

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**



**INFLUENCIA DE LA TIMULINA SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS IN  
VITRO EN LAS CÉLULAS DE LA TECA DE OVARIOS DE RATÓN**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología Experimental

**P R E S E N T A**

Andrea Chaparro Ortega

**Directores:**

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dr. Roberto Domínguez Casalá

**Asesora:**

Dra. Patricia Rosas Saucedo

# **COMITÉ TUTORAL**

## **Codirector**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Responsable del Área de Biología Celular

Profesor Titular "C"

D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III

## **Codirector**

**Dr. Roberto Domínguez Casalá**

Responsable de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

Profesor Titular "C"

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel III

## **Asesora**

**Dra. Patricia Rosas Saucedo**

Responsable del Laboratorio de Neuroinmuno-endocrinología

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

Profesor Titular "B"

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

**“El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”**

**Número CVU de la beca otorgada por CONACyT 371069.**

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroinmuno-  
endocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la  
Reproducción. UMIEZ. FES-Zaragoza, UNAM.**

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "INFLUENCIA DE LA TIMULINA SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS IN VITRO EN LAS CÉLULAS DE LA TECA DE OVARIOS DE RATÓN", que presentó **Andrea Chaparro Ortega**. El día 28 de Febrero del año 2013.

Dr. Pablo G. Damián Matzumura

Presidente

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción  
Profesor Titular "C"  
Universidad Autónoma Metropolitana

---

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Secretario

Responsable del Laboratorio de Neuroinmuno-endocrinología  
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción  
Profesor Titular "B"  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

---

Dra. Leticia Morales Ledesma

Vocal

Responsable del Laboratorio de Fisiología Reproductiva  
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción  
Profesor Titular "B"  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

---

Dra. María Elena Ayala Escobar

Vocal

Responsable del Laboratorio de Pubertad  
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción  
Profesor Titular "B"  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Mi más sincero respeto, admiración y gratitud a los pilares de éste trabajo, el Dr. Betancourt, el Dr. Domínguez y la Dra. Rosas, quienes son el vivo ejemplo de humildad y sabiduría y quienes enriquecieron siempre ésta investigación. Gracias por su tiempo, colaboración, apoyo y valiosos consejos en todos los ámbitos de mí vida.

Gracias al Dr. Matsumura, la Dra. Morales y la Dra. Ayala por sus valiosas contribuciones, consejos y comentarios a ésta investigación y por aceptar ser miembros de mi jurado.

Al Dr. Francisco Vázquez del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por su asesoría en el montaje de las técnicas de cultivo de las células de la teca.

Al Biól. Roberto Chavira del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por el apoyo constante e incondicional brindado para la medición de hormonas esteroides.

A las M. en C. Claudia Cipactli Ortega y Adriana Cabrera, por su gran ayuda en los cultivos celulares.

A Gabriela Dávila por su apoyo en el cultivo celular.

Al laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia de la UMIEZ, en especial al Dr. Edelmiro Santiago y a la Mtra. Itzen Aguiñiga por sus enseñanzas y facilidades otorgadas.

Agradezco también a la M.V.Z Adriana Altamirano, responsable del bioterio de la FES Zaragoza por facilitarme los animales utilizados en la presente investigación.

A mis compañeros de la UIBIR Cipa, Adri, Rafa, Natalia, Gaby, Ibeth, Azu, Juanito, Dey, Ely, Rosa y Gaby.

Quiero agradecer al Dr. Francisco Alarcón por su constante apoyo otorgado a lo largo de éste trabajo.

A la UAM y a todos los profesores y compañeros de la Maestría en Biología experimental que me acogieron e hicieron sentir parte de esta gran institución.

## DEDICATORIAS

---

Con todo mi amor a mi esposo Arturo, quien con paciencia, apoyo, compañía y comprensión, me ha motivado siempre a seguir adelante. Le doy gracias a dios por unir nuestros caminos.

Te amo.

A mis padres, Rosa y Andrés. Por su apoyo incondicional y por nunca perder la fe en mí. Mi más grande ejemplo de amor y superación. Gracias a dios por tenerlos a mi lado.

Los amo.

A mi niña, Rosa. Porque en todo momento estás conmigo y alegras mi vida. Te quiero tanto.

Con especial cariño a mi abuelita Reme, gracias por todo lo que ha hecho por mí.

A la memoria de mi querido suegro Arturo. Como nos hace falta, lo extraño.

Con cariño y gratitud a la Dra. Patricia Rosas Saucedo. Por su guía, consejos, paciencia y sobretodo su sincera amistad.

A mis amigos Cipa, Azu y Juanito, gracias por su constante ayuda y amistad.

**ÍNDICE**

RESÚMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
MARCO TEÓRICO.....	1
EL OVARIO.....	1
FOLÍCULO OVÁRICO.....	2
CÉLULAS DE LA TECA.....	3
ESTEROIDOGÉNESIS.....	5
TIMULINA.....	11
RELACIONES NEUROENDOCRINAS ENTE LA TIMULINA Y EL SISTEMA REPRODUCTOR.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44



## RESUMEN

La timulina es un nonapéptido sintetizado exclusivamente por las células retículo epiteliales del timo. Participa en la regulación de las funciones reproductoras de manera estimulante en todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. *In vitro* la timulina estimula la secreción de  $17\beta$ -estradiol por células de la granulosa. Cuando a estas células se les adiciona FSH, la timulina estimula la secreción tanto de progesterona como de  $17\beta$ -estradiol. Con base en estos antecedentes, en el presente estudio se analizó la posible participación de la timulina en la regulación de la biosíntesis de andrógenos por células de la teca del ovario de ratón

Se utilizaron ratones hembra prepúberes de la cepa CD1 de 20 días de edad, inyectados con 5 u.i. de gonadotropina coriónica equina (eCG), sacrificados a las 48 h. Se extrajeron los ovarios de manera aséptica y se colocaron en medio de cultivo. Las células de la teca se obtuvieron por gradientes discontinuos de Percoll. En cajas de cultivo se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml de medio DMEM/Ham-F12 suplementado y se incubaron a 37 °C. A las 24 h se cambió el medio de cultivo y los cultivos se dividieron entre las variables requeridas según el diseño experimental.

En todos los ensayos se contó con un grupo sin tratamiento (secreción basal) y se realizaron tres ensayos por triplicado. Se cuantificaron las cantidades de progesterona y androstenediona en el medio de cultivo por quimioluminiscencia.

Para determinar la concentración efectiva al 50% ( $CE_{50}$ ) de la hormona luteinizante (LH) que estimula la secreción de progesterona y androstenediona *in vitro*, los cultivos se incubaron con diferentes concentraciones de LH (0, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 y 75 ng/ml) durante 24 h. El aumento en la secreción de progesterona y androstenediona fue similar con todas las concentraciones de LH utilizadas, por lo que se consideró 12.5 ng/ml como la  $CE_{50}$  de LH.

En los cultivos de células de la teca incubados por 24 h con concentraciones crecientes de timulina (0, 0.001, 0.01 ng/ml) tanto la secreción de progesterona como de androstenediona fueron inhibidas al adicionar 0.001 ng/ml de timulina. La adición de 0.01 ng/ml de timulina, resultó en la inhibición de la secreción de androstenediona y no se modificó la de progesterona.

En las células de la teca incubadas con 12.5 ng/ml de LH y 0.001 ó 0.1 ng/ml de timulina la secreción de progesterona y de androstenediona fue menor que la estimulada con LH.

A partir de los resultados obtenidos, proponemos que en las células de la teca de los ovarios de ratón, la timulina regula de manera inhibitoria la secreción de la progesterona y androstenediona, tanto en condiciones basales como estimuladas con LH.

**ABSTRACT**

Thymulin is a nonapeptide synthesized exclusively by thymic epithelial cells, participates in the regulation of reproductive functions acting as both inhibitory and stimulatory at all levels of the hypothalamic-pituitary-gonad axis. Thymulin stimulates secretion of the  $17\beta$ -estradiol by granulosa cells *in vitro*. When FSH was added to the incubation medium, progesterone and  $17\beta$ -estradiol secretion increased. Based on this background, the present study analyzed the possible involvement of thymulin in the regulation of androgen biosynthesis by theca cells of the mouse ovary.

CD1 female mice were injected with 5 i.u. of equine chorionic gonadotropin (eCG) at 20 day of age and were sacrificed 48 h later. The ovaries were aseptically removed, and placed in medium. Theca cells were obtained by a discontinuous Percoll gradient.  $1 \times 10^5$  cells/ml of DMEM/Ham-F12 supplemented medium were planted in culture wells and incubated. At the 24 h the medium was changed by a fresh one and after the cultures were divided between the variables required by experimental design.

In all test a group without treatment (basal secretion) was included. Three assays were conducted in triplicate. The amounts of progesterone and androstenedione present in the culture medium were quantified by chemiluminescence method.

To determine the 50% effective concentration ( $CE_{50}$ ) of luteinizing hormone (LH) secretion *in vitro* on progesterone and androstenedione, cultures were incubated with

different concentrations of LH (0, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 and 75 ng/ml) for 24 h. The increase in progesterone and androstenedione concentration was similar for all LH concentrations. Then, 12.5 ng/ml of LH was considered the CE<sub>50</sub> concentration of LH.

Cultured theca were incubated for 24 h with increasing concentrations of thymulin (0, 0.001, 0.01 ng/ml). The secretion of progesterone and androstenedione was inhibited with the concentration of 0.001 ng/ml of thymulin. When the concentration of thymulin was higher, androstenedione secretion was inhibited, while progesterone secretion was similar to basal.

In the theca cells incubated with 12.5 ng/ml of LH and 0.001 or 0.1 ng/ml of thymulin inhibited progesterone and androstenedione secretion.

The results show that in the theca cells of mouse ovaries, thymulin regulates progesterone and androstenedione secretion in an inhibitory way.

## **MARCO TEÓRICO**

### **El ovario**

En la hembra de los mamíferos, el ovario es un órgano pareado cuyas funciones son la producción de gametos viables (ovocitos) y la elaboración de hormonas esteroides y peptídicas necesarias en la regulación de la reproducción (Geneser, 2000; Miller y Leavell, 2001; Domínguez y col., 2003). Estas funciones son reguladas por señales hormonales secretadas por el hipotálamo, la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormonas secretadas por la hipófisis, y las hormona luteinizante (LH), estimulante del folículo (FSH), prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), y señales nerviosas que llegan al ovario por el nervio ovárico superior, el nervio del plexo ovárico y el nervio vago (Morán y col., 2005; Morales y col., 2007; Morales y col., 2012).

En el ovario se describen tres compartimentos (Figura 1) (Audesirk y Audesirk, 1997).

1. Folicular: formado por todos los folículos en diferentes fases de desarrollo.
2. Luteal: formado por los cuerpos lúteos de aquellos folículos que expulsaron al ovocito.
3. Intersticial: formado por las células de la teca interna de los folículos atrésicos que tienen receptores a la LH.

Por lo anterior se considera que el folículo ovárico constituye la unidad estructural y funcional del ovario (Audesirk y Audesirk, 1997).

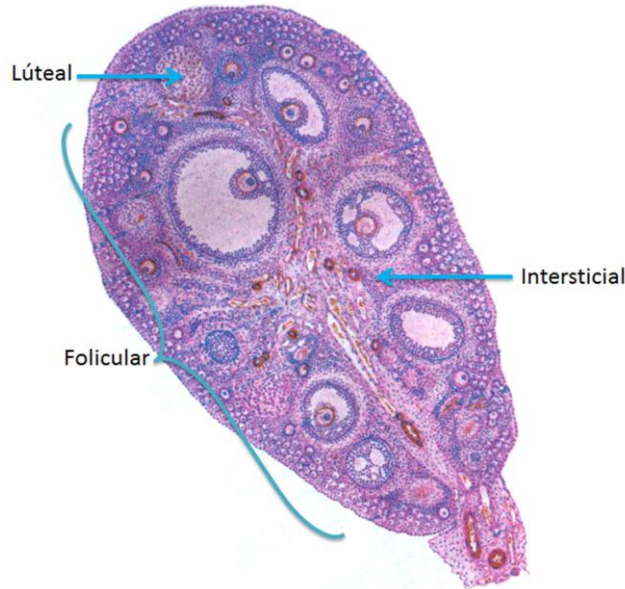


Figura 1. Representación que muestra los tres compartimentos que conforman al ovario (Modificado de <http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/histologia/archivos%20MatDid/Atlas%20Di%20Fiore/difiore.html>)

### Folículo Ovárico

Los folículos son la fuente principal de los distintos tipos de hormonas secretadas por el ovario. Cada folículo está formado por el ovocito, las células de la granulosa, una membrana basal y las células de la teca (Rajkovic y col., 2006).

