



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FES ZARAGOZA

Estudio de la participación de la timulina en la regulación de la secreción de la FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata adulta.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LORENA HINOJOSA BACA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

MÉXICO, D.F.



Octubre, 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.

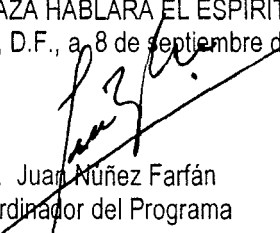
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de noviembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **HINOJOSA BACA LORENA** con número de cuenta **85366215** y número de expediente **500951019**, con la tesis titulada: **"Estudio de la participación de la timulina en la regulación de la secreción de la FSH y LH por las células de adenohipofisis de rata adulta"**, bajo la dirección del **Dr. Roberto Domínguez Casalá**.

Presidente:	Dra. Patricia Rosas Saucedo
Vocal:	Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Vocal:	Dra. Leticia Morales Ledesma
Vocal:	Dr. José Alonso Fernández Guasti
Secretario:	Dr. Roberto Domínguez Casalá
Suplente:	Dra. Margarita Virginia González del Pliego Olivares
Suplente:	Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de septiembre del 2006.



Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

A las siguientes instituciones por el apoyo financiero

UNAM-DGEP por la beca de Doctorado

CONACyT por la beca de Doctorado

UNAM-PAEP por los proyectos 101312, 101313

UNAM- DGAPA-PAPIIT por los proyectos IN217301 e IN228005

A los miembros del Comité Tutoral por todas sus aportaciones y sugerencias

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

A los miembros del Jurado del examen por su empeño en la revisión de la Tesis y sus valiosas sugerencias

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. José Alonso Fernández Guasti

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Margarita Virginia González del Pliego Olivares

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

A mi hijo Leonardo

Por el amor que despertó en mí y por que me reafirmó el valor que tiene la vida

A mi esposo Gerardo

por su amor, apoyo constante, paciencia y compañía

A mi madre Bertha

A mis hermanos Lourdes, Verónica, Jesús y Mariano

A mis sobrinos Irving, Daniel, Sheila Mariana,

María Fernanda, Selene, Alan Jafeth

Citlaly y Alonso

A mis seres queridos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por su amistad, apoyo constante y ser pilar en mi formación profesional.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por su enseñanza y ayuda brindada para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Marta C. Romano Pardo y a la Biol. Carolina Miranda Brito, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, por el apoyo técnico en los cultivos celulares.

Al Dr. Pablo Damián Matsumura, del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM Iztapalapa y al Biol. Roberto Chavira, del Laboratorio de Hormonas Esteroides del INCMN "Salvador Zubirán", por la colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano, de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, por las facilidades otorgadas para la realización de los cultivos.

A la M. en C. Lourdes Castillo Granada, del Laboratorio de Espectroscopia, por su colaboración en la medición de la concentración de zinc.

Al Dr. Isaías Salgado Ugarte y al Dr. Xavier Chiappa Carrara, por su asesoría en estadística.

A la MVZ. Adriana Altamirano y al MVZ. Román Hernández, por todas las facilidades obtenidas para trabajar con las ratas en el Bioterio y al personal, por el mantenimiento de los animales utilizados en este estudio.

A Naham Ortega y Claudia Ortega, por su apoyo en los cultivos en machos.

A mis compañeros del Laboratorio de Neuroimmuno-endocrinología: Lorena, Bárbara, Adriana, Claudia y Naham.

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

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
GLOSARIO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Eje hipotálamo-hipófisis	3
Hipotálamo	3
Hipófisis	6
La FSH y LH	8
Las hormonas esteroideas secretadas por las gónadas	10
Ciclo estral en la rata	12
Regulación de la secreción de FSH y LH en la hembra	15
Participación de los esteroides sexuales en la regulación estimulante e inhibitoria de la secreción de FSH y LH	16
Regulación neuroendócrina del eje hipotálamo-hipófisis en el macho	18
Características del timo	19
Relaciones neuroendócrinas entre el timo y el sistema reproductor	23
Efecto de los péptidos tímicos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	26
Características de la timulina	28
Mecanismos de acción de la timulina	29
Efectos de la timulina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	30
Interacción funcional de la timulina con otras hormonas hipofisarias	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40

RESULTADOS	44
Análisis de las variaciones de las concentraciones de FSH, LH y esteroides sexuales .	44
Variaciones de la concentración de zinc	45
Análisis de los efectos de la adición de GnRH a cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH	46
Estudio de los efectos de la adición de timulina a cultivos de células de adenohipófisis de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH, basal o estimulada por GnRH	47
Análisis comparativo de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis preincubadas con esteroides sexuales y estimuladas o no con timulina, con GnRH o con ambas	49
Estudio de los efectos de la timulina adicionada a cultivos de células de adenohipófisis de rata obtenidas en cada uno de los días del ciclo estral (diestro 1, diestro 2, proestro o estro), sobre la liberación de FSH y LH, tanto basal como estimulada con GnRH	57
Artículo: Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by <i>in vitro</i> pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle	59
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	78
PUBLICACIONES	95

GLOSARIO

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
CLIP	Péptido del lóbulo intermedio parecido a la corticotropina
DAG	Diacilglicerol
D-MEM	Medio Dulbecco´s Modified Eagle
eCG	Gonadotropina coriónica equina (antes PMSG)
FSH	Hormona estimulante del folículo
FTS	Timulina o factor tímico del suero
GABA	Ácido gama amino butírico
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la GH
GMPC	Guanosin monofosfato
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
TGF β-1	Factor de crecimiento transformante β -1
GTP	Guanosin trifosfato
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N´-[2-etanosulfónico]
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a la insulina I
IP₃	Inositol trifosfato
LH	Hormona luteinizante
MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
NPY	Neuropéptido Y
PRL	Prolactina
SP	Sustancia P
SR	Somatostatina
RIA	Radioinmunoanálisis
TF-5	Timosina fracción 5
TFX	Factor tímico X
THF	Factor tímico humoral
TRH	Hormona liberadora de la TSH
TSH	Hormona estimulante de la tiroides

RESUMEN

La timulina es un nonapéptido sintetizado exclusivamente por el epitelio del timo. Su administración sistémica en la etapa peripuberal del ratón hembra estimula la respuesta ovulatoria al tratamiento con eCG. *In vitro* la timulina estimula la esteroidogénesis gonadal, y la liberación de FSH y LH en la adenohipófisis de rata. Los resultados antes mencionados muestran que la timulina participa en los mecanismos que regulan al eje hipotálamo-hipófisis-gonada. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos que tiene la timulina en la regulación de la liberación de la FSH y LH por las células de la adenohipófisis de ratas hembras y machos, además se evaluó si sus efectos son modulados por el ambiente hormonal (esteroides sexuales) del animal del que se obtuvieron las células.

Se utilizaron cultivos en monocapa de células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas, los cuales se incubaron por 3 h en presencia de timulina, combinada o no con GnRH. Otras células se pretrataron por 24 h con progesterona (P_4), testosterona (T), ó 17β -estradiol (E_2), y luego se adicionó timulina, GnRH o ambas y se incubaron por 3 h. En otros experimentos se utilizaron cultivos en suspensión de células de adenohipófisis obtenidas de ratas en diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) o estro (E), y se estudiaron los efectos de la timulina en presencia o no de GnRH durante 1 h. La concentración de FSH y LH se cuantificó en el medio por la técnica de RIA.

En las células de adenohipófisis de macho, la timulina inhibió la liberación basal de las gonadotropinas, evento que fue revertido al agregar GnRH. En los cultivos celulares de hembra no se observaron cambios con ningún tratamiento.

En las células de la hembra, el pretratamiento con P_4 y posterior adición de timulina, resultó en un incremento de la liberación de FSH; mientras que con T y timulina su liberación disminuyó. El pretratamiento con E_2 y timulina no indujo cambios. La liberación de LH por las células preincubadas con P_4 y tratadas con timulina y GnRH fue menor que en las células que no se trataron con el esteroide; la adición del E_2 y timulina incrementó su liberación; la T no indujo cambios en la respuesta de las células a los diferentes tratamientos. En las células de macho, sólo la P_4 inhibió la acción de la timulina y GnRH en la liberación de LH.

En los cultivos en suspensión de células de adenohipófisis obtenidas de ratas en D1, la adición de timulina incrementó la liberación de FSH; efecto contrario se observó en el E. En el D1, D2 y P el tratamiento con timulina y GnRH resultó en una menor liberación de FSH. Una relación directamente proporcional se observó entre la concentración en suero de P_4 y la liberación de FSH inducida por timulina.

La adición de timulina al cultivo de células de ratas en D1, D2 o E estimuló la liberación de LH, lo que no ocurrió en el P. En el P y E, la timulina y la GnRH tuvieron un efecto sinérgico estimulante sobre la liberación de LH, mientras en el D1 se presentó un efecto inhibitorio en la liberación de la gonadotropina.

Los resultados muestran diferencias en la liberación de las gonadotropinas entre ambos sexos, así como en la respuesta de las células de la adenohipófisis a la timulina, GnRH o ambas. En el macho, la timulina ejerce un efecto inhibitorio en la liberación de las gonadotropinas. Mientras que en la hembra, la variabilidad en la liberación de la FSH y LH en respuesta a la timulina, GnRH o ambas durante el ciclo, indica que el efecto de la timulina depende de las interacciones neuroendócrinas que varían durante el ciclo estral. Con base en lo anterior es posible sugerir que la timulina actúa como un modulador fino de la acción de GnRH en los gonadotropos.

ABSTRACT

Thymulin is a nonapeptide exclusively synthesized by the thymic epithelium. When prepubertal mice are treated with thymulin, eCG injection stimulates ovulation. *In vitro* studies show that thymulin stimulates the gonadal steroidogenesis, FSH and LH release by the rat anterior pituitary, suggesting that thymulin participates in the mechanism regulating the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Then, present study was designed to analyze the effect of thymulin on gonadotropins release by adenohypophyseal cells from female and male rats, and to analyze if its effects are modulated by the hormonal milieu (sex steroids) of the donor animal. Adenohypophyseal cells obtained from female and male adult rats were incubated in a monolayer system during 3 h with or without thymulin, GnRH or thymulin+GnRH. In another study the cells were preincubated during 24 h with progesterone (P_4), testosterone (T), or 17β -estradiol (E_2); thymulin, GnRH or thymulin+GnRH were added and the incubation followed during 3 h. In a third study, adenohypophyseal cells obtained from female rats in diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), proestrus (P) or estrus (E) were incubated in a suspension system and the effects of adding thymulin, GnRH or thymulin+GnRH during 1 h were analyzed. In the culture medium the concentration of FSH and LH were measured by RIA.

In cells obtained from male rats, thymulin inhibited FSH and LH release, while adding GnRH to thymulin-treated cells reversed such effect. In adenohypophyseal cells obtained from female rats, thymulin had no effects.

In cells obtained from female rats, the pretreatment with P_4 followed by thymulin stimulation resulted in an increase in FSH release, while in T pretreated cells thymulin addition resulted in a diminution of FSH release and pretreatment with E_2 thymulin had no effects. In cells preincubated with P_4 the addition of thymulin+GnRH inhibited LH release in comparison with control (cells without P_4 preincubation). The preincubation with E_2 followed by the addition of thymulin resulted in an increase in LH release, while the pretreatment with T had no effect. In adenohypophyseal cells obtained from male rats, the preincubation with sex steroids did not affect FSH release, while the preincubation with P_4 inhibited the effects of thymulin+GnRH on LH release.

When adenohypophyseal cells obtained from female rats in D1 thymulin stimulated FSH release, while when the same treatment was done to cells obtained in E, an inhibition in the hormone release was observed. The addition of thymulin+GnRH to cells obtained from rats in D1, D2 or P inhibited FSH release. A proportional relation between P_4 serum levels and FSH release induced by thymulin was observed. Thymulin stimulated LH release in cells obtained from rats in D1, D2 or E, and had no effects in cells obtained from rats in P. Thymulin and GnRH had a synergic effect on LH release to cells obtained from rats in P or E, while in D1 the effects were inhibitory.

Present results show the existence of sex differences in the capacity of adenohypophyseal cells to release gonadotropins and the cell response to thymulin, GnRH or both on FSH and LH release. While in male thymulin inhibits gonadotropin release, in the female cells the effects of thymulin, GnRH or both varies during the estrous cycle, suggesting that the effects depend on the neuroendocrine interactions occurring during the estrous cycle. Based on present results we suggest that thymulin acts as a fine modulator on GnRH effects on gonadotropins.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, la función reproductora es regulada por señales neuroendócrinas en las que participan el Sistema Nervioso Central, la hipófisis y las gónadas (Fink, 1986, 1988; Everett, 1994). A partir de los resultados obtenidos con los animales timentomizados en la etapa neonatal o infantil (Besedovsky y Sorkin, 1974; Michael y col., 1980; Kosiewicz y Michael, 1990; García y col., 2000), los ratones con ausencia de timo (Rebar y col., 1981b) o hipoplasia tímica (Rosas y col., 1987; Rosas 1990), así como los efectos de las hormonas tímicas en modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* (Goldstein y col., 1981; Rebar y col., 1981a; Michael, 1983; Mendoza y Romano, 1989; Mendoza y col., 1995; Hinojosa y col., 1999), se muestra la existencia de una red de comunicación entre los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico. Esta red está conformada por numerosas hormonas, neurohormonas y neurotransmisores que participan como mensajeros entre el cerebro, el sistema nervioso periférico, la hipófisis, las gónadas y el sistema inmunológico.

En los seres vivos, el mantenimiento de la homeostasis requiere de sistemas de comunicación que garanticen la estabilidad del medio interno del individuo. Entre las señales provenientes del sistema inmunológico se describe a la timulina (hormona tímica), como un factor que participa en la regulación del sistema reproductor. Algunos estudios realizados en el ratón prepúber muestran que la inyección con eCG no induce la ovulación, mientras que si se administra la timulina 24 horas antes del tratamiento con eCG, los animales ovulan y aumenta el peso de los ovarios (Hinojosa, 1998; Hinojosa y col., 1999). En el ratón con timentomía realizada en la etapa infantil, la inyección diaria de timulina inmediatamente después de la timentomía, normaliza las alteraciones ocasionadas por la falta del timo (García y col., 2000). Cuando la timulina es inyectada en el hipotálamo medio o en la hipófisis anterior de ratones hembra prepúberes, se restablece la respuesta ovulatoria (García, 2005; García y col., 2005).

En estudios *in vitro*, utilizando tejido de adenohipófisis de rata macho, la adición de timulina al medio de cultivo estimula la liberación de la LH (Zaidi y col., 1988; Hadley y col., 1997) en la misma proporción que lo hace la GnRH (Zaidi y col., 1988). En las células de adenohipófisis de rata hembra, la adición de timulina estimula la liberación de la FSH y LH, tanto en condiciones basales como estimuladas por GnRH (Brown y col., 2000). En las gónadas en cultivo de hembra y macho, la timulina estimula la secreción de los esteroides sexuales (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990; Wise, 1998; Wise y Ford, 1999).

A partir de los resultados antes mencionados, se sugiere que la timulina participa en los mecanismos que regulan el sistema reproductor por dos vías: sobre la función del eje hipotálamo-hipofisario en la liberación de la FSH y LH y por su efecto directo en las gónadas, donde estimula la secreción de los esteroides, y en la hembra al actuar sobre el crecimiento folicular y la ovulación.

Con base en lo anterior, el presente estudio está orientado a analizar el papel que tiene la timulina en la regulación de la liberación de la FSH y LH en cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas adultas hembras o machos, mantenidas bajo las mismas condiciones experimentales, y evaluar si sus efectos son regulados por los esteroides sexuales.

MARCO TEÓRICO

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS

El hipotálamo y la hipófisis conforman una unidad funcional cuya comunicación se establece por diversas hormonas peptídicas secretadas por el hipotálamo y que actúan sobre la hipófisis. Esta unidad funcional participa de manera fundamental en la regulación del sistema endócrino.

Hipotálamo

En el Sistema Nervioso Central existen grupos de neuronas especializadas que secretan GnRH (pyro-Glu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂) (Fink, 1988). Estas neuronas forman redes laxas y difusas que se localizan desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal (que incluye el núcleo septal triangular y medial), el núcleo de la estría terminal y en el hipotálamo el núcleo periventricular, las áreas preóptica medial y lateral, el área hipotalámica anterior y la zona retroquiasmática, además del hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Silverman y col., 1994) [Figura 1].

La mayoría de las neuronas que sintetizan la GnRH (GnRHérgicas) proyectan sus axones hacia la eminencia media donde la hormona es liberada de manera pulsátil en los capilares que conforman el sistema porta hipotálamo-hipofisario (Fink, 1988; Merchenthaler y col., 1989; King y Rubin, 1995), hasta llegar a la hipófisis anterior (adenohipófisis). La GnRH al unirse a sus receptores membranales en los gonadotropos desencadena una cascada de señales intracelulares que culminan con la síntesis y liberación pulsátil de la FSH y LH (Fink, 1986, 1988; Everett, 1994; Silverman y col., 1994) [Figura 2]. Otras neuronas GnRHérgicas ubicadas en el área septal-preóptica establecen sinapsis con neuronas localizadas en diversas regiones del Sistema Nervioso Central como son el órgano vasculoso de la lámina terminal, la amígdala, el área

tegmental ventral, el cerebro medio, el rafé, la sustancia gris periacueductal, el hipocampo y bulbo olfatorio (Silverman y col., 1994; Palkovits, 2000).

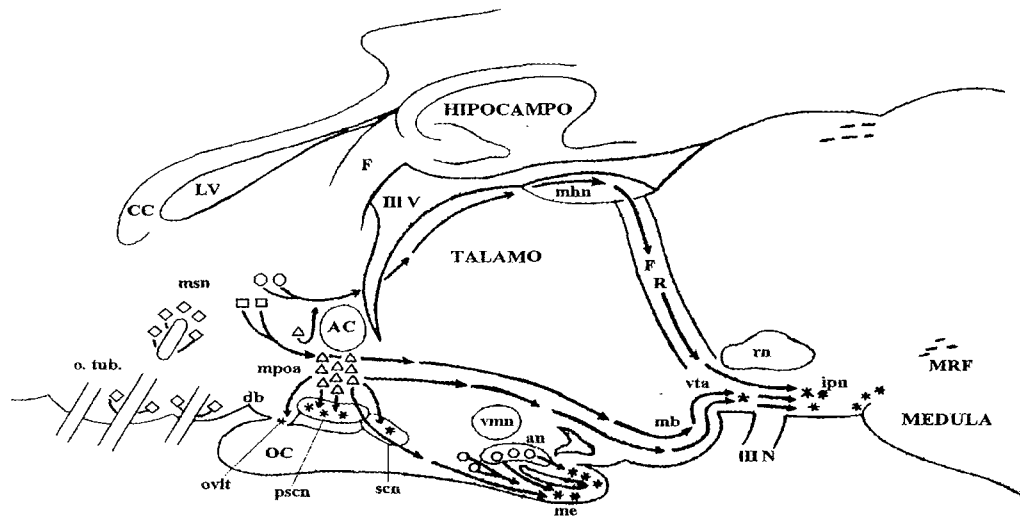


Figura 1. Plano sagital medial del cerebro de un cobayo que muestra los diferentes grupos de neuronas GnRHérgicas indicadas con símbolos geométricos, las rutas de las fibras están indicadas por flechas y las terminales por asteriscos. **AC:** comisura anterior; **an:** núcleo arcuato; **CC:** cuerpo caloso; **db:** banda diagonal de Broca; **F:** fornix; **FR:** fascículo retroflexo; **ipn:** núcleo interpeduncular; **LV:** ventrículo lateral; **mb:** cuerpos mamilares; **me:** eminencia media; **mhn:** habénula medial; **mpos:** área preóptica medial; **msn:** septo medial; **OC:** quíasma óptico; **o. tub.:** tubérculo olfatorio; **ovlt:** órgano vasculoso de la lámina terminal, **pscn:** núcleo supraquiasmático preóptico; **rn:** núcleo rojo; **scn:** núcleo supraquiasmático; **vmb:** núcleo ventro medial; **vta:** área tegmental ventral; **III V:** tercer ventrículo; **III N:** nervio oculomotor (Tomado de Silverman y col., 1994).

En el hipotálamo se describe la existencia de dos centros de regulación de la secreción de las gonadotropinas: un centro tónico formado por las neuronas GnRHérgicas que se localizan en los núcleos ventromedial y arcuato, que regula la secreción continua de la hormona, y un centro fásico ubicado en el área preóptica, el núcleo supraquiasmático y el hipotálamo anterior, que regula la secreción preovulatoria de la GnRH (Fink, 1986, 1988; Blake, 1999).

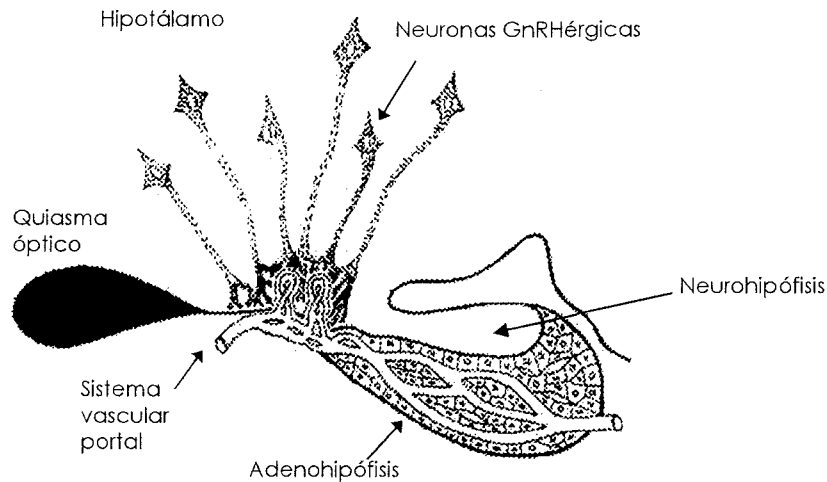


Figura 2. Esquema que muestra la conexión anatómica del hipotálamo con la hipófisis a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario. En el hipotálamo, las neuronas liberan la GnRH que pasa por el sistema porta y llega a la hipófisis (Tomado de Halász, 2000).

La secreción de la GnRH es regulada por numerosas señales nerviosas y por las variaciones que ocurren en la concentración plasmática de los esteroides sexuales. Según Hrabovszky y col. (2001) y Kallo y col. (2001) las neuronas GnRHérgicas presentan receptores de estrógenos del tipo β , pero no los del tipo α . Belsham y col. (1998) describen la presencia de receptores nucleares de los andrógenos. Según Dufourny y Skinner (2003) las células GnRHérgicas carecen de receptores de progesterona, pero poseen receptores de la alopregnenolona, hormona que se produce por el metabolismo local de la progesterona, la cual modifica rápidamente la actividad de la neurona GnRHérgica (Rønnekleiv y Kelly, 2005). Diversas neuronas localizadas dentro y fuera del hipotálamo hacen sinapsis con neuronas GnRHérgicas. La comunicación interneuronal se realiza por diversos neurotransmisores (catecolaminas, acetilcolina, serotonina y GABA) y neuropéptidos (NPY, SP, SR y neurotencina), los cuales participan en la regulación de la secreción de GnRH (Fink, 1986, 1988; Kordon y col., 1994; Silverman y col., 1994).

Hipófisis

La hipófisis se localiza por debajo de la base del encéfalo al que está unida por el tallo pituitario. Este órgano descansa en la silla turca del hueso esfenoides y está rodeada por la duramadre que penetra profundamente (Stevens y Steven, 1995; Fink, 2000; Ross y col., 2005).

Desde el punto de vista anatómico, en la hipófisis se describen cuatro zonas. 1) la pars anterior o distal, que junto con la pars intermedia forman la adenohipófisis, que es la que ocupa la mayor parte de la glándula. 2) la pars tuberalis, una proyección de la adenohipófisis que se extiende hacia arriba siguiendo la parte anterior y lateral del tallo pituitario, donde se observan los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisario. 3) la pars intermedia, cuyo desarrollo varía en las especies estudiadas. 4) la pars posterior o nerviosa (neurohipófisis) cuya localización también varía con las especies estudiadas (Stevens y Steven, 1995; Fink, 2000; Ross y col., 2005).

Desde el punto de vista embriológico, la neurohipófisis es una proyección de tejido nervioso que se origina del piso del diencefalo (región infundibular de origen neuroectodérmica), mientras que el resto de la glándula proviene del techo de la faringe (bolsa de Rathke) (Fink, 2000; Geneser, 2000; Ross y col., 2005).

En la adenohipófisis se describe la presencia de diferentes tipos celulares que se han clasificado en células cromófilas, porque su citoplasma tiene afinidad por el color y en las células cromófobas, las cuales no se tiñen. Las células cromófilas se clasifican, con base en la afinidad de los gránulos por los colorantes ácidos (alfa) o básicos (beta), y son llamadas acidófilas o basófilas, las cuales secretan siete hormonas que se enlistan en el Cuadro 1 (Stevens y Steven, 1995; Ross y col., 2005).

Cuadro 1. Tipo celular y hormonas secretadas por la hipófisis.

<i>Tipo celular</i>	<i>Colorante</i>	<i>Abundancia</i>	<i>Gránulos de secreción</i>	<i>Hormona que secreta</i>	<i>Función</i>
Células acidófilas					
Somatotrófica	Naranja G (PAS-)	50%	300-400 nm	GH	Promueve el crecimiento en todas las células del cuerpo: hueso, músculo, corazón, cerebro, etc. Su efecto no es directo, es mediado por somatomedinas y factores de crecimiento.
Lactotrófica	Naranja G (PAS-) Eritrosina de Herlant	20%-50% (aumenta durante la gestación)	400-700 nm 300-500 nm	PRL	Es esencial para iniciar la síntesis de leche en la glándula mamaria. También participa en funciones relacionadas con el crecimiento, la osmoregulación, el metabolismo de grasas y carbohidratos, la reproducción y la conducta parental.
Células basófilas					
Tirotrófica	Aldehído-tionina (PAS+)	5 %	140-200 nm	TSH	Estimula la secreción de tiroxina y triyodotironina en la glándula tiroides.
Gonadotrófica	Aldehído-tionina (PAS+)	5 %	200-250 nm	FSH LH	Promueve el desarrollo del gameto y la secreción de las hormonas gonadales. En la hembra estimula el crecimiento de los folículos ováricos, promueve el desarrollo del ovocito y la secreción de estrógenos. En el macho estimula la producción de espermatozoides y la secreción de la inhibina por su acción en las células de Sertoli. En la hembra estimula la ovulación y la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo en el ovario. En el macho estimula las células de Leydig para secretar andrógenos como la testosterona.
Corticotrófica	Hematoxilina (PAS+)	20 %	100-200 nm	ACTH	Estimula la síntesis y liberación de las hormonas glucocorticoides (cortisol, corticosterona, etc) en la corteza adrenal.
Melanotrófica	Aldehído-tionina (PAS+)			MSH	Actúa en los melanotrofos de anfibios y estimula el cambio del color de la piel. La MSH tiene varias formas las cuales son similares en estructura a la ACTH. α -MSH funciona como un neuropéptido e influye en la memoria.

PAS: ácido peryódico de Shiff

En la adenohipófisis también se sintetiza el polipéptido proopiomelanocortina (POMC) a partir del cual, por efectos enzimáticos, se obtienen las siguientes hormonas peptídicas: ACTH, α -MSH, β -MSH, γ -MSH, el CLIP, β -lipotropina y β -endorfina. La β -endorfina tiene efectos analgésicos y participa en la regulación del aprendizaje, la memoria, alimentación, termorregulación, presión arterial y conducta reproductiva (Stevens y Steven, 1995).

La FSH y la LH

La GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas las cuales llegan a las gónadas por el torrente sanguíneo y se unen a sus receptores de membrana presentes en algunas de las células que conforman a los ovarios y testículos. En el ovario, la FSH estimula el crecimiento y la diferenciación de los folículos, mientras que la LH induce la ruptura del folículo con la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo. Ambas gonadotropinas participan en la regulación de la esteroidogénesis (Fink, 1986, 1988; Everett, 1994). En el testículo, la FSH estimula la producción de espermatozoides (espermatogénesis), mientras que LH actúa sobre las células de Leydig donde estimula la secreción de testosterona (Dorrington y Armstrong, 1975; Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La FSH y LH son hormonas glicoprotéicas sintetizadas por la adenohipófisis y están formadas por dos cadenas polipeptídicas (subunidad α y β) cuya síntesis es codificada por genes diferentes (Haisenleder y col., 1994). La cadena α es idéntica en ambas gonadotropinas, mientras que la β es específica para cada hormona (Pierce y Parsons, 1981; Gharib y col., 1990; Bousfield y col., 1994).

En la rata, el contenido del ARNm de la cadena α aumenta a las 8:00 h en el diestro 2 (ver sección ciclo estral), alcanza su valor máximo a las 20:00 h, declina abruptamente a la media noche y permanece bajo durante las etapas del proestro, estro

y diestro 1 (Zmeili y col., 1986; Haisenleder y col., 1994). En cambio, el contenido en ARNm de la cadena β de LH es bajo en el día del estro y diestro 1, incrementa a las 8:00 h del diestro 2, después disminuye y permanece así hasta la mañana del proestro (Zmeili y col., 1986). A las 14:00 h del día del proestro se presenta un segundo aumento que alcanza la máxima concentración a las 17:00 h y después declina rápidamente. A las 22:00 h del proestro la concentración de ARNm es similar a las del estro y diestro 1. El contenido en ARNm de la cadena β de FSH aumenta a partir de las 20:00 h del día del proestro, alcanza el máximo a las 2:00 h del estro, retorna a concentraciones basales a las 8:00 h, permanece bajo hasta las 20:00 y aumenta a partir de las 23:00 h del mismo día y permanece elevado hasta la tarde del diestro 1, mientras que en el diestro 2 las concentraciones son menores que las observadas en los días del proestro y estro (Ortolano y col., 1988; Haisenleder y col., 1994).

Después de la síntesis del ARNm que codifica para las subunidades β de FSH y LH, así como la subunidad α común, la síntesis de las hormonas polipeptídicas se lleva a cabo en los ribosomas. La estructura polipeptídica resultante es transportada al aparato de Golgi, donde suceden las modificaciones post-transduccionales que consisten en la glicosilación (adición de ácido siálico, entre otros carbohidratos, a las subunidades proteicas α y β) específica de cada gonadotropina y la sulfatación en el caso de la subunidad β de la LH. La adición de ácido siálico a los carbohidratos terminales de las moléculas se realiza en la región "trans" del aparato de Golgi por un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, denominadas sialiltransferasas (Hirschberg y Snider, 1987; Baenziger y Green, 1988).

Tanto la FSH como la LH presentan isoformas que se explican por la presencia de grandes cantidades de ácido siálico (monosacárido con carga eléctrica negativa), lo que ocasiona diferencias en el punto isoeléctrico y el peso molecular. Esta heterogeneidad en las formas moleculares influye en su vida media, en la capacidad de interaccionar con su receptor y en el potencial biológico evaluado *in vivo* e *in vitro* (Dufau y Veldhuis,

1987; Wilson y col., 1990; Ulloa-Aguirre y col., 1995).

Las isoformas ácidas de la FSH y LH predominan en la circulación sanguínea cuando la concentración de esteroides gonadales es baja, como ocurre en los animales castrados y en las mujeres menopáusicas. Estas formas ácidas tienen una actividad biológica baja y una vida media larga. Las isoformas básicas de las gonadotropinas predominan en la etapa periovulatoria y tienen mayor afinidad por su receptor, pero son eliminadas más rápidamente (Dufau y Veldhuis, 1987; Ulloa-Aguirre y col., 1995).

En la rata hembra los pulsos de amplitud baja de GnRH elevan los ARNm de las subunidades β de la FSH o LH, mientras que los pulsos con amplitud alta incrementan el ARNm de subunidad α (Haisenleder y col., 1990).

Las hormonas esteroideas secretadas por las gónadas

Todas las hormonas esteroideas se originan a partir del colesterol que las células obtienen de la sangre a partir de lipoproteínas, del almacenado bajo la forma de ésteres o de la síntesis de *novó* a partir de acetato. En la esteroidogénesis ovárica participan células de la teca interna, de la granulosa, del cuerpo lúteo y la glándula intersticial. En las células de la teca la LH induce la transformación de colesterol a pregnenolona. A partir de la cual la biosíntesis sigue dos vías diferentes: la delta ⁵ (Δ^5) y la delta ⁴ (Δ^4). En la vía Δ^4 la pregnenolona es transformada a progesterona por un complejo enzimático microsomal, la 3 β -HSD. En la vía Δ^5 la pregnenolona, por efecto del complejo 17 α -hidroxilasa y C₁₇₋₂₀ liasa (citocromo P₄₅₀ C17), se transforma en la 17 α -hidroxipregnenolona y posteriormente en dehidroepiandrosterona (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994) [Figura 3].

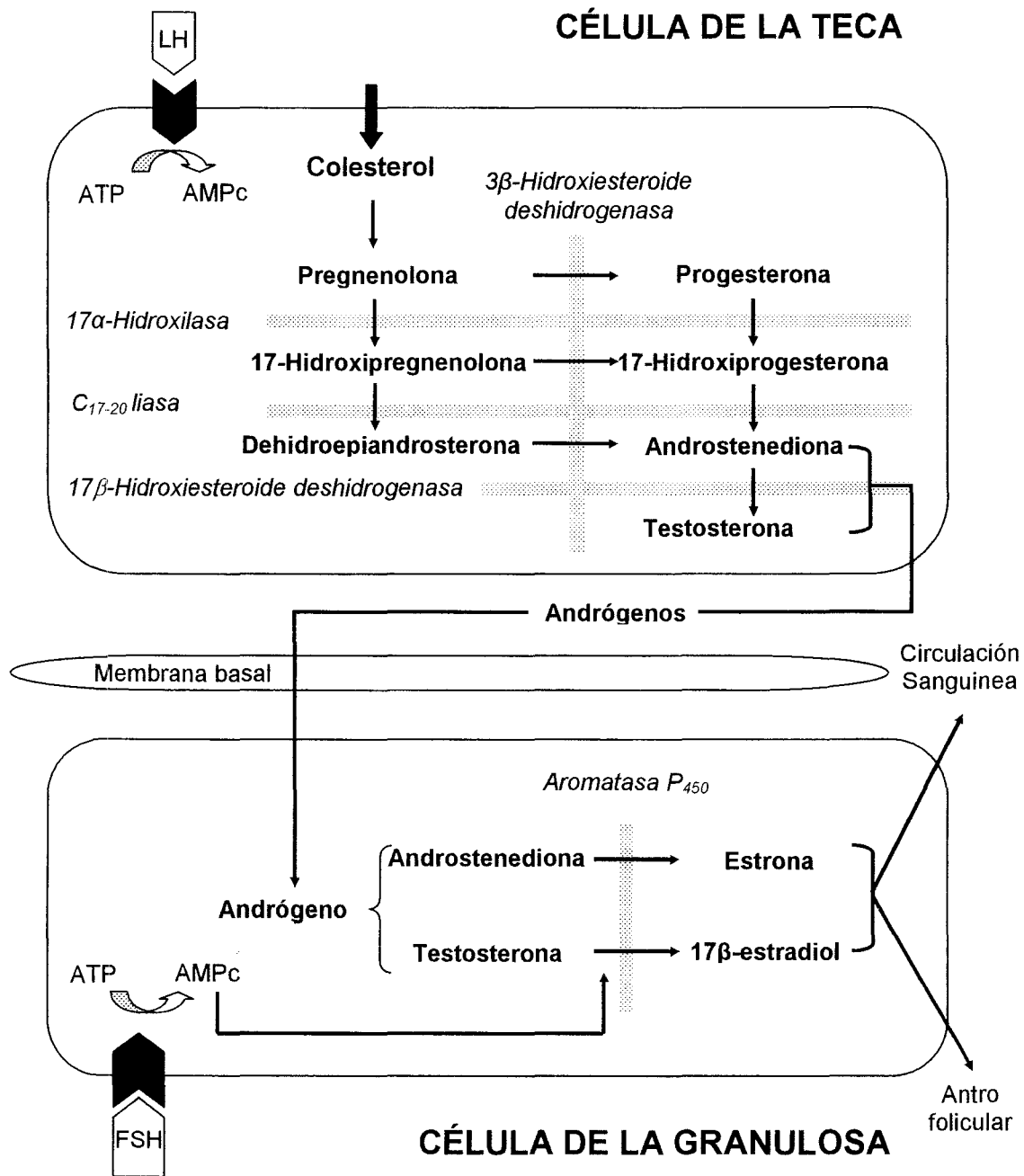


Figura 3. Acción de las gonadotropinas en las células de la teca y de la granulosa. Ruta de biosíntesis de las hormonas esteroides (Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En la vía Δ^4 , por efectos de la enzima 17α -hidroxilasa, la progesterona es transformada en 17α -hidroxiprogesterona, la cual es convertida en androstenediona por acción de la C_{17-20} liasa, la cual por acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se convierte en testosterona. Ambos andrógenos (androstenediona y testosterona) atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa. En estas células la FSH incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasa, lo que provoca que los andrógenos sean aromatizados a estrógenos (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Conforme el folículo madura, las células de la granulosa adquieren receptores de la LH por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos. El incremento en las concentraciones en suero de los estrógenos sensibiliza a la hipófisis al efecto de la GnRH, provocando un aumento brusco de la concentración de LH (pico preovulatorio) que culmina con la ovulación (Fink, 1986; Domínguez y col., 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En el testículo también existen las dos vías de síntesis de hormonas esteroides. La síntesis de testosterona se realiza en las células de Leydig, mientras que la producción de estradiol ocurre en las células de Sertoli (Dorrington y Armstrong, 1975; Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Ciclo estral en la rata

La receptividad sexual de la rata hembra se presenta cada cuatro o cinco días y el intervalo entre cada día de receptividad recibe el nombre de ciclo estral. Lo mismo ocurre con el proceso de ovulación y en ese caso se habla del ciclo ovulatorio que tiene la misma duración. A lo largo del ciclo estral hay cambios en la conducta sexual de la hembra que aseguran su máxima receptividad durante la etapa ovulatoria. Su duración es regulada por variaciones en la intensidad de la luz, por la ingesta de alimento, la

temperatura y la presencia del macho (Fink, 1986, 1988; Freeman, 1994).

El término "estro" proviene del latín oestrus y este a su vez del griego oistros, que significa tábano, agujón o frenesí. Para su estudio, al ciclo estral se le divide en cuatro etapas: diestro 1 o metaestro, diestro 2, proestro y estro [Figura 4]. La duración promedio de cada etapa es: diestro 1 de 6 a 8 horas, diestro 2 de 55 a 57 horas, proestro de 12 a 14 horas y estro de 25 a 27 horas (Fink, 1988; Freeman, 1994).

Diestro 1 (metaestro): esta etapa se presenta después de la ovulación y se le describe como una etapa progestacional, ya que existe un incremento en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo. En el frotis vaginal el tipo celular predominante son los leucocitos y también se observan algunas células cornificadas o escamadas. Las concentraciones de FSH, LH y estradiol en suero son bajas y hacia el final de esta etapa aumenta la secreción de estradiol (Ruiz, 1988; Freeman, 1994).

Diestro 2: si no se presenta la fecundación en esta etapa hay una rápida involución funcional o lisis del cuerpo lúteo. La concentración de progesterona en la circulación sanguínea disminuye. Los cuernos uterinos son pequeños y se presentan levemente contraídos. La citología vaginal muestra leucocitos y aparecen algunas células epiteliales nucleadas en una mucosa muy delgada. Las concentraciones de FSH y LH son bajas y la liberación de estradiol sigue en aumento debido al estímulo de la enzima aromatasa inducido por la FSH en las células de la granulosa en el ovario (Ruiz, 1988; Freeman, 1994).

Proestro: en este día se anuncia el próximo celo o "calor". En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales nucleadas y ocasionalmente escamas (células epiteliales que pierden el núcleo). En la mañana de este día se observa un aumento significativo de la concentración de estradiol, la cual es fundamental como estimulante de la secreción de la GnRH, lo que resulta en un aumento de la liberación

de la FSH y LH (14:00-15:00 h). En la tarde (17:00-19:00 h) la concentración de la LH presenta un pico, lo que induce a la ovulación algunas horas después. Al igual que la LH, la FSH presenta su máxima liberación por la tarde (17:00-19:00 h). En esta etapa se inicia el incremento en la concentración de progesterona, lo que favorece la ovulación y facilita el comportamiento estral (Ruiz, 1988; Freeman, 1994).

