



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA TIMULINA
SOBRE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA
ESTEROIDOGÉNICA DE LOS OVARIOS DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA DE LA LUZ ADRIANA CABRERA PRADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Patricia Rosas Saucedo

COMITÉ TUTOR: Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. Marta Catalina Romano Pardo

MÉXICO, D.F.

Mayo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **CABRERA PRADO MARÍA DE LA LUZ ADRIANA** con número de cuenta **98544026** con la tesis titulada **"Estudio de la participación de la timulina sobre la capacidad de respuesta esteroideogénica de los ovarios del ratón"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO**:

Presidente: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Vocal: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
Secretario: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Suplente: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Suplente: DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de Enero de 2012.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Edif. de Posgrado P. B. (Costado Sur de la Torre II de Humanidades) Ciudad Universitaria C.P. 04510 México, D.F.
Tel. 5623-0173 Fax: 5623-0172 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por darme la oportunidad de ingresar al programa y adquirir conocimientos que enriquecieron mi formación profesional.

Al CONACyT por brindarme el apoyo a través de la beca otorgada con número de becario 225435 y a DGAPA-PAPIIT clave IN228709

Al comité tutor por sus comentarios y aportaciones durante la realización de la tesis:

*Dra. Patricia Rosas Saucedo
Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. Marta C. Romano Pardo*

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios y sugerencias:

*Dr. José Miguel Betancourt Rule
Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. Marta Catalina Romano Pardo
Dra. María Esther Cruz Beltrán*

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas y al laboratorio de Neurofisiología Celular, Instituto de Neurobiología, UNAM, por la asesoría de los cultivos celulares.

Al laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biólogo Roberto Chavira por su colaboración en la cuantificación de hormonas.

A mi tutora la Dra. Patricia Rosas Saucedo por ser el pilar en mi formación profesional.

DEDICATORIA

Gracias Dios por permitirme realizar una de mis metas y rodearme de amigos.

A mis padres, donde quiera que estén sé que les da alegría ver que lo logre.

A mi pequeña Valentina por llegar a transformar mi vida de una forma maravillosa.

A Claus Ortega por brindarme su amistad y consejos.

A la Dra. Paty por su apoyo, enseñanzas y consejos que me han guiado profesional y personalmente.

A Claus Gal y Angy por apoyarme incondicionalmente y acompañarme en momentos difíciles y de alegría.

A todos mis compañeros del laboratorio Natalia, Andrea, Rafa, Bety, Diana, Raúl, Carlos y Alexis.

A mi pequeña Valentina

ÍNDICE	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	1
El ovario	1
<i>Células de la granulosa</i>	5
<i>Esteroidogénesis</i>	6
Relación entre hormonas tímicas y la función reproductora	9
<i>Timo</i>	9
<i>Timulina</i>	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	23
1. Determinación de la dosis efectiva al 50% (DE ₅₀) de la FSH sobre la secreción in vitro de esteroides por las células de la granulosa	23
2. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción basal de progesterona y 17 β -estradiol en el cultivo de células de la granulosa.	26
3. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción de progesterona y 17 β -estradiol estimulada por FSH en el cultivo de células de la granulosa	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

La timulina es una hormona peptídica sintetizada exclusivamente por el epitelio tímico. Su administración en la bursa ovárica de ratones prepúberes tratados con gonadotropinas, modifica la respuesta ovulatoria y las concentraciones de estradiol en suero. Con base en esos antecedentes, en el presente estudio se analizó la participación de la timulina en la regulación de la capacidad esteroidogénica del ovario, utilizando como modelo el cultivo de células de la granulosa del ovario de ratón.

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 de 20 días de edad, inyectados con 5 u.i. de la gonadotropina coriónica equina (eCG), sacrificados a las 48 h. Se extrajeron los ovarios de manera aséptica y se colocaron en medio de cultivo Leibovitz´s L-15. Las células de la granulosa se obtuvieron por punción de los folículos grandes. En cajas de cultivo se sembraron 1×10^5 células/ml de medio DMEM/Ham-F12 suplementado y se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% de CO_2 . Se realizó el cambio de medio por medio fresco y los cultivos se dividieron entre las variables requeridas según el diseño experimental.

A todos los cultivos se les adicionó androstenediona (10^{-7} M) por ser el sustrato para la biosíntesis de 17β -estradiol. En todos los ensayos se contó con un grupo sin tratamiento (secreción basal) y uno con alcohol etílico al 1% por ser el disolvente de la androstenediona. En todos los casos se realizaron tres ensayos por triplicado. En el medio de cultivo se cuantificaron las cantidades de progesterona y 17β -estradiol por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida.

Para determinar la dosis efectiva al 50% (DE_{50}) de la hormona estimulante del folículo (FSH) sobre la secreción *in vitro* de progesterona y 17β -estradiol, los cultivos se incubaron con diferentes concentraciones de FSH (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 ng/ml) por 24 h. La FSH no modificó la secreción de progesterona, mientras que la de 17β -estradiol fue incrementando hasta presentar la máxima respuesta con 60 ng/ml de FSH. Con base a este resultado se consideró 15 ng/ml como la DE_{50} de FSH.

En los cultivos de células de la granulosa incubados por 24 h con concentraciones crecientes de timulina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 ng/ml) la secreción de progesterona se inhibió con la concentración de 1 ng/ml. La administración de 0.001 ng/ml de timulina incrementó significativamente la secreción de 17β -estradiol, mientras que las dosis de 0.1 ó 1 ng/ml la inhibieron.

La incubación de las células de la granulosa con 15 ng/ml de FSH y 0.1 ng/ml de timulina estimuló la secreción de progesterona y la co-incubación de FSH y 0.001 ó 0.1 ng/ml de timulina incrementó la secreción de 17β -estradiol.

Los resultados muestran que la timulina participa en los mecanismos de regulación de la secreción de las hormonas esteroideas por las células de la granulosa de los ovarios de ratón. En ausencia de FSH la timulina inhibe la

secreción de progesterona y tiene un efecto dual sobre la secreción de 17β -estradiol. En presencia de FSH estimula la secreción tanto de progesterona como de 17β -estradiol.

Abstract

Thymulin is a peptide synthesized exclusively by thymic epithelium. Its injection into the ovarian bursa of prepubertal mice treated with gonadotropins, modifies the ovulatory response and estradiol serum levels. Based in these results, in present study, we analyzed the possibility that thymulin modulates the ovarian steroidogenic capacity. Such hypothesis was tested by analyzing the effects of thymulin in the in vitro mouse ovarian granulosa cells model.

Prepubertal 20-day old female mice of the CD1 strain, were injected with 5 i.u. of equine chorionic gonadotropin (eCG) and sacrificed 48 h later. The ovaries were aseptically removed, and placed in medium Leibovitz's L-15; the granulosa cells in the large follicles were obtained by puncture; 1×10^5 cells/ml of DMEM/Ham-F12 supplemented medium were planted in culture wells and incubated at 37 °C, under a water-saturated atmosphere, gassed with 95% air and 5% CO₂ for 24 h. The medium was changed by a fresh one and the harvested cells crop in new wells.

Androstenedione (10^{-7} M) used as substrate for the biosynthesis of 17 β -estradiol, was added to the wells. In all trials a group without treatment (basal secretion) and one with 1% ethyl alcohol as solvent of androstenedione, were included. In all cases, three assays were conducted in triplicate. The 17 β -estradiol and progesterone amounts were measured in the culture medium by Radioimmunoassay (RIA) of solid phase.

The 50% (ED₅₀) effective dose of follicle stimulating hormone (FSH) on progesterone and 17 β -estradiol secretion, was determined by incubating granulosa cells with different concentrations of FSH (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 ng/ml) for 24 h. Progesterone secretion was not modified, while 17 β -estradiol secretion was increasing to make the maximum response with 60 ng/ml of FSH. The 15 ng/ml of FSH was considered as the ED₅₀.

In granulosa cells incubated for 24 h with increasing concentrations of thymulin (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 ng/ml), progesterone secretion was inhibited with 1 ng/ml. The administration of 0.001 ng/ml of thymulin significantly increased secretion of 17 β -estradiol, while doses of 0.1 or 1 ng/ml inhibited.

The incubation of the granulosa cells with 15 ng/ml of FSH and 0.1 ng/ml of thymulin increased the concentration of progesterone and the co-incubation of FSH with 0.1 or 0.001 ng/ml of thymulin increased secretion of 17 β -estradiol.

The results show that the thymulin participates in the mechanisms regulating steroid hormones secretion by mouse granulosa cells. Thymulin has a dual effect on the secretion of steroid and in presence of FSH modulates in a stimulatory way the 17 β -estradiol and progesterone secretion.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, las funciones del ovario dependen de la comunicación eficiente entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico. Interactuando en esta red de comunicación se encuentra el timo, mismo que por intermedio de las hormonas que sintetiza, participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

El ovario

Los ovarios son responsables de la producción de ovocitos y síntesis de hormonas necesarias en la regulación de la reproducción (Yao y Bahr, 1999). Estas funciones son reguladas por las hormonas secretadas por la hipófisis, las adrenales, la tiroides y el timo (Domínguez, 1997).

La estructura del ovario consiste de corteza, médula e hilio. La corteza se compone de un estroma de tejido conectivo donde se localizan los folículos ováricos (compartimento folicular), a partir de los cuales se originan los ríonectivo y gran cantidad de capilares. El hilio está conformado por la arteria y vena ovárica, vías linfáticas, fibras nerviosas y células intersticiales (Sánchez, 1999; Wong y Adashi, 1999; Geneser, 2000).

En el compartimento folicular suceden una serie de cambios morfológicos y estructurales que conducen a la transformación de folículos primordiales hasta folículos maduros altamente diferenciados. Los folículos primordiales están constituidos por un ovocito y una capa circundante de células epiteliales aplanadas denominadas células foliculares, precursoras de las células de la granulosa (Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001). La maduración del folículo primordial implica la transformación a folículo primario. Durante este proceso de maduración, el ovocito aumenta de tamaño y las células aplanadas crecen y adquieren una forma cúbica y luego cilíndrica, además de un aspecto granular y

es entonces cuando reciben el nombre de células de la granulosa (Geneser, 2000).

Durante el crecimiento del ovocito se forma una gruesa cubierta refringente, llamada zona pelúcida, que separa al ovocito de las células de la granulosa circundantes. La zona pelúcida está compuesta por varias glicoproteínas secretadas por el ovocito y mucopolisacáridos provenientes de las células de la granulosa. Conforme transcurre el crecimiento, las células del estroma circundante se distribuyen alrededor del folículo y forman las células de la teca (Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001).

Cuando las células de la granulosa del folículo primario proliferan y forman numerosos estratos de células cuboides, se constituye el folículo secundario. Entre las capas de células de la granulosa aparecen zonas irregulares llenas de líquido que aumentan de tamaño y se fusionan en una cavidad denominada antro folicular (Geneser, 2000). El líquido folicular se origina principalmente por la acumulación de los productos de secreción de las células de la granulosa y en menor proporción, por los de las células tecointersticiales y el torrente sanguíneo, (proteínas, polipéptidos, estrógenos, gonadotropinas, gonadocrininas, neurotransmisores y factores de crecimiento) (Domínguez y cols., 1991; Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001). Gradualmente el ovocito adopta una posición excéntrica, rodeado por células de la granulosa que conforman el *cumulus oophorus* (Geneser, 2000).

Simultáneamente, las células de la teca se diferencian en una capa interna y externa. Las células de la teca interna son células poliédricas epiteloideas con núcleos redondos, las cuales van generando receptores a la hormona luteinizante (LH), capacidad de biosíntesis de esteroides y una gran vascularización por el ingreso de vasos sanguíneos. Las células de la teca externa conservan forma ahusada y se localizan a la periferia del estroma ovárico (Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001) (Fig. 1).

Se denomina folículo maduro o preovulatorio cuando éste alcanza su tamaño máximo. Poco antes de la ovulación se forma una elevación en la superficie del ovario, se liberan las células de la parte basal del *cumulus oophorus* y el ovocito fluye libremente en el líquido folicular rodeado de células de la granulosa orientadas radialmente, por lo que se le llama corona radiada (Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001).