El ovocito es una célula altamente especializada, con una carga genética diferente a las células somáticas por efectos del entrecruzamiento genético que se produce durante la etapa de diploteno de la primera división meiótica (Guyton y Hall, 2001). El origen de las células de la granulosa es heterogéneo y su nivel de diferenciación poco uniforme (Audesirk y Audesirk, 1997; Yen y Jaffes, 2009). . 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 y que son las más activas como secretoras de estrógenos (Yen y Jaffes, 2009), la antral, células que están más cerca de la cavidad antral, con mayor número de receptores de PRL y con diferente capacidad de respuesta a FSH y GnRH (Domínguez y col., 1991) y el *cumulus*, células que rodean al ovocito y que no presentan actividad de aromatasa (Yen y Jaffes, 2009). Las células de la granulosa presentan receptores de FSH y la unión de esta hormona con sus receptores promueve síntesis de aromatasa que a su vez convierte los andrógenos en estrógenos (Domínguez y col., 1991; Young y McNeilly, 2010).

El ovocito y las células de la granulosa están separados del estroma circundante por la membrana basal (Yen y Jaffes, 2009).

### **Células de la teca**

Alrededor de la membrana basal se encuentran las células de la teca o tecointersticiales que se caracterizan por presentar innervación y vascularización (Domínguez y col., 1991; Ross y col., 2005).

En el ovario de mamíferos las funciones de las células de la teca son:

- 1) Secretar progesterona y andrógenos a la circulación. Parte de los andrógenos son utilizados por las células de la granulosa como substrato aromatizable para la biosíntesis de estrógenos (Vázquez y col., 2010; Ortega y col., 2011, 2012).

- 2) Dar soporte estructural al folículo (Simone y Mahesh, 1993; Domínguez y col., 2003).

Las células de la teca proceden de células precursoras parecidas a fibroblastos dentro del estroma ovárico (Yen y Jaffes, 2009; Young y McNeilly, 2010). Estas células indiferenciadas no expresan receptores de la hormona luteinizante (LHR), por lo que el inicio de la diferenciación de las células de la teca es independiente de las gonadotropinas (Magoffin y Weitsman, 1994).

Las células de la teca se diferencian a partir del momento en que el folículo presenta dos o más capas de células de la granulosa. La teca interna está formada por células mioideas, fibroblastos y células esteroideogénicas. Fuera de la teca interna, se encuentra la teca externa, formada por tejido conectivo que carece de células esteroideogénicas (Merchant y Moreno, 2003). En el momento que se distinguen dos poblaciones de células de la teca, las internas muestran expresión de LHR y su unión a éstos da lugar a la estimulación de la activación y síntesis de las enzimas esteroideogénicas (Honda y col., 2007; Young y McNeilly, 2010).

Las células de la teca presentan características estructurales de células secretoras de esteroides como abundantes mitocondrias con crestas tubulares, evidente retículo endoplásmico liso (REL) y vesículas lipídicas (Magoffin, 2005), lo que se asocia con la esteroideogénesis.



## ESTEROIDOGÉNESIS

Se denomina esteroidogénesis a los cambios sucesivos que se producen en la molécula de colesterol y que dan como resultado la formación de diferentes moléculas que conservan el núcleo ciclo pentanoperhidro fenantreno del colesterol (Figura 2). Durante el proceso de síntesis de hormonas esteroides en el ovario se forman diversas moléculas que actúan como sustrato en la síntesis de otras, hasta aquellas con actividad biológica. En éste proceso participan varios complejos enzimáticos que pertenecen a la misma familia de citocromos P450 (Domínguez y col., 2003; Díaz, 2004; Domínguez y col., 2011).

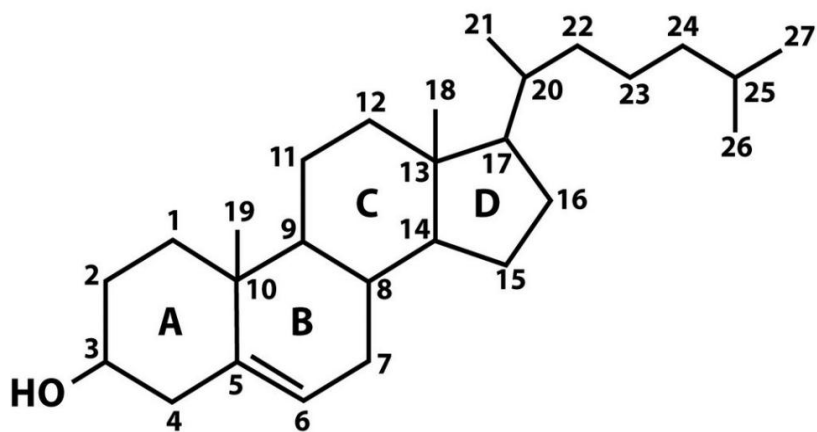


Figura 2. Molécula de colesterol formada por tres anillos ciclohexano (A,B,C) constituyendo un fenantreno, con dos grupos metilo en las posiciones  $\beta$ 18 y  $\beta$ 19, un doble enlace entre los C5 y C6, un hidroxilo en el C3 y un anillo ciclopentano ( anillo D), con una cadena lateral que corresponde a los carbonos 20 a 27, en la posición C17 de su estructura (Tomado de Díaz, 2004; Díaz y Juárez, 2007).

Las células de la teca obtienen el colesterol de cuatro fuentes (Rone y col., 2009):

- 1) Síntesis *de novo* en el REL, a partir de la acetil Co A que se origina del catabolismo de los glúcidos, aminoácidos y ácidos grasos.
- 2) El colesterol almacenado en vesículas lipídicas como ésteres de colesterol.
- 3) Del colesterol sanguíneo ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) por medio de los receptores de tipo “scavenger” B1 (SR-B1) (Hoekstra y col., 2010).
- 4) Del colesterol sanguíneo ligado a las lípoproteínas de baja densidad (LDL) que ingresan a la célula mediante endocitosis.

Aunque las células esteroideogénicas pueden sintetizar colesterol *de novo*, la gran demanda de éste por dichas células, requiere de una eficiente importación de dicha molécula que se obtiene de la dieta y que es transportado por las lipoproteínas (Gwynne y Strauss, 1982).

Las células esteroideogénicas humanas obtienen el colesterol de las LDL, mientras que las de los roedores utilizan el unido a las HDL (Connelly y Williams, 2003; Liu y col., 2000; Vergeer y col., 2011).

El colesterol obtenido de las LDL, LDH, o sintetizado *de novo*, es esterificado y almacenado en vesículas, las que son endocitadas por lisosomas donde se

encuentra la lipasa ácida lisosomal (LAL) que hidroliza a dichos ésteres. La molécula de colesterol liberada por la hidrólisis se une a la proteína Niemann-Pick tipo C2 (NPC2) por el extremo  $3\beta$ -hidroxilo. El complejo formado transfiere el colesterol a la proteína NPC1 y éste se une a la membrana del lisosoma (Friedland y col., 2003; Kwon y col., 2009).

Fuera del lisosoma el colesterol se une a proteínas de transporte, como la proteína transportadora de esteroides 2 ( $SCP_2$ ) y ambos llegan a la membrana externa de la mitocondria (Vahouny y col., 1983) donde el colesterol es tomado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (STAR), la cual lo ingresa a la mitocondria (Steck y Lange, 2010; Horibata y Sugimoto, 2010). En las mitocondrias se encuentra la enzima que escinde la cadena lateral de colesterol (P450 $scc/CYP11A$ ) y oxida el grupo ceto en el C20, dando origen a la molécula de pregnenolona (Figura 3) que es el paso limitante en la síntesis de todas las hormonas esteroides (Domínguez y col., 2011; Miller y Auchus, 2011).

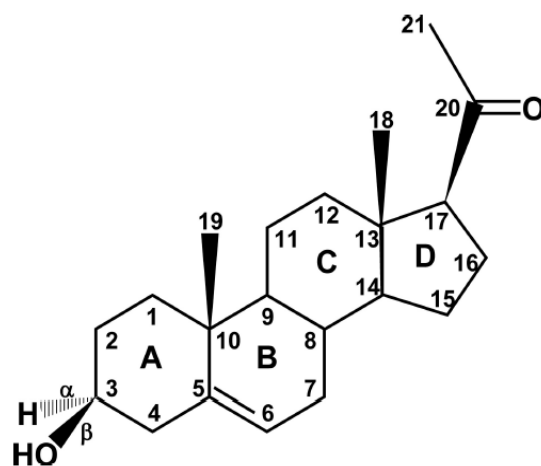


Fig. 3. Estructura química de la pregnenolona. Tomado de Miller y Auchus, 2011.

En las células de la teca la pregnenolona es transportada desde la mitocondria hacia el REL, donde es biotransformada de manera diferencial en función de que se mantenga la doble ligadura en el C5 ( $\Delta^5$ ) o se isomericice al C4 ( $\Delta^4$ ) (Murray y col., 2001; Miller y Auchus, 2011).

La ruta  $\Delta^4$  o de las cetonas es la vía que toman las moléculas esteroideas que tienen el enlace de insaturación entre el C4 y el C5 y un grupo ceto en el C3. En esta vía, las enzimas 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) y la  $\Delta^{4,5}$ isomerasa catalizan la deshidrogenación del grupo 3 $\beta$  hidroxilo ecuatorial (el grupo hidroxilo es sustituido por un grupo cetona) y la subsecuente isomerización del doble enlace, lo que da lugar a la estructura  $\Delta^4$  3-cetona, convirtiendo la pregnenolona en progesterona. Algunas moléculas de progesterona son transportadas en el torrente sanguíneo por la globulina que se une a las hormonas sexuales (SHBG) (Prescott y col., 2012). Otra parte de las moléculas de progesterona son utilizadas como sustrato en la síntesis de andrógenos. La enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP17) incorpora un hidroxilo en el C17, lo que convierte a la progesterona en 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona. Por acción de la C17,20-liasa la molécula de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona pierde los C20 y C21 y el grupo hidroxilo del C17 es oxidado a un grupo cetona, lo que da origen a la androstenediona. En este andrógeno, el grupo cetona del C17 es reducido a un grupo hidroxilo por acción de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD), originando la testosterona (Figura 4) (Yen y Jaffes, 2009; Miller y Auchus, 2011).

En la ruta  $\Delta^5$  la pregnenolona es transformada en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona por acción de la  $17\alpha$ -hidroxilasa que incorpora un hidroxilo en el C17. A partir de este esteroide, la C17, 20-liasa elimina los C20 y C21 y oxida a cetona el hidroxilo del C17 formando la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Figura 4) (Domínguez y col., 2011).

La unión de la LH a sus receptores, estimula la síntesis y la activación (fosforilación) de la STAR, aumenta la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que actúa como segundo mensajero y la expresión de las enzimas  $3\beta$ -HSD,  $17\alpha$ -hidroxilasa y C17,20 liasa (Lavoie y King, 2009; Manna y col., 2009).

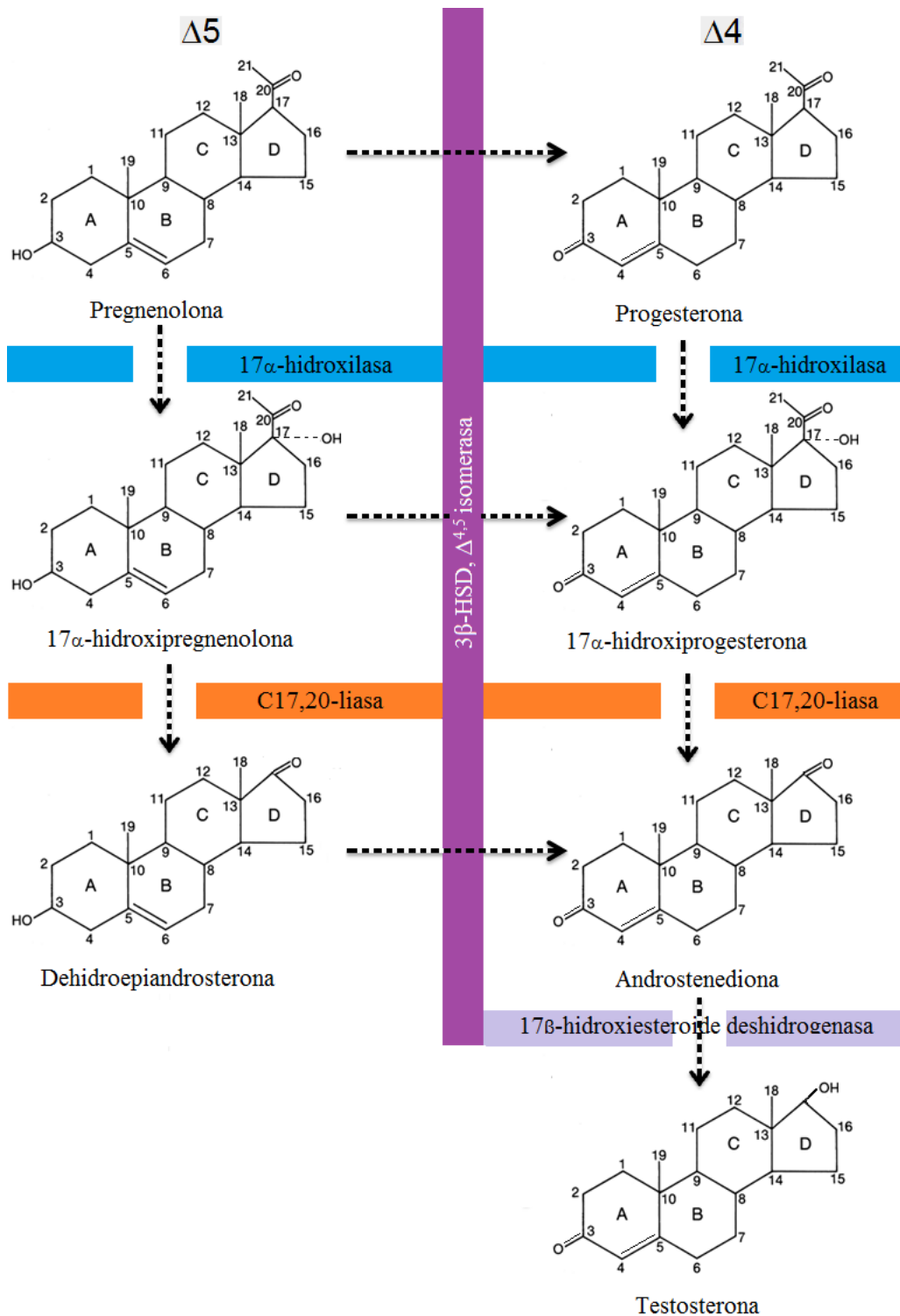


Figura 4. Rutas  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  en la biosíntesis de andrógenos (Tomado y modificado de Murray y col., 2001).