Estro: en esta etapa se presenta el celo, la cópula y la ovulación. En la madrugada de este día ocurre la ovulación. En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales cornificadas y el útero incrementa su tamaño. Las concentraciones de la LH y del estradiol disminuyen a valores basales. La concentración de FSH presenta un segundo pico en la mañana, cuyo papel sería reclutar a los folículos que ovularán en los siguientes ciclos (Ruiz, 1988; Freeman, 1994).

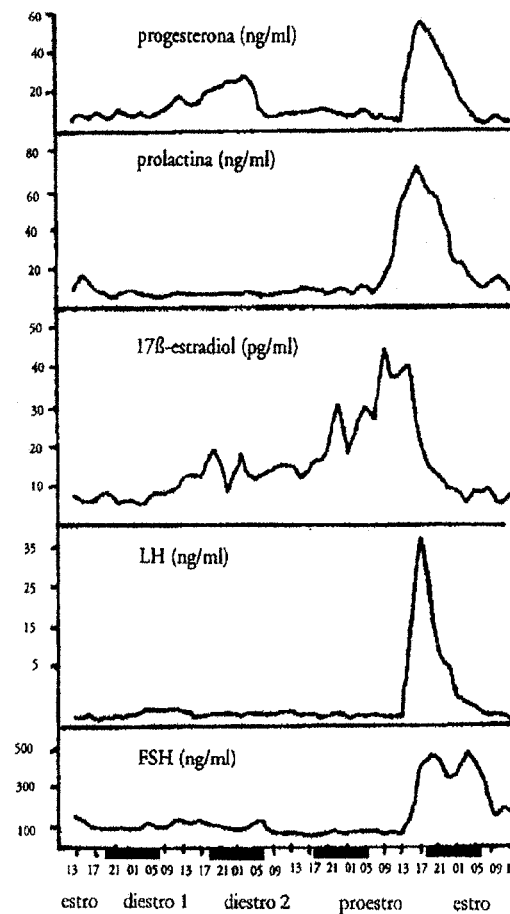


Figura 4. Perfil de las concentraciones plasmáticas de progesterona, prolactina, 17β-estradiol, LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral en la rata (Tomado de Freeman, 1994).

En las ratas con ciclo de cuatro días, el patrón de la concentración de testosterona y androstenediona es similar al del estradiol (Dupon y Kim, 1973; Gay y Tomacari, 1974). La concentración de progesterona muestra un pico en la tarde-noche (17:00 h) del proestro y uno segundo pico que inicia al medio día del diestro 1 y continúa en la madrugada del diestro 2, llegando a concentraciones basales en la mañana de este día (Eto y col., 1962; Hashimoto y col., 1968; Freeman, 1994).

Regulación de la secreción de FSH y LH en la hembra

En la rata, la liberación preovulatoria de las gonadotropinas es el resultado del incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH al sistema porta, así como del aumento progresivo en la sensibilidad de los gonadotropos a dicha hormona (Fink, 1986, 1988; Gore-Langton y Armstrong, 1994), la cual se explica por un aumento en el número de receptores de GnRH en los gonadotropos que se presenta en la tarde del diestro 2 y se mantiene hasta que se presenta el pico de LH en la tarde del proestro (Clayton y col., 1980; Savoy-Moore y col., 1980; Clayton y Catt 1981).

En la mujer y la rata, el aumento preovulatorio en la concentración de estradiol en plasma es esencial para la iniciación y mantenimiento del incremento en la respuesta de la hipófisis a la GnRH. Tanto la GnRH como la progesterona amplifican la respuesta de los gonadotropos (Fink, 1988). La pre-sensibilización de los gonadotropos por los estrógenos resulta en un aumento inicial de la liberación de las gonadotropinas como respuesta al incremento de GnRH (Blake, 1999). En cambio, los andrógenos reducen la respuesta de la LH y tienen un efecto facilitador en la respuesta de FSH a la GnRH (Fink, 1988).

En la rata en diestro 2, el estradiol ejerce un efecto estimulante en la liberación de LH, ya que la administración de inhibidores de estrógenos o antisueros anti-estradiol, bloquean la liberación preovulatoria de LH que normalmente ocurre en proestro

(Freeman, 1994). En este día la concentración nuclear y total del complejo estradiol-receptor en la hipófisis es mayor que en cualquier otro día del ciclo (Fink, 1988).

La presencia de progesterona en el día del proestro juega un papel dual en el control de la liberación de la LH durante el ciclo estral, ya que en la tarde del proestro sensibiliza la hipófisis a los efectos de la GnRH y posteriormente inhibe su respuesta. En células de hipófisis de rata o en ratas en las cuales el tallo hipofisario ha sido cortado, los estrógenos y la progesterona facilitan la respuesta de la hipófisis por una acción directa en los gonadotropos. Los receptores de progesterona en hipófisis son dependientes de estrógenos (Fink, 1988).

En la rata, el segundo pico espontáneo en la concentración de FSH ocurre alrededor de 11 horas después de la liberación preovulatoria de la LH (Fink, 1988) y es independiente del estímulo de la GnRH, ya que la administración de un antagonista a GnRH en la tarde del proestro bloquea la liberación de FSH que ocurre en este día, pero no la que se libera en el estro (Condon y col., 1984; Schwartz y col., 1985; Freeman, 1994).

Participación de los esteroides sexuales en la regulación estimulante e inhibitoria de la secreción de FSH y LH

Los esteroides sexuales regulan la secreción hormonal por mecanismos que estimulan o inhiben la síntesis y liberación de las gonadotropinas y sus efectos dependen de la dosis, el tiempo de exposición y la secuencia de la administración.

La gonadectomía resulta en el aumento de la concentración de LH en la hipófisis y en el plasma (Yamamoto y col., 1970; Schwartz y McCormack, 1972; Tapper y col., 1972; Freeman, 1994). La respuesta de la hipófisis a la falta de las gónadas ocurre más lentamente en la hembra que en el macho. En la hembra la respuesta inicial a la

ovariectomía se presenta por el incremento en la frecuencia de los pulsos de GnRH y un aumento en los receptores en la hipófisis (Katt y col., 1985; Freeman, 1994).

En la hipófisis de la rata, la ovariectomía ocasiona drástico aumento en la expresión del ARNm de la subunidad α de las gonadotropinas y menor expresión en el ARNm de la subunidad β de la LH (Corbani y col., 1984; Freeman, 1994). El tratamiento con estradiol induce un incremento en la concentración del ARNm de la subunidad α y no modifica el de la subunidad β (Haisenleder y col., 1988). El tratamiento con estradiol y progesterona disminuyen la concentración de LH en suero y también de los ARNm de la subunidades α y β de la LH en la hipófisis (Corbani y col., 1990; Freeman, 1994).

Los estrógenos estimulan la liberación de GnRH, ya que su inyección resulta en el aumento de la frecuencia y magnitud de los pulsos del decapeptido (Fink, 1988) y aumentan el número de receptores de GnRH en los gonadotropos (Blake, 1999).

En la rata ovariectomizada, la baja concentración de LH después de la administración de benzoato de estradiol (Oshima y col., 1978), es reflejo de la disminución en la frecuencia (Weick y Noh, 1984) y la amplitud de los pulsos de dicha hormona (Gallo y Moberg, 1977). La administración de progesterona a ratas castradas sin un pretratamiento con estradiol, no modifica la concentración de LH (Caligaris y col., 1971; Tapper y col., 1972; Swerdloff y col., 1972; Freeman, 1994), lo que se explica porque los receptores de progesterona en el hipotálamo y en la hipófisis son estrógeno-dependientes (Fink, 1988). En cambio, en ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos, la administración de progesterona disminuye la concentración de LH en comparación a los animales castrados que sólo fueron tratados con estrógenos (Caligaris y col., 1971; Freeman, 1994).

En estudios *in vitro*, el agregado de estradiol al medio de cultivo estimula la secreción de la FSH y LH por su acción directa en la hipófisis y la progesterona potencia

el efecto estimulante del estradiol (Drouin y Labrie, 1981).

En cultivos de células de adenohipófisis de rata, la liberación basal y estimulada de las gonadotropinas por la GnRH es amplificada por la adición de estradiol (Drouin y Labrie, 1976), mientras que en cultivos de fragmentos de hipófisis, el agregado de estradiol al medio resulta en el aumento del ARNm de la subunidad β de LH (Shupnik y col., 1989; Freeman, 1994). También se ha observado que las células de hipófisis obtenidas durante el proestro son más receptivas al tratamiento con GnRH (Baldwin y Downs, 1981; Freeman, 1994).

Los esteroides ováricos incrementan el número de receptores de GnRH en la hipófisis (Clayton y col., 1980; Savoy-Moore y col., 1980; Clayton y Catt 1981; Freeman, 1994). En cultivos de hipófisis obtenidas de rata hembra prepúber, el agregado de progesterona al medio de cultivo resulta en una disminución en la secreción de las gonadotropinas, lo que se explica por la disminución del número de receptores de GnRH provocado por la progesterona (Conn y col., 1984; Witcher y col., 1984; Freeman, 1994; Janovick y Conn, 1996).

Regulación neuroendócrina del eje hipotálamo-hipófisis en el macho

La liberación de la FSH y LH en la rata macho, a diferencia de la hembra, es de tipo tónica (secreción pulsátil y constante). Tanto en la rata como en el hombre se presentan dos o más pulsos de LH, antes de que ocurra un incremento en la secreción de testosterona (Veldhuis y col., 1987). Este aumento de LH declina inmediatamente, sin embargo, la testosterona permanece elevada por un periodo más largo tanto en el hombre (10 a 20 min) como en la rata (3-6 h) (Blake, 1999).

En el hombre existe un ritmo circádico en la secreción de testosterona con aumento en la noche que es acompañado de un incremento en la amplitud de los pulsos

de LH (Boyar y col., 1974; Kapen y col., 1974; Veldhuis y Johnson, 1988; Veldhuis y col., 1990).

Los andrógenos regulan de manera inhibitoria la secreción de la FSH y LH, ya que suprimen los pulsos de GnRH en el hipotálamo y la capacidad de respuesta de los gonadotropos (Marynick y col., 1979; Blake, 1999).

La adenohipófisis en el macho contiene receptores de estrógenos, y la inyección del esteroide puede suprimir la liberación de LH inducida por GnRH. En el hipotálamo se producen considerables cantidades de estrógenos por la aromatización de los andrógenos. Tanto los estrógenos de origen hipotalámico como los de origen sistémico pueden actuar directamente sobre los gonadotropos en donde suprimen la liberación de la LH inducida por la GnRH. Estudios recientes muestran que la adenohipófisis de rata contiene a la enzima aromatasa (Galmiche y col., 2006).

Características del timo

El timo es un órgano linfoepitelial primario del sistema inmunológico, en el que se lleva a cabo la diferenciación y maduración de los linfocitos T (Roitt y col., 1993; Geneser, 2000; Ross y col., 2005).

En los mamíferos, el timo es un órgano de forma triangular, bilobulado, de color gris rosáceo. Está ubicado en el tórax, inmediatamente por detrás de la parte superior del esternón, con la base apoyada en el corazón, el ápice dirigido hacia el cuello y delante de las venas tiroideas inferiores, la tráquea y los grandes vasos incluyendo el cayado aórtico (Bellanti, 1987; Geneser, 2000; Ross y col., 2005) [Figura 5].

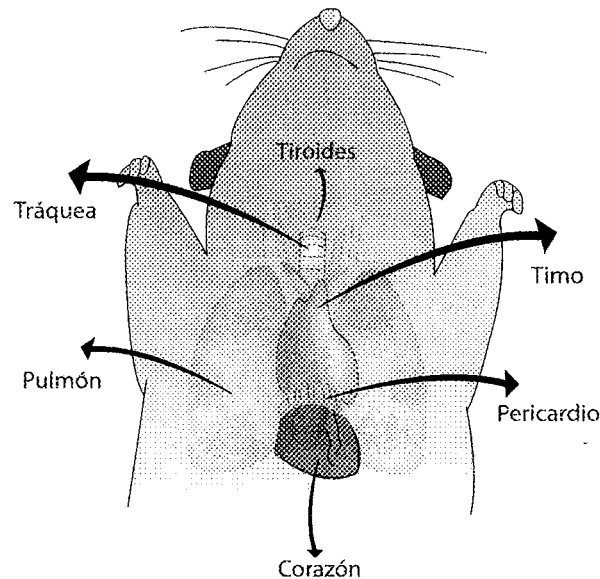


Figura 5. Esquema que muestra la ubicación anatómica del timo en el ratón.

Cada uno de los lóbulos del timo está formado por una matriz de células epiteliales dispuestas en forma de red (células retículo-epiteliales), entre las cuales se depositan los linfocitos. Este órgano presenta una organización cortico-medular y sus lóbulos están rodeados por una cápsula de tejido conectivo derivado del mesénquima, la cual se extiende hacia el interior de los lóbulos formando tabiques que lo dividen en lobulillos. Cada lobulillo presenta una corteza rica en linfocitos y una médula con menor densidad de éstos. En la médula se encuentra un elemento estructural llamado corpúsculo de Hassall que es un agrupamiento de células retículo-epiteliales engrosadas y dispuestas concéntricamente (Bellanti, 1987; Roitt y col., 1993; Bergman y col., 1998; Geneser, 2000; Ross y col., 2005) [Figura 6].

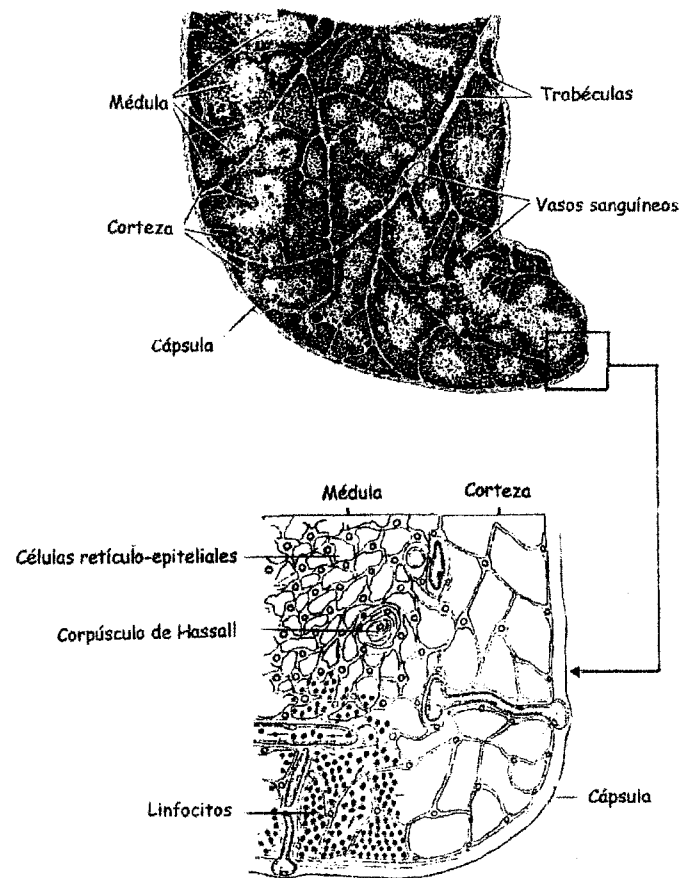


Figura 6. Esquema que muestra la histología del timo y su organización cortico-medular (Tomado de Bellanti, 1987).

El timo crece desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el que comienza un proceso de involución, denominado "involución fisiológica". Esta disminución se debe principalmente al decremento en la proliferación de linfocitos en la corteza, en respuesta al incremento en las concentraciones de las hormonas sexuales en el plasma, característico de esta etapa. A medida que avanza el proceso de involución, el tejido adiposo aumenta y cuando el animal llega a la vejez sólo se observa un pequeño cúmulo en lugar del timo (Aboussaouira y col., 1989; Roitt y col., 1993; Geneser, 2000) [Figura 7].

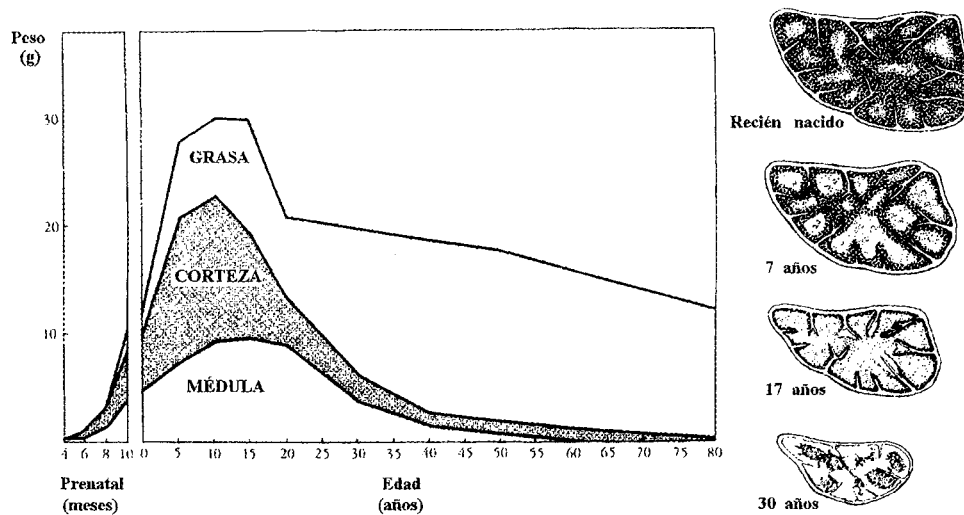


Figura 7. Representación gráfica y esquemática que muestra los cambios en peso y composición del timo humano durante el proceso de involución (Tomado de Bellanti, 1987).

Las células retículo-epiteliales sintetizan hormonas polipeptídicas a las que se les ha llamado timosinas, que estimulan la maduración y diferenciación de los linfocitos T (Goldstein, 1984).

De las hormonas tímicas, la TF-5 es un extracto tímico que está compuesto por una familia de péptidos (40-50) clasificados con base en su punto isoeléctrico (pI) en: timosina α_1 , α_5 y α_7 (pI por debajo de 5), timosina β_1 , β_3 , β_4 , β_7 , β_8 , β_9 y β_{10} (pI 5-7), y timosina γ (pI por arriba de 7) (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

Otras de las hormonas sintetizadas por el timo son el THF, la timulina o FTS, la timoestimulina, la timopoiatina y el TFX (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984).

La concentración de las timosinas en la sangre, junto con la inmunidad que depende del timo, disminuye con la edad de los individuos de manera paralela con el proceso de involución del órgano [Figura 8].

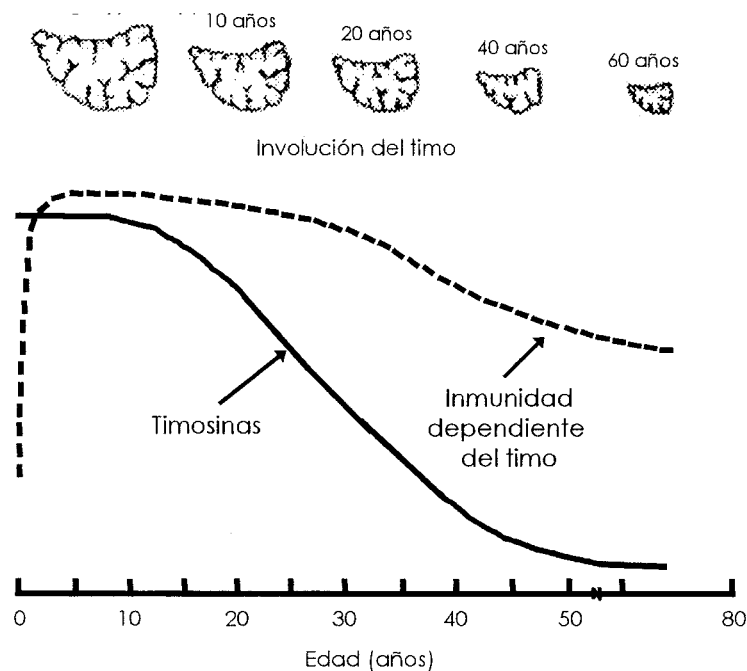


Figura 8. Representación gráfica y esquemática que muestra el proceso de involución del timo en el humano el cual se acompaña de la disminución en la concentración de timosinas en el plasma y la disminución de la inmunidad dependiente del órgano (Modificado de Bellanti, 1987).

Relaciones neuroendócrinas entre el timo y el sistema reproductor

La primera evidencia de una interacción entre el sistema reproductor y el timo fue la aportada por Calzolari en 1898, quien describió en el conejo que la castración ocasionaba hipertrofia del timo. Varias décadas después, esta relación fue apoyada por los resultados obtenidos por diversas manipulaciones experimentales y los cambios funcionales y anatómicos del timo durante la vida de los animales tales como:

- El timo comienza a involucionar durante la pubertad como respuesta al incremento de las concentraciones plasmáticas de las hormonas sexuales que ocurren en esta etapa. También se ha descrito que cuando se administra

progesterona, estrógenos o testosterona se provoca la involución del órgano (Grossman, 1984; Fitzpatrick y col., 1985; Roitt y col., 1993).

- La involución del timo se acelera durante la preñez, lo que se atribuye al aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona y corticosterona durante este periodo (Carter, 1976; Chambers y Clarke, 1979; Grossman, 1984).
- La castración antes de la pubertad, retarda el proceso de involución del timo, mientras que en el animal adulto la extirpación de las gónadas induce su hipertrofia (Janardana Sarma y Sirsi, 1961; Grossman, 1984, 1985; Fitzpatrick y col., 1985; Rosas y col., 1992).
- En las células retículo-epiteliales del timo existen receptores específicos de las hormonas sexuales y a la GnRH (Sholiton y col., 1980; Grossman, 1984; Morgan y Grossman, 1985; Marchetti y col., 1989a).
- La inyección de antagonistas a la GnRH promueve la involución del timo. Al parecer esta hormona estimula el desarrollo y mantenimiento del epitelio tímico (Marchetti y col., 1989b, 1990).

Los modelos biológicos más utilizados en el estudio de la vinculación del timo con los mecanismos que regulan la función reproductora han sido los ratones congénitamente atímicos y los hipotímicos, así como la rata y el ratón timectomizados al nacimiento o a los 10 días de edad.

El ratón nu/nu es un mutante que se caracteriza por ser alopécico y congénitamente atímico, presenta retraso en la edad de la apertura vaginal (pubertad), baja fertilidad (Flanagan, 1966; Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y col., 1981b), poco desarrollo del ovario con foliculogénesis anormal y reducción del número de folículos en

crecimiento (Lintern-Moore y col., 1976; Lintern-Moore y Pantelouris, 1975; Lintern-Moore, 1977); en la etapa prepuberal las concentraciones plasmáticas de GnRH, FSH, LH, GH, estradiol, progesterona y testosterona son menores que las del animal normal (Shire y Pantelouris, 1974; Rebar y col., 1981b; Chesnokova y col., 1983).

En el ratón congénitamente atímico recién nacido, el injerto de timo previene la disminución en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas, normaliza la función endocrina de las gónadas y los animales son fértiles (Rebar y col., 1980; Chesnokova y col., 1983).

En la década de los ochentas, en una colonia de ratones CD1 de la FES-Zaragoza apareció un mutante alopécico con alteraciones en el desarrollo del timo, que se manifiestan después de los 10 días de vida postnatal. En la etapa adulta, el peso del órgano es menor en un 50% que el de un ratón normal, razón por la que se le llamó hipotímico (et/et). Este animal presenta una serie de alteraciones en el sistema reproductor, como son: pubertad retardada; la tasa de fertilidad es similar a la de los animales normales, aunque decrece prematuramente; tiene menor peso de los ovarios; y baja respuesta ovulatoria frente a un estímulo gonadotrópico (Rosas y col., 1987; Rosas, 1990).

El análisis de la población folicular de los ovarios del ratón et/et muestra que el número de folículos es menor que en el normal, aunque los folículos crecen con la estimulación gonadotrópica, el 75% de éstos son atrésicos (Rosas e Hinojosa, 1993). En estos animales, el injerto de un timo normal al nacimiento no previene el retardo en la pubertad y las alteraciones ocasionadas por el decremento del timo frente al estrés (Hinojosa, 1994; Hinojosa y Rosas, 1994).

En el ratón normal, la timectomía realizada en la etapa perinatal (1-4 días de edad) provoca disgénesis ovárica en la etapa adulta (130 días), caracterizada por la infiltración

linfocítica de los ovarios, disminución del número de folículos, hipertrofia e hiperplasia de las células intersticiales, proliferación del tejido conectivo, ausencia de cuerpos lúteos o destrucción de los mismos por la proliferación del tejido conectivo y presencia de quistes (Nishizuka y Sakakura, 1969; Kosiewicz y Michael, 1990; Michael y col., 1990). Estos cambios en la morfología del ovario se acompañan de la disminución en las concentraciones de FSH, LH, GH, prolactina y estrógenos en el plasma (Michael y col., 1980,1981). También se presenta retardo en la pubertad e infertilidad (Nishizuka y Sakakura, 1969, 1971; Michael y col., 1980). Estas modificaciones se explican por una respuesta autoinmune que da origen a la formación de anticuerpos antiovocitos (Nishizuka y Sakakura, 1969, 1971; Michael y col., 1980; Taguchi y col., 1980; Kosiewicz y Michael, 1990), lo cual es impedido si se realiza un trasplante inmediato de timo (Sakakura y Nishizuka, 1972).

La extirpación del timo en un ratón de 10 días de vida postnatal trae como resultado retraso de la edad de la pubertad, disminución en el desarrollo del ovario (sin mostrar signos de disgénesis), menor número de folículos en crecimiento y poca respuesta ovulatoria al estímulo gonadotrópico (García, 1996; García y col., 2000).

En la rata hembra neonatal, la timectomía ocasiona alteraciones en el desarrollo del ovario semejantes a las que presenta el ratón (Lintern-Moore, 1972; Hattori y Brandon, 1979).

Efecto de los péptidos tímicos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que las timosinas participan en la regulación del sistema reproductor. Rebar y col. (1981a) describen que la adición de la TF-5 o la timosina β_4 a un sistema de perfusión de hipotálamo medio basal e hipófisis, incrementa significativamente la liberación de LH. Este efecto no se observa cuando las timosinas son administradas sólo al tejido hipofisario, mientras que en el hipotálamo, aumentan

significativamente la liberación de la GnRH.

En ratones prepúberes, la administración de TF-5 aumenta la concentración plasmática de estradiol y adelanta la edad de la apertura vaginal (Michael, 1983). La administración de timosina β_4 , en el tercer ventrículo del cerebro del ratón adulto, incrementa la concentración de LH en el plasma (Hall y col., 1985).

El medio de incubación de timo y el medio condicionado de células retículo-epiteliales contienen un factor de peso molecular de 28 kD, que estimula la secreción *in vitro* de la FSH y LH e incrementa el efecto estimulante de la GnRH sobre la liberación de ambas gonadotropinas por las células de adenohipófisis de rata (Mendoza y Romano, 1989; Mendoza y col., 1995).

En cultivo de células foliculares del ovario o de células de Leydig del testículo, el factor tímico de 28 kD compite con la hCG por su receptor, lo que resulta en la inhibición de la producción de esteroides (Hiriart y Romano, 1986; Pedernera y col., 1986; Aguilera y Romano, 1989).

Estudios *in vitro* muestran que las células retículo-epiteliales del timo, provenientes de animales castrados, liberan mayor cantidad del factor tímico de 28 kD que las de los animales intactos. Si los animales castrados fueron tratados con testosterona antes de la obtención del cultivo del timo, las células retículo-epiteliales liberan menor cantidad del factor tímico al medio de cultivo (Reyes-Esparza y Romano, 1989).

Uzumcu y col. (1992) mostraron que el medio condicionado de células retículo-epiteliales del timo adicionado a un cultivo de células de la granulosa de rata prepúber, incrementa la secreción basal de progesterona y estradiol. Las timosinas contenidas en el medio también estimulan la actividad aromatasa y la liberación de ambos esteroides en presencia o no de FSH (Uzumcu y Lin, 1994).

En la cerda, la concentración en plasma de timosina β_4 varía durante el ciclo estral ya que aumenta en la fase folicular y disminuye en la luteal en forma paralela con la concentración plasmática de progesterona (Ford y col., 1990). En mujeres postmenopáusicas u ovariectomizadas, la concentración de esta timosina en el plasma es menor que en una mujer normal (Golsteyn y Fritzler, 1987).

En el hombre, la concentración de timosina α_1 en el plasma seminal es menor en individuos infértiles que en normales (Naz y col., 1992).

Características de la timulina

La timulina es un nonapéptido (pyro-Glu¹-Ala²-Lys³-Ser⁴-Gln⁵-Gly⁶-Gly⁷-Ser⁸-Asn⁹-OH) con peso molecular de 900 daltons y pI de 7.5 (Bach y col., 1977; Goldstein y col., 1981). Este péptido es una metaloproteína, ya que necesita de la unión con el Zn^{+2} para obtener su conformación espacial que determina su actividad biológica e incrementa su vida media en el plasma (Imaizumi y col., 1981; Dardenne y col., 1982, 1984, 1985; Bach y Dardenne, 1984; Gastinel y col., 1984).

La timulina se une al Zn^{+2} , formando dos complejos 1:1 y 1:2. Los estudios realizados con resonancia magnética mostraron que en el complejo 1:1, una molécula de timulina se une a una de Zn^{+2} y el enlace se presenta en el -OH del carboxilo terminal de los aminoácidos Ser^{4,8} y $-COO^-$ de Asn⁹, el cuarto ligando posiblemente es una molécula de agua. En el complejo 1:2, una molécula de Zn^{+2} se une a dos de timulina en los aminoácidos Ser⁴ y Asn⁹ (Gastinel y col., 1984; Dardenne y col., 1985; Cung y col., 1988). La conformación 1:1 es la única que es reconocida por los anticuerpos monoclonales específicos para la timulina, además es la que muestra la mayor actividad biológica (Imaizumi y col., 1981; Dardenne y col., 1982) [Figura 9].

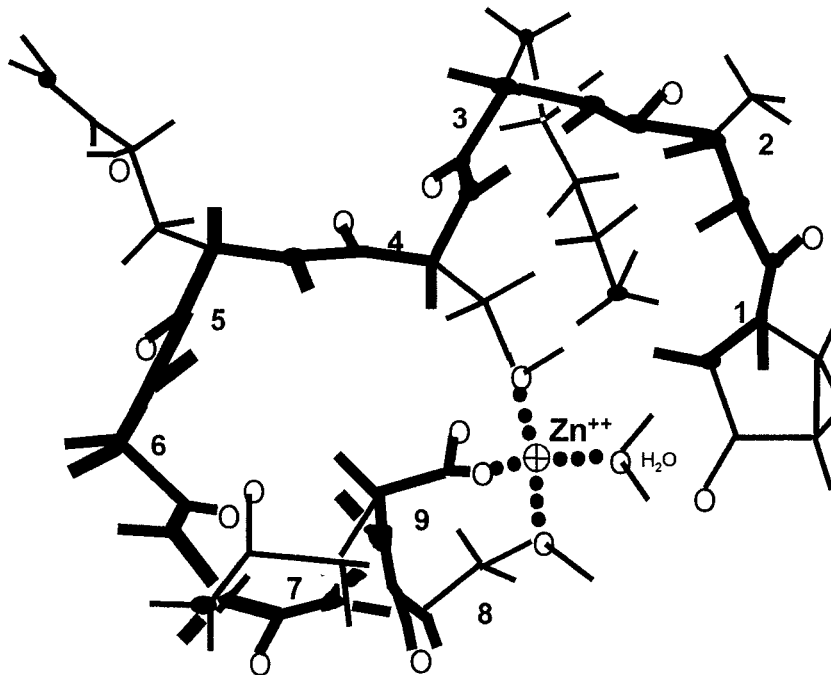


Figura 9. Esquema que muestra el complejo 1:1 de la unión timulina- Zn^{+2} con los aminoácidos Ser^4-OH , y Ser^8-OH y Asn^9-COO^- (Tomado de Cung y col., 1988).

En los linfocitos T se han descrito dos tipos de receptores de timulina y su unión es específica, saturable y reversible. La constante de disociación de cada receptor es de 0.516 ± 0.2 nM y 110 ± 27.8 nM, su concentración es de 0.186 ± 0.045 pmol y 2.026 ± 0.367 pmol/mg de membrana y su número es de 5×10^4 y 8×10^4 receptores por célula (Pléau y col., 1980; Gastinel y col., 1984).

Mecanismos de acción de la timulina

Los mecanismos de acción de la timulina han sido poco estudiados, aunque se describe que en la traducción de señales a partir de la unión de la timulina con su receptor, participan el AMPc, GMPc, fosfato de inositol y calcio como segundos mensajeros (Hadley y col., 1997; Brown y col., 1998, 1999, 2000).

La timulina al unirse al receptor de membrana activa a las proteínas G, las que a su vez estimulan a la enzima adenilato ciclasa o guanilato ciclasa que se localizan en la membrana celular. La adenilato ciclasa transforma el ATP en AMPc, mientras que la guanilato ciclasa desfosforila al GTP en GMPc. Tanto AMPc como GMPc activan a las PKs, las cuales fosforilan proteínas en la membrana celular, lo que permite la apertura de canales iónicos y la liberación de una hormona. Si las PKs que se localizan en el citoplasma son activadas, entran al núcleo y fosforilan a factores de transcripción que regulan la expresión de genes encargados de la síntesis de una proteína como un receptor, una enzima, hormona o neurotransmisor (Enjalbert, 1989; Hanley y Steiner, 1989).

La activación del fosfato de inositol ocurre de manera similar a lo descrito para las proteínas G. La proteína que se activa en la membrana es una fosfolipasa C que cataliza la conversión de fosfatidil inositol bifosfato en el IP₃ y DAG. El IP₃ en el citoplasma se une a receptores específicos que se encuentran en el retículo endoplásmico e induce la liberación de calcio, el cual activa PKs tipo C o Pks dependientes de calmodulina. El DAG activa a las PKs que a su vez, fosforilan factores de transcripción que regulan la transcripción génica (Enjalbert, 1989; Hanley y Steiner, 1989).

Efectos de la timulina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

Algunas timosinas han sido detectadas en otros órganos como el bazo, hígado, pulmón, riñón y Sistema Nervioso Central, también son producidas por macrófagos, los cuales están presentes en muchos tejidos (Dalakas y col., 1984; Horecker, 1984). La timulina es sintetizada exclusivamente por el epitelio tímico, ya que se ha mostrado que en el ratón congénitamente atímico nu/nu dicho péptido está ausente y en los animales timentomizados, la timulina desaparece de la circulación sanguínea después de realizada la operación (Safieh y col., 1990). En ambos modelos experimentales, cuando se realiza un injerto de timo o de células retículo-epiteliales tímicas, la timulina es detectada en el

suero (Dardenne y col., 1974; Safieh y col., 1990; Hall y col., 1992).

Estudios de inmunofluorescencia realizados en el timo del ratón y en humano, muestran la existencia de una unión específica del anticuerpo anti-timulina con las células retículo-epiteliales de este órgano y la mayor cantidad se observa en los corpúsculos de Hassall (Monier y col., 1980; Jambon y col., 1981; Savino y col., 1982).

La concentración plasmática de la timulina varía a lo largo de la vida del individuo. En el ratón, la timulina se ha detectado desde los 14 días de vida intrauterina y su concentración en plasma se mantiene estable hasta los 5 ó 7 meses de edad, posteriormente disminuye llegando a valores mínimos hacia los 12 meses. En el hombre, la timulina está presente a partir de la sexta semana del desarrollo embrionario, en el recién nacido la concentración de timulina es de aproximadamente 2000 fg/ml en el suero obtenido del cordón umbilical. La concentración de este péptido en el suero se mantiene estable hasta los 15 ó 20 años de edad, seguida de una progresiva disminución conforme avanza la edad (Dardenne y Bach, 1981; Jambon y col., 1981; Safieh y col., 1990; Consolini y col., 2000). Esta baja en la concentración de la timulina en plasma es paralela a la involución del timo y se ha mostrado que se debe al decremento en la síntesis de la timulina y a la presencia en sangre de sus inhibidores (Dardenne y Bach, 1981; Jambon y col., 1981; Consolini y col., 2000) [Figura 10].

En la rata y el humano, la timulina presenta un patrón de secreción circádico y su máxima liberación se observa en la noche. En la rata, la administración de melatonina durante el día incrementa la concentración de timulina, mientras que la acción prolongada de luz o la pinealectomía disminuyen su concentración (Molinero y col., 2000).

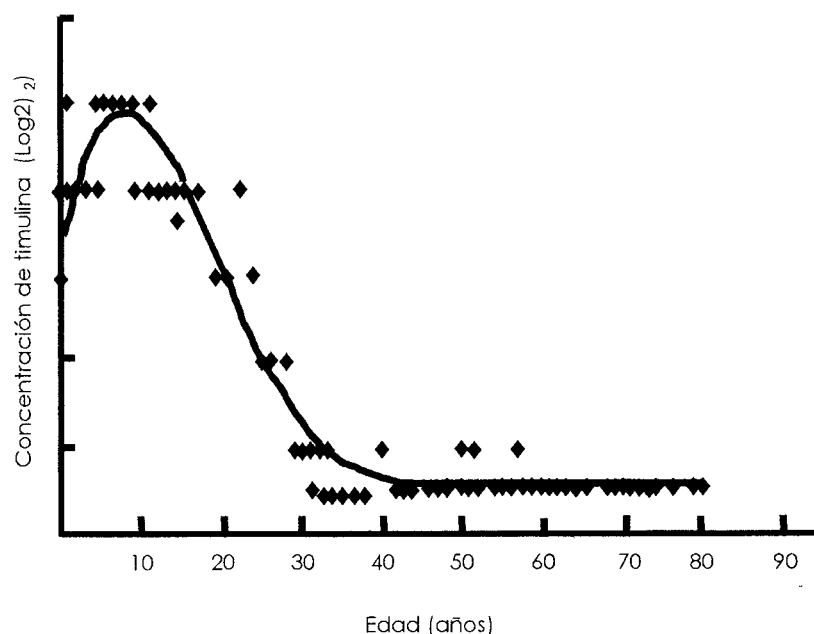


Figura 10. Figura que muestra la concentración de timulina en el plasma de humanos a lo largo de la vida. La timulina disminuye a partir de la pubertad y va decreciendo conforme avanza la edad (Tomado de Consolini y col., 2000).

Se ha propuesto que la liberación de la timulina es regulada por los esteroides sexuales, ya que la castración en el ratón adulto provoca disminución de la concentración plasmática de la timosina e incremento en el número de células epiteliales del timo que contienen dicha hormona, mientras que la administración de testosterona inmediatamente después de la intervención quirúrgica previene estos efectos (Dardenne y col., 1986).

En animales desnutridos o con deficiencias en Zn^{+2} , así como en el ratón viejo (15 y 18 meses de edad), la concentración de timulina en el plasma es baja. Cuando se suplementa la dieta de estos animales con Zn^{+2} , se restaura la concentración de la timulina (Boukaiba y col., 1993; Dardenne y col., 1993).

Estudios *in vitro* muestran que la timulina estimula la proliferación de las células germinales de los ovarios y testículos de fetos de rata. En cultivo de testículo de rata sacrificada entre el día dos y seis de edad, la timulina incrementa la tasa de incorporación de timidina tritiada a los gonocitos (Prépin 1991, 1993; Prépin y col., 1994). Cuando se administra el TGF β -1 (inhibidor del crecimiento y la diferenciación celular) a los cultivos de células germinales, se bloquea el incremento en la proliferación inducido por la timulina (Prépin y Le Vigouroux, 1997).

En cultivos de células de la granulosa de ovarios de cerda estimuladas con FSH o LH, la adición de timulina incrementa la secreción de progesterona y la actividad del complejo enzimático aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). Estos hallazgos no fueron confirmados por Uzumcu y col. (1992), quienes observaron que el agregado de timulina a cultivos de células de la granulosa de rata no tiene efecto en la secreción de progesterona y estradiol. En cultivos de testículo de rata o jabalí, la timulina estimula la secreción de testosterona (Wise, 1998; Wise y Ford, 1999).

En el ratón, la administración diaria de timulina a partir del nacimiento hasta la pubertad, disminuye la concentración sérica de estradiol, incrementa el peso del timo y los animales presentan una mayor respuesta ovulatoria ante el estímulo con eCG (Cerde, 1998). Cuando se inyecta timulina en la etapa peripuberal, se produce un retardo en el inicio de la pubertad, aumenta el peso del timo e incrementa la concentración sérica de progesterona. En el ratón de 20 días la inyección con eCG no resulta en ovulación, sin embargo, la administración de timulina 24 horas antes del tratamiento con eCG, induce la ovulación e incrementa el peso de los ovarios (Hinojosa, 1998; Hinojosa y col., 1999).