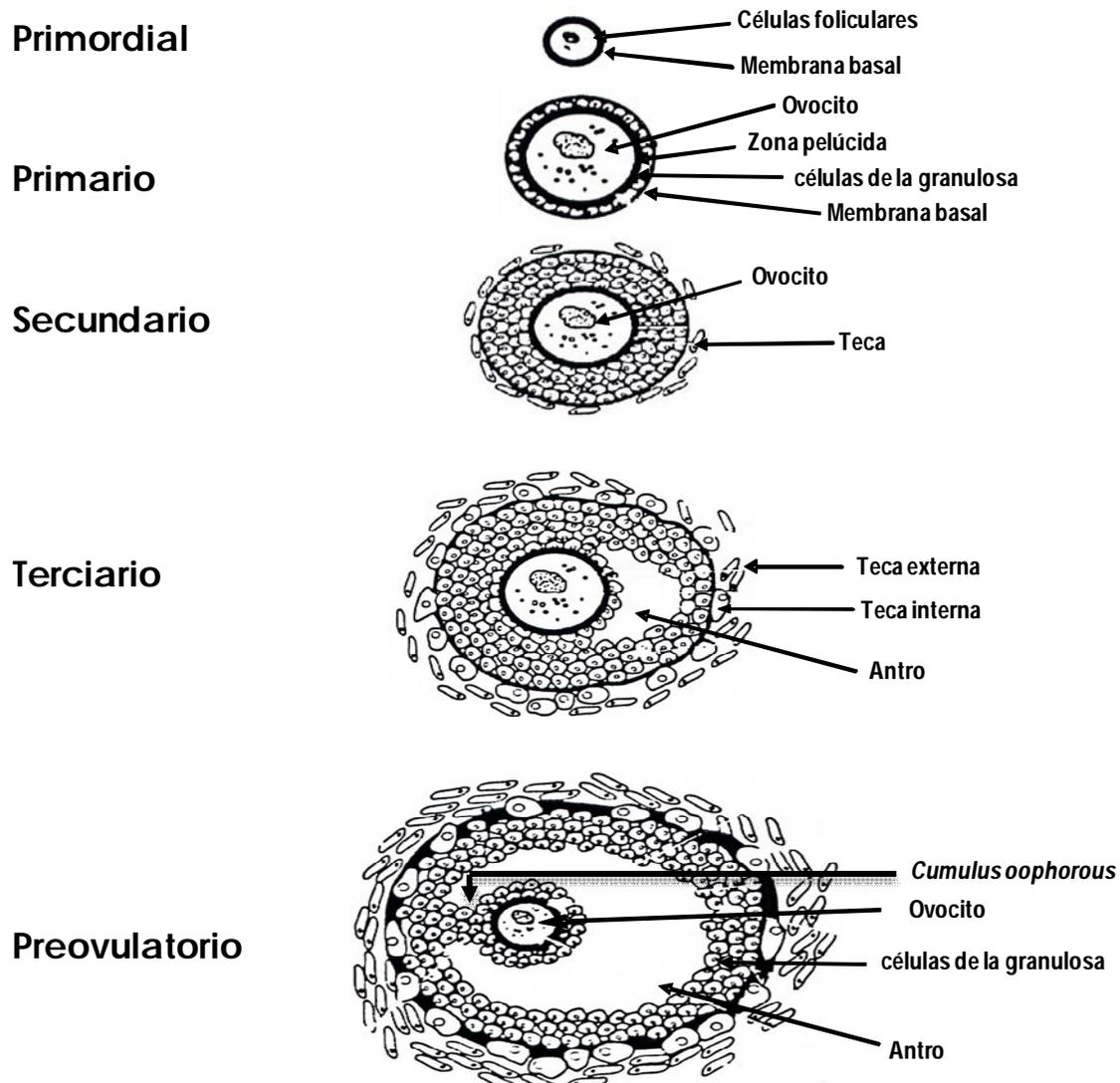


Fig. 1. Esquema que muestra el crecimiento del folículo ovárico. Modificado de Greenwald y Roy, 1994.

El compartimento luteal se forma como consecuencia de la ovulación, cuando el ovocito es expulsado junto con el líquido folicular, el folículo se colapsa y se forman pliegues en la pared, resultado de la contracción de la teca externa y se llena de un líquido rico en fibrina. Se degrada la membrana basal que rodea las células de la granulosa y la capa no vascularizada de estas células es invadida por tejido conectivo vascularizado. Las células de la granulosa y de la teca interna crecen hasta triplicar su tamaño y se transforman en grandes células poliédricas llamadas células luteínicas de la granulosa y células luteínicas de la teca. Dicha transformación se denomina luteinización y es causada por la LH, además de que estimula la secreción de progesterona y en menor proporción la de estrógenos (Geneser, 2000; Yeh y Adashi, 2001).

En el estroma del ovario se encuentran grupos aislados de células epiteloideas con aspecto granular denominadas células intersticiales. Se distinguen cuatro clases de estas células, que se clasifican por sus características y posición en el ovario en primarias, tecales, secundarias e hiliares. En el humano, las primarias aparecen a las doce semanas de gestación y desaparecen ocho semanas más tarde. Las células tecales emigran hacia la membrana basal del folículo cuando el ovocito está rodeado por 2 ó 3 capas de células de la granulosa, se disponen en bandas para formar, tras su diferenciación la teca interna y externa. Cuando no ocurre la ovulación en el folículo, las células intersticiales tecales se transforman en células intersticiales secundarias, las cuales mantienen la actividad esteroidogénica y reciben inervación noradrenérgica. Las células intersticiales hiliares constituyen el hilio ovárico y tienen capacidad esteroideogénica (Sánchez, 1999; Yeh y Adashi, 2001).

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

El inicio de la atresia folicular parece estar determinado por alteraciones del ovocito, el cual pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Esta alteración es seguida por modificaciones de las células de la granulosa, como pérdida gradual de los receptores a la hormona estimulante del folículo (FSH) y LH, lo que se traduce en disminución de las concentraciones de estrógenos y progesterona y elevadas concentraciones de androstenediona, testosterona y dihidrotestosterona. La pérdida de receptores a gonadotropinas y los cambios que continúan, son fundamentales en el proceso de atresia, dado que la capacidad del folículo para mantener la síntesis de estrógenos es primordial para evitarla (Domínguez y cols., 1991; Greenwald y Roy, 1994).

Células de la granulosa

Las células de la granulosa tienen gran capacidad proliferativa y alto grado de cambios estructurales claves en la maduración del folículo. La diferenciación morfológica ocurre en respuesta a estímulos endocrinos y paracrinos, la cual comienza poco antes de que los folículos inicien el crecimiento (Wong y Adashi, 1999; Yeh y Adashi, 2001).

Las células de la granulosa están estratificadas de tal manera que, conforme el folículo va creciendo se distinguen tres poblaciones: la mural (células que están en contacto con la membrana basal), la antral (células que están más cerca de la cavidad antral) y el *cumulus* (células que rodean al ovocito). Las células murales son consideradas las de mayor capacidad de síntesis de esteroides, con altas concentraciones intracelulares de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y citocromo P₄₅₀aromatasa, además de poseer un gran número de receptores a LH, características que las diferencian de las células antrales y del *cumulus*. En las células del *cumulus* se ha mostrado la ausencia de actividad de citocromo P₄₅₀, lo que sugiere nula actividad aromatasa, además de presentar menor número de receptores a LH y por ende, disminución en la capacidad de respuesta a LH en comparación con las células murales. Durante la ovulación, las células del *cumulus* salen junto con el ovocito, el resto

se transforman en células granulosa-luteales para dar lugar al cuerpo lúteo (Yeh y Adashi, 2001).

Las células de la granulosa tienen un papel vital en la esteroidogénesis y crean las condiciones necesarias para la ovulación, fertilización e implantación. Altas concentraciones de progesterona y estrógenos son necesarias en la implantación del blastocisto, ambos esteroides tienen un efecto mitogénico y promueven la expresión de factores de crecimiento y citocinas en el endometrio (Carson, 1999).

Esteroidogénesis

Las células de la granulosa, en cooperación con las células de la teca estimuladas por la FSH y la LH respectivamente, participan en la biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario, cuyo sustrato es el colesterol, mismo que se obtiene de varias fuentes, entre ellas las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del plasma sanguíneo, el almacenado en las células esteroidogénicas como colesterol libre o en forma de ésteres y el que proviene de la síntesis *de novo* a partir del acetato (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1999; Hinshelwood, 1999; Ing, 1999; O'Malley y Strott, 2001).

El colesterol más utilizado en la síntesis de hormonas esteroides deriva de las lipoproteínas séricas, éstas se unen a receptores de membrana y el complejo lipoproteína-receptor ingresa a la célula por endocitosis. Las vesículas endocíticas se fusionan con los lisosomas, en los que se hidrolizan los ésteres del colesterol y originan colesterol libre. Este es reesterificado y almacenado en el citoplasma en gotas lipídicas. Cuando se necesita colesterol, los ésteres son hidrolizados y posteriormente con ayuda de la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) son transportados al interior de la membrana de la mitocondria (O'Malley y Strott, 2001; Yeh y Adashi, 2001).

La etapa inicial en la biosíntesis de esteroides es la conversión del colesterol a pregnenolona, la cual se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria de las células de la teca, donde se localiza el complejo enzimático citocromo P₄₅₀SCC (Brown, 1999; O'Malley y Strott, 2001). La pregnenolona sigue dos rutas biosintéticas para la producción de andrógenos, la Δ^4 , 3-cetona (Δ^4 , 3Ceto) y la Δ^5 , 3 β -hidroxi (Δ^5 , 3 β -OH). La primera es la oxidación de la pregnenolona, catalizada por la enzima 3 β -HSD que da como producto la progesterona. La progesterona por la participación de la 17 α -hidroxilasa es transformada en 17-hidroxiprogesterona que, por la acción de la enzima C₁₇₋₂₀ liasa, lleva a la formación de la androstenediona, la que a su vez por intermedio de la 17 β -HSD la convierte en testosterona. En la vía Δ^5 , 3 β -OH la pregnenolona, por efecto de la 17 α -hidroxilasa resulta en la producción de la 17-hidroxipregnenolona, la que a su vez es transformada por la enzima C₁₇₋₂₀ liasa en dehidroepiandrosterona, que por la acción de la 3 β -HSD se transforma en androstenediona. La transformación de pregnenolona y progesterona a andrógenos ocurre en el retículo endoplásmico (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1999; Hinshelwood, 1999; Ing, 1999; O'Malley y Strott, 2001) (Fig. 2).

Los andrógenos (testosterona y androstenediona) salen de las células de la teca, atraviesan la membrana basal y entran a las células de la granulosa. Ahí por estímulo de la FSH se incrementa la actividad del complejo enzimático P₄₅₀aromatasa que provoca que la androstenediona se convierta en estrona y la testosterona en 17 β -estradiol. Finalmente estos estrógenos se vierten al antro folicular y a la circulación sanguínea (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Brown, 1999; Hinshelwood, 1999; Ing, 1999; O' Malley y Strott, 2001).

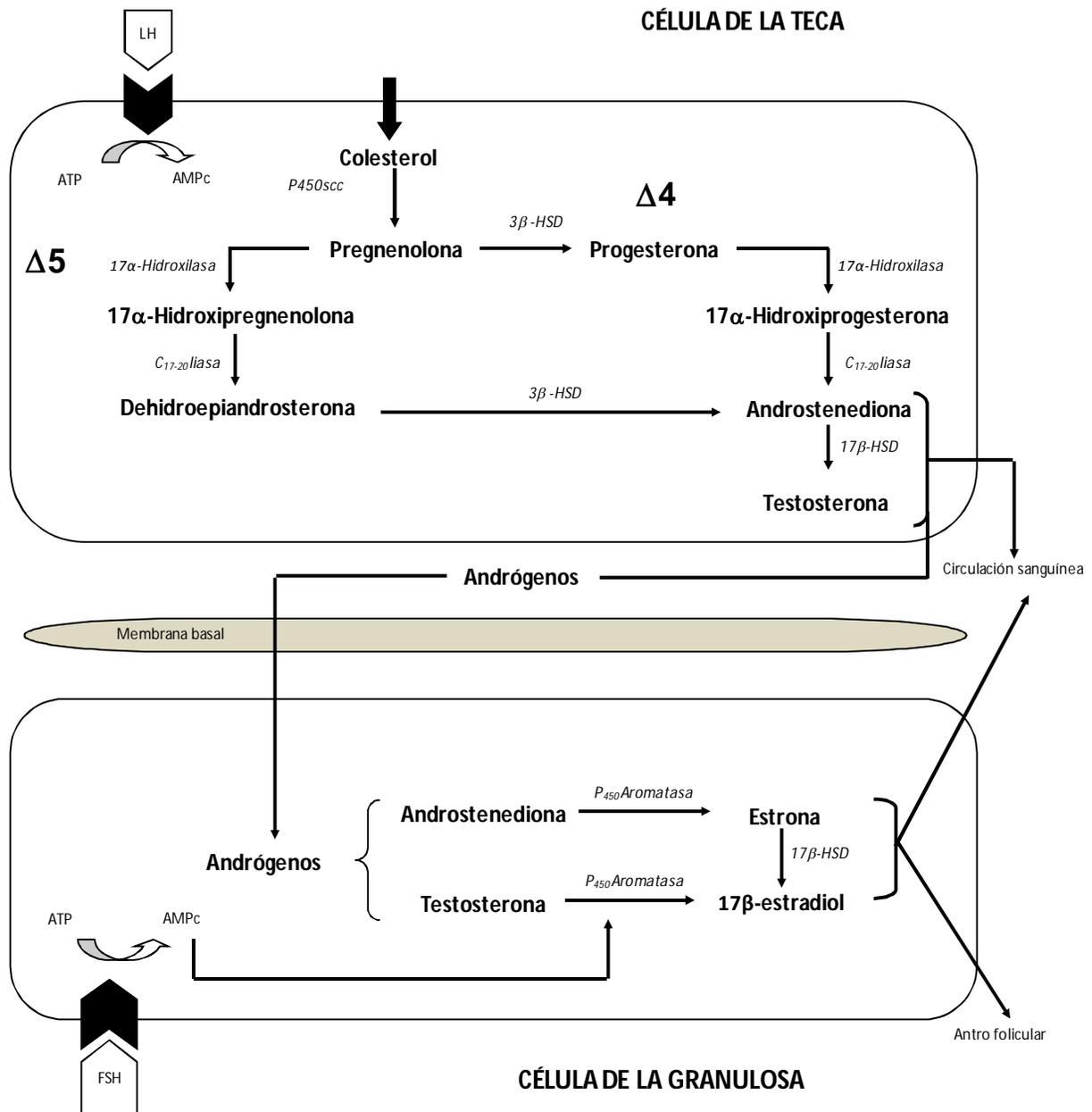


Fig. 2. Esquema que muestra la biosíntesis de hormonas esteroides por las células de la granulosa y la teca. Hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994.