Los andrógenos salen de las células de la teca y, al igual que la progesterona, siguen dos rutas diferentes. Una endocrina donde unidos a las SHBG son transportados por el torrente sanguíneo y otra paracrina en la cual moléculas de androstenediona y testosterona atraviesan la membrana basal y son incorporadas al citoplasma de las células de la granulosa, donde por efectos del complejo P450 aromatasa, pierden el C18; El anillo A se transforma en un anillo fenólico y los grupos cetónicos son reducidos a grupos hidroxilos. La síntesis del complejo P450aromatasa es regulada inicialmente por la unión de la FSH a su receptor, lo que estimula la transcripción del gen que codifica para este complejo (Díaz, 2004).

## **TIMULINA**

La timulina es un nonapéptido que, a diferencia de otras timosinas, es sintetizado exclusivamente por las células retículo-epiteliales del timo (Bach y col., 1977; Pléau y col., 1977, 1981; Dardenne y Bach., 1981; Jambon y col., 1981) y atraviesa la barrera hematoencefálica (Bach y Dardenne, 1984). Para que la molécula tenga actividad biológica, debe acoplarse al ión zinc en una relación equimolecular (Dardenne y col., 1985; Reggiani y col., 2009a,b). En hombres de 20 años la concentración de timulina en el suero es de 1500 fg/ml, en la rata y el ratón adulto la concentración es de aproximadamente 600 fg/ml (Safieh y col., 1990).

Las células retículo-epiteliales del timo presentan receptores membranales a varias hormonas que estimulan la secreción de timulina: hormona de crecimiento (Timsit y

col., 1992; Goya y col., 1994), PRL (Dardenne y col., 1989, 1991), triyodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ) (Goya y col., 1993; Brown y col., 1998). La timulina autoregula su propia secreción de manera estimulante o inhibitoria en función de la concentración que alcance en el medio (Savino y col., 1983).

La timulina se une a su receptor en la membrana celular y activa a la fosfolipasa C que cataliza la conversión de fosfatidil inositol bifosfato ( $PIP_2$ ) en inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) que actúan como segundos mensajeros (Hanley y Steiner, 1989). Según Pléau y col. (1980), en los linfocitos existen dos tipos de receptores a timulina con  $K_d$  de 3.5 nM y 110 nM, lo que equivale a  $4.8 \times 10^4$  y  $8 \times 10^5$  sitios de unión por célula.

La timulina también activa las proteínas G lo que resulta en la conversión del monofosfato de guanósina (GMP) y el monofosfato de adenosina (AMP) en GMP cíclico (GMPc) y AMPc que actúan como segundos mensajeros. Éstos activan a las proteínas cinasas (PKs) que se encuentran en el citoplasma. Las PKs activas entran al núcleo y fosforilan factores de transcripción que, dependiendo de las características y necesidades de la célula, regulan la expresión de genes que codifican para la síntesis de proteínas, receptores o enzimas (Brown y col., 2000).

Existe una relación funcional bidireccional entre la timulina y el sistema neuroendocrino. En niños con deficiencia congénita en la producción de la GH, la concentración de timulina en el suero es menor que en los niños sanos y la inyección de GH normaliza su concentración (Mocheeggiani y col., 1996).



En adultos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el tratamiento con GH incrementa la masa tímica, induce la producción *de novo* de células T y facilita la recuperación de T CD4+ (Napolitano y col., 2008).

Los ratones de 29 meses de edad presentan concentraciones bajas de timulina en sangre, la inyección de la GH ovina incrementa las concentraciones de timulina llegando a valores similares a los de ratones de 16 a 18 meses de edad (Goya y col., 1993).

*In vitro*, la GH estimula la liberación de timulina por las células epiteliales del timo (Timsit y col., 1992). En estudios *in vivo* e *in vitro* se muestra que la timulina estimula la secreción de la GH (Goya y col., 1994; Brown y col., 1999).

La estimulación *in vivo* o *in vitro* de las células epiteliales del timo con PRL resulta en el aumento de la secreción de timulina (Dardenne y col., 1989). A su vez, la timulina estimula la liberación de PRL (Goya y col., 1994) y esta liberación es mayor cuando las células de adenohipófisis son obtenidas de animales jóvenes (Brown y col., 1998).

En ratas de diferentes edades, la inyección de T<sub>3</sub> incrementa la concentración de timulina en el plasma (Dardenne y col., 1988). En rata y ratones con hipotiroidismo la concentración de timulina en el suero es menor que en los sanos, al igual que el número de células retículo epiteliales que la contienen. El tratamiento con T<sub>3</sub> induce un incremento en la concentración sérica de timulina y en el número de células

epiteliales tímicas (CET) (Savino y col., 1984). En estudios *in vitro*, se observó que las hormonas tiroideas estimulan la secreción de timulina por una acción directa sobre las CET (Mocchegiani y col., 1990).

En células de adenohipófisis *in vitro* el tratamiento con la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y timulina, estimula de manera sinérgica la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Brown y col., 1998).

## **RELACIONES NEUROENDOCRINAS ENTRE LA TIMULINA Y EL SISTEMA REPRODUCTOR**

En el estudio de las interacciones entre la timulina y el sistema reproductor, se han utilizado varios modelos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

**El ratón congenitamente atímico (nu/nu).** Las características de este ratón son alopecia (nu/nu), carencia de timo, baja fertilidad o infertilidad (Flanagan, 1966), retraso en el inicio de la pubertad y en la primera ovulación (Besedovsky y Sorkin, 1974), elevada frecuencia de atresia folicular (Lintern–More, 1977) y concentraciones de gonadotropinas y estradiol menores que las de los animales con timo (Rebar y col., 1981).

Los ratones atímicos también se caracterizan por presentar menor número de neuronas que secretan GnRH y de células hipofisarias que secretan gonadotropinas.

En este modelo, la terapia génica neonatal con genes que codifican para la timulina (NTGT), previene estas alteraciones y evita la deficiencia ovárica prematura, las bajas concentraciones de estrógenos y el retraso en el inicio de la pubertad (Reggiani y col., 2012).

**El ratón timectomizado.** En el ratón, la timectomía realizada a los 10 días de edad resulta en características similares a las del ratón atímico como: retraso en el inicio de la pubertad, aumento de la atresia folicular, bajas concentraciones de estradiol y disminución de la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico. La inyección diaria de timulina inmediatamente después de la extirpación del timo, restablece todos estos parámetros (García y col., 2000).

**El ratón intacto.** En el ratón intacto prepúber tratado con la gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG), en una concentración que no induce la ovulación, la administración sistémica de timulina 24 horas antes de la PMSG, resulta en superovulación (Hinojosa y col., 1999).

La timulina ejerce sus efectos en cada uno de los componentes del eje hipotálamo-hipofisario-ovario. En el ratón prepúber, la anestesia con éter bloquea la ovulación inducida por eCG, y la microinyección de timulina en el hipotálamo medio o en la hipófisis, restablece la respuesta ovulatoria frente al estímulo gonadotrópico (García y col., 2005). La inyección de timulina en la bursa ovárica del ratón prepúber,

aumenta la cuota ovulatoria y la secreción de estradiol en respuesta a la administración de gonadotropinas (Reyes, 2010; Loaiza y col., 2010).

**Las células de hipófisis en cultivo.** En hipófisis de rata, la timulina estimula la liberación de LH (Zaidi y col., 1988). En cultivo de células de adenohipófisis, la adición de timulina estimula la secreción de gonadotropinas a valores similares a los obtenidos con el estímulo de GnRH, efecto que se potencia al co-cultivar las células con timulina y GnRH (Brown y col., 2000).

La adición de timulina al cultivo de células de adenohipófisis, estimula o inhibe la liberación de las gonadotropinas en función del día del ciclo estral en el cual se encontraban los animales al momento del sacrificio, efecto que es modulado por los esteroides sexuales (Hinojosa y col., 2004; Ortega, 2007).

**Las células de la granulosa en cultivo.** En células de la granulosa de ovarios de cerda, la timulina estimula la actividad aromatasa, así como la capacidad de respuesta de enzimas que participan en la síntesis de progesterona ante el estímulo de LH (Ledwitz y Scheid, 1990). En cultivos de células de la granulosa de ratón, la adición de timulina resulta en aumento en la secreción de estradiol (Cabrera y col., 2010), si se agregan timulina y FSH aumenta la secreción del esteroide (Cabrera, 2012).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de los antecedentes mencionados, se sugiere que la timulina estimula la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ya que tanto *in vivo* como *in vitro*, la timulina estimula la secreción de gonadotropinas por la hipófisis, mientras que en el ovario, estimula el crecimiento folicular, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides y actúa directamente sobre las células de la granulosa, incrementando la secreción de estradiol.

La información sobre la participación de la timulina en la regulación de la secreción de esteroides por las células teca-intersticiales del ratón prepúber es escasa. Por ese motivo, en este proyecto se decidió estudiar, en un modelo *in vitro*, el efecto de la timulina sobre las células de la teca y su participación en la regulación de la secreción de andrógenos.

## **HIPÓTESIS**

Si en presencia de androstenediona, la timulina incrementa la síntesis y liberación de estradiol por las células de la granulosa en cultivo y su inyección en la bursa ovárica estimula la secreción de estradiol, lo que puede interpretarse como un efecto directo de la timulina en todos los compartimientos del ovario, entonces la adición de timulina en un cultivo de células de la teca interna estimulará la síntesis de progesterona y androstenediona como sustratos en la síntesis de estradiol.

## OBJETIVOS

### General

Analizar el papel de la timulina en la regulación de la secreción *in vitro* de progesterona y androstenediona por las células de la teca interna de los ovarios de ratón.

### Particulares

- Determinar la concentración efectiva al 50% (CE<sub>50</sub>) de la LH en la secreción *in vitro* de progesterona y androstenediona por las células de la teca.
- Analizar los efectos de diferentes concentraciones de timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona en las células de la teca.
- Estudiar los efectos de la timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona por las células de la teca estimuladas con LH.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Obtención de células de la teca***

Se utilizaron 60 ratones hembra prepúberes de 20 días de edad de la cepa CD1 (Harlan, México), mantenidos en bioterio libre de patógenos específicos, bajo condiciones de fotoperiodo (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad relativa (40%) controladas, agua y alimento *ad libitum*.

Las células de la teca se obtuvieron de los ovarios de animales que se inyectaron por vía subcutánea con 5 u.i. de eCG (Hinojosa y col., 1999; Cabrera, 2012) para estimular el desarrollo de folículos antrales. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical 48 h después de la estimulación gonadotrópica, esto es antes de que ocurra la ovulación y así evitar la presencia de cuerpos lúteos.

Se extrajeron los ovarios de manera aséptica y se pasaron a una caja Petri con 5 ml de medio Leibovitz L15 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). En la campana de bioseguridad y bajo el microscopio estereoscópico se eliminaron la grasa y la bursa que cubren los ovarios. Se trasladaron a una caja Petri con medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle, mezcla nutriente F-12 HAM (DMEM/F-12 HAM vol. 50/50) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) ajustado a pH 7.6, suplementado con 10% de suero fetal de bovino (GIBCO, México), 1% de antibiótico, 10  $\mu\text{g/ml}$  de insulina (GIBCO) y 1 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich). Posteriormente se puncionó el ovario, se colectaron los fragmentos de tejido por aspiración con una



pipeta y se colocaron en una mezcla de digestión compuesta por colagenasa (Sigma-Aldrich) 4 mg/ml (200  $\mu$ l), BSA (EQUITECH) 10 mg/ml (100  $\mu$ l), DNasa (Sigma) 10  $\mu$ g/ml (100  $\mu$ l) y medio 199 (Sigma) (300 $\mu$ l).