La extirpación del timo en el ratón de diez días de vida postnatal provoca la disminución en la concentración sérica de estradiol, mientras que la inyección diaria de timulina inmediatamente después de la timectomía normaliza la concentración del

esteroide. Cuando el ratón timectomizado es tratado de manera secuencial con eCG y hCG a los 25 días de edad, se presenta una disminución significativa en el número de ovocitos liberados, sin embargo, el reemplazo con timulina restablece la cuota ovulatoria (García y col., 2000).

En cultivo de tejido adenohipofisario de rata macho adulta, Zaidi y col. (1988) muestran que la adición de timulina estimula la liberación de la LH en la misma proporción que la que se obtiene cuando la adenohipófisis es estimulada con la GnRH. Esta respuesta se presenta de manera dosis-dependiente. Resultados similares se observan al administrar timulina unida a Zn^{+2} , en explantes de adenohipófisis de rata macho adulta (Hadley y col., 1997).

Brown y col. (2000) mostraron en cultivos de células de adenohipófisis de rata hembra, que la adición de timulina estimula la liberación de FSH y LH, y en presencia de GnRH la timulina tiene un efecto sinérgico en la liberación de la LH, mientras su efecto es aditivo en la secreción de FSH. Dicho efecto se acompañan del incremento en la concentración de segundos mensajeros como son el GMPc, AMPc, calcio y fosfato de inositol (Hadley y col., 1997; Brown y col., 2000).

Interacción funcional de la timulina con otras hormonas hipofisarias

Timulina-PRL

La hiperprolactinemia en ratones jóvenes y viejos inducida por repetidas inyecciones de PRL, incrementa la concentración de timulina (Dardenne y col., 1989). Resultados similares fueron observados en pacientes con hiperprolactinemia ocasionada por adenomas de hipófisis, en los cuales se presentan concentraciones altas de timulina en el suero, mientras que la administración de bromocriptina (agonista de los receptores de PRL y bloqueador de la síntesis de PRL) resulta en una menor producción de timulina de

manera dosis-dependiente (Timsit y col., 1990). La adición de PRL a cultivos de células retículo-epiteliales de timo humano, estimula la secreción de timulina y dicho efecto es inhibido por la administración de anticuerpos contra PRL (Savino y col., 1984; Timsit y col., 1992).

La perfusión de timulina a hipófisis de ratas estimula la liberación de la PRL (Goya y col., 1994); la misma respuesta se observa al agregar timulina a explantes de adenohipófisis obtenidas de rata hembra joven, adulta o vieja, siendo las hipófisis de los animales senescentes menos eficientes en la liberación de PRL (Brown y col., 1998). Estos resultados no concuerdan con lo observado por Hadley col. (1997) quienes describen que la administración de timulina a cultivos de adenohipófisis inhibe la liberación de PRL.

Timulina-GH

Otra de las hormonas hipofisarias que participan en la regulación de la secreción de timulina es la GH. Por ejemplo, niños con deficiencia congénita en la producción de GH presentan menor concentración de timulina en el suero y el tratamiento con GH incrementa la concentración de la timulina en la circulación (Mocchegiani y col., 1990, 1996). La concentración plasmática de timulina es mayor en las personas con acromegalia, que tienen hipersecreción de GH, que en las personas normales. El aumento de la concentración de timulina tiene una correlación positiva con la concentración de IGF-I (Timsit y col., 1990), por lo que se ha propuesto que el efecto estimulante de la GH sobre la timulina está mediado por IGF-I, ya que la adición de un anticuerpo anti IGF-I o contra el receptor de IGF-I, bloquea dicha respuesta (Timsit y col., 1992, De Mello-Coelho y col., 1998).

A su vez, la secreción de GH por la hipófisis es regulada por la timulina, ya que la perfusión de timulina en hipófisis de rata o su agregado a cultivos de células de la

adenohipófisis de rata hembra joven, adulta o vieja, induce incremento en la liberación de la GH (Goya y col., 1994; Brown y col., 1999). En cultivo de células de adenohipófisis, el agregado de timulina aumenta la secreción de la GH en una manera dosis y tiempo-dependiente. El agregado de timulina y GHRH a un cultivo de células de adenohipófisis de ratas jóvenes y adultas tiene un efecto semiaditivo sobre la secreción de GH por las células, mientras que el mismo experimento realizado en adenohipófisis obtenidas de animales viejos, indica que hay una suma de efectos de ambas hormonas (Brown y col., 1999). Hadley y col. (1997) mostraron que la administración de timulina a tejido adenohipofisario de rata macho adulta no induce cambios en la liberación de GH.

Timulina-TSH

En personas con hipertiroidismo, la concentración de timulina es elevada, mientras que es baja en las que tienen hipotiroidismo (Fabris y col., 1986). Además, la concentración de timulina en suero y el número de células retículo-epiteliales que la contienen en la rata y el ratón con hipotiroidismo es menor que en los animales testigo (Savino y col., 1984).

Estudios *in vivo e in vitro* muestran que la timulina estimula la liberación de TSH (Goya y col., 1994; Brown y col., 1998). En las células de adenohipófisis de rata hembra joven, adulta o vieja, la administración de timulina también incrementa la secreción de la TSH de manera dosis-tiempo-dependiente. En todas las edades, el tratamiento de timulina y TRH resulta en un efecto sinérgico sobre la liberación de la TSH (Brown y col., 1998).

Timulina-ACTH

Los resultado de estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que la administración de ACTH estimula la secreción de la timulina (Buckingham y col., 1991, 1992; Safieh y col., 1991). En explantes de adenohipófisis de rata macho adulta, Hadley y col. (1997) mostraron que la administración de timulina resulta en un incremento significativo en la liberación de la ACTH.

También se ha mostrado que la beta-endorfina y la Leu-encefalina estimulan la secreción de la timulina en cultivos de células retículo-epiteliales del timo (Savino y col., 1990).

Las evidencias actuales muestran que la timulina participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, ya que forma parte de los mecanismos que participan en la liberación de las hormonas hipofisarias y la secreción de los esteroides sexuales, la proliferación celular, el crecimiento folicular y la ovulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos resultados experimentales muestran que la inyección sistémica de timulina en el ratón hembra prepúber, incrementa la respuesta ovulatoria frente al estímulo con eCG; su inyección en el hipotálamo medio o la hipófisis anterior de ratones hembras prepúberes, restablece la respuesta ovulatoria en animales cuya ovulación fue bloqueada por la anestesia con éter; estimula la liberación de la FSH y LH por las células de hipófisis de rata hembra, mientras que en el tejido hipofisario del macho solamente la de LH; en cultivos de gónadas estimula la secreción de los esteroides sexuales. Este conjunto de resultados lleva a sugerir que la timulina forma parte de los mecanismos que regulan el sistema reproductor de la hembra y del macho, por dos vías: una sobre la función del eje hipotálamo-hipofisario en la liberación de la FSH y LH, y otra por sus efectos directos en el ovario al estimular la secreción de los esteroides, el crecimiento folicular y la ovulación, y en el testículo al favorecer la esteroidogénesis.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se analizó el papel de la timulina en la regulación de la liberación de la FSH y LH en cultivos de células de adenohipófisis de ratas machos y hembras, además se evaluó si sus efectos son modulados por el ambiente hormonal (esteroides sexuales) del animal del que se obtuvieron las células.

HIPÓTESIS

Dado que la timulina participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, entonces la adición de este péptido tímico a cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho modificará la secreción de la FSH y LH y la respuesta de los gonadotropos dependerá del sexo del animal donante, y en la hembra, del ambiente hormonal que prevalece al momento de la obtención de las células.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la adición de timulina a cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho sobre la liberación de la FSH y LH.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar los efectos de la adición de GnRH a cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH.
2. Estudiar los efectos de la adición de timulina a cultivos de células de adenohipófisis de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH, basal o estimulada por GnRH.
3. Comparar la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis preincubadas con esteroides sexuales y estimuladas o no con timulina, con GnRH o con ambos.
4. Estudiar los efectos de la timulina adicionada a cultivos de células de adenohipófisis de rata obtenidas en cada uno de los días del ciclo estral (diestro 1, diestro 2, proestro o estro), sobre la liberación de FSH y LH, tanto basal como estimulada con GnRH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembra y macho adultas (tres meses de edad) de la cepa Wistar, mantenidas en condiciones controladas de fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luz de 05:00 a 19:00 h), temperatura de 24 ± 2 °C y libre acceso al agua y al alimento. En todos los casos se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana sobre Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El Comité de Bioética de la FES Zaragoza, UNAM, aprobó los protocolos experimentales utilizados en el presente estudio.

Se usaron ratas macho o hembra tomadas al azar (animales en todos los días del ciclo estral) para la obtención de células de adenohipófisis que fueron cultivadas en monocapa. También se utilizaron ratas hembras en las que se realizó el seguimiento del ciclo estral por la toma diaria del frotis vaginal y cuando presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días, se separaron por grupos dependiendo del día del ciclo (diestro 1, diestro 2, proestro o estro) para obtener las células que se cultivaron en suspensión.

Materiales y reactivos

Las hormonas y reactivos fueron adquiridos con los siguientes proveedores: D-MEM, tripsina, suero fetal de bovino y antibiótico (penicilina 10,000 U/ml y estreptomycin 10 mg/ml) de GIBCO (BRL, Grand Island, NY, USA); glucosa y carbón activo de Merck (México); HEPES, timulina, GnRH, progesterona, testosterona y 17β -estradiol de Sigma (Chemical Co., St. Louis, Mo, USA); estuches comerciales para medir progesterona, testosterona y 17β -estradiol de Coat-A-Count (Los Angeles, CA, USA); para medir FSH y

LH los reactivos fueron donados por NIADDK (Bethesda MD, USA). Los materiales usados fueron las cajas de cultivo (6 pozos, 35 mm de diámetro) de Nalgen Nunc (International, Rochester, NY, USA), y los tubos cónicos (15 ml) de Falcon (USA).

Obtención de las células

Las ratas hembra o macho se sacrificaron por decapitación entre las 9:00 y 10:00 h, e inmediatamente se les extrajo el cerebro en forma aséptica y se disecó la hipófisis. Se separó la neurohipófisis de la adenohipófisis. Las células de la adenohipófisis se disociaron siguiendo el método de Steinberger y col. (1973), que consiste en una primer disgregación enzimática del tejido con tripsina al 0.25% en solución salina libre de calcio y magnesio, durante 15 min a 37°C en baño María con agitación.

El tejido se resuspendió en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 1% (v/v) de antibiótico (penicilina 10,000 U/ml y estreptomicina 10 mg/ml) y 0.1% de glucosa, y se sometió a un segundo procedimiento de disgregación mecánica al pasar el tejido repetidas veces por una pipeta. En cada ensayo se realizó el conteo celular en un hemocitómetro.

a) Cultivo en monocapa

En las cajas de cultivo se sembraron 10^6 células/ml obtenidas de adenohipófisis de ratas macho o hembra. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda saturada con 5% de CO₂ y 95% de aire, durante 24 hrs. Pasado este tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se reincubó nuevamente por 24 hrs. Finalizado este tiempo, se realizó otro cambio de medio, y se iniciaron los diferentes tratamientos. Las células se incubaron por tres h y al término del tiempo, se recolectó el medio para la medición de FSH y LH.

b) Cultivo en suspensión

Las células de adenohipófisis obtenidas de ratas en cada uno de los días del ciclo estral, se colocaron en tubos cónicos con 1 ml de D-MEM suplementado y 25 mM de HEPES y se incubaron a 37°C en baño María con agitación durante 1 h. Después de este tiempo, las células en suspensión se centrifugaron a 800 rpm durante 8 min a 4°C. El sobrenadante se extrajo, y se sustituyó por medio fresco, momento en el que se realizaron los tratamientos. Las células se incubaron por 1 h y al finalizar se recolectó el medio para la medición de FSH y LH.

Concentraciones en suero de la FSH, LH y esteroides sexuales

Al momento de la decapitación de los animales se obtuvo sangre del tronco, se le dejó coagular durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se separó el suero y se almacenó a -20°C para la posterior determinación de las concentraciones de FSH, LH y esteroides sexuales por RIA.

Radioinmunoanálisis

La cuantificación de FSH y LH en el suero y medio de cultivo, se realizó por RIA de doble anticuerpo, siguiendo el protocolo del National Pituitary Program. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 4% y 7.9% para FSH y de 5.1% y 6.5% para LH y la sensibilidad fue de 0.1 ng/ml. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado y los resultados se expresaron como los estándares internacionales de referencia NIADDK RP-2.

La medición de progesterona, testosterona y 17β-estradiol se realizó por RIA usando la técnica de fase sólida I¹²⁵, y siguiendo el método descrito por Diagnostic Products Corporation (Kubasik y col., 1984). La sensibilidad del método para

progesterona fue 0.02 ng/ml, para testosterona fue 5 pg/ml y para 17 β -estradiol fue 8 pg/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron para progesterona de 5.3% y 9.8%, para testosterona 9.7% y 10.2% y para 17 β -estradiol 6.9% y 10.8%, respectivamente. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Concentración de Zn⁺²

Dado que el Zn⁺² incrementa la vida media y actividad biológica de la timulina (Dardenne y col., 1982, 1984), en este estudio se evaluó la concentración de Zn⁺² por espectrofotometría de absorción atómica (García y col., 2002), en la hipófisis de machos y hembras, y en el suero fetal de bovino adicionado a los cultivos. El límite de detección fue 0.013888 μ g/ml y el de cuantificación fue 0.04629 μ g/ml.

Análisis estadístico

Los datos de las concentraciones de gonadotropinas y esteroides sexuales en el suero, y de Zn⁺² en hipófisis y suero fetal, se analizaron utilizando la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. La concentración de gonadotropinas en el medio de cultivo fue analizada con la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba múltiple de Dunn's. En los casos en que se compararon dos grupos se aplicó la prueba de "U" de Mann-Whitney. Los resultados se expresaron como media \pm e.e.m. Sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5 %.

Se realizó un análisis del coeficiente de correlación (r^2) entre la concentración de esteroides sexuales y los efectos de la timulina en la liberación de las gonadotropinas, y sólo fueron considerados significativos los valores que fueron iguales o mayores a 0.85.

RESULTADOS

Análisis de las variaciones de las concentraciones de FSH, LH y esteroides sexuales

El análisis de la concentración de FSH en el suero de las ratas hembra sacrificadas en la mañana de cada día del ciclo estral muestra que ésta fue mayor en los días del proestro y estro que en el día del diestro 2, la cual fue similar a la medida en ratas en diestro 1. No se observaron diferencias significativas en la concentración de LH. En los días del diestro 2 y proestro, la concentración de progesterona fue menor que en el día del diestro 1, mientras que las concentraciones de testosterona y estradiol mostraron su mayor valor en el día del proestro (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. de las concentraciones de FSH, LH, progesterona, testosterona y 17 β -estradiol en el suero de ratas sacrificadas en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral.

Grupos	n	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Progesterona (ng/ml)	Testosterona (pg/ml)	17β-estradiol (pg/ml)
<i>Diestro 1</i>	6	5.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	16.4 \pm 2.0	52 \pm 10	39.7 \pm 1.4
<i>Diestro 2</i>	6	5.1 \pm 0.4	0.5 \pm 0.0	9.4 \pm 1.6 <i>a</i>	298 \pm 109	46.0 \pm 2.5
<i>Proestro</i>	6	7.5 \pm 0.7 <i>b</i>	0.7 \pm 0.1	8.5 \pm 1.5 <i>a</i>	566 \pm 162 <i>a,c</i>	53.2 \pm 3.1 <i>a,c</i>
<i>Estro</i>	6	7.1 \pm 0.5 <i>b</i>	0.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.7	32 \pm 6	38.8 \pm 1.6

a, $p < 0.05$ vs. diestro 1 (ANDEVA seguida de Tukey)

b, $p < 0.05$ vs. diestro 2 (ANDEVA seguida de Tukey)

c, $p < 0.05$ vs. estro (ANDEVA seguida de Tukey)

En la figura 11 se muestra la comparación de las concentraciones hormonales entre machos y hembras analizadas en la mañana de cada día del ciclo estral. La concentración de FSH en el suero de la rata hembra siempre fue menor que la del macho. No se observaron diferencias significativas en la concentración de LH entre machos y hembras. La concentración de progesterona fue significativamente menor en

el macho que en la hembra independientemente del día del ciclo estral considerado, mientras que la de testosterona fue mayor.

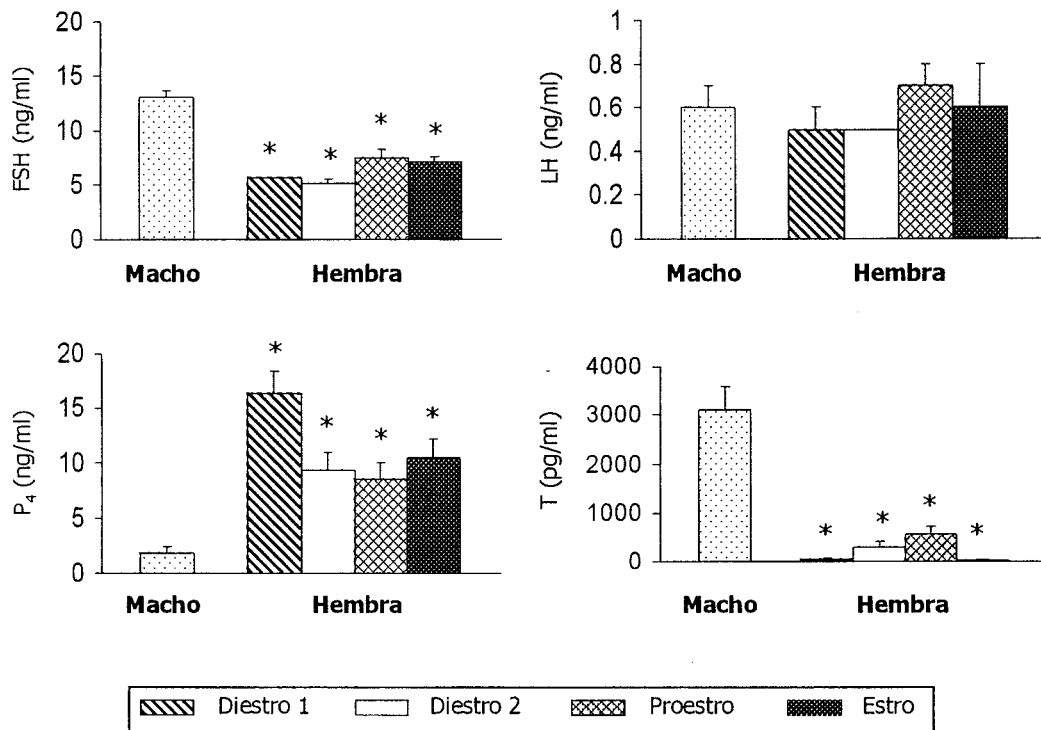


Figura 11. Media \pm e.e.m. de las concentraciones de FSH, LH, progesterona (P₄) y testosterona (T) en el suero de ratas macho o hembra sacrificadas en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral. * $p < 0.05$ vs. macho (Prueba de "U" de Mann-Whitney).

Variaciones de la concentración de Zinc

La concentración de Zn⁺² en la hipófisis de la rata hembra no presentó diferencias significativas durante el ciclo estral (diestro 1: 32.0 ± 0.5 ; diestro 2: 35.6 ± 1.6 ; proestro: 36.3 ± 1.5 ; estro: 35.5 ± 0.7 ng/mg de tejido fresco, NS). En el macho, la concentración del metal fue menor que en la hembra (24.4 ± 1.6 ng/mg de tejido fresco). La concentración de Zn⁺² en el suero fetal de bovino adicionado al cultivo fue de 284 ng/ml de medio.

Objetivo 1. Análisis de los efectos de la adición de GnRH a cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH

Con el fin de evaluar la respuesta de los células de adenohipófisis a la administración de GnRH y determinar la dosis efectiva al 50% (DE₅₀) en la liberación de FSH y LH, se utilizaron cultivos en monocapa de células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho, las cuales se trataron con GnRH en las siguientes concentraciones: 10⁻¹², 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ y 10⁻⁶ M, o no recibieron tratamiento (basal).

Resultados

Los gonadotropos de las hembras liberaron la mayor cantidad de FSH y LH con el tratamiento de GnRH 10⁻⁸ M de. En los cultivos de células obtenidas de las ratas macho la máxima liberación de FSH se observó cuando fueron tratadas con 10⁻⁸ M de GnRH, mientras que la máxima liberación de LH se observó en los cultivos tratados con de 10⁻¹² M (Figura 12).

Con base en los resultados obtenidos la DE₅₀ de GnRH en la hembra para FSH y LH fue de 10⁻⁹ M. Dado que uno de los objetivos era poder comparar la respuesta de los las células de hipófisis anterior obtenidos de machos y hembras, y a pesar de que las células secretoras de LH de los machos son más sensibles que las de las hembras, se decidió usar las misma dosis de GnRH para el tratamiento de las células en ambos sexos.

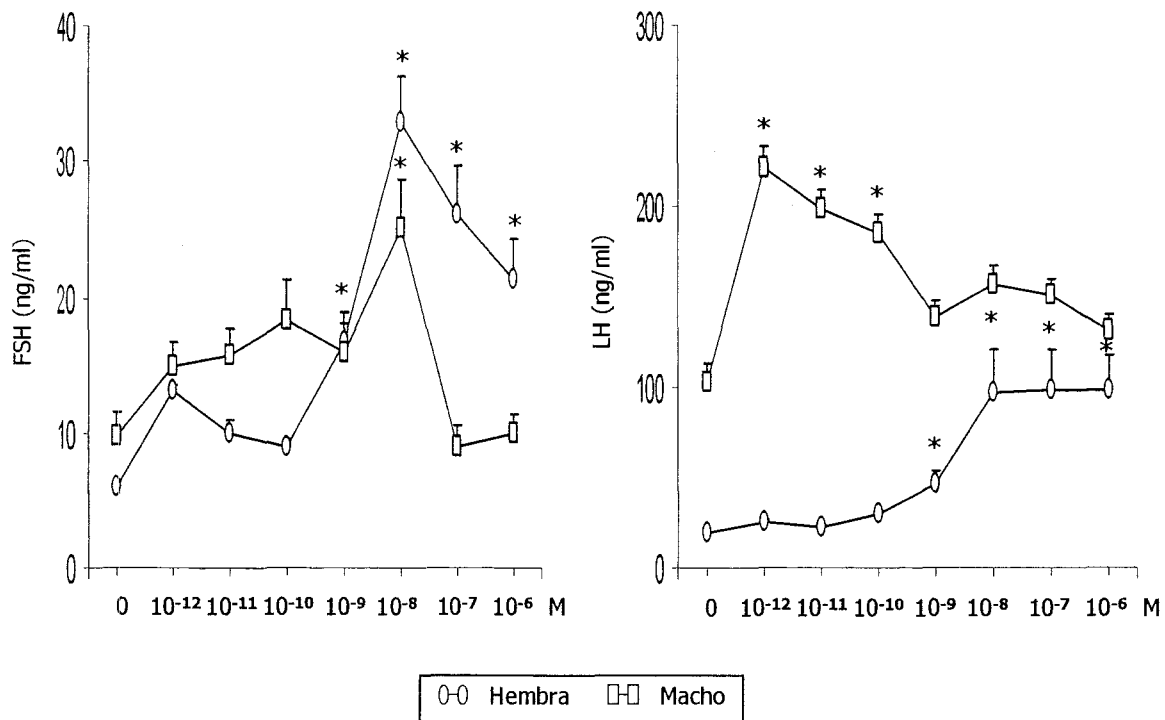


Figura 12. Curva dosis-respuesta de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas, incubadas por tres hrs en presencia de diferentes concentraciones de GnRH o sin tratamiento (basal). * $p < 0.05$ vs. basal correspondiente (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn's).

Objetivo 2. Estudio de los efectos de la adición de timulina a cultivos de células de adenohipófisis de ratas macho o hembra (independientemente del día del ciclo estral del donador) sobre la liberación de FSH y LH, basal o estimulada por GnRH

Para analizar si la timulina participa en la regulación de la liberación de la FSH y LH, se utilizaron cultivos en monocapa de células de adenohipófisis de ratas hembra o macho, a los cuales se les adicionaron 100 ng/ml de timulina, GnRH 10^{-9} M o la combinación de ambas hormonas, además de un grupo sin tratamiento. Las células fueron incubadas

durante tres hrs y luego se recuperó el medio de cultivo.

Resultados

La adición de timulina no indujo cambios significativos en la liberación de FSH y LH en el medio por las células adenohipofisarias de la hembra. El tratamiento con GnRH incrementó la liberación de FSH y LH y esta respuesta no fue modificada por la administración conjunta de GnRH+timulina (Figura 13).

La liberación basal de FSH por las células de rata macho fue mayor que en las de la hembra. El agregado de timulina al medio de cultivo resultó en una menor liberación de FSH que la observada en los cultivos sin tratamiento. En cambio, la adición de GnRH o GnRH+timulina no modificó la concentración de esta hormona (Figura 13).

En la adenohipófisis de rata macho, la adición de timulina resultó en una menor liberación de LH al medio, mientras que la de GnRH o GnRH+timulina no modificó la concentración de la LH (Figura 13).

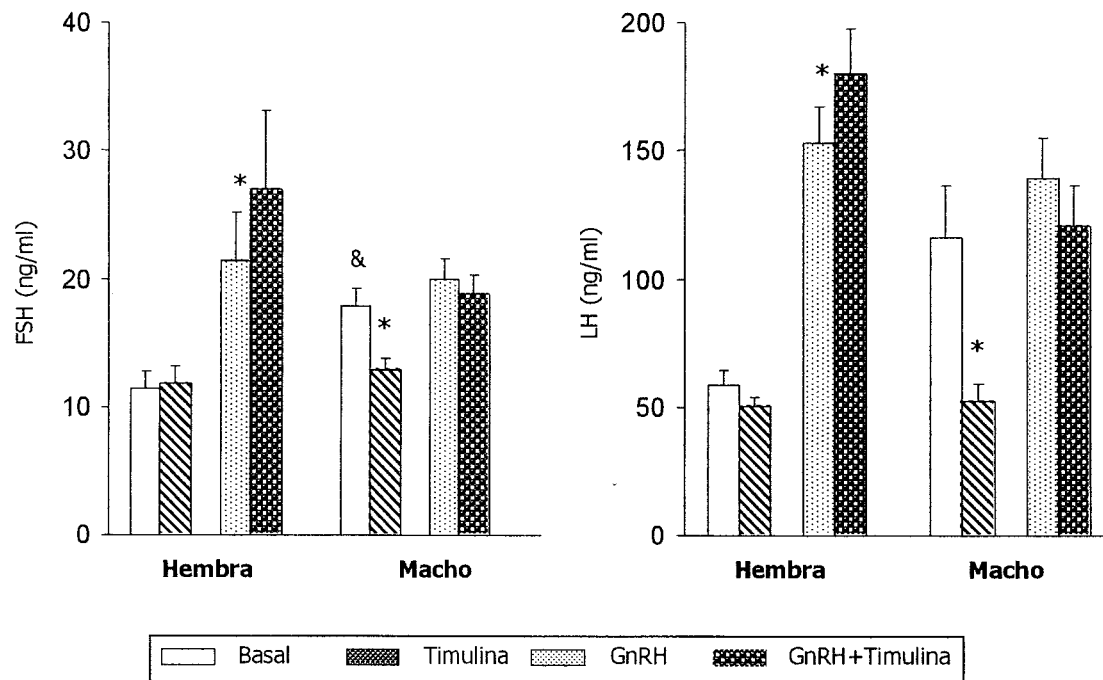


Figura 13. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas, preincubadas durante 48 hrs. Las células fueron incubadas por tres hrs sin o con timulina (100 ng/ml) y en presencia o no de GnRH (10^{-9} M). * $p < 0.05$ vs. basal; & $p < 0.05$ vs. hembra (Prueba de "U" de Mann-Whitney).

Objetivo 3. Análisis comparativo de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis preincubadas con esteroides sexuales y estimuladas o no con timulina, con GnRH o con ambas

Con el fin de evaluar si la respuesta de las células de adenohipófisis en cultivo al tratamiento con timulina es regulada por los esteroides sexuales, se utilizaron células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho cultivadas en monocapa y preincubadas por 24 hrs. Posteriormente se cambió el medio de cultivo con D-MEM suplementado con suero fetal de bovino lavado con carbón activado y se adicionaron 50 ng/ml de progesterona, 100 pg/ml de testosterona, ó 100 pg/ml de 17β -estradiol

disueltos en etanol al 1%. Como testigo se utilizaron pozos a los que solamente se les agregaron 5 μ l/ml de etanol y otros que no recibieron tratamiento (basal). Las células se incubaron por 24 hrs, se sustituyó el medio y los cultivos se trataron con timulina, GnRH, o GnRH+timulina en las mismas concentraciones que en el experimento anterior.

Resultados

Dado que la adición de etanol al medio de cultivo no modificó de manera significativa la liberación basal y la estimulada de FSH y LH (Tabla 2), los resultados de los efectos del pretratamiento con progesterona, testosterona ó 17 β -estradiol fueron comparados con los cultivos que no recibieron algún tratamiento previo.

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas, preincubadas durante 24 hrs en presencia o no de etanol, al término del tiempo las células se trataron o no con GnRH (10^{-9} M) por tres hrs.

<i>Grupos</i>	HEMBRA		MACHO	
	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
<i>Basal</i>	11.4 \pm 1.4	58.6 \pm 6.1	17.9 \pm 1.4	116.3 \pm 20.0
<i>Etanol</i>	11.5 \pm 4.1	68.6 \pm 7.5	16.4 \pm 1.7	82.4 \pm 18.7
<i>GnRH</i>	21.4 \pm 3.8 *	153.0 \pm 14.2 *	20.0 \pm 1.6	139.2 \pm 15.6
<i>Etanol + GnRH</i>	18.8 \pm 1.7	130.1 \pm 12.3	15.9 \pm 1.6	87.2 \pm 19.4

* $p < 0.05$ vs. basal (prueba de "U" de Mann-Whitney)

a) FSH

La preincubación con progesterona, testosterona ó 17 β -estradiol a las células de adenohipófisis de ratas hembra no modificó la liberación de FSH. La adición de GnRH a los cultivos celulares de ratas hembra preincubadas con progesterona ó 17 β -estradiol resultó en un aumento significativo de la liberación de la hormona en comparación con las células que sólo recibieron el esteroide. La respuesta de las células preincubadas con

testosterona y tratadas con GnRH fue significativamente menor que la de las células sin el esteroide y estimuladas con GnRH (Figura 14 panel A).

La preincubación de las células de adenohipófisis de ratas macho con testosterona resultó en una menor liberación de la FSH, tanto en las células que fueron estimuladas o no con GnRH. La adición de GnRH a las células de hipófisis preincubadas con 17β -estradiol resultó en una mayor liberación de FSH que en aquellas que no recibieron GnRH. La preincubación con progesterona no modificó la respuesta celular (Figura 14 panel B).

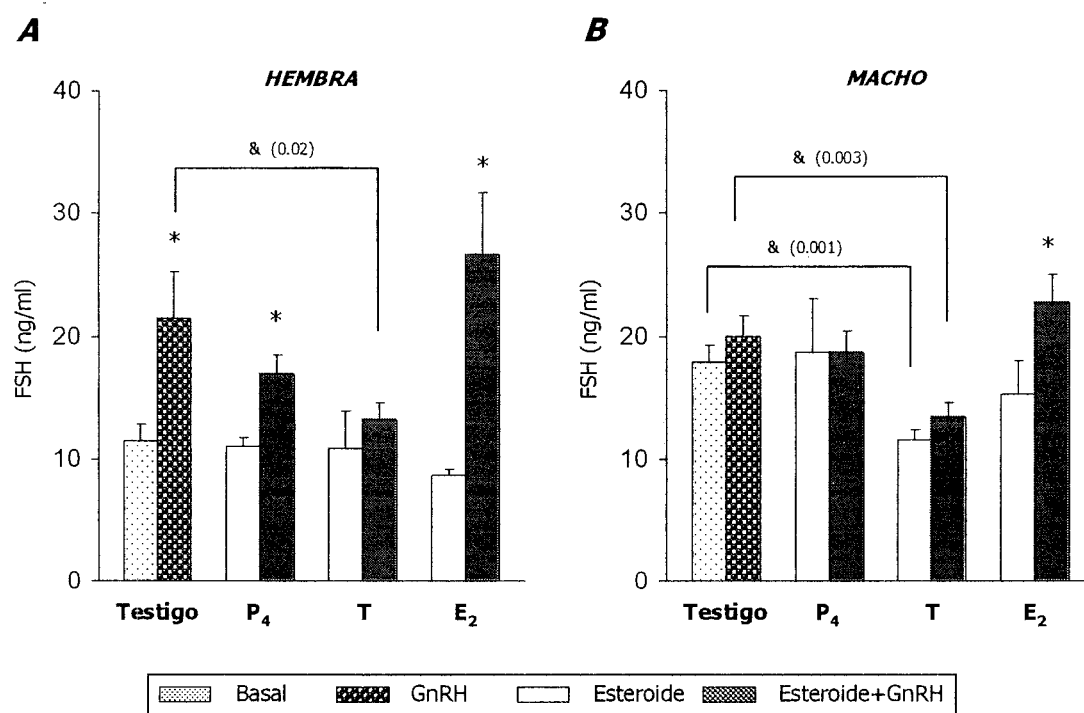


Figura 14. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con progesterona [P₄] (50 ng/ml), testosterona [T] (100 pg/ml), 17β -estradiol [E₂] (100 pg/ml) o sin esteroides (testigo). El medio fue reemplazado por medio fresco con o sin GnRH (10^{-9} M), y se incubaron por tres hrs. * $p < 0.05$ vs. Basal; # $p < 0.05$ vs. Testigo (prueba de "U" de Mann-Whitney).

En las hipófisis obtenidas de ratas hembra, el pretratamiento con progesterona

seguido del de timulina indujo una mayor liberación de FSH que en las células que sólo recibieron timulina. Este resultado no se observó por la adición de GnRH (Figura 15 panel A). En los cultivos de hipófisis obtenidos del macho, la adición de progesterona más timulina o progesterona más GnRH y timulina no provocó cambios en la concentración de la hormona (Figura 15 panel B).

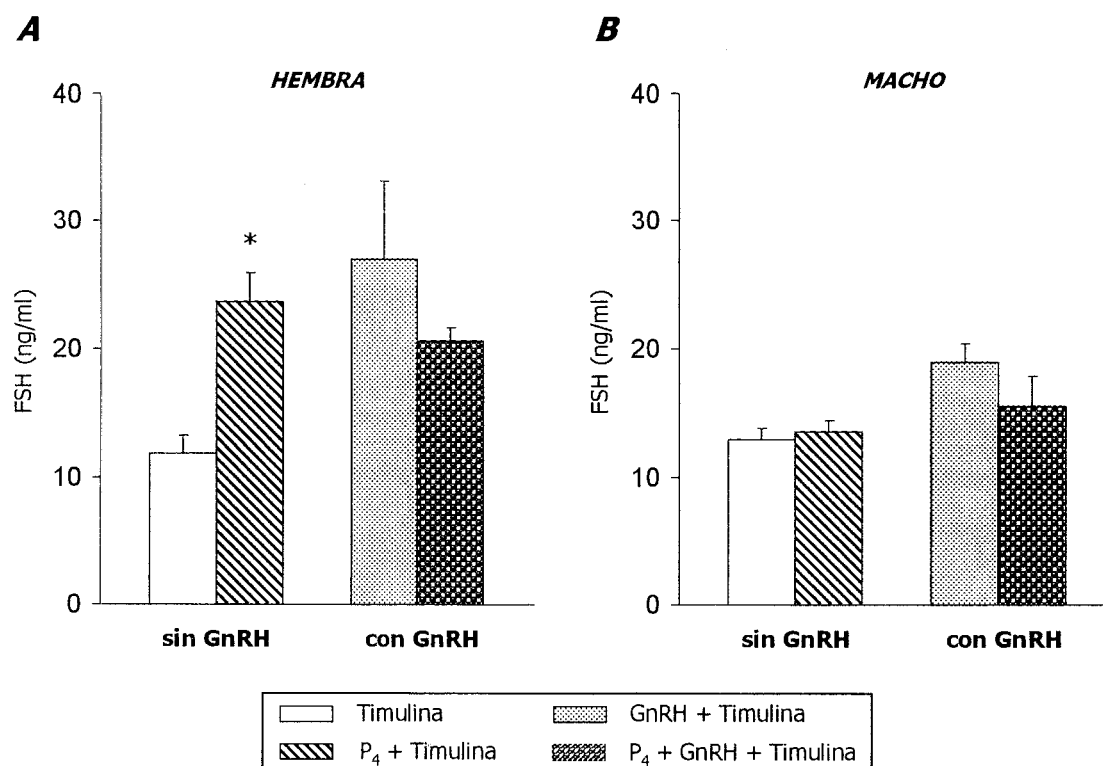


Figura 15. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con o sin progesterona [P₄] (50 ng/ml), después el medio fue reemplazado por medio fresco con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10⁻⁹ M) y timulina, y se incubaron por tres hrs. *p<0.05 vs. timulina (prueba de "U" de Mann-Whitney).

El pretratamiento con testosterona a cultivos de células de adenohipófisis de hembras, seguido de la adición de timulina resultó en una menor liberación de FSH que la observada en las células que fueron tratadas sólo con timulina. Cuando estas células fueron tratadas con testosterona, GnRH y timulina no se modificó la liberación de la

gonadotropina en comparación con las células que recibieron GnRH y timulina (Figura 16 panel A). En los gonadotropos obtenidos de ratas macho, los mismos tratamientos no tuvieron efecto sobre la liberación de FSH (Figura 16 panel B).

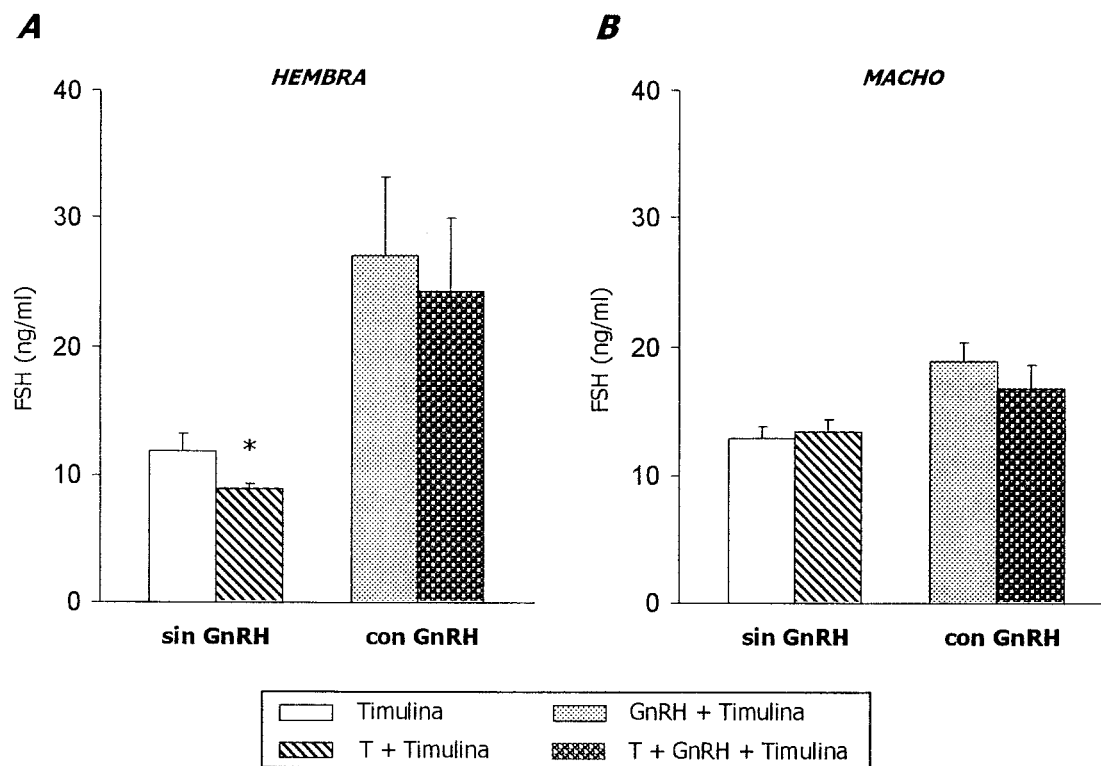


Figura 16. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con o sin testosterona [T] (100 pg/ml), después el medio fue reemplazado por medio fresco con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10^{-9} M) y timulina, y se incubaron por tres hrs. * $p < 0.05$ vs. timulina (prueba de "U" de Mann-Whitney).