Las gonadotropinas son hormonas clave en la regulación del crecimiento y diferenciación del folículo y la esteroidogénesis; su capacidad para modular las funciones del ovario está en función de su concentración y de la expresión de sus receptores. Esta última es regulada por varios factores y hormonas como: factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I), activina, inhibina, FSH y estradiol (Minegishi, 2004; Rozell y cols., 2009). En las células de la granulosa la expresión de la aromatasas es estimulada por la FSH, dicho efecto es potenciado por los andrógenos, IGF-I y estradiol (Stocco, 2009).

Relación entre hormonas tóxicas y la función reproductora

Timo

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

La matriz del timo está formada por células epiteliales dispuestas en forma de red (retículo-epiteliales), en cuyos espacios se depositan los linfocitos. En la parte periférica de cada lobulillo se encuentra gran cantidad de linfocitos, a esta zona se le denomina corteza. En la parte central se encuentra la médula que presenta una mayor densidad de células retículo-epiteliales, donde se encuentran pequeños grupos de células epiteliales distribuidas de manera concéntrica llamados corpúsculos de Hassall (Fawcett, 1995; Geneser, 2000) (Fig. 3).

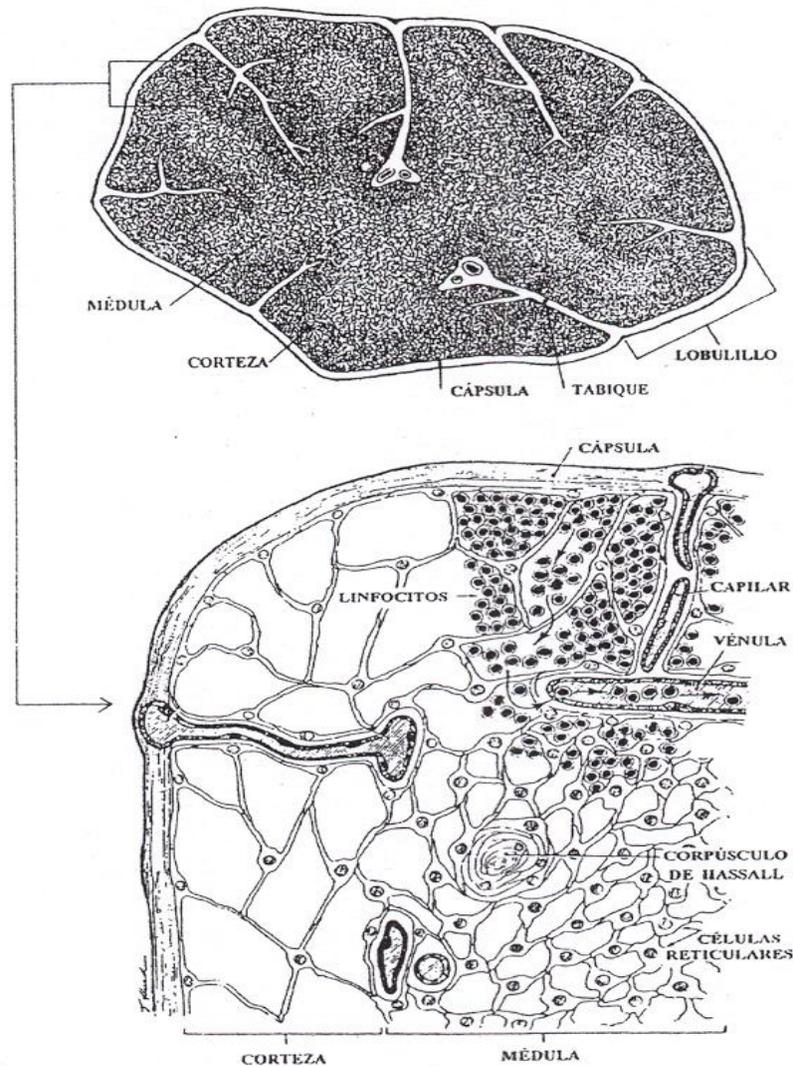


Fig. 3. Esquema que muestra la histología del timo y su organización cortico-medular. Tomado de Bellanti, 1986.

Con la edad el timo presenta un proceso morfo-fisiológico de involución, en el cual disminuye la proliferación de linfocitos e incrementa la tasa de recambio linfocítica (son más los linfocitos inmunocompetentes que salen a la circulación que los que proliferan), lo que lleva a la disminución del volumen cortical. De manera gradual se reemplaza el espacio que ocupaban los linfocitos corticales por tejido adiposo (Fawcett, 1995; Geneser, 2000; Ross y cols., 2007) (Fig. 4).

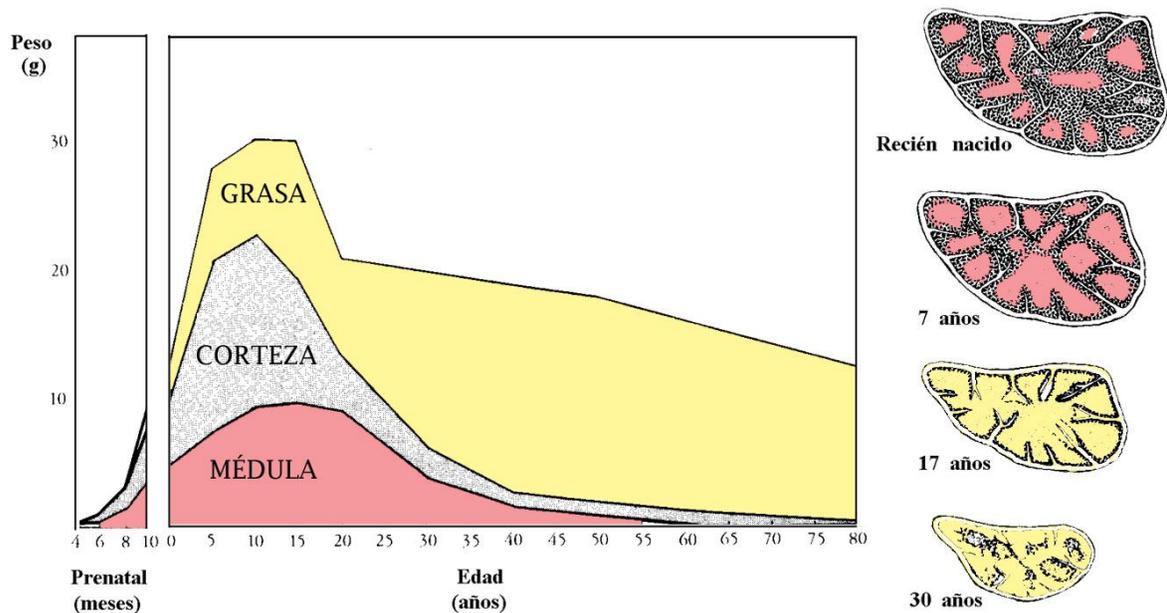


Fig. 4. Esquema que muestra los cambios de peso y composición del timo en humanos durante el proceso de involución. Tomado de Bellanti, 1986.

Estudios de inmunohistoquímica muestran que las hormonas tímicas son producidas por las células epiteliales y están involucradas en la diferenciación y maduración de los linfocitos T inmunocompetentes (Dardenne y cols., 1986). A estas hormonas se les ha llamado timosinas, constituidas por: timosina fracción 5 (TF-5), timosina α_1 , timosina β_4 , factor tímico humoral (THF), timopoyetina II (TP), factor tímico X (TFX) y timulina o factor tímico del suero (FTS) (Goldstein y cols., 1981). No obstante que la función glandular decrece, las células retículo-epiteliales continúan sintetizando péptidos aún en la vejez (Consolini y cols., 2000; Geneser, 2000).

Estudios *in vitro* muestran que algunas timosinas regulan las funciones del sistema reproductor de la hembra. Rebar (1984) utilizó un sistema de perfusión de hipotálamo e hipófisis de rata y observó que la TF-5 y la timosina β_4 inducen la secreción de la GnRH y por ende la de gonadotropinas. En células de la granulosa de ovarios de rata, la adición del medio de cultivo de células retículo-epiteliales del timo, incrementa la secreción de estradiol y progesterona tanto basal como estimulada por FSH, así como la actividad de la aromatasa (Uzumcu y cols., 1992; Uzunmcu y Lin, 1994).

Algunas de estas timosinas son secretadas también por los riñones, bazo, hígado, pulmón y aún en el SNC, excepto la timulina cuya síntesis se lleva a cabo sólo en el timo (Savino y cols., 1982; Dalakas y cols., 1984; Horecker, 1984).

Timulina

La timulina es un nonapéptido cuya secuencia de aminoácidos es pyro-Glu¹-Ala²-Lys³-Ser⁴-Gln⁵-Gly⁶-Gly⁷-Ser⁸-Asn⁹-OH y participa en la regulación de la diferenciación y maduración de los linfocitos T (Bach y cols., 1977). Estudios realizados con anticuerpos monoclonales anti-timulina muestran que la timulina está presente únicamente en las células epiteliales del timo. Esta hormona tímica no es detectada en el suero de ratones congénitamente atímicos nu/un y en ratones timectomizados desaparece de la circulación después de la operación (Dardenne y Bach, 1981; Savino y cols., 1982).

La timulina necesita unirse con el Zn^{+2} para que tenga actividad biológica; estudios de resonancia magnética mostraron que forma complejos 1:1 y 1:2. En el complejo 1:2 una molécula de Zn^{+2} está unida a dos moléculas de timulina y el enlace se presenta en el -OH de la Ser⁴ y el -COO⁻ de la Asn⁹. En el complejo 1:1 una molécula de Zn^{+2} se une a una molécula de timulina y el enlace se presenta en -OH de Ser^{4,8} y -COO⁻ de Asn⁹ (Cung y cols., 1988).

En linfocitos T se han descrito dos tipos de receptores a 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 8×10^5 receptores por célula (Pléau y cols., 1980).

En el suero humano, la timulina se ha detectado al nacimiento; su concentración va en aumento con la edad hasta alcanzar su máximo entre los cinco y diez años de edad. En la adolescencia la concentración de timulina comienza a disminuir gradualmente; a los 36 años es baja pero se mantiene estable hasta los 80 años de edad (Consolini y cols., 2000) (Fig. 5). En el suero obtenido del cordón umbilical de niños recién nacidos se han cuantificado 2,191 fg/ml de timulina, en el suero de varones de 20 años de edad, se han registrado 1,499 fg/ml de timulina y en adultos entre 21 y 65 años 371 fg/ml (Safieh y cols., 1990).

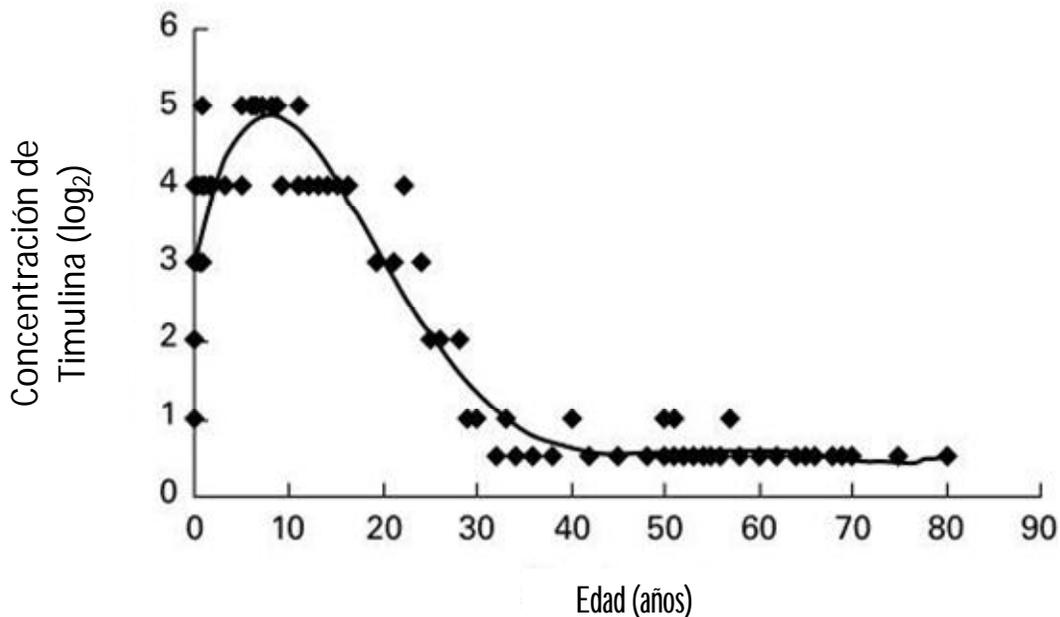


Fig. 5. Esquema que muestra la concentración de timulina en plasma humano con respecto a la edad. Tomado de Consolini y cols., 2000.

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 a los 12 meses de edad (Dardenne y Bach, 1981). En el ratón adulto la concentración de timulina en el suero es de aproximadamente 638 fg/ml (Safieh y cols., 1990).

Se ha mostrado que la secreción de la timulina depende de la participación de varias hormonas, así como de la propia timulina. Al respecto, Cohen y colaboradores (1986) observaron que la administración de timulina al cultivo de células epiteliales tímicas de humano, induce disminución en la secreción de timulina, así como en el número de células que la contienen.