Los fragmentos se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda y saturada con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, por 60 min. Cada 20 min los fragmentos fueron homogeneizados pasándolos repetidamente por la punta de una pipeta de precisión hasta no detectarlos.

En un tubo cónico de 10 ml se preparó un gradiente de Percoll (Sigma) con dos fases: la primera de Percoll pesado (2000  $\mu$ l) compuesto por la mezcla de Percoll (880  $\mu$ l), medio 199 (920 $\mu$ l), Hepes 250 mM (200 $\mu$ l); y la segunda de Percoll ligero (1995.6  $\mu$ l) formado por Percoll (75.6  $\mu$ l), Hepes 250 mM (200 $\mu$ l), BSA 100 mg/ml (20 $\mu$ l), M199 con 150 mM de NaCl (1.7 ml). Se vertió el Percoll ligero sobre el pesado evitando que se mezclaran, al final se agregó el homogenado celular y se centrifugó a 400 rpm por 25 min.

Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiraron las células de la teca que se localizaban entre el Percoll pesado y el ligero procurando extraer la menor cantidad de Percoll. Posteriormente se lavaron las células colocándolas en un tubo eppendorf con 1 ml de DMEM-F12 (GIBCO), se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, se eliminó el medio y se re-suspendieron en medio fresco.

### **Cultivo de células de la teca**

De la suspensión celular se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l de medio-células; las células fueron teñidas con 20  $\mu$ l de azul tripano al 0.5% para medir la viabilidad, posteriormente se realizó un conteo en un hematocitómetro para obtener una concentración final de  $1 \times 10^5$  células/ml. Las células se sembraron en placas de cultivo, calidad cultivo de tejidos (Nalgen Nunc Internacional, Rochester, NY, USA) y se incubaron por 24 h, seguido por un cambio de medio por medio fresco (DMEM) y se adicionó el tratamiento a cada grupo celular según indica el diseño experimental. Las células se dejan 24 h más al término de las cuales se colectó el medio (León y col., 2009; Rzepezyńska y col., 2010., Vázquez y col., 2010) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de las concentraciones de progesterona y de androstenediona por quimioluminiscencia.

**Diseño experimental.** De todos los experimentos se realizaron tres ensayos, cada uno por triplicado.

#### **1. Determinar la concentración efectiva al 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) de la LH en la secreción de progesterona y androstenediona.**

Para la determinación de la  $\text{CE}_{50}$  de LH se realizó una curva dosis-efecto. Grupos de células de la teca pre-incubadas por 24 h, fueron estimuladas durante 24 h con concentraciones crecientes de LH (12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 y 75 ng/ml), con base en las metodologías propuestas por Taylor y colaboradores (1997); Duleba y

colaboradores (1999) y Ortega y colaboradores (2012). Al finalizar se colectó el medio de cultivo y se cuantificó las cantidades de progesterona y androstenediona por quimioluminiscencia. Con base en los resultados, se determinó como  $CE_{50}$  la de 12.5 ng/ml.

**2. Analizar los efectos de diferentes concentraciones de timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona.**

Grupos de células de la teca preincubadas por 24 h, se estimularon con concentraciones crecientes de timulina (Sigma-Aldrich) (0.001, 0.01, 0.1, y 1 ng/ml) durante 24 h, según la metodología habitual del laboratorio. Se colectó el medio de cultivo y se cuantificaron las concentraciones de progesterona y androstenediona por quimioluminiscencia.

**3. Analizar los efectos de la timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona en células de la teca estimuladas con LH.**

. Con base en los resultados del experimento anterior, se decidió utilizar las dosis de 0.001 y 0.01 para conocer si la timulina y la LH tienen efectos sinérgicos sobre las células de la teca, en la secreción de progesterona y androstenediona. A células de la teca preincubadas por 24 h se les adicionaron 12.5 ng/ml de LH y 0.001 ó 0.1 ng/ml de timulina y se incubaron por 24 h. Se colectó el medio y se midió la concentración de progesterona y androstenediona por quimioluminiscencia.

### ***Cuantificación de progesterona y androstenediona por quimioluminiscencia***

Las cantidades de progesterona y androstenediona en el medio de cultivo, fueron medidas por un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida (COAT COUNT) en un equipo IMMULITE® 1000 Systems (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Alemania). Los límites de detección fueron de 0.02 a 20 ng/ml para progesterona y de 0.3 a 10 ng/ml para androstenediona. Los coeficientes de error interensayo e intraensayo presentaron variaciones de 8.41% y 7.97% para progesterona y para androstenediona de 7.01% y 6.83%.

### ***Análisis estadístico***

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  e.e.m. Los datos de las concentraciones de progesterona y androstenediona fueron analizados por un análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguido por la prueba de Tukey, o al análisis de correlación lineal de Pearson. Cuando se compararon dos grupos se utilizó la prueba de “t” de Student. Se consideraron como significativos aquellos resultados cuya probabilidad fue igual o menor al 5% (Marques, 2001).

## RESULTADOS

**1. Determinación de la concentración efectiva al 50% (CE<sub>50</sub>) de la LH en la secreción de progesterona y androstenediona por las células de la teca.**

En las figuras 5 y 6, se muestran los resultados de los efectos de agregar diferentes concentraciones de LH sobre la concentración de progesterona y androstenediona en el medio de cultivo. Se observó un aumento significativo de la liberación de ambas hormonas, independientemente de la dosis adicionada. Por lo que se decidió utilizar la concentración de 12.5 ng/ml de LH.

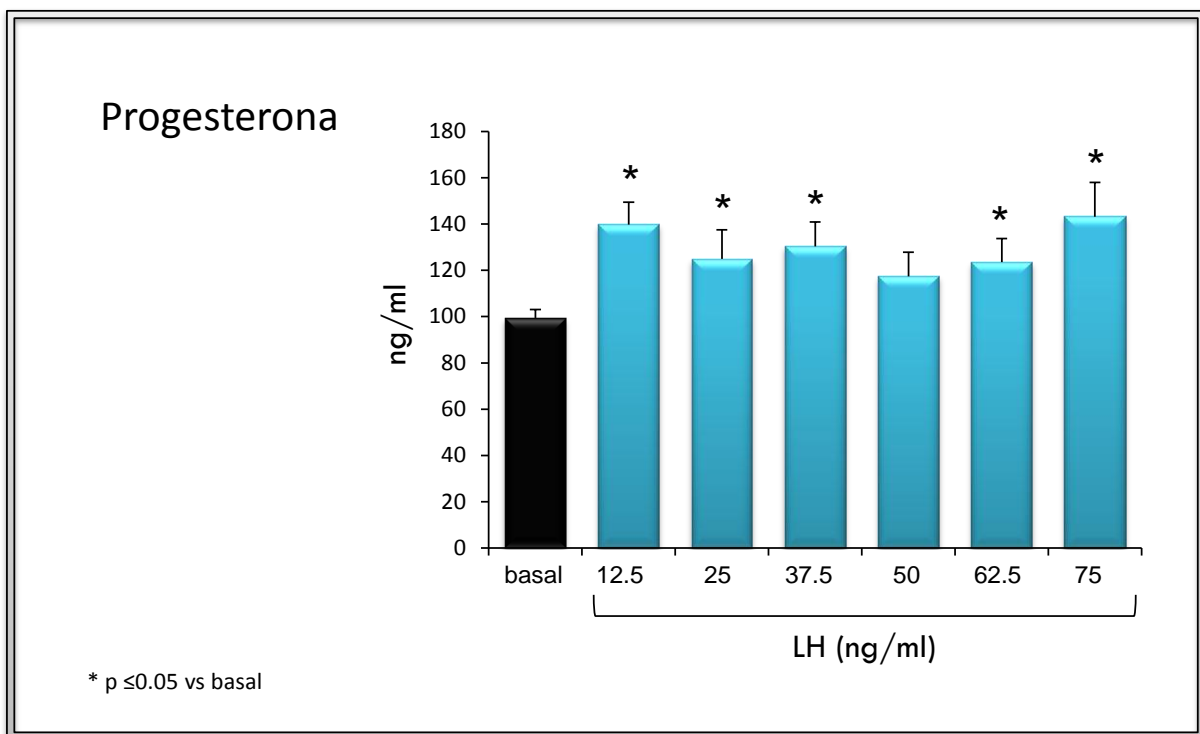


Figura 5. Media ± e.e.m. de la concentración de progesterona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón. Las células se incubaron por 24 h en presencia de dosis crecientes de LH y sin tratamiento (basal).

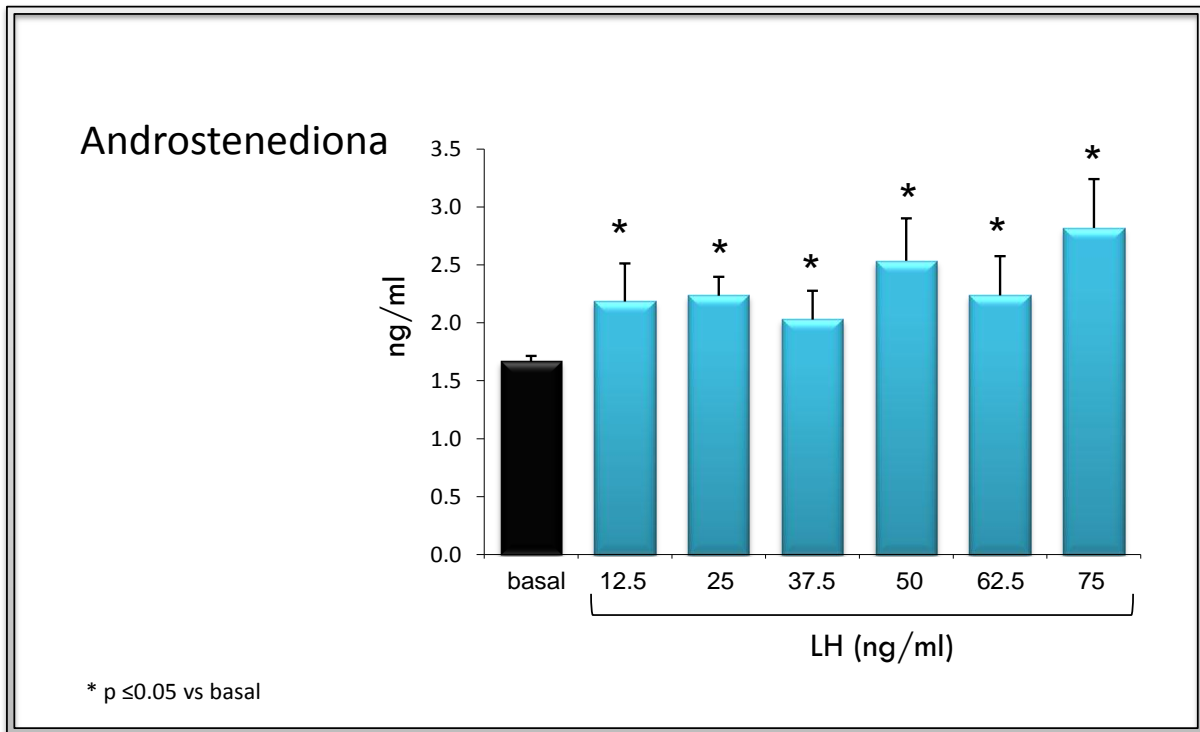


Figura 6. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de androstenediona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón. Las células se incubaron por 24 h en presencia de dosis crecientes de LH y sin tratamiento (basal).

**2. Efectos de diferentes concentraciones de timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona por las células de la teca.**

La concentración de progesterona en el medio de cultivo de las células tratadas con 0.001 ng/ml de timulina, fue menor que la secreción basal (Figura 7).