No se presentaron cambios en la concentración de FSH en el medio de cultivo de las adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho, por el pretratamiento con 17β -estradiol+timulina ó 17β -estradiol con GnRH+timulina respecto a los grupos sin el esteroide (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. de la liberación de FSH (ng/ml) por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs en

presencia o no de 17β -estradiol [E_2] (100 pg/ml), después el medio fue reemplazado por medio fresco con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10^{-9} M) y timulina, y se incubaron por tres hrs.

<i>Grupos</i>	HEMBRA		MACHO	
	Sin GnRH	Con GnRH	Sin GnRH	Con GnRH
<i>Timulina</i>	11.8 ± 1.4	27.0 ± 6.2	12.9 ± 0.9	18.9 ± 1.4
<i>E₂+Timulina</i>	10.4 ± 2.6	18.3 ± 1.0	14.4 ± 1.6	17.2 ± 1.5

b) LH

En comparación con la liberación basal, el pretratamiento con progesterona, testosterona ó 17β -estradiol a células de hipófisis obtenidas de rata hembra no resultó en cambios significativos en la liberación de LH, mientras que la adición de GnRH resultó en mayor liberación de la hormona, independientemente del esteroide utilizado. El aumento en la liberación de LH en respuesta a la estimulación con GnRH fue significativamente menor en las células pretratadas con progesterona o testosterona y GnRH que en las que no fueron preincubadas con las hormonas sexuales (Figura 17 panel A).

En las células de adenohipófisis de rata macho, el pretratamiento con testosterona o 17β -estradiol resultó en menor liberación de LH que la observada en las células que no recibieron estímulo. Cuando las células preincubadas con testosterona ó 17β -estradiol fueron tratadas con GnRH, la liberación de la gonadotropina fue significativamente mayor que la observada en las células que sólo fueron preincubadas con los esteroides. Las células que fueron preincubados con testosterona, liberaron menor cantidad de LH en respuesta a la estimulación con GnRH que los que no fueron preincubados con ninguna hormona sexual, pero si con GnRH. La preincubación de las células con progesterona no modificó de manera significativa la respuesta de las células a la GnRH (Figura 17 panel B).

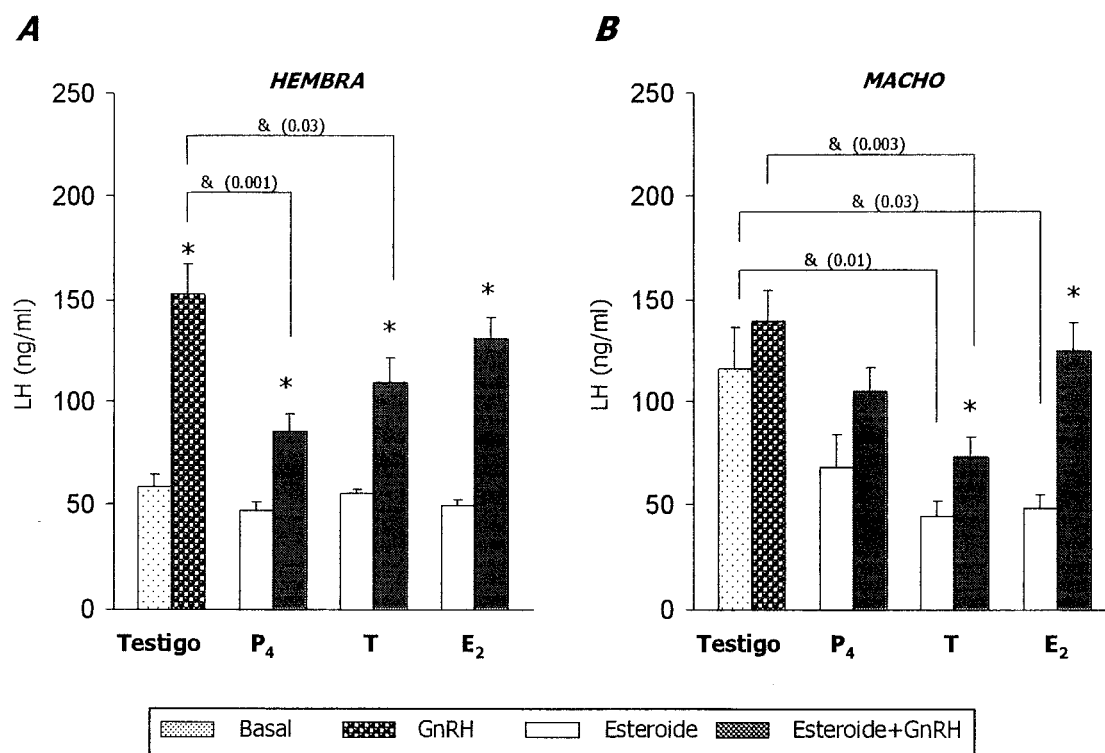


Figura 17. Media \pm e.e.m. de la liberación de LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con progesterona [P₄] (50 ng/ml), testosterona [T] (100 pg/ml), 17 β -estradiol [E₂] (100 pg/ml) o sin esteroides (testigo). El medio fue reemplazado por medio fresco con o sin GnRH (10⁻⁹ M), y se incubaron por tres hrs. *p<0.05 vs. Basal; # p<0.05 vs. Testigo (prueba de "U" de Mann-Whitney).

La adición de timulina a los cultivos de células de adenohipófisis de hembra preincubadas con progesterona no modificó la liberación de LH, aunque la respuesta de las células preincubadas con el esteroide al estímulo con GnRH+timulina fue menor que en las células que no fueron preincubadas con progesterona, pero si con timulina. Resultados similares fueron observados en los cultivos obtenidos de ratas macho (Figura 18 paneles A y B).

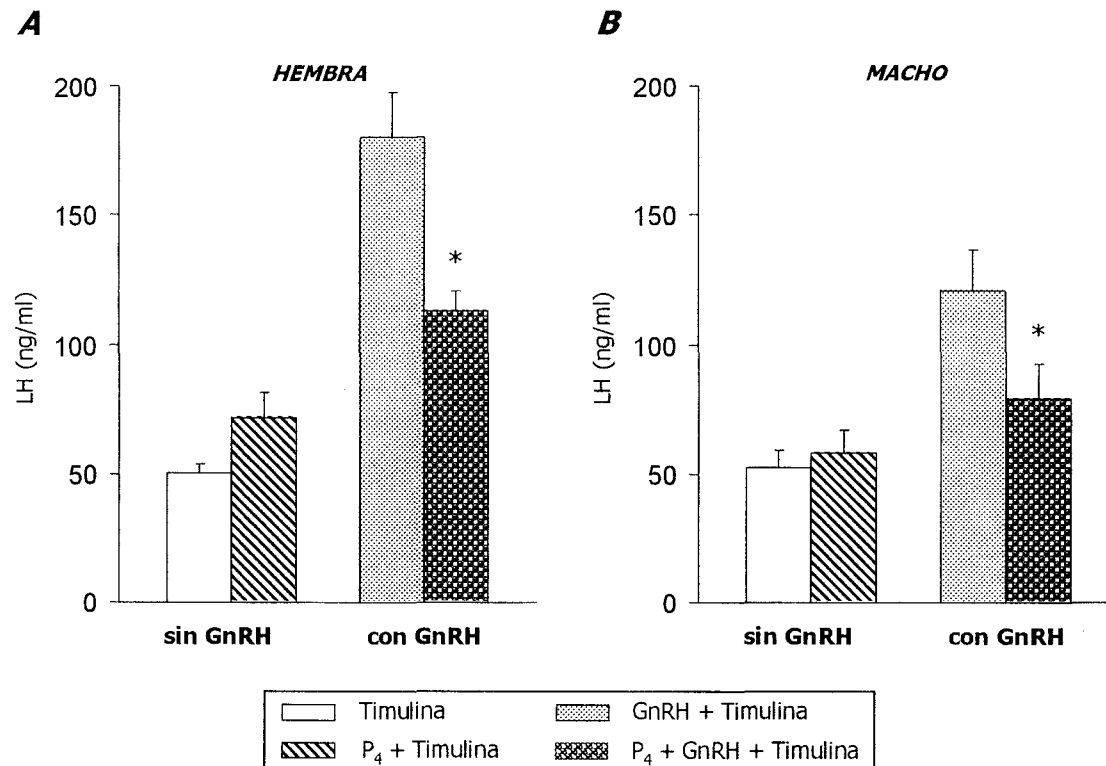


Figura 18. Media \pm e.e.m. de la liberación de LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con o sin progesterona [P₄] (50 ng/ml), después el medio fue reemplazado por medio fresco con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10⁻⁹ M) y timulina, y se incubaron por tres hrs. * p<0.05 vs. GnRH+timulina (prueba de "U" de Mann-Whitney).

La liberación de LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho, no fue modificada por el pretratamiento con testosterona y posterior adición de timulina o testosterona con GnRH+timulina, respecto a los grupos sin el esteroide (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. de la liberación de LH (ng/ml) por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs en presencia o no de testosterona [T] (100 pg/ml), después el medio fue reemplazado por otro con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10^{-9} M) y timulina, y se incubaron por tres hrs.

<i>Grupos</i>	HEMBRA		MACHO	
	Sin GnRH	Con GnRH	Sin GnRH	Con GnRH
<i>Timulina</i>	50.5 \pm 3.1	179.8 \pm 17.8	52.1 \pm 7.0	120.9 \pm 15.7
<i>T+Timulina</i>	47.5 \pm 3.7	144.6 \pm 5.2	50.0 \pm 4.9	95.1 \pm 12.5

En comparación con los cultivos obtenidos de ratas hembra que fueron tratadas con timulina, las células preincubadas con 17β -estradiol liberaron mayor cantidad de LH en respuesta a la adición de timulina. El agregado de GnRH no modificó de manera significativa este resultado (Figura 19 panel A). La preincubación con 17β -estradiol de las células de adenohipófisis obtenidas de ratas macho, no modificó la respuesta de las células a la estimulación con timulina o GnRH+timulina (Figura 19 panel B).

Objetivo 4. Estudio de los efectos de la timulina adicionada a cultivos de células de adenohipófisis de rata obtenidas en cada uno de los días del ciclo estral (diestro 1, diestro 2, proestro o estro), sobre la liberación de FSH y LH, tanto basal como estimulada con GnRH

Este experimento fue diseñado para analizar si la respuesta de la hipófisis de la rata hembra al tratamiento con timulina, GnRH o GnRH+timulina es diferente dependiendo del día del ciclo estral de la donadora.

El planteamiento del problema, los experimentos realizados, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos están publicados en extenso en el siguiente artículo.

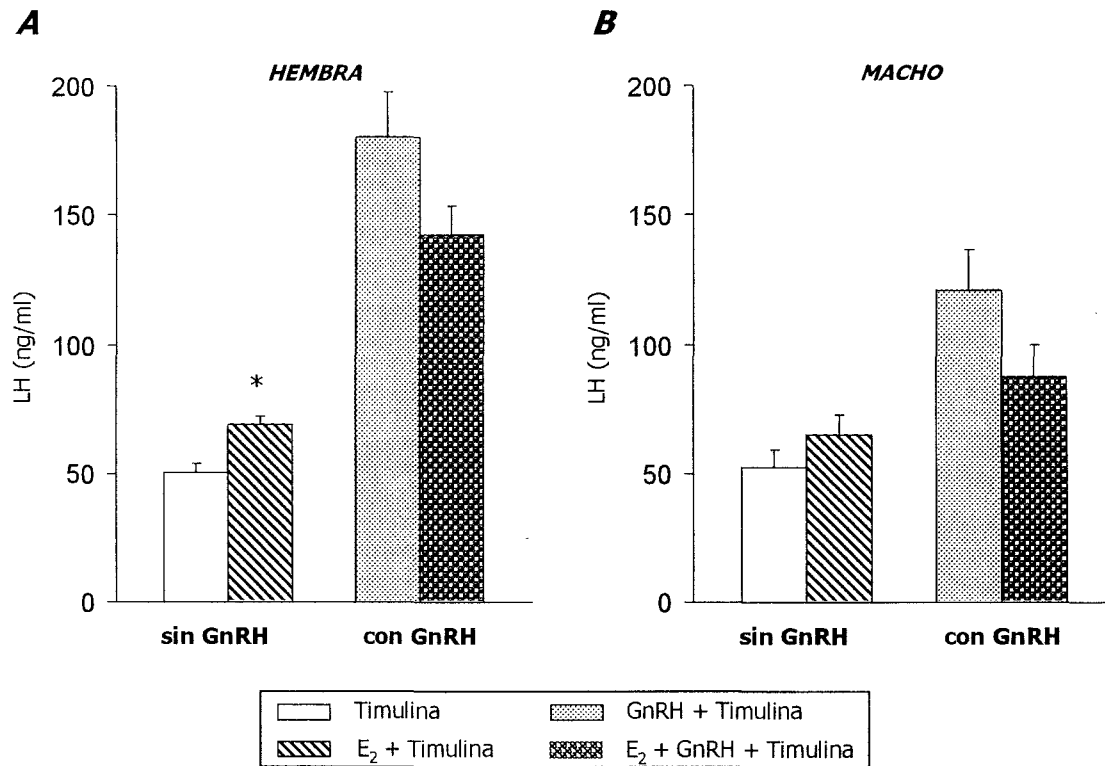


Figura 19. Media \pm e.e.m. de la liberación de LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra o macho adultas. Las células fueron preincubadas durante 24 hrs con o sin 17 β -estradiol [E₂] (100 pg/ml), después el medio fue reemplazado por otro con timulina (100 ng/ml), o con GnRH (10⁻⁹ M) y timulina, y se incubaron por tres hrs. *p<0.05 vs. timulina (prueba de "U" de Mann-Whitney).

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Life Sciences 76 (2004) 795–804

Life Sciences

www.elsevier.com/locate/lifescie

Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by in vitro pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle

Lorena Hinojosa^a, Lorena García^a, Roberto Domínguez^a, Marta C. Romano^b, Pablo G. Damián-Matsumura^c, Lourdes Castillo^d, Patricia Rosas^{a,*}

^a*Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Neuroimmuno-endocrinology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, A.P. 9-020. CP 15000, México DF, México*

^b*Physiology, Biophysics and Neuroscience Department, CINVESTAV, IPN, México*

^c*Biology of Reproduction Department, UAM-Iztapalapa, México*

^d*Laboratory of Spectrophotometry, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México*

Received 23 June 2004; accepted 13 July 2004

Abstract

The effects of thymulin and GnRH on FSH and LH release were studied in suspension cultures of anterior pituitary cells from female adult rats sacrificed on each day of the estrous cycle. The spontaneous release of gonadotropins by pituitaries, as well as their response to GnRH or thymulin addition, fluctuated during the estrous cycle. Adding thymulin to pituitary cells from rats in diestrus 1 increased the concentration of FSH; while in cells from rats in estrus, FSH level decreased. Thymulin had a stimulatory effect on the basal concentration of LH during most days of the estrous cycle. Adding GnRH increased FSH release in cells from rats in diestrus 1, diestrus 2, or proestrus, and resulted in higher LH levels in cells obtained from rats in all days of the estrous cycle. Compared to the GnRH treatment, the simultaneous addition of thymulin and GnRH to cells from rats in diestrus 1, diestrus 2, or proestrus resulted in lower FSH concentrations. Similar results were observed in the LH release by cells from rats in diestrus 1, while in cells from rats in proestrus or estrus, LH concentrations increased. A directly proportional relation between progesterone serum levels and the effects of thymulin on FSH release was observed.

* Corresponding author. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, UNAM. A.P. 09-020. CP 15000, México, D.F., México. Tel.: +52 55 56230711, +52 55 56230732; fax: +52 55 56700859.

E-mail addresses: prosas44@correo.unam.mx, lhinojosab@hotmail.com, rdcasala@hotmail.com (P. Rosas).

These data suggest that thymulin plays a dual role in the release of gonadotropins, and that its effects depend on the hormonal status of the donor's pituitary.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Thymulin; Pituitary cells; FSH; LH; GnRH; Estrous cycle

Introduction

Based on published results on the effects of neonatal or infantile thymectomy (Besedovsky and Sorkin, 1974; Michael et al., 1980; Kosiewicz and Michael, 1990; García et al., 2000), the congenital absence of the thymus (Rebar et al., 1981b), and the effects of thymic peptides on *in vivo* and *in vitro* models (Rebar et al., 1981a; Michael, 1983; Mendoza and Romano, 1989; Mendoza et al., 1995; Hinojosa et al., 1999), the participation of the thymus in regulating the hypothalamic-pituitary-ovary axis is widely accepted.

Thymulin is a nonapeptide (pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH) exclusively synthesized by the thymic epithelium, since it is not detected in athymic nude mice (nu/nu) or in thymectomized mice. In both models, grafting the thymus or epithelial thymic cells results in the detection of thymulin in serum (Bach et al., 1977; Dardenne et al., 1984; Safieh et al., 1990). Injecting equine chorionic gonadotropin (eCG) to 20-day old mice does not induce ovulation; however, thymulin treatment before eCG injection results in an increase of both, ovulation rate and ovarian weight (Hinojosa et al., 1999). Infantile thymectomy in mice results in lower serum level of estrogen during the pre-pubertal phase and in a lower ovulatory response to gonadotropin stimulus; in turn, injecting thymulin immediately after surgery resulted in normal estrogen level and normal ovulation rates (García et al., 2000).

In vitro studies show that in both, male and female gonads, thymulin modulates steroidogenesis (Ledwitz-Rigby and Scheid, 1990; Wise, 1998). In *in vitro* conditions, the addition of thymulin to pituitary tissue obtained from adult male rats stimulates the release of luteinizing hormone (LH) in a dose-related way; similar to the responses obtained by adding gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (Zaidi et al., 1988; Hadley et al., 1997). Comparable results were observed on the release of follicle stimulating hormone (FSH) and LH from perifusates pituitary cells, or stationary cell cultures obtained from female rats (Brown et al., 2000).

Taken together, the results reported to date suggest that in *in vitro* conditions, thymulin stimulates the release of FSH and LH. However, previous studies have been performed without considering the plausible hormonal influences arising from the different days of the estrous cycle. The present study was designed to establish if thymulin's effects on FSH and LH release depend on the hormonal status of the pituitary donor.

Materials and methods

Animals

A total of 160-adult (3 months old) female Wistar rats were used in this study. Animals were housed under controlled light conditions (light on from 05:00 to 19:00 h) and had free access to food and water.

The animals' estrous cycle was monitored by daily vaginal smears. Only rats showing at least two consecutive 4-day cycles were used. Animals were maintained in accordance with the NIH guide for the care and use of laboratory animals. The animal care committee at the FES Zaragoza, UNAM, approved the protocols used in this study.

Cell dispersion

Groups of 10 rats on each day of the estrous cycle were killed by decapitation between 09:00 and 10:00 h., and immediately after sacrifice the pituitary glands were aseptically removed. Cells were obtained following previously described methodologies (Mendoza et al., 1995). Briefly, anterior pituitary glands were dissected, minced, and treated with 0.25% trypsin (1:250; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) in a Ca^{2+} and Mg^{2+} free balanced salt solution, at 37°C for 15 minutes. Cell dissociation was accomplished by repeatedly passing the tissue fragments through a pipette (Steinberger et al., 1973).

Suspension pituitary cells culture

Dispersed cells (10^6 cells) of anterior pituitary glands from four groups of 10 rats, in either diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), proestrus (P), or estrus (E) were seeded in plastic tubes containing 1 ml of culture medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (GIBCO), 1% (v/v) antibiotics (penicillin at 10,000 U/ml, plus streptomycin at 10 mg/ml; GIBCO), and 25 mM of N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA). Cell cultures were maintained at 37°C under constant shaking for 1 h. After this pre-incubation period, the suspension was centrifuged at 800 rpm for 8 minutes at 4°C. The culture medium was removed and the cells were re-suspended in 1 ml of fresh medium.

According to Dardenne et al. (1982, 1984), Zn increases the half-life and biological activity of thymulin. To discard the possibility that the effects of thymulin during the estrous cycle may be explained by differences in pituitary Zn levels, the concentrations of this metal in pituitaries from rats on each day of the estrous cycle were measured by atomic absorption spectrophotometry. We found that the concentrations of Zn in the pituitaries is similar along the estrous cycle (D1: 32.0 ± 0.5 ; D2: 35.6 ± 1.6 ; P: 36.3 ± 1.5 ; E: 35.5 ± 0.7 ng/ml, NS). In order to know the amount of Zn added to cell cultures, the Zn concentration in the fetal bovine serum was also measured. Our results indicate that Zn was added at a rate of 284 ng/ml of medium.

Experimental design

Effects of thymulin, GnRH, or thymulin and GnRH treatment on FSH and LH release by adenohypophyseal cells during the estrous cycle

After a pre-incubation period of 1 h, suspended pituitary cell cultures from rats on each day of the estrous cycle were treated with 100 ng/ml of thymulin (Sigma), with 1.2 ng/ml of GnRH (Sigma), or with GnRH plus thymulin (at same concentrations). Untreated suspended cells were used as basal concentration. Data for each experimental series were obtained by triplicate.

The dose of thymulin used was selected based on previous results from our laboratory, indicating that the dose of 100 ng induces ovulation in pre-pubertal mice treated with eCG (Hinojosa et al., 1999). In in

vitro conditions the dose of GnRH used, 1.2 ng/ml, stimulates the release of FSH and LH (Mendoza and Romano, 1989; Mendoza et al., 1995; Hinojosa et al., 2002).

All cell cultures were maintained at 37°C under constant shaking for 1 h. After incubation, the suspension was centrifuged at 800 rpm for 8 minutes at 4°C. Supernatants were collected and frozen at –20°C, until FSH and LH were measured by radioimmunoassay (RIA).

Radioimmunoassay

The blood from the trunk from six randomly selected animals on each day of the estrous cycle was collected, allowed to coagulate at room temperature for 1 h, and centrifuged at 3000 rpm. The serum was kept at –20°C, until FSH, LH, progesterone, and 17β-estradiol concentrations were measured by RIA.

FSH and LH levels in serum and medium were measured by the double antibody RIA technique, employing reagents and protocols kindly supplied by the NIADDK National Pituitary Program (Bethesda, MD, USA). Intra- and inter-assay variations were in the order of 5.1% and 6.5% for LH, and 4% and 7.9% for FSH. All samples were assayed in duplicates. The results are expressed in terms of NIADDK standards RP-2.

Serum concentrations of progesterone and 17β-estradiol were measured by RIA using the solid-phase iodine-125 technique (Kubasik et al., 1984), with kits purchased from Coat-A-Count, following the methodology described by Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA). This procedure's sensitivity to measure progesterone and 17β-estradiol was 0.02 ng/ml and 8 pg/ml, respectively. Intra- and inter-assay coefficients of variation for progesterone were 5.3% and 9.8%, respectively; and for 17β-estradiol, 6.9% and 10.8%, respectively. All samples were assayed in duplicates.

Statistical analysis

Hormone levels in serum were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. Gonadotropins concentration in the culture medium was analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA test, followed by Dunn's multiple comparisons test. Differences between two groups were compared by Mann-Whitney U-test. A probability of less than 5% was considered significant. The correlation between progesterone and estradiol serum concentrations and the effects of thymulin or GnRH or GnRH + thymulin on FSH and LH release by pituitary cells from rats on each day of the estrous cycle was analyzed. A correlation (r^2) was considered significant if greater than 0.85.

Results

Gonadotropins and steroid serum levels

During the morning, FSH serum levels were higher in P and E than in D2. LH concentrations were similar during the estrous cycle. In D2 and P, progesterone serum levels were lower than in D1, while the highest estradiol serum level was observed in animals sacrificed on P (Table 1).

Basal and stimulated levels of FSH and LH

Anterior pituitary cells from rats in E released more FSH than cells obtained in other days of the estrous cycle. GnRH treatment increased FSH release in pituitary cells from rats in D1, D2, and P (Table 2).

Table 1

Mean \pm s.e.m. of FSH, LH, progesterone and 17 β -estradiol serum concentrations from rats in the morning of each day of estrous cycle

Group	n	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Progesterone (ng/ml)	17 β -estradiol (pg/ml)
Diestrus 1	6	5.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	16.4 \pm 2.0	39.7 \pm 1.4
Diestrus 2	6	5.1 \pm 0.4	0.5 \pm 0.0	9.4 \pm 1.6*	46.0 \pm 2.5
Proestrus	6	7.5 \pm 0.7 ^{&}	0.7 \pm 0.1	8.5 \pm 1.5*	53.2 \pm 3.1*
Estrus	6	7.1 \pm 0.5 ^{&}	0.6 \pm 0.2	10.5 \pm 1.7	38.8 \pm 1.6 [%]

* p < 0.05 vs. diestrus 1 group (ANOVA followed by Tukey's test).

[&] p < 0.05 vs. diestrus 2 group (ANOVA followed by Tukey's test).

[%] p < 0.05 vs. proestrus group (ANOVA followed by Tukey's test).

The basal release of LH by pituitary cells from rats in P was higher than in cells from rats in D1 or D2, while the concentration observed in E was lower than in D1 (Table 2).

GnRH addition to pituitary cell cultures resulted in an increase of LH release in all days of the estrous cycle and the highest influence on LH release was observed in cells collected on D2 and P (Table 2).

Effects of thymulin or thymulin and GnRH treatment on FSH and LH release by adenohipophyseal cells during the estrous cycle

The addition of thymulin to pituitaries from rats in D1 resulted in a significant increase of FSH release, while an opposite effect was observed in pituitaries from rats in E (Fig. 1A).

Compared to GnRH stimulated cells, adding thymulin and GnRH to pituitaries from rats in D1, D2, or P resulted in lower FSH concentrations (Fig. 1B).

Thymulin addition to cells from rats in D1, D2, or E resulted in LH concentrations increase, but not in cells obtained in P (Fig. 2A). Compared to GnRH treated cells, adding thymulin and GnRH to pituitary cells from rats in D1 resulted in lower LH release; while a significant increase in the release of this hormone was observed in cells from rats in P or E (Fig. 2B).

The following correlation coefficients (r^2) were calculated: Progesterone serum levels and FSH release stimulated by thymulin, the $r^2 = 0.90$; progesterone serum levels and LH release stimulated

Table 2

Mean \pm s.e.m. of the FSH and LH release by anterior pituitary cells obtained from rats on each day of estrous cycle

Group	FSH (ng/ml)				LH (ng/ml)			
	n	Basal	n	GnRH	n	Basal	n	GnRH
Diestrus 1	12	15.6 \pm 1.6	12	29.4 \pm 2.1 [#]	12	75.5 \pm 3.4	12	92.9 \pm 3.3 [#]
Diestrus 2	12	19.2 \pm 2.1	12	36.5 \pm 4.6 [#]	12	90.2 \pm 5.5	12	138.8 \pm 4.0 ^{*#}
Proestrus	12	23.9 \pm 1.2	12	39.4 \pm 3.6 [#]	12	130.0 \pm 10.9 ^{*,&}	12	148.1 \pm 5.5 ^{*#}
Estrus	12	43.9 \pm 3.1 ^{*,&,%}	12	32.4 \pm 3.7	12	96.4 \pm 3.9*	12	123.4 \pm 12.2 [#]

After a 1 h pre-incubation, cells were incubated for 1 h without treatment (basal) or with 1.2 ng/ml of GnRH.

* p < 0.05 vs. diestrus 1 group (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test).

[&] p < 0.05 vs. diestrus 2 group (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test).

[%] p < 0.05 vs. proestrus group (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test).

[#] p < 0.05 vs. basal group (Mann-Whitney U-test).

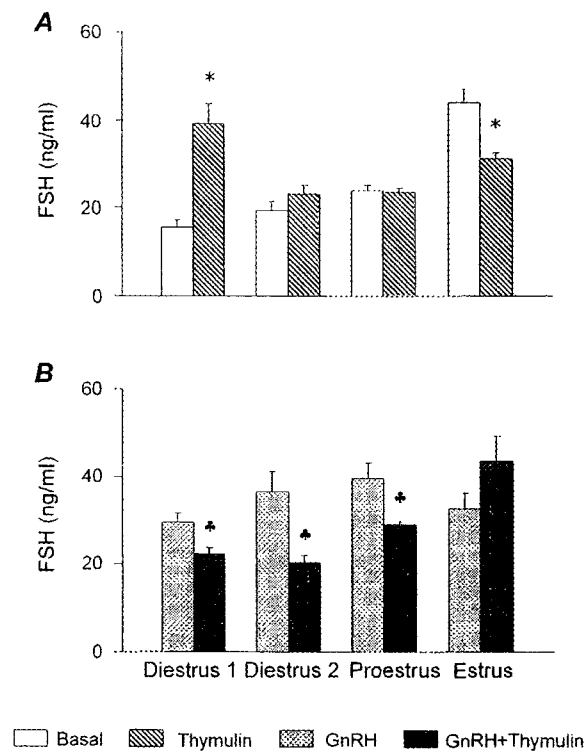


Fig. 1. Mean \pm s.e.m. of FSH release by anterior pituitary cells obtained from rats on each day of estrous cycle. Cells were pre-incubated for 1 h. The culture medium was removed and the cells were re-suspended in fresh medium [basal], treated with thymulin (100 ng/ml) [panel A], with GnRH (1.2 ng/ml), or with GnRH + thymulin [panel B]. The cells were incubated for 1 h. Each bar represents four experimental series and three replicates for each series ($n = 12$). * $p < 0.05$ vs. basal group (Mann-Whitney U-test); ♣ $p < 0.05$ vs. GnRH group (Mann-Whitney U-test).

by GnRH, the $r^2 = 0.96$; and between estradiol serum levels and FSH release stimulated by GnRH, the $r^2 = 0.86$.

Discussion

Present results indicate that thymulin's effect on FSH and LH release by anterior pituitary cells from female rats varies during the estrous cycle, suggesting that the influence of thymulin depends on the hormonal status of the donor's pituitary.

Haisenleder et al. (1994) showed that the mRNA concentration for FSH β and LH β vary during the estrous cycle, and established that LH β mRNA levels show two peaks, one at 08:00 of D2, and a second at 17:00 of P. In turn, FSH β mRNA levels show a single peak at 02:00 on the day of E. Such changes in mRNAs concentrations are not totally parallel with FSH and LH serum concentrations changes.

The present study evaluates the changes in the gonadotropes' ability to release hormones, as no time for new hormone synthesis was allowed. The pattern of FSH and LH release to the blood does not parallel to the spontaneous release of these hormones to the culture medium after 1 h of incubation (in

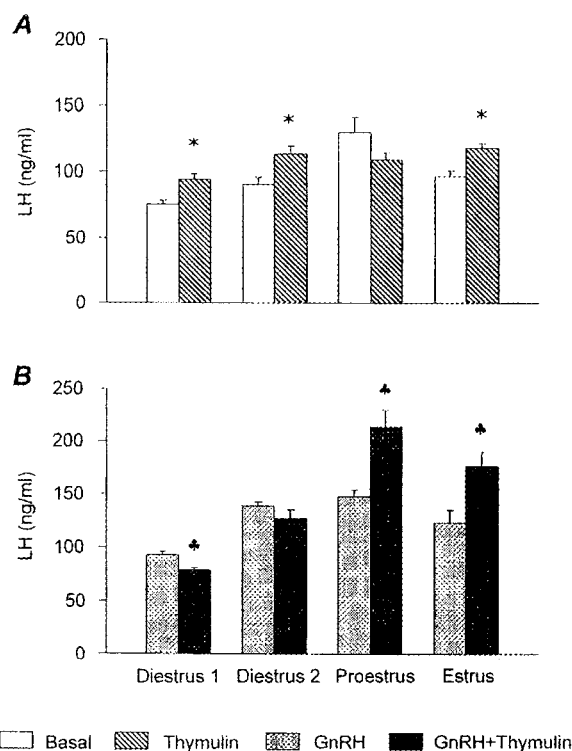


Fig. 2. Mean \pm s.e.m. of LH release by anterior pituitary cells obtained from rats on each day of estrous cycle. Cells were pre-incubated for 1 h. The culture medium was removed and the cells were re-suspended in fresh medium [basal], treated with thymulin (100 ng/ml) [panel A], with GnRH (1.2 ng/ml), or with GnRH+thymulin [panel B]. The cells were incubated for 1 h. Each bar represents four experimental series and three replicates for each series ($n = 12$). * $p < 0.05$ vs. basal group (Mann-Whitney U-test); ♣ $p < 0.05$ vs. GnRH group (Mann-Whitney U-test).

serum, the concentration of FSH is 10 fold higher than LH, while in the culture medium LH values are 2–5 fold higher).

These results could be explained by three distinct, non-exclusive, ways: the lack of gonadal hormones regulating gonadotropes secretion activity (Kamel et al., 1987; Fallest and Schwartz, 1991; Blake, 1998; Fowler et al., 2003); the existence of hypothalamic inhibiting factors (Hwan and Freeman, 1987; De la Lastra and Leal, 1989; Blake, 1998); or an intrinsic regulatory system acting through autocrine and paracrine signals (Kitaoka et al., 1988; Bohnsack et al., 2000). It is also possible that the differences in gonadotropins secretion observed in *in vitro* studies reflect the presence of factors secreted by pituitary that directly inhibiting basal FSH secretion, such as inhibin (Schwall, 1998).

It is well established that an ordered sequence of hormonal events occur throughout the estrous cycle, as the pituitary gland is cyclically exposed to diverse feedbacks mechanisms regulating gonadotropin secretion (Blake, 1998; Bohnsack et al., 2000). During D2 and P, higher levels of GnRH receptors in pituitary cells are found (Clayton et al., 1980; Savoy-Moore et al., 1980; Marian et al., 1981). The results obtained in the present study are consistent with the above-mentioned results, since LH release to the culture medium by cells in D2 and P reached its highest values. Then, the effects of GnRH on pituitary cells' release of FSH or LH depends on the priming conditions of the hormonal milieu characteristic of

each day of the estrous cycle. This idea is supported by the results obtained in the present study: a directly proportional relation between estradiol serum levels and GnRH effects on FSH release; and a proportionally inverse relation between progesterone serum levels and LH release in GnRH stimulated pituitaries.

Our results suggest that thymulin has a dual effect on gonadotropins release. For LH release, the effect was stimulatory during the estrous cycle; and for FSH release, the effects were stimulatory in D1 and inhibitory in E. Because the correlation analysis showed a directly proportional relation between progesterone serum levels and the effects of thymulin on FSH release, we suggest that progesterone modulates the cells' reactivity to thymulin.

Brown et al. (2000) showed that in pituitary cells from female rats (regardless of the estrous cycle day they were in) incubated for 40 min, thymulin stimulates the release of FSH and LH; and that thymulin plus GnRH treatment has a synergistic effect on LH release, and an additive effect on FSH release. In the study, Brown et al. suggest that thymulin and GnRH do not share proximal steps of transduction pathways. Present results show that when GnRH and thymulin coexist in the culture medium, the action of thymulin can either inhibit or stimulate GnRH effects, depending on which day of the estrous cycle the pituitary donor is in. This suggests that thymulin is capable of regulating the response of gonadotropes to GnRH on gonadotropin secretion in different ways.

Interactions between the nervous, immune, and endocrine systems require a complex communication network. This network is composed of many hormones, including thymulin, that participate as messengers between the brain, pituitary, peripheral nervous system, immune cells, and gonads. Taken together, the variability between GnRH and thymulin interactions during the estrous cycle on FSH and LH release suggests that the effects of thymulin are influenced by paracrine interactions, known to vary during the estrous cycle, and that thymulin acts as a fine modulator of GnRH actions on gonadotropes.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the technical assistance expertise of Mario A. Altamirano Lozano PhD. and Carolina Miranda Brito. We would also like to thank the statistical advice of Isaías H. Salgado Ugarte PhD, J. Miguel Betancourt Rule PhD, and Xavier Chiappa Carrara PhD; and Alvaro Domínguez González M.Sc for the English revision.

This work was supported by DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP 101312, 101313 and CONACyT.

References

- Bach, J.-F., Dardenne, M., Pléau, J.M., 1977. Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature* 266 (3), 55–57.
- Besedovsky, H.O., Sorkin, E., 1974. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 249, 356–358.
- Blake, C.A., 1998. Gonadotropin secretion, control of. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, pp. 528–552.
- Bohnsack, B.L., Szabo, M., Kilen, S.M., Tam, D.H.Y., Schwartz, N.B., 2000. Follistatin suppresses steroid-enhanced follicle-stimulating hormone release in vitro in rats. *Biology of Reproduction* 62 (3), 636–641.
- Brown, O.A., Sosa, Y.E., Dardenne, M., Pléau, J.M., Goya, R.G., 2000. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *Journal of Gerontology: Biological Sciences* 55A (4), B170–B176.

- Clayton, R.N., Solano, A.R., Garcia-Vela, A., Dufau, M.L., Catt, K.J., 1980. Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 107 (3), 699–706.
- Dardenne, M., Pléau, J.M., Nabarra, B., Lefrancier, P., Derrien, M., Choay, J., Bach, J.F., 1982. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79, 5370–5373.
- Dardenne, M., Savino, W., Gastinel, L., Bach, J.F., 1984. Thymulin. New biochemical aspects. In: Goldstein, A.L. (Ed.), *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications*. Plenum Press, New York, pp. 37–42.
- De la Lastra, M., Leal, J., 1989. Factor hipotalámico inhibidor de la secreción de hormona luteinizante: relación con fragmentos 1–5 de hormona liberadora de LH. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 22 (1), 53–59.
- Fallete, P.C., Schwartz, N.B., 1991. Acute inhibitory effects of 17β -estradiol are observed on gonadotropin secretion from perfused pituitary fragments of metestrous, but not proestrous, rats. *Endocrinology* 128 (1), 273–279.
- Fowler, P.A., Sorsa-Leslie, T., Harris, W., Mason, H.D., 2003. Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction* 126, 689–699.
- García, L., Hinojosa, L., Domínguez, R., Chavira, R., Rosas, P., 2000. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *Journal of Endocrinology* 166 (2), 381–387.
- Hadley, A.J., Rantle, C.M., Buckingham, J.C., 1997. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 4 (2), 62–69.
- Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., Marshall, J.C., 1994. Regulation of gonadotropin gene expression. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1793–1813.
- Hinojosa, L., Chavira, R., Domínguez, R., Rosas, P., 1999. Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *Journal of Endocrinology* 163 (2), 255–260.
- Hinojosa, L., García, L., Quiróz, U., Chavira, R., Romano, M.C., Domínguez, R., Rosas, P., 2002. Sex differences in FSH and LH secretion by the pituitary treated in vitro with thymulin. *The Thirty Fifth Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, Baltimore, Maryland, July 28–31, 2002. *Biology of Reproduction* 66 (272), pp. 306–307.
- Hwan, J.C., Freeman, M.E., 1987. A physiological role for luteinizing hormone release-inhibiting factor of hypothalamic origin. *Endocrinology* 121 (3), 1099–1103.
- Kamel, F., Balz, J.A., Kubajak, C.L., Schneider, V.A., 1987. Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120 (4), 1651–1657.
- Kitaoka, M., Kojima, I., Ogata, E., 1988. Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157 (1), 48–54.
- Kosiewicz, M.M., Michael, S.D., 1990. Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *Journals of Reproduction and Fertility* 88 (2), 427–440.
- Kubasik, N.P., Hallauer, G.D., Brodows, R.G., 1984. Evaluation of a direct solid-phase radioimmunoassay for progesterone, useful for monitoring luteal function. *Clinical Chemistry* 30, 284–286.
- Ledwitz-Rigby, F., Scheid, P.G., 1990. Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins in vitro. *The Eight Ovarian Workshop. Regulatory Process and Gene Expression in the Ovary*, Maryville, Tennessee, July 12–14, pp. 473–478.
- Marian, J., Cooper, R.L., Conn, P.M., 1981. Regulation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular Pharmacology* 19 (3), 339–405.
- Mendoza, M.E., Romano, M.C., 1989. Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14 (4), 233–242.
- Mendoza, M.E., Martin, D., Candelaria, P.G., Romano, M.C., 1995. Evidence that secretory products of the reticulo-epithelial cells of the rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *Journal of Reproductive Immunology* 28 (3), 203–215.
- Michael, S.D., 1983. Interactions of the thymus and the ovary. In: Greenwald, G.S., Terranova, P.F. (Eds.), *Factors Regulating Ovarian Function*. Raven Press, New York, pp. 445–464.
- Michael, S.D., Taguchi, O., Nishizuka, Y., 1980. Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biology of Reproduction* 22 (2), 343–350.
- Rebar, R.W., Miyake, A., Low, T.L.K., Goldstein, A.L., 1981a. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214 (6), 669–671.
- Rebar, R.W., Morandini, I.C., Erickson, G.F., Petze, J.E., 1981b. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 108 (1), 120–126.