Se ha observado en ratas y ratones jóvenes, que la administración intraperitoneal de la triyodotironina (T3) modula la concentración de timulina en suero así como el número de células que la contienen (Savino y cols., 1984). En niños con deficiencias en la hormona de crecimiento (GH), la concentración de timulina es baja y cuando se les administra GH por vía subcutánea, la concentración de la hormona tímica se incrementa a valores normales 24 h después de la administración de GH (Mocchegiani y cols., 1990). Además, se ha mostrado que la administración de prolactina estimula de manera dependiente de la dosis la secreción de la timulina en ratones jóvenes y viejos, efectos que también se observaron en el cultivo de células epiteliales tímicas de humano y murino (Dardenne y cols., 1989).

Las hormonas esteroideas (progesterona y 17β -estradiol) estimulan de una a dos veces más la secreción de timulina en el cultivo de células epiteliales tímicas de humano y murinos (Savino y cols., 1988). La adrenalectomía o la gonadectomía en ratones jóvenes disminuyen al 50% las concentraciones de timulina en suero (Dardenne y cols., 1986).

Además de la regulación hormonal, se ha descrito en cultivo de células epiteliales de timo humano, que la incorporación de neuropéptidos como la β -endorfina o leu-encefalina incrementa la concentración de timulina en el medio de cultivo (Savino y cols., 1990).

Experimentos *in vitro* utilizando fragmentos de hipófisis anterior de rata macho, muestran que la timulina participa en la regulación de la secreción de LH, al aumentar su liberación de manera similar a la observada cuando se estimula con GnRH (Zaidi y cols., 1988). Brown y colaboradores (2000), utilizando el cultivo de células de adenohipófisis de rata hembra, muestran que la timulina estimula la liberación de FSH y LH y sugieren que en dicho efecto están involucrados los fosfatos de inositol, calcio y AMPc. Cuando estas células son incubadas con timulina y GnRH se observa un efecto aditivo sobre la secreción de FSH y un efecto sinérgico sobre la liberación de LH (Brown y cols., 2000). En tejido de adenohipófisis de rata, la timulina estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropina e incrementa AMPc y GMP (Hadley y cols., 1997).

Reggiani y colaboradores, en el 2006, construyeron un vector adenoviral recombinante portador de la secuencia sintética de ADN que codifica para un análogo biológicamente activo de timulina (Rad-metFTS), el cual es capaz de restaurar a largo plazo las concentraciones de timulina circulante cuando es inyectado vía intramuscular en ratas y ratones timectomizados. La terapia génica neonatal con este vector en ratones congénitamente atímicos (nu/nu) que se caracterizan por presentar concentraciones bajas de gonadotropinas en suero y menor densidad y tamaño de las células secretoras de FSH y LH, repara dichas alteraciones, lo que se correlaciona con la secreción de timulina (Goya y cols., 2007; Reggiani y cols., 2009).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que el ratón prepúber de 20 días de edad no es capaz de ovular en respuesta al estímulo con la gonadotropina coriónica equina (eCG); cuando a estos animales se les administra diariamente

timulina por vía sistémica, iniciando 24 h antes de la inyección de la gonadotropina y culminando en el momento del sacrificio en el primer estro vaginal, se induce la ovulación, liberando un promedio de 32 ovocitos (Hinojosa y cols., 1999).

También se ha mostrado que la timectomía realizada en el ratón durante la etapa infantil (diez días de edad) (Tx-10), provoca retraso en el inicio de la pubertad y disminución en las concentraciones de estradiol, en el número de folículos en crecimiento y en la respuesta ovulatoria inducida por las gonadotropinas; en este modelo biológico la administración sistémica de timulina inmediatamente después de la timectomía revierte dichas alteraciones (García, 1996; García y cols., 2000).

En estudios previos se analizó la participación de la timulina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, utilizando tanto ratones intactos como Tx-10 a los cuales se les inyectó en el hipotálamo o en la hipófisis timulina. En el ratón intacto los resultados mostraron que la timulina administrada en el hipotálamo medio o en la hipófisis restituye la ovulación bloqueada por el anestésico, lo que indica su participación en la liberación de GnRH y de gonadotropinas (García, 2005; García y cols., 2005), mientras que en el ratón Tx-10 sólo se incrementó la cuota ovulatoria al administrar la hormona en la hipófisis, por lo que la falta de timulina desde los 10 días provoca que algunas deficiencias a nivel hipotalámico sean irreversibles (González y cols., 2005; Cabrera y González, 2006).

En células de adenohipófisis de rata hembra obtenidas en cada día del ciclo estral, la timulina sola o en presencia de GnRH tiene un efecto estimulante o inhibitorio sobre la liberación de las gonadotropinas que depende del estado hormonal del animal donador (Hinojosa y cols., 2004).

En células de adenohipófisis de rata hembra, el tratamiento con progesterona o estradiol previo a la adición de timulina, estimula la liberación de FSH y LH, lo que indica que los efectos de la timulina son mediados por los esteroides sexuales (Hinojosa, 2006).

Ledwitz-Rigby y Scheid (1990) mostraron en cultivo de células de la granulosa de ovarios de cerda, que la timulina incrementa la actividad aromatasa y la respuesta a las gonadotropinas.

En ratones prepúberes tratados con 2 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG, la microinyección de 60 o 120 pg de timulina en la bursa ovárica incrementan la concentraciones de 17β -estradiol en suero, sin cambios en la respuesta ovulatoria. Cuando se utiliza un estímulo gonadotrópico mayor (3 u.i. de eCG y 3 u.i. de hCG) la microinyección intrabursal de 60 pg de timulina es capaz de amplificar la respuesta ovulatoria (Reyes, 2010; Rosales y cols., 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestros estudios, así como los de otros autores, apoyan la hipótesis de que la timulina está actuando como un regulador fino de las funciones del eje hipotálamo-hipofisario, lo que finalmente culmina con la ovulación. Resultados *in vivo* muestran que también modula la respuesta ovulatoria y esteroidogénica del ovario a las gonadotropinas. Con el fin de profundizar en el estudio de la participación de la timulina en la secreción de esteroides se decidió analizar sus efectos sobre la capacidad esteroidogénica del ovario, utilizando como modelo el cultivo de células de la granulosa del ovario de ratón.

HIPÓTESIS

Si la administración de timulina en la bursa ovárica amplifica la respuesta ovulatoria inducida por gonadotropinas e incrementa las concentraciones de estradiol en suero, entonces las células de la granulosa en cultivo responderán a la adición de timulina incrementando su capacidad esteroidogénica.

OBJETIVOS

- Determinar la dosis efectiva al 50% (DE₅₀) de la hormona estimulante del folículo (FSH) sobre la secreción de progesterona y 17 β -estradiol por las células de la granulosa de los ovarios de ratón.
- Estudiar los efectos de la timulina sobre la secreción basal de progesterona y 17 β -estradiol por las células de la granulosa.
- Estudiar los efectos de la timulina sobre la capacidad de respuesta esteroidogénica de las células de la granulosa frente al estímulo gonadotrópico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 (Harlan, México). Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio con barreras, con fotoperiodo controlado de 10 h de luz y 14 de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h) y temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con libre acceso al agua y al alimento. A los 24 días de edad se inyectaron con 5 u.i. de eCG y se sacrificaron por dislocación cervical 48 h después.

Obtención de células de la granulosa

Los ovarios se extrajeron de manera aséptica y se colocaron en una caja Petri de 50 mm con medio de cultivo Leibovitz's L-15 (GIBCO, NY, USA) suplementado con 1% de antibiótico (penicilina 10,000 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y anfotericina B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (GIBCO). Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se eliminó la grasa y la bursa de los ovarios. Posteriormente se trasladaron a una caja Petri con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's nutrient Medium Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 HAM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) ajustado a un pH de 7.6, suplementado con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO, México), 1% de antibiótico, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina (GIBCO) y 1mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich). Se puncionaron los folículos grandes, se colectó el medio/células, se centrifugó a 800 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.

Cultivo de células de la granulosa

Las células se resuspendieron en medio de cultivo fresco DMEM/F-12 HAM suplementado, se tomó una alícuota de 20 μl de células medio y se mezcló con 20 μl de azul de tripán, se homogenizó, se tomó una alícuota de 10 μl y se contaron las células en un hemocitómetro para llevar a un volumen final de 1×10^5 células/ml (Jia y Hsueh, 1986; Zachow y Woolery, 2002). La siembra se realizó en cajas de cultivo (Falcon, NJ, USA) de 24 pozos (500 μl de medio-células/pozo) y se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% de CO_2 .

Posteriormente se cambió el medio y los pozos se distribuyeron de acuerdo con las variables requeridas según se indica en el diseño experimental y se incubaron por 24 h. Previo a los tratamientos, al cultivo se le adicionó 10^{-7} M de androstenediona (4-androstene-3,17-diona; Sigma-Aldrich) como sustrato para la síntesis de 17β -estradiol. En cada ensayo se contó con un grupo de liberación basal y uno con alcohol etílico al 1% por ser el disolvente de la androstenediona. Pasadas las 24 h se colectó el medio de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -20 °C para la posterior cuantificación de progesterona y 17β -estradiol.

Radioinmunoanálisis

Las concentraciones de progesterona y 17β -estradiol en el medio de cultivo se cuantificaron por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count, CA, USA) que constan de tubos de polipropileno que contienen el anticuerpo específico: anti-progesterona o anti-estradiol, a los cuales se les adicionaron 100 μ l de la muestra y 1000 μ l de la hormona radioactiva (I^{125}), la mezcla se agitó para facilitar la reacción y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó la muestra y se determinó la concentración de la hormona con la ayuda de un contador de centelleo gamma (Packard Instrument Co.TM), en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración.

Las concentraciones de progesterona se expresaron en ng/ml y las de 17β -estradiol en pg/ml, la sensibilidad del método fue de 0.0488 ng/ml y 0.8989 pg/ml respectivamente. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87% para progesterona y 6.9% y 10.8% para 17β -estradiol.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm e.e.m. Los datos se analizaron por pares utilizando la prueba "U" de Mann-Whitney. Se consideraron como significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

Diseño experimental

1. Determinación de la dosis efectiva al 50% (DE₅₀) de la FSH sobre la secreción *in vitro* de esteroides por las células de la granulosa.

Para determinar la DE₅₀ de la FSH (Calbiochem, CA, USA) se realizó la curva dosis-respuesta sometiendo cultivos preincubados por 24 h a diferentes concentraciones de la gonadotropina (0, 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 ng/ml), (Welsh y cols., 1983; Zachow y Woolery, 2002) y se reincubaron por 24 h más. Al término de este tiempo, se colectó el medio de cultivo y se cuantificaron las concentraciones de progesterona y 17 β -estradiol por RIA de fase sólida.

2. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción basal de progesterona y 17 β -estradiol en el cultivo de células de la granulosa.

A cultivos preincubados por 24 h, al cambio de medio por medio fresco se les adicionaron concentraciones crecientes de timulina (Sigma-Aldrich) (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 ng/ml). Las células se incubaron por 24 h más y posteriormente se colectó el medio de cultivo y se cuantificaron las concentraciones de progesterona y 17 β -estradiol por RIA de fase sólida.

3. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción de progesterona y 17 β -estradiol estimulada por FSH en el cultivo de células de la granulosa.

Cultivos preincubados por 24 h, al cambio de medio por medio fresco se les adicionaron FSH (15 ng/ml)+timulina (0.001 ó 0.1 ng/ml). Las células se incubaron por 24 h más, posteriormente se colectó el medio de cultivo y se cuantificaron las concentraciones de progesterona y 17 β -estradiol por RIA de fase sólida.

En todos los casos se realizaron tres ensayos, cada uno por triplicado.

RESULTADOS

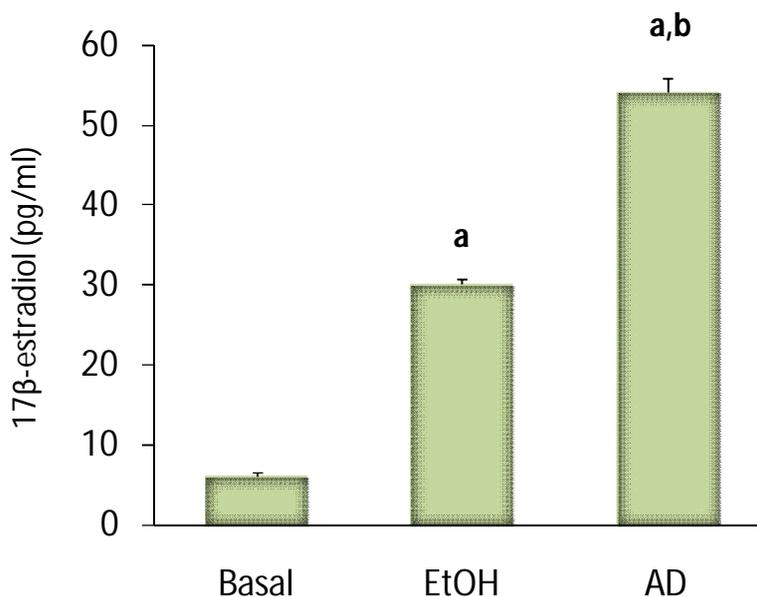
1. Determinación de la dosis efectiva al 50% (DE₅₀) de la FSH sobre la secreción *in vitro* de esteroides por las células de la granulosa.

La progesterona secretada al medio de cultivo por las células de la granulosa se mantuvo sin cambios cuando se administró etanol (EtOH) o EtOH+ androstenediona (AD) en comparación con la secreción basal. La administración de diferentes concentraciones de FSH no modificó la secreción de progesterona respecto al grupo AD (Tabla 1).