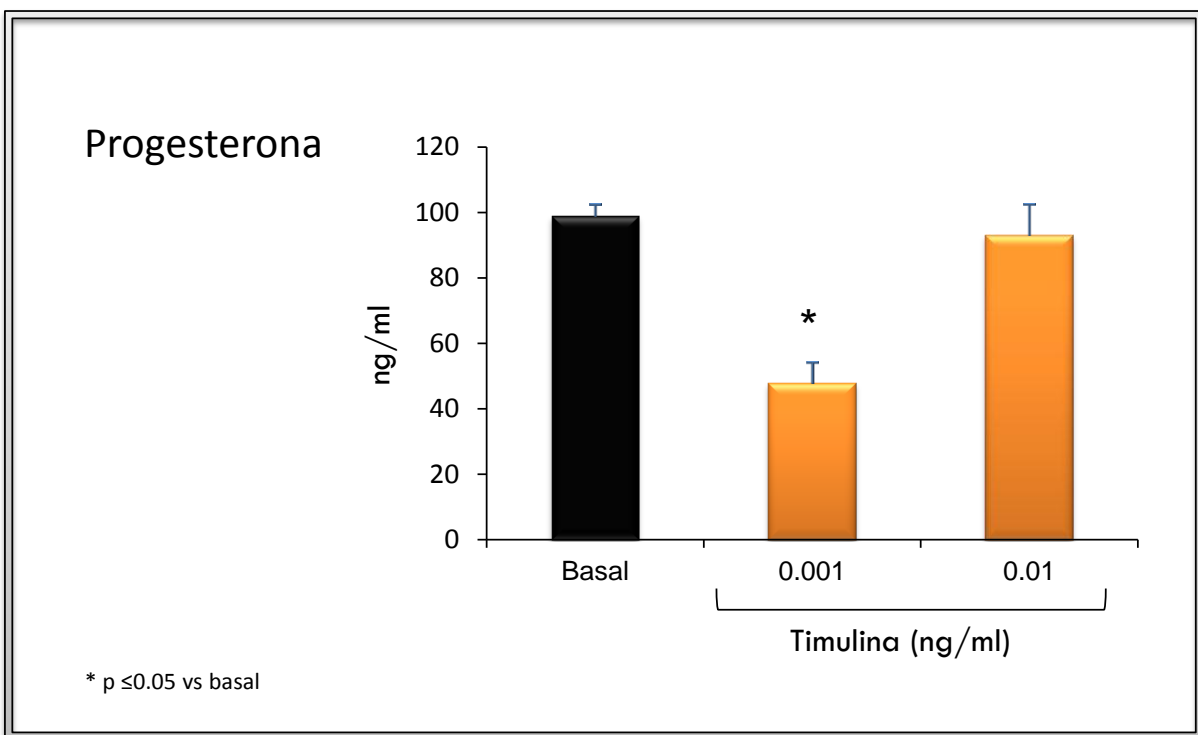


Figura 7. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón. Las células se incubaron por 24 h en presencia de timulina y sin tratamiento (basal).

La concentración de androstenediona fue menor en el medio de cultivo tanto de las células tratadas con 0.001 como las tratadas con 0.01 ng/ml de timulina respecto a la secreción basal (Figura 8).

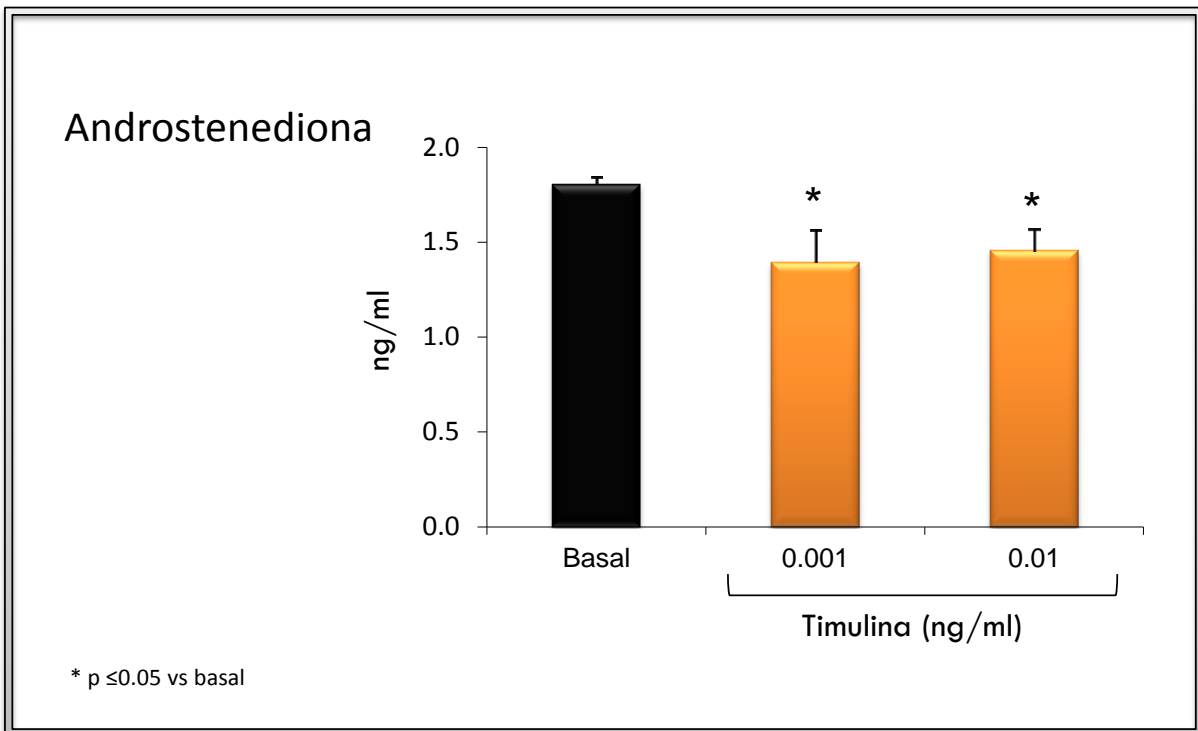


Figura 8. Media ± e.e.m. de la concentración de androstenediona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón. Las células se incubaron por 24 h en presencia de timulina y sin tratamiento (basal).



**3. Efectos de la adición de timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona en células de la teca estimuladas con LH.**

En las figuras 9 y 10 se muestra que la secreción de progesterona y androstenediona estimuladas con LH (12.5 ng/ml) disminuyeron significativamente cuando la LH se adicionó junto con la timulina, independientemente de la concentración empleada. Sin embargo, la concentración de progesterona duplica la observada en las células estimuladas sólo con timulina ( $88.4 \pm 16.6$  vs.  $47.9 \pm 6.2$ ), lo que no ocurrió con la concentración de androstenediona ( $1.3 \pm 0.07$  vs.  $1.4 \pm 0.16$ ).

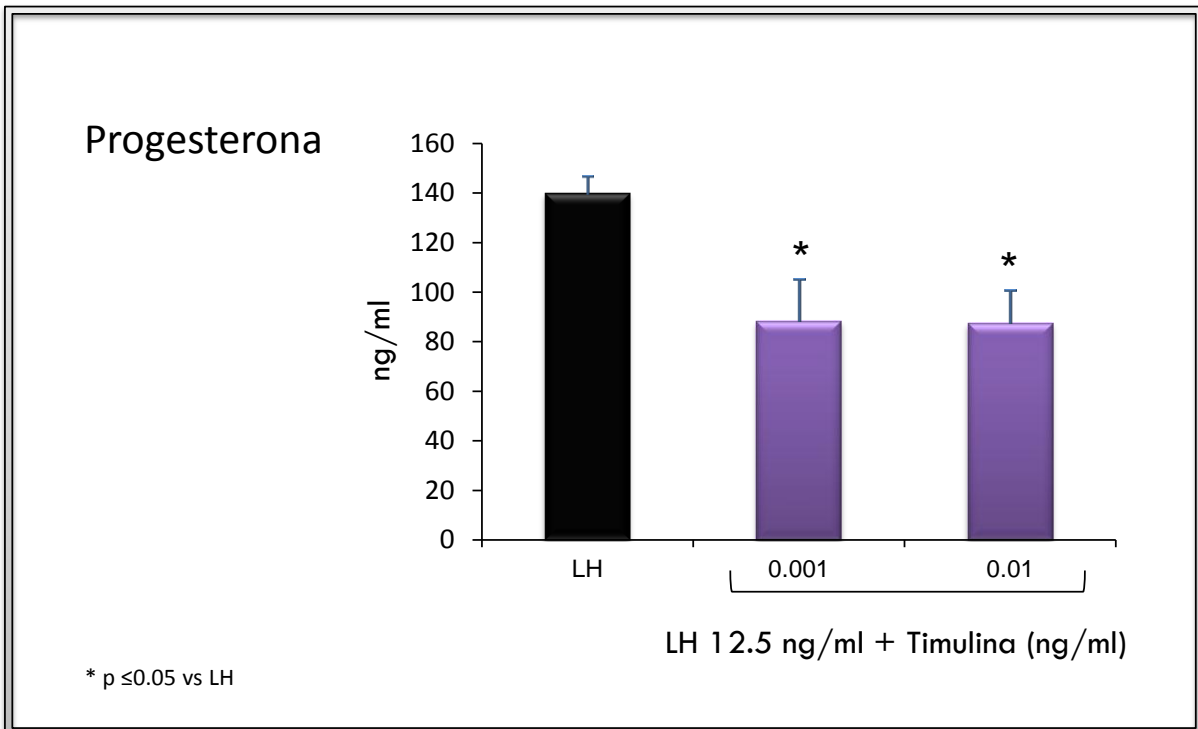


Fig. 9. Media ± e.e.m. de la concentración de progesterona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón estimuladas con 12.5 ng/ml de LH, tratadas con timulina y sin tratamiento.

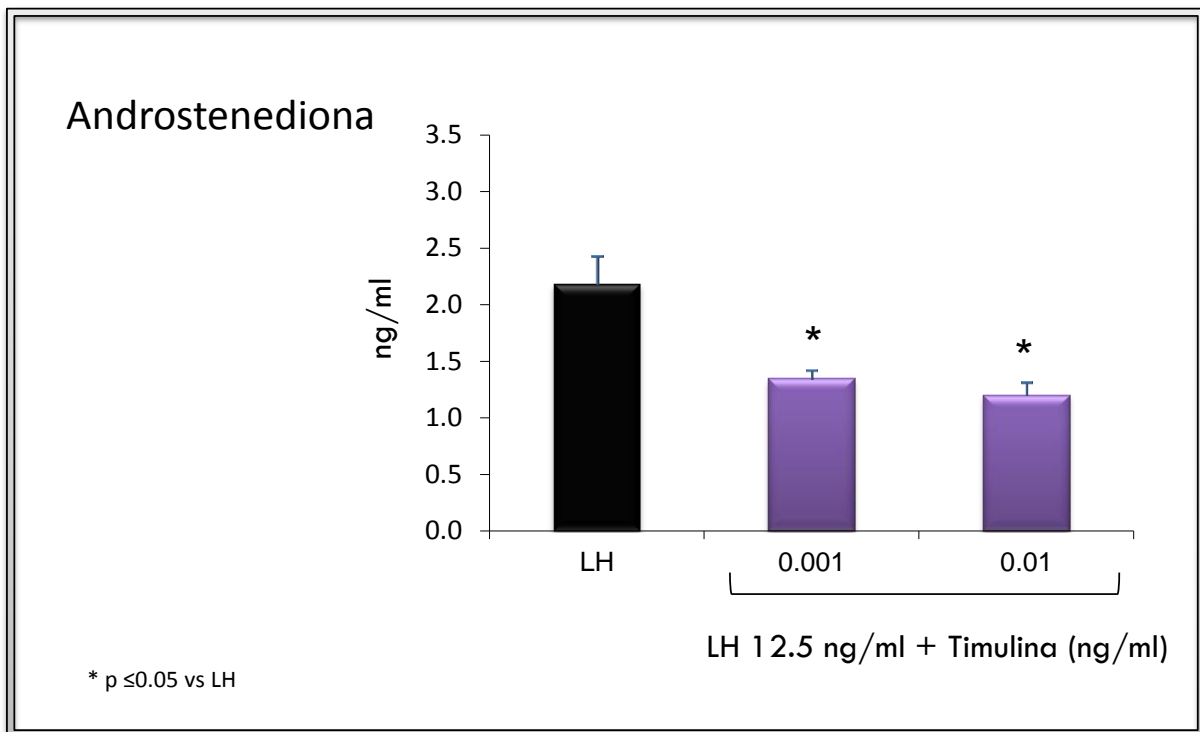


Fig. 10. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de androstenediona en el medio de cultivo de células de la teca de los ovarios de ratón estimuladas con 12.5 ng/ml de LH, tratadas con timulina y sin tratamiento.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la adición de concentraciones bajas de timulina a las células de la teca del ovario de ratón, regulan de manera inhibitoria la secreción *in vitro* de progesterona y androstenediona en ausencia o presencia de LH. En cambio, cuando las concentraciones son más elevadas, la secreción de progesterona no se modifica, mientras que la de androstenediona permanece baja.

En las células de la teca, la LH estimula la expresión de las proteínas StAR, 3 $\beta$ -HSD y 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa (*CYP17*) (Lavoie y King, 2009; Manna y col., 2009) y por ello la secreción de progesterona y androstenediona (Duleba y col., 1999; Solovyeva y col., 2000; Fukuda y col., 2009; Ortega y col., 2012). Esta respuesta depende del número de receptores a LH presentes en la célula (Ojeda y Skinner, 2006). Dado que en nuestro caso el aumento de la secreción de progesterona y androstenediona fue similar de la mínima a la máxima concentración de LH evaluada, se propone que al agregar la concentración de 12.5 ng/ml de LH, se ocuparon todos los receptores a la hormona.

