS	Timulina
Número de animales	9	6
TAO	9/9	6/6
Número de ovocitos	9.9 \pm 0.5	9.5 \pm 0.8
Peso corporal (g)	13.7 \pm 0.4	13.9 \pm 0.5
Ovarios (mg)	8.9 \pm 0.6	8.9 \pm 0.8
Útero (mg)	59.9 \pm 3.2	55.0 \pm 2.9
17 β -estradiol (pg/ml)	66.0 \pm 4.9 (4)	70.5 \pm 3.4 (3)

() número de animales en los que se cuantificó la hormona

5. Respuesta ovulatoria de ratones Tx-10 inyectados con timulina en la hipófisis y tratados con 2.5 u.i. de eCG.

Cuando a los ratones Tx-10 se les administró timulina en la hipófisis, no presentaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes respecto al grupo inyectado con SS. Sin embargo, el número de ovocitos liberados por los animales tratados con timulina fue mayor que el observado en los animales con SS (Tabla 9).

Tabla 9. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados de ratones timectomizados a los diez días de edad, inyectados en la hipófisis con solución salina (SS) o timulina a los 19 días de edad, tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	SS	Timulina
Número de animales	9	13
TAO	3/9	5/13
Número de ovocitos	8.0 \pm 0.6	10.6 \pm 0.8 *

* $p < 0.05$ vs SS (Prueba de t de Student de una cola)

El análisis del peso corporal y de los órganos en función de la presencia de ovulación, mostró que en el grupo inyectado con solución salina, el peso corporal de los que ovularon fue significativamente mayor que el de los no ovulantes, mientras que el peso de los órganos no mostró diferencias significativas. El mismo análisis realizado en el grupo de animales inyectados con timulina mostró que el peso corporal fue similar entre ovulantes y no ovulantes, pero el peso de los ovarios fue significativamente mayor en los que se presentó la ovulación. El peso del útero no mostró diferencias significativas (Tabla 10).

En los animales tratados con timulina el peso corporal fue similar independientemente de la presencia de ovulación. Sin embargo, el peso de los ovarios de los animales ovulantes fue significativamente mayor al de los no ovulantes, aún comparándolos con los tratados con solución salina (Tabla 10).

Tabla 10. Media \pm e.e.m. del peso corporal y de los órganos de ratones timectomizados a los diez días de edad, inyectados en la hipófisis con solución salina (SS) o timulina a los 19 días de edad, tratados con 2.5 u.i. de eCG a los 20 días de edad y sacrificados a los 23 días de edad.

Parámetros	SS		Timulina	
	ovulantes	NO ovulantes	ovulantes	NO ovulantes
Peso corporal (g)	13.9 \pm 0.1	11.2 \pm 0.5 a	14.7 \pm 0.4	13.9 \pm 0.4 b
Ovarios (mg)	8.3 \pm 0.4	7.8 \pm 0.3	10.5 \pm 0.5 b	7.8 \pm 0.4 a
Útero (mg)	66.4 \pm 2.6	67.9 \pm 3.2	67.5 \pm 5.2	64.8 \pm 2.9

a, $p < 0.05$ vs animales que ovularon (Prueba de *t* de Student)

b, $p < 0.05$ vs SS correspondiente (Prueba de *t* de Student)

Únicamente se pudo evaluar la concentración de 17β -estradiol en los animales inyectados con SS o timulina que presentaron ovulación y no mostraron diferencias significativas (65.3 ± 2.7 vs 63.1 ± 0.9 pg/ml, NS).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en el ratón, la timectomía realizada a los diez días de edad provoca deficiencias en el proceso de maduración sexual que se manifiestan al inicio de la pubertad. Además, que la inyección de timulina en la hipófisis restablece parcialmente la respuesta ovulatoria inducida, efecto que no ocurre cuando se inyecta timulina en el hipotálamo medio, lo que nos permite sugerir que la falta del timo desde la etapa infantil modifica los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas.

El análisis de los diversos parámetros de los ratones intactos o Tx-10 a la pubertad espontánea, corrobora lo previamente descrito para este último en el que la ausencia del timo desde la etapa infantil disminuye la capacidad esteroideogénica de los ovarios, lo que se refleja en el retraso del inicio de la pubertad y menor peso del útero (García, 1996; García y cols., 2000).