Tabla. 1. Concentraciones de progesterona (media ± e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con alcohol etílico al 1% (EtOH), EtOH+androstenediona (10⁻⁷ M) (AD), AD+dosis crecientes de FSH (ng/ml) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

		Progesterona (ng/ml)
Basal		78.2 ± 5.4
EtOH		78.2 ± 3.5
AD		77.5 ± 3.6
AD+FSH (ng/ml)	7.5	76.4 ± 2.4
	15	75.0 ± 2.4
	30	75.2 ± 3.2
	60	77.2 ± 5.5
	120	82.6 ± 2.3
	240	83.8 ± 3.7

La concentración de 17β -estradiol fue significativamente mayor en el grupo tratado con EtOH respecto a la secreción basal. Cuando se adicionó AD, la secreción de 17β -estradiol se incrementó aún más en comparación con los grupos basal y EtOH (Fig. 6).

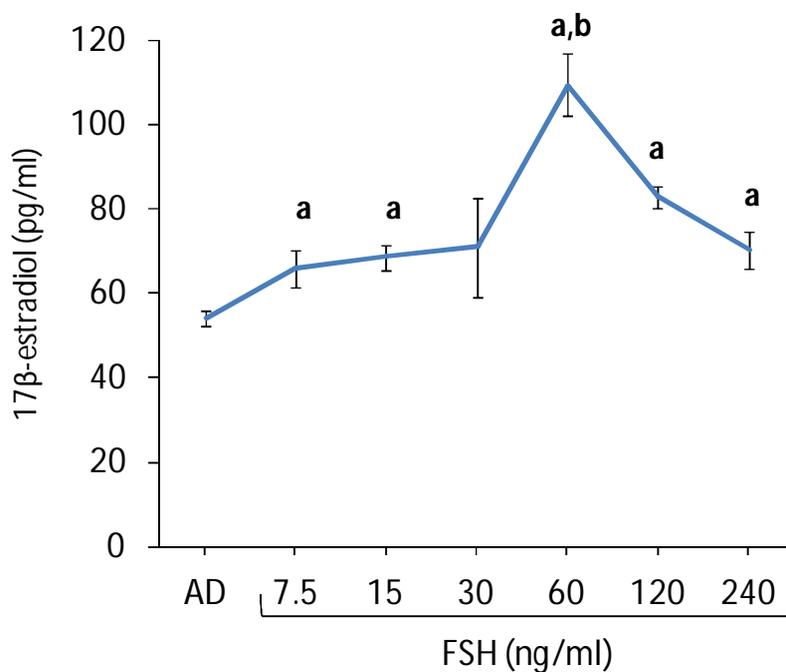


a, $p \leq 0.05$ vs basal
b, $p \leq 0.05$ vs EtOH

Fig. 6. Concentraciones de 17β -estradiol (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con alcohol etílico al 1% (EtOH), EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

Debido a las diferencias en la secreción de 17β -estradiol entre los grupos basal, EtOH y AD se utilizó a este último como grupo de comparación para analizar los efectos de las diferentes concentraciones de FSH sobre la secreción de esteroides.

En todos los grupos experimentales la incorporación FSH al medio de cultivo, incrementó de manera significativa la secreción de 17β -estradiol respecto al grupo AD, excepto con 30 ng/ml. Con la concentración de 60 ng/ml de FSH, la secreción de 17β -estradiol fue significativamente mayor al resto de las concentraciones (Fig. 7). Con base en lo anterior se consideró como dosis efectiva al 50% la concentración de 15 ng/ml de FSH.



a, $p \leq 0.05$ vs AD

b, $p \leq 0.05$ vs todas las concentraciones de FSH

Fig. 7. Concentraciones de 17β -estradiol (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o AD+dosis crecientes de FSH y se incubaron por 24 h más.

2. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción basal de progesterona y 17β -estradiol en el cultivo de células de la granulosa.

La secreción de progesterona por las células de la granulosa no se modificó en los grupos tratados con EtOH o AD respecto a la secreción basal (Fig. 8).

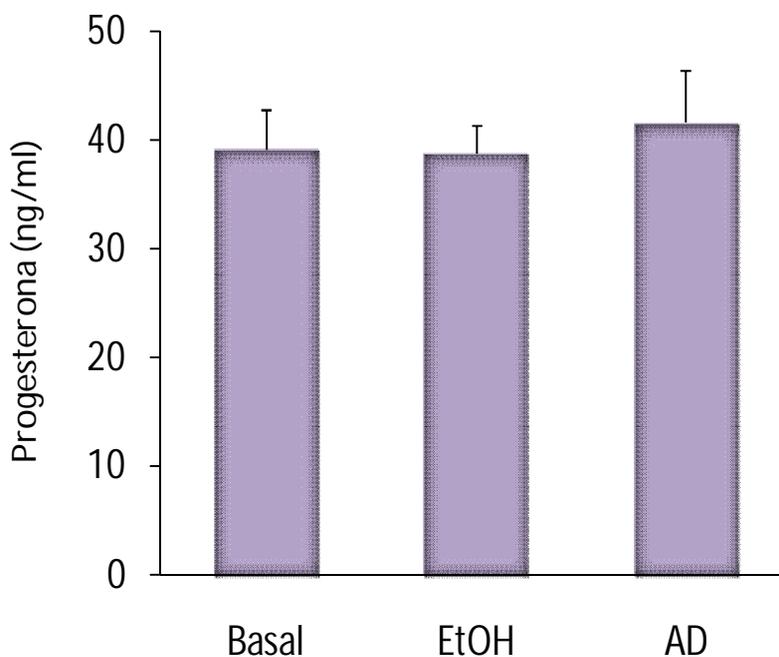
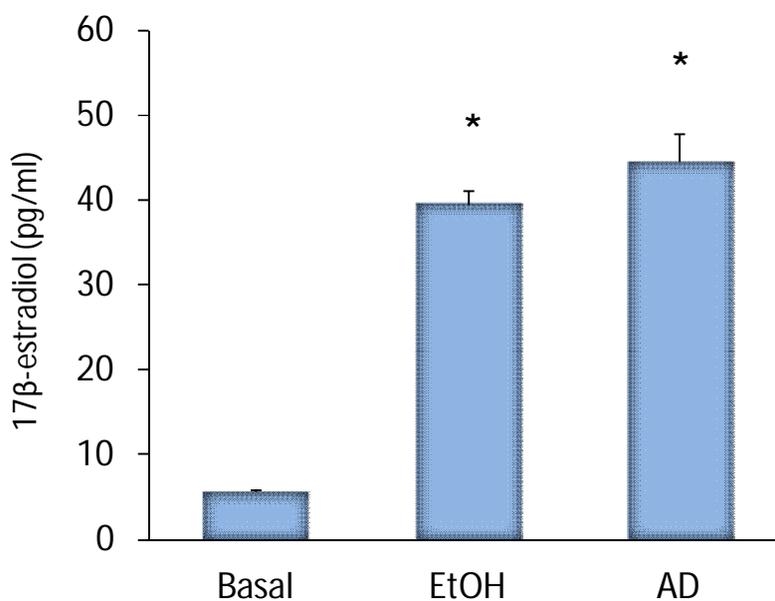


Fig. 8. Concentraciones de progesterona (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con alcohol etílico al 1% (EtOH), EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

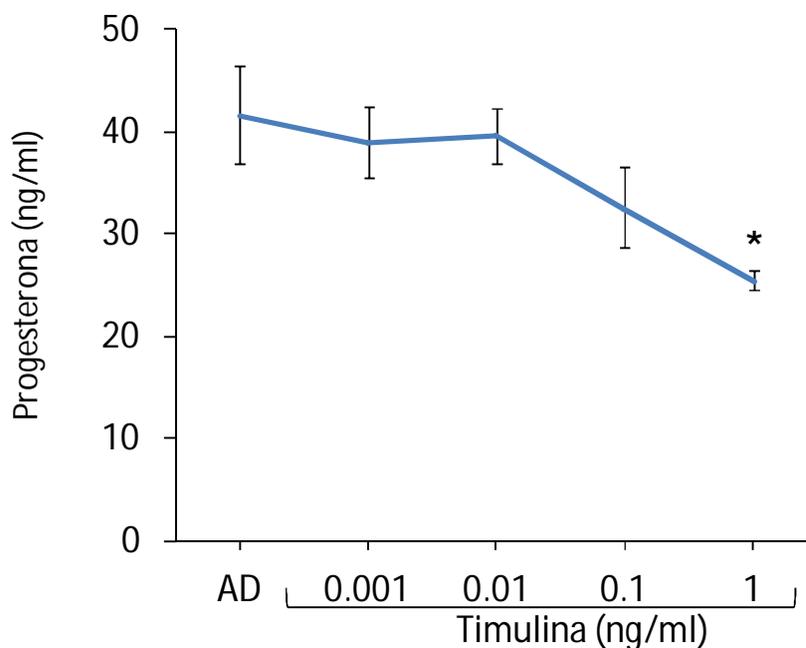
La secreción de 17β-estradiol por las células de la granulosa tratadas con EtOH o con AD fue significativamente mayor que la secreción basal. No se observaron diferencias significativas entre los grupos EtOH y AD (Fig 9).



*p ≤0.05 vs basal

Fig. 9. Concentraciones de 17β-estradiol (media ± e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con alcohol etílico al 1% (EtOH), EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

Con los diferentes tratamientos de timulina disminuyó la secreción de progesterona respecto al grupo tratado con AD ($r^2=0.8127$, $p= 0.0338$ Pearson) (Fig. 10).

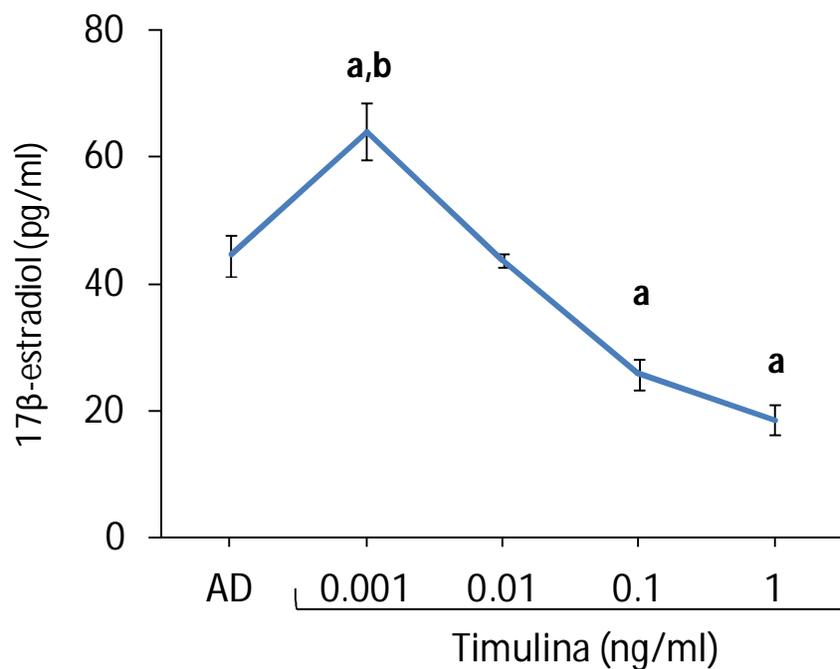


* $p \leq 0.05$ vs AD

Fig. 10. Concentraciones de progesterona (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o AD+timulina (0.001, 0.01, 0.1 ó 1 ng/ml) y se incubaron por 24 h más.

El tratamiento con 0.001 ng/ml de timulina incrementó la secreción de 17β -estradiol respecto a todas las concentraciones de timulina y al grupo AD. Los

tratamientos con 0.1 y 1 ng/ml de timulina disminuyeron significativamente la secreción de 17 β -estradiol respecto al grupo AD (Fig. 11).



a, $p \leq 0.05$ vs AD

b, $p \leq 0.05$ vs todas las concentraciones de timulina

Fig. 11. Concentraciones de 17 β -estradiol (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (AD) o AD+timulina (0.001, 0.01, 0.1 ó 1 ng/ml) y se incubaron por 24 h más.

3. Estudio de los efectos de la administración de timulina sobre la secreción de progesterona y 17β -estradiol estimulada por FSH en el cultivo de células de la granulosa.

Las concentraciones de progesterona secretadas por las células de la granulosa no se modificaron por la adición de FSH sola o en combinación con EtOH o AD respecto a la secreción basal (Fig. 12).