Murayama y colaboradores (2012) observaron que el agregado de LH en concentraciones bajas al cultivo de células de la teca de ovejas, estimula la expresión del ARNm de StAR y *CYP17* y aumenta la secreción de progesterona y androstenediona. En cambio, el agregado de concentraciones altas de LH aumenta

la expresión del ARNm de *CYP17* y la producción de androstenediona. Los autores proponen que la intensidad de la señal de LH regula la producción de progesterona y androstenediona vía la acetilación de histonas con regiones promotoras a factores de transcripción para StAR o *CYP17*. Los resultados de nuestro estudio muestran que a diferencia de lo observado en el cultivo de células de la teca de oveja, en el ratón el agregado de concentraciones bajas o altas de LH, siempre se traduce en el aumento de la secreción de progesterona y androstenediona. Estas diferencias podrían ser explicadas por tratarse de dos especies diferentes.

Estudios *in vitro* con células de la granulosa de cerda muestran que la timulina estimula la secreción de estradiol (Ledwitz y col., 1990). En cultivos de células de la granulosa de ovarios de ratón, la adición de timulina en dosis cercanas a la fisiológica (0.001 ng/ml) incrementa la secreción de 17 $\beta$ -estradiol, efecto que sería regulado por la vía de las PKs (Cabrera, 2012). Los resultados del presente estudio muestran que en las células de la teca, la timulina en la misma concentración inhibe la secreción de progesterona y androstenediona, por lo que se propone que los efectos de la timulina son estimulantes o inhibitorios en función de la célula o tejido en estudio.

La biosíntesis de hormonas esteroideas por las células de la teca es regulada por proteínas transportadoras y por enzimas que son activadas por diversos factores (Duleba y col., 1999; Magoffin, 2005; Young y McNelly, 2010; Ortega y col., 2011). En el proceso de biosíntesis, el complejo hormona-receptor desencadena la liberación de los segundos mensajeros por la vía de las PKs que fosforilan factores

de transcripción que codifican para proteínas y enzimas encargadas de la biotransformación de progesterona y androstenediona (Chedrese y Bertorello, 2009).

En células de la teca de ratas prepúberes, la activación de la vía PKC bloquea la biosíntesis de esteroides (Hofeditz y col., 1988). Según Beshay y colaboradores (2007) la PKC disminuye la expresión de genes de reacción rápida como el cFOS y de factores de transcripción, lo que explicaría la disminución de la secreción de androstenediona. Dado que según Hanley y Steiner (1989), la timulina activa la PKC, la disminución en la secreción de androstenediona observada en los cultivos adicionados con timulina, podría ser explicada por la activación de esta vía.

En las figuras 11, 12, 13 y 14, se plantean los modelos teóricos que explicarían las acciones de la LH, timulina y LH-timulina en la regulación de la síntesis de progesterona y androstenediona por parte de las células de la teca, con base en los presentes resultados y en los propuestos por otros autores (Pléau y col., 1980; Hofeditz y col., 1988; Hanley y Steiner, 1989; Taylor y col., 1997; Duleba y col., 1999; Wu y col., 2003; Chaturvedi y col., 2004; Maggoffin, 2005; Chedrese y Bertorello, 2009; Young y McNeilly, 2010; Ortega y col., 2012).

**Modelo que explica la posible vía por la cual la LH estimula la secreción de progesterona y androstenediona (Figura 11).**

1. *In vitro* la célula de la teca secreta de manera espontánea progesterona y androstenediona por activación de factores de transcripción vía la PKA.
2. Las células de la teca tienen receptores a LH de alta y baja afinidad.
3. Dado que no se observaron diferencias en las cantidades de progesterona y androstenediona secretadas al medio en función de la concentración de LH agregada, se propone que la LH se une a todos los receptores de alta afinidad, lo cual resulta en el aumento de la PKA y por ende de la progesterona y androstenediona.

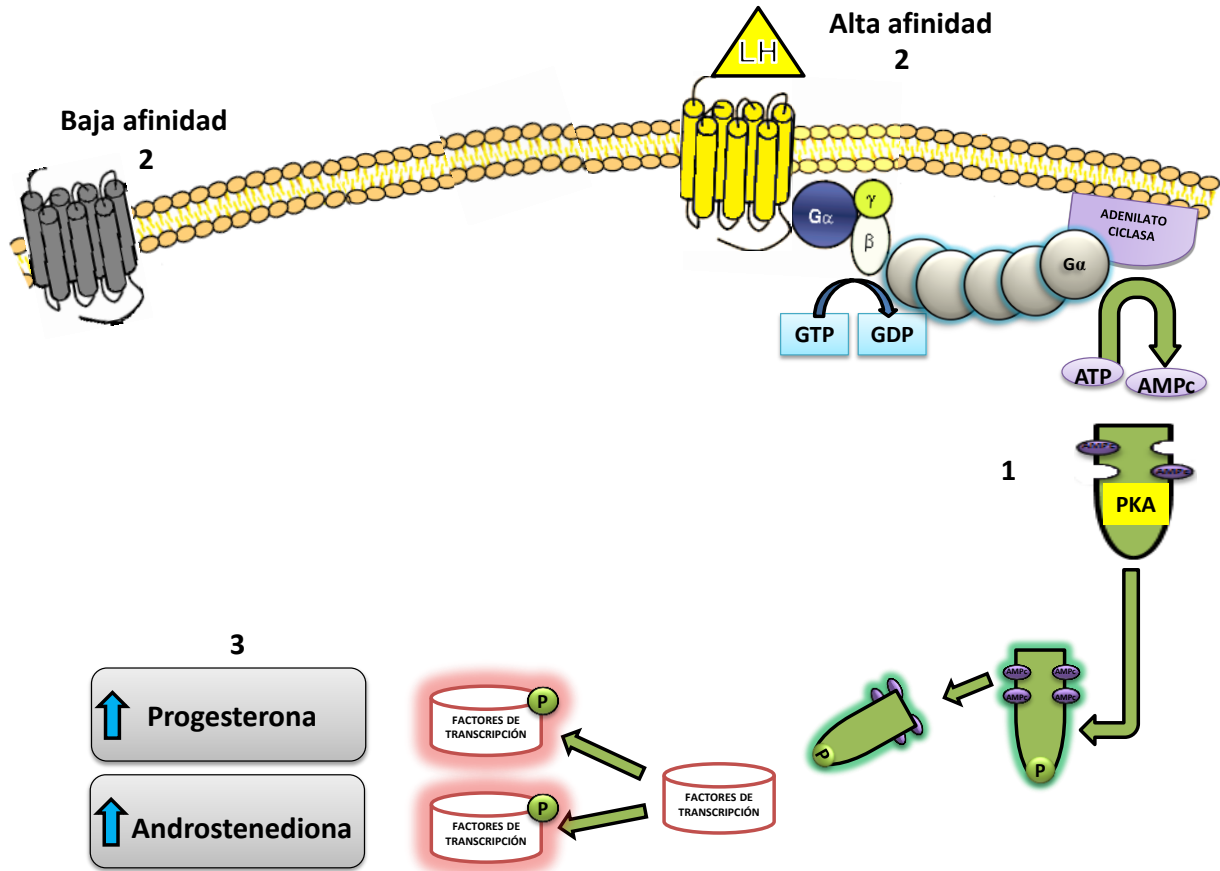


Figura 11. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la LH en la estimulación de la biosíntesis de progesterona y androstenediona por las células de la teca. Hormona luteinizante (LH), trifosfato de guanosina (GTP), monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y proteína cinasa A (PKA).

**Modelo que explica la posible vía por la cual la timulina en concentraciones bajas disminuye la secreción de progesterona y androstenediona (Figura 12).**

1. La timulina tiene dos tipos de receptores con diferentes  $K_d$  (como se ha descrito en la membrana celular de los linfocitos) (Pléau y col., 1980). La unión de la timulina con su receptor de mayor afinidad activa a la fosfolipasa C, la cual hidroliza el  $PIP_2$  en  $IP_3$  y DAG (Hanley y Steiner, 1989).
2. El DAG activa a la PKC y el  $IP_3$  moviliza el  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que aumenta la actividad de la PKC.
3. La activación de las PKC inhibe la vía PKA y con ello bloquea parcialmente la biosíntesis de esteroides (Hofeditz y col., 1988; Beshay y col., 2007).



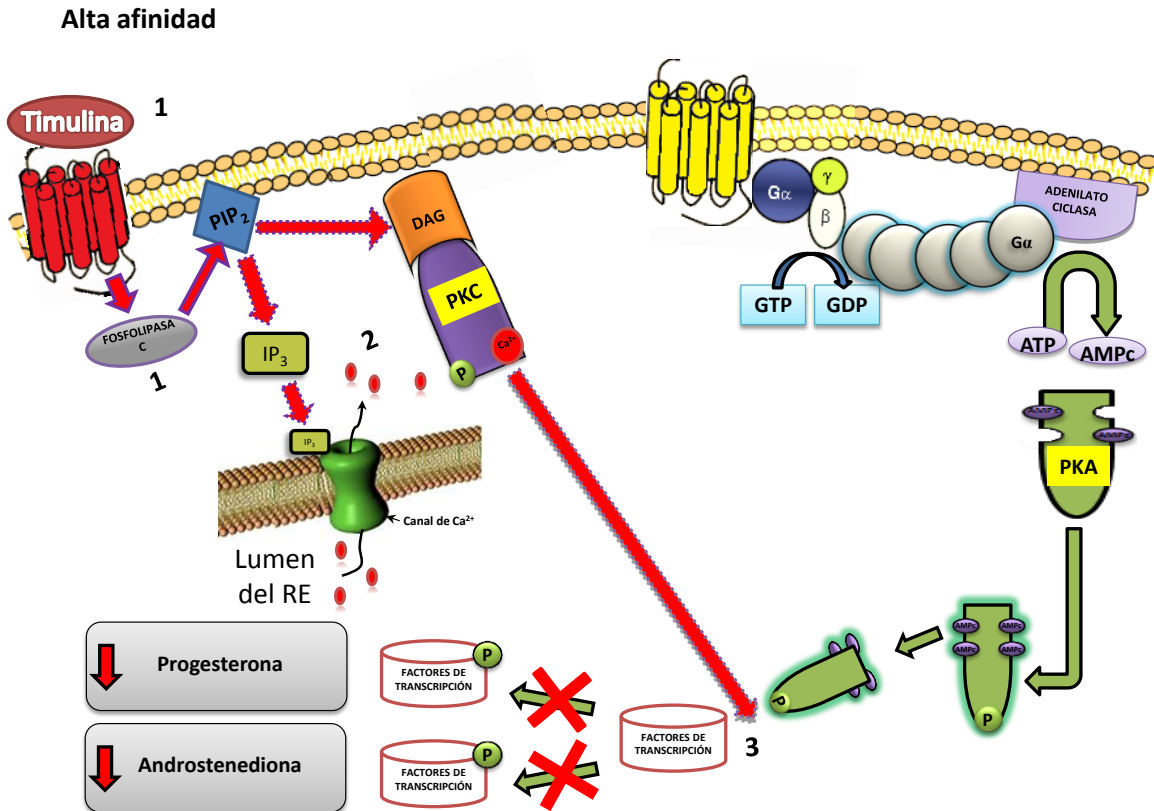


Figura 12. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la timulina en la inhibición de la biosíntesis de progesterona y androstenediona por las células de la teca. Trifosfato de guanósina (GTP), monofosfato de guanósina cíclico (GMPc), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), proteína cinasa A (PKA), fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y proteína cinasa C (PKC).

**Modelo que explica la posible vía por la cual la timulina en concentraciones altas no modifica la secreción de progesterona y disminuye la de androstenediona (Figura 13).**

1. Inicialmente, la timulina estimula la PKC lo que inhibe parcialmente la biosíntesis de progesterona y androstenediona.
2. La mayor cantidad de timulina en el medio resulta en la activación de los receptores de baja afinidad, los cuales estimularían a la PKA (Cabrera, 2012) y ésta a su vez la síntesis de progesterona por medio de factores de transcripción propios para esta hormona.
3. Los factores de transcripción para la androstenediona no serían estimulados por el aumento de la PKA.