- Safieh, B., Kendall, M.D., Norman, J.C., Metreau, E., Dardenne, M., Bach, J.F., Pleau, J.M., 1990. A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *Journal of Immunological Methods* 127 (2), 255–262.
- Savoy-Moore, R.T., Schwartz, N.B., Duncan, J.A., Marshall, J.C., 1980. Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209 (4459), 942–944.
- Schwall, R.H., 1998. Inhibin. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, pp. 832–839.
- Steinberger, A., Chrowdhury, M., Steinberger, E., 1973. Effect of repeated replenishment of hypothalamic extract on LH and FSH secretion in monolayer cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 92 (1), 12–17.
- Wise, T., 1998. In vitro and in vivo effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 66 (3), 129–135.
- Zaidi, S.A.A., Kendall, M.D., Gillham, B., Jones, M.T., 1988. The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 12 (4), 253–264.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la liberación *in vitro* de la FSH y LH por las células de adenohipófisis en respuesta a la GnRH y timulina, depende del medio hormonal del que provienen las hipófisis (sexo y día del ciclo estral). Además que la acción de la timulina sobre la adenohipófisis es regulada por los esteroides sexuales.

En este estudio se muestran que la concentración de FSH evaluada en el suero y en el medio de cultivo, es mayor en el macho que en la hembra, mientras que para LH ésta diferencia sólo se observa en el medio. Estos resultados aunado a los de otros autores (Elskus y col., 1995), no logran responder la pregunta de ¿por qué se observan diferencias en la respuesta secretora de la hipófisis de machos y hembras?.

Es bien conocido que la secreción de LH por las hipófisis de ratas macho y hembra en respuesta a la castración es diferente; en el macho la hipófisis libera rápidamente grandes cantidades de la hormona 24 hrs después de la gonadectomía, mientras que en la hembra la concentración de LH muestra un pequeño aumento después de la ovariectomía y se mantiene sin mayores cambios durante varios días (Gay y Midgley, 1969; Spitzbarth y col., 1988; Fallest y col., 1989). Estas respuestas no parecen deberse a la concentración de la hormona en la hipófisis de los animales, ya que no se han observado diferencias significativas entre ellas (Spitzbarth y col., 1988). Para el caso de la FSH la castración de ratas macho y hembra resulta en un aumento del 650% en las hembras y un 293% en los machos (Elskus y col., 1995), lo que refleja una gran diferencia en la regulación de la secreción de ambas hormonas.

Estudios realizados por el grupo de Schwartz (Fallest y col., 1989, Fallest y Schwartz, 1991) indican que la secreción de LH depende fundamentalmente de los cambios en la señal hipotalámica (GnRH). No obstante que en el presente trabajo no se

observaron diferencias en la concentración sérica de LH entre hembras y machos sacrificados en la mañana, éstas se hicieron presentes cuando la hipófisis fue liberada de su sistema normal de regulación, lo cual podría ser explicado por tres diferentes factores: la falta de hormonas gonadales que regulan la actividad secretora de los gonadotropos (Kamel y col., 1987; Fallest y Schwartz, 1991; Blake, 1998; Fowler y col., 2003); la existencia de factores hipotalámicos inhibidores (Hwan y Freeman, 1987; De la Lastra y Leal, 1989; Blake, 1998; Lux-Lantos y col., 1992, 2001); o un sistema de regulación intrínseco que actúa a través de señales autócrinas y parácrinas (Kitaoka y col., 1988; Bohnsack y col., 2000). Según el grupo de Schwartz, la secreción de FSH depende más de las fluctuaciones en la concentración de inhibina (Fallest y col., 1989, Fallest y Schwartz, 1991; Schwall, 1998).

Otra posibilidad para explicar las diferencias entre las hipófisis de machos y hembras sería el número de receptores a estradiol que presentan los gonadotropos de ambos sexos, el cual varía con el ciclo estral de la hembra y es más o menos constante para el caso del macho (Babichev y col., 1989).

Estudios en los cuales se realizó el intercambio de hipófisis entre machos y hembras muestran que la hipófisis es asexual (Everett 1964) y que ni el sexo del donador, ni el número de hipófisis injertadas modifican las respuestas conductuales a los implantes hipofisarios (Bouchon y Ropartz, 1994).

Por ello las diferencias observadas en nuestro estudio respecto a la secreción de gonadotropinas por las células de adenohipófisis de ratas macho y hembra mantenidas en cultivo, deben estar relacionadas a la integración de todas las señales neuroendócrinas que convergen en la regulación de la secreción hormonal y no a un solo factor.

Lo anteriormente expuesto nos permite sugerir que las diferencias sexuales en la respuesta de las células adenohipofisarias a las diferentes dosis de GnRH utilizadas en este estudio y por Sanders y col. (1975), pueden ser explicadas como el resultado de la dependencia de los gonadotropos del donador a su ambiente hormonal.

Según Brown y col. (2000), la adición de timulina a cultivos de células de adenohipófisis de rata hembra estimula la liberación de FSH y LH. En el presente estudio, la timulina no modificó la liberación basal ni la estimulada por GnRH, de ambas gonadotropinas en las células de adenohipófisis de hembra cultivadas en monocapa. Esta discrepancia probablemente está relacionada con las diferentes condiciones experimentales, ya que los experimentos del grupo de Brown se realizaron en tiempos cortos (preincubación de 20 min y exposición a timulina de 40 min) lo que nos permite pensar que la acción de la timulina depende de factores reguladores cuyo efecto decrece con el tiempo de preincubación (48 hrs).

En cultivos de tejido adenohipofisario de rata macho, Zaidi y col. (1988) observan que la timulina estimula la liberación de la LH de manera dosis-dependiente. Resultados similares fueron observados con la administración *in vitro* de timulina más Zn^{+2} (Hadley y col., 1997). En nuestro estudio, la timulina mostró un efecto inhibitorio en la liberación basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata macho. Tales diferencias, como en el caso de las células de hembra, pueden estar relacionadas con una o más de las siguientes variables: tiempos cortos de preincubación celular (150 min, ambos estudios) y la concentración (Zaidi y col.: 8.59 $\mu\text{g/ml}$; Hadley y col.: 429 fg a 42.95 pg/ml) y tiempo de exposición (30 min, ambos estudios) a la timulina. Pero no así por la presencia de Zn^{+2} , ya que este metal, esencial para incrementar la bioactividad de la molécula de timulina (Dardenne y col., 1982, 1984), siempre estuvo presente en el medio de cultivo utilizado.

Se han descrito la existencia de una interacción funcional entre la timulina y los esteroides gonadales; Estudios *in vitro* muestran que la timulina participa en la regulación de la esteroidogénesis gonadal (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990; Wise, 1998) e *in vivo* la progesterona, el estradiol y la testosterona regulan la liberación de la timulina (Dardenne y col., 1986, 1988). Nuestros resultados indican que esta interacción también ocurre a nivel adenohipofisario ya que los esteroides de origen gonadal modulan la respuesta de los gonadotropos, tanto de hembra como de macho, a los efectos de la timulina en la liberación de las gonadotropinas.

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que la progesterona ejerce efectos estimulantes e inhibitorios sobre la secreción de las gonadotropinas, los cuales dependen de la dosis, la duración y secuencia de su administración (Brown-Grant y Naftolin, 1972; Drouin y Labrie 1981; Lagacé y col., 1980). En nuestro estudio, la preincubación de células de adenohipófisis de rata hembra con progesterona no modificó la liberación basal de las gonadotropinas, pero redujo la liberación de LH estimulada por la GnRH. Esta respuesta fue similar a la observada por Janovick y Conn (1996) en hipófisis en cultivo obtenidas de ratas hembra prepúberes. Dicho efecto puede estar relacionado con el hecho que la progesterona desensibiliza los gonadotropos a la acción de la GnRH al disminuir el número de receptores a GnRH, como ha sido propuesto por Conn y col. (1984).

En la hembra, el aumento en la concentración de FSH liberada por las células de adenohipófisis pretratadas con progesterona y luego con timulina, cuando cada una de manera independiente no tienen efectos sobre FSH, indica que este esteroide facilita la acción de la timulina sobre la liberación de la gonadotropina. Cabe la posibilidad de que la progesterona participe en la expresión de un número mayor de receptores a timulina (evento del que no se tienen evidencias a la fecha) lo que amplificaría la concentración de segundos mensajeros al tratar a las células con timulina, ya que se ha mostrado que

ésta aumenta la concentración de AMPc, de calcio y de fosfato de inositol en los gonadotropos de rata hembra adulta (Brown y col., 2000).

Según Kamel y col. (1987) el pretratamiento con testosterona a los gonadotropos de rata hembra adulta disminuye la respuesta de las células a la GnRH, medido por la liberación de LH. Resultados similares se presentaron en este estudio, pero para ambas gonadotropinas lo que apoya la idea que la testosterona inhibe la acción de la GnRH sobre la liberación de FSH y LH. Los resultados obtenidos al preincubar las células de hembra con testosterona y tratarlas con timulina, nos permite sugerir que ambas hormonas interactúan para ejercer un efecto inhibitorio sobre la liberación de FSH.

Según Drouin y Labrie (1981) en cultivos de células de adenohipófisis obtenidas de rata hembra adulta, el tratamiento con estradiol en presencia de diferentes dosis de GnRH, estimula la liberación de la FSH y LH. Nuestros resultados muestran que el pretratamiento con estradiol en las adenohipófisis de hembra, amplifica el efecto estimulante de la GnRH sobre la liberación de FSH. El hecho que la preincubación con estradiol revele un efecto estimulante de la timulina en la liberación de la LH, indica que el estradiol regula la acción de la timulina en la liberación de la gonadotropina.

Al parecer en las células de la adenohipófisis de la rata hembra, la timulina estaría estimulando o inhibiendo la secreción espontánea de las gonadotropinas dependiendo de la señal esteroideogénica previa. En las células cuya impronta fue con progesterona, timulina estimula la liberación de FSH; con estradiol, timulina estimula la liberación de LH y con testosterona, timulina inhibe solo FSH.

En las células de adenohipófisis del macho, sólo el pretratamiento con testosterona, ocasiono cambios en la liberación de las gonadotropinas, tanto en la basal como en la estimulada por GnRH. La inhibición observada en la liberación tanto de FSH como LH inducida por este esteroide indicaría que en el macho la testosterona

disminuye la respuesta de los gonadotropos, como ya ha sido descrito (Starzec y col., 1996).

La baja liberación de LH por las células de adenohipófisis del macho, pretratadas con progesterona y posteriormente timulina más GnRH, muestra que este esteroide modula la acción de la timulina sobre la liberación de la gonadotropina. Sin embargo, la falta de respuesta de las células del macho a la mayoría de los tratamientos realizados, puede ser debido a que las concentraciones utilizadas fueron las de la hembra y no las fisiológicas para este sexo.

En los cultivos obtenidos de ratas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral, la timulina ejerció un efecto estimulante en la liberación basal de LH; en la liberación de FSH el efecto fue estimulante en diestro 1 e inhibitorio en estro. El análisis de correlación mostró una relación directamente proporcional entre las concentraciones de progesterona en suero y el efecto de la timulina en la liberación de FSH, resultados similares a los obtenidos con los cultivos en monocapa. Este hecho ratifica que la progesterona modula la sensibilidad de los gonadotropos a la timulina. Con base en los resultados se puede sugerir que la timulina tiene un efecto dual (estimulante o inhibitorio) en la liberación de las gonadotropinas.

Brown y col. (2000) mostraron en células de hipófisis de rata hembra (sin considerar el día del ciclo en el que se encontraban) que la timulina estimula la liberación de la FSH y LH; que el tratamiento con timulina y GnRH tiene un efecto sinérgico en la liberación de LH y uno aditivo en la liberación de FSH. Con esos resultados el grupo de Brown sugiere que la timulina no usa las mismas vías de transducción que la GnRH. Los resultados del presente estudio mostraron que cuando timulina y GnRH coexisten en el cultivo, la acción de la timulina puede inhibir o estimular el efecto de la GnRH y este efecto depende del día del ciclo estral en el que se encuentre el donador, lo que muestra que la timulina es capaz de regular la respuesta

de los gonadotropos a GnRH, en la liberación de las gonadotropinas por una vía diferente a la de la GnRH.

Este estudio muestra la existencia de diferencias sexuales en la liberación basal de la FSH y LH, así como en la respuesta de las células de adenohipófisis a la timulina, la GnRH o ambas. En el macho, la timulina ejerce un efecto inhibitorio en la liberación de las gonadotropinas, mientras que en la hembra, la variabilidad de respuestas a timulina, GnRH o ambas durante el ciclo estral, sobre la liberación de las gonadotropinas, indica que el efecto de la timulina está influenciado por interacciones neuroendócrinas que varían durante el ciclo estral, y que su acción es modulada por los esteroides sexuales. Con base en lo anterior es posible sugerir que la timulina actúa como un modulador fino de la acción de la GnRH en los gonadotropos.

CONCLUSIONES

1. La respuesta de las células de adenohipófisis en cultivo al tratamiento con timulina, GnRH o ambas, depende del sexo del animal.
 - En las células de adenohipófisis de rata hembra, la timulina no tiene efecto en la liberación de las gonadotropinas.
 - En las células de adenohipófisis de rata macho, la timulina ejerce un efecto inhibitorio en la liberación basal de la FSH y LH, el cual es revertido por el tratamiento con GnRH.
2. El efecto de la timulina sobre la liberación de las gonadotropinas por las células de adenohipófisis es modulado por los esteroides sexuales.
 - En las células de adenohipófisis de la hembra pretratadas con progesterona, la timulina estimula la liberación de FSH; con testosterona, este péptido inhibe la liberación de FSH; con estradiol, la timulina estimula la liberación de LH.
 - En las células de adenohipófisis del macho pretratadas con progesterona, la timulina inhibe la liberación de LH en presencia de GnRH.
3. Los efectos de la timulina sobre la liberación de la FSH y LH depende del día del ciclo estral en que se obtienen las células de adenohipófisis.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevan a proponer los siguientes problemas a resolver.

- La diferente respuesta que tienen las células de la adenohipófisis de la rata hembra a lo largo del ciclo estral a la adición de timulina ¿se debe a su efecto directo sobre los gonadotropos o a su interacción con otras células adenohipofisarias que participan en la liberación de las gonadotropinas?.
- La acción de los esteroides sexuales sobre los efectos de la timulina ¿se debe a que estos esteroides están regulando la expresión de los receptores de timulina o existen otros mecanismos?.
- En la hipófisis de la hembra ¿cuáles son los mecanismos que están involucrados en la regulación de los efectos que tienen la timulina en la liberación de las gonadotropinas?.
- La falta de respuesta de las células de adenohipófisis del macho a los diferentes tratamientos con GnRH, o con el pretratamiento con esteroides sexuales y posterior adición de timulina, o GnRH+timulina ¿se debe a que las concentraciones usadas no fueron las fisiológicas para este sexo?.

BIBLIOGRAFÍA

Aboussaouira T, Moustafa Y e Idelman S (1989). Image analysis of cell proliferation in rat thymus throughout development. *Thymus* **12**, 167-186.

Aguilera G y Romano MC (1989). Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J Endocrinol* **123**, 367-373.

Babichev VN, Peryshkovay TA y Adamskaia EI (1989). Changes in the number of estradiol and testosterone-binding sites of the hypophysis in cyclic female rats in the period of elevated follicle-stimulating hormone levels. *Probl Endokrinol (Mosk)* **35**, 59-62.

Bach J-F 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, pp 593-600.

Bach J-F, Dardenne M y Pleau J-M (1977). Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature* **266**, 55-57.

Baenziger JU y Green ED (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* **947**, 287-306.

Baldwin DM y Downs TR (1981). Release of LH and FSH by anterior pituitary cell suspensions from female rats during the estrous cycle and from estrogen-treated ovariectomized rats. *Biol Reprod* **24**, 581-590.

Bellanti JA (1987). Inmunología. 3ª ed, Interamericana, México, pp 18-58.

Belsham DD, Evangelou A, Roy D, Duc VL y Brown TJ (1998). Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by 5 alpha-dihydrotestosterone in GnRH-secreting GT1-7 hypothalamic neurons. *Endocrinology* **139**, 1108-1114.

Bergman RA, Afifi AK y Heideger PM Jr (1998). Histología. McGraw-Hill Interamericana, México, pp 369.

Besedovsky HO y Sorkin E (1974). Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* **249**, 356-358.

Blake CA (1999). Gonadotropin secretion, control of. En: Encyclopedia of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds, Vol II, Academic Press, San Diego, pp 528-552.

Bohnsack BL, Szabo M, Kilen SM, Tam DHY y Schwartz NB (2000). Follistatin suppresses steroid-enhanced follicle-stimulating hormone release *in vitro* in rats. *Biol Reprod* **62**, 636-641.

Bouchon R y Ropartz P (1994). Pituitary grafts and behavior in mice. Effects of sex of donor and number of pituitary grafts on exploratory and learning abilities. *Physiol Behav* **55**, 711-5.

Boukaiba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A, Fusselier M, Dardenne M y Lemonnier D (1993). A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am J Clin Nutr* **57**, 566-572.

Bousfield GR, Perry WM y Ward DN (1994). Gonadotropins chemistry and biosynthesis. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 1749-1792.

Boyar RM, Rosenfeld RS, Kapen S, Finkelstein JW, Roffwarg HP, Weitzman ED y Hellman L (1974). Human puberty. Simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J Clin Invest* **54**, 609-618.

Brown OA, Sosa YE, Bolognani F y Goya RG (1998). Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech Ageing Dev* **104**, 249-262.

Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J y Goya RG (1999). Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* **69**, 20-27.

Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J-M y Goya RG (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol A Biol Sci* **55A**, B170-B176.

Brown-Grant K y Naftolin F (1972). Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone. *J Endocrinol* **53**, 37-46.

Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover P y Kendall MD (1992). Interactions between the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the thymus in the rat: a role for corticotrophin in the control of thymulin release. *J Neuroendocrinol* **4**, 295-301.

Buckingham JC, Safieh B, Singh S y Kendall MD (1991). Interactions of corticotrophin and glucocorticoids in the control of thymulin release in the rat. *Br J Pharmacol* **105**, pp 15.

Caligaris L, Astrada JJ y Taleisnik S (1971). Biphasic effect of progesterone on the release of gonadotropin in rats. *Endocrinology* **89**; 331-337.

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

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

Chambers SP y Clarke AG (1979). Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil* **55**, 309-315.

Chesnokova VM, Ivanova LN y Gruntenko EV (1983). Influence of the thymus on the endocrine function of the gonads and adrenals in mice. *Biull Eksp Biol Med* **96**, 89-91.

Clayton RN y Catt KJ (1981). Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* **2**, 186-209.

Clayton RN, Solano AR, Garcia-Vela A, Dufau ML y Catt KJ (1980). Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **107**, 699-706.

Condon TP, Heber D, Stewart JM, Sawyer CH y Whitmoyer DI (1984). Differential gonadotropin secretion: blockade of periovulatory LH but not FHS secretion by a potent LHRH antagonist. *Neuroendocrinology* **38**, 357-361.

Conn PM, Rogers DC y Seay SG (1984). Biphasic regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by receptor microaggregation and intracellular Ca²⁺ levels. *Mol Pharmacol* **25**, 51-55.

Consolini R, Legitimo A, Calleri A y Milani M (2000). Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clin Exp Immunol* **121**, 444-447.

Corbani M, Counis R, Starzec A y Jutisz M (1984). Effect of gonadectomy on pituitary levels of mRNA encoding gonadotropin subunits and secretion of luteinizing hormone. *Mol Cell Endocrinol* **35**, 83-87.

Corbani M, Counis R, Wolinska-Witort E, D'Angelo-Bernard G, Moumni M y Jutisz M (1990). Synergistic effects of progesterone and oestradiol on rat LH subunit mRNA. *J Mol Endocrinol* **4**, 119-125.

Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach J-F y Laussac J-P (1988). NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *J Biol Chem* **263**, 5574-5580.

Dalakas MC, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever JL y Goldstein AL (1984). Thymosin β_4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications*. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York, pp 119-125.

Dardenne M y Bach J-F (1981). Thymic hormones. En: *The thymus gland*. M Kendall Ed, Academic Press, London, pp 113-131.

Dardenne M, Boukaiba N, Gagnerault M-C, Homo-Delarche F, Chappuis P, Lemonnier D y Savino W (1993). Restoration of the thymus in aging mice by *in vivo* zinc supplementation. *Clin Immunol Immunopathol* **66**, 127-135.

Dardenne M, Papiernik M, Bach J-F y Stutman O (1974). Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. *Immunology* **27**, 299-304.

Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J y Bach JF (1982). Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 5370-5373.

Dardenne M, Savino W, y Bach J-F (1988). Modulation of thymic endocrine function by thyroid and steroid hormones. *Intern J Neuroscience* **39**, 325-334.

Dardenne M, Savino W, Berrih S y Bach JF (1985). A zinc-dependent epitope on the molecule of thymulin, a thymic hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 7035-7038.

Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J y Bach J-F (1986). Thymic hormone-containing cells. VII. Adrenals and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J Immunol* **136**, 1303-1308.

Dardenne M, Savino W, Gagnerault M-C, Itoh T y Bach J-F (1989). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates *in vivo* and *in vitro* the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* **125**, 3-12.

Dardenne M, Savino W, Gastinel L y Bach J-F (1984). Thymulin. New biochemical aspects. En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York, pp 37-42.

De la Lastra M y Leal J (1989). Factor hipotalámico inhibidor de la secreción de hormona luteinizante: relación con fragmento 1-5 de hormona liberadora de LH. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **22**, 53-59.

De Mello-Coelho V, Savino W, Postel-Vinay MC y Dardenne M (1998). Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Dev Immunol* **6**, 317-323.

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, M A Porrúa, México, pp 161-192.

Dorrington JH y Armstrong DT (1975). Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17beta synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 2677-2681.

Drouin J y Labrie F (1976). Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **98**, 1528-1534.

Drouin J y Labrie F (1981). Interactions between 17β -estradiol and progesterone in the control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **108**, 52-57.

Dufau ML y Veldhuis JD (1987). Pathophysiological relationships between the biological and immunological activities of luteinizing hormone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **1**, 153-176.

Dufourny L y Skinner DC (2003). Colocalization of progesterone receptors and thyroid hormone receptors alpha in the ovine diencephalon: no effect of estradiol. *Neuroendocrinology* **77**, 51-58.

Dupon C y Kim MH (1973). Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestradiol during the rat oestrous cycle. *J Endocrinol* **59**, 653-654.

Elskus AA, Phelps AF y Schwartz NB (1995). Acute sex differences in serum LH levels in gonadectomized rats: investigation of pituitary response to GnRH pulse frequency and prolactin secretion as etiological agents. *Neuroendocrinology* **61**, 301-309.

Enjalbert A (1989). Multiple transduction mechanisms of dopamine, somatostatin and angiotensin II receptors in anterior pituitary cells. *Horm Res* **31**, 6-12.

Eto T, Masuda H, Suzuki Y y Hosi T (1962). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *Jpn J Anim Reprod* **8**, 34-40.

Everett JW (1964). Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol Rev* **44**, 373-431.

Everett JW (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2^a ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 1509-1526.

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F y Pinchera A (1986). Thyroid function modulates thymic endocrine activity. *J Clin Endocrinol Metab* **62**, 474-478.

Fallest PC, Hiatt ES y Schwartz NB (1989). Effects of gonadectomy on the in vitro and in vivo gonadotropin responses to gonadotropin-releasing hormone in male and female rats. *Endocrinology* **124**, 1370-1379.

Fallest PC y Schwartz NB (1991). Acute inhibitory effects of 17β -estradiol are observed on gonadotropin secretion from perfused pituitary fragments of metestrous, but not proestrous, rats. *Endocrinology* **128**, 273-279.

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

Fink G (1988). Gonadotropin secretion and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, Vol I, Raven Press, New York, pp 1349-1377.

Fink G (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function general principles. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. PM Conn y ME Freeman Eds, Humana Press, New Jersey, pp 107-133.

Fitzpatrick FT, Kendall MD, Wheeler MJ, Adcock IM y Greenstein BD (1985). Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J Endocrinol* **106**, R17-R19.

Flanagan SP (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* **8**, 295-309.

Ford JJ, Vakharia DD, Anderson LL y Klindt J (1990). Thymosin- β 4 concentrations during the estrous cycle and after hypophyseal stalk transection of female pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* **193**, 185-189.

Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W y Mason HD (2003). Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research?. *Reproduction* **126**, 689-699.

Freeman ME (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol II, Raven Press, New York, pp 613-658.

Gallo RV y Moberg GD (1977). Serotonin mediated inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology* **100**, 945-954.

Galmiche G, Richard N, Corvaisier S y Kottler M-L (2006). The expression of aromatase in gonadotropes is regulated by estradiol and gonadotropin-releasing hormone in a manner that differs from the regulation of luteinizing hormone. *Endocrinology* **147**, 4234-4244.

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 Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

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 Doctoral, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

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 injecting thymulin into the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* **12**, 314-320.

García A, Soberon E y Cortés M (2002). Métodos analíticos, guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México.

Gastinel LN, Dardenne M, Pleau J-M y Bach J-F (1984). Studies on the zinc binding site to the serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* **797**, 147-155.

Gay VL y Midgley AR (1969). Response of the adult rat to orchidectomy and ovariectomy as determined by LH radioimmunoassay. *Endocrinology* **84**, 1359-1364.

Gay VL y Tomacari RL (1974). Follicle-stimulating hormone secretion in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science* **184**, 75-77.

Geneser F (2000). Histología. 3ª ed, Médica Panamericana, España, pp 421-427, 581-590.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA y Chin WW (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* **11**, 177-199.

Goldstein AL (1984). Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications. Plenum Press, New York, pp 669.

Goldstein AL, Low TLK, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu S-K, Naylor PB y McClure JE (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog Horm Res* **37**, 369-415.

Golsteyn EJ y Fritzler MJ (1987). The role of the thymus-hypothalamus-pituitary-gonadal axis in normal immune processes and autoimmunity. *J Rheumatol* **14**, 982-990.

Gore-Langton RE y Armstrong DT (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 571-627.

Goya RG, Sosa YE, Brown OA y Dardenne M (1994). *In vitro* studies on the thymus-pituitary axis in young and old rats. *Ann NY Acad Sci* **741**, 108-114.

Grossman CJ (1984). Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev* **5**, 435-455.

Grossman CJ (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.

Hadley AJ, Rantle CM y Buckingham JC (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* **4**, 62-69.

Haisenleder DJ, Barkan AL, Papavasiliou S, Zmeili SM, Dee C, Jameel ML, Ortolano GA, el-Gewely MR y Marshall JC (1988). LH subunit mRNA concentrations during LH surge in ovariectomized estradiol-replaced rats. *Am J Physiol* **254**, E99-E103.

Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC (1994). Regulation of gonadotropin gene expression. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 1793-1813.

Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ellis TR, Paul SJ y Marshall JC (1990). Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude in female rats. *Endocrinology* **127**, 2869-2875.

Halász B (2000). The hypothalamus as an endocrine organ. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. PM Conn y ME Freeman Eds., Humana Press, pp 3-21.

Hall NR, McGillis JP, Spangelo BL, Healy DL, Chrousos GP, Schulte HM y Goldstein AL (1985). Thymic hormone effects on the brain and neuroendocrine circuits. En: *Neural Modulation of Immunity*. R Guillemin Ed, Raven Press, New York, pp 179-193.

Hall NRS, O'Grady MP y Menzies RA (1992). Thymic regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Int J Immunopharmac* **14**, 353-359.

Hanley RM y Steiner AL (1989). The second-messenger system for peptide hormones. *Hosp Pract* **24**, 59-70.

Hashimoto I, Henricks DM, Anderson LL y Melampy RM (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* **82**, 333-341.

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

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

Hinojosa L (1998). Estudio de la participación de la timulina en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad y la ovulación en los ratones hembra normal e hipotímico. Tesis Maestría, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P (1999). Effects of the thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* **163**, 255-260.

Hinojosa L y Rosas P (1994). Estudio de la respuesta del ratón hembra hipotímico al injerto de timo sobre la regulación de la pubertad espontánea. XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, O145.

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

Hirschberg CB y Snider MD (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* **56**, 63-87.

Horecker BL (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, pp 77-88.

Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I y Liposits Z (2001). Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* **142**, 3261-3264.

Hwan JC y Freeman ME (1987). A physiological role for luteinizing hormone release-inhibiting factor of hypothalamic origin. *Endocrinology* **121**, 1099-1103.

Imaizumi A, Gytoku J, Terada S y Kimoto E (1981). Structural requirement for the biological activity of serum thymic factor. *FEBS Letters* **128**, 108-110.

Jambon B, Montagne P, Bene M-C, Brayer M-P, Faure G y Duheille J (1981). Immunohistologic localization of "facteur thymique serique" (FTS) in human thymic epithelium. *J Immunol* **127**, 2055-2059.

Janardana Sarma T y Sirsi M (1961). Comparison of the effect of ovariectomy and adrenalectomy on the thymus in young female rats, and a study of the part played by the thymus in body growth. *J Endocrinol* **22**, 177-182.

Janovick JA y Conn PM (1996). Progesterone diminishes the sensitivity of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone (LH) release and protects an LH pool from desensitization: actions opposed by cholera toxin. *Endocrinology* **137**, 1823-1827.

Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML y Coen CW (2001). Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* **13**, 741-748.

Kamel F, Balz JA, Kubajak CL y Schneider VA (1987). Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **120**, 1651-1657.

Kapen S, Boyar RM, Finkelstein JW, Hellman L y Weitzman ED (1974). Effect of sleep-wake cycle reversal on luteinizing hormone secretory pattern in puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **39**, 293-299.

Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A y Marshall JC (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* **116**, 2113-2115.

King JC y Rubin BS (1995). Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cell Mol Neurobiol* **15**, 89-106.

Kitaoka M, Kojima I y Ogata E (1988). Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 48-54.

Kordon C, Drouva SV, Martinez de la Escalera G y Weiner RI (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 1621- 1681.

Kosiewicz MM y Michael SD (1990). Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J Reprod Fert* **88**, 427-440

Kubasik NP, Hallauer GD y Brodows RG (1984). Evaluation of a direct solid-phase radioimmunoassay for progesterone, useful for monitoring luteal function. *Clin Chem* **30**, 284-286.

Lagacé L, Massicotte J y Labrie F (1980). Acute stimulatory effects of progesterone on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* **106**, 684-689.

Ledwitz-Rigby F y Scheid PG (1990). Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins *in vitro*. VIII. Ovarian Workshop. Regulatory process and gene expression in the ovary, 473-478.

Lintern-Moore S (1972). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol Reprod* **17**, 155-161.

Lintern-Moore S (1977). Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary. *Biol Reprod* **17**, 155-161.

Lintern-Moore S, Moore GP y Pantelouris EM (1976). Abnormal nucleolar growth in the oocytes of athymic "nude" mice. The result of gonadotropin insufficiency?. *Exp Cell Res* **97**, 430-432.

Lintern-Moore S y Pantelouris EM (1975). Ovarian development in athymic nude mice. I. The size and composition of the follicle population. *Mech Ageing Dev* **4**, 385-390.

Low TLK y Goldstein AL (1984). Thymosins: structure, function and therapeutic applications. *Thymus* **6**, 27-42.

Lux-Lantos V, Becu-Villalobos D, Bianchi M, Rey-Roldan E, Chamson-Reig A, Pignataro O y Libertun C (2001). GABA(B) receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinology* **73**, 334-343.

Lux-Lantos V, Rey E y Libertun C (1992). Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology* **56**, 687-693.

Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Farinella Z, Cordaro S y Scapagnini U (1989a). Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* **125**, 1025-1036.

Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Palumbo G, Raiti F, Cutuli N, Farinella Z y Scapagnini U (1990). A physiological role for the neuropeptide luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) during the maturation of thymus gland function. *Int J Neurosci* **51**, 287-289.

Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Raiti F, Palumbo G, Farinella Z, Cordaro S y Scapagnini U (1989b). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist restoration of age-associated decline of thymus weight, thymic LHRH receptors, and thymocyte proliferative capacity. *Endocrinology* **125**, 1037-1045.

Marynick SP, Loriaux DL, Sherins RJ, Pita JC y Lipsett MB (1979). Evidence that testosterone can suppress pituitary gonadotropin secretion independently of peripheral aromatization. *J Clin Endocrinol Metab* **49**, 396-398.

Mendoza ME, Martin D, Candelaria PG y Romano MC (1995). Evidence that secretory products of the reticulo-epithelial cells of the rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *J Reprod Immunol* **28**, 203-215.

Mendoza ME y Romano MC (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* **14**, 233-242.

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 SD (1983). Interactions of the thymus and the ovary. En: Factors Regulating Ovarian Function. GS Greenwald y PF Terranova Eds, Raven Press, New York, pp 445-464.

Michael SD, De Angelo L y Kaikis-Astaras A (1990). Plasma protein and hormone profiles associated with autoimmune oophoritis and ovarian tumorigenesis in neonatally thymectomized mice. *Autoimmunity* **6**, 1-12.

Michael SD, Taguchi O y Nishizuka Y (1980). Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol Reprod* **22**, 343-350.

- Michael SD, Taguchi O, Nishizuka Y, McClure JE, Goldstein AL y Barkley MS** (1981). The effect of neonatal thymectomy on early follicular loss and circulating levels of corticosterone, progesterone, estradiol, and thymosin α_1 . En: Dynamics of Ovarian Function. NB Schwartz y M Hunzicker-Dunn Eds, Raven Press, New York, pp 279-284.
- Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E y Fabris N** (1990). Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* **33**, 248-255.
- Mocchegiani E, Sartorio A, Santarelli L, Ferrero S y Fabris N** (1996). Thymulin, zinc and insulin-like growth factor-I (IGF-I) activity before and during recombinant growth hormone (rec-GH) therapy in children and adults with GH deficiency. *J Endocrinol Invest* **19**, 630-637.
- Molinero P, Soutto M, Benot S, Hmadcha A y Guerrero JM** (2000). Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin α_1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J Neuroimmunol* **103**, 180-188.
- Monier JC, Dardenne M, Pléau JM, Schmitt D, Deschaux P y Bach JF** (1980). Characterization of facteur thymique sérique (FTS) in the thymus. I. Fixation of anti-FTS antibodies on thymic reticulo-epithelial cells. *Clin Exp Immunol* **42**, 470-476.
- Morgan DD y Grossman CJ** (1985). Studies on the cytosolic estrogen receptor from rat thymus. *Thymus* **7**, 279-286.
- Naz RK, Kaplan P y Goldstein AL** (1992). Thymosin alpha-1 enhances the fertilizing capacity of human sperm cell: implication in diagnosis and treatment of male infertility. *Biol Reprod* **47**, 1064-1072.
- Nishizuka Y y Sakakura T** (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753-755.
- Nishizuka Y y Sakakura T** (1971). Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* **89**, 886-893.
- Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Iliff-Sizemore SA, Landefeld TD, Maurer RA y Marshall JC** (1988). Follide-stimulating hormone β subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **123**, 2946-2948.
- Oshima I, Morishita H, Omura K y Saito S** (1978). Changes in hypothalamic LH-RH content and blood levels of LH-RH, gonadotropin and estradiol during the preovulatory stage of rat estrous cycle. *Endocrinol Jpn* **25**, 607-611.
- 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, Humana Press, New Jersey, pp 23-40.

- Pedernera E** (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: Comunicación Neuroendócrina Bases Celulares y Moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp 33-46.
- Pedernera E, Diaz-Osuna J y Calcagno M** (1986). A thymus factor influences the *in vitro* testosterone secretion of Leydig cells in the rat. *Life Sci* **38**, 779-787.
- Pierce JG y Parsons TF** (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* **50**, 465-495.
- Pléau J-M, Fuentes V, Morgat J-L y Bach J-F** (1980). Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2861-2865.
- Prépin J** (1991). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire foetal de rat *in vitro*. *C R Acad Sci Paris III* **313**, 407-411.
- Prépin J** (1993). Le thymus foetal et la thymuline stimulent la prolifération des gonocytes dans le testicule foetal de rat *in vitro*. *C R Acad Sci Paris* **316**, 451-454.
- Prépin J y Le Vigouroux P** (1997). Inhibition by TGF- β 1 of the *in vitro* thymulin-stimulated proliferation of gonocytes from fetal rat testes. *Reprod Nutr Dev* **37**, 203-206.
- Prépin J, Le Vigouroux P y Dadoune JP** (1994). Effects of thymulin on *in vitro* incorporation of ^3H -thymidine into gonocytes of newborn rat testes. *Reprod Nutr Dev* **34**, 289-294.
- Rebar RW, Miyake A, Low TLK y Goldstein AL** (1981a). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* **214**, 669-671.
- Rebar RW, Morandini IC, Benirschke K y Petze JE** (1980). Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* **107**, 2130-2132.
- Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF y Petze JE** (1981b). The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* **108**, 120-126.
- Reyes-Esparza JA y Romano MC** (1989). An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *J Steroid Biochem* **34**, 541-545.
- Roitt IM, Brostoff J y Male DK** (1993). Immunology. 3ª ed, Mosby-Year Book Europe, Inglaterra, pp 3.1-3.12.
- Rønnekleiv OK y Kelly MJ** (2005). Diversity of ovarian steroid signaling in the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* **26**, 65-84.
- Rosas P** (1990). Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM.

Rosas P e Hinojosa L (1993). Efectos de la estimulación gonadotrópica sobre el crecimiento folicular en el ovario de ratones prepúberes normales e hipotímicos. XIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana, L-44.

Rosas P, Castellanos P y Domínguez R (1987). The existence of spontaneous hairless ("nude") hypothyroid mutant mice from the CD1 strain, reared under conventional animal house conditions. *Med Sci Res* **15**, 553-554.

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

Ross MH, Kaye GI y Pawlina W (2005). Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. 4ª ed, Médica Panamericana, Argentina, pp 380-384, 644-655.

Ruiz DMF (1988). Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM, México, pp 81-106.

Safieh B, Kendall MD, Norman JC, Metreau E, Dardenne M, Bach JF y Pleau JM (1990). A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *J Immunol Meth* **127**, 255-262.

Safieh B, Venn GE, Ritter MA, Singh S, Buckingham JC y Kendall MD (1991). Plasma thymulin concentrations in cardiac patients: involvement with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Physiol* **438**, pp 50.

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

Sanders FJ, May PB y Donabedian RK (1975). *In vitro* pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone (LH-RH) in intact and castrated male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* **3**, 71-80.

Savino W, Dardenne M, Papiernik M y Bach J-F (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.

Savino W, Gagnerault MCI, Bach JF y Dardenne M (1990). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. *Life Sci* **46**, 1687-1697.

Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S y Dardenne M (1984). Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels *in vivo* can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* **55**, 629-635.

Savoy-Moore RT, Schwartz NB, Duncan JA y Marshall JC (1980). Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* **209**, 942-944.

Schwall RH (1999). Inhibin. En: Encyclopedia of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds, Vol II, Academic Press, San Diego, pp 832-839.

Schwartz NB y McCormack CE (1972). Reproduction: gonadal function and its regulation. *Annu Rev Physiol* **34**, 425-472.

Schwartz NB, Rivier C, Rivier J y Vale WW (1985). Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonists on serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone under conditions of singular follicle-stimulating hormone secretion. *Biol Reprod* **32**, 391-398.

Shire JG y Pantelouris EM (1974). Comparison of endocrine function in normal and genetically athymic mice. *Comp Biochem Physiol* **47 A**, 93-100.

Sholiton LJ, Grossman CJ y Taylor BB (1980). Rat thymic homogenates convert testosterone to androgenic metabolites. *J Steroid Biochem* **13**, 1365-1367.

Shupnik MA, Gharib SD y Chin WW (1989). Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. *Mol Endocrinol* **3**, 474-480.

Silverman A-J, 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, 2ª ed, Vol I, Raven Press, New York, pp 1683-1709.

Spitzbarth TL, Horton TH, Lifka J y Schwartz NB (1988). Pituitary gonadotropin content in gonadectomized rats. Immunoassay measurements influenced by extraction solvent and testosterone replacement. *J Androl* **9**, 294-304.

Starzec AB, Lerrant Y, Berault A y Counis R (1996). Testosterone inhibits the basal and gonadotropin-releasing hormone-stimulated synthesis and release of newly synthesized α - and lutropin (LH) β -subunit but not release of stored LH in cultured rat pituitary cells. *Biochim Biophys Acta* **1310**, 348-354.

Steinberger A, Chowdhury M y Steinberger E (1973). Effect of repeated replenishment of hypothalamic extract on LH and FSH secretion in monolayer cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **92**, 12-17.

Stevens A y Steven LJ (1995). Texto y Atlas de Histología. Mosby/Doyma Libros, España, 250-254.

Swerdlow RS, Jacobs HS y Odell WD (1972). Synergistic role of progestogens in estrogen induction of LH and FSH surge. *Endocrinology* **90**, 1529-1536.

- Taguchi O, Nishizuka Y, Sakakura T y Kojima A** (1980). Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: detection of circulating antibodies against oocytes. *Clin Exp Immunol* **40**, 540-533.
- Tapper CM, Naftolin F y Brown-Grant K** (1972). Influence of the reproductive state at the time of operation on the early response to ovariectomy in the rat. *J Endocrinol* **53**, 47-57.
- Timsit J, Safieh B, Gagnerault MC, Savino W, Lubetzki J, Bach J-F y Dardenne M** (1990). Increase of circulating levels of thymulin in hyperprolactinemia and acromegaly. *C R Acad Sci III* **310**, 7-13.
- Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault M-C, Bach J-F y Dardenne M** (1992). Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 183-188.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ y Padmanabhan V** (1995). Follide-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* **16**, 765-787.
- Uzumcu M, Akira S y Lin YC** (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Sci* **51**, 1217-1228.
- Uzumcu M y Lin YC** (1994). Characterization of the stimulatory actions of thymic factor(s) on basal and gonadotropin-induced steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* **105**, 209-216.
- Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML y Lizarralde G** (1990). Twenty-four-hour rhythms in plasma concentrations of adenohipofyseal hormones are generated by distinct amplitude and/or frequency modulation of underlying pituitary secretory bursts. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 1616-1623.
- Veldhuis JD y Johnson ML** (1988). Operating characteristics of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in men: circadian, ultradian, and pulsatile release of prolactin and its temporal coupling with luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 116-123.
- Veldhuis JD, King JC, Urban RJ, Rogol AD, Evans WS, Kolp LA y Johnson ML** (1987). Operating characteristics of the male hypothalamo-pituitary-gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle-stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 929-941.
- Weick RF y Noh KA** (1984). Inhibitory effects of estrogen and progesterone on several parameters of pulsatile LH release in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* **38**, 351-356.
- Wilson CA, Leigh AJ y Chapman AJ** (1990). Gonadotrophin glycosylation and function. *J Endocrinol* **125**, 3-14.
- Wise T** (1998). *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* **66**, 129-135.

Wise T y Ford JJ (1999). Effects of the thymic peptide thymulin on *in vitro* and *in vivo* testicular steroid concentrations in white composite and meishan boars. *J Anim Sci* **77**, 2240-2251.

Witcher JA, Nearhoof KF y Freeman ME (1984). Secretion of luteinizing hormone (LH) and pituitary receptors for LH-releasing hormone as modified by the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* **115**, 2189-2194.

Yamamoto M, Diebel ND y Bogdanove EM (1970). Analysis of initial and delayed effects of orchidectomy and ovariectomy on pituitary and serum LH levels in adult and immature rats. *Endocrinology* **86**, 1102-1111.

Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **12**, 253-264.

Zmeili SM, Papavasiliou SS, Thorner MO, Evans WS, Marshall JC y Landefeld TD (1986). Alpha and luteinizing hormone beta subunit messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **119**, 1867-1869.

PUBLICACIONES

HINOJOSA L, MIRANDA-BRITO C, DAMIÁN-MATZUMURA PG, GARCÍA L, ROMANO MC, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (2000). Efectos de la timulina en la liberación de la FSH y LH por las células de la adenohipófisis de rata hembra. XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas y XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C108. Cancún, QR., 3 al 7 de septiembre. En el 2001 también fue presentado en la Semana de Investigación y Posgrado, FES Zaragoza, UNAM.

HINOJOSA L, GARCÍA L, CHAVIRA R, ROMANO MC, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (2001). Efectos de la timulina en la secreción de la LH por las células de adenohipófisis de rata en cada uno de los días del ciclo estral. XLIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C17. Monterrey, NL., 26 al 30 de agosto.

HINOJOSA L, GARCÍA L, CHAVIRA R, CASTILLO L, ROMANO MC, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (2002). Estudio de los efectos de la timulina en la liberación *in vitro* de FSH y LH por la hipófisis de rata en cada uno de los días del ciclo estral. XXVII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, 98-105. Morelia, Mich., 30 de junio al 3 de julio.

HINOJOSA L, GARCÍA L, QUIRÓZ U, CHAVIRA R, ROMANO MC, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (2002). Sex differences in FSH and LH secretion by the pituitary treated *in vitro* with thymulin. *Biology of Reproduction* 66, Supp. 1, Abs 515. Baltimore, Maryland, USA, 28 al 31 de julio.

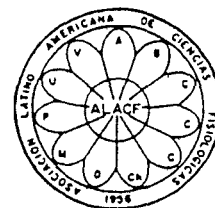
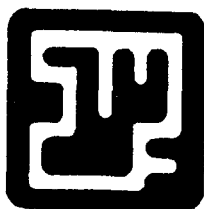
HINOJOSA L, GARCÍA L, CHAVIRA R, CÁRDENAS M, ROMANO MC, DOMÍNGUEZ R y ROSAS P (2002). Los esteroides sexuales modulan los efectos de la timulina en la liberación de la FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata hembra. XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C230. Colima, Col., 8 al 12 de septiembre.

HINOJOSA L, GARCÍA L, CASTILLO L, DOMÍNGUEZ R Y ROSAS P (2003). Variaciones en la concentración de Zn y testosterona a lo largo del ciclo estral de la rata. Relación funcional con timulina en la hipófisis. XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia y XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas, PT 07.024. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1 al 4 de septiembre.

HINOJOSA L, GARCÍA L, DOMÍNGUEZ R, ROMANO MC, DAMIÁN-MATSUMURA PG 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. Veracruz, Ver., 15-17 de mayo.

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 gonadotropinas en hipófisis de rata macho. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C211. Boca de Río, Ver., 1 al 5 de agosto.

HINOJOSA L, GARCÍA L, DOMÍNGUEZ R, ROMANO MC, DAMIÁN-MATSUMURA PG, 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 Sciences* 76, 795-804 (en el texto).



SOCIEDAD MEXICANA
DE CIENCIAS
FISIOLÓGICAS, A. C.
Y
ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

**XLIII CONGRESO NACIONAL
XX CONGRESO LATINOAMERICANO.**

Del 3 al 7 de septiembre del 2000.

**Programa General
y Resúmenes**

**Hotel Fiesta Americana Coral Beach
Cancún, Quintana Roo, México, 2000.**

LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE GnRH PRESENTA CAMBIOS ASIMÉTRICOS ENTRE EL LADO DERECHO E IZQUIERDO DE POA-AHA. Arteaga-López P^{1,2}, Cruz ME¹, Cerbón MA², Cruz-Mederos D¹, Mendoza-Rodriguez A² y Domínguez R¹. ¹ Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, ² Facultad de Química, U.N.A.M., México, D.F.

Se ha mostrado que los lados derecho e izquierdo del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) regulan de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación. Con el objetivo de conocer si la expresión del gen de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) también es asimétrica, se estudió el patrón de expresión del ARNm de GnRH en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral a diferentes horas del día. Grupos de 6 ratas intactas (3 repeticiones por hora y día) fueron utilizados para extraer el ácido ribonucleico nuclear (ARN) total de los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, el gen fue amplificado por la técnica de RT-PCR. El gen de GAPDH se utilizó como control de expresión constitutiva. Los resultados muestran que la expresión del ARN mensajero (ARNm) de GnRH en POA-AHA derecha es mayor que en el lado izquierdo (*0.1510±0.009 vs. 0.0686±0.0086 *p<0.005); dicha asimetría varía durante el día y el ciclo estral. Estos resultados coinciden con los observados previamente que muestran que la concentración de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es mayor que en el izquierdo.

Aprobado por CONACYT IN27851-M y CONACYT 121846.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON OXITOCINA SOBRE LA MORFOMETRIA DE MOTONEURONAS DEL MUSCULO PUBOCOCCIGEO EN RATAS MACHO. Castellán, F.*, Nicolás, L.*, Manzo, J., Pacheco, P. y Hernández, M.E.* Inst. de Neuroetología, Univ. Veracruzana, Xalapa, Ver.; Inst. de Inv Biomédicas, UNAM, México, D.F.

Las motoneuronas del músculo pubococcigeo (MnPe) se localizan en segmentos lumbosacros de la médula espinal, y son sensibles a la fluctuación de hormonas esteroides. Dependen fundamentalmente de estradiol, aunque carecen de sus receptores, así como de aromatasas para convertirla a partir de la testosterona. Con ello, hemos propuesto la hipótesis de que el metabolismo de esteroides en el macho se lleva a cabo en el núcleo paraventricular (NPV), cuyas células proyectan directamente a la médula espinal lumbosacra. A su vez, el NPV se comunica con las MnPe vía otro mensajero, la oxitocina (OT). Los resultados que aquí se muestran validan esta hipótesis. Para ello, se utilizaron ratas macho Wistar intactas y castradas (C), con éstas últimas se formaron cuatro grupos (n=8 c/u): a) machos C; b) C con cánula intratecal sin tratamiento; c) igual a b pero con tratamiento con vehículo; d) con tratamiento con OT (5µl 0.5 nM). El tratamiento fue diario por dos semanas. Las MnPe fueron marcadas posteriormente con peroxidasa de rábano.

El tratamiento intratecal con OT reduce los efectos producidos por la castración, aún en ausencia de testosterona. A pesar de que la recuperación fue significativa, las MnPe no se tiñeron al nivel de un animal intacto. Así, se concluye que la OT liberada por el NPV en la médula lumbosacra, es importante para el mantenimiento de las MnPe dependientes de esteroides. No obstante, se requieren de más estudios para determinar una dosis más apropiada de tratamiento. Finalmente, se sugiere que este mecanismo puede también existir en otras motoneuronas espinales sensibles a esteroides, como aquellas del núcleo del bulbocavernoso que inervan a la musculatura peneana.

BECAS CONACYT: Reg. 153783 (F.C.) y Reg. 124762 (L.N.)

DETERMINACIONES CIRCADIANAS DE PROLACTINA, CORTISOL Y MELATONINA EN UN CASO DE UN MONO ASINTOMÁTICO TRATADO CON MPTP. Barcia C*, Bautista V, Sánchez-Bahillo A, Lozano ML, Fernández-Villalba E, Herrero MT. Grupo de Neurología y Neurocirugía Experimental. Dept. de Ciencias Morfológicas y Psicobiología, Univ. de Murcia, España. El MPTP es una proneurotoxina que administrada en dosis sistémicas puede producir un síndrome parkinsoniano estable en primates. Sin embargo, algunas especies e individuos no son susceptibles a esta proneurotoxina. Las determinaciones hormonales pueden dar una medida indirecta de las posibles alteraciones de los núcleos hipotalámicos por acción del MPTP.

En este experimento se utilizaron siete monos macacos macho adultos. Cinco de ellos fueron tratados con dosis sistémicas intravenosas de MPTP. Cuatro de ellos mostraron un parkinsonismo estable pero uno de ellos no mostró ningún signo parkinsoniano. Estos monos no fueron tratados con L-DOPA ni agonistas dopaminérgicos. Las extracciones de plasma se realizaron cada tres horas cubriendo las 24 horas del día. La extracción de las muestras se repitió tres veces para cada animal. Las concentraciones hormonales se determinaron por ensayo inmunoenzimático y se compararon estadísticamente los tres grupos entre sí.

Las determinaciones de prolactina y cortisol siguieron un patrón circadiano similar al grupo control. Sin embargo, los niveles de melatonina presentaron niveles significativamente más bajos en los valores nocturnos respecto a los otros dos grupos. Estos resultados sugieren que el MPTP podría producir lesiones hipotalámicas pero sólo en individuos susceptibles.

Palabras clave: Parkinson, susceptibilidad, neurotoxicidad, ritmos circadianos.

EFFECTOS DE LA TIMULINA EN LA LIBERACIÓN DE LA FSH Y LH POR LAS CÉLULAS DE LA ADENOhipófISIS DE RATA HEMBRA. Hinojosa, L.^{1*} (avalado por Morales Ledesma Leticia), Miranda-Brito, C.^{2*}, Damián-Matzumura, P.G.^{3*}, García, L.^{1*}, Romano, M.C.^{2*}, Domínguez, R.^{1*} y Rosas, P.^{1*} ¹Lab. de Neuroinmuno-endocrinología, UIBR. FES-Zaragoza, UNAM. ²Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV, IPN. ³Depto. de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa. México DF, México.

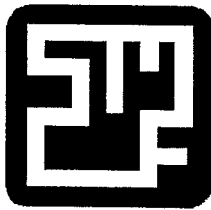
La administración sistémica de timulina en la etapa peripuberal del ratón hembra, estimula la respuesta ovulatoria frente al tratamiento con PMSG. En el ratón timentomizado a los diez días de edad, la inyección diaria de timulina modifica la esteroidogénesis. Lo anterior muestra que la timulina participa en la regulación de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Debido a esto se decidió estudiar los efectos de la timulina (unida o no a Zn) en la liberación *in vitro* de la FSH y la LH por las células de la adenohipófisis de rata hembra adulta, estimuladas o no con GnRH (10⁻⁹M), por un período de tres horas. Se determinaron las concentraciones de gonadotropinas en el medio de cultivo por RIA y se compararon con los resultados obtenidos al administrar timulina (100 ng) o timulina+Zn (10⁻⁷M), ya que este metal incrementa su actividad biológica. La mediate e.m. de los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Grupo	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
Basal	35.2 ± 3.3	61.8 ± 8.7
GnRH	76.6 ± 4.2 a	191.8 ± 37.5 a
GnRH + Timulina	63.1 ± 2.1 a	111.5 ± 15.9
GnRH + Timulina + Zn	55.2 ± 3.4 a,b	106.9 ± 6.3 b

a, p<0.05 vs. Basal; b, p<0.05 vs. GnRH. (ANDEVA, seguida de Tukey)

No se observaron diferencias significativas en la concentración basal de FSH y LH cuando se administró timulina sola o combinada con Zn. Sin embargo, este péptido unido al metal disminuyó el efecto estimulante de GnRH sobre la liberación *in vitro* de las gonadotropinas. Los resultados sugieren que el efecto de la timulina en la hipófisis es mediado por GnRH y depende de su interacción con el Zn.

Aprobado por DGAPA-IN225598. PAEP-101312. CONACYT y PUIS.



**SOCIEDAD MEXICANA
DE CIENCIAS
FISIOLÓGICAS, A. C.**

XLIV CONGRESO NACIONAL

Del 26 al 30 de agosto del 2001.

**Programa General
y Resúmenes**

**Universidad Autónoma de Nuevo León e
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey.**

**Gran Hotel Ancira
Monterrey, Nuevo León, México, 2001.**

EFFECTOS DE LA TIMULINA EN LA SECRECIÓN DE LA LH POR LAS CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA EN CADA UNO DE LOS DÍAS DEL CICLO ESTRAL.

Hinojosa, L.^{1*}, García, L.^{1*}, Chavira, R.^{2*}, Romano, M.C.³, Domínguez, R.¹ y Rosas, P.^{1*}. ¹Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES-Zaragoza, UNAM. ²INCMN "Salvador Zubirán". ³Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV, IPN, México, D.F., México.

En el ratón prepúber inyectado con PMSG, la administración previa de timulina (T) estimula la ovulación. *In vitro* la T estimula la secreción de LH en células de hipófisis de rata macho. Basado en lo anterior, se analizó el efecto de la T (unida o no a Zn) en la secreción de la LH por las células de adenohipófisis, cultivadas en suspensión y obtenidas de ratas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral. Las células se trataron con 100 ng de timulina o Zn (10^{-7} M) (metal que incrementa la actividad biológica de la T) o T-Zn y se estimularon o no con GnRH (10^{-8} M). Los cultivos se incubaron por una hora. En el medio de cultivo se cuantificó la concentración de LH (ng/ml) por radioinmunoanálisis. Los resultados se expresan en media \pm e.m. en la siguiente tabla:

Grupo/día	Diestro 1	Diestro 2	Proestro	Estro
Basal	33.7 \pm 3.4	52.0 \pm 3.5	60.9 \pm 1.2	55.2 \pm 5.0
Zn	56.7 \pm 4.3 a	79.3 \pm 3.1 a	73.6 \pm 3.2	95.4 \pm 9.2 d
T	50.5 \pm 4.0	71.4 \pm 6.2	52.6 \pm 4.8	62.8 \pm 2.7
T-Zn	38.7 \pm 3.5 b	102.0 \pm 5.3 a,c	76.2 \pm 5.7 c	56.4 \pm 3.8
GnRH	48.0 \pm 5.4	91.8 \pm 15.0 a	71.2 \pm 4.0	93.0 \pm 0.4 a
GnRH-Zn	46.3 \pm 1.4	69.6 \pm 4.6	92.7 \pm 4.7	63.3 \pm 2.8 e
GnRH-T	42.2 \pm 3.6	59.4 \pm 3.6 e	81.2 \pm 13.0	82.1 \pm 7.7
GnRH-T-Zn	52.2 \pm 1.7	76.9 \pm 2.7	46.5 \pm 5.2 f	64.6 \pm 0.7 e

a, p<0.05 vs. Basal; b, p<0.05 vs. Zn; c, p<0.05 vs. T; d, p<0.05 vs. Basal, T, T-Zn; e, p<0.05 vs. GnRH; f, p<0.05 vs. GnRH-Zn.

Los cambios en la secreción basal de LH y en la respuesta a GnRH durante el ciclo, indican que *in vitro* sigue existiendo influencia del medio ambiente hormonal previo al sacrificio. Los resultados muestran que en diestro 2, la T incrementa la liberación basal de LH sólo en presencia de Zn, lo que no sucede con la secreción estimulada ya que la T-Zn inhibe el efecto de GnRH en el día del proestro.

Apoyado por DGAPA-IN225598, PAEP-101313, CONACyT y PUIS

C19

EL IONÓFORO DE CALCIO A23187 AUMENTA EL PROCESAMIENTO POST-TRADUCCIONAL DE LA PROENKEFALINA EN UNA LÍNEA CELULAR DE ORIGEN HEMATOPOYÉTICO. Lopez-Camacho, C*, Duran S*, Teran-Vasquez L*, Valls M, Vindrola O, Padrós MR. Laboratorio de Bioquímica. Instituto de Fisiología. Universidad Autónoma de Puebla.

La línea celular de origen hematopoyético HL-60 (leucemia promielocítica humana) sintetiza y libera péptidos derivados (PDP) de la proencefalina (PENK). En el presente trabajo se analizó el efecto del aumento del calcio intracelular, por tratamiento con ionóforo de calcio A23187 (IC), sobre el procesamiento de los PDP en estas células. Para ello la línea fue cultivada siguiendo las especificaciones de American Type Culture Collection, e incubadas por 15, 30 y 60 minutos, en presencia o ausencia de 10 μ M del IC. Las proteínas de los extractos celulares fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos. En las células control se observó la presencia de proteínas de 44-46, 34-30, 22 y 17 kDa. El tratamiento con el IC disminuyó el contenido de estas a los 15 minutos, observándose luego un aumento del doblete de 44-46 kDa a los 30 y 60 minutos; mientras que las proteínas de 22 y 34 kDa no se detectaron a los 60 minutos. El agregado de ciclosporina A (CSA) 45 minutos antes del tratamiento con el IC, inhibió la disminución en los niveles de las moléculas de 34 y 22 kDa. Por otro lado el IC aumentó en un 63%, 86% y 27% el contenido de met-enkefalina a los 15, 30 y 60 min. de tratamiento, respectivamente. Este efecto fue inhibido por la CSA. Experimentos de pulso y cambio, seguidos de inmunoprecipitación, mostraron que las células HL-60 sintetizan fundamentalmente una molécula de 44kDa. El tratamiento con IC por 15 y 30 min. produjo una marcada disminución en los niveles de esta proteína acompañado de un aumento en la liberación, con un pico máximo a los 30 minutos. Este efecto no fue revertido por CSA. Estos resultados indican que el aumento del calcio intracelular inducido por el IC provoca una notable disminución en los niveles celulares de las proteínas precursoras de PENK, acompañado de un aumento en la liberación de los mismos y de su procesamiento post-traducciona hacia met-enkefalina. Este último efecto es revertido por tratamiento previo con CSA. Este trabajo fue financiado por los Proyectos CONACyT 25657N y 31764N.

C18

HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DE POLLO (cGH) Y SU PATRÓN DE SECRECIÓN EN RESPUESTA AL AYUNO. López-Rosales, L.J., Martínez-Coria H., Luna, M., Arámburo, C. Centro de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, Qro.

La diversidad funcional de la Hormona del crecimiento (GH) puede ser explicada, al menos parcialmente por su heterogeneidad molecular. Resultados previos muestran que al menos dos variantes de carga presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos: la forma con un Rf = 0.23 es esencialmente lipolítica, mientras que la de 0.3 es antilipolítica. En aves se ha reportado que el patrón de variantes moleculares presentes en la adenohipófisis difiere durante el desarrollo. Además, estudios *in vitro* muestran una secreción diferencial de la variante de 26kDa de GH en respuesta a GHRH, lo que sugiere que su síntesis y secreción en los somatotropos se modifica dependiendo del estímulo. El ayuno es una condición fisiológica que compromete el equilibrio energético del animal en donde el incremento de GH participa como contrarregulador de la hipoglucemia lo que nos permite utilizarlo como modelo experimental. En este trabajo se estudio el efecto del ayuno (24h, 72h y 120h) sobre el patrón de secreción de las variantes de masa de la cGH en pollos de 4 semanas de edad. Se determinó la concentración total de cGH en el extracto hipofisiario (EH) y en el suero a través de un ELISA específico, el patrón de variantes moleculares de la hormona se analizó por Western blot y densitometría. Como indicador homeostático se determinaron los niveles de glucosa plasmática. Se observó un incremento significativo en los niveles de cGH total en respuesta al ayuno mientras los niveles de glucosa no presentan modificaciones importantes. Al analizar el patrón de secreción de las variantes en el suero se observó una disminución en la concentración relativa de la variante de 26 kDa con respecto al control. La forma monomérica de 22kDa presenta una tendencia a incrementar su concentración relativa. En los EH en no se observan modificaciones significativas en la concentración de cGH total ni en las bandas inmunoreactivas. Estos resultados nos permiten suponer que la regulación a la baja de la síntesis y secreción de las variantes de menor afinidad al receptor incrementa la proporción del monómero secretado y por ende su capacidad de estímulo.

Apoyado por los donativos de CONACyT 31817-N y PAPIIT UNAM IN206196 y por la donación de animales de Pilgrim's Pride

CA1

ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y DESARROLLO DEL FOLÍCULO OVÁRICO EN LA RATA PREPÚBER. Morán, M.J*, Ayala, M.E., Monroy, J*, Damián-Matsumura*, Domínguez, R. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (Laboratorio de Pubertad). Facultad de estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP. 9-020, México, DF. Departamento de Biología de la Reproducción, UAM Iztapalapa, México.

La selección de los folículos ováricos, su crecimiento y maduración son regulados por las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH)), cuya secreción es modulada por la serotonina (5-HT) entre otros sistemas de neurotransmisión y por las hormonas esteroideas. Previamente hemos mostrado que la administración sistémica de 5-HT bloquea parcialmente la ovulación en el día del primer estro vaginal (PEV). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue el de analizar si los cambios en la ovulación observados en estos animales están asociados a modificaciones en el crecimiento folicular. Ratas hembras de la cepa CHZ-V de 30 días de edad fueron inyectadas con 37.5 mg/kg de clorhidrato de 5-HT (C-5-HT) o de sulfato de 5-HT (S-5-HT) o solución salina (SAL). Todos los animales fueron sacrificados en el día del PEV. Se diseccionaron los ovarios, se realizaron cortes seriados a 10 μ m y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina, para realizar el análisis de la población folicular. En suero se cuantificó la concentración de FSH y LH por la técnica de radioinmunoanálisis. Los resultados se analizaron estadísticamente. En los animales que recibieron ambos tipos de 5-HT se observó la tendencia a la disminución en el número total de folículos [C-5-HT: 49.2 \pm 3.3; S-5-HT: 49.8 \pm 8.9 vs 71.5 \pm 16.5, NS]. Así mismo el número de folículos pequeños (<349 μ m de diámetro) disminuyó de manera significativa [C-5-HT: 39.2 \pm 2.1; S-5-HT: 43.8 \pm 4.5 vs 64.7 \pm 14.9, p< 0.05]. En ambos casos la concentración de FSH disminuyó [C-5-HT: 12.5 \pm 0.4; S-5-HT: 6.1 \pm 2.0 vs 31.1 \pm 3.5, p< 0.05] y la concentración de LH únicamente disminuyó en los animales que recibieron S-5-HT [0.46 \pm 0.04 vs 1.3 \pm 0.09, p< 0.05]. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que el sistema serotoninérgico participa en los eventos que regulan el proceso de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Apoyado por DGAPA IN210500 y PUIS, UNAM.



**ACADEMIA DE INVESTIGACION
EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION A.C.**

XXVII REUNION ANUAL

*Morelia, Michoacán
30 de Junio al 3 de Julio 2002*

Consejo Directivo y Comité Organizador

PRESIDENTA

Marta Romano Pardo

VICEPRESIDENTA

Ana Elena Lemus Bravo

SECRETARIA

Margarita González del Pliego Olivares

CONSEJEROS

Gabriela Morali de la Brena

Miguel Cervantes Alfaro

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TIMULINA EN LA LIBERACIÓN *in vitro* DE FSH Y LH POR LA HIPÓFISIS DE RATA EN CADA UNO DE LOS DÍAS DEL CICLO ESTRAL.

Hinojosa L¹, García L¹, Chavira R², Castillo L⁴, Romano MC³, Domínguez R¹ y Rosas P¹.

¹Laboratorio de Neuroinmuno-endocrinología, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES-Zaragoza, UNAM. AP 9-020, CP 15000, México DF, México.

²Depto. de Biología de la Reproducción, INCMN "Salvador Zubirán", México DF, México.

³Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, México DF, México.

⁴Laboratorio de Espectroscopia, FES-Zaragoza, UNAM. México DF, México.

RESUMEN

La timulina participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En estudios *in vivo*, se ha mostrado que este péptido induce la ovulación en el ratón prepúber tratado con PMSG. *In vitro* se ha observado que la timulina estimula la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis de rata adulta macho o hembra. Sin embargo, se sabe que en la hembra el ambiente neuroendócrino en el que se encuentra la adenohipófisis varía a lo largo del ciclo estral. Por esto en el presente estudio se analizaron los efectos de la timulina en la secreción *in vitro* de la FSH y LH por las células de adenohipófisis obtenidas de ratas en cada uno de los días del ciclo estral. Se utilizaron cultivos de células de adenohipófisis en suspensión, obtenidas de ratas adultas sacrificadas en diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P) y estro (E). Las células se incubaron durante 1 h sin tratamiento (basal) o con GnRH (10^{-9} M) o con timulina (100 ng) en presencia o no de GnRH. En el medio se evaluó la concentración de FSH y LH por radioinmunoanálisis. Los resultados mostraron que las células adenohipofisarias obtenidas de ratas en P liberaron más FSH que las células en D1, presentando la máxima liberación las células de animales en E. Los cultivos de células en P liberaron mayor concentración de LH que las células en D1 y D2, en cambio en las células en E la concentración fue mayor respecto a las células en D1. El tratamiento con GnRH incrementó la secreción basal de FSH en D1, D2 y P. Sin embargo, en la secreción de LH este efecto sólo se presentó en las células en D1 y D2. Cuando las células en D1 se trataron con timulina se indujo el aumento de la secreción basal de FSH. Un efecto inverso se observó al tratar a las células en E. La liberación basal de LH al medio de cultivo de células en D1, D2 y E, se incrementó por la administración de timulina. Esta respuesta no se presentó en las células en P. Sólo en las células de adenohipófisis en D2, la adición de timulina más GnRH disminuyó la liberación estimulada de FSH. La timulina más GnRH también disminuyó la secreción de LH pero en D1, mientras que en el P la estimuló en comparación con las células que únicamente tuvieron GnRH. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la secreción, tanto basal como estimulada de FSH y LH por las células de adenohipófisis, son el resultado de las condiciones neuroendócrinas que prevalecen en cada día del ciclo y que la timulina puede tener efectos tanto estimulantes como uno inhibitorios en la liberación de las gonadotropinas, lo que depende del ambiente hormonal del animal al momento del sacrificio y de la presencia de GnRH.

Palabras claves: timulina, FSH, LH, adenohipófisis, ciclo estral.

INTRODUCCIÓN

En el establecimiento de las relaciones neuroinmunoendócrinas, existen interacciones funcionales bidireccionales entre el timo y el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La participación del timo en la regulación de este eje es por intermedio de las hormonas polipeptídicas que sintetiza llamadas timosinas (Goldstein y col., 1981; Low y Goldstein, 1984; Uzumcu y col., 1992; Spangelo, 1995).

Se ha descrito que algunas de estas timosinas tienen efecto sobre la función hipotálamo-hipofisaria, tal es el caso de la timosina β_4 , la que adicionada a un sistema de perfusión de hipotálamo medio basal e hipófisis, incrementa la liberación de la hormona luteinizante (LH) hasta 200 veces más que la basal, cuando es administrada a tejido hipofisario la concentración de LH es similar a la basal, y adicionada a hipotálamo aumenta la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Rebar y col., 1981).

Existen evidencias que muestran que el timo modula la respuesta de la hipófisis, ya que al adicionarle un factor aislado del medio de incubación de timo y del medio condicionado de células retículo-epiteliales tímicas, se incrementa el efecto estimulante de la GnRH sobre la liberación *in vitro* de las gonadotropinas (Mendoza y Romano, 1989; Mendoza y col., 1995).

Algunas timosinas se han detectado en bazo, hígado, pulmón, riñón y cerebro, lo que dificulta la interpretación de que el timo está involucrado con los mecanismos que regulan el eje neuroendócrino de la reproducción (Dalakas y col., 1984; Horecker, 1984; Hall y col., 1992).

De las timosinas estudiadas hasta el momento, la timulina es un nonapéptido sintetizado exclusivamente por el epitelio tímico. Se ha mostrado que el ratón congénitamente atímico nu/nu carece de timulina y en el ratón sometido a una timectomía la hormona desaparece de la circulación sanguínea. En ambos modelos experimentales, cuando se realiza un injerto de timo o de células epiteliales tímicas, la timulina es detectada en el suero (Dardenne y col., 1974; Safieh y col., 1990). En el plasma, la timulina se encuentra unida a zinc lo que incrementa su vida media y actividad biológica (Imaizumi y col., 1981; Dardenne y col., 1982, 1984; Bach y Dardenne, 1984). Estudios preliminares de nuestro laboratorio utilizando espectrofotometría de absorción atómica, muestran que tanto en la hipófisis como en el suero fetal de bovino, está presente el zinc.

La timulina participa en la regulación de la función reproductora, ya que su administración al ratón prepúber produce retardo en el inicio de la pubertad, aumento del peso del timo y de la concentración sérica de progesterona. En el ratón de 20 días de edad el tratamiento con la gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG) no resulta en ovulación. Sin embargo la administración de timulina 24 horas antes del tratamiento con PMSG, induce la ovulación e incrementa el peso de los ovarios (Hinojosa y Rosas, 1996, 1997; Hinojosa y col., 1999).

En el ratón, la extirpación del timo a los diez días de vida postnatal (Tx-10), provoca disminución del 66% en la concentración sérica de estradiol; el reemplazo hormonal con timulina inmediato a la timectomía normaliza la concentración del esteroide. Cuando este modelo es tratado a los 25 días de edad de manera secuencial con PMSG y la gonadotropina coriónica humana, se observa una disminución en el número de ovocitos liberados respecto al animal intacto estimulado con ambas gonadotropinas. En el Tx-10 el reemplazo de timulina y el mismo tratamiento hormonal restablece la cuota ovulatoria (García y col., 2000).

La timulina también es capaz de modular la esteroidogénesis gonadal. En estudios realizados con células de la granulosa en cultivo obtenidas de ovarios de cerda, la **administración de timulina incrementa la actividad aromatasasa y la secreción de progesterona estimulada por gonadotropinas** (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). En el

testículo de rata, se ha descrito que esta timosina aumenta la secreción *in vitro* de testosterona (Wise, 1998).

Zaidi y colaboradores (1988) muestran que la adición de timulina al cultivo de tejido adenohipofisario de rata macho adulta, estimula la liberación de la LH en la misma proporción que lo hace la GnRH y de manera dosis-dependiente. Resultados similares se presentan al administrar timulina unida a zinc (Hadley y col., 1997). En hipófisis de ratas hembra tratadas o no con GnRH, la timulina incrementa la secreción de la hormona estimulante del foliculo (FSH) y de la LH (Brown y col., 2000).

Dado que en la rata, la hipófisis está sometida a diferentes condiciones neuroendócrinas a lo largo del ciclo estral, en el presente proyecto se decidió estudiar el efecto que tiene la timulina sobre la secreción *in vitro* de las gonadotropinas por las células de la adenohipófisis, obtenidas de ratas en cada uno de los días del ciclo estral.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas (tres meses) de la cepa Wistar a las cuales se les realizó el seguimiento del ciclo estral por la toma diaria del frotis vaginal. Los animales se separaron por grupos dependiendo del día del ciclo estral (diestro 1, diestro 2, proestro o estro) y se sacrificaron por decapitación entre las 9:00 y 10:00 h. El cerebro se disecó inmediatamente en forma aséptica para extraer la hipófisis.

Del tronco se colectó la sangre, se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se separó el suero y se almacenó a -20°C para la posterior determinación de las concentraciones de FSH y LH por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo, siguiendo el protocolo y los reactivos donados por el National Pituitary Program (NIADDK, Bethesda MD, EE.UU.). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 4% y 7.9% para FSH y 5.1% y 6.5% para LH.

Cultivo de células de la adenohipófisis

La hipófisis se disecó y se separó la neurohipófisis de la adenohipófisis. Las células de la adenohipófisis se disociaron siguiendo el método de Steinberger y colaboradores (1973), que consiste en disgregar el tejido con tripsina (GIBCO, NY, EE.UU.) al 0.25% en solución salina libre de calcio y magnesio, durante 15 min a 37 °C en baño María con agitación.

Las células se resuspendieron en medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium, D-MEM, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO), 1% de antibiótico (penicilina y estreptomina, GIBCO), 0.1% de glucosa (Merck, México) y 25 mM de N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU.) y se sometieron a una disgregación mecánica al pasar el tejido repetidas veces por una pipeta. En cada ensayo se realizó el conteo celular en un hemocitómetro y se sembraron 10^7 células/ml de medio de cultivo.

Las células se colocaron en tubos cónicos con 1 ml de D-MEM, se incubaron a 37°C en baño María con agitación durante 1 hora. Después de este tiempo, las células en

suspensión se centrifugaron a 800 rpm durante 8 min a 4 °C. El sobrenadante se extrajo y se substituyó por medio fresco y se procedió a realizar los diferentes tratamientos.

Experimento 1: Las células de adenohipófisis se trataron con 100 ng de timulina (Sigma) y se incubaron por 1 hora. Pasado este tiempo se colectó el medio y se almacenó a -20°C hasta la medición de las concentraciones de la FSH y la LH por RIA. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Experimento 2: Otros grupos de cultivos celulares se procesaron de la misma manera que en el experimento anterior y además se trataron con GnRH (10^{-9} M). El cultivo se incubó por 1 hora y finalizado este tiempo se recuperó el medio para la medición de la FSH y LH por RIA. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos de las concentraciones de gonadotropinas se analizaron utilizando la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, se aplicó la prueba de "t" de Student. Los resultados se expresaron como media \pm e.e.m. Sólo se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5 %.

RESULTADOS

Concentraciones de gonadotropinas en el suero de ratas en cada uno de los días del ciclo estral.

La concentración de FSH en el suero de las ratas sacrificadas en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral fue mayor en el proestro y en el estro en comparación con el diestro 2. Sin embargo, en la concentración de LH no se observaron diferencias significativas a lo largo del ciclo (tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. de la concentración en suero de FSH y LH (ng/ml) en la rata adulta en cada uno de los días del ciclo estral.

Grupos	Diestro 1	Diestro 2	Proestro	Estro
FSH	5.6 \pm 0.1	5.1 \pm 0.4	7.5 \pm 0.7 *	7.1 \pm 0.5 *
LH	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2

* $p < 0.05$ vs Diestro 2

Concentración de gonadotropinas en el medio de cultivo de células de adenohipófisis tratadas con GnRH y sin tratamiento (basal).

En los cultivos de células adenohipofisarias de ratas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral, se presentó un incremento en la liberación basal de FSH en el día del proestro respecto al diestro 1. En los cultivos provenientes de animales en estro, la concentración de FSH fue significativamente mayor al resto de los días. En cuanto a la secreción basal de LH, se observó que fue mayor en el proestro en comparación con los

diestros 1 y 2, mientras que en el estro esta diferencia sólo se observó al comparar con el diestro 1 (figura 1).

El tratamiento con GnRH dió como resultado un aumento en la concentración de FSH respecto a la liberación basal en todos los días, excepto en el estro. La secreción de LH en el medio de cultivo, bajo el estímulo de la GnRH, sólo se incrementó significativamente en los diestros 1 y 2 en comparación con la basal (figura 2).

Respuesta de las células adenohipofisarias al tratamiento con timulina en presencia o no de GnRH.

En las células de adenohipófisis obtenidas de ratas en diestro 1, la adición de timulina incrementó la secreción de FSH en comparación con la liberación basal. Sin embargo, en las células en estro, la administración de timulina resultó en un decremento de esta gonadotropina. En los cultivos en diestro 2 y proestro, no se observaron diferencias significativas (figura 3).

La administración de timulina en las células de adenohipófisis en diestro 2, disminuyó la concentración de FSH inducida por la GnRH. En el resto de los cultivos tratados con timulina y GnRH no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los cultivos que sólo recibieron GnRH (figura 3).

La secreción de LH por las células de adenohipófisis en cultivo, se incrementó por la adición de timulina en todos los días del ciclo excepto en el proestro en comparación con la liberación basal. Cuando las células en diestro 1 fueron tratadas con timulina y GnRH, se presentó una disminución en la liberación estimulada de LH. Sin embargo, en las células en proestro la administración de timulina y GnRH aumentó la secreción de esta gonadotropina y en diestro 2 y estro no la modificó, respecto a las células que sólo recibieron GnRH (figura 3).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la secreción basal de FSH y LH por las células de adenohipófisis cultivadas en suspensión y obtenidas de ratas en los diferentes días del ciclo estral, es el resultado de las condiciones neuroendócrinas que prevalecen en cada día del ciclo. La respuesta de estos cultivos celulares a la estimulación con GnRH también depende del ambiente hormonal del animal al momento del sacrificio. Estos resultados concuerdan en parte con los de O'Conner y colaboradores (1988), quienes describen en hipófisis en cultivo que la secreción de LH, bajo el estímulo pulsátil de GnRH, varía según el día del ciclo estral pero no así la secreción de FSH.

En nuestro estudio la liberación basal de FSH al medio de cultivo se incrementa gradualmente a partir del diestro 1 y alcanza su máxima liberación el día del estro. Un perfil similar se presenta en las variaciones de la concentración sérica de la hormona de los animales estudiados. Por otra parte, el incremento más conspicuo en la liberación basal de LH se presenta en las células obtenidas de animales en proestro, evento que no corresponde con la concentración en suero, ya que no se observan diferencias

significativas durante el ciclo estral. Se ha descrito que la concentración del ARNm de la cadena β de la FSH y la LH en la hipófisis de la rata varía a lo largo del ciclo estral (Haisenleder y col., 1994), lo que apoya la idea que las modificaciones en la liberación basal de ambas gonadotropinas son el reflejo de las diferencias en la capacidad de síntesis de cada hormona durante el ciclo.

Nuestros resultados muestran que en los días en que la secreción basal de FSH o LH es baja, las células tienen una mayor capacidad de respuesta frente al estímulo con GnRH y la pierden cuando la liberación basal es elevada. Estos hallazgos podrían ser explicados por la existencia de factores hipofisarios e hipotalámicos que regulan de manera estimulante o inhibitoria la liberación hormonal (Schwartz y Cherny, 1992; Kondor y col., 1994).

Brown y colaboradores (2000) indican que en las células de adenohipófisis obtenidas de ratas hembra en cualquiera de los días del ciclo estral, la timulina incrementa la secreción de ambas gonadotropinas; cuando la timosina es administrada en combinación con GnRH induce un efecto sinérgico en la liberación de la LH y uno aditivo en la FSH. En este estudio, mostramos que la capacidad de respuesta de los gonadotropos al tratamiento con timulina, está en función del día del ciclo estral y presenta tanto efectos estimulantes, similares a los observados al adicionar GnRH, como inhibitorios. La respuesta diferencial de las células de adenohipófisis frente al estímulo conjunto de GnRH y timulina, podría ser explicada por una interacción de ambas hormonas a nivel de receptores y es probable que en condiciones normales exista una modulación de los efectos de cada hormona.

BIBLIOGRAFÍA

Bach JF y Dardenne M (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application. AL Goldstein Ed., Plenum Press, New York, pp 593-600.

Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM y Goya RG (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **55A**, B170-B176.

Dalakas MC, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever JL y Goldstein AL (1984). Thymosin β_4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application. AL Goldstein Ed., Plenum Press, New York, pp 119-125.

Dardenne M, Papiernik M, Bach JF y Stutman O (1974). Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. *Immunology* **27**, 299-304.

Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J y Bach JF (1982). Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **79**, 5370-5373.

Dardenne M, Savino W, Gastinel L y Bach JF (1984). Thymulin. New biochemical aspects. En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application. AL Goldstein Ed., Plenum Press, New York, pp 37-42.

- 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.
- Goldstein AL, Low TLK, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu S-K, Naylor PB y McClure JE (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Recent Prog. Horm. Res.* **37**, 369-415.
- Hadley AJ, Rantle CM y Buckingham JC (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomod.* **4**, 62-69.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC (1994). Regulation of gonadotropin gene expression. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds., 2ª ed., Vol I, Raven Press, New York, pp 1793-1813.
- Hall NRS, O'Grady MP y Menzies RA (1992). Thymic regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Int. J. Immunopharmac.* **14**, 353-359.
- 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 y Rosas P (1996). Effects of the serum thymic factor (FTS) on the gonadotropin-induced ovulation in normal and hypothyroid mice. *Biol. Reprod.* **54**, Suppl. 1, Abs 115.
- Hinojosa L y Rosas P (1997). Evidencias de la participación de la timulina en el proceso de pubertad. Ratones eutímicos e hipotímicos como modelos de estudio. *XXII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción*, 36-46.
- Horecker BL (1984). Thymosin β_4 . Distribution and biosynthesis in vertebrate cells and tissues. En: *Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Application*. AL Goldstein Ed., Plenum Press, New York, pp 77-88.
- Imaizumi A, Gytoku J, Terada S y Kimoto E (1981). Structural requirement for the biological activity of serum thymic factor. *FEBS Letters* **128**, 108-110.
- Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G y Weiner RI (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y JD Neill Eds., 2ª ed., Vol I, Raven Press, New York, pp 1621-1681.
- Ledwitz-Rigby F y Scheid PG (1990). Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins *in vitro*. *VIII. Ovarian Workshop. Regulatory process and gene expression in the ovary*, pp. 473-478.
- Low T y Goldstein A (1984). Thymosins: Structure, function and therapeutic applications. *Thymus* **6**, 27-42.
- Mendoza ME, Martín D, Candelaria PG y Romano MC (1995). Evidence that secretory products of the reticulo-epithelial cells of the rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *J. Reprod. Immunol.* **28**, 203-215.
- Mendoza ME y Romano MC (1989). Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* **14**, 233-242.
- O'Cooner JL, Clary AR y Kellom TA (1988). Superfused pituitary cell cultures: comparative responsiveness of cells derived from various stages of the estrous cycle to LHRH stimulation administered as short duration pulses. *Life Sci.* **42**, 61-72.
- Rebar RW, Miyake A, Low TLK y Goldstein AL (1981). Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* **214**, 669-671.
- Safieh B, Kendall MD, Norman JC, Metreau E, Dardenne M, Bach J-F y Pleau JM (1990). A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *J. Immunol. Meth.* **127**, 255-262.
- Spangelo B (1995). The thymic-endocrine connection. *J. Endocrinol.* **147**, 5-10.

Steinberger A, Chowdhury M y Steinberger E (1973). Effects of repeated replenishment of hypothalamic extract of LH and FSH secretion in monolayer cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **92**, 7-12.

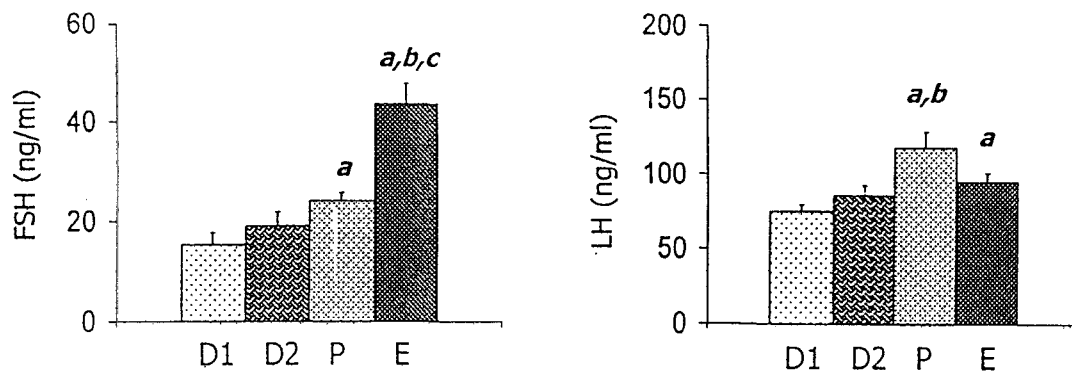
Uzumcu M, Akira S y Lin YC (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Sciences* **51**, 1217-1228.

Schwartz J y Cherny R (1992). Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocrin. Rev.* **13**, 453-475.

Wise T (1998). *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **66**, 129-135.

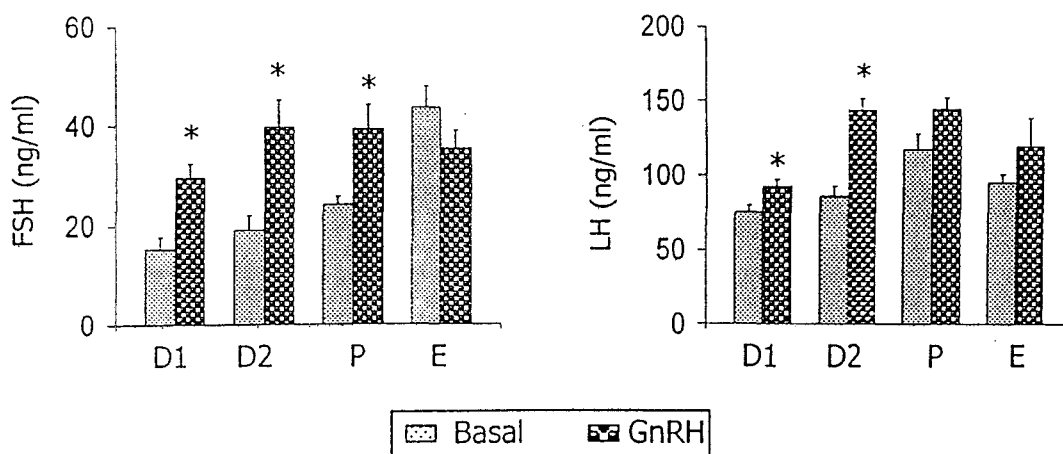
Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **12**, 253-264.

Apoyado por DGAPA-PAPIIT clave IN217301, PAEP claves 101312 y 101313 y CONACyT.



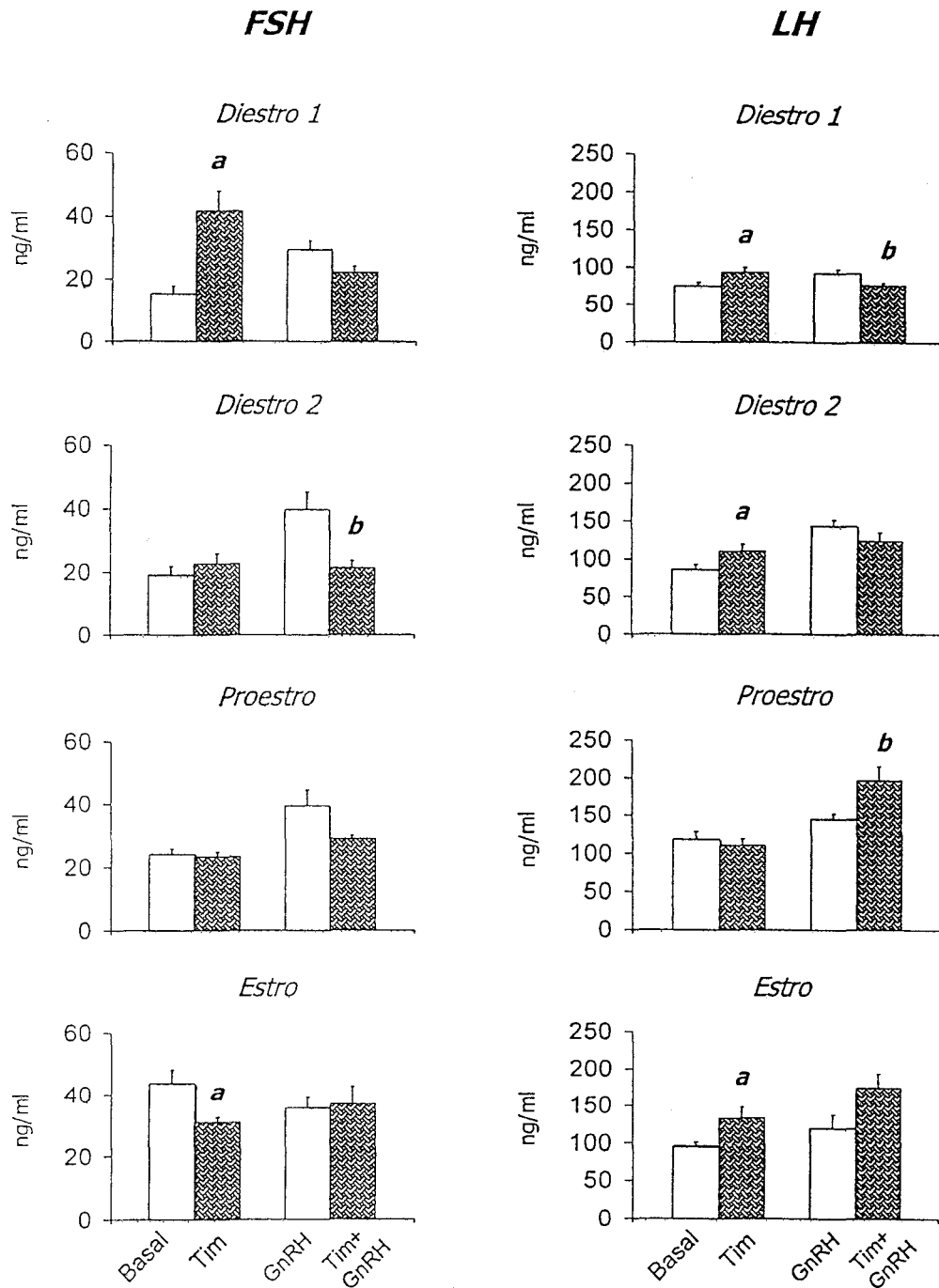
a, $p < 0.05$ vs. D1 *b*, $p < 0.05$ vs. D2 *c*, $p < 0.05$ vs. P

Figura 1. Concentración basal de FSH y LH en el medio de cultivo de las células de adenohipófisis incubadas en suspensión durante una hora y obtenidas de ratas adultas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral (D1, diestro 1; D2, diestro 2; P, proestro; E, estro).



* $p < 0.05$ vs. Basal

Figura 2. Concentración de FSH y LH en el medio de cultivo de las células de adenohipófisis, obtenidas de ratas adultas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral (D1, diestro 1; D2, diestro 2; P, proestro; E, estro) e incubadas en suspensión durante una hora en presencia o no de GnRH (10^{-9} M).



a, $p < 0.05$ vs. Basal *b*, $p < 0.05$ vs. GnRH

Figura 3. Concentración de FSH y LH en el medio de cultivo de las células de adenohipófisis, obtenidas de ratas adultas sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral e incubadas en suspensión durante una hora sin tratamiento (basal) o con GnRH (10^{-9} M) o con 100 ng de timulina (Tim) en presencia o no de GnRH.

PROGRAM
for the
THIRTY-FIFTH ANNUAL
MEETING

of the

SOCIETY FOR THE STUDY
OF REPRODUCTION

Marriott Waterfront Hotel
July 28-31, 2002
Baltimore, Maryland

Biology of Reproduction
Volume 66, Supplement 1

513. PERSISTENT EFFECTS OF PRENATAL TREATMENT WITH ANTI-ANDROGENS ON THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS OF ADULT SPOTTED HYENAS. Ned J Place¹, Kay E Holekamp², Cheryl L Sisk³, Mary L Weldele¹, Elizabeth M Coscia¹, Christine M Drea⁴ and Stephen E Glickman¹. ¹Dept of Psychology, University of California, Berkeley, CA; ²Dept of Zoology, Michigan State University, East Lansing, MI; ³Dept of Psychology, Michigan State University, East Lansing, MI; ⁴Dept of Biological Anthropology, Duke University, Durham, NC.

Prenatal exposure to androgens has been associated with irreversible effects on LH and sex steroid secretion in several species of mammals. Disruptions in LH secretion often render androgenized females oligo-ovulatory or anovulatory in adulthood. Spotted hyenas are an interesting test case of this phenomenon as female fetuses are naturally exposed to high levels of androgens but are reproductively successful in adulthood. Although spotted hyenas suffer reproductive costs associated with virilization of females (e.g. high mortality of first born cubs owing to passage of the fetus through a narrow penis-like clitoris), this species suffers no loss of ovulatory function. To begin to understand how female spotted hyenas escape the negative impact of prenatal androgen exposure on ovulatory function, we experimentally blocked androgens during pregnancy, and then tested the offspring for any long-term effects on LH and sex steroid secretion. We also compared LH secretion patterns between control males and females to determine if any sex differences exist in this species. Adult offspring of either treated (Flutamide ± Finasteride) or untreated mothers underwent a GnRH challenge with subsequent measurement of LH and sex steroids. Secretion of LH appeared to be sexually dimorphic in untreated hyenas, as females had a higher baseline level of LH and a greater response to GnRH than males. Prenatal anti-androgen treatment significantly altered the LH response to GnRH, as treated animals of both sexes showed higher LH peaks than same-sexed controls; treated females also showed a later peak. Plasma E₂ concentration was higher in treated females, whereas T and A4 levels tended to be lower than control females. Prenatal anti-androgen treatment appeared to have long-lasting effects on steroidogenic function of the testes, as treated males had lower mean T levels than control males, despite a two-fold greater LH response to the GnRH challenge. Blocking androgens in utero appears to have persistent effects on LH secretion and gonadal steroidogenesis in the spotted hyena. These sex differences and effects of prenatal anti-androgens on LH secretion suggest that the hypothalamic-pituitary unit of female spotted hyenas is partially masculinized, but apparently without any adverse effects on ovulatory function.

514. ENZYMATIC REMOVAL OF ASPARAGINE-LINKED CARBOHYDRATES FROM DIMER hCG AND RESULTANT BIOACTIVITY. Craig AH Richard¹ and JA DeLoia¹. ¹Dept of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Magee-Women's Research Institute, Pittsburgh, PA.

Human chorionic gonadotropin (hCG) is best known for its critical role in the establishment and maintenance of early pregnancy. The bioactivity of hCG has been attributed to the asparagine-linked carbohydrates on each subunit of hCG, especially the carbohydrate at asparagine 52 on the alpha subunit (asp52). Specific removal of the asparagine-linked carbohydrates from dimer hCG has only been done by site-directed mutagenesis. We therefore utilized endoglycosidases to specifically remove asparagine-linked carbohydrates and examine the resultant bioactivity of the dimer. Different sources of dimer hCG were incubated with various endoglycosidases. HCG was subsequently run on an SDS PAGE gel, proteins were stained and the extent of deglycosylation was evaluated. HCG bioactivity was evaluated on human granulosa-luteal cells in culture. Endoglycosidases were able to cleave asparagine-linked carbohydrates from dimer hCG. The specific removal of asp52 did not alter the bioactivity of dimer hCG. The removal of 70% of all the N-linked carbohydrates from dimer hCG also did not alter the bioactivity of the dimer. The results of these studies demonstrate that the asparagine-linked carbohydrates may not be involved directly in the receptor signaling of hCG.

515. SEX DIFFERENCES IN FSH AND LH SECRETION BY THE PITUITARY TREATED IN VITRO WITH THYMULIN. Lorena Hinojosa¹, Lorena García¹, Ubaldo Quiróz¹, Roberto Chavira², Marta C Romano³, Roberto Domínguez¹ and Patricia Rosas¹. ¹Biology of Reproduction Research Unit, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico; ²INCMN, Mexico; ³CINVESTAV, IPN, México City, Mexico.

There is evidence that the injection of thymulin (T) stimulates the gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice and increase estradiol serum levels in 10-day thymectomized mice. In vitro the thymulin stimulates the secretion of LH by cells of pituitary of male rat. Present study analyzed the effects of thymulin on the FSH and LH secretion by pituitary cells obtained from adult male and female rat preincubated in vitro for 48 hours. The cells were treated for 3 hours with 100 ng of T, Zinc (10⁻⁷ M) or T-Zn and stimulated or not with GnRH (10⁻⁹ M). The medium was recuperated for measure of FSH and LH by radioimmunoassay. The administration of Zn or thymulin to pituitary cells had not effect on the gonadotrophins secretion. In both sex T-Zn stimulated the release of FSH (female: 3.7±0.3 vs. 4.7±0.3 ng/ml; male: 10.4±1.3 vs. 13.4±1.1 ng/ml, p<0.05) and LH (female: 23.2±1.6 vs. 31.5±2.0 ng/ml; male: 23.2±3.1 vs. 33.8±2.1 ng/ml, p<0.05). GnRH treatment to female pituitary cells resulted in an increase in FSH and LH secretion (FSH: 3.7±0.3 vs. 6.8±1.0 ng/ml; LH: 23.2±1.6 vs. 47.8±5.9 ng/ml, p<0.05). Such effects were not observed in the pituitaries of male rats (FSH: 10.4±1.3 vs.

10.8±0.7 ng/ml; LH: 23.2±3.1 vs. 24.5±1.4 ng/ml, NS). T or T-Zn administration to pituitaries of female rats treated with GnRH did not affect FSH (T: 6.8±1.0 vs. 6.5±0.8 ng/ml; T-Zn: 6.8±1.0 vs. 8.3±1.3 ng/ml, NS) and LH (T: 47.8±5.9 vs. 52.4±7.0 ng/ml; T-Zn: 47.8±5.9 vs. 53.9±8.1 ng/ml, NS) secretion. In male pituitary cells, T or T-Zn administration resulted in an increase in FSH (T: 10.8±0.7 vs. 15.5±1.1 ng/ml; T-Zn, 10.8±0.7 vs. 17.5±1.7 ng/ml, $p<0.05$) and LH (T-Zn: 24.5±1.4 vs. 36.9±4.3 ng/ml, $p<0.05$) secretion. Present results suggest that thymulin exert a direct effect on the secretion of FSH and LH from female and male rat pituitaries. However only the pituitary of male increases the response to GnRH treatment. Such differences in gonadotrophins secretion depend on sex of pituitary donor, may be linked to prior in vivo hormonal environment (Supported by DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP-101312 y 101313, CONACyT).

516. FUNCTIONAL DIFFERENCES IN THE GnRH SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS BETWEEN α T3-1 AND L β T2 CELLS. Michael W Wolfe¹, Mark S Roberson² and Gerald B Call¹. ¹Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS; ²Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY.

There are currently two gonadotrope cell models that are used to study GnRH signaling and regulation of gonadotropin gene expression. The two predominant cell lines that are used, α T3-1 and L β T2, were generated by transgenic expression of the SV40 large T antigen. To date, the α T3-1 cell line has been thoroughly characterized and has been used by numerous investigators. Unfortunately, similar characterization of the L β T2 cell line has not been performed. The current study focuses on a single difference that was observed between these two cell lines: the longevity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) activation of the human luteinizing hormone β (hLH β) promoter. We have determined that the hLH β promoter is activated for a longer period of time by a single 15 minute pulse of GnRH in L β T2 than it is in α T3-1 cells. Promoter activation was maximal at 8 hr ($p<0.01$) in α T3-1 cells with a decline to 24 hr. In L β T2 cells, hLH β activity was elevated by GnRH at 4, 8, 12 and 24 hr ($p<0.05$) with maximal activity occurring at 12 and 24 hr. Mutational analysis of critical DNA response elements within the hLH β promoter revealed that the Egr elements are solely responsible for GnRH induction at these extended time points (12 and 24 hours). Analysis of Egr1 protein levels revealed a longer presence of Egr1 in L β T2 than α T3-1 cells. Egr1 was present at 8 hr following stimulation with GnRH in L β T2 cells, but absent at this time point in α T3-1 cells. Constant GnRH appeared to increase (as compared with a 15 min pulse) the amount of Egr1 expression in L β T2, but not α T3-1 cells. Induction of mitogen activated protein kinase (MAPK) activity paralleled the presence of Egr1 in both cell lines. Finally, the elevated long term MAPK activation in L β T2 cells was associated with a lack of MAPK phosphatase-2 and decreased MAPK phosphatase-1 in the L β T2 cells. In conclusion, these data demonstrate that a significant difference(s) exists between the two gonadotrope models in terms of GnRH signaling and subsequent induction of Egr1 and LH β .

517. ESTROGEN INCREASES LACTOTROPH ABUNDANCE AND PROLACTIN mRNA LEVELS IN THE RAT PITUITARY P₀ CELL LINE. Xiaoqin Fu¹ and Tom E Porter¹. ¹Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, MD.

E₂ increases PRL production and lactotroph abundance in the anterior pituitary and in GH₁, GH₃, and GH₄C₁ cell lines. However, >30% of these cells produce PRL without E₂. This high basal level makes studies of lactotroph induction by E₂ difficult. However, E₂ treatment of the P₀ cell line increased the percentage of PRL-secreting cells from <2% to nearly 40% of all cells. It was not determined whether E₂ induced release of stored PRL or whether E₂ affected PRL gene expression in P₀ cells. Moreover, all prior cultures of P₀ cells included 10% untreated horse serum, which likely contained E₂. This study was designed to further define E₂ effects on PRL production in P₀ cells. P₀ cells were grown first in SMEM with 10% charcoal-stripped horse serum (CSHS), 5nM tri-iodothyronine, and 2nM corticosterone. Then, the cells were cultured in SMEM with 5% CSHS with or without E₂. Cells were treated with 10⁻¹⁰ or 10⁻⁸ M E₂ for 4, 24, 48, and 72 hours. PRL containing cells were assessed by immunocytochemistry. Neither concentration of E₂ affected the percentage of lactotrophs after 4 hours. However, after 24 hours, both 10⁻¹⁰ and 10⁻⁸ M E₂ began to increase the percentage of PRL cells ($p<0.05$, n=3 experiments) to 9.8±0.5% and 12.1±0.9%, respectively, relative to the control of 5.3±0.7%. After 72 hours, PRL cells increased to 16.9±0.6% and 17.5±0.9% of all cells, respectively ($p<0.05$, n=3). Next, P₀ cells were treated with 10⁻⁸ M E₂ for 48 and 72 hours. PRL mRNA levels, as determined by Northern blotting, were barely detectable without E₂, but were greatly increased after 48 and 72 hours of E₂ treatment. We conclude that E₂ can increase the abundance of PRL-containing cells and PRL gene expression in P₀ cells after 24 and 48 hours, respectively. Considering the low levels of lactotrophs and PRL mRNA under basal conditions, the P₀ cell line is a good model for studying E₂ effects on PRL production and lactotroph induction.

MEMORIA DEL XLV
CONGRESO NACIONAL
8 al 12 de septiembre de 2002

**SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.**

PROGRAMA GENERAL Y RESÚMENES

UNIVERSIDAD DE COLIMA

Centro Universitario de
Investigaciones Biomédicas

Colima, Col. México, 2002

MODIFICACIONES EN EL CRECIMIENTO DEL FOLÍCULO OVÁRICO DE LA RATA PREPÚBER CON LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ (NDR). Morroy J*, Ayala ME, Chavira R* y Domínguez R. Laboratorio de Pubertad de la UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición, México.

La inervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en neuronas localizadas en los núcleos del rafé. También se acepta que la secreción de las gonadotropinas y las funciones del ovario son reguladas por el sistema serotoninérgico. La inyección de 10 µl de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR de la rata de 30 días edad, bloquea la primera ovulación. Para analizar si la falta de ovulación es el resultado de modificaciones en el crecimiento y la función endócrina del folículo ovárico, se analizaron los efectos de la inyección de ácido ascórbico al 0.05% o la lesión del NDR, producida por la 5,6-DHT sobre la población folicular y las concentraciones sérica de progesterona (P₄) y 17β-estradiol (E₂). Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados ocho, diez o doce días después de realizar la intervención quirúrgica. En los animales sacrificados a los ocho y diez días después de la lesión del NDR, el número total de folículos medidos disminuyó (Ocho: 77.3±9.3 vs. 139.8±8.0; Diez: 72.5±7.0 vs. 103.5±9.8, p<0.05) y se incrementó a los doce días (143.7±10.5 vs. 88.0±11.0, p<0.05). La concentración de P₄ disminuyó en los animales sacrificados a los ocho o doce días después de la lesión (Ocho: 1.5±0.4 vs. 9.9±1.1; Doce: 7.1±0.9 vs. 4.7±0.6, p<0.05). En los animales sacrificados a los diez y doce días la concentración de E₂ en los animales desnervados fue menor que los testigos (Diez: 5.4±0.7 vs. 13.2±2.2; Doce: 15.2±0.8 vs. 25.4±3.4, p<0.05). Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR es esencial en el mantenimiento de los mecanismos neuroendócrinos que regulan las funciones del ovario.

Apoyado por DGAPA IN210500, DGEPE, PUIS y CONACyT.

AFLUENCIA DE LINFOCITOS EN EL ENDOMETRIO DE LA CONEJA, DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE LA GESTACIÓN TEMPRANA Y PSEUDOGESTACIÓN Zamora, H.V*, Villaseñor G.H.*, Anzaldúa, A.S.*, Romano, M. y Pérez-Martínez, M*. Depto. de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM y Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN., México, D.F.

En el contexto de la interacción inmunoendocrina que ocurre en el inicio de la gestación, la progesterona destaca por su papel regulador de diversos procesos tisulares. Con el propósito de evaluar la actividad migratoria de los linfocitos totales en el endometrio de conejas durante la gestación temprana y pseudogestación inducida con hCG se utilizaron conejas Nueva Zelanda gestantes y pseudogestantes (n= 41). En ambos grupos se evaluó la migración de linfocitos al endometrio en los días 1 al 5 y 8 postcoito. Se obtuvieron fragmentos de ambos cuernos uterinos de cada animal que se procesaron por inclusión en parafina para obtener cortes de 6-8µm y se tiñeron con Giemsa para identificar a los linfocitos. Se contaron los linfocitos presentes en 25 campos microscópicos, en la lámina epitelial-lámina propia de tejido conjuntivo con el objetivo 40X y un ocular con retícula micrométrica. El número de linfocitos totales presentes en el endometrio durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación fue menor (P<0.05) con respecto a los valores encontrados en las hembras testigo, no gestantes (NG). En las animales pseudogestantes también hubo un menor número de linfocitos con respecto a las conejas NG, sin embargo la disminución de linfocitos encontrada en los días 1 y 2 fue más evidente que la observada para estos días en las conejas gestantes. En el día 8 se encontró menor número de células que el resto de los demás días. Se concluye que durante los 8 primeros días de la gestación el número de linfocitos presentes en la mucosa uterina disminuye y que en el estado de pseudogestación ocurre un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en la gestación. +Financiado por PAPIIT-UNAM (Proyecto IN 212101).

LOS ESTEROIDES SEXUALES MODULAN LOS EFECTOS DE LA TIMULINA EN LA LIBERACIÓN DE LA FSH Y LH POR LAS CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA HEMBRA. Hinojosa, L.^{1*}, García, L.^{1*}, Chavira, R.^{2*}, Cárdenas, M.^{2*}, Romano, M.C.³, Domínguez, R.¹ y Rosas, P.^{1*}. ¹UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. ²INCMN "Salvador Zubirán". ³Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN. México, D.F., México.

Previamente mostramos que los efectos de la timulina (T) en las células de adenohipófisis (CAHF) de rata modifican la liberación *in vitro* de las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) dependiendo del día del ciclo estral. Por ello en el presente estudio se analizó la participación de los esteroides sexuales en la respuesta de las CAHF a la T, en la liberación de las gonadotropinas. Se utilizaron CAHF de rata hembra, pre-incubadas por 24 h en medio de cultivo con suero lavado. Posteriormente, las células se trataron durante 24 h con progesterona (P₄) [50 ng/ml] o testosterona (TS) [100 pg/ml] o 17β-estradiol (E₂) [100 pg/ml]. Al término de este tiempo, se cambió el medio y se agregó la T (100 ng), en presencia o no de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) [10⁻⁹ M]. Los cultivos se incubaron por tres horas. En el medio se evaluó la concentración de FSH y LH (ng/ml) por RIA. Los resultados se expresan en media±e.m.

Grupo	Testigo	T	GnRH	GnRH+T
FSH	11.4±1.4	11.8±1.4	21.4±3.8 a	30.8±6.5
P ₄	13.0±2.0	22.3±2.4 a	17.9±1.7	20.6±1.7
TS	15.5±3.4	9.4±0.7	13.2±1.4	30.1±6.0 b
E ₂	8.5±0.5	13.9±3.1	29.6±3.4 a	18.2±1.0
LH	58.6±6.1	53.3±3.9	178.7±20.0 a	169.1±18.8
P ₄	47.7±5.0	77.1±10.0 a	98.1±10.4 a	113.2±7.6
TS	59.2±4.0	49.4±3.8	109.3±12.4 a	144.7±6.2 b
E ₂	51.2±3.3	69.8±5.0 a	149.6±21.1 a	135.7±11.8

a, p<0.05 vs. Testigo; b, p<0.05 vs. GnRH

Los resultados muestran que la P₄ y el E₂ modulan los efectos de la T sobre las CAHF no estimuladas, ocasionando una mayor liberación de las gonadotropinas y la TS sólo lo hace al adicionarles GnRH, lo que sugiere que la acción de la timulina sobre los gonadotropos depende de la sensibilidad que les confiere el esteroide y de la presencia de GnRH. Apoyado por DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP 101312, 101313 y CONACyT.

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON PLOMO SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA EN LA RATA ADULTA. Ruiz, M.* (avalado por Morán José Luis), Handal, A.*, Morán, C.* & Gómez, E.* Laboratorio de Investigaciones Biológicas, Instituto de Ciencias, BUAP.

Se ha descrito que el plomo induce alteraciones significativas en la ontogenia y el funcionamiento del sistema reproductor. Con el fin de analizar los efectos de la ingestión crónica de diferentes concentraciones *acetato de plomo* sobre el inicio de la pubertad, el desarrollo folicular y la ovulación, en el presente trabajo de utilizaron ratas hembra adultas de la cepa *C57-ZV* que fueron expuestas a diferentes concentraciones de *acetato de plomo* en el agua de beber durante 90 días, a partir del destete (30 días de edad). Cuatro grupos experimentales recibieron 0.0 (Control), 0.003, 0.03 y 0.6 g/l de *acetato de plomo* disuelto en el agua de beber, respectivamente. Los animales se sacrificaron en la mañana del primer estro vaginal después de los 120 días de edad. A la autopsia se diseccionaron y pesaron los ovarios y el útero, que fueron analizados histológicamente. La concentración de plomo en la sangre fue similar entre los grupos experimentales tratados con 0.003 y 0.03 g/l de *acetato de plomo* (5.8±1.6 vs. 3.4±0.7 µg/dL, n.s.), pero en el grupo tratado con 0.6 g/l, los niveles de plomo fueron significativamente más altos (18.2±2.2 µg/dL vs. las otras concentraciones de acetato de plomo, p<0.001; ANDEVA / Tukey-Kramer). En el grupo tratado con 0.6 g/l de *acetato de plomo* se observó un adelanto de la pubertad respecto a los grupos tratados con bajas concentraciones (0.003 y 0.03 g/l: 55.1±0.9 vs. 0.6 g/l: 49.8±1.6 días, p<0.001; U de Mann-Whitney). El peso de los ovarios y del útero fue similar en todos los grupos. El número de cuerpos lúteos frescos encontrados en los ovarios de los animales tratados con plomo fue significativamente menor, independiente de la concentración a la que fueron expuestos (Control: 10.8±0.8 vs. Acetato de Plomo: 6.2±0.5, p<0.001; U de Mann-Whitney). El porcentaje de atresia en la población folicular en los animales tratados con 0.6 g/l de *acetato de plomo* se incrementó en un 36% comparado con el control. El porcentaje de folículos preantrales sanos disminuyó a medida que se incrementó la concentración de plomo en el agua de beber (Control: 91.7±6.2 vs. 0.003 g/l: 80.8±0.9, 0.03 g/l: 68.7±5.9 y 0.6 g/l: 53.4±13.7). Estos resultados nos permiten sugerir que la intoxicación crónica con plomo inhibe la ovulación al afectar los mecanismos que controlan el desarrollo folicular de los ovarios. La ingestión de plomo a partir del momento del destete induce alteraciones significativas en los mecanismos endocrinos y neuroendocrinos que regulan la pubertad de la rata (Apoyado por FOMES 2000-22-22).

XXXVIII Congresso da
Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis
&
XXI Congresso da Associação
Latino Americana de Ciências
Fisiológicas - ALACF

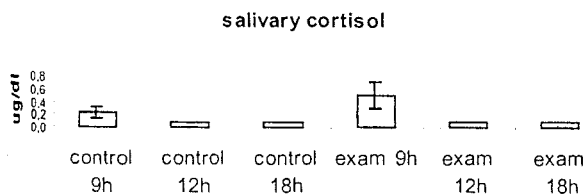
01 a 04 de setembro de 2003
Ribeirão Preto - SP

indicator of the serum levels of this hormone. The use of saliva to measure cortisol avoids the additional stress of blood collection. However, there are controversies regarding the correlation between salivary and serum cortisol levels in situations of acute stress.

Aim: To measure salivary cortisol levels immediately before an exam designed to select students for a graduate course, and to compare these levels with those on another day.

Methods: Three saliva samples were collected from seven students (male and female, ~25 years old) at 9 a.m., 12 a.m. and 6 p.m. on the day of the exam using Salivettes (Nümbrecht, Germany). The exam started at 9 a.m. and lasted 3 h. Samples were also collected on another day in which the subjects were involved in their usual routine tasks. The samples were stored at -20°C until assayed. Salivary cortisol levels were assayed with a commercial kit (DSL-10-67100, Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA). The results were compared using Student's *t*-test, with the level of significance fixed at $p < 0.05$.

Results: Three students showed a 10513% (mean \pm S.D.) increase in their salivary cortisol levels immediately before the exam (at 9 a.m.), but no alteration at 12 a.m. and 6 p.m. on the same day when compared to samples collected another day (Figure 1). Three other students showed no alterations, and in one student the salivary cortisol level decreased on the day of the exam compared to the levels on another day.



Conclusion: Salivary cortisol levels may be useful for detecting acute stress. Subjects who showed no alteration in their salivary cortisol levels on the day of exam may not consider the exam to be a stressor.

Financial support: FAPESP and CAPES

PT 07.023 SERUM LEVELS OF TESTOSTERONE AND CORTISOL IN SOCCER PLAYERS.

García, MC¹; Fernandes, GA²; Grassi-Kassisse, DM¹; Macedo, DV³ & Spadari-Bratfisch, RC¹. 1. Depto Fisiologia e Biofísica, IB, 2. Depto Patologia Clínica, FCM, 3. Depto Bioquímica, IB, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

The physical training may be considered a stressor agent since it is based on the hypothesis that a challenge to the homeostasis would induce adaptation. Being so, it is expected that during a training session the stress hormones serum levels were high but decrease towards basal levels in a short period after the end of the training session when the anabolic hormones would induce the adaptation process. However, if the imposed load was excessive, those levels would remain higher than normal and it may trigger the third

phase of the stress reaction, known as exhaustion, burnout or overtraining. The plasma levels of hormones related to the stress reaction were not measured in soccer players.

Aim: To measure the serum levels of cortisol and testosterone soccer players, during a training period of preparation before competition period.

Methods: Three blood samples were collected from junior soccer players (male, 16-19 year-old) in the beginning, the middle and end of a period of training that lasted almost three months. All samples were collected through venous puncture between 8:00 a.m. to 10:00 a.m., after breakfast, in a resting day in which the subject went to the laboratory for that purpose. The blood was allowed to clot at room temperature; the serum was separated and kept at -20°C until dosages were done. Cortisol and testosterone serum levels were assayed by a commercial kit (Immulite-2000, Diagnostic Products Corp., LA, USA). Data were compared by ANOVA and Tukey test; the level of significance was fixed at $p < 0.05$.

Results: Our data have shown that the basal serum levels of cortisol were 38.9 \pm 3.2; 35.6 \pm 3.2 and 40.9 \pm 4.2 nmol/100 ml at the beginning, the middle and the end of the period of preparation for the championship, respectively. At the same periods the serum levels of testosterone were 1.80 \pm 0.11, 1.93 \pm 0.16 and 1.82 \pm 0.1 nmol/100 ml, and the testosterone/cortisol ratios (TT/Cx100) were 48.4 \pm 3.9, 56.3 \pm 5.1 and 46.8 \pm 3.8. There were no significant differences between the serum levels of cortisol, testosterone or the TT/C ratio between the three analyzed periods.

Conclusion: The physical training program imposed to these athletes did not cause any alteration on the serum levels of the stress hormone cortisol or the anabolic hormone testosterone, therefore we conclude that these soccer players were not chronically stressed.

Financial support: FAPESP and CAPES

PT 07.024 VARIACIONES EN LA CONCENTRACIÓN DE Zn Y TESTOSTERONA A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA. RELACIÓN FUNCIONAL CON TIMULINA EN LA HIPÓFISIS.

Hinojosa L¹, García L¹, Castillo L², Domínguez R¹ y Rosas P¹. ¹UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. ²Laboratorio de Espectroscopia, FES-Zaragoza, UNAM. México DF, México.

La timulina unida a Zn incrementa su vida media y actividad biológica y su liberación es estimulada por la testosterona (T). En células de adenohipófisis de rata hembra pretratadas *in vitro* con T, la timulina incrementa el efecto de la GnRH en la liberación de las gonadotropinas. Objetivo: en ratas cíclicas, analizar si se correlacionan las concentraciones de Zn en el timo y en el suero con las de testosterona. Métodos: ratas Wistar adultas cíclicas se sacrificaron a las 09:00 h de cada día del ciclo estral (D1: diestro 1; D2: diestro 2; P: proestro; E: estro). En suero y timo se midió el contenido de Zn por espectrofotometría de absorción atómica. En el suero se evaluó T por RIA. Resultados: (mediae.e.m.): no se observaron diferencias significativas en la concentración de Zn en suero durante el ciclo estral (promedio: 101826 ng/ml). Tanto la concentración de Zn intratímico (D1: 42.16.9; D2: 51.49.5; P: 75.26.1; E: 21.13.7 ng/mg de tejido fresco, $p < 0.05$) como la de T en el suero (D1: 668; D2: 371115; P: 664181; E: 357 pg/ml, $p < 0.05$),

presentaron un incremento significativo en el día del P. Existe una correlación positiva entre la concentración de Zn y T ($r^2=0.87$, prueba de Pearson). Conclusión: el aumento en las concentraciones de Zn en el tórax y de T en el suero en la mañana del P puede explicar la acción potenciadora que tiene la timulina sobre la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis.

Apoyado por DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP 101312, 101313 y CONACyT.

PT 08 001 OXIDATIVE STRESS DURING REHABILITATION FROM PROTEIN MALNUTRITION ASSOCIATED OR NOT TO EXERCISE IN RATS.

Prada, F.J.A.**¹, Macedo, D.V.¹ e Mello, M.A.R.². ¹Labex, UNICAMP, Campinas e ²Department de Educação Física, UNESP, Rio Claro, SP Brasil.

Objective: Protein malnutrition leads to functional impairment in several organs, which is not fully reversed with nutritional recovery. Physical exercise, in turn, may be a beneficial part of nutritional rehabilitation (Eur. J. Clin. Nutr. 48(suppl)S186-S190, 1994). However, the increased energy demand during exercise may induce oxidative stress. The present study was designed to evaluate biomarkers of oxidative stress in rats submitted or not to exercise during recovery from protein malnutrition. **Methods:** Young male Wistar rats fed a low protein (LP = 6%) diet from weaning (28 days) to 60 day-old and then a normal protein (NP = 17%) diet until 90 day-old were separated into 2 groups: sedentary (SED) and trained (TRA = swimming 1h/day, 5 days/week, from 60 to 90 day-old, with an overload of 5% of b.w.). Rats always fed the NP diet and separated into SED and TRA groups were used as controls. Blood glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) activities as well as plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) were measured as biomarkers of antioxidant system and oxidative damage, respectively. **Results:** Blood CAT was reduced in LP-SED (45%), LP-TRA (75%) and NP-TRA (67%) in relation to the NP-SED group. Blood GR was also reduced LP-SED, LP-TRA and NP-TRA groups (60, 90 and 82% respectively) when compared to the NP-SED group. Plasma TBARs appeared reduced in LP-SED (16%) and LP-TRA (25%) in relation to corresponding controls. Body weight gain was higher (19%) in LP-TRA than in LP-SED rats. **Conclusions:** Although exercise did increase body growth during nutritional rehabilitation, it was not able to overcome the oxidative stress imposed by protein restriction early in life. SUPPORTED by FAPESP and CNPq.

PT 08 002 EFICIÊNCIA MECÂNICA DELTA E A OCORRÊNCIA DO PLATÔ DO CONSUMO DO OXIGÊNIO NA DETECÇÃO DA POTÊNCIA AERÓBIA MÁXIMA

¹POMPEU, F.A.M.S.; ¹GAMA, B.P.; ¹RIBEIRO, P.S. e ²GOMES, P.S.C.

¹Dep. Biociências e Ativ. Física UFRJ e ²Programa de Pós-graduação UGF.

Introdução: O aumento da carga de trabalho sem o concomitante aumento no consumo de oxigênio (platô do VO_2) é considerado como critério referencial na detecção da potência aeróbia máxima (VO_{2max}). Contudo, frequentemente este fenômeno não é observado. Isto em razão da velocidade de protocolo ergométrico ou da aptidão dos sujeitos que produzem diferentes *deficits* de oxigênio a cada estágio.

Objetivo: Estudar a ocorrência do platô do consumo do oxigênio na determinação do VO_{2max} em protocolos com estágio de 1, 3 e min de duração e, sua relação com a eficiência mecânica delta ($D_{1,3}$).

Métodos: Dez voluntários (233 anos e 61,215,4 kg) foram



XXVIII REUNIÓN ANUAL
ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, A.C.

III REUNIÓN
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA, A.C.

Sex differences on the effects of thymulin and GnRH on gonadotropin release by *in vitro* pituitary cells.

L. HINOJOSA¹, L. GARCÍA¹, R. DOMÍNGUEZ¹, M.C. ROMANO²,
P.G. DAMIÁN-MATSUMURA³ AND P. ROSAS¹.

Short title: Thymulin and *in vitro* gonadotropins release

Key words: thymulin, pituitary cells, FSH, LH, GnRH

Abstract. The acute effects of thymulin and GnRH stimulation on FSH and LH release were studied in cultured anterior pituitary cells derived from female and male adult rats. In *in vitro* and *in vivo* conditions, the release of FSH was higher in male than in female rats. No significant difference in the release of LH was observed between *in vivo* cells of both sexes, though, in *in vitro* conditions, female pituitary cells released more LH than male cells did. Neither the addition of thymulin alone, nor of thymulin plus GnRH modified the release of gonadotropins by anterior pituitary cells of female rats. In turn, thymulin and GnRH had a synergic effect on the release of FSH by male pituitary cells. Preincubation of female pituitary cells with steroids did not modify the basal release of gonadotropins. However, pituitary cells primed with progesterone or testosterone showed an inhibitory effect on LH release after stimulation with GnRH. Pituitary cells primed with progesterone and treated with thymulin released more FSH and LH. Preincubation of pituitary cells with testosterone resulted in a synergic effect between thymulin and GnRH on the release of gonadotropins. Preincubation with 17 β -estradiol increased the effects of thymulin on LH release. These data suggest that the release of gonadotropins is mediated by sexual differences, and that thymulin plays a modulating role in the release of gonadotropins; which in turn, depends on the presence of GnRH and sex steroids.

¹Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Neuroimmuno-endocrinology. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, A.P. 9-020. CP 15000, México DF, México. ²Physiology, Biophysics and Neuroscience Department, CINVESTAV, IPN, México DF, México. ³Biology of Reproduction Department, UAM-Iztapalapa, México DF, México.

Introduction

Based on published results of the effects of neonatal or pre-pubertal thymectomy (1, 2), the congenital absence of the thymus (3), and the effects of thymic peptides on pre-pubertal animals (4), it is accepted that the thymus participates in the regulation of the hypothalamic-pituitary-ovary axis.

Thymosins are polypeptide hormones synthesized by the thymus, spleen, liver, kidneys, and central nervous system (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Thymulin, in turn, is a nonapeptide (pyro-Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH), synthesized exclusively by the thymic epithelium, since it is not detected in athymic nude mice (nu/nu), or in thymectomized mice. In both models however, the presence of thymic graft results in the detection of thymulin in serum (12, 13, 14).

According to Rebar *et al.* (15), thymosin β_4 acts on the hypothalamus, increasing GnRH secretion without having a direct effect on the pituitary. The addition of incubation medium of thymus or thymic-reticule epithelial cell cultures to pituitary cells *in vitro* enhanced the GnRH stimulated release of FSH and LH (16, 17). In cultures of pituitary cells obtained from male rats, thymulin stimulates the release of LH in a dose-related way, similarly to the response obtained with GnRH addition (18, 19). Similar results were observed on the secretion of FSH and LH by pituitary cells obtained from female rats (20).

Studies *in vivo* show that injecting equine chorionic gonadotropin (eCG) to 20 days-old mice does not induce ovulation, while thymulin treatment, before eCG injection, resulted in an increase of both, ovulation rate and ovarian weight (4).

When 10 days-old mice are thymectomized, a significant decrease in estrogen levels in serum occurs; while, injecting thymulin immediately after surgery results in normal estrogen levels. In the same model, injecting eCG followed by human chorionic gonadotropin (hCG) injection results in a lower number of ova shed compared to control animals, while injecting thymulin before eCG+hCG stimulation, restores the release of ova to normal rates (2). Studies *in vitro* show that in male and female gonads, thymulin modulates gonadal steroidogenesis (21, 22).

Taken together, up to date reported results suggest that in *in vitro* conditions, thymulin stimulates the release of FSH and LH. However, since published studies have been performed under very different experimental conditions, it is difficult to determine if the effects of thymulin are dependent on the hormonal conditions of each sex. The present study was designed to compare the effects of thymulin on the release of FSH and LH by pituitary-cell cultures obtained from female and male rats. The study was carried out with and without the addition of GnRH. In order to explore the possibility that sex steroids influence the release of gonadotropins induced by thymulin, the release of FSH and LH by female pituitary cells was measured in cultures primed with progesterone (P_4), testosterone (T) and 17β -estradiol (E_2), treated with thymulin and/or GnRH.

Materials and Methods

Animals

Adult female and male Wistar rats (3 months old) were housed under controlled light conditions (light on from 0500 to 1900h) and with free access to food and water. Animals were maintained in accordance with the NIH guide for the care and use of laboratory animals. The animal care committee at the FES Zaragoza has approved the protocols used in this study.

Serum FSH and LH levels

Regular estrous cycle in females was monitored by daily vaginal cytology inspections. Rats in each day of the estrous cycle, that showed at least two four-day cycles, were used. Female and male rats were killed by decapitation between 09:00 and 10:00 h. Blood from the trunk was collected, allowed to coagulate at room temperature for 1 h, and centrifuged at 3000 rpm. The serum was kept at -20 °C until FSH and LH were measured by radioimmunoassay (RIA).

Pituitary cell cultures

Anterior pituitary glands were obtained aseptically from adult female or male rats. From females, pituitary glands were obtained at all stages of the estrus cycle. Procedures for pituitary cell culture preparation were performed according to Steinberger *et al.* (23). Briefly, the glands were dissected, minced, and treated with 0.25% trypsin (1:250; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) in a Ca²⁺ and Mg²⁺ free balanced salt solution, at 37°C for 15 min. Cell dissociation was accomplished by repeatedly passing the tissue fragments through a pipette. Aliquots of 10⁷ cells were seeded in each well of a multi-well culture plate (6 wells, 35 mm well diameter; Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA), containing 1 ml of culture medium D-MEM (GIBCO), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; GIBCO), and 1% (v/v) antibiotics (penicillin 10000 U/ml plus streptomycin 10 mg/ml; GIBCO). Cell cultures were maintained at 37 °C under a water-saturated atmosphere of 5% CO₂/95% air for 48 h, with intermediate changes (24 h and 48 h) of fresh medium. Because Zn increases the half-life and the biological activity of thymulin (24, 25), the concentration of Zn in the FBS was measured in preliminary studies using atomic absorption spectrophotometry, and the results indicate that the FBS has a higher concentration of Zn than the rat serum (2839.5±6.2 vs 1036.7±19.1 ng/ml, p<0.05).

Experimental design

Experiment 1. Anterior pituitary cells' response to the addition of different concentrations of GnRH on the release of gonadotropins.

Pituitary cells of adult female or male rats were preincubated for 48 h

and treated with different concentrations (0 basal, 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M) of GnRH (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA). Incubation was carried out for a 3 h period, after which, the medium was collected and frozen at -20°C , until FSH and LH were measured by RIA.

Experiment 2. Effects of thymulin on basal and GnRH-stimulated release of FSH and LH by adenohipophyseal cells obtained from female or male rats.

Pituitary cells were preincubated for 48 h and treated with 100 ng/ml thymulin (Sigma), 10^{-9} M GnRH, or with thymulin plus GnRH (same concentrations). Incubation was carried out for a 3 h period, after which, the medium was collected for FSH and LH measurement.

Experiment 3. Effects of thymulin on FSH and LH release by female-pituitary cells primed with sex steroids.

After a preincubation period of 24 h, pituitary cells were incubated in a D-MEM medium, supplemented with steroid-free bovine fetal serum. P_4 (50 ng/ml), T (100 pg/ml), or E_2 (100 pg/ml) were added at the highest known concentration during the estrous cycle. Groups of cells without hormone addition were maintained as controls. After 24 h, the medium was changed, and thymulin, GnRH, or thymulin and GnRH were added. Three hours later the medium was collected for FSH and LH measurement.

Radio-immunoassay

FSH and LH levels in the media were determined by the double antibody RIA technique, employing reagents and protocols supplied by the NIADDK National Pituitary Program (Bethesda, MD, USA). Intra- and inter-assay variations were in the order of 5.1% and 6.5% for LH, and 4% and 7.9% for FSH. All samples were assayed in duplicates, with results expressed in terms of NIADDK standards RP-2.

Statistical analysis

Hormone concentrations were analyzed by multivariate analysis of variance (MANOVA), followed by Tukey's test. Differences between two groups were compared by Student's t-test. P values < 0.05 were accepted as significant. All data are expressed as the mean \pm e.e.m. of at least three different experiments, each performed in triplicate.

Results

Serum FSH and LH levels

During each day of the estrous cycle, female rats had consistently lower morning FSH levels in serum, when compared to morning FSH levels of male rats (13.0 ± 0.6 ng/ml vs. diestrus 1: 5.6 ± 0.1 ; diestrus 2: 5.1 ± 0.4 ;

proestrus: 7.5 ± 0.7 ; estrus: 7.1 ± 0.5 ; $p < 0.05$). The morning concentration of LH, in turn, was similar in both sexes (male: 0.6 ± 0.1 ng/ml vs. female: diestrus 1: 0.5 ± 0.1 ; diestrus 2: 0.5 ± 0.0 ; proestrus: 0.7 ± 0.1 ; estrus: 0.6 ± 0.2 , NS).

Anterior pituitary cells' response to the addition of different concentrations of GnRH on the release of gonadotropins.

In cultures of both, male and female cells, the concentration of FSH and LH in the medium collected after 24 h of incubation was consistently higher than in the medium collected after a 48 h incubation period. However, after 24 and 48 h of incubation, pituitary cells obtained from male rats released more FSH than female rat cells did. In turn, after a 24 h incubation period, the pituitary cells from female rats released more LH than male rat cells did. Such difference was not observed when the medium was collected after 48 h of incubation (Table 1).

TABLE 1. FSH and LH release by anterior pituitary cells of female or male rats, incubated for 48 h and recuperate of medium every 24 h.

Groups	FSH (ng/ml)		LH (ng/ml)	
	FEMALE	MALE	FEMALE	MALE
24 h	152.2 ± 6.0	$320.9 \pm 15.5 \#$	373.8 ± 34.5	$275.8 \pm 23.1 \#$
48 h	$18.6 \pm 2.0 *$	$68.4 \pm 6.1 * \#$	$191.2 \pm 13.3 *$	$189.9 \pm 14.7 *$

Values are the mean \pm SEM and represents 3 independent experiments.

* Significantly different from 24 h ($P < 0.05$)

Significantly different from female ($P < 0.05$)

In pituitary cells of both, male and female rats, the highest response to GnRH stimulation on FSH and LH release was observed with a dose of 10^{-8} M (Table 2). Based on these results, all the other experiments were performed using 10^{-9} M GnRH.

TABLE 2. Dose-response curve to GnRH. Anterior pituitary cells of female or male rats were incubated for 3 h with different concentrations of GnRH.

Groups	FSH (ng/ml)		LH (ng/ml)	
	FEMALE	MALE	FEMALE	MALE
Basal	2.6 ± 0.4	5.4 ± 0.1 #	6.5 ± 0.3	8.5 ± 0.3 #
GnRH				
10 ⁻¹² M	6.8 ± 0.7	7.7 ± 0.5	10.8 ± 0.8	8.8 ± 0.6
10 ⁻¹¹ M	5.1 ± 0.6	6.7 ± 0.7	8.4 ± 1.3	8.9 ± 0.6
10 ⁻¹⁰ M	4.3 ± 0.4	5.6 ± 0.4 #	12.6 ± 0.5	9.7 ± 0.5 #
10 ⁻⁹ M	7.7 ± 0.8 *	6.8 ± 0.4	23.0 ± 3.2	8.9 ± 0.5 #
10 ⁻⁸ M	16.8 ± 1.7 *	12.0 ± 1.0 *#	58.9 ± 12.8 *	12.6 ± 0.9 *#
10 ⁻⁷ M	13.7 ± 1.4 *	8.6 ± 0.5 *#	58.3 ± 9.0 *	11.2 ± 0.8 #
10 ⁻⁶ M	12.9 ± 1.4 *	7.2 ± 0.6 #	51.6 ± 7.7 *	11.0 ± 1.0 #

Values are the mean ± SEM and represents 3 independent experiments.

* Significantly different from basal ($P < 0.05$)

Significantly different from female ($P < 0.05$)

Effects of thymulin on basal and GnRH-stimulated release of FSH and LH by adenohypophyseal cells obtained from female or male rats.

A synergic effect between thymulin and GnRH was observed on FSH release by pituitary cell cultures of male rats. In turn, thymulin did not modify the release of FSH by pituitary cells obtained from female rats, while GnRH did. No synergic effect between thymulin and GnRH was observed in female pituitary cells.

The addition of thymulin to cultures did not modify the release of LH in female or male pituitary cells. Stimulation with GnRH resulted in an increase of LH release by female pituitary cells, but not by male cells. Thymulin did not modify this effect (Table 3).

TABLE 3. Effect of thymulin on the basal and stimulated (GnRH, 10^{-9} M) FSH and LH release by anterior pituitary cells of female or male rats. Cells were incubated for 3 h without or with thymulin (100 ng/ml).

Groups	FSH (ng/ml)		LH (ng/ml)	
	FEMALE	MALE	FEMALE	MALE
Basal	3.7 ± 0.3	10.4 ± 1.3 &	23.2 ± 1.6	23.2 ± 1.6
Thymulin	4.0 ± 0.3	8.5 ± 1.1 &	26.7 ± 2.5	21.3 ± 1.6
GnRH	6.8 ± 1.0 *	10.8 ± 0.7 &	47.8 ± 5.9 *	24.5 ± 1.4 &
GnRH+Thymulin	6.5 ± 0.8	15.5 ± 1.1 #&	52.4 ± 7.0	31.1 ± 3.2 &

Values are the mean ± SEM and represents 3 independent experiments.

* Significantly different from basal ($P < 0.05$)

Significantly different from GnRH ($P < 0.05$)

& Significantly different from female ($P < 0.05$)

Effects of thymulin on FSH and LH release by female-pituitary cells primed with sex steroids.

Preincubation of pituitary cells with steroid hormones did not modify the release of FSH or LH. Quite different results were observed when cells preincubated with steroids were stimulated with GnRH. FSH release in E_2 primed cells was not modified by GnRH stimulation. In contrast, the addition of either P_4 or T during preincubation and after GnRH stimulation resulted in a decrease in LH release (Fig. 1).

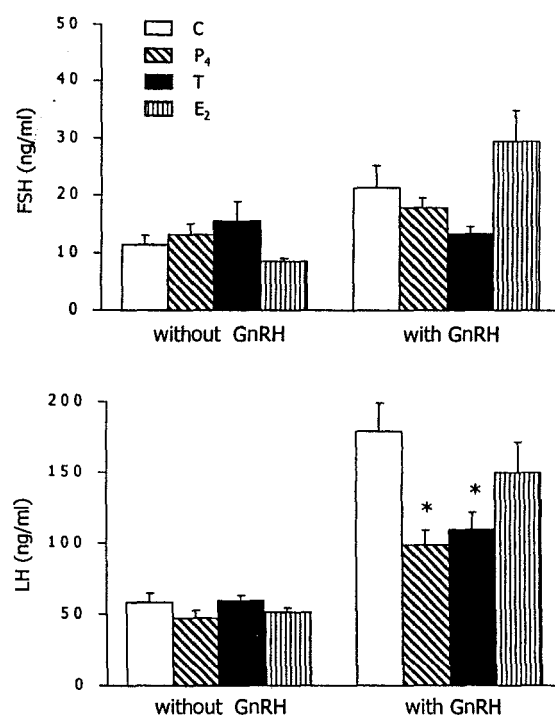


FIG. 1. Effect of steroids on the FSH and LH release by anterior pituitary cells of female rats. Cells were incubated for 24 h in the presence of progesterone [P₄] (50 ng/ml), testosterone [T] (100 pg/ml), 17 β -estradiol [E₂] (100 pg/ml) or without steroids [C: control], then the medium was replaced by another with or without GnRH (10⁻⁹ M), and incubated for 3 h. Each bar represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. C with GnRH.

Preincubation with P₄ followed by thymulin administration, resulted in an increase of FSH and LH release, while preincubation with E₂, followed by thymulin addition, resulted in an increase of LH release only (Fig. 2). In turn, preincubation with T did not modify the effects of thymulin. A synergic effect on FSH and LH release was observed between thymulin and GnRH in cells preincubated with T, while preincubation with P₄ or E₂ had no apparent effects (Fig. 3).

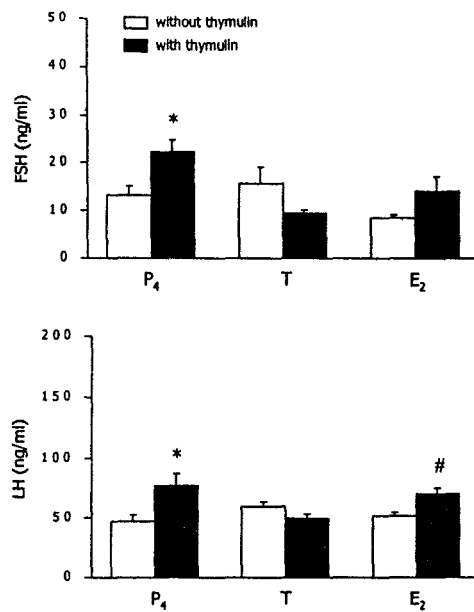


FIG. 2. Effects of thymulin on the FSH and LH release by anterior pituitary cells of female rats. Cells were incubated for 24 h in the presence of progesterone [P₄] (50 ng/ml), testosterone [T] (100 pg/ml) or 17 β -estradiol [E₂] (100 pg/ml), then the medium was replaced by another with or without thymulin (100 ng/ml), and incubated for 3 h. Each bar represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with P₄ alone; # $P < 0.05$ compared with E₂ alone.

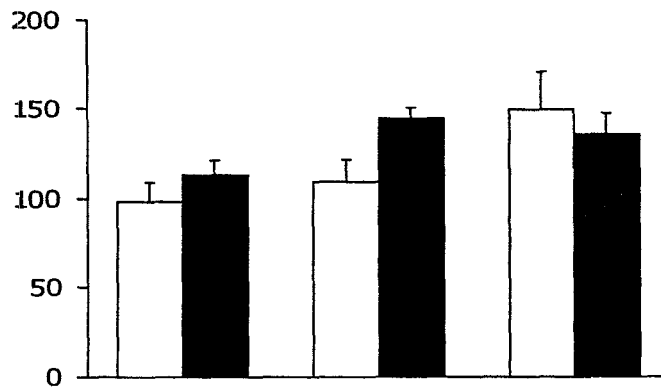


FIG. 3. Effects of thymulin on the FSH and LH release stimulated by GnRH by anterior pituitary cells of female rats. Cells were incubated for 24 h in the presence of progesterone [P₄] (50 ng/ml), testosterone [T] (100 pg/ml) or 17 β -estradiol [E₂] (100 pg/ml), then the medium was replaced by another with GnRH (10⁻⁹ M) or GnRH and thymulin (100 ng/ml), and incubated for 3 h. Each bar represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with GnRH+T.

Discussion

Present results suggest that in cultures of anterior pituitary cells, the release of FSH and LH in response to the presence of GnRH and/or thymulin, depends on the hormonal status of the pituitary donor. Furthermore, the effects of thymulin, on gonadotropins release by pituitary cells of female rats, are steroid dependent.

At present, no explanation is available for the higher concentration of FSH in serum and the release of FSH *in vitro* by pituitary cells of male rats, compared to pituitary cells of cyclic female rats. Elskus *et al.* (26) reported similar results between male and metestrous female rats. These sex differences were not observed in the levels of LH in serum. However, as indicated by present results, sex differences in LH release are present when the pituitary is released from its normal control systems, and is denoted by the higher release of LH by female pituitary cells compared to male cells.

The higher concentrations of FSH and LH observed in the culture medium, compared to the serum of donor animals, could be explained through different non-exclusive ways, such as: the existence of hypothalamic inhibiting factors (27, 28, 29, 30, 31); the lack of gonadal hormones regulating gonadotropes secretion activity (32, 33); or, an intrinsic regulatory system acting through autocrine and paracrine signals (34).

The sex differences in the response of *in vitro* pituitary cells to increasing doses of GnRH, observed in the present study and by Sanders *et al.* (35), suggests that pituitary responses to the hypothalamic hormone depends on the hormonal ambient of the donor. In the present study, thymulin did not modify the basal nor the GnRH stimulated release of LH, however, evidence that in *in-vitro* conditions thymulin stimulates the release of LH by female (20) and male (18) pituitary glands has been reported. Such differences could be related to the amount of thymulin added to the *in vitro* system, and/or be related to the extent of the preincubation period. In addition, there are also great differences in the exposure time to thymulin, as well as in the type of medium used for incubation (18, 20). These factors could plausibly have an effect on LH release, and thus, it is possible that the effects of thymulin depend on some regulatory factors whose effects decrease during the preincubation period. Another possibility is that such modulating factors exist in the fetal serum bovine, which in turn, modulates the effects of thymulin on pituitary cells.

The lack of effects of thymulin on the release of FSH by the pituitary of female rats observed in the present study does not support the observations by Brown *et al.* (20). However, in the anterior pituitary cells of male rats, thymulin has a synergic effect with GnRH on the release of FSH. Such sex differences could reflect a different hormonal medium characteristic between male and female rats donors.

In vitro and *in vivo* studies have shown that depending upon the dosage, duration, and order of administration, the addition of P₄ may stimulate or inhibit gonadotropin secretion (36, 37, 38). The blockade of

P_4 on the GnRH action on LH release observed in this study, support Janovick and Conn's (39) proposition that P_4 desensitize female gonadotropes to GnRH effects.

T also seems to affect the sensibility of gonadotropes to GnRH, since the release of LH by cells preincubated with T and then stimulated with GnRH was lower than the LH release rate of cells treated with GnRH only. Such results agree with Kamel *et al.* (33) and Deneff *et al.* (40).

We observed that preincubation with E_2 did not affect LH release, spontaneous or GnRH induced. Such results disagree with Drouin and Labrie's (37) results, whom described an increase in LH release when cells were preincubated for a 48 h period with E_2 , at higher concentrations (1 nM) than those used in the present study.

The observed increase in gonadotropins release from cells preincubated with P_4 and later with thymulin may indicate an increase in thymulin receptors, triggered by the P_4 treatment. Cells preincubated with T showed a similar effect to the exposure of thymulin and GnRH, resulting in a synergic effect between thymulin and GnRH on gonadotropins release. The effects of thymulin in the anterior pituitary cells of female were similar to those observed in male cells.

Preincubation with E_2 seems to increase the sensitivity of gonadotropes to thymulin, only in terms of LH release. Such results support the idea of differences in the regulatory pathways releasing FSH and LH by the anterior pituitary in cells treated with thymulin.

Taken together, the present results show the existence of sex differences on the basal release of FSH and LH, and on the participation of thymulin on the mechanisms regulating such effects.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the technical assistance expertise of Biol. Carolina Miranda Brito. We would also like to thank Isaías H. Salgado Ugarte PhD. for statistical assessment assistance, to Lourdes Castillo Granada M.S. for the atomic absorption spectrophotometry Zn measurements, and to Alvaro Domínguez González M.S. for the English revision.

Supported by DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP 101312, 101313 and CONACyT.

References

1. Kosiewicz MM, Michael SD 1990 Neonatal thymectomy affects follicle populations before the onset of autoimmune oophoritis in B6A mice. *J Reprod Fert* 88:427-440

2. **García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R, Rosas P** 2000 Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotropin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J Endocrinol* 166:381-387
3. **Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF, Petze JE** 1981 The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 108:120-126
4. **Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R, Rosas P** 1999 Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* 163: 255-260
5. **Goldstein AL, Low TL, Thurman GB, Zatz MM, Hall N, Chen J, Hu S-K, Naylor PB, McClure JE** 1981 Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. *Rec Prog Horm Res* 37:369-415
6. **Dalakas MC, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever JL, Goldstein AL** 1984 Thymosin b_4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. In: Goldstein AL, ed. *Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications*. New York: Plenum Press; 119-125
7. **Horecker BL** 1984 Thymosin b_4 . Distribution and biosynthesis in vertebrate cell and tissues. In: Goldstein AL, ed. *Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications*. New York: Plenum Press; 77-88
8. **Low TLK, Goldstein AL** 1984 Thymosins: structure, function and therapeutic applications. *Thymus* 6:27-42
9. **Uzumcu M, Akira S, Lin YC** 1992 Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cell. *Life Sciences* 51:1217-1228
10. **Hall NRS, O'Grady MP, Menzies RA** 1992 Thymic regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Int J Immunopharmac* 14:353-359
11. **Spangelo BL** 1995 The thymic-endocrine connection. *J Endocrinol* 147:5-10
12. **Bach J-F, Dardenne M, Pleau J-M** 1977 Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* 266:55-57
13. **Dardenne M, Savino W, Gastinel L, Bach J-F** 1984 Thymulin. New biochemical aspects. In: Goldstein AL, ed. *Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications*. New York: Plenum Press; 37-42
14. **Safieh B, Kendall MD, Norman JC, Metreau E, Dardenne M, Bach J-F, Pleau JM** 1990 A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *J Immunol Meth* 127:255-262
15. **Rebar RW, Miyake A, Low TLK, Goldstein AL** 1981 Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214:669-671

16. **Mendoza ME, Romano MC** 1989. Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 14:233-242
17. **Mendoza ME, Martin D, Candelaria PG, Romano MC** 1995 Evidence that secretory products of the reticulo-epithelial cells of the rat thymus modulate the secretion of gonadotrophins by rat pituitary cells in culture. *J Reprod Immunol* 28:203-215
18. **Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT** 1988 The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 12:253-264
19. **Hadley AJ, Rantle CM, Buckingham JC** 1997 Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomod* 4:62-69
20. **Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J-M, Goya RG** 2000 Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol A Biol Sci* 55A:B170-B176
21. **Ledwitz-Rigby F y Scheid PG** 1990 Thymulin (serum thymic factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins *in vitro*. VIII. Ovarian Workshop. Regulatory process and gene expression in the ovary, Maryville, Tennessee, 473-478
22. **Wise T** 1998 *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 66:129-135
23. **Steinberger A, Chrowdhury M, Steinberger E** 1973 Effects of repeated replenishment of hypothalamic extract of LH and FSH secretion in monolayer cultures of rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 92:7-12
24. **Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J** 1982 Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor (FTS). *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5370-5375
25. **Dardenne M, Savino W, Gastinel L y Bach J-F** 1984 Thymulin. New biochemical aspects. In: Goldstein AL, ed. *Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications*. New York: Plenum Press; 37-42
26. **Elskus AA, Phelps AF, Schwartz NB** 1995 Acute sex differences in serum LH levels in gonadectomized rats: investigation of pituitary response to GnRH pulse frequency and prolactin secretion as etiological agents. *Neuroendocrinol* 61:301-309
27. **Hwan JC, Freeman ME** 1987 A physiological role for luteinizing hormone release-inhibiting factor of hypothalamic origin. *Endocrinology* 121:1099-1103
28. **De la Lastra M, Leal J** 1989 [Hypothalamic inhibiting factor of luteinizing hormone secretion: relation to the fragment 1-5 of the LH releasing hormone]. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 22:53-59
29. **Shangold GA, Miller RJ** 1990 Direct neuropeptide Y-induced modulation of gonadotrope intracellular calcium transients and gonadotropin secretion. *Endocrinology* 126:2336-2342

30. **Lux-Lantos V, Rey E, Libertun C** 1992 Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinol* 56:687-693
31. **Lux-Lantos V, Becu-Villalobos D, Bianchi M, Rey-Roldan E, Chamson-Reig A, Pignataro O, Libertun C** 2001 GABA (B) receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinol* 73:334-343
32. **Fallest PC, Schwartz NB** 1991 Acute inhibitory effects of 17 β -estradiol are observed on gonadotropin secretion from perfused pituitary fragments of metestrous, but not proestrous, rats. *Endocrinology* 128:273-279
33. **Kamel F, Balz JA, Kubajak CL, Schneirder VA** 1987 Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1651-1657
34. **Bohnsack BL, Szabo M, Kilen SM, Tam DH, Schwartz NB** 2000 Follistatin suppresses steroid-enhanced follicle-stimulating hormone release *in vitro* in rats. *Biol Reprod* 62:636-641
35. **Sanders FJ, May PB, Donabedian RK** 1975 *In vitro* pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone (LH-RH) in intact and castrated male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 3:71-80
36. **Brown-Grant K, Naftolin F** 1972 Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone. *J Endocrinol* 53:37-46
37. **Drouin J, Labrie F** 1981 Interactions between 17 β -estradiol and progesterone in the control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 108:52-57
38. **Lagacé L, Massicotte J, Labrie F** 1980 Acute stimulatory effects of progesterone on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 106:684-689
39. **Janovick JA, Conn PM** 1996 Progesterone diminishes the sensitivity of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone (LH) release and protects an LH pool from desensitization: actions opposed by cholera toxin. *Endocrinology* 137:1823-1827
40. **Denef C, Hautekeete E, Dewals R, De Wolf A** 1980 Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by androgens in rat pituitary cells in culture: functional diversity of subpopulations separated by unit gravity sedimentation. *Endocrinology* 106:724-729



MEMORIA DEL XLVII
CONGRESO NACIONAL

1 AL 5 DE AGOSTO DEL 2004

**SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS
FISIOLOGICAS, A.C.**

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Instituto de Neuroetología

SEDE: "WORLD TRADE CENTER"
BOCA DEL RIO, VERACRUZ

Veracruz, Ver. México, 2004

C-208

EFFECTOS DEL SULFATO DE ATROPINA EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL DÍA DEL PROESTRO. Palafox, M.T.*, Meléndez, G.*, Rodríguez, J.O.*, Barco, A.I.*, Chavira, R.*, Flores, A.*, Domínguez, R.*, Cruz, M.E.* *FES-Zaragoza ¹INCMN, Salvador Zubirán, México D.F.

En la rata la concentración plasmática de Progesterona (P4), Testosterona (T) y Estradiol (E2) alcanza valores máximos en el día del proestro (P). Para analizar si la secreción de estas hormonas es regulada por el sistema colinérgico, ratas cíclicas en P fueron anestesiadas con éter (13:00 h) y hemiovariectomizadas del lado izquierdo (Hovx-I) o derecho (Hovx-D), adrenalectomizadas (ADX), ADX+Hovx-I, ADX+Hovx-D. Como grupo testigo se utilizaron animales con perforación dorsal unilateral del peritoneo (izquierda (PPI) derecha (PPD)). Otros grupos de animales tratados fueron inyectados (12:00 h) con 100 mg/kg de sulfato de atropina (ATR). Los animales fueron sacrificados a las 14:00 h del P. La cuantificación de las hormonas se realizó por RIA. La concentración T (230.1[±]15.0 vs. 122.8[±]12.2 pg/ml, p<0.05) y E2 (111.1[±]15.3 vs. 58.8[±]8.9 pg/ml, p<0.05) disminuye después de la inyección de ATR a animales con PPI. Este efecto no se observó en ratas con PPD. La inyección con ATR en los Hovx-I resultó en disminución en la concentración de P4 (22.3[±]2.1 vs. 14.5[±]1.5 ng/ml, p<0.05) y T (75.2[±]19.1 vs. 26.0[±]7.1, p<0.05), y en las ratas con Hovx-D de P4 (20.2[±]1.6 vs. 13.0[±]3.0, p<0.05), T (101.0[±]13.1 vs. 38.6[±]7.5, p<0.05) y E2 (142.0[±]14.1 vs. 8.1[±]7.9, p<0.05). La ADX en las ratas con Hovx-I resultó en disminución de T (93.3[±]16.1 vs. 29.8[±]10.0, p<0.05) y E2 (51.2[±]5.2 vs. 30.5[±]5.9, p<0.05) y de P4 (4.8[±]0.9 vs. 1.8[±]0.4, p<0.05) en los con Hovx-D. En estos últimos aumentó el E2 (21.7[±]5.9 vs. 49.7±7.8). Con estos resultados sugerimos que en P el sistema colinérgico regula de manera estimulante la secreción de las tres hormonas. Apoyado por CONACYT: 40300/A-1.

C-209

PROGESTERONE AND ESTRADIOL DECREASE THE INFECTION BY PORCINE RUBULAVIRUS IN CULTURED HYPOTHALAMIC AND HIPOCAMPAL NEURONAL CELLS. Mendoza Magaña, M.L.*, Godoy Martínez, D. V.*, Guerrero Cázarez, H.*, Dueñas Jiménez, J.M., Dueñas Jiménez, S.H., Ramírez Herrera, M.A. *C.U.C.S. Universidad de Guadalajara.

The porcine rubulavirus (PoRv) is the causative agent of the pig blue eye disease. The infection causes fatal neurological alterations in neonatal pigs. Apparently, neuronal membrane sialoglycoproteins act as a receptors, particularly the 120 kDa isoform of NCAM binds the PoRv, its binding is blocked by enzymatic elimination sialylated N-linked oligosaccharide chains. The present report analyzes whether progesterone or estradiol modulate the virus infection in cultured neuronal cells. We used new born pigs to prepare hypothalamic and hippocampal cultures. Cells were incubated in DMEM F-12 medium, with 20% FCS for 48 hours, in subsequent incubations we used modified DMEM F-12 without phenol red and supplemented with B27 mixture. Progesterone (10⁻⁶, -7 and -8 mM) and estradiol (10⁻⁴, -5 and -6 mM) were diluted in ethanol and then added to the growth medium. Cells were exposed for 48 hours and then infected with PoRv. Infected cells were identified with an immunocytochemical method using a polyclonal anti-PoRv, an anti-mouse IgG peroxidase labeled and visualized with DAB. Infected control cells and vehicle control were used for these experiments. Integrated optical density values for each cell were determined using the Image-Pro analyzer. Progesterone (10⁻⁴, -5 and -6 mM) seems to decrease infection signal in neuronal cells. Estradiol moderately decreased the immunocytochemical infection signal. In conclusion: neurosteroids could be able to confer protection for neuronal cells against viral infection, this effects require further experiments to determine whether membrane receptors are modified by esterooids or other mechanisms could be involved to limit the viral infection.

C-210

EFFECTO DEL ESTRES OXIDATIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN NEURONAS DE SUBTANTIA NIGRA DE RATAS EXPUESTAS A OZONO. Angoa Pérez, M.*, Rugerío Vargas, C., Ramírez Escoto, M., Lemini Guzmán, C., Borgonio Pérez, G., Rodríguez Alvarado, M., Rivas Arancibia, S. *Facultad de Medicina, UNAM.

Las especies reactivas de oxígeno producen cambios en la expresión de una variedad de genes implicados en la patogénesis de muchas enfermedades. La existencia de receptores a estrógenos (ER-alfa y ER-beta) en tejido nervioso, se ha relacionado con efectos neuroprotectores que involucran su activación. Existen estudios epidemiológicos que asocian el uso de estrógenos en la postmenopausia con una reducción del riesgo de contraer enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de ER-alfa y ER-beta en sustantia nigra de ratas expuestas repetidamente a bajas dosis de ozono. Se dividieron 30 ratas hembras ovariectomizadas de la cepa Wistar en 3 grupos (n=10). Grupo 1 (control): expuestas a aire libre de ozono. Grupo 2: expuestas a ozono durante 15 días. Grupo 3: expuestas a ozono durante 30 días (la dosis de ozono fue de 0.25 ppm durante 4 h diarias). Se cuantificaron lípidos peroxidados, y se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para ER-alfa y ER-beta contrastadas con Luxol Fast-Blue. Los resultados muestran un aumento en los niveles de lipoperoxidación a los 30 días de exposición a ozono con respecto al grupo control, mientras que a los 15 días no se encontraron diferencias. Por otra parte, el número de células inmunorreactivas a ER-alfa no mostró diferencias con los distintos tratamientos. Sin embargo, las neuronas inmunorreactivas a ER-beta aumentaron a los 15 días de exposición. Con lo anterior podemos concluir que la expresión de receptores ER-alfa en neuronas dopaminérgicas no parece estar relacionada con cambios en el balance redox celular, mientras que los cambios en la expresión de ER-beta indican que estos receptores responden a señales oxidativas.

C-211

PARTICIPACIÓN DE LOS ESTEROIDES SEXUALES EN LOS EFECTOS DE LA TIMULINA SOBRE LA SECRECIÓN IN VITRO DE GONADOTROPINAS EN HIPOFISIS DE RATA MACHO. Ortega Florencio, N.*, Ortega Rodríguez, C.*, Hinojosa Baca, L.*, Chavira Ramírez, R.*, Domínguez Casala, R.*, Rosas Saucedo, P. *UIBR, FES-Zaragoza, UNAM ¹INCMN.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la timulina modifica la liberación de las gonadotropinas en las células de adenohipófisis en cultivo (1). Con el objeto de analizar si los efectos de la timulina sobre la liberación de gonadotropinas están en función de las hormonas sexuales, se utilizaron cultivos en monocapa de células de adenohipófisis de rata macho adulta, preincubadas durante 24 h con progesterona (P4) (50 ng/ml), testosterona (T) (100 pg/ml) o estradiol (E2) (100 pg/ml), al finalizar este tiempo se realizó un cambio de medio y se trataron durante 3 h con timulina (100 ng/ml), GnRH (10⁻⁹M) o GnRH+timulina y sin tratamiento. En el medio de cultivo se evaluaron las concentraciones de FSH y LH por radioinmunoanálisis. Los datos se expresan como media±sem de cuatro experimentos por triplicado. Los resultados mostraron que la adición de timulina a células previamente expuestas a P4 o E2 incrementó la liberación de LH en comparación con los cultivos que únicamente se trataron con los esteroideos (P4: 82.4±7.1 vs 58.8±5.5; E2: 73.5±4.4 vs 54.4±4.4 ng/ml, P<0.05), efecto que no se observó al tratar con GnRH+timulina, independientemente del esteroide utilizado. En la liberación de FSH se observó que sólo en las células pretratadas con E2, la adición de timulina ejerce un efecto inhibitorio sobre la estimulación de GnRH (17.9±1.1 vs 23.3±2.2 ng/ml, P<0.05). En resumen se puede concluir que la timulina tiene un papel dual sobre la secreción de FSH y LH que depende de la presencia de GnRH y de la sensibilidad de los gonadotropos preestablecida por el esteroide. Apoyado por DGAPA-PAPIIT, clave IN217301. 1. Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damian-Matsumura PG and 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 AIBIR. 185-198.