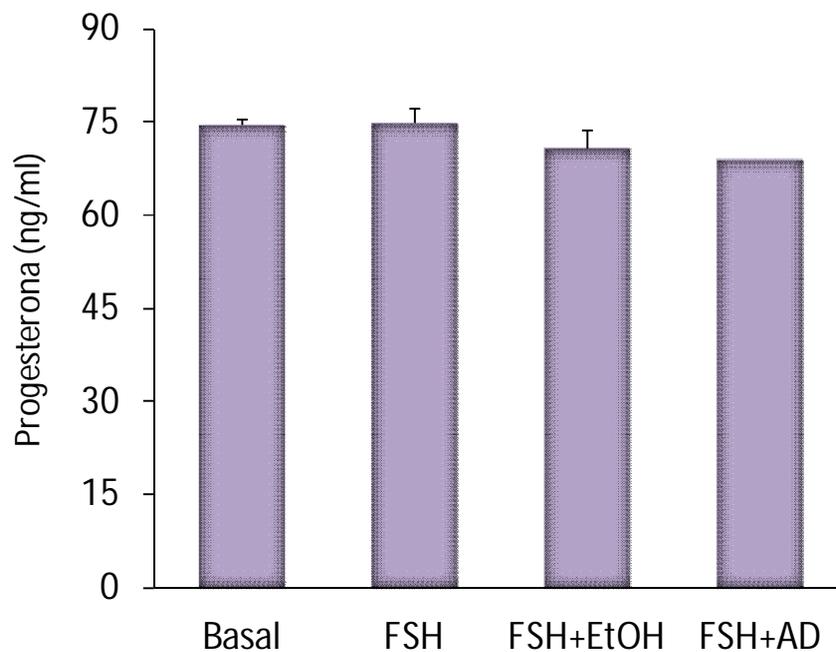
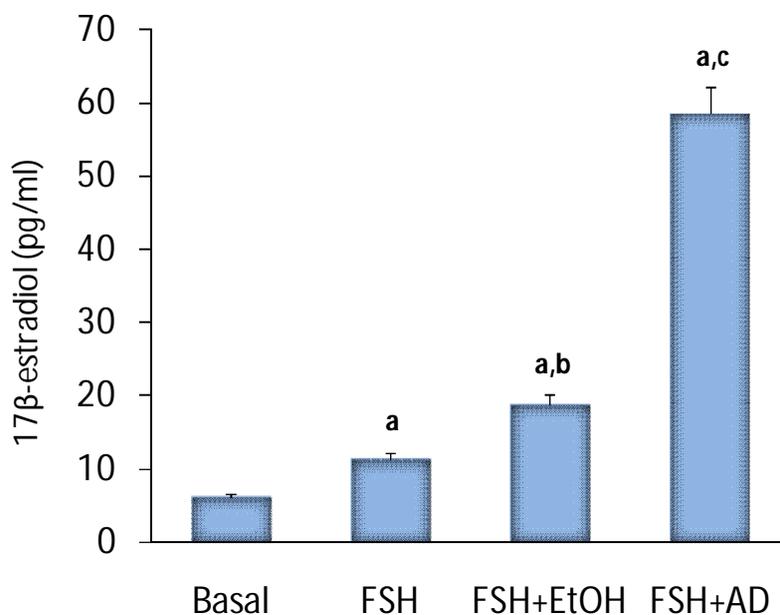


Fig. 12. Concentraciones de progesterona (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con FSH (15 ng/ml), FSH+alcohol etílico (1%) (FSH+EtOH) o FSH+EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (FSH+AD) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

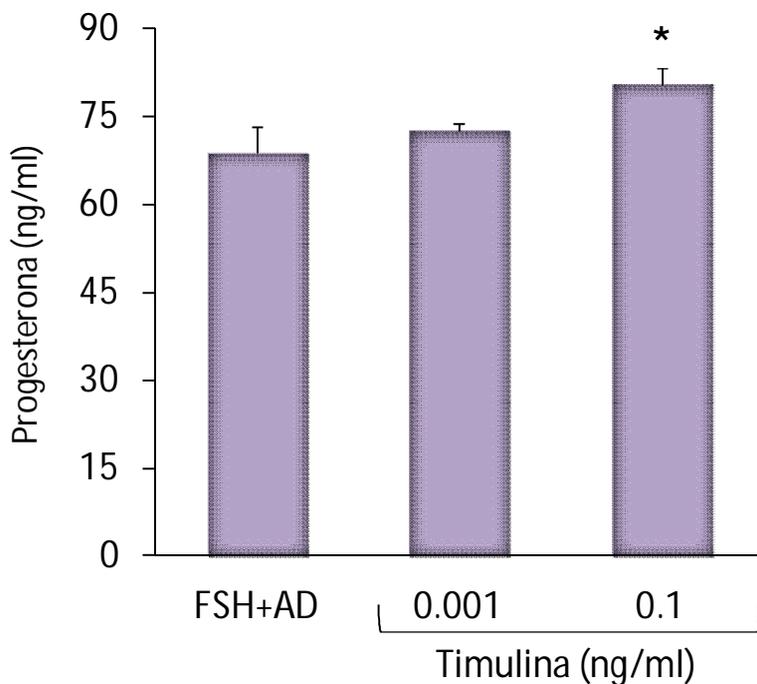
En todos los grupos que fueron tratados con FSH, la secreción de 17β -estradiol por las células de la granulosa fue significativamente mayor al grupo de secreción basal. Cuando las células se trataron con FSH+EtOH se observó un incremento significativo comparado con el grupo al cual sólo se le administró FSH y el adicionar al medio de cultivo androstenediona aumentó aún más la secreción de 17β -estradiol respecto al tratamiento de FSH+EtOH (Fig. 13).



a, $p \leq 0.05$ vs Basal
 b, $p \leq 0.05$ vs FSH
 c, $p \leq 0.05$ vs FSH+EtOH

Fig. 13. Concentraciones de 17β -estradiol (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con FSH (15 ng/ml), FSH+alcohol etílico (1%) (FSH+EtOH) y FSH+EtOH+androstenediona (10^{-7} M) (FSH+AD) o sin tratamiento (basal) y se incubaron por 24 h más.

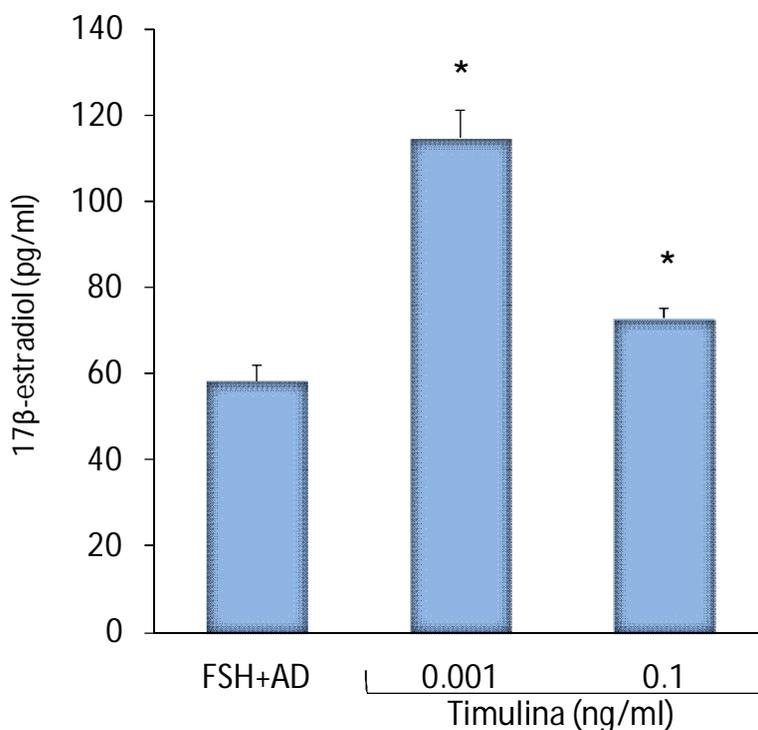
En las células de la granulosa tratadas con FSH+AD, la adición de 0.1 ng/ml de timulina incrementó significativamente la secreción de progesterona (Fig. 14).



* $p \leq 0.05$ vs FSH+AD

Fig. 14. Concentraciones de progesterona (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con FSH +EtOH+androstenediona (FSH+AD) o FSH+AD+timulina (0.001 y 0.1 ng/ml) y se incubaron por 24 h más.

En comparación con el grupo tratado con FSH+AD, la administración de timulina incrementó significativamente la concentración de 17β -estradiol, siendo mayor la secreción cuando se administró 0.001 ng/ml de timulina (Fig. 15).



* $p \leq 0.05$ vs FSH+AD

Fig. 15. Concentraciones de 17β -estradiol (media \pm e.e.m.) en el medio de cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón. Después de 24 h de incubación y de un cambio de medio por medio fresco, las células se trataron con FSH +EtOH+androstenediona (FSH+AD) o FSH+AD+timulina (0.001 y 0.1 ng/ml) y se incubaron por 24 h más.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en las células de la granulosa en cultivo, la concentración de timulina cercana a la fisiológica estimula la secreción de 17β -estradiol en ausencia o presencia de FSH. Altas concentraciones de timulina inhiben la secreción de progesterona y 17β -estradiol, efecto que se invierte al adicionar FSH al cultivo celular.

Durante la última etapa del desarrollo folicular, las células de la granulosa adquieren la capacidad de producir progesterona bajo el estímulo de la FSH, la cual promueve la síntesis de ARNm que codifica para las enzimas P_{450}^{scc} y 3β -HSD, involucradas en la conversión de colesterol a progesterona (Zelevnik, 1999). En células de la granulosa de bovinos, se ha detectado la presencia de ARNm que codifica para la enzima 3β -HSD, lo que se correlaciona con la concentración de progesterona secretada al medio de cultivo (Sahmi y cols., 2004). Nuestros resultados muestran que las células de la granulosa obtenidas de los ovarios de ratón y mantenidas en cultivo, son capaces de secretar progesterona en ausencia o presencia de FSH, lo que sugiere que al igual que en otras especies, las células cuentan con la maquinaria enzimática para la síntesis de este esteroide.

Las células de la granulosa de mujer tienen la capacidad de secretar estradiol de manera espontánea durante los primeros días de cultivo (Erickson y cols., 1989; Földesi y cols., 1998). Resultados similares se obtuvieron en nuestros cultivos, ya que las células de la granulosa de ratón secretan 17β -estradiol sin el estímulo de FSH o la adición de andrógenos (basal).

Estudios *in vitro* realizados con ovarios de tilapia muestran que la incubación con etanol incrementa la secreción de 17β -estradiol, lo que coincide con el aumento en la expresión del gen de la enzima $P_{450}^{aromatasa}$ (Kim y cols., 2003). Lo anterior podría ser una explicación del incremento en la secreción de 17β -estradiol cuando se administró etanol a las células de la granulosa de ratón. El hecho que la

concentración de progesterona no se haya modificado en nuestros cultivos apoya esta interpretación.

En células de la granulosa de ovarios de bovinos suplementadas con androstenediona, se detecta la presencia de los ARNm para la P₄₅₀SCC y la 3 β -HSD, sin cambios en su concentración ni en la de progesterona; sin embargo se incrementa el ARNm para la P₄₅₀aromatasa así como la concentración de estradiol (Hamel y cols., 2005). Resultados similares obtuvimos al adicionar androstenediona al medio de cultivo, donde la concentración de progesterona no se modificó y la de 17 β -estradiol aumentó más del 70%, lo que pone de manifiesto la gran capacidad biosintética de las células de la granulosa de ratón en respuesta a la androstenediona, como sustrato (Yeh y Adashi, 2001) y como regulador de la expresión del gen para la aromatasa.

Entre las funciones de la FSH está desencadenar la cascada de señalización que culmina con la síntesis de estrógenos (Conley y Walters, 1999). Dicha gonadotropina promueve la formación de segundos mensajeros como el cAMP, que a su vez activa los factores de transcripción que, unidos al ADN, conducen a la síntesis de la P₄₅₀aromatasa (Reichert, 1999). Los resultados obtenidos en este estudio indican que dicha cascada de señalización se está llevando a cabo en las células de la granulosa de ratón en respuesta al estímulo de FSH.

En células de la granulosa de ovarios de vacas, la concentración del ARNm del receptor a FSH, así como la secreción de 17 β -estradiol, disminuyen conforme aumenta la concentración de FSH administrada al medio de cultivo. Esto debido al sistema de retroalimentación negativa que ejerce la FSH sobre la expresión de sus propios receptores (Houde y cols., 1994, Berndtson y cols., 1995, Rouillier y cols., 1996). Un efecto similar se observa en la curva dosis-respuesta de las células de la granulosa de ratón frente a un estímulo gonadotrópico mayor (>60 ng/ml), lo que probablemente se debe a una disminución en la sensibilización de las células regulada por la FSH.

Se ha mostrado en el cultivo de células de la granulosa de ovarios de conejas, que la estimulación con FSH, en ausencia de androstenediona, estimula la secreción de estradiol, lo que se ha explicado por una reserva de andrógenos aromatizables listos para ser transformados por la P₄₅₀aromatasa a estrógenos en el momento en que dichas células sean estimulada por la FSH (Picazo y cols., 2000). Lo mismo puede estar ocurriendo en nuestros cultivos de células de la granulosa de ratón que bajo el estímulo único de FSH aumentan al doble la secreción de 17 β -estradiol respecto a la secreción basal.

Se ha mostrado que dosis bajas de timulina estimulan la diferenciación de las células T-cooperadoras y dosis altas estimulan la diferenciación de las T-supresoras (Bach y Dardenne, 1984). En células de adenohipófisis en cultivo, dosis bajas de timulina estimulan la secreción de FSH y LH, mientras que con dosis altas el efecto estimulante disminuye conforme aumenta la concentración (Brown y col., 2000). En el cultivo de células de la granulosa de ovario de cerda, dosis crecientes de timulina no modifican la secreción espontánea de progesterona y en presencia de FSH la incrementa proporcionalmente a la concentración (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). En nuestro modelo de células de la granulosa, la timulina inhibe la secreción espontánea de progesterona de manera proporcional a la dosis. La secreción de 17 β -estradiol se incrementó con la concentración fisiológica de timulina (0.001 ng/mL) y disminuyó con las más altas (0.1 y 1 ng/mL). Nuestros resultados confirman que la timulina tiene un efecto dual dependiendo de la concentración e indican que la esteroidogénesis es uno de los procesos donde esto también se manifiesta.

En el cultivo de células de la granulosa de cerda, se ha descrito que la timulina tiene efecto estimulante sobre la actividad de la aromatasa (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990), por lo que el incremento en la concentración basal de 17 β -estradiol por las células de la granulosa de ratón prepúber podría estar vinculado a dicho efecto.

La administración sistémica diaria de timulina a ratones durante la etapa peripuberal e inyectados con eCG incrementa las concentraciones de progesterona en suero (Hinojosa y col., 1999). En células de la granulosa de ovario de cerda la incubación con timulina y FSH incrementa la secreción de progesterona, lo que se atribuye a la participación de la timulina con los mecanismos involucrados en la síntesis o actividad de las enzimas responsables de la producción de este esteroide (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990). Resultados similares observamos en los cultivos con FSH, lo que sugiere un efecto potenciador de la timulina sobre los efectos de la gonadotropina. El hecho que las mismas concentraciones de timulina no modifiquen la secreción basal, apoyan esta interpretación.

En estudios previos hemos mostrado en animales intactos y Tx-10 que la administración sistémica de timulina incrementa las concentraciones de 17β -estradiol en sangre (García, 2000). En estudios recientes observamos que la microinyección de timulina en la bursa del ovario de ratones prepúberes incrementa de 2 a 11 veces más las concentraciones de 17β -estradiol frente al estímulo gonadotrópico (Rosales y cols., 2010). Nuestros resultados muestran que las células de la granulosa, en ausencia o presencia de FSH, son blanco de la timulina. Este hecho sugiere que parte de los efectos observados sobre la esteroidogénesis *in vivo* podrían ser reflejo de lo que ocurre *in vitro*.

Los efectos de timulina sobre la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis dependen de la relación timulina-gonadotropinas (Hinojosa, 1998; García, 2000; Reyes, 2010; Rosales y cols., 2010). Cuando se incubaron las células de la granulosa con la concentración fisiológica de timulina y se estimularon con la DE_{50} de FSH, la concentración de 17β -estradiol fue de igual magnitud a la observada con la DE_{100} de FSH. Estos resultados sugieren que la timulina potencia el efecto de FSH.

Con los resultados obtenidos podemos sugerir que la timulina es un regulador fino de la secreción de esteroides, probablemente modulando la receptividad del ovario a las gonadotropinas o interactuando con alguna de las moléculas que participan

en la cascada de señalización en la secreción de esteroides por las células de la granulosa. Para explicar lo anterior se propone el siguiente modelo.

Modelo que explica las posibles vías que utilizaría la timulina en la biosíntesis de 17β -estradiol por las células de la granulosa.

Efecto estimulante de la timulina sobre la secreción de 17β -estradiol.

1. La timulina se une a su receptor en la membrana (Pléau y cols., 1980; Cohen y cols., 1986) de la célula de la granulosa.
2. La unión hormona-receptor, vía las proteínas G, activa la enzima adenilato ciclasa y promueve la conversión de ATP a AMPc (como se ha propuesto que ocurre en diferentes poblaciones celulares hipofisarias y en linfocitos T) (Rinaldi y cols., 1985; Hadley y cols., 1997; Brown y cols., 1998, 1999, 2000).
3. El incremento en la producción de AMPc induce la activación de la proteína cinasa A (PKA) (Chedrese y Bertorello, 2009; Rozell y cols., 2009).
4. PKA fosforila al factor de transcripción CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding, por sus siglas en inglés) (Chedrese y Bertorello, 2009; Rozell y cols., 2009).
5. CREB entra al núcleo y se une a la región de ADN que codifica para la expresión de la enzima aromatasa en las células de la granulosa del ovario (Stocco, 2009).
6. El incremento de la enzima aromatasa por efecto de la timulina (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1990) resulta en un aumento de la síntesis y secreción de 17β -estradiol (Fig. 16).

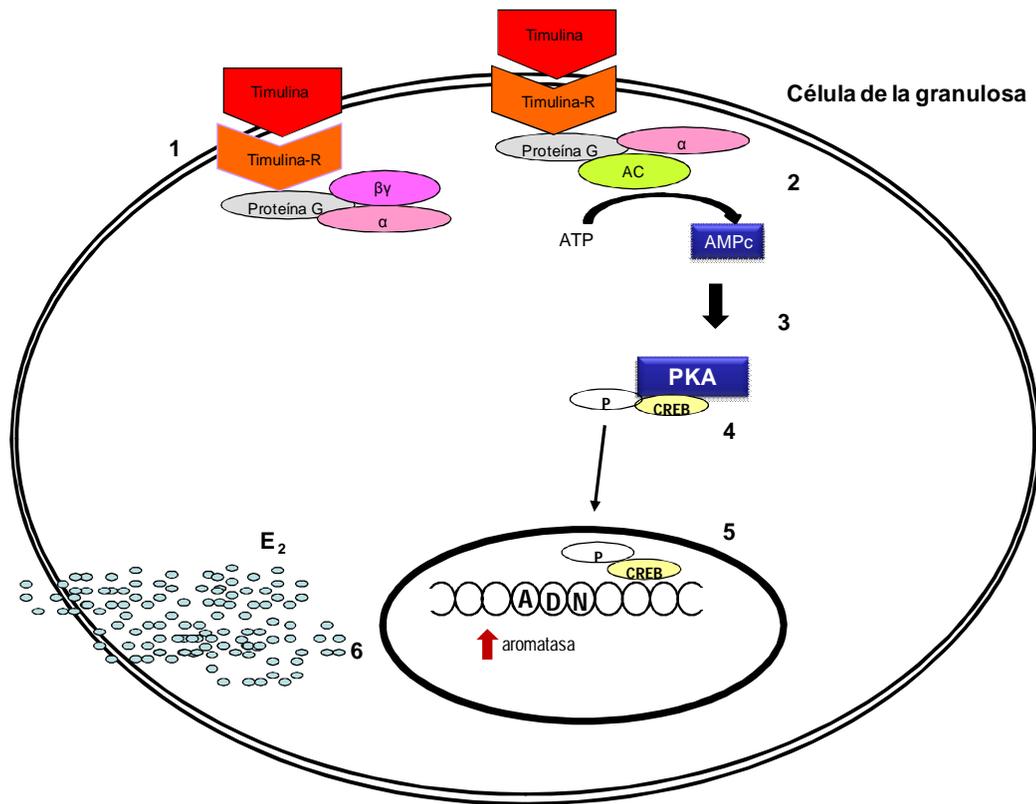


Fig. 16. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la timulina en la estimulación de la biosíntesis de 17β -estradiol por las células de la granulosa. Adenilato ciclasa (AC), receptor de timulina (Timulina-R), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), proteína cinasasa A (PKA), factor de transcripción CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding, por sus siglas en inglés), fosforilación (P), 17β -estradiol (E_2), ácido desoxirribonucleico (ADN).

Efecto inhibitorio de la timulina sobre la secreción de 17 β -estradiol.

La timulina en altas concentraciones disminuye su efecto estimulante por un mecanismo de desensibilización del receptor, de la siguiente manera:

1. Inactivación del receptor al desacoplarlo de las proteínas G. El receptor a timulina activado es reconocido por las proteínas cinasas de los receptores acoplados a PKA (GRK) y es fosforilado.
2. La fosforilación del receptor provoca la unión de arrestinas (proteínas citosólicas) que bloquean su capacidad para interactuar con las proteínas G (desensibilización).
3. Los receptores fosforilados son internalizados por endocitosis mediada por clatrina.
4. Este proceso finalmente re-sensibiliza y posteriormente recicla los receptores a la membrana plasmática (Fig. 17).

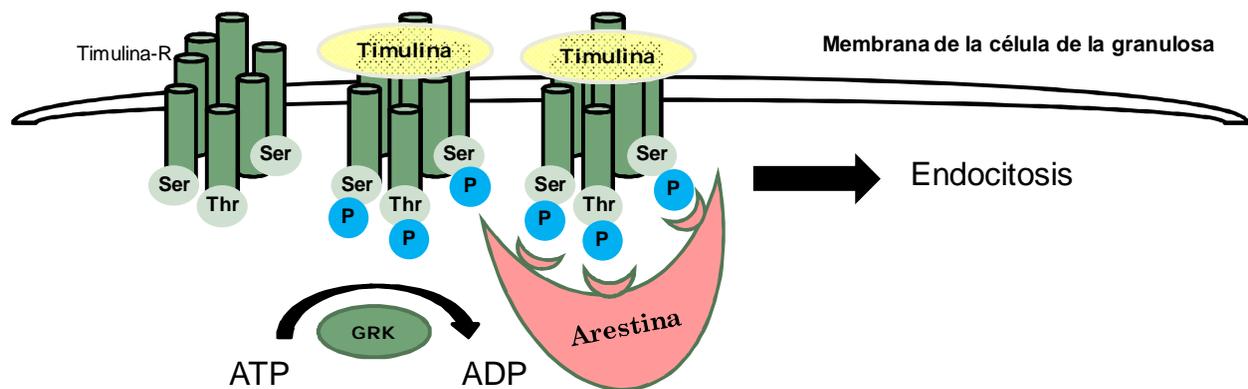


Fig. 17. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la timulina en la inhibición de la biosíntesis de 17 β -estradiol por las células de la granulosa. receptor de timulina (Timulina-R), trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), proteínas cinasas de los receptores acoplados a PKA (GRK), fosforilación (P), serina (Ser), treonina (Thr).

Efecto estimulante de la timulina en presencia de FSH sobre la secreción de 17 β -estradiol.

1. La FSH se une a su receptor en la membrana de las células de la granulosa.
2. La activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) promueve la conversión de ATP a AMPc.
3. La AC se une a factores de intercambio activados por AMPc (EPAC) y activa la proteína Rap1.
4. Este complejo activa PI3K, que a su vez activa cinasas dependientes de fosfoinositoides (PDK) y éstas activan a la proteína cinasa B (PKB).
5. Lo que lleva al incremento de la enzima aromatasa vía la participación de CREB (Rozell y cols., 2009; Stocco, 2009; Strauss y Williams, 2009).
6. La FSH estimula las vías AMPc/PKA/CREB y AMPc/PKB/CREB que activan la expresión del gene que codifica para la síntesis de la enzima aromatasa (CYP19a) (Chedrese y Bertorello, 2009; Rozell y cols., 2009).

Las células están bajo la influencia de más de una molécula reguladora al mismo tiempo y las vías de señalización responden a diferentes agonistas que interactúan para regular procesos intracelulares similares (Chedrese y Bertorello, 2009). Si FSH y timulina, activan simultáneamente la vía de señalización AMPc/PKA/CREB resulta en un efecto aditivo sobre la secreción de 17 β -estradiol (Fig. 18).

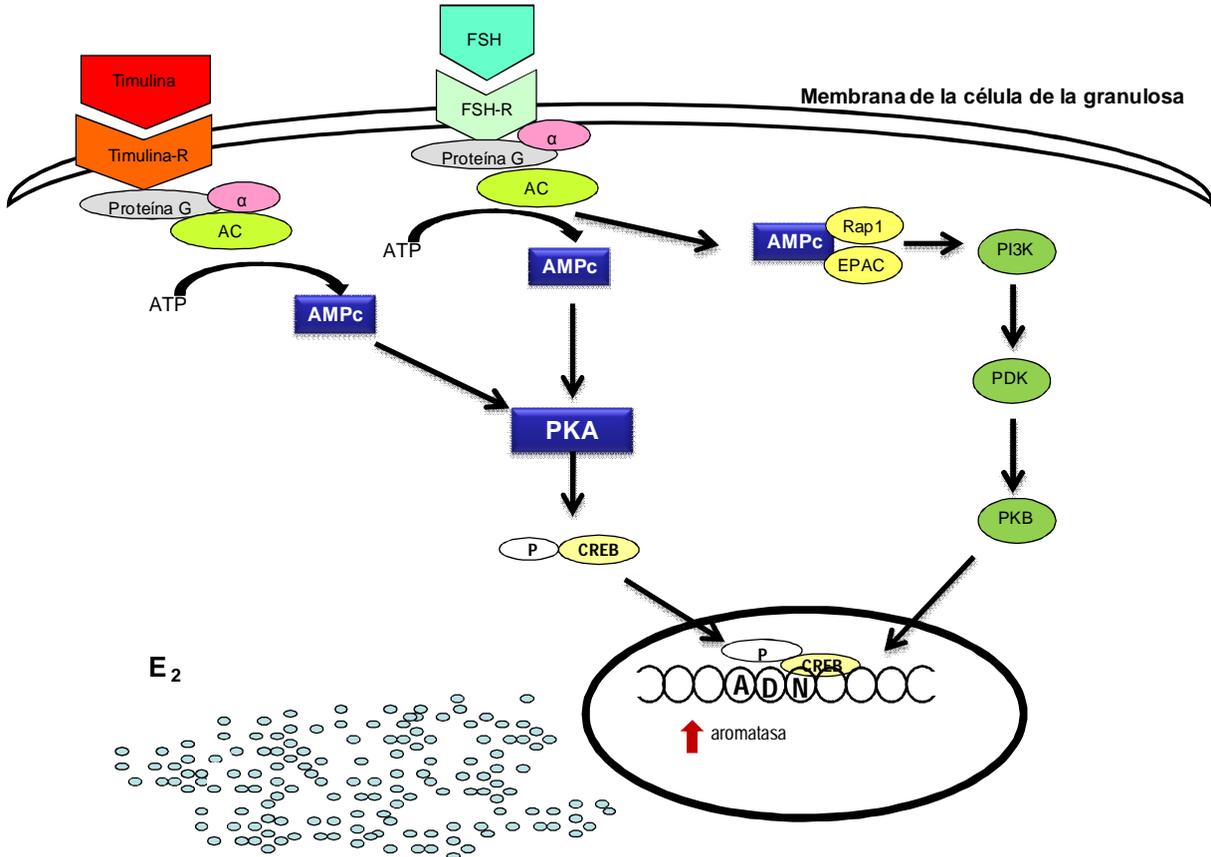


Fig. 18. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la timulina y FSH en la estimulación de la biosíntesis de 17β -estradiol por las células de la granulosa. Adenilato ciclasa (AC), receptor de timulina (Timulina-R), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), proteína cinasa A (PKA), factor de transcripción CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding, por sus siglas en inglés) (CREB), fosforilado (P), 17β -estradiol (E_2), ácido desoxirribonucleico (ADN), hormona estimulante del folículo (FSH), receptor de FSH (FSH-R), proteína Rap1 (Rap), cinasas dependientes de fosfoinositoides (PDK), factores de intercambio activados por AMPc (EPAC), proteína cinasa B (PKB), cinasa de 3 fosfatidil inositol (PI3K).

CONCLUSIONES

- ❖ Las células de la granulosa de los ovarios de ratón en cultivo, secretan de manera espontánea 17β -estradiol y progesterona.
- ❖ En el cultivo de las células de la granulosa la concentración de 17β -estradiol se incrementa en respuesta a la adición de androstenediona o FSH o ambas.
- ❖ La timulina en concentraciones bajas, estimula la secreción espontánea de 17β -estradiol y no modifica la secreción de progesterona por las células de la granulosa en cultivo.
- ❖ La timulina en concentraciones altas, inhibe la secreción espontánea de progesterona y de 17β -estradiol por las células de la granulosa en cultivo.
- ❖ La presencia de timulina en los cultivos de células de la granulosa estimulados con FSH, incrementa la secreción de ambos esteroides dependiendo de la concentración de timulina

BIBLIOGRAFÍA

- Bach JF y Dardenne M. (1984). Clinical aspects of thymulin (FTS). En: Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications. AL Goldstein Ed, Plenum Press, New York, 593-613.
- Bach JF, Dardenne M, Pléau JM y Sosa J. (1977). Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* **266**, 55-57.
- Bellanti JA. (1986). Inmunología. 3ª edición. Interamericana, México. 662.
- Berndtson A, Vincent S y Fortune J. (1995). Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Biology of Reproduction* **52**, 1334-1342.
- Brown T. (1999). Steroid hormones, overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 634-644.
- Brown O, Sosa Y, Bolognani F y Goya R. (1998). Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mechanisms of Ageing and Development* **104**, 249-262.
- Brown O, Sosa Y, Dardenne M, Pléau JM y Goya R. (1999). Growth hormone-releasing activity of thymulin: effects of age. *Neuroendocrinology* **69**, 20-27.
- Brown O, Sosa Y, Dardenne M, Pléau JM y Goya R. (2000). Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *Journal of Gerontology* **55A**, B170-B176.
- Cabrera ML y González B. (2006). Estudio de los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo medio e hipófisis de ratones timectomizados a los diez días de edad sobre la respuesta ovulatoria inducida por la administración de gonadotropinas. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 61 pp.
- Carson D. (1999). Implantation. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 806-810.
- Chedrese P y Bertorello. (2009). The molecules that transmit information into cell: the intracellular signaling pathways. En: Reproductive endocrinology: a Molecular Approach. Chedrese Eds. Springer. New York. 23-39.
- Cohen S, Berrih S, Dardenne M y Bach JF (1986). Feedback regulation of the secretion of a thymic hormone (thymulin) by human thymic epithelial cells in culture. *Thymus* **8**, 109-119.
- Conley A y Walters K. (1999). Aromatization. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 1. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 280-290.
- Consolini A, Legitimo A, Calleri y Milani M. (2000). Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clinical and Experimental Immunology* **121**, 444-447.
- Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF y Laussac JP. (1988). NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Z(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 5574-5580.

- Dalakas M, Hubbard R, Cunningham G, Trapp B, Sever J y Goldstein A. (1984). Thymosin β 4 is present in a subset of oligodendrocytes in the normal human brain. En: Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 119-125.
- Dardenne M y Bach JF. (1981). Thymic hormones. En: The Thymus Gland. Ed. MD Kendall. Academic Press, New York. 113-131.
- Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J y Bach JF (1986). Thymic hormone-containing cells. VII. Adrenal and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *The Journal of Immunology* **136**, 1303-1308.
- Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T y Bach JF. (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.
- Domínguez R, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. R Domínguez Ed. PUIS-UNAM. Miguel Ángel Porrua. México. 163-192.
- Domínguez R. (1997). Endocrinología de las gónadas. En: Curso Internacional Precongreso. Actualización en Fisiología. Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-280.
- Erickson GF, Garzo VG y Magoffin DA. (1989). Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism* **69**, 716-724.
- Fawcett DW. (1995). Tratado de histología. 12ª edición. Interamericana, México. 489-491.
- Földesi I, Breckwoldt M y Neulen J. (1998). Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. *Human Reproduction* **13**, 1455-1460.
- García L. (1996). Estudio de los efectos de la timectomía realizada en la etapa infantil sobre el proceso de pubertad y la ovulación en el ratón. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 66 pp.
- García L. (2000). Estudio de los efectos de la timulina en la pubertad, la ovulación y la esteroidogénesis del ratón timectomizado a los diez días de edad. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 92 pp.
- García L, 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. *The Journal of Endocrinology* **166**, 381-387.
- García L. (2005). Estudio de los efectos de la microinyección de timulina en el hipotálamo o en la hipófisis sobre las funciones del ovario del ratón prepúber tratado con eCG. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 109 pp.
- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. (2005). Effects of injection thymulin into the anterior or medial hypothalamus or pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* **12**, 314-320.

- Geneser F. (2000). Histología. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. 421-427.
- Goldstein A, Low T, Thurman G, Zatz M, Hall N, Chen J, Hu SK, Naylor P y McClure J. (1981). Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland. En: Recent progress in hormone research. RO Greep Ed. Academic Press, New York. 369-415.
- González B, Cabrera ML, García L, Hinojosa L, Domínguez R y Rosas P. (2005). Efectos de la inyección de timulina en hipófisis de ratones timectomizados e intactos, sobre la ovulación inducida por gonadotropinas. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C-205.
- Gore-Langton R y Armstrong D. (1994). Follicular Steroidogenesis and its Control. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 571-627.
- Goya R, Reggiani P, Vesenbeckh S, Pléau JM, Sosa Y, Cónsole G, Schade R, Henklein P y Dardenne M. (2007). Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **293**, E182-E187.
- Greenwald G y Roy S. (1994). Follicular development and its control. En: The Physiology of Reproduction. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 629-724.
- Hadley A, Rantle C y Buckingham J. (1997). Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* **4**, 62-69.
- Hamel M, Vanselow J, Nicola E y Price C. (2005). Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development* **70**, 175-183.
- 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 normales e hipotímicos. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 79 pp.
- Hinojosa L. (2006). Estudio de la participación de la timulina en la regulación de la secreción de la FSH y LH por las células de la adenohipófisis de rata adulta. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 95 pp.
- Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P. (1999). Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothymic mice. *The Journal of Endocrinology*. **163**, 255-260.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura P 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.
- Hinshelwood M. (1999). Steroidogenesis, overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 644-653.
- Horecker B. (1984). Thymosin β 4. Distribution and biosynthesis in vertebrate cells and tissues. En: Thymic Hormones and Lymphokines. Basic Chemistry and Clinical Applications. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New York. 77-88.
- Houde A, Lambert A, Saumande J, Silversides D y Lussier J. (1994). Structure of

- the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Molecular Reproduction and Development* **39**, 127-135.
- Ing N. (1999). Steroid hormone receptors. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 4. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 654-661.
 - Jia X-C y Hsueh A. (1986). Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology* **119**, 1570-1577.
 - Kim B, Rahman M, Kim S, Lee Y y Takemura A. (2003). Alcohol treatment promotes conversion of testosterone to estradiol-17 β in female tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **29**, 263-268.
 - Ledwitz-Rigby F y Scheid P. (1990). Thymulin (Serum Thymic Factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotrophins in vitro. VII ovarian Workshop. Maryville, Tennessee. 473-478.
 - Minegishi T. (2004). Regulation of gonadotropin receptor in the ovary. En: The Ovary. 2a edición. PCK Leung y E Adashi Eds. Elsevier Academic Press, USA. 79-92.
 - Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E y Fabris N (1990). Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Hormone Research* **33**, 248-255.
 - O' Malley y Strott C. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico. 4ª edición. SC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana, México. 118-143.
 - Picazo R, Illera J y Illera M. (2000). Development of a long-term serum-free cultura system for immature granulosa cells from diethylstilboestrol-treated prepubertal rabbits: influence of androstenedione and fibronectin on FSH-induced cytodifferentiation. *Journal of Reproduction and Fertility* **119**, 279-285.
 - Pléau JM, Fuentes V, Morgat JL y Bach JF (1980). Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* **77**, 2861-2865.
 - Rebar R. (1984). Effects of thymic peptides on hypothalamic-pituitary function. En: Thymic Hormones and Lymphokines. AL Goldstein Ed. Plenum Press, New Cork. 325-334.
 - Reggiani P, Hereñú C, Rimoldi O, Brown O, Pléau JM, Dardenne M y Goya R (2006). Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene therapy* **13**, 1214-1221.
 - Reggiani P, Martines E, Ferese C, Goya R y Cónsole G. (2009). Morphological restoration of gonadotrope population by thymulin gene therapy in nude mice. *Histology and Histopathology* **24**, 729-735.
 - Reichert L. (1999). FSH (Follicle-Stimulating Hormone). En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 418-422.
 - Reyes C. (2010). Efectos de la administración de timulina en la bursa del ovario de ratones prepúberes sobre la respuesta ovulatoria. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. 80 pp.

- Rinaldi-Garci C, Jezzi T, Baldassarre A, Dardenne M, Bach JF y Garci E. (1985). Effect of thymulin on intracellular cyclic nucleotides and prostaglandins E₂ in peanut agglutinin-fractionated thymocytes. *European Journal of Immunology* **15**, 548-552.
- Ross M y Pawlina W. (2007). Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana, México. 457-461.
- Rosales B, Loaiza D, Reyes C, Chavira R y Rosas P. (2010). Estudio de la respuesta esteroidogénica del ratón prepúber a la administración intraovárica de diferentes concentraciones de timulina. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, C-315.
- Rouillier P, Matton P, Sirard M y Guilbault A. (1996). Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. *Journal of Animal Science* **74**, 3012-3019.
- Rozell T, Li Y y Freeman L. (2009). The FSH receptor: one receptor with multiple forms or a family of receptors. En: Reproductive Endocrinology: a Molecular Approach. Chedrese Eds. Springer. New York. 161-174.
- Safieh B, Kendall M, Norman J, Metreau E, Dardenne M, Bach JF y Pleau J. (1990). A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples. *Journal of Immunological methods* **127**, 255-262.
- Sahmi M, Nicola E.S. Silva J.M y Price C.A. (2004). Expression of 17β- and 3β-hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **223**, 45-54.
- Sánchez J. (1999). Fisiología del ovario. En: Fisiología Humana. 2ª edición. Tresguerres Eds. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid. 1036-1048.
- Savino W, Dardenne M, Papiernik M y Bach JF. (1982). Thymic hormone-containing cells. Characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* **156**, 628-633.
- Savino W, Gagnerault MC, Bach JF y Dardenne M (1990). Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. *Life Sciences* **46**, 1687-1697.
- 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. *Clinical and Experimental Immunology* **55**, 629-635.
- Stocco C. (2009). Hormonal and molecular regulation of the cytochrome P450 aromatase gene expression in the ovary. En: Reproductive Endocrinology: a Molecular Approach. Chedrese Eds. Springer. New York. 257-269.
- Strauss J y Williams C. (2009). The Ovarian Life Cycle. En: Reproductive Endocrinology: Physiology, and clinical management. 6ª edición. SC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Elsevier, USA. 155-190.
- Uzumcu M y Lin Y. (1994). Characterization of the stimulatory actions of thymic factor(s) on basal and gonadotrophin-induced steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **105**, 209-216.

- Uzumcu M, Akira S y Lin Y. (1992). Stimulatory effect of thymic factor(s) on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Life Science*. **51**, 1217-1228.
- Welsh TH, Zhuang LZ y Hsueh A. (1983). Estrogen augmentation of gonadotropin-stimulated progesterin biosynthesis in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **112**, 1916-1924.
- Wong K y Adashi E. (1999). Granulosa cells. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. E Knobil y JD Neill Eds. Academic Press, New York. 569-572.
- Yao H y Bahr J. (1999). Ovary, overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 3. E Knobil y JD Neill Eds. Academic Press, New York. 590-596.
- Yeh J y Adashi E. (2001). El ciclo ovárico. En: Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico. 4ª edición. SC Yen, RB Jaffe y RL Barbieri Eds. Editorial Médica Panamericana, México. 164-202.
- Zachow R y Woolery J. (2002). Effects of hepatocyte growth factor on cyclic nucleotide-dependent signaling and steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction* **67**, 454-459.
- Zaidi S, Kendall M, Gillham B y Jones M. (1988). The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* **12**, 253-264.
- Zeleznik A. (1999). Luteinization. En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. E Knobil y JD Neill Eds. Raven Press, New York. 1076-1083.