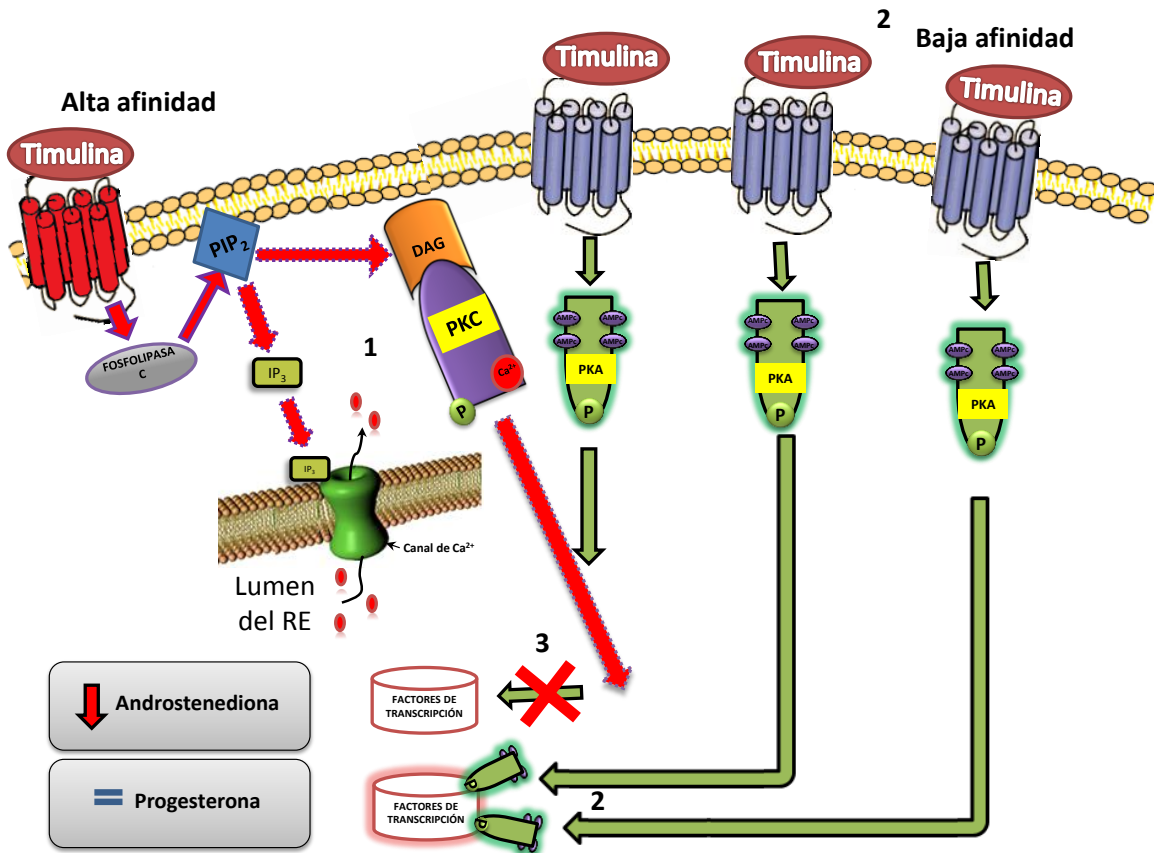


Figura 13. Esquema que muestra la vía intracelular por la cual timulina no modifica la concentración de progesterona y disminuye la de androstenediona en las células de la teca. Proteína cinasa A (PKA), fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y proteína cinasa C (PKC).

**Modelo que explica la posible vía por la cual la timulina agregada al medio de cultivo después de la adición de LH, resulta en una menor secreción de progesterona y androstenediona (Figura 14).**

1. La LH estimula la vía de la PKA y con ello la secreción de progesterona y androstenediona.
2. La unión de la timulina a sus receptores de alta afinidad, estimula la PKC, la cual a su vez bloquea a la PKA.
3. Dado que la LH es el estímulo funcional de la secreción de progesterona y fue el estímulo que se agregó primero, la cantidad de progesterona que secretan las células sometidas a LH+timulina, es mayor que la secretada por las células que fueron tratadas exclusivamente con timulina.
4. La secreción de androstenediona en las células estimuladas con LH+timulina es similar a la observada en las células estimuladas sólo con timulina, este resultado apoya la idea de que los factores de transcripción propios para la androstenediona no serían estimulados por el aumento de la PKA, lo que si ocurriría con los de progesterona.

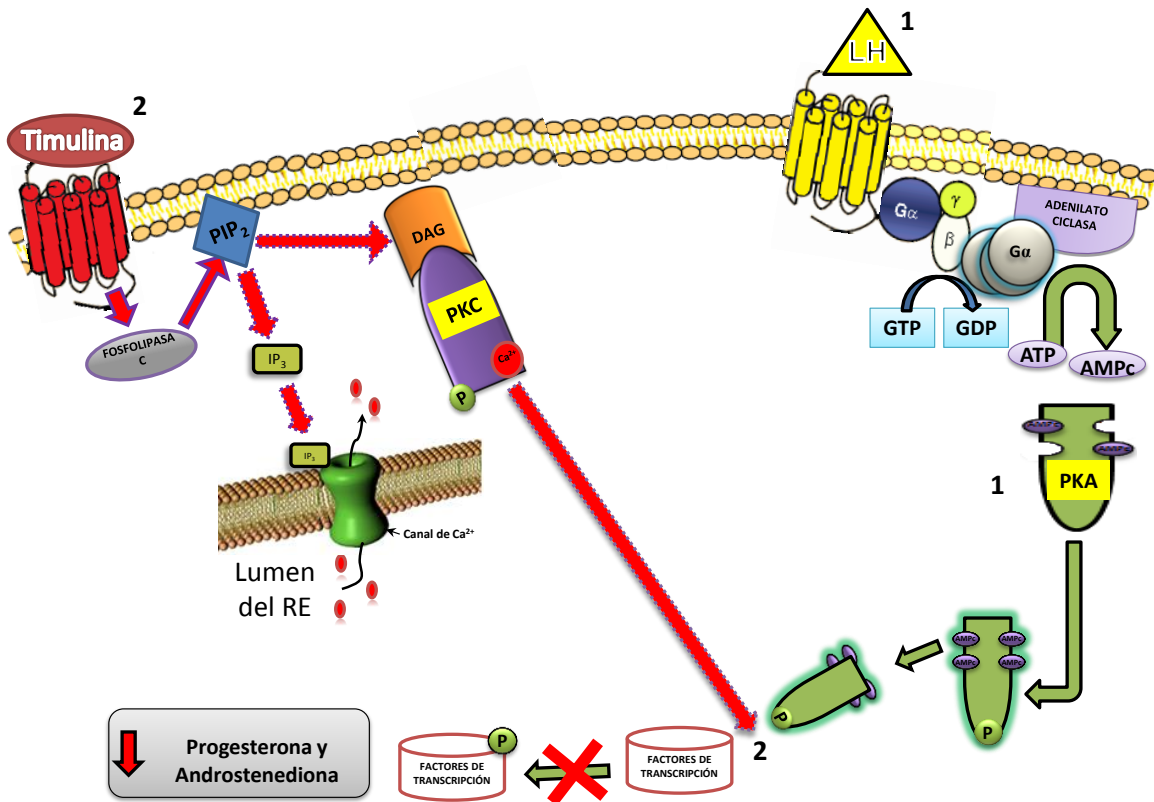


Figura 14. Esquema que muestra la vía intracelular que utilizaría la timulina en la inhibición de la biosíntesis de progesterona y androstenediona en células de la teca estimuladas con LH. Trifosfato de guanósina (GTP), monofosfato de guanósina cíclico (GMPc), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), proteína cinasa A (PKA), fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y proteína cinasa C (PKC).

## CONCLUSIONES

- *In vitro*, células de la teca de ovarios de ratón secretan de manera espontánea progesterona y androstenediona.
- La secreción de ambas hormonas es estimulada por la LH.
- La timulina en dosis cercana a la fisiológica disminuye la secreción de progesterona y androstenediona.
- Los efectos de la timulina sobre la secreción de progesterona y androstenediona son diferentes y dependen de la concentración de timulina agregada al medio.
- La adición de timulina al cultivo de células de la teca estimuladas con LH, disminuye la secreción de ambas hormonas.
- Los efectos de la timulina son estimulantes o inhibitorios en función de la célula o tejido en estudio.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Audesirk T y Audesirk G. (1997). *Biología. La Vida en la Tierra*. 4ª edición. Editorial Pearson. México. 765-775 pp.
2. Bach J y Dardenne M. (1984). "Clinical aspects of thymulin (FTS)". En: *Thymic hormones and lymphokines. Basic chemistry and clinical applications*. Editorial Plenum Press. New York. 593-600 pp.
3. Bach J, Dardenne M, Pléau J. (1977). "Biochemical characterization of a serum thymic factor". *Nature* **266**:55-57.
4. Besedovsky H y Sorkin E. (1974). "Thymus involvement in female sexual maturation". *Nature*. **249**:356–358.
5. Beshay V, Havelock J, Sirianni R, Ye P, Suzuki T, Rainey W y Carr B. (2007). The Mechanism for Protein Kinase C Inhibition of Androgen Production and 17Hydroxylase Expression in a Theca Cell Tumor Model Victor. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:4802–4809.
6. Brown O, Sosa Y, Bolognani F, Goya R. (1998). "Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner". *Mech. Ageing. Dev.* **104**:249-262.
7. Brown O, Sosa Y, Dardene M, Pléau J, Goya R. (2000). "Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age". *J. Gerontol.* **55**:170-176.
8. Brown O, Sosa Y, Dardenne M, Pléau J, Goya R. (1999). "Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent". *Neuroendocrinol.* **69**:20-27.

9. Cabrera M, Vázquez-Cuevas F, Chavira R, Ortega C, Domínguez R, Rosas P. (2010). "Curva dosis efecto de la timulina sobre la secreción de esteroides por las células de la granulosa de los ovarios de ratón". LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Sociedad de Ciencias Fisiológicas, AC. Villahermosa, Tabasco.
10. Cabrera M. (2012). "Estudio de la participación de la timulina sobre la capacidad de respuesta esteroidogénica de los ovarios de ratón". Tesis de maestría. FES-Zaragoza, UNAM. México.
11. Chaturvedi G, Arai K, Limback D, Roby K, Terranova P. (2004). "Src Tyrosine Kinase Regulates CYP17 Expression and Androstenedione Secretion in Theca-Enriched Mouse Ovarian Cells". *Endocrine*. **25**:147–154.
12. Chedrese P y Bertorello A. (2009). "Androgens-Molecular basis and related disorders". En: *Reproductive endocrinology: a Molecular Approach*. Chedrese Eds. Springer. New York. 205-214.
13. Chedrese P y Bertorello A. (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.
14. Connelly M y Williams D. (2003). "SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells". *Trends Endocrinol. Metab.* **14**:467–472.
15. Dardenne M y Bach J. (1981). "Thymic hormones. En: *The thymus gland*". M Kendall Ed, Academic Press. New York 113-131.
16. Dardenne M, Kelly P, Bach J. (1991). "Identification and functional activity of Prl receptors in thymic epithelial cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:9700-97004.
17. Dardenne M, Savino W, Bach J. (1988). "Modulation of thymic endocrine function by thyroid and steroid hormones". *Intern. J. Neuroscience*. **39**:325-334.



18. Dardenne M, Savino W, Berrih S, Bach J. (1985). "A zinc-dependent epitope on the molecule of thymulin, a thymic hormone". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**:7035-7038.
19. Dardenne M, Savino W, Gagnerault M. (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". *Endocrinol.* **125**:3-12.
20. Díaz B N. (2004). *Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: biología y clínica del cáncer*. Departamento de Bioquímica y Fisiología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España. 1-17 pp.
21. Díaz J y Juárez M. (2007). *Bioquímica*. Editorial Mc Grawll Hill-Interamericana. México. 586-595.
22. Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991). "La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico". En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Miguel Ángel Porrua. México. 161-192.
23. Domínguez R, Flores A, Cruz-Morales S.E. (2011). "Hormonal and Neural Mechanisms Regulating Hormone Steroids Secretion". En *Steroids-Basic Science*. Ed. Hassan Abduljabbar. Cap. 1, pp 3-32. Publisher: In Tech. Subject: Endocrinology and Metabolism. ISBN 978-953-307-866-3.
24. Domínguez R, Morales L, Cruz ME. (2003). *Ovarian Asymmetry*. *Biomed. Sci.* **5**:95-104.
25. Duleba A, Spaczynski R, Olive D, Behrman H. (1999). "Divergent mechanisms regulate proliferation/survival and steroidogenesis of theca-interstitial cells". *Molecular Human Reproduction* **5**:193–198.

26. Flanagan SP. (1966). "Nude," a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* **8**:295–309.
27. Friedland C, Liou H, Lobel P, Stock A. (2003). "Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:2512–2517.
28. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. (2009). "Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells". *Journal of Ovarian Research* **2**:17.
29. 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". *J. Endocrinol.* **166**:381-387.
30. García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R, Rosas P. (2005). "Effects of injection thymulin into the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice". *Neuroimmunomodulation.* **12**:314-320.
31. Gastinel L, Pleau J, Goldstein G, Bach J. (1983). "Interaction of thymopoietin peptides with the specific receptor of facteur thymique serique (FTS)." *Thymus.* **5**:78-87.
32. Geneser F. (2000). Órganos de la Reproducción. En: *Histología sobre Bases Moleculares.* 3ra edición. Editorial Médica-Panamericana. Buenos Aires. 22: 613-638 pp.
33. Goya R, Gagnerault M, Sosa Y. (1993). "Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in aging rats". *Neuroendocrinology.* **58**:338-343.
34. Goya R, Sosa Y, Brown O, Dardenne M. (1994). "In vitro studies on the thymus-pituitary axis in young and old rats". *Ann. NY. Acad. Sci.* **741**:108-114.