Los ratones Tx-10 sacrificados a la pubertad, alcanzaron menor peso corporal y de los ovarios, resultados que podrían estar vinculados con alteraciones en los mecanismos que regulan la secreción de la GH por la ausencia de timo. Al respecto, se ha mostrado que la adición de TF-5 o timulina a las células de adenohipófisis en cultivo incrementa la liberación de GH (Spangelo y cols., 1987; Badamchian y cols., 1991; Goya y cols., 1994; Brown y cols., 1999). Es probable que al extirpar el timo se este privando a la hipófisis de este estímulo, lo que se manifestaría en el crecimiento corporal y en el desarrollo del ovario ya que durante la etapa juvenil, este órgano madura bajo el control de la FSH y la LH pero bajo la influencia estimulante de la GH (Ojeda y cols., 1986).

En ambos tipos de animales la ovulación espontánea sólo se presentó en un animal, sin embargo en el ratón intacto la cuota ovulatoria fue mayor que en el animal Tx-10, evento que podría ser el resultado de la disminución del 40% en el número de folículos en crecimiento que presentan estos animales al primer estro vaginal (García, 1996; García y cols., 2000). García (1996) propone que la timectomía realizada en la etapa infantil, podría modificar la elevación de FSH que ocurre en esta etapa, la cual es fundamental para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad (Döhler y Wuttke, 1974; Hage y cols., 1978; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

El análisis comparativo de los parámetros de los animales intactos y Tx-10 en la etapa juvenil indica que en esta etapa aún no se manifiestan las diferencias que los distinguen al inicio de la pubertad, al parecer éstas se presentan y en algunos casos se acentúan, en la transición de la etapa juvenil a la puberal. Ojeda y colaboradores (1986) describen que al inicio de la etapa juvenil todos los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario incrementan su actividad secretora en respuesta a sus respectivos factores de regulación, lo que se refleja en mayor concentración en suero de estradiol biológicamente activo debido también a que la α -fetoproteína presenta un decremento conspicuo en esta etapa. Nuestros resultados parecen indicar que los procesos de maduración del eje que suceden durante la etapa juvenil no están ocurriendo normalmente en el ratón Tx-10, ya que en la etapa puberal la concentración de estradiol fue similar a la que presentó en la etapa juvenil, esto es, ya no se incrementó y el peso de los ovarios y el útero no alcanzaron el crecimiento ponderal que se observa en el animal intacto, lo que nos permite sugerir que el timo es un factor clave en el paso de la inmadurez a la madurez sexual.

García y colaboradores (2000) mencionan que los animales timectomizados se caracterizan por presentar una menor capacidad de respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico. El hecho que los animales prepúberes intactos hayan ovulado en respuesta a 2.5 u.i. de eCG y los Tx-10 no y que al tratarlos con ambas gonadotropinas los Tx-10 hayan presentado una cuota ovulatoria menor, confirman esta aseveración.

Los resultados anteriores muestran que en el ratón Tx-10, el sólo estímulo con 2.5 u.i. de eCG no es suficiente para inducir la ovulación, lo que indica que no es capaz de liberar la concentración preovulatoria de LH. Al respecto se ha descrito que la timulina adicionada al cultivo de células hipofisarias estimula la liberación de LH (Zaidi y cols., 1988; Hadley y cols., 1997; Brown y cols., 2000; Hinojosa y cols., 2004). Es probable que al eliminar el timo y por ende la timulina, se esté privando a la hipófisis de este estímulo. También se ha descrito que los efectos estimulantes de la timulina sobre la secreción de LH por la hipófisis dependen de la presencia de estradiol (Ortega y cols., 2005), esteroide cuya concentración mostramos que es deficiente en el ratón Tx-10.

La disminución en la cuota ovulatoria de los animales Tx-10 cuando se tratan con ambas gonadotropinas, podría deberse al decremento en el número de folículos en crecimiento que presenta este modelo, pérdida que se recupera por la administración de eCG, sin embargo los folículos no son rescatados de la atresia como ocurre con el animal intacto (García, 1996). Con nuestros resultados se confirma que en el ratón Tx-10, además del estímulo gonadotrópico es necesaria la presencia del timo para observar una respuesta ovulatoria similar a la del ratón intacto.

La presencia de superovulación, evento que es definido como el doble de la cuota ovulatoria normal (Greenwald y Roy, 1994), en los animales Tx-10 tratados con 4 u.i. de eCG y posteriormente hCG, indica que el ovario de estos animales responde bajo un estímulo gonadotrópico mayor, por lo que una posible explicación a la ausencia de ovulación cuando sólo son estimulados con 4 u.i. de eCG, sería la inhibición o el retraso en la liberación preovulatoria de LH debido a un efecto estrogénico como ha sido descrito (Welschen y Rutte, 1971; Cerda, 1998; García, 2000).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que en el ratón prepúber intacto inyectado con eCG, la timulina administrada por vía sistémica juega un papel estimulante en el proceso ovulatorio (Hinojosa, 1998; Hinojosa y cols., 1999). Resultados similares se obtienen cuando se administra la timulina en el hipotálamo medio, previo al estímulo con eCG (García y cols., 2005). Nuestros resultados indican que en el ratón Tx-10 esto último no sucede, lo que sugiere que la interacción entre la timulina y los mecanismos que regulan la secreción de la GnRH se establece desde etapas más tempranas del desarrollo prepuberal. El hecho que en el ratón Tx-10 se normalicen las alteraciones reproductoras, incluso la respuesta ovulatoria inducida, cuando la timulina se administra diariamente por vía sistémica e inmediata a la timectomía (García, 1996; García y cols., 2000), apoya esta interpretación.

Se ha mostrado que la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico de los ratones prepúberes intactos también se incrementa al inyectar timulina en la hipófisis, lo que se atribuye a un efecto estimulante de la timulina sobre la sensibilidad de los gonadotropos a la GnRH (García y cols., 2005). En nuestro estudio observamos que la administración de timulina en la hipófisis de los Tx-10

no modificó la tasa de animales ovulantes, pero sí favoreció el crecimiento de los ovarios y la liberación de un número mayor de ovocitos. Es probable que en los animales Tx-10 la timulina amplifique la sensibilidad de los gonadotropos facilitando la respuesta a la secreción tónica de GnRH.

En resumen nuestros resultados muestran que en el animal privado del timo desde los diez días de edad la administración única de timulina en el eje hipotálamo-hipofisario no es suficiente para amplificar la respuesta ovulatoria, independientemente de la concentración de eCG utilizada, lo que nos permite sugerir que:

- la deficiencia en el desarrollo folicular y la respuesta ovulatoria del ratón Tx-10, probablemente se debe a la falta de timulina en el ovario, ya que ésta participa en los procesos de reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990).
- la deficiencia en la capacidad esteroidogénica de los ovarios del ratón Tx-10 podría ser la causa de que la timulina no ejerza sus efectos estimulantes sobre la secreción de gonadotropinas por la hipófisis (Hinojosa y cols., 2003; Hinojosa y cols., 2004; Ortega y cols., 2005).
- el timo y por ende la timulina son necesarios en el proceso de maduración sexual, sin descartar la posible participación de otras timosinas producidas por el propio timo (Rebar y Miyake., 1981).

El hecho que lo animales se encuentren privados del timo desde la etapa infantil y por ende de timulina, al parecer modifica el ambiente hormonal del animal prepúber, no siendo el adecuado para que después de diez días la timulina estimule la secreción preovulatoria de LH.

CONCLUSIONES

- En el ratón, la timectomía realizada a los diez días de edad retrasa el inicio de la pubertad, disminuye el crecimiento ponderal de los ovarios y el útero y disminuye la capacidad esteroideogénica del ovario.
- Las deficiencias reproductoras del ratón con timectomía infantil se manifiestan hasta la etapa puberal.
- El ratón timectomizado a los diez días de edad no es capaz de responder al estímulo con eCG y ovular.
- En el ratón con timectomía infantil, la inyección de timulina en el hipotálamo medio no modifica la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico.
- La inyección de timulina en la hipófisis restablece la cuota ovulatoria en el ratón timectomizado en respuesta al tratamiento con eCG.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar B. (2003). Integración neuroendocrina. En: Fisiología humana. 2ª edición. Tresguerras J. MacGraw-Hill. Interamericana. México. 861-877.
- Audersik T y Audersik G. (1996). Reproducción animal. En: Biología. La Vida en la Tierra. 4ª edición. Prentice Hall, Pearson Educación Latinoamericana. México. 772 pp.
- Bach JF y Dardenne M. (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: Thymic hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 593-599.
- Bach JF, Dardenne M, Pléau JM y Sosa J. (1977). Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* **266**, 55-57.
- Badamchian M, Spangelo B, Damavandy T, MacLeod R y Goldstein A. (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.
- Bellanti J y Kadlec J. (1986). Inmunología general. En: Inmunología. 3ª edición. Interamericana, México. 18-58.
- Bentley P. (1982). Endocrinología. En: Fisiología comparada. L Goldstein Ed. Nueva Editorial Interamericana, México. 347-410.
- Besedovsky H y Sorkin E. (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.
- Becú-Villalobos D y Lacau-Mengido I. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **40**, 1-17.
- Brown O, Sosa Y, Dardenne M, Pléau JM y Goya R. (1999). Growth hormone-release activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* **69**, 20-27.

- Brown O, Sosa Y, Dardenne M, Plèau JM y Goya R. (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J. Gerontology* **4**, B170-B176.
- Brown T. (1998). Steroid Hormones, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 634-644.
- Calzolari A. (1898). Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la foction du thymus et celle des testicules. *Arch. Ital. Biol.* Torino **30**, 71-77. Tomado de: Rebar R. (1984). Effects of thymic peptides on hypothalamic-pituitary fuction. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications*. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 325-334.
- Cerda A. (1998). Estudio de los efectos de la administración sistémica de la timulina en diferentes etapas del desarrollo postnatal del ratón en la pubertad y la ovulación. Tesis de licenciatura. Carrera de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México. 60 pp.
- Charli J, Ponce G y Joseph-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Miguel Àngel Porrua, México. 57-82.
- Cruse J y Lewis R. (1995). *Illustrated Dictionary of Immunology*. CRC Press, Neva York. 327 pp.
- Dalakas M, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever J y Goldstein A. (1984). Thymosin β_4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: *Thymic Hormones and Lynphokines. Basic Chemistry and Clinical Aplications*. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 119-125.
- Dardenne M y Bach JF. (1981). Thymic hormones. En: *The Thymus Gland*. MD Kendall Ed. Academic Press, New York. 113-131.
- Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaseirlian D, Hassid J y Bach J. (1986). Thymic hormone-containg cells. VII. Adrenal and gonads control the in vivo secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J. Immunology* **136**, 1303-1308.

- Döhler K y Wuttke W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* **94**, 1003-1008.
- Domínguez R. (1997). Endocrinología de las gónadas. En: Curso Internacional Precongreso. Actualización en Fisiología. Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-280.
- Domínguez R, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. R Domínguez Ed. PUIS-UNAM. Miguel Ángel Porrúa. México. 163-192.
- Everett J. (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York, 1509-1526.
- Fawcett DW. (1995). Tratado de Histología. 12^a edición. Interamericana, México. 489-491.
- Flanagan S. (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. Camb.* **8**, 295-309.
- Franklin K y Paxinos G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. New York. 93 figuras.
- García L. (1996). Estudio de los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre el proceso de pubertad y la ovulación en el ratón. Tesis de licenciatura. Carrera de Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 66 pp.
- García L. (2000). 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 de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 92 pp.
- García L. (2005). Estudio de los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis sobre las funciones del ovario del ratón prepúber tratado con eCG. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 109 pp.

- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. (2000). Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J. Endocrinol.* **166**, 381-387.
- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. (2005). Effects of injection thymulin into the anterior or medial hypothalamus or pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* **12**, 314-320.
- Geneser F. (2000). Histología. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana, México. 421-427.
- Goldstein A, 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. En: *Recent Progress in Hormone Research*. RO Greep Ed. Academic Press, New York. 369-415.
- Gore-Langton R y Armstrong D. (1994). Follicular Steroidogenesis and Its Control. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 571-627.
- Goya R, Sosa Y, Brown O y Dardenne M. (1994). In vitro studies on the thymus-pituitary axis in young and old rats. *Ann NY Acad Sci* **741**, 108-114.
- Greenwald G y Roy S. (1994). Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 629-724.
- Hadley M. (2000). Endocrinology. 5ª edición. Prentice-Hall, Brasil. 89-93.
- Hadley A, Rantle C y Buckingham J. (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* **4**, 62-69.
- Hafez E. (1989). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 5ª edición. ESE Hafez Ed. Interamericana, México. 142-181.
- Hage A, Groen-Klevant A y Welschen R. (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocr.* **88**, 375-382.

- 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 hipotímicos. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 79 pp.
- 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. Endocrinol.* **163**, 255-260.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura P y Rosas P. (2003). Sex differences on the effects of thymulin and GnRH on gonadotropin release by *in vitro* pituitary cells. XXVIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. 185-198.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura P, Castillo L y Rosas P. (2004). Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by *in vitro* pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci.* **76**, 795-804.
- Hinshelwood M. (1998). Steroidogenesis, Overview. En: Enciclopedia of Reproduction. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 644-653.
- Horecker B. (1984). Thymosin β_4 . Distribution and biosynthesis in vertebrate cells and tissues. En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 77-88.
- Ing N. (1998). Steroid Hormone Receptors. En: Enciclopedia of Reproduction. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 654-661.
- Jänig W. (1993). Sistema nervioso vegetativo. En: Fisiología humana. 24^a edición. RF Schmidt Ed. Latinoamericana. Mc Graw-Hill. España. 384-391.
- Kosiewicz M y Michael S. (1990). Neonatal thymectomy effects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J. Rep. & Fert.* **88**, 427-440.

- Ledwitz-Rigby F y Scheid P. (1990). Thymulin (Serum Thymic Factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotrophins in vitro. VIII ovarian Workshop. Maryville, Tennessee. 473-478.
- McCann S, Lipton J, Sternberg E, Chrousos G, Gold P y Smith C. Eds. (1998). Neuroimmunomodulation: Molecular aspects, integrative systems, and clinical advances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **840**. The New York Academy of Sciences. New York. 866 pp.
- Merchenthaler I, Culler MD, Petrusz P, Flerko B y Negro-Vilar A. (1989). Immunocytochemical localization of the gonadotropin-releasing hormone-associated peptide portion of the LHRH precursor in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the rat central nervous system. *Cell Tissue Res.* **255**, 5-14.
- Michael S. (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: Factors Regulating Ovarian Function. GS Greenwald y PF Terranova Eds. Raven Press, New York. 445-464.
- Michael S, Taguchi O y Nishizuka Y (1980). Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol. Reprod.* **22**, 343-350.
- Michael S, Taguchi O, Nishizuka Y, McClure J, Goldstein A y Barkley M. (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin α_1 . En: Dynamics of Ovarian Function. NB Schwartz y M Hunzicker-Dunn Eds. Raven Press, New York. 279-284.
- Nishizuka Y y Sakakura T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753-755.
- O' Malley y Strott C. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico. 4ª edición. SC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana, México. 118-143.

- Ojeda S y Urbanski H. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 363-409.
- Ojeda S, Urbanski H y Ahmed C. (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Rec. Prog. Horm. Res.* **42**, 385-442.
- Ortega C, Ortega N, Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P. (2005). Respuesta diferencial de las células de adenohipófisis de rata hembra o macho a la administración de timulina en la secreción de FSH y LH. Papel de los esteroides sexuales. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C208.
- Ortega N, Ortega C, Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P. (2004). Participación de los esteroides sexuales en los efectos de la timulina sobre la secreción *in vitro* de las gonadotropinas en hipófisis de rata macho XLVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C211.
- Palkovits M. (2000). Micro and macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. PM Conn y ME Freeman Eds. Human press, Totowa, New Jersey. 23-40.
- Peter H. (1970). Some aspects of early follicular development. En: *Ovarian Follicular Development and Function*. AR Midgley y WA Sadler Eds. Raven Press, New York. 1-3.
- Raynaud J. (1973). Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids* **21**, 249-258.
- Rebar R. (1984). Effects of thymic peptides on hypothalamic-pituitary fuction. En: *Thymic Hormones and Lymphokines*. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New Cork. 325-334.
- Rebar R y Miyake A. (1981). Thymosin Stimulates Secretion of Luteinizing Hormone-Releasing Factor. *Science* **214**, 669-671.
- Rebar R, Morandini I, Benirschke K y Petze J. (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* **107**, 2130-2132.

- Rosas P, Argüello M y Domínguez R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Med. Sci. Res.* **17**, 285-286.
- Rosas P, Hinojosa L, Huerta D, Sánchez S y Domínguez R. (2005). Tasa de fertilidad y respuesta ovulatoria de ratones congénitamente alopecicos e hipotímicos. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C-209.
- Ruiz D. (1988). Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. UNAM. México. 81-108.
- Savino W. (1999). Neuroendocrine Control of the Thymus. Karger. Suiza. 144 pp.
- Savino W, Dardenne M, Papiernik M y Bach JF. (1982) Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **156**, 628-633.
- Silverman A, Livne I y Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The physiology of reproduction. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 1683-1709.
- Spangelo B, Judd A, Ross P, Login I, Jarvis W, Badamchian M, Goldstein A y MacLeod R. (1987). Thymosin fraction 5 stimulates prolactin and growth hormone release from anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **121**, 2035-2043.
- Uzumcu M, Akira S y Lin Y. (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Sci.* **51**, 1217-1228.
- Uzumcu M y Lin Y. (1994) Characterization of the stimulatory actions of thymic factor(s) on basal and gonadotropin-induced steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol. Cel. Endocrin.* **105**, 209-216.
- Van-voorhis B. (1998). Follicular development. En: Encyclopedia of Reproduction Vol 2. E Knobil y JD Neill Eds. Academic Press, USA. 376-389.

- Welschen R y Rutte M. (1971). Ovulation in adult rats after treatment with pregnant mare serum gonadotrophin during oestrus. *Acta Endocrin.* **68**, 41- 49.
- Yeh J y Adashi E. (2001). El ciclo ovárico. En: *Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico.* 4ª edición. SC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana, México.164-202.
- Zaidi S, Kendall M, Gillham B y Jones M. (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **12**, 253-264.