35. Guyton AC, Hall, JE. (2001). Tratado de Fisiología Médica. 10<sup>a</sup> Edición. McGraw Hill-Interamericana. México.
36. Gwynne J y Strauss J. (1982). "The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands". *Endocr. Rev.* **3**:299–329.
37. Hanley RM y Steiner A. (1989). "The second-messenger system for peptide hormones". *Hops pract* **24**:59-70.
38. Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R, 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.
39. Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura P, Castillo L, 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". *Lif. Sci.* **76**:795-804.
40. Hoekstra M, Berkel T, Van Eck M. (2010). "Scavenger receptor BI: A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism". *World J Gastroenterol* **16**:5916-5924.
41. Hofeditz C, Magoffin D, Erickson G. (1988) "Evidence for protein kinase C regulation of ovarian theca-interstitial cell androgen biosynthesis". *Biology of Reproduction* **39**:873-881.
42. Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T. (2007) "Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells". *PNAS* **104**:12389-12394.
43. Horibata Y y Sugimoto H. (2010). "StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria". *J. Biol. Chem.* **285**:7358–7365.

44. <http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/histologia/archivos%20MatDid/Atlas%20Di%20Fiore/difiore.html>
45. Jambon B, Montagne P, Bene MC, Brayer MP, Faure G, Duheille J. (1981). "Immunohistologic localization of facteur thymique serique (FTS) in human thymic epithelium". *J. Immunol.* **127**:255-259.
46. Kwon H, Abi-Mosleh L, Wang M, Deisenhofer J, Goldstein J, Brown M, Infante R. (2009). "Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol". *Cell.* **137**:1213–1224.
47. Lavoie H y King S. (2009). "Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B". *Ex. Biol. Med.* **234**:880–907.
48. Ledwitz F y Scheid P. (1990). "Thymulin (Serum Thymic Factor) modulation of porcine granulosa cell responsiveness to gonadotropins in vitro". *Ovarian workshop: Regulatory process and gene expression in the ovary.* Maryville, Tennessee. p.38.
49. Lintern-Moore S. (1977). "Effect of athymia on the initiation of follicular growth in the rat ovary". *Biol. Reprod.* **17**:155-161.
50. Liu J, Heikkila P, Meng Q, Kahri A, Tikkanen M, Voutilainen R. (2000). "Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals". *Eur. J. Endocrinol.* **142**:677–682.
51. Loaiza D, Rosales B, Reyes C, Chávez N, Rosas P. (2010). "Estudio de la respuesta ovulatoria del ratón prepuber a la administración de diferentes concentraciones de gonadotropinas". *LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.* Sociedad de Ciencias Fisiológicas, AC. Villahermosa, Tabasco.

52. Magoffin D y Erickson G. (1988) "Evidence for Protein Kinase C Regulation of Ovarian Theca-Interstitial Cell Androgen Biosynthesis". *Biology of Reproduction* **39**:873-881.
53. Magoffin D y Weitsman S. (1994) "Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca interstitial cells". *Biology of Reproduction* **51**:766–775.
54. Magoffin D. (2005) "Ovarian theca cell". *Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**:1344-1349.
55. Manna P, Dyson M, Stocco D. (2009) "Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives". *Molecular Human Reproduction* **15**:321–333.
56. Marques MJ. (2001). "Estadística básica un enfoque no paramétrico". UNAM. México.
57. Merchant H y Moreno N. (2003) "Diferenciación celular durante el desarrollo de la gónada". En: *Biología celular y molecular*. Jiménez L y Merchant H. Editorial Pearson Educación. México. Cap.23.
58. Miller MA, y Leavell LC. (2001). *Manual de Anatomía y Fisiología*. 2ª edición. La Prensa Médica Mexicana. México. 748-754 pp.
59. Miller W y Auchus R. (2011). "The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders". *Endocrine Reviews* **32**:81-151.
60. Mocchegiani E, Amadio L, Fabris N. (1990) "Neuroendocrine–thymus interactions. I. In vitro modulation of thymic factor secretion by thyroid hormones". *J Endocrinol Invest* **13**:139–47.

61. 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.
62. Morales L, Ricardo B, Bolaños A, Chavira R y Domínguez R. (2007). "Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses." *Reprod Biol Endocrinol*. **13**:5-24.
63. Morales L, Vieyra E, Ramírez D, Trujillo A, Chavira R, Cárdenas M y Domínguez R. (2012). "Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats." *Reprod Biol Endocrinol*. **30**:10-88.
64. Morán C, Franco A, Morán J, Handal A, Morales L y Domínguez R. (2005). "Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat". *Endocrine*. **26**:147-152
65. Murayama C, Miyazaki H, Miyamoto A y Shimizu T. (2012). "Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells" *Molecular and Cellular Endocrinology* **350**:1–9.
66. Murray RK, Mayes PA, Granner DK. (2001). "Bioquímica de Harper". Editorial El manual moderno. México. 679-687.
67. Napolitano L, Schmidt D, Gotway M, Ameli N, Filbert E, Clor J, Epling L, Sinclair E, Baum P, Li K, Killian M, Bacchetti P y McCune J. (2008). "Growth hormone enhances thymic function in HIV-1–infected adults". *J. Clin. Invest.* **118**:1085–1098.
68. Ojeda S y Skinner. (2006) "Puberty in the Rat". En: Knobil E, Neill J (Eds.) "The Physiology of Reproduction". 3ª edición. Raven Press. New York. Vol. 2. 2063-2102.

69. Ortega C. (2007). "Estudio de los efectos de la timulina sobre la liberación de FSH y LH por las células de adenohipófisis en cultivo. Influencia del día del ciclo estral y de los esteroides sexuales". Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México.
70. Ortega I, Cress A, Wong D, Villanueva J, Sokalska A, Moeller B, Stanley S, Duleba A. (2011). "Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells". *Biol Reprod.* **86**:1-11
71. Ortega I, Villanueva J, Wong D, Cress A, Sokalska A, Stanley S, Duleba A. (2012). "Resveratrol Reduces Steroidogenesis in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells: The Role of Inhibition of Akt/ PKB Signaling Pathway". *Endocrinology* **153**:4019–4029.
72. Pléau J, Dardene M, Bach J. (1981). "The serum thymic factor (FTS)". *Mol. Cell. Biochem.* **41**:67-72.
73. Pléau J, Dardenne M, Blouquit Y, Bach J. (1977). "Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum". *J. Biol. Chem.* **252**:8045-8047.
74. Pléau J, Fuentes V, Morgat J, Bach J. (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.
75. Prescott J, Thompson D, Kraft P, Chanock S, Audley T, Brown J, Leyland J, Folkard E, Doody D. (2012). "Genome-Wide Association Study of Circulating Estradiol, Testosterone, and Sex Hormone-Binding Globulin in Postmenopausal Women". *PLoS ONE* **7**:1-8
76. Rajkovic A, Pangas S y Matzuk M (2006) "Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models". En: Knobil E, Neill J (Eds.) "The Physiology of Reproduction". 3ª edición. Raven Press. New York. Vol. 2. 2063-2102.

77. Rebar R, Morandini I, Erickson G, Petze J. (1981). "The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females". *Endocrinology*. **108**:120–126.
78. Reggiani P, Barbeito C, Zuccolilli G, Cónsole G, Flamini A, Dardenne M, Goya R. (2012). "Neonatal Thymulin Gene Therapy Prevents Ovarian Dysgenesis and Attenuates Reproductive Derangements in Nude Female Mice". *Endocrinology* **153**:3922–3928.
79. Reggiani P, Martines E, Ferese C, Goya R, Console G. (2009a). "Morphological restoration of gonadotrope population by thymulin gene therapy in nude mice". *Histol Histopathol*. **24**:729-735.
80. Reggiani P, Morel G, Console G, Barbeito C, Rodriguez S S, Brown O A, Bellini M J, Pleau J M, Dardenne M, Goya R G. (2009b). "The Thymus-Neuroendocrine Axis. Neuroimmunomodulation". **1153**:98-106.
81. Reyes C. (2010). "Efectos de la administración de timulina en la bursa del ovario de ratones prepúberes sobre la respuesta ovulatoria". Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México.
82. Rone M, Fan J y Papadopoulos V. (2009). "Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states". *Biochim. Biophys. Acta*. **1791**:646 –658.
83. Ross M, Kaye G, Paulina W. (2005). *Histología texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 735, 736.
84. Safieh B, Kendall M, Norman J, Metreau E, Dardenne M, Bach J y Pleau J. (1990). "A new radioimmunoassay for the thymic peptide thymulin, and its application for measuring thymulin in blood samples". *J. Immunol. Meth*. **127**:255-262.



85. Savino W, Dardenne M, Bach J. (1983). "Thymic hormones containing cells. III. Evidence for a feed-back regulation of the secretion of the serum thymic factor (FTS) by thymic epithelial cells". Clin. Exp. Immunol. **52**:7-12.
86. Savino W, Gagnerault M, Bach J 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.
87. Simone D y Mahesh V. (1993) "An Autoregulatory Process for Androgen Production in Rat Thecal-Interstitial Cells". Biology of Reproduction **48**:46-56.
88. Solovyeva E, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A. (2000). "Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Rat Theca-Interstitial Cell Androgen Biosynthesis". Biology of Reproduction **63**:1214–1218.
89. Steck T y Lange Y. (2010). "Cell cholesterol homeostasis: Mediation by active cholesterol". Trends Cell Biol. **20**:680–687.
90. Taylor C, Limbacka D, Terranova P. (1997). "Src tyrosine kinase activity in rat thecal–interstitial cells and mouse TM3 Leydig cells is positively associated with cAMP-specific phosphodiesterase activity". Molecular and Cellular Endocrinology **126**:91–100.
91. Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach J, 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.
92. Vahouny G, Chanderbhan R, Noland B, Irwin D, Dennis P, Lambeth J, Scallen T. (1983). "Sterol carrier protein 2: identification of adrenal sterol carrier protein 2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization". J. Biol. Chem. **258**:1173-1737.

93. Vázquez F, Zárate E, Garay E y Arellano R. (2010). "Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells". *Reproductive Biology and Endocrinology*. **8**:88.
94. Vergeer M, Korporaal S, Franssen R, Meurs I, Out R, Hovingh G, M. (2011). "Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans". *N. Engl. J. Med.* **364**:136–145.
95. Wu Q, Sucheta S, Azhar S, Menon K. (2003). "Lipoprotein Enhancement of Ovarian Theca-Interstitial Cell Steroidogenesis: Relative Contribution of Scavenger Receptor Class B (Type I) and Adenosine 5-Triphosphate-Binding Cassette (Type A1) Transporter in High-Density Lipoprotein-Cholesterol Transport and Androgen Synthesis". *Endocrinology* **144**:2437-2445.
96. Yen S y Jaffes R. (2009) "Endocrinología Reproductiva: Fisiología, Patofisiología y Gestión Clínica". Ed. 6ª. Editorial. ELSELVIER.
97. Young J y McNeilly A. (2010) "Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle". *Reproduction* **140**:489–504.
98. Zaidi S, Kendall M, Gillham B, Jones M. (1988). "The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts". *Thymus* **12**:253-264



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00108

Matrícula: 210389521

INFLUENCIA DE LA TIMULINA  
SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS *In vitro*  
EN LAS CELULAS DE LA  
TECA DE OVARIOS DE RATON

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 28 del mes de febrero del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA  
DRA LETICIA MORALES LEDESMA  
DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR  
DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO


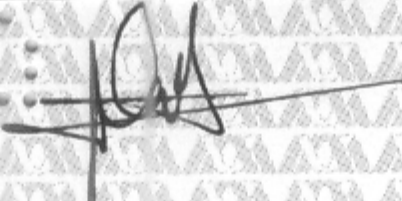
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: ANDREA CHAPARRO ORTEGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

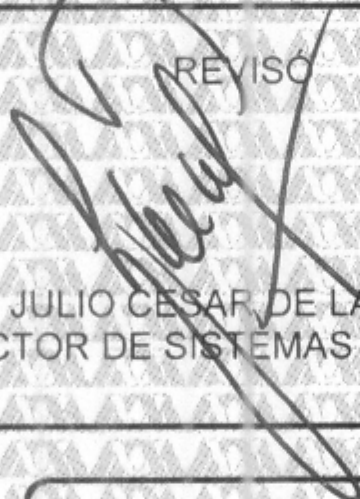
*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.


ANDREA CHAPARRO ORTEGA  
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS




DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE



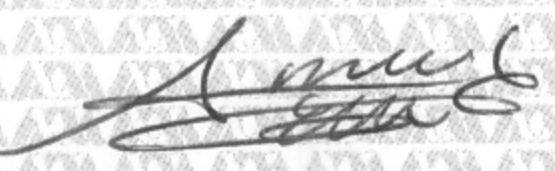
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL



DRA LETICIA MORALES LEDESMA

VOCAL



DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR

SECRETARIA



DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO