



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas**

**TÍTULO:
*TERAPIA GÉNICA PARA LA HORMONA TÍMICA
TIMULINA EN MODELOS DE TIMODEFICIENCIA***

**TESISTA:
LIC. PAULA CECILIA REGGIANI**

**DIRECTOR: Dr. RODOLFO G. GOYA
CO-DIRECTOR: Dr. OMAR J. RIMOLDI
ASESOR ACADEMICO: Dr. C. ALBERTO FOSSATI**

2009

Reggiani, Paula Cecilia

Terapia génica para la hormona tímica timulina en modelos de timodeficiencia. - 1a ed.
- La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2011.
E-Book.

ISBN 978-950-34-0796-7

1. Endocrinología. 2. Hormonas. 3. Tesis de doctorado. I. Título
CDD 573.4

Fecha de catalogación: 11/11/2011

*...dedicada a Fernando,
por hacer de mi una mejor persona.*

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado principalmente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección del Dr. Rodolfo Goya y la co-dirección del Dr. Omar Rimoldi.

Durante la realización de esta Tesis se recibió apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, Francia).

PUBLICACIONES

Lista de publicaciones en las cuales se comunicaron resultados relativos a la presente Tesis Doctoral.

1. **2009: Reggiani P**, Martines E, Ferese C, Goya R, Cónsole G. *Morphological Restoration of Gonadotrope Population by Thymulin Gene Therapy in Nude Mice*. *Histology and Histopathology* 24: 729-735 (IF 2.007).
2. **2009: Reggiani PC**, Morel GR, Cónsole GM, Barbeito CG, Rodriguez S, Brown OA, Bellini MJ, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. *The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153: 98-106 (IF 1.731). Review.
3. **2008: Morel GR***, **Reggiani PC***, Console GM, Rimoldi OJ, Vesenbeckh SM, Garcia-Bravo MM, Rodriguez SS, Brown OA, Goya RG. *Potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models*. *Current Gene Therapy*; 8: 49-53 (IF 4.455). Review. ***Igual participación**
4. **2007: Goya* RG**, **Reggiani* PC**, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P, Dardenne M. *Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice*; *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*; 293: E182-187 (IF 4.138). ***Igual participación**
5. **2007: Reggiani PC**, Martines EV, Camihort GA, Luna GC, Brown OA, Goya RG, Cónsole GM. *Restauración de de la función reproductiva en ratones inmunodeficientes por medio de terapia génica con el gen del péptido timulina*. *AMA* 3: 1-6.
6. **2006: Morel GR**, Brown OA, **Reggiani PC**, Hereñú CB, Portiansky EL, Zuccolilli GO, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. *Peripheral and mesencephalic transfer of a synthetic gene for the thymic peptide thymulin*. *Brain Research Bulletin*; 69: 647-651 (IF 1.943).
7. **2006: Reggiani PC**, Hereñú CB, Rimoldi OJ, Brown OA, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. *Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats*. *Gene therapy* 13: 1214-1221 (IF 4.812).

PREMIOS

Lista de premios, los cuales se obtuvieron por la presentación de trabajos relativos a la presente Tesis Doctoral.

- Premio “**Profesor Dr. Samuel M. Mc Cann 2007**”, otorgado según el dictamen del jurado, al mejor trabajo sobre Neuroinmunoendocrinología.
Título: ***Terapia génica neonatal para el péptido tímico timulina como estrategia preventiva de las alteraciones ováricas en el ratón congenitamente atímico.***
Autores: **Reggiani PC**, Barbeito CG, Flamini MA, Cónsole GM, Rodríguez SS, Dardenne M, Goya RG.
Otorgado por la Sociedad Argentina de Fisiología en el marco de la Reunión 2007, realizada conjuntamente con las Sociedades Argentinas de Investigación clínica e Inmunología.
Mar del Plata, 24 de Noviembre de 2007.

- Premio “**Profesor Doctor Manuel Litter**”, otorgado según el dictamen del jurado, al mejor trabajo científico.
Título: ***Restauración de la función reproductiva en ratones inmunodeficientes por medio de terapia génica con el gen del péptido timulina.***
Autores: **Reggiani PC**, Martines EV, Camihort GA, Luna GC, Brown OA, Goya RG, Cónsole GM.
Otorgado por la Asociación Médica Argentina y la Sociedad Argentina de Farmacología y Terapéutica.
Buenos Aires, 5 de Noviembre de 2007.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y profundo agradecimiento para...

El Dr. Rodolfo G. Goya, por haberme guiado en las actividades de investigación que condujeron finalmente a la realización de la presente tesis y, más aún, por su permanente apoyo profesional, contención personal, y por haberme permitido continuar sólidamente con mi formación en el ámbito de la ciencia.

Al Dr. Omar J. Rimoldi, por su tiempo, dedicación y paciencia, por transmitirme sus experiencias y conocimientos (y, por retarme de vez en cuando).

Al Dr. C. Alberto Fossati, por haberme asistido cada vez que fue necesario para que la presente tesis pueda efectivamente realizarse.

A todos mis compañeros del laboratorio, Yolanda, Claudia, Silvia, Jole, Sole, Oscar, Gustavo, Ignacio y Mauro, quienes de innumerables formas ayudaron y colaboraron con mi formación de doctorado. Además, por brindarme su compañía y su apoyo a nivel personal.

A Yolanda Sosa, repito este agradecimiento por su invaluable ayuda en el bioensayo de timulina, por prestarme sus ojos.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) y a todos los compañeros del instituto, donde se me brindó el espacio y el apoyo necesario para realizar distintas actividades necesarias para la consecución de esta tesis.

Al personal de la Cátedra de Patología B, cuyo desinteresado apoyo a nuestro grupo de investigación en mucho ha contribuido a la realización de esta tesis.

A la Dra. Gloria Cónsole y a todos los compañeros de la Cátedra Histología B de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, por su buena voluntad y apoyo reiterado tanto para llevar adelante esta tesis de doctorado como para posibilitar mi desarrollo académico y profesional.

A los Dres. Alicia Flamini, Claudio Barbeito y Gustavo Zuccolilli, por haberme enseñado, ayudado y aconsejado en numerosos momentos.

A los Dres. Mireille Dardenne y Jean-Marie Pléau, Hospital Necker de Paris, por su valioso asesoramiento técnico y teórico (Merci Mireille et Jean-Marie).

Asimismo, a toda la comunidad educativa de las Facultades de Ciencias Médicas y de Ciencias Exactas (UNLP) por haber dado el soporte necesario para llevar adelante mis estudios.

Finalmente a mi familia y amigos, porque sin su sostén y afecto nada de lo que he hecho hubiese sido posible.

...para todos ellos mi más sincero y profundo agradecimiento.

Paula C. Reggiani

CONTENIDOS

<u>RESUMEN</u>	13
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	15
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	18
1.1 EL TIMO	18
1.1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS.....	18
1.1.2 COMUNICACIÓN ENTRE EL TIMO Y EL SISTEMA NEUROENDOCRINO.....	20
1.1.2.1 Acciones del sistema neuroendocrino sobre el timo.....	21
1.1.2.2 Acciones del timo sobre el sistema neuroendocrino.....	23
1.1.3 HORMONAS TÍMICAS.....	24
1.1.3.1 Aspectos generales.....	24
1.1.3.2 TF5, FTH, factor tímico X, timoestimulina, timopoyetina y HTH....	24
1.1.3.3 Timulina.....	27
1.1.3.3.1 Aspectos generales.....	27
1.1.3.3.2 Control Neuroendocrino de la secreción de timulina.....	32
1.1.3.3.3 Propiedades biológicas de la timulina.....	35
1.1.3.3.3.1 Acciones inmunomodulatorias.....	35
1.1.3.3.3.2 Acciones endocrinas.....	39
1.1.3.3.3.2.1 Actividades hipofisotrópicas.....	39
1.1.3.3.3.2.2 Relevancia de la timulina en el eje reproductivo.....	40
1.1.3.3.3.3 Enfermedades asociadas al desbalance tímico: Potencial terapéutico de la timulina.....	41
1.2. MODELOS ANIMALES DE TIMODEFICIENCIA	42
1.2.1 ANIMALES TIMECTOMIZADOS.....	42
1.2.2 EL RATÓN CONGÉNITAMENTE ATÍMICO: <i>NUDE</i>	43
1.3. EL ROL DEL TIMO SOBRE EL EJE REPRODUCTIVO	48
1.3.1 DESCRIPCIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISO-GONADAL	48
1.3.2 EJE TIMO-OVÁRICO: IMPORTANCIA DE LA INTEGRIDAD TÍMICA EN EL PERÍODO PERINATAL	52

1.4. TERAPIA GÉNICA	56
1.4.1 ASPECTOS GENERALES	56
1.4.2 VECTORES RETROVIRALES	61
1.4.3 VECTORES HEPÉTICOS	63
1.4.4 VECTORES ADENO-ASOCIADOS	66
1.4.5 VECTORES ADENOVIRALES	68
2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	78
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	80
3.1 PROTOCOLOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	80
3.1.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON LOS PLÁSMIDOS DE INTERÉS.....	80
3.1.1.1 Preparación de bacterias competentes utilizando cloruro de calcio	80
3.1.1.2 Transformación de bacterias competentes	80
3.1.2 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS	81
3.1.2.1 Obtención de plásmidos en pequeña escala (minipreparación)	81
3.1.2.2 Obtención de plásmidos a gran escala (maxipreparación)	82
3.1.3 DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER).....	82
3.1.4 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA.....	83
3.1.4.1 Electroforesis preparativa en geles de agarosa	83
3.1.5 PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE DOBLE CADENA QUE CODIFICAN PARA <i>met</i> FTS	84
3.1.6 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	84
3.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PORTADORES DEL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA	85
3.2.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIOTA <i>pcDNA-met</i> FTS.....	85
3.2.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICO <i>pmet</i> FTS- hMGFP	86
3.3 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA (RAd-FTS)	87
3.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SISTEMA DE CONSTRUCCIÓN.....	87
3.3.2 CONSTRUCCIÓN DE RAd-FTS	88
3. 4 PROTOCOLOS DE CULTIVO CELULAR	90

3.4.1 CÉLULAS	90
3.4.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES DE CULTIVO DE CÉLULAS	90
3.4.2.1 Mantenimiento de los stocks.....	90
3.4.2.2 Congelamiento de células.....	91
3.4.2.3 Descongelamiento de células.....	91
3.4.3 COTRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA	92
3.4.4 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RAd-FTS	92
3.4.5 TITULACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE.....	94
3.5 PROTOCOLOS DE MANEJO DE ANIMALES Y TÉCNICAS QUIRÚRGICAS	94
3.5.1 ANIMALES	94
3.5.2 TIMECTOMÍA	95
3.5.2.1 Timectomía en ratas.....	95
3.5.2.2 Timectomía en ratones.....	96
3.6 CARACTERIZACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN NO VIRALES	96
3.6.1 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE pCDNA- <i>met</i> FTS ...	96
3.6.2 CARACTERIZACIÓN DE <i>pmet</i> FTS-hMGFP	97
3.7 CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DEL RAd-FTS	98
3.7.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	98
3.7.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	99
3.8 TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON TIMULINA	99
3.8.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	99
3.8.2 PERFUSIÓN INTRACARDÍACA DE RATONES HEMBRAS DEL EXP-2.....	101
3.9 ENSAYOS HORMONALES	102
3.9.1 INMUNOENSAYOS	102
3.9.2 DOSAJE DE TIMULINA	102
3.9.2.1 ELISA.....	102
3.9.2.2 Bioensayo para timulina.....	103
3.10 PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS	105
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106

4. RESULTADOS	107
4.1 DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN NO VIRALES PARA TIMULINA	107
4.1.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIOTA pcDNA- <i>met</i> FTS	107
4.1.1.1 Experimentos <i>in vitro</i>	107
4.1.1.1.1 Transfección de líneas celulares con el pcDNA- <i>met</i> FTS.....	107
4.1.1.1.2 Inmunoneutralización <i>in vitro</i> de timulina con anticuerpo anti-FTS	108
4.1.1.2 Experimentos <i>in vivo</i>	109
4.1.1.2.1 Actividad biológica en el suero de ratones TX luego de la inyección de lisados de células 293 transfectados con pcDNA- <i>met</i> FTS.....	109
4.1.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICO p <i>met</i> FTS-hMGFP.....	110
4.1.2.1 Transfección de líneas celulares con el p <i>met</i> FTS-hMGFP.....	110
4.2 DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA	111
4.2.1 OBTENCIÓN DEL RAd-FTS	111
4.2.2 CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DEL RAd-FTS	113
4.2.2.1 Experimentos <i>in vitro</i>	113
4.2.2.1.1 Incubación de cultivos celulares con el RAd-FTS.....	113
4.2.2.1.2 Incubación de células TEC con el RAd-FTS.....	114
4.2.2.2 Experimentos <i>in vivo</i>	115
4.2.2.2.1 Terapia Génica con Timulina en Ratones TX: Expresión prolongada de los niveles séricos de Timulina.	115
4.2.2.2.2 Terapia Génica con Timulina en Ratas TX: Restauración a largo plazo de los niveles de Timulina sérica.....	115
4.3 TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON TIMULINA (TGNT)	118
4.3.1 EFECTO RESTAURATIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RAd-FTS EN LA TIMULINA SÉRICA DE LOS RATONES <i>NUDE</i>	118
4.3.2 LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA NEONATAL PREVIENE EL DÉFICIT DE LH Y FSH EN <i>NUDE</i> ADULTOS	118
4.3.3 EFECTO DE TGNT SOBRE EL PESO CORPORAL DE LOS RATONES <i>NUDE</i>	118
4.3.4 EFECTO DE LA TGNT SOBRE LAS NEURONAS GNRH	121
4.3.5 EFECTO DE LA TGNT SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS	

POBLACIONES GONADOTROPAS HIPOFISARIAS	123
4.3.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RAD-FTS EN LOS NIVELES SÉRICOS DE ESTRÓGENO Y PROGESTERONA DE LOS RATONES <i>NUDE</i>	125
4.3.7 EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA NEONATAL SOBRE EL COMIENZO DE MADUREZ SEXUAL EN RATONES HEMBRAS <i>NUDE</i>	125
4.3.8 CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA OVÁRICA DE LOS RATONES <i>NUDE</i> SOMETIDOS A TGNT	126
4.3.9 EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA NEONATAL SOBRE LA ALTURA DE LA PARED UTERINA	129
5. <u>DISCUSIÓN</u>	131
6. <u>CONCLUSIÓN</u>	142
7. <u>REFERENCIAS</u>	143

RESUMEN

La timulina es una hormona producida exclusivamente por las células epiteliales tímicas; consiste en un nonapéptido biológicamente inactivo (facteur thymique sérique o FTS) coordinado al ión Zn^{+2} en una relación equimolecular 1:1, lo cual le confiere su actividad biológica característica.

La timulina participa en la diferenciación de los linfocitos T y en la modulación de varias de sus funciones. Los niveles circulantes de esta hormona se encuentran disminuidos durante el envejecimiento normal y en patologías tales como el SIDA y el síndrome de DiGeorge, una enfermedad caracterizada por la ausencia congénita del timo y de las glándulas parótidas.

La secreción de timulina está influenciada por una compleja trama endocrina que incluye a la mayoría de las hormonas adenohipofisarias y periféricas. Recíprocamente, existe evidencia de que además de su acción inmunomoduladora, la timulina posee actividad hipofisotrófica *in vitro* y, por lo tanto, puede actuar directamente sobre la adenohipófisis *in vivo*, modulando la respuesta de la glándula a secretagogos o inhibidores hipotalámicos. En los últimos años, un número creciente de estudios coloca a la timulina como un mediador fisiológico (el primero descrito) del eje timo-cerebro-hipófisis. Además, existe evidencia de que la timulina estimula la liberación de citoquinas de ciertos tipos de linfocitos y de que posee actividad antiinflamatoria y analgésica en el sistema nervioso central y en modelos de inducción de la inflamación, a nivel periférico y local.

La actividad endocrina y antiinflamatoria de este metalopéptido ha generado un creciente interés en la posibilidad de implementar estrategias de terapia génica para timulina en situaciones de disfunción tímica o en patologías cerebrales asociadas a procesos inflamatorios. Desafortunadamente, hasta el momento no se ha logrado clonar el gen de la timulina. Esta situación nos condujo a diseñar una secuencia sintética de ADN codificante para un análogo biológicamente activo de timulina, *metFTS*, la cual fue clonada en vectores de expresión apropiados, a fin de caracterizar las propiedades biológicas de dicho análogo tanto *in vitro* como *in vivo*. Una vez demostrada la funcionalidad del gen sintético diseñado, se construyó un vector adenoviral recombinante (RA-d-FTS) portador de dicho gen

sintético para implementar estrategias de terapia génica *in vivo* en modelos animales de timodeficiencia.

Uno de estos modelos, el ratón congénitamente atímico (*nude*), exhibe ciertas deficiencias reproductivas que parecen estar directamente vinculadas a su carencia de hormonas tímicas circulantes. En efecto, pocos días después del nacimiento, tanto el ratón *nude* como el ratón normal neonatalmente timectomizado, desarrollan, además de un severo cuadro de inmunodeficiencia, una serie de alteraciones degenerativas en las glándulas tiroideas, adrenales y expresan severas deficiencias en su función reproductiva.

El vector adenoviral RAd-FTS logró una restauración prolongada de los niveles de timulina circulante cuando fue inyectado intramuscularmente en ratas y ratones adultos timectomizados. Asimismo, la terapia génica neonatal para timulina en la hembra *nude*, logró restaurar los niveles de timulina sérica y prevenir las alteraciones a nivel hipotálamo-gonadotropo-ovárico que típicamente ocurren en estos mutantes en la adultez. Consecuentemente, estos resultados señalan a la timulina como el mediador fisiológico, o al menos uno de los mediadores, de la influencia perinatal del timo sobre la maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Dicha influencia podría ejercerse a través del sistema neuroendocrino y/o directamente a nivel ovárico.

Nuestros resultados se suman a la evidencia de que la timulina juega un rol fisiológico relevante como mediadora de la influencia perinatal del timo sobre la maduración del eje reproductivo y sugieren que terapia génica con el gen sintético para la timulina puede constituir una estrategia terapéutica efectiva para el abordaje de déficits reproductivos asociados con disfunciones endocrinas del timo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV: virus adenoasociados

ACTH: adrenocorticotrofina

Ad: adenovirus

ADH: hormona antidiurética

AH: células adenohipofisarias

ApV: apertura vaginal

AR: artritis reumatoidea

ATx: adultos timentomizados

BHK: línea celular de riñón de hámster bebé

C57: ratones C57BL/6

CAR: receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus coxsackie B

CER: cefaloridina

CL: cuerpos lúteos

CPE: efecto citopático

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

DC: densidad celular

dc: doble cadena

E: gen temprano

E₂: estrógeno

EDTA: etilen-diamino tetra-acetato de sodio

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EM: eminencia media

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

ET: endotoxina

FSH: hormona foliculoestimulante

FTS: factor tímico sérico

FTS-Zn: timulina

GFP: proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*

GH: hormona de crecimiento

GHRH: hormona liberadora de GH

Gn: gonadotrofinas

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

hCG: gonadotropina coriónica humana
HEK293: línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293
HSV: virus herpes simplex
HTH: hormona homeostática tímica
i.c.v.: intracerebroventricular
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
Ig: inmunoglobulinas
IGF-1: factor de crecimiento símil insulina-1
IL: interleuquina
IN: integrasa
ITR: repeticiones invertidas terminales
 K_d : constante de disociación
L: gen tardío
LB: medio de cultivo Luria-Bertani
LH: hormona luteinizante
LHRH: hormona liberadora de LH
linf: linfocitos
linf-Th: linfocitos T colaboradores
linf-Ts: linfocitos T supresores
LTR: secuencias terminales repetidas largas
NGF: factor de crecimiento nervioso
NK: células citotóxicas naturales
NTx: neonatalmente timectomizados
nu/+: heterocigotas
nu/+: ratones heterocigotas
nu/nu: ratones homocigotas para el gen *nude*
NZB: ratón negro de Nueva Zelanda
P₄: progesterona
PAT: péptido sintético análogo de la timulina
PG: prostaglandina
polyA: señal de poliadenilación
PRL: prolactina
ProT: protimosina
PT: proteína terminal

RAd-(GFP/TK)_{fus}: vector control que expresa la proteína de fusión GFP/TK

RAd: vector adenoviral recombinante

RAd-βgal: vector control que expresa β-galactosidasa

RAd-βgal: vector control que expresa β-galactosidasa

RIA: radioinmunoensayo

RT: transcriptasa reversa

sc: simple cadena

SD: ratas de la cepa Sprague Dawley

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIN: vectores auto-inactivables

SNC: sistema nervioso central

SU: proteína de la envoltura de superficie

T₃: tri-iodotironina

T₄: tiroxina

TC: tamaño celular

TEC: células reticuloepiteliales o epiteliales tímicas

TGNT: terapia génica neonatal con timulina

THF: factor tímico humoral

TK: timidina quinasa del virus *Herpes simplex* tipo 1

TM: proteína de la envoltura transmembrana

TNF: factor de necrosis tumoral

TP5: timopentina

TRH: hormona liberadora de tirotrófina

TSH: tirotrófina

TX: timectomía/ timectomizado

TX-10: ratón timectomizado en el día 10 de vida

T-α₁: timosina-α₁

U: unidad

VIP: péptido intestinal vasoactivo

whn: gen winged helix nude

20α-HSD: 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL TIMO

1.1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

El timo es un órgano linfoide situado en el mediastino anterior. Desde la década del 60, se le ha otorgado un rol central en el desarrollo del sistema inmune celular. Específicamente, durante la vida fetal y neonatal es responsable de la producción y desarrollo de células inmunocompetentes, los linfocitos T (linf-T). Precursores de los linf-T, derivados de la médula ósea, llegan al timo donde experimentan un complejo proceso de maduración que involucra la expresión secuencial de varios marcadores de membrana; subsecuentemente se produce la migración de los timocitos seleccionados positivamente hacia áreas dependientes de linf-T tales como el bazo, los nódulos linfáticos, las placas de Peyer y las amígdalas (Savino y Dardenne, 2000). Una vez que el sistema linfoide se ha desarrollado y madurado, es requerida la continua presencia del timo para contribuir a mantener el fino balance inmunorregulador entre las distintas poblaciones de linf-T (helper, memoria, killer, etc.).

Este órgano está rodeado por una fina cápsula de tejido conjuntivo que envía tabiques hacia su interior dividiéndolo incompletamente en pequeños lóbulos, los cuales a su vez se dividen en lobulillos. El estroma del interior de los lobulillos está dividido en dos regiones, una periférica rica en linfocitos, denominada corteza y otra central, denominada médula, formada por una malla con predominio de células retículoepiteliales o epiteliales tímicas (TEC, abreviatura que deriva de la expresión en inglés *Thymic Epitelial Cells*, y que se usará en esta tesis). Las TEC juegan un rol central en la maduración intratímica de los linf-T. Estas células secretan factores quimiotáxicos que permiten la colonización del timo por los pre-linfocitos T. Además, las TEC producen citoquinas y hormonas tímicas con actividad, *in vitro* e *in vivo*, sobre los distintos estadios de la diferenciación de linf-T y proveen algunas de las señales necesarias para su maduración (Bach y Dardenne, 1988).

En el desarrollo humano, durante la sexta semana de gestación, el endodermo del ala ventral del tercer par de bolsas faríngeas origina (bilateralmente) un esbozo

tímico, correspondiente al componente epitelial. Ambos esbozos tímicos se alargan y emigran caudalmente fusionándose en la línea media, luego son revestidos e invadidos por mesénquima derivado de las crestas neurales, el cual origina la cápsula y las trabéculas. La interacción entre las crestas neurales y el componente endodérmico se hace necesaria para que este último se diferencie y funcione. Durante la novena semana, el esbozo epitelial del timo es invadido por protimocitos provenientes de la médula ósea, que inducidos por dicho esbozo proliferan y se distribuyen formando las zonas cortical y medular (Gómez Dumm, 2003).

El timo presenta su máximo desarrollo después del nacimiento, incrementando su peso desde ese momento hasta la pubertad. Después de la pubertad comienza a involucionar, observándose una progresiva disminución del parénquima tímico, particularmente de los linfocitos corticales, y un aumento del tejido adiposo por infiltración de células adiposas circundantes, proceso denominado involución fisiológica. La atrofia o involución tímica resulta en un desarrollo menos eficiente de linf-T y en la disminución de la migración de los timocitos. El timo es una de las primeras glándulas del cuerpo en atrofiarse y, como consecuencia, la inmunidad timo-dependiente declina con la edad (**Fig. 1**) (Fisher, 1964; Lynch y col., 2009). Adicionalmente, existen factores que pueden contribuir con la disminución del tamaño del timo tales como las infecciones, la malnutrición y el estrés (Fisher, 1964).

La pérdida de un timo funcional durante la infancia resulta en un deterioro del número de linf-T y en la inmunidad mediada por células. En adultos, la disminución de actividad tímica, que resulta en un sistema inmune menos eficaz, está normalmente asociada a un incremento en la incidencia de distintas enfermedades, incluyendo las infecciones oportunistas, la autoinmunidad y el cáncer. Además, puede asociarse con el deterioro de uno o más de los subtipos de linf-T (Oates y Goldstein, 1984; Lynch y col., 2009).

Un caso severo de deficiencia tímica es el síndrome de DiGeorge. Esta es una enfermedad causada por una malformación congénita que se manifiesta por la hipoplasia o ausencia del timo y las paratiroides en los neonatos. La malformación ocurre por fallas en la diferenciación de las bolsas faríngeas (tercera y cuarta) y en el primer arco branquial. Asimismo, los pacientes con síndrome de DiGeorge

presentan una susceptibilidad aumentada a las infecciones, hipoparatiroidismo congénito, malformaciones de la boca, oídos de implantación baja, hipoplasia tiroidea y en algunos casos anomalías cardíacas (Sadler, 2001).

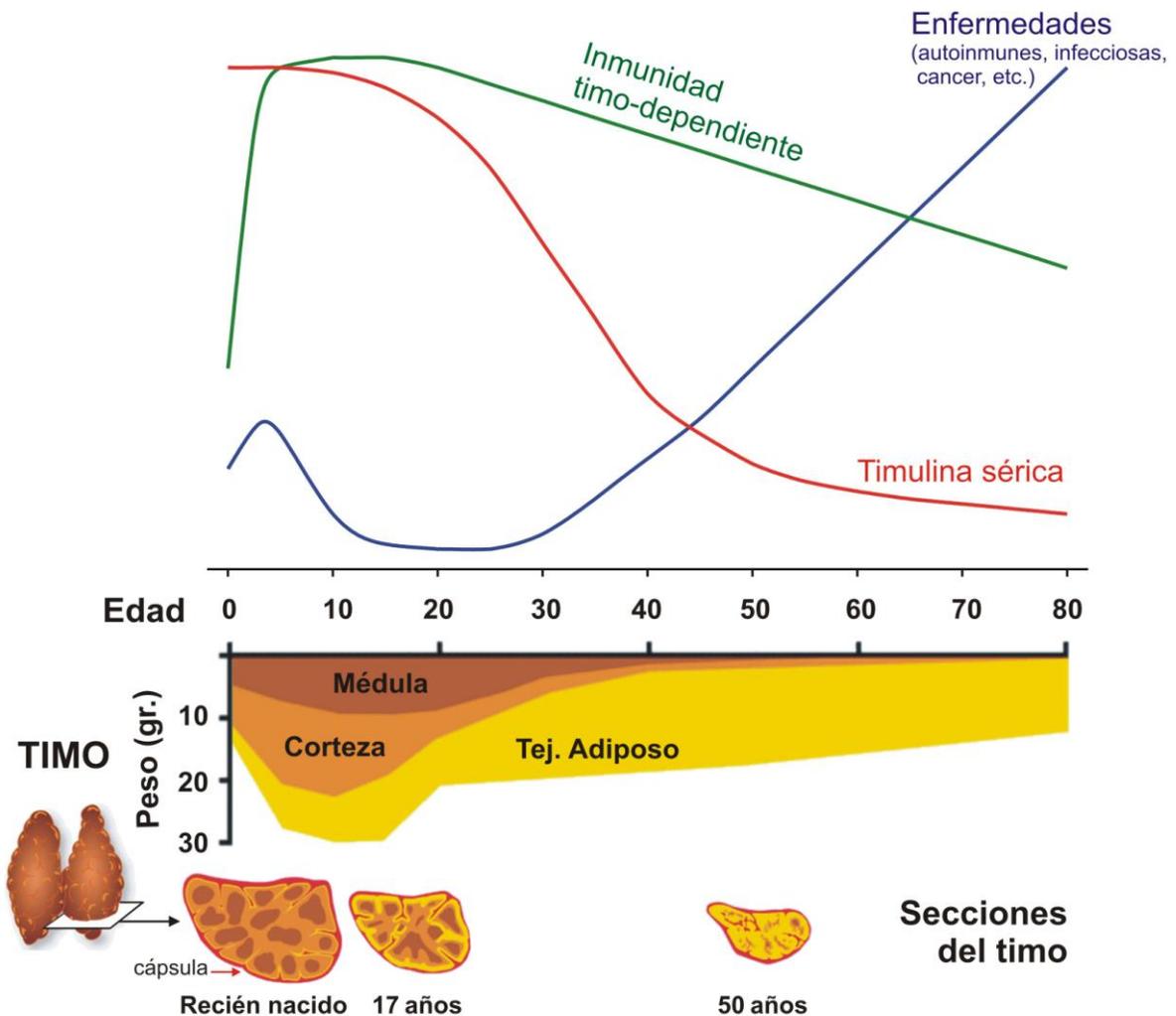


Figura 1: Representación de la involución tímica durante la vida humana en relación con la incidencia de enfermedades, con la capacidad de la inmunidad timo-dependiente y con los niveles séricos de timulina. Los esquemas de las secciones tímicas muestran el proceso de involución fisiológica donde se observa: una disminución en el peso de la glándula y una disminución en las proporciones de tejido cortical y medular con una creciente infiltración del tejido adiposo en el parénquima tímico.

1.1.2 COMUNICACIÓN ENTRE EL TIMO Y EL SISTEMA NEUROENDOCRINO

La comunicación entre los sistemas inmune y neuroendocrino ha sido claramente demostrada. Estos sistemas usan ligandos y receptores similares para

establecer circuitos fisiológicos de comunicación intra- e inter-sistema que juegan un importante rol en la homeostasis.

1.1.2.1 Acciones del sistema neuroendocrino sobre el timo

Se sabe que el timo recibe influencias neuroendocrinas además de las inmunológicas. Evidencias cada vez más firmes han colocado a un gran número de hormonas y neuropéptidos entre los inmunomoduladores potentes, sabiéndose que participan en varios aspectos de la función del sistema inmune en la salud y la enfermedad (Savino y Dardenne, 2000).

Asimismo, se han documentado extensas asociaciones entre la hipófisis, la tiroides, las adrenales, las gónadas y el timo (Fabris y col., 1989). Por ejemplo, la pérdida de la hipófisis o de la función tiroidea promueve la involución tímica y la administración de sus productos endocrinos la restaura. Se ha postulado una función regulatoria de la glándula pineal sobre el timo de manera directa o a través de la hipófisis (Maestroni y col., 1988).

También se ha propuesto que el eje hipófiso-tímico regula el sistema inmune y juega un importante rol en la atrofia tímica y en la disminución de la actividad de las células T que ocurre durante el proceso del envejecimiento. Efectivamente, se ha observado que las hormonas hipofisarias modulan la actividad funcional de las células linfoides (Fabris y col., 1971) y que el trasplante neonatal de timo normal en ratones atímicos (*nude*) reconstituye la respuesta inmune mediada por células. Sin embargo, para que esto último suceda se requiere de una normal función e integridad hipofisaria (Pierpaoli y col., 1976). Por otra parte, distintos estudios han demostrado que la involución tímica asociada al envejecimiento no es irreversible sino que, por el contrario, el timo es un órgano dinámico capaz de responder al medio ambiente endocrino aún en animales viejos. Así, la atrofia tímica causada por la edad puede revertirse parcialmente mediante manipulaciones endocrinas, tales como, el uso de células GH3 (una línea de células epiteliales hipofisarias que secretan hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL)) (Davila y col., 1987), la castración en ratas macho (Greenstein y col., 1986; Fitzpatrick y Greenstein, 1987), la administración de una mezcla de hormonas en roedores hipofisectomizados (Harrison y col., 1982) y la aplicación de hormonas tiroideas.

Dichas manipulaciones aumentan la respuesta endocrina tímica en humanos (Fabris y col., 1986) y en ratones (Fabris y Mocchegiani, 1985) viejos.

Desde la década del 60 se realizaron importantes contribuciones en el estudio de la relación entre el timo y el eje adrenal, demostrándose que los corticoides adrenales afectan el tamaño y la morfología tímica. Por consiguiente, la administración de adrenocorticotrofina (ACTH) o el estrés resulta en una marcada disminución de los linf-T y en el tamaño del timo. Asimismo, la adrenalectomía en animales resulta en una hiperplasia tímica (Fisher, 1964).

Finalmente, el extremadamente complejo control neuroendocrino del timo parece estar influenciado por un circuito biológico que involucra la producción intratímica de una variedad de hormonas y neuropéptidos y la expresión de sus respectivos receptores en células tímicas. En efecto, se ha demostrado que en las TEC se produce aunque en niveles muy bajos, corticosterona, GH, ACTH, somatostatina, vasopresina, oxitocina, insulina, factor de crecimiento símil insulina-1 (IGF-1), β -endorfina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y, tal vez, tirotrófina (TSH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Asimismo, en los timocitos se ha detectado la producción de PRL, GH, hormona luteinizante (LH), hormona liberadora de LH (LHRH), hormona liberadora de GH (GHRH), hormona liberadora de corticotrofina (CRH), hormona liberadora de tirotrófina (TRH), β -endorfina y VIP (Savino y Dardenne, 2000). También se ha documentado la detección de receptores para dichas moléculas (**Tabla 1**).

Tabla 1: Resumen de la expresión y localización de los receptores encontrados en el timo según la revisión de Savino y Dardenne (2000):

Receptor de		Localización
glucocorticoides		Citoplasma y núcleo de los timocitos (disminuyen con la edad), y en cultivo de TEC.
esteroides sexuales	Estrógeno (E ₂)	Preparaciones tímicas de células no linfoides, en TEC y en timocitos.
	Progesterona (P ₄)	Preparaciones tímicas de células no linfoides y en TEC.
	Andrógenos	Preparaciones tímicas de células no linfoides, fracciones enriquecidas con TEC y en todas las poblaciones de timocitos.
tri-iodotironina (T ₃)/ tiroxina (T ₄)		Timocitos y en TEC de roedores y humanos.
ACTH		TEC.
PRL		TEC y en timocitos (independiente de su maduración). A elevados niveles de PRL circulante (ej: lactancia) aumentaron los niveles de su receptor.

GH	Cultivo de TEC y en timocitos humanos, principalmente en un estado muy inmaduro de diferenciación.
GHRH	Timocitos de rata.
TRH	Extractos de timo.
somatostatina	Timocitos de ratón y en TEC humanas. La somatostatina inhibe <i>in vitro</i> la proliferación de TEC humanas.
Oxitocina	Timocitos.
Vasopresina	Timocitos.
β -endorfina	Preparaciones de membrana de extractos de timo.
VIP	Timocitos y en TEC humanas.
Insulina	Timocitos.
IGF-1	Timocitos y en TEC humanas y de roedores.

1.1.2.2 Acciones del timo sobre el sistema neuroendocrino

A partir de la década del 60 comenzó a emerger la idea de que el timo participa, durante la ontogenia temprana, en la programación definitiva del cerebro para la regulación hipotalámica de las funciones endocrinas que se desarrollarán en el adulto. Asimismo comenzó a reportarse que el timo ejerce, a través de las hormonas que produce (que se describirán más bajo), una acción moduladora directa sobre la función hipofisaria (Pierpaoli y *col.*, 1976).

La relevancia del timo sobre el eje adrenal se ha documentado en estudios que demostraron que la timectomía disminuye los niveles de ACTH y corticosterona en la sangre de ratas recién nacidas (Deschaux y *col.*, 1979) y de ACTH y β -endorfinas en monos jóvenes (Healy y *col.*, 1983). Los productos del timo pueden influenciar la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. En efecto, se ha observado que una preparación tímica bovina puede estimular directamente la secreción hormonal de la células corticotropas adenohipofisarias (Farah y *col.*, 1987).

También se encuentra bien documentado que el eje timo-hipofisario regula el sistema reproductor. Se sabe, por ejemplo, que las células gonadotropas y lactotropas son capaces de responder *in vitro* a diferentes factores de origen tímico (Brown y *col.*, 1994). Asimismo, se ha observado que la presencia del timo es requerida para una normal secreción de PRL y, a la inversa, que la PRL es probablemente la hormona más necesaria para la generación de las células T inmunocompetentes, vía su actividad timotrópica y timoestimulante (Pierpaoli y *col.*, 1970; 1971; 1976).

El ratón *nude* presenta niveles anormales de progesterona (P_4) durante la pubertad y los niveles séricos de LH son la mitad de los que poseen los animales normales. Esto sugiere que el timo participa directamente en la organización de los centros nerviosos intervinientes en la maduración sexual y la ciclicidad en hembras (Pierpaoli y col., 1976). Tales hallazgos *in vivo* están en línea con estudios *in vitro* en los que se documentó que las células gonadotropas y lactotropas son capaces de responder a diferentes factores de origen tímico (Brown y col., 1994).

1.3 HORMONAS TÍMICAS

1.3.1 Aspectos generales

Desde principios del siglo XX, se postuló que el timo posee un rol endocrino. Actualmente, las TEC son consideradas el componente endocrino del timo debido a que producen y secretan interleuquinas (IL) y péptidos bioactivos (hormonas tímicas).

La diferenciación de los linf-T comprende una serie de eventos que comienzan con un precursor linfoide y culminan con un linf-T maduro. Esta transformación secuencial está controlada por distintos factores. En estadios tempranos, el epitelio tímico juega un rol central y aparentemente único. Las hormonas tímicas ejercen dos acciones biológicas importantes sobre los linf-T y sus precursores inmaduros: la inducción de marcadores antigénicos y la promoción de varias de las funciones de los linf-T.

Se han descrito y caracterizado siete preparaciones tímicas principales, purificadas o semipurificadas a partir de timo bovino o de sangre. Se trata de la timosina fracción (TF5), el factor tímico humoral (FTH), el factor tímico X, la timoestimulina, la timopoyetina y la hormona tímica homeostática (HTH) y la timulina. Las seis primeras se describirán en forma conjunta mientras que la timulina se tratará, por su importancia, en una sección separada.

1.3.2 TF5, FTH, factor tímico X, timoestimulina, timopoyetina y HTH

La timosina fracción 5, la preparación tímica mejor caracterizada después de la timulina, se obtuvo de una preparación de timo de ternero y, a partir de esta fracción se pudieron identificar unos 20 péptidos, algunos de los cuales fueron purificados y secuenciados: timosina- α_1 , α_{11} , β_4 , β_8 , β_9 y β_{10} .

La timosina- α_1 (T- α_1 , PM= 3108 daltons) contiene 28 aminoácidos y un NH₂ terminal acetilado. Se ha demostrado que induce la expresión de algunos antígenos de superficie durante la diferenciación de los linf-T, incrementa la respuesta mitogénica de los linfocitos murinos, estimula la producción de anticuerpos y linfoquinas, y modula la expresión de la deoxinucleotidiltransferasa terminal (Bach y col., 1991). La T- α_1 ha sido usada en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con cáncer e inmunodeficiencias. Algunas evidencias sugieren que la T- α_1 es un fragmento de un polipéptido nativo mayor, la protimosina (ProT). La ProT fue encontrada a altas concentraciones en el timo pero también en el bazo, el hígado, los riñones y el cerebro. Se ha observado que la ProT resultó más efectiva que la T- α_1 en proteger a ratones de la infección con *Candida albicans*. Asimismo, la ProT induce la maduración y diferenciación de los linf-T y posee actividad antitumoral (Shiau y col., 2001).

El factor tímico humoral (THF) se detectó en un extracto del timo de ternero con el que logró restaurarse la inmunocompetencia en ratones neonatalmente timectomizados (NTx). A partir del extracto crudo de THF se aisló un octapéptido, el factor tímico humoral γ_2 (TFH- γ_2), con actividad biológica *in vitro* e *in vivo*. En efecto, se ha demostrado que TFH- γ_2 le otorgó reactividad inmunológica a las poblaciones celulares de linfocitos no competentes (Kook y Trainin, 1974). Además, se observó que el TFH- γ_2 indujo un incremento en la proliferación de linfocitos y en la producción de IL-2, por las células del bazo de ratones NTx (Bach y col., 1991).

La timopoyetina, inicialmente caracterizada por sus efectos sobre la transmisión neuromuscular más que por su acción sobre el sistema inmune (Harris y col., 1994), consiste en un polipéptido de 49 aminoácidos y su actividad biológica está localizada en el fragmento pentapeptídico timopentina (TP5). En estudios *in vivo*, se ha demostrado que esta hormona (y el péptido sintético TP5) promueve varias de las funciones de los linf-T (Bach y Dardenne, 1988).

Los niveles de algunos péptidos tímicos declinan con la edad y con la involución tímica, siendo indetectables en animales timectomizados (TX). Los niveles séricos de timopoyetina, T- α y del THF- γ_2 no disminuyen después de la involución tímica y la timectomía (Hadden, 1992).

Distintas hormonas tímicas han sido implicadas en el control neuroendocrino. En efecto, se ha documentado que la administración de la TF5 y de la HTH, una proteína dimérica, ejerce una inhibición significativa sobre la secreción de tirotrófina en ratas jóvenes; sin embargo, dicha inhibición no se observa en animales viejos (Goya y col., 1987; 1988). Además, se ha observado que la HTH también resulta activa sobre el eje adrenal (Goya y col., 1990).

Las timosinas son capaces de modular la liberación de las hormonas adenohipofisarias, incluyendo a la ACTH, PRL, GH y β -endorfina (Bach y col., 1991). Se ha observado que la timosina- β_4 estimula la liberación de la LH y de LHRH cuando se administra intracerebroventricularmente (Rebar y col., 1981a); sin embargo, se observó que no altera los niveles de ACTH o glucocorticoides circulantes (Healy y col., 1983).

Por otro lado, la timosina α_1 no influye en la secreción de la LH o de la LHRH y, luego de ser administrada centralmente, estimula la liberación de ACTH (McGillis y col., 1985; Hall y col., 1985). Otros trabajos mostraron que, aparentemente, la timosina α_1 ejerce una regulación negativa sobre la secreción *in vivo* de TSH, ACTH y PRL, sin detectarse efectos sobre los niveles de GH (Milenkovic y McCann, 1992).

Estudios en niños indican que la administración de timopoyetina resulta en un incremento de los niveles séricos de GH y cortisol (Savino y Dardenne, 2000). Más aún, se ha observado *in vitro* que la timopoyetina y el TP5 pueden incrementar los niveles de ACTH, β -endorfina y β -lipotrofina (Bach y col., 1991).

Aunque el mecanismo de acción de las hormonas tímicas aún no ha sido establecido, existen algunas hipótesis que resulta de interés considerar. Una de ellas propone que las hormonas tímicas actuarían por medio de mecanismos que requieren el incremento intracelular de los niveles de cAMP. Esta hipótesis se derivó de estudios *in vitro* e *in vivo* en los cuales la administración de THF indujo la activación de la adenilato ciclasa y un rápido aumento intracelular en los niveles de cAMP, los cuales subsecuentemente mediarían la maduración de las células linfoides derivadas del timo (Kook y Trainin, 1974). Además, en otro estudio se observó que la timopoyetina se une a receptores de membrana plasmática presentes en protimocitos induciendo la estimulación de la adenilato ciclasa (Bach y col., 1991), lo cual sustenta a la hipótesis en cuestión.

Alternativamente, se ha hipotetizado que en el mecanismo de acción de las hormonas tímicas participaría la prostaglandina E₂. Esta hipótesis se apoya en estudios que demostraron que tanto la timosina fracción 5 como la T- α_1 estimulan la producción de prostaglandina E₂ en linfocitos inmaduros derivados del bazo de ratones adultos timectomizados (ATx) o del timo de ratones intactos (Rinaldi-Garaci y *col.*, 1983). Además, se sugirió que el aumento de prostaglandina E₂ a su vez podría estimular la síntesis de cAMP (Kook y Trainin, 1974; Bach y Dardenne, 1988). También, se ha observado que la timosina puede afectar la vía de la lipoxigenasa y, probablemente, modular la síntesis de leucotrienos (Oates y Goldstein, 1984), los cuales a su vez podrían aumentar los niveles de cAMP.

Otra hipótesis propone que las hormonas tímicas actuarían, al menos en parte, por mecanismos que incrementan los niveles de cGMP. Esta hipótesis se apoya en estudios que demostraron que la incubación de timocitos con la timosina fracción 5 induce el ingreso de calcio que, a su vez, induce un incremento en los niveles de cGMP, los cuales mediarían la maduración y activación linfocitaria en el timo y en el bazo (Oates y Goldstein, 1984). Además, dicha hipótesis se apoya en estudios que mostraron que en linf-T maduros la timopoyetina se une a receptores de membrana, los cuales activan la guanilato ciclasa (Bach y *col.*, 1991).

En suma, los estudios presentados sugieren que las hormonas tímicas actuarían por medio del incremento en los niveles de nucleótidos cíclicos, dependientes del influjo de calcio, involucrando la vía de las prostaglandinas y la de los leucotrienos.

1.1.3.3 Timulina

1.1.3.3.1 Aspectos generales

La existencia de un factor tímico presente en el suero normal y en extractos tímicos ha sido descrita por Bach y Dardenne (1973) en experimentos en los cuales dicho factor tímico es capaz de aumentar la sensibilidad a la azatioprina de las células T formadoras de rosetas. Este factor tímico, aislado originalmente de suero de cerdo, consiste en un nonapéptido de 847 daltons de peso molecular que fue denominado factor tímico sérico (FTS) (Bach y *col.*, 1977).

La ausencia del FTS en el suero de ratones TX y de los ratones *nude* y su presencia tras el trasplante del timo, demostró su exclusivo origen tímico (Bach y

Dardenne, 1973). En efecto, mediante diferentes técnicas de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunoelectromicroscopía pudo confirmarse la localización del FTS en el citoplasma de las TEC. En estos estudios *in vitro* se usó un suero anti-queratina para demostrar que las células que contenían el FTS eran de origen epitelial. Además, se observaron inclusiones cristalinas citoplasmáticas que fueron específicamente marcadas con anticuerpo anti-FTS (Schmitt y col., 1980). Esto pudo confirmarse en un estudio posterior de Auger y col. (1984), en el cual utilizando dos anticuerpos monoclonales (anti-FTS sintético y anti-FTS intracelular) se marcaron células del timo de ratones normales y autoinmunes (NZB). La marcación predominó en la región medular y raramente se observó en la corteza, excepto en la región subcapsular, la cual puede corresponder a las células nodrizas. En la región medular, el elevado número de células inmunomarcadas correlaciona positivamente con las TEC. Precisamente, en las TEC se detectó fluorescencia intravesicular, con los dos anticuerpos, y se marcaron sus prolongaciones con el anti-FTS sintético.

El cultivo primario de las TEC humanas tratadas con tres inhibidores del movimiento vesicular indujo una disminución del FTS liberado y un aumento en el número de células marcadas con anti-FTS monoclonal. Esto sugirió que el péptido es secretado por exocitosis (Savino y Dardenne, 1986).

En los ratones NZB (un modelo experimental de lupus eritematoso sistémico) se observó una disminución en el número de las células marcadas, en la intensidad de la fluorescencia y en el número de vesículas encontradas respecto de lo observado en los ratones normales. Es de interés remarcar que las vesículas son más grandes que las de los animales normales, tal vez debido a un proceso de secreción de timulina anormal. Más aún, las inclusiones citoplasmáticas se correlacionaron con la disminución de los niveles de timulina circulante y fueron descritas en ratones Swan, NZB y normales viejos, sugiriendo que pueden depositarse durante el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes y durante el envejecimiento (Schmitt y col., 1980).

La secuencia de aminoácidos del FTS circulante (aislada del suero de cerdo) fue establecida a partir del péptido intacto y del péptido tratado con enzimas proteolíticas por el método de Edman y es la siguiente: pyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-OH (Pléau y col., 1977). Para confirmar la estructura primaria

completa así generada, se sintetizó un péptido (basándose en ella), el cual mostró una actividad biológica, *in vitro* e *in vivo*, idéntica a la del FTS nativo (Bach y col., 1977).

Sin embargo, algunas preparaciones de FTS sintético resultaron ser inactivas o inestables. Este hecho sugirió la existencia de dos formas del péptido, una biológicamente activa y otra que no lo era. Efectivamente, la incubación del péptido con agentes quelantes resultó en la pérdida de su actividad, la cual fue recuperada tras la adición de sales de Zn^{+2} , Al^{+3} y Ga^{+3} . La activación más efectiva del FTS fue obtenida mediante su mezcla con el Zn^{+2} en una relación molar 1:1, lo cual demostró que la forma biológicamente activa contiene un ión Zn^{+2} . La presencia de Zn^{+2} en el FTS sintético fue confirmada por espectrometría de absorción atómica. Además, mediante estudios de microanálisis se identificaron gránulos densos de Zn^{+2} dentro de vesículas citoplasmáticas en cultivo de TEC y en secciones tónicas, sugiriendo que la interacción con el FTS ocurre en estas células (Dardenne y col., 1982).

A raíz de estos estudios pioneros, el complejo activo formado por FTS-Zn fue denominado “**timulina**”. La actividad biológica de esta hormona fue evaluada por un bioensayo desarrollado por Dardenne y Bach (1975), que utilizó la formación de rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja (el mismo se describirá en Materiales y Métodos). Desde que se desarrolló este bioensayo, a principios de los años 70, ha sido utilizado para medir los niveles de timulina en fluidos biológicos.

En un estudio con ratonas preñadas TX se detectó timulina sérica después del día 14 de gestación, probablemente secretada por el timo fetal (Bach, 1983). En el hombre, los niveles más elevados de timulina sérica se han detectado desde el período neonatal hasta la adolescencia, momento en el que comienzan a declinar alcanzando valores muy bajos a los 36 años; a partir de este momento, permanecen constantes durante el envejecimiento (se dosó hasta los 80 años) (**Fig. 1**) (Consolini y col., 2000).

Estudios de resonancia magnética nuclear y de dicroísmo circular indicaron que el nonapéptido en solución acuosa es flexible y asume múltiples conformaciones en un equilibrio dinámico (Laussac y col., 1986). Más aún, en un estudio similar se examinaron los cambios conformacionales del nonapéptido en presencia y ausencia de Zn^{+2} , de manera de aclarar la relación entre la conformación y la

actividad. A partir de este estudio se determinó: *i*) la existencia de dos complejos de asociación entre el Zn^{+2} y el nonapéptido (1:1 y 1:2), *ii*) la diferencia entre los dos complejos depende de la Ser⁸, *iii*) en el complejo 1:1, las Ser^{4,8} y la Asn⁹ son los tres aminoácidos que se coordinan al ión Zn^{+2} (**Fig. 2**), y *iv*) la conformación de la secuencia Ser⁸-Asn⁹ alrededor del metal es un factor determinante en la expresión de la actividad biológica (Cung y *col.*, 1988). En un estudio *in vitro*, en las TEC humanas, se sugirió que el Zn^{+2} se une al FTS principalmente dentro de las vesículas citoplasmáticas, previo a su secreción (Savino y Dardenne, 1986).

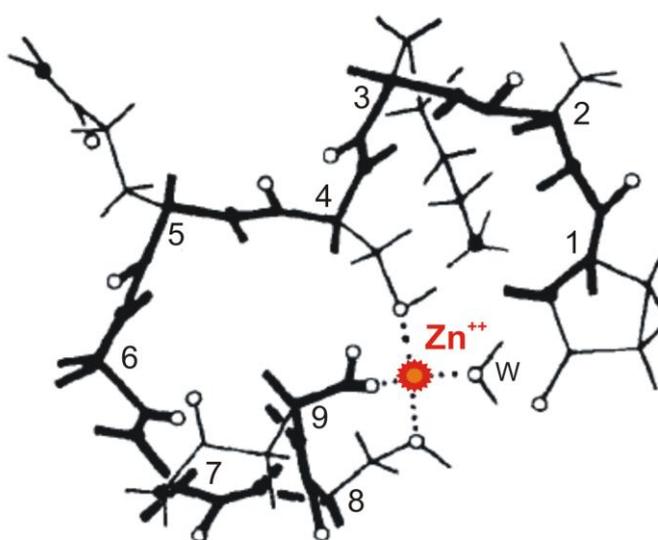


Figura 2: Representación espacial que muestra la relación estequiométrica 1:1 en el complejo Zn-FTS. Los residuos Ser⁴-OH, Ser⁸-OH y Asn⁹-COOH son los que se coordinan al ion Zn^{+2} , siendo el cuarto ligando una molécula de agua (w). Los números representan los nueve aminoácidos que forman el FTS, comenzando en el grupo N-terminal (Modificado de Cung y *col.* 1988).

Durante estas investigaciones se sostuvo que la presencia de cambios mínimos en la secuencia del FTS podría alterar su acción biológica y su capacidad para unirse a receptores celulares. Así, para investigar la relación entre la estructura y la actividad del FTS, se realizaron estudios en los cuales a partir de la secuencia nativa del péptido se sintetizaron numerosos análogos modificando uno o dos aminoácidos (Pléau y *col.*, 1979; Auger y *col.*, 1987). Por ejemplo, en dos casos se cambiaron los aminoácidos de las posiciones 4 y 9 por D-Ser y Asp, respectivamente, lo que resultó en péptidos inactivos en el bioensayo de rosetas. El análogo Asp-9-FTS fue capaz de inhibir el efecto del FTS sobre las células formadoras de rosetas. Otros análogos sintetizados, en los cuales fue sustituido el

primer aminoácido por Gln o Pro, mostraron poseer una actividad biológica idéntica a la del FTS en el bioensayo de rosetas. El antagonista Asp-9-FTS y los agonistas Pro-1-FTS y Gln-1-FTS mostraron capacidad de competir por el receptor del FTS de la línea celular 1301 (derivada del cultivo de leucocitos de un paciente con leucemia linfoblástica aguda) (Pléau y col., 1979; Gastinel y col., 1982).

Hasta el momento, se ha descrito la existencia de un receptor específico para el FTS en dos líneas celulares tumorales de linf-T humanos, la 1301 y la HSB2, utilizando FTS tritiado ($[^3\text{H}]$ -FTS) (Pléau y col., 1980). El receptor de la línea 1301 fue el más estudiado, describiéndose dos sitios de unión independientes que no presentan cooperatividad negativa, con K_d del orden de 3,5 y 110 nM y un número máximo de sitios de unión de 48.000 y 780.000 por célula, respectivamente. Además, se observó que la interacción del $[^3\text{H}]$ -FTS con la membrana plasmática de las 1301 fue estable, saturable y reversible (Gastinel y col., 1982). Sin embargo, en estos estudios no se pudo corroborar la presencia de receptores citoplasmáticos, necesitándose otros estudios para determinarlo. Todos los esfuerzos subsecuentes para demostrar la presencia de receptores para FTS en linf-B, linf-T normales u otros tipos celulares han sido infructuosos.

Aún no se conoce de qué manera la timulina ejerce sus efectos. En estudios basados en el bioensayo de rosetas se observó que el cAMP actúa de manera sinérgica con la timulina sobre las células formadoras de rosetas, por lo que se sugirió que el cAMP podría ser el segundo mensajero mediante el cual la timulina actúa. Sin embargo, otros trabajos propusieron a las prostaglandinas (PG), debido a que la presencia de inhibidores de PG anuló el efecto de la timulina (Bach, 1983). Sin embargo, las evidencias disponibles no son suficientes como para sostener tal presunción.

Se han documentado interacciones de la timulina con proteínas aún no caracterizadas. En efecto, la actividad de la timulina en el bioensayo de rosetas sólo aparece después de la eliminación por diálisis o por filtración de moléculas con un PM entre 100 a 300 kDa (Pléau y col., 1981). Estas observaciones apoyan la hipótesis de la existencia de proteínas presentes en el suero normal que poseen una acción inhibitoria sobre la timulina. Por otra parte, mediante el análisis de eluciones obtenidas por fraccionamiento de suero humano y de ratón se ha sugerido la presencia de proteínas transportadoras de la timulina. Dichas

moléculas tendrían un PM del orden del de la albúmina o la prealbúmina, de 40 a 60 kDa (Bach, 1983).

1.1.3.3.2 Control Neuroendocrino de la secreción de timulina

La producción y secreción de timulina está influenciada directa o indirectamente por el sistema neuroendocrino. Efectivamente, se ha documentado un número de secretagogos para la timulina. Estos incluyen la dexametasona, la progesterona, la testosterona, el estrógeno (E₂), la PRL, la GH y las hormonas tiroideas (**Fig. 3**). En cultivo de TEC, cada una de estas moléculas estimula la liberación de timulina. Además de los efectos de estas hormonas, los opiodes endógenos como las β -endorfinas, estimulan la liberación de timulina en cultivo de TEC de roedores y humanos (Savino y Dardenne, 2000).

Distintos trabajos sustentan la existencia de un eje PRL-timulina. En primer lugar, se ha identificado la presencia de receptores para PRL en las TEC (Dardenne y *col.*, 1991). Además, se ha observado que la PRL es capaz de estimular la síntesis y secreción de timulina, *in vitro* en las TEC e *in vivo* en ratones viejos que poseían bajos niveles de timulina sérica (Dardenne y *col.*, 1989). Más aún, en un modelo de hiperprolactinemia experimental, inducida por inyecciones repetidas de PRL, se observó un incremento en los niveles de timulina en animales jóvenes y viejos (Savino y Dardenne, 2000). Por otra parte, se le ha otorgado a la PRL un rol importante en el desarrollo y la función de los linf-T (Hadden, 1992; Pierpaoli y *col.*, 1976). Algunos investigadores sugirieron que la PRL actúa sobre una población de células accesorias productoras de IL-1 induciendo la secreción de esta citoquina, la cual actúa sobre las TEC promoviendo su proliferación y aumentando la secreción de timulina (Hadden, 1992).

Las fluctuaciones en los niveles séricos de la GH modulan la síntesis y la secreción de timulina. En perros viejos tratados con la GH bovina se observó una restauración parcial de sus bajos niveles de timulina (Goff y *col.*, 1987). En ratones viejos, el tratamiento con GH ovina incrementó sus bajos niveles de timulina (Goya y *col.*, 1992), mientras que en ratas viejas el tratamiento combinado de la GH y tiroxina (T₄) restauró parcialmente los bajos niveles de timulina (Goya y *col.*, 1993).

La hipofisectomía en ratas conduce a una intensa, aunque transitoria, disminución de los niveles séricos de timulina.

Se ha documentado que los niños que presentan una deficiencia congénita en la producción de GH muestran, además, bajos niveles de timulina sérica. El tratamiento con GH logra restaurar la timulina sérica, lo que se correlaciona con los niveles de IGF-1 circulante (Mocchegiani y *col.*, 1990b; 1996). Asimismo, pacientes acromegálicos mostraron elevados niveles de timulina sérica en comparación con personas normales, lo cual también se correlacionó con niveles elevados de IGF-1 (Timsit y *col.*, 1992).

En experimentos *in vitro*, la GH humana recombinante estimuló la liberación de timulina a partir de las TEC, las cuales poseen receptores para dicha hormona (Ban y *col.*, 1991). Además, en estos experimentos se observó que el efecto de la GH podía ser bloqueado con el agregado de anticuerpos contra IGF-1 y contra el receptor de IGF-1, lo que ha llevado a postular al IGF-1 como un posible mediador de los efectos de la GH sobre las TEC (Timsit y *col.*, 1992).

Las hormonas tiroideas también modulan la secreción de timulina. En estudios *in vitro*, se observó que las hormonas tiroideas estimulan la secreción de timulina por una acción directa sobre las TEC (Mocchegiani y *col.*, 1990a; Villa-Verde y *col.*, 1993). El tratamiento *in vivo* con tri-iodotironina (T_3), en TEC de ratones y ratas jóvenes, indujo un incremento en los niveles de timulina sérica y en el número de células que contienen timulina en el timo. El efecto opuesto pudo evidenciarse con la administración de un inhibidor de la síntesis de hormonas tiroideas, el 6*N*-propil-2-tiouracilo (Savino y *col.*, 1984). Además, se ha documentado que en animales viejos, los cuales poseen niveles de timulina sérica disminuidos, el tratamiento con T_4 pudo revertir esta deficiencia (Fabris y Mocchegiani, 1985; Villa-Verde y *col.*, 1993). Pacientes con hipertiroidismo exhibieron niveles elevados de timulina en el suero mientras que pacientes con hipotiroidismo mostraron niveles disminuidos (Fabris y *col.*, 1986).

Respecto de la acción de la ACTH o las gonadotrofinas sobre la timulina, aún no se ha documentado que ejerzan un efecto directo sobre su secreción. Sin embargo, se ha observado que un aumento en la liberación de ACTH, por ejemplo en el pico del ciclo circadiano o durante una cirugía, coincidió con un aumento de la liberación de timulina (Safieh-Garabedian y *col.*, 1992). En un estudio *in vitro*, la

ACTH mostró incrementar, de manera dosis dependiente, los niveles de timulina y, además, esta actividad fue dependiente de Ca^{+2} (Buckingham y *col.*, 1992).

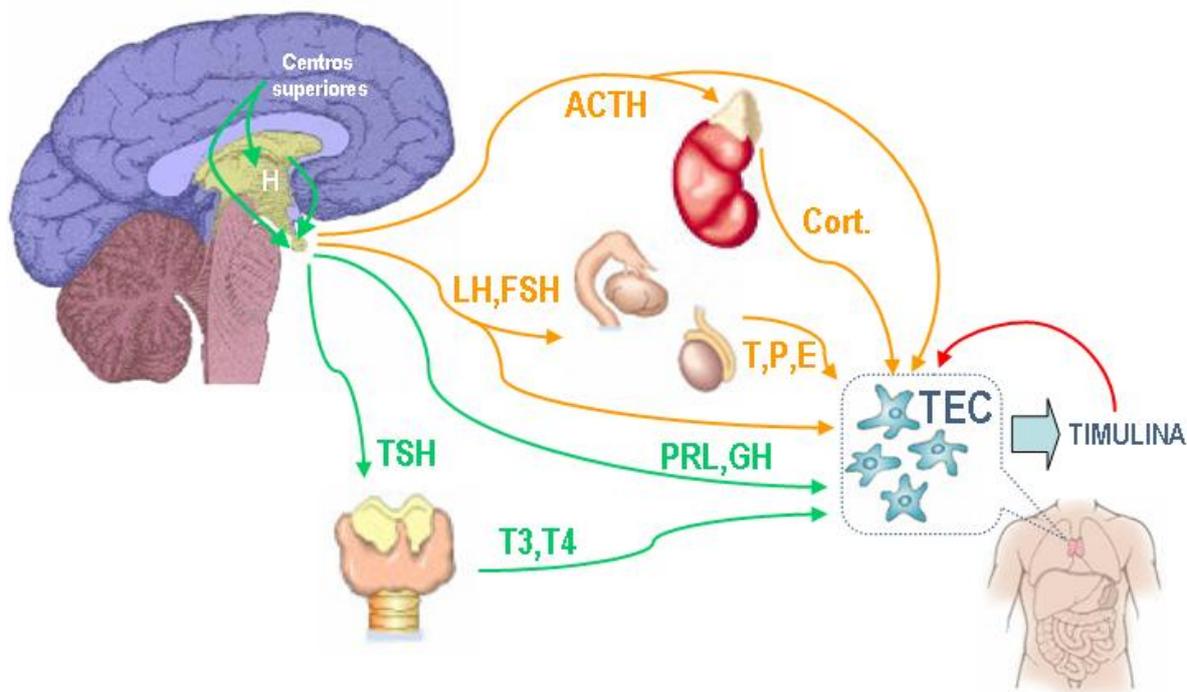


Figura 3: Control pleiotrópico sobre la producción y secreción de timulina. La timulina ejerce una retroalimentación negativa sobre su propia producción. La liberación de timulina se encuentra estimulada por la TSH, por medio de la T_3 y T_4 , y por acción directa de la PRL y la GH. Aún no está claro si la acción de la ACTH y las gonadotropinas (LH y FSH) sobre las células epiteliales del timo (TEC), ya sea directa o indirectamente por medio del cortisol-corticosterona y por los esteroides sexuales (testosterona, progesterona y estrógeno), es inhibitoria o estimuladora.

El efecto de los esteroides adrenales y gonadales sobre la secreción de timulina parece ser complejo; una estrategia experimental para estudiarlo es mediante la adrenalectomía y/o la gonadectomía. La extracción de las adrenales o las gónadas, en machos y hembras, produjo una disminución transitoria (durante un mes) de los niveles de timulina sérica. Por su parte, la adrenalectomía junto con la gonadectomía produce una disminución de la timulina sérica más prolongada (durante 3 meses volviendo a valores normales a los 6 meses). Es de remarcar que en ambos procesos de cirugía simple o doble se ha observado un incremento en el contenido intratímico de timulina (Dardenne y *col.*, 1986). En cultivos de TEC, de roedores y humanos, se observó que la exposición a niveles fisiológicos de

glucocorticoides, estradiol, progesterona o testosterona aumentó la concentración de timulina en los sobrenadantes celulares (Savino y col., 1988).

Aunque no existen evidencias concluyentes, se sugiere que hay factores hipotalámicos capaces de influir en la producción de timulina mediante una acción directa sobre la actividad endocrina de las TEC. Se ha observado que el tratamiento i.p. de ratones senescentes con extractos hipotalámicos provenientes de ratones jóvenes corrigió el déficit de los niveles de timulina sérica (Folch y col., 1986). En cultivos de TEC, la exposición a extractos hipotalámicos o hipofisarios derivados de ratones jóvenes indujo un aumento en la concentración de timulina en los sobrenadantes celulares y este efecto decayó cuando los extractos se obtuvieron de ratones viejos (Goya y col., 1995a).

Se ha documentado que tanto *in vitro* como *in vivo* la timulina es capaz de regular su propia secreción (Savino y Dardenne, 2000). En efecto, se ha observado que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-timulina en ratones resulta en un incremento en el contenido intratímico de la hormona (Savino y col., 1983). Más aún, la incubación de TEC en cultivo con estos anticuerpos incrementó el número de células que contienen timulina. De manera inversa, la adición exógena de timulina en cultivos de TEC resultó en una disminución de su liberación (Cohen y col., 1986).

1.1.3.3.3 Propiedades biológicas de la timulina

1.1.3.3.3.1 Acciones inmunomodulatorias

La timulina ejerce distintas acciones sobre el sistema inmune. Entre las más importantes puede mencionarse su participación en la diferenciación de los linf-T y en la modulación de la mayoría de sus funciones. Dependiendo del estado inmunológico del modelo experimental que se utilice, la timulina es capaz de estimular, inhibir o dejar intactas las funciones de los linf-T estudiadas (**Tabla 2**).

Se ha demostrado que la timulina induce una amplia variedad de marcadores de diferenciación *in vitro* e *in vivo* en células inmaduras (pro-linfocitos y timocitos) y en linf-T de pacientes y animales inmuno-suprimidos (Incefy y col., 1980; Bach, 1983). Además, se ha observado que esta hormona estimula: *i*) la activación de linf-T citotóxicos (linf-Tc), linf-T colaboradores (linf-Th) y linf-T supresores (linf-Ts), *ii*) la proliferación de linf-T y *iii*) la síntesis de IgG anti-ADN, IgA e IgG y de IL-2

(Charreire y Bach, 1975; Bach, 1983). En general, los efectos documentados para la timulina son inmunoestimuladores, pero un ejemplo de su efecto inmunosupresor es el retardo en el rechazo del trasplante de piel en animales normales, tal vez por estimulación de linf-Ts (Kaiserlian y col., 1981).

En otros estudios, se ha observado que la timulina ejerce un efecto dual sobre la actividad de las células citotóxicas naturales (NK, *Natural Killer*), aumentándolas o reduciéndolas, dependiendo de la concentración de timulina empleada (en estudios *in vitro*) y de los valores iniciales de la actividad de estas células (en estudios *in vivo*, en pacientes con cáncer) (Dokhelar y col., 1983).

Tabla 2: Resumen de los efectos de la timulina sobre las funciones de los linf-T (Bach, 1983).

Efecto de la timulina	Modelo experimental
Estimulación de la proliferación de linf-T	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación inducida por fitohemoaglutinina en ratones y ratas ATx y en humanos inmunodeficientes. • Lupus.
Aumento de la citotoxicidad e hipersensibilidad retardada	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción citotóxica alogénica en ratones ATx. • Citotoxicidad anti-trinitrofenol en timocitos normales. • Reacción de rechazo de injerto-contra-huésped en ratones normales. • Estimulación de la hipersensibilidad retardada en ratones ATx.
Estimulación de la actividad de los linf-Th	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de la síntesis de anticuerpos en ratones senescentes y en pacientes inmunodeficientes. • Inducción de la producción de IL-2 en timocitos normales y en provenientes del bazo de ratones <i>nude</i>. • Aumento en la producción de autoanticuerpos (IgG anti-ADN) en ratones hembras jóvenes de la cepa B/W. <p>Estos efectos se observan con bajas dosis de timulina ($<10^{-7}$ M).</p>
Estimulación de la actividad de los linf-Ts	<ul style="list-style-type: none"> • Retardo en el rechazo a injertos de piel en ratones normales. • Depresión de la producción de autoanticuerpos (IgG anti-ADN) en ratones machos jóvenes de la cepa B/W. • Estimulación de la supresión inducida con concanavalina A en personas normales y con lupus. <p>Estos efectos se observan con altas dosis de timulina ($>10^{-7}$ M).</p>
Modificación de la actividad de las células NK	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la actividad de células NK: <i>in vivo</i> en pacientes con bajos valores de NK, e <i>in vitro</i> con bajas concentraciones de timulina. • Disminución de la actividad de células NK: <i>in vivo</i> en pacientes con valores normales o elevados de NK, e <i>in vitro</i> con altas concentraciones de timulina.
Aumento en la respuesta de los linf-B	<ul style="list-style-type: none"> • Favorecimiento de la activación policlonal de linf-B del ratón inducida por LPS.

Se estudió el efecto del tratamiento con timulina en un modelo de ratón híbrido (B/W), conocido por desarrollar espontáneamente un cuadro de autoinmunidad severa caracterizado por elevados niveles de anticuerpos anti-ADN, depósitos de Ig en los glomérulos y un síndrome linfoproliferativo (Síndrome de Sjögren, trastorno autoinmunitario crónico que se caracteriza por infiltración linfoplasmocitaria de las glándulas exocrinas con destrucción epitelial). En animales machos viejos B/W la inyección intraperitoneal (i.p.) de timulina, durante 4 semanas, indujo una mejoría en los niveles de autoanticuerpos (marcada disminución) y en la glomerulopatía (disminución de los depósitos de Ig) (Israel-Biet y *col.*, 1983).

Por consiguiente, tradicionalmente se ha considerado que la timulina posee un papel inmunomodulador. No obstante, evidencias recientes demostraron que la inyección sistémica de esta hormona en dosis de nanogramos es capaz de producir hiperalgesia y citoquinas inflamatorias, mientras que cuando se la inyecta a dosis más altas (en microgramos), previo a la inyección periférica de endotoxina (ET), puede inducir el efecto opuesto (Safieh-Garabedian y *col.*, 2000). Otros estudios realizados en un modelo de leishmaniasis cutánea en ratones indujo hiperalgesia y estimulación de la IL-1 β y del factor de crecimiento nervioso (NGF), aportando evidencias en relación a la acción moduladora que ejerce la timulina sobre dicha hiperalgesia. En este modelo, las inyecciones i.p. de esta hormona a distintas concentraciones (1, 100 y 1000 ng) indujeron una reducción de la hiperalgesia y de los niveles de los factores proinflamatorios (IL-1 β y NGF), de manera reversible y dependiente de la dosis (Kanaan y *col.*, 2002).

Adicionalmente, la timulina ha demostrado ejercer una acción antiinflamatoria sobre el sistema nervioso central (SNC) y, de esta manera, se le otorga un rol potencialmente neuroprotector. Precisamente, en un modelo de inflamación cerebral por inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de ET, el pretratamiento con timulina i.c.v. redujo la hiperalgesia y normalizó o atenuó los niveles elevados de IL-1 β e IL-6 (inducidos por la ET) en algunas áreas del cerebro (Safieh-Garabedian y *col.*, 2003).

Debido a la bimodalidad de las acciones de la timulina, se llevaron a cabo experimentos con el péptido sintético análogo a la timulina Asp-9-FTS (PAT), inicialmente sintetizado por Pleau y *col.*, 1979. En un primer trabajo, se estudió la

acción del PAT en el tratamiento del dolor por inflamación en modelos animales de hiperalgesia inflamatoria inducida por ET, sistémica y local. Se demostró que ejercía un poderoso efecto hipoalгésico y anti-inflamatorio que puede atribuirse a su acción inhibitoria de la cascada inflamatoria (Safieh-Garabedian y *col.*, 2002).

Complementariamente, se estudió el efecto del PAT en cuatro modelos animales de dolor neurogénico (dos por mononeuropatía periférica y dos por hiperalgesia inducida por capsaicina). Los resultados de este trabajo demostraron que el PAT ejerce un poderoso efecto analгésico (con dosis en microgramos en comparación con otras drogas como la morfina en miligramos). Dicho efecto fue evidenciado por la inhibición dosis dependiente de las manifestaciones neuropatológicas, en los modelos de mononeuropatía, y por la interferencia, directa o indirecta, de la acción de la capsaicina sobre las aferencias nociceptivas. Por lo tanto, el PAT parece reproducir los efectos analгésicos de la timulina sin ejercer ninguna acción hiperalгésica (Saadé y *col.*, 2003).

Recientemente, se ha documentado que la timulina posee actividad protectora en otros órganos, pudiendo modificar el daño celular y la lesión tisular. En efecto, el daño renal inducido por cefaloridina (CER, un antibiótico nefrotóxico que induce falla renal aguda en animales y humanos), mediado por la activación de la vía de señalización ERK, resulta significativamente atenuado por la administración intravenosa de timulina. En este estudio se demostró que el pre-tratamiento con timulina inhibe la activación de ERK inducida por CER y, por lo tanto, previene la disfunción renal en ratas (Kohda y *col.*, 2005).

Otros estudios mostraron que la timulina previene la pancreatitis experimental y la diabetes inducida por aloxano o estreptozotocina (Yamanouchi y *col.*, 1994) y la diabetes y miocarditis causadas por el virus de la encefalomiocarditis en ratones (Mizutani y *col.*, 1996). Además, se ha demostrado que suprime la encefalomiелitis alérgica aguda experimental y la fibrosis de la piel durante la reparación de la herida (Nagai y *col.*, 1982; Barbul y *col.*, 1989). En otros trabajos se ha demostrado que la timulina previene la lesión pulmonar inducida por bleomicina, una droga antitumoral (Yara y *col.*, 2001). Más recientemente se observó que también previene la aparición del perfil cardiopulmonar morfológico, hemodinámico e inflamatorio característico de la hipertensión pulmonar inducida por monocrotalina (Henriques-Coelho y *col.*, 2008).

Aún no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual la timulina ejerce su protección en los tejidos dañados y en las alteraciones mencionadas. Se ha demostrado que este péptido es capaz de incrementar los niveles de la superóxido dismutasa en ratones con senescencia acelerada (Zhao y *col.*, 1990), sugiriendo que tal vez actúe alterando la producción de radicales libres.

1.1.3.3.2 Acciones endocrinas

1.1.3.3.3.2.1 Actividades hipofisotrópicas

Un número creciente de investigaciones le otorgan a la timulina un rol hipofisotrópico. En efecto, en condiciones *in vitro*, la incubación de timulina con fragmentos hipofisarios obtenidos de ratas machos adultas indujo una estimulación de la liberación de LH (Zaidi y *col.*, 1988). Coincidiendo con estos resultados, se ha demostrado que este metalopéptido puede estimular la liberación de GH, PRL, LH y TSH a partir de preparaciones de células adenohipofisarias perifundidas obtenidas de ratas hembras. Este efecto hipofisotrópico es dependiente de la dosis de timulina y disminuye con la edad de los animales donantes de células adenohipofisarias, lo cual sugiere que el envejecimiento conduce a una desensibilización de la hipófisis a las señales tímicas (Brown y *col.*, 1998; 1999; 2000).

En un estudio posterior se estableció que el efecto de la timulina sobre la liberación de gonadotrofinas varía durante del ciclo estral de la rata. Concretamente, la hormona posee un efecto estimulador sobre la liberación de LH durante todo el ciclo, y de FSH durante el diestro 1, pero es inhibitoria durante el estro. Además, se observó una relación directamente proporcional entre los niveles de progesterona y el efecto de la timulina sobre la liberación de FSH, siendo factible que la progesterona actúe regulando la reactividad de las células hipofisarias a la timulina. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la influencia de este péptido tímico depende del status hormonal de los animales donantes de las pituitarias (Hinojosa y *col.*, 2004). Adicionalmente, se ha observado que la timulina estimula la liberación de ACTH en incubados de fragmentos hipofisarios de rata, efecto que parece estar mediado por una acumulación intracelular de cAMP y cGMP (Hadley y *col.*, 1997).

De manera complementaria, se ha estudiado el efecto de la disminución de la timulina sérica sobre la hipófisis. Para ello se realizó una inmunoneutralización de la hormona mediante un anticuerpo anti-timulina en ratones desde el nacimiento hasta la pubertad. A partir de este estudio pudo evidenciarse una disminución en los niveles séricos de PRL, LH, FSH, GH y TSH. Esta alteración del estado hormonal se correlacionó con modificaciones, en su mayoría compensatorias, del tamaño y número de células de las poblaciones adenohipofisarias. Por ejemplo, se observó un menor número de células en las poblaciones lactotropa, somatotropa y corticotropa, y una hipertrofia celular en las poblaciones gonadotropa, somatotropa y corticotropa. Además, pudieron determinarse diferencias en la respuesta a la inmunoneutralización relacionadas con el sexo de los animales (Camihort y *col.*, 2006).

1.1.3.3.2.2 Relevancia de la timulina en el eje reproductivo

Se ha sugerido una participación, directa o indirecta, de la timulina sobre las gónadas. En efecto, en la hembra, esta hormona puede intervenir en la función esteroideogénica ovárica, incrementando la actividad de la aromatasa (enzima limitante de la esteroideogénesis). Además, se observó que los ovarios responden a la timulina mediante un mayor incremento de las gonadotropinas durante la maduración de la granulosa y aumento en la secreción de la progesterona (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1991). La administración de timulina previa al tratamiento con eCG (gonadotropina corónica equina) indujo un incremento en el peso ovárico y en la tasa de ovulación, efecto que dependió de la dosis del metalopéptido y de la edad de los ratones (Hinojosa y *col.*, 1999).

En el macho, también se sugiere que la timulina es uno de los componentes de la compleja serie de eventos endocrinos y paracrinós que controlan la esteroideogénesis testicular. Efectivamente, se ha demostrado que esta hormona afecta positivamente la acumulación de andrógeno testicular. En estos estudios, en tres líneas de cerdos genéticamente seleccionadas por poseer niveles elevados, bajos y normales de LH circulante, la timulina fue inyectada en la yugular determinando, en general, un incremento de las concentraciones circulantes de testosterona. La inyección de timulina no afectó las concentraciones de estrógeno, por lo cual su efecto se limita a la acción sobre los andrógenos.

Dichos efectos son dependientes de las concentraciones de LH y timulina. Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis que propone que la timulina aumenta el efecto estimulador de la LH sobre el incremento de andrógenos en los testículos de ratas y cerdos (Wise 1998; Wise y Ford, 1999).

1.1.3.3.3 Enfermedades asociadas al desbalance tímico: Potencial terapéutico de la timulina

En humanos y animales, se ha demostrado que el envejecimiento conduce a una severa involución del timo y de los niveles de timulina sérica (Goff y *col.*, 1987; Goya y *col.*, 1992; Consolini y *col.*, 2000). Por otra parte, la mayoría de las enfermedades que desarrollan un cuadro de inmunodeficiencia presentan atrofia tímica y anormalidades en las TEC. Además, en todos los casos se ha observado una significativa reducción en los niveles séricos de timulina (Safieh-Garabedian y *col.*, 1992). Estas enfermedades incluyen al síndrome de DiGeorge, la ataxia telangiectasia, la deficiencia de IgA con bajo número de linf-T, las infecciones crónicas asociadas con descenso de linf-T, las leucemias, los linfomas y las enfermedades autoinmunes, tales como, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoidea (AR), la esclerosis múltiple y la diabetes autoinmune (Incefy y *col.*, 1980). Si bien no existe evidencia de que la caída en los niveles circulantes de timulina juegue un rol causal en las mencionadas patologías, resulta plausible suponer que la terapia de reemplazo con timulina podría atenuar algunos de los síntomas asociados a estas enfermedades o al envejecimiento (Iwata y *col.*, 1981).

En estudios de niños y adultos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se observó que sus niveles de timulina sérica se encontraban disminuidos en comparación con voluntarios saludables. Además, estos pacientes presentaban una disminución en el número de linf-T, así como una respuesta disminuida a la fitohemoaglutinina y una propensión a desarrollar infecciones virales (Dardenne y *col.*, 1983; Safieh-Garabedian y *col.*, 1992). La disminución en los niveles séricos de timulina y las anomalías de los linf-T en estos pacientes, apoya la hipótesis de que la timulina juega un rol relevante en el mantenimiento de una inmunocompetencia normal (Safieh-Garabedian y *col.*, 1992).

Se han realizado algunos abordajes clínicos preliminares con timulina sintética. En pacientes con síndrome de DiGeorge, la timulina restauró el número y la

función de los linf-T. En tres casos de niños con síndrome de inmunodeficiencia (dos relacionados con la ataxia telangiectásica) la administración intravenosa de timulina sintética (10 µg/Kg), diariamente durante dos semanas y luego quincenalmente, indujo una mejoría clínica general, una disminución de la frecuencia de las infecciones, una corrección del déficit de linf-T y una rápida producción de IgA (a las dos semanas de comenzado el tratamiento) (Bordigoni y col., 1982). En el caso de tratamiento de AR se observó un mejoramiento clínico, en particular, de aquellos aspectos relacionados con la inflamación (Amor y col., 1987).

1.2 MODELOS ANIMALES DE TIMODEFICIENCIA

Los roedores inmunodeficientes son modelos indispensables para las investigaciones biomédicas en oncología, inmunología, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, rechazo de tejidos trasplantados e infecciones. Los animales timoprivos constituyen un modelo de inmunodeficiencia ampliamente utilizado. A continuación se describen algunos modelos animales de timodeficiencia.

1.2.1 ANIMALES TIMECTOMIZADOS

Se encuentra bien establecido que los ratones y cobayos timectomizados en los primeros días de vida desarrollan una marcada deficiencia en la población de linf-T y en su capacidad inmunológica y algunos desarrollan el síndrome de Wasting, que lleva a la muerte de los animales (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Una característica de este síndrome es la deficiencia de linfocitos, lo que sugiere que el factor primario de esta patología es el desbalance en el sistema linfoide. A esta hipótesis la sostienen estudios que demuestran que el síndrome puede ser prevenido por un adecuado trasplante de tejido linfopoiético (Pierpaoli y Sorkin, 1972; Pierpaoli y Besedovsky, 1975).

Distintas especies animales responden de diferentes maneras a la timectomía neonatal (NTx), probablemente por una variabilidad en el grado de madurez y función del timo al nacer. Por ejemplo, en ratas, ratones y hámsteres se observó una disminución de sus linf-T. En cuanto al desarrollo del síndrome de Wasting,

los ratones lo desarrollan, las ratas raramente lo presentan y, en el caso de los hámsteres, los machos lo desarrollan y las hembras no, sugiriendo la presencia de un factor hormonal y/o sexual en estos animales (Sherman y Dameshek, 1964).

La timectomía en ratones recién nacidos y hasta los 35 días de edad interfiere con el desarrollo de la capacidad inmunológica de las células provenientes de los ganglios linfáticos y del bazo (Dalmaso y *col.*, 1964). Asimismo, se ha demostrado que la NTx en ratones induce una defectuosa producción de anticuerpos y, frecuentemente, estos animales muestran un crecimiento deficiente, desarrollan el síndrome de Wasting y mueren a edades tempranas. Contrariamente, la TX en animales adultos no está acompañada por un severo disturbio en la linfopoyesis o en las funciones inmunes. Sin embargo, si el animal adulto se timectomiza e irradia desarrolla severos defectos en la capacidad inmunológica (Miller, 1964).

En cuanto a su estado endocrino, los ratones NTx han evidenciado alteraciones en los niveles de las distintas hormonas hipofisarias, de manera similar a lo que ocurre en los ratones congénitamente atímicos. Así, tras la NTx se han observado modificaciones en la población somatotropa (Pierpaoli y Sorkin, 1972), en los niveles séricos de GH, LH y FSH, sin alterar los niveles de PRL (Michael y *col.*, 1980). Adicionalmente, se ha documentado que la NTx indujo una disminución en los niveles de estrógeno circulante (García y *col.*, 2000) y alteración de la corteza adrenal (Pierpaoli y Sorkin, 1972).

La timectomía en distintas cepas de ratones y en ratas, realizada neonatalmente, y en primates (TX fetal) indujo importantes alteraciones reproductivas, las cuales se describen en el inciso **1.3.2** de la presente tesis.

1.2.2 EL RATÓN CONGÉNITAMENTE ATÍMICO: NUDE

La mutación *nude* (*nu*) fue descubierta en 1962 en una colonia exocriada de ratones; luego se determinó que era autosómica recesiva (1966) y que causaba disgenesia tímica (1968). Es decir, los mutantes *nude* carecían de un timo funcional, observándose solo un rudimento, y producían un número muy reducido de células T maduras (Rygaard, 1973). Además de fallar en la formación del timo, el ratón *nude* (homocigota) presentaba un fenotipo desnudo o sin pelo, característica que le dio el nombre a la mutación.

El alelo mutado *nude* está localizado en el cromosoma 11 y tiene un efecto pleiotrópico. Recientemente, se ha determinado que el gen *whn* (*winged helix nude*) representa el gen *nude*. Los ratones heterocigotas (*nu/+*) para dicho gen son fenotípicamente normales e inmunocompetentes mientras que los homocigotas (*nu/nu*) son los inmunocomprometidos (**Fig. 4**).

El clonado del gen *whn* dio lugar a una serie de investigaciones que arrojaron las siguientes conclusiones: *i*) los dos clones generados con la mutación *whn* (homocigotas) exhiben las mismas características macroscópicas del ratón *nude*, atimia y carencia de pelo; *ii*) el gen *whn* codifica para una proteína nuclear, el factor de transcripción WHN; *iii*) para la formación del primordio tímico no se requiere la expresión del gen *whn*; *iv*) para una exitosa colonización de los precursores de los linf-T en el rudimento tímico es necesaria la expresión de gen *whn*; y por último, *v*) la actividad del gen *whn* también es necesaria para el mantenimiento de la diferenciación de las células precursoras primitivas en los fenotipos de TEC en el timo maduro (Nehls y col., 1996; Schlake y col., 1997).

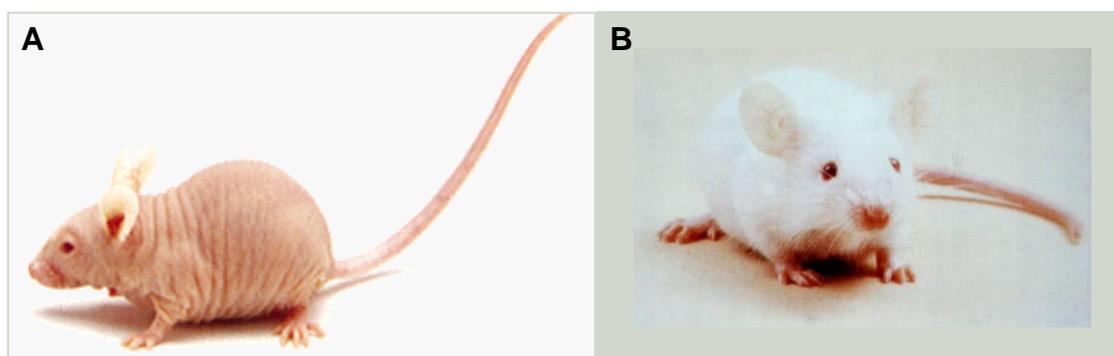


Figura 4. Ratones homocigota *nude* (A) y heterocigota (B). Puede observarse las diferencias fenotípicas ocasionadas por la mutación *nude*.

Los mutantes *nude* poseen defectos básicos que pueden involucrar las tres capas embrionarias. La disgenesia tímica parece ser causada por un error metabólico en el ectodermo y mesodermo y por una inadecuada masa mesenquimática en el área del mediastino. Estas anomalías resultan en una falla durante la colonización del rudimento tímico por los protimocitos migrantes, acompañada de alteraciones en las células estromales y epiteliales (Holub, 1989). Consecuentemente, estos animales presentan deficiencias de linf-T competentes, aunque mantienen un complemento normal de linfocitos B, dependientes de la médula ósea, y niveles elevados de las células NK y de macrófagos (Holub y col.,

1989) que es su principal mecanismo de defensa. La formación de anticuerpos en estos mutantes está principalmente limitada a las IgM y a una respuesta primaria. Los niveles de IgG fluctúan considerablemente entre individuos de la misma colonia. Además, se observa un déficit general en las IgA y una heterogeneidad disminuida de las inmunoglobulinas (Mink y col., 1980).

En la piel de los ratones *nude* se observa una queratinización defectuosa del pelo y degeneración de los folículos pilosos, resultando en calvicie a pesar de que incrementan la frecuencia de los ciclos de crecimiento capilar (Eaton, 1976). A nivel histológico, presentan escasos folículos pilosos normales y también algunos pelos finos. Como consecuencia de la calvicie estos animales tienen problemas de termorregulación (Holub, 1989).

Además de las características fenotípicas descritas de los ratones *nude* (atimia y carencia de pelo), estos animales poseen un peso corporal y de sus órganos menor que el de los heretocigotas. Este tipo de anomalías en el peso pueden estar determinadas genéticamente y/o por una acción prenatal del timo (Rebar y col., 1982).

Los ratones *nude* han mostrado poseer niveles de gonadotrofinas disminuidos; esta anomalía no se encuentra genéticamente ligada al sexo. En efecto, en distintas investigaciones se ha observado que machos *nude* poseen concentraciones reducidas de LH y FSH en la hipófisis y en el suero, en comparación con su contraparte heterocigotas. Estas concentraciones son aún más reducidas en el período previo a la maduración sexual (Rebar y col., 1982; Goya y col., 2001). Dicha deficiencia fue prevenida parcialmente mediante la implantación de timos provenientes de animales heterocigotas (Rebar y col., 1981b). Otras hormonas que se han observado disminuidas en estos mutantes son la TSH, la GH, la T₃ y la PRL séricas, sin mostrar cambios en los niveles de T₄ y en la morfología de las células tirotropas, somatotropas y lactotropas adenohipofisarias (Goya y col., 1995b; 1996).

Adicionalmente, se ha observado que los ratones congénitamente atímicos responden anormalmente al estrés. En efecto, el estrés por inmovilización indujo una reducción en los niveles de GH, TSH y gonadotrofinas séricas, particularmente de LH, y una elevación inmediata de los niveles de PRL sérica, en hetero y homocigotas, aunque la respuesta de estos últimos fue menor (Goya y

col., 1995b; 1996; 2001). Tales resultados sugieren que estos mutantes presentan una disfunción neuroendocrina en relación con las gonadotrofinas.

Consecuentemente, se ha observado que en los ratones machos *nude* adultos los niveles séricos de testosterona se encuentran disminuidos (Rebar y col., 1982). El estrés por frío indujo un incremento en los niveles séricos de TSH, T₃ y T₄ en los ratones homo y heterocigotas, siendo mayor la respuesta en los ratones atímicos, aunque los niveles basales de TSH y T₃ estén disminuidos. Por consiguiente, la respuesta neuroendocrina a un agente estimulador, como el frío, parece estar bien preservada en los ratones *nude* por medio del eje TSH-tiroides (Goya y col., 1995b).

Las hembras homocigotas *nude* prepuberales, han mostrado poseer niveles de gonadotrofinas séricas disminuidos en comparación con los de las heterocigotas. En el período prepuberal se ha observado un dramático incremento en los niveles de gonadotrofinas hipofisarias en el día 20 de edad, tanto en heterocigotas como en *nude*. Sin embargo, las concentraciones de gonadotrofinas en las hembras homocigotas son significativamente menores que las de las hembras heterocigotas (Rebar y col., 1980). En un estudio posterior, durante el primer día de vida, las hembras *nude* fueron implantadas subcutáneamente con timos provenientes de animales heterocigotas y sacrificadas en el día 20 de edad, lo que resultó en una completa prevención de los bajos niveles séricos de gonadotrofinas (Rebar y col., 1981b). Después de la apertura vaginal, las concentraciones de LH y FSH en la hipófisis y los niveles séricos de FSH no mostraron ser significativamente diferentes, mientras que los niveles de LH en suero permanecieron disminuidos durante la vida (Rebar y col., 1980).

La PRL es otra hormona que se encuentra afectada en estos mutantes. Se ha observado que el trasplante de timo, hipófisis o de timo más hipófisis en hembras *nude* de 30 días de edad, induce un incremento significativo de los niveles séricos de PRL (30 días después del trasplante) en comparación con las hembras *nude* que no fueron trasplantadas (Gaufo y Diamond, 1997).

Adicionalmente, se han observado en los ratones *nude* (machos y hembras), alteraciones en la corteza adrenal que pueden ser prevenidas mediante el trasplante neonatal de timo (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Las hembras *nude* homocigotas de 30 días también han mostrado poseer niveles de estrona y

androstenediona disminuidos en comparación con los niveles de las heterocigotas (Rebar y col., 1980). Presentan asimismo alteraciones en su eje reproductivo, las cuales se describen en detalle en el inciso **1.3.2** de la presente tesis.

Se ha documentado que, bajo condiciones convencionales de crianza, los ratones atímicos poseen una vida corta (2-4 meses) (Pierpaoli y Sorkin, 1972). No obstante, bajo condiciones libres de gérmenes (SPF), se ha observado que la supervivencia máxima del ratón *nude* es la misma que la de ratón salvaje (Holland y col., 1978). El promedio de supervivencia de los ratones *nude*, sin embargo, es menor que el de su contraparte heterocigota porque desarrollan más frecuentemente linfomas. Además, el mutante *nude* es más susceptible a ciertos patógenos naturales (virus y parásitos intestinales) (Holub, 1992).

En condiciones convencionales, estos mutantes progresivamente presentan una reducción del peso corporal, pérdida de la grasa subcutánea, disminución de los linfocitos periféricos, una rápida deshidratación con hipotermia e hipotonía muscular, diarrea, cataratas y caquexia (**Fig. 5**). Debido a estos síntomas dichos animales deteriorados fueron llamados “wasting” o “senescentes” (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Además, los animales con wasting mostraron alteraciones más pronunciadas en las adrenales y desarrollo de atrofia e hipofuncionalidad en la tiroides, respecto de los ratones *nude* que no presentan wasting (Pierpaoli y Sorkin, 1972).



Figura 5. Fotografía de un ratón congénitamente atímico *nude* de 3 meses de edad que desarrolló “wasting”. Extraída de Pierpaoli y Sorkin, 1972.

A nivel central, las hembras *nude* mostraron deficiencias en la corteza frontal y fronto-parietal, que incluyen las aéreas motora y somatosensorial primarias, sin observarse alteraciones en la corteza occipital. Las regiones corticales afectadas,

de ambos hemisferios, fueron más delgadas en las hembras *nude* respecto de las heterocigotas. El trasplante de timo, hipófisis y de timo más hipófisis dentro de la cápsula del riñón derecho, en hembras *nude* de 30 días de edad, indujo una restauración del tamaño de las áreas corticales deficientes, 30 días después del trasplante (Gaufo y Diamond, 1997).

Finalmente, se considera que el ratón mutante *nude* es un modelo clave para estudiar la diferenciación de los linf-T, las reacciones celulares específicas y la termogénesis en estados de inmunodeficiencia (Holub, 1992). Además, el hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha contribuido al desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos roedores en el primer modelo animal de experimentación inmunodeficiente (Carbone y Maschi, 2006).

1.3 EI ROL DEL TIMO SOBRE EL EJE REPRODUCTIVO

1.3.1 DESCRIPCIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL

El eje reproductivo femenino está constituido por el hipotálamo, la adenohipófisis y los ovarios. El hipotálamo es una región del sistema nervioso central (SNC) localizada en el diencefalo, formando las paredes laterales y ventrales del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis. Se conecta con la hipófisis mediante el tallo hipofisario.

El hipotálamo consta de varios núcleos constituidos por células que sintetizan y secretan distintos péptidos que actúan sobre la hipófisis, modulando su función. Por lo tanto, esta estructura nerviosa puede ser considerada una glándula. Efectivamente, el hipotálamo ha sido ampliamente estudiado por su estricta dependencia hormonal y por considerarse el centro responsable de la coordinación del sistema endocrino, regulando las actividades de las glándulas tiroideas, suprarrenales y las gónadas, así como las funciones de crecimiento, lactancia y equilibrio hídrico, entre otras. Además, interviene en funciones de naturaleza no endocrinas (regulación de la temperatura), en la actividad del sistema nervioso autónomo y en el control del apetito (Genuth, 1998; Larsen y col., 2002).

La glándula pituitaria o hipófisis cumple una función integradora neuroendocrina, regulando a glándulas periféricas y a tejidos blanco hormono-dependientes. Actúa sobre el metabolismo, la reproducción y el crecimiento tisular. Está localizada en la zona central de la base del cerebro y se halla alojada en una concavidad del esfenoides denominada silla turca. Esta glándula consta de dos porciones principales: 1) la adenohipófisis formada por el lóbulo anterior o *pars distalis*, el lóbulo intermedio o *pars intermedia* y el lóbulo infundíbulo-tuberal o *pars tuberalis* y 2) la neurohipófisis formada por la eminencia media, el tallo infundibular y el lóbulo posterior o *pars nervosa*. Estas dos porciones tienen un origen embriológico diferente. La adenohipófisis deriva de la bolsa de Rathke, una evaginación del ectodermo oral, mientras que la neurohipófisis deriva del infundíbulo, un divertículo neuroectodérmico en el piso del diencéfalo. La bolsa de Rathke pierde su conexión con la cavidad oral y se adhiere al infundíbulo, conforme avanza el desarrollo embrionario (Gómez Dumm, 2003).

El hipotálamo proyecta axones desde los núcleos supraóptico y paraventricular que terminan en la *pars nervosa*, los cuales forman el haz hipotálamo-hipofisario, constituyéndose una conexión directa entre el hipotálamo y la neurohipófisis. Así, las hormonas peptídicas, oxitocina y vasopresina, se sintetizan en los núcleos hipotalámicos, viajan a través de los axones y se almacenan en la *pars nervosa* desde donde son liberadas a la circulación en respuesta a estímulos específicos.

Desde otros núcleos hipotalámicos se proyectan axones que terminan en la eminencia media, adyacentes a una red de capilares. Estos axones constituyen el haz tuberoinfundibular a partir de los cuales se liberan, de manera intermitente, factores hipotalámicos estimuladores e inhibidores. Dichas sustancias hipofisotrópicas son transportadas por el sistema porta hipotálamo-hipofisario hasta la *pars distalis* de la adenohipófisis donde se encuentran sus células diana. Las hormonas estimuladoras que produce el hipotálamo son: la CRH, la GHRH, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la TRH. Los factores hipotalámicos inhibidores son la dopamina y la hormona inhibidora de GH (GHRH o somatostatina) (Genuth, 1998; Larsen y col., 2002).

Por su parte, la adenohipófisis sintetiza y libera a la circulación sanguínea seis hormonas, todas ellas de naturaleza peptídica. Como ya se ha mencionado, el hipotálamo es el principal regulador de la secreción hipofisaria. La adenohipófisis

consta de diferentes grupos celulares que sintetizan hormonas: 1) las células *corticotropas*, que se sitúan en el centro y producen adrenocorticotrofina (ACTH); 2) las células *gonadotropas*, que se localizan en la pars distalis y secretan gonadotropinas (FSH y LH), activinas e inhibinas; 3) las células *lactotropas*, que también se localizan en la pars distalis, por lo cual se sugiere una interacción paracrina entre ellas y las células gonadotropas, y secretan PRL; 4) las células *melanotropas*, que se localizan en la zona intermedia y secretan hormona melanocito-estimulante; 5) las células *somatotropas*, localizadas en las alas laterales y secretan GH; y 6) las células *tirotropas* de localización anteromedial que secretan TSH (Genuth, 1998; Larsen y col., 2002). Además de estas células cromófilas, la hipófisis presenta células cromófobas que se hallan en estadios endocrinos previos o involutivos, por lo que presentan escasos gránulos secretorios cuando se las estudia mediante inmunocitoquímica óptica o electrónica (Cónsole y Gómez Dumm, 1997).

El eje hipotálamo-hipofisario se encuentra regulado principalmente por mecanismos de retroalimentación (feed-back), habitualmente negativos. Además, las células folículo-estelares producen interleuquina 6 y factores de crecimiento endotelial y fibroblástico. También se las asocia con funciones de sostén, fagocitosis, respuesta inmune y control de iones y líquido intersticial. Tendrían acciones paracrinas sobre las células endocrinas. Esta población celular ofrece un campo promisorio para el estudio de las interconexiones paracrinas intraglandulares (Cónsole y col., 1999).

De esta manera, el hipotálamo, la adenohipófisis y los ovarios constituyen el eje neuroendocrino que regula la reproducción (**Fig. 6**). Cualquier trastorno cuantitativo o cualitativo en la acción de estas estructuras se traduce en anomalías del sistema reproductor. Por lo tanto, el sistema reproductor femenino requiere de una interacción regulada entre señales nerviosas y endocrinas para iniciar y sostener sus funciones cíclicas normales. Precisamente, el hipotálamo sintetiza y secreta de manera pulsátil un decapeptido, la GnRH, que a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario llega a la adenohipófisis, donde promueve la secreción de gonadotropinas (Gn), FSH y LH. Las Gn son hormonas glucoproteicas que se vierten a la circulación y llevan a cabo sus acciones sobre el ovario. Los estrógenos producidos por el ovario causan inhibición de la secreción, tanto de

GnRH a nivel hipotalámico como de FSH y LH a nivel hipofisario, completándose así un circuito de retroalimentación hipotálamo-hipófiso-ovárico. Este efecto inhibitorio de los estrógenos se ve potenciado por la progesterona (Genuth, 1998; Larsen y col., 2002).

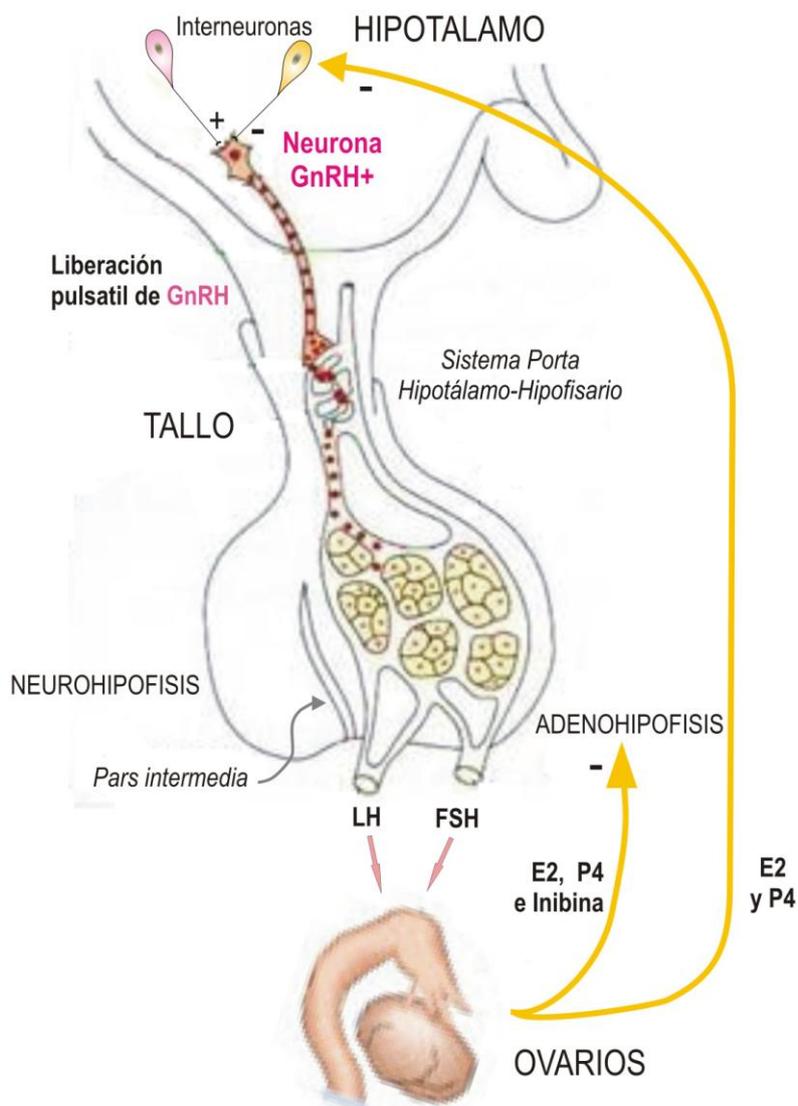


Figura 6. Eje reproductivo: esquema del tráfico hormonal entre el hipotálamo, la adenohipófisis y el ovario. A nivel central se produce la GnRH que estimula las células gonodotropas adenohipofisarias. Dichas células sintetizan y secretan LH y FSH. Estas Gn estimulan los ovarios (gametogénesis y esteroideogénesis) los cuales producen estrógeno, progesterona e inhibina, que a su vez regulan negativamente el hipotálamo y la hipófisis.

La función principal de la FSH es estimular el desarrollo folicular y, por lo tanto, la gametogénesis. La LH ejerce un control sobre la producción de esteroides gonadales a partir de las células foliculares ováricas. En primer lugar, produce un

aumento de pregnenolona y, secundariamente, de testosterona y estradiol, vía progesterona. Adicionalmente, su pico preovulatorio desencadena la ruptura y luteinización del folículo maduro.

Además, otras hormonas intervienen en el control de la función reproductiva, tales como la inhibina y la activina; la inhibina frena la secreción de FSH y la activina la estimula. Asimismo, se ha observado que la PRL tiene efecto supresor a nivel hipofisario e hipotalámico. Por otro lado, el óxido nítrico interviene en la regulación paracrina de FSH y LH (Genuth, 1998; Larsen y *col.*, 2002).

1.3.2 EJE TIMO-OVÁRICO: IMPORTANCIA DE LA INTEGRIDAD TÍMICA EN EL PERÍODO PERINATAL

Numerosas evidencias sugieren que, al menos en ratas y ratones, la acción endocrina del timo sobre el eje ovárico es ejercida, principalmente, en un período perinatal delimitado entre los últimos días de la preñez y los primeros días postnatales. Se ha documentado que durante dicho período crítico del desarrollo el timo interviene en la maduración sexual, particularmente en las hembras. Es de remarcar que durante este período ocurren pasos decisivos del desarrollo y la programación de ciertas funciones neuroendocrinas en el cerebro (Harris y Levine, 1965; Pierpaoli y Besedovsky, 1975).

Los primeros estudios se realizaron en ratones timectomizados en los días 2 a 4 de vida demostrando la existencia de una ventana temporal madurativa en la cual interviene el timo. Estos animales NTx desarrollaban, frecuentemente, una disfunción ovárica que se caracterizaba por una pérdida en el número de ovocitos, un creciente aumento de infiltración linfocitaria ovárica e hipertrofia e hiperplasia de células intersticiales, anomalías que se correlacionaban con una disminución en el número de folículos y cuerpos lúteos. Estas alteraciones fueron inicialmente evidenciadas a los 25 días de edad haciéndose muy prominentes a los 2-3 meses de vida. Sin embargo, cuando la TX se realizó después de los 7 días de vida no se observaron cambios en el desarrollo ovárico mientras que la TX antes de los 2 días de edad provocaba la muerte de los animales, debido a la enfermedad de wasting (Nishizuka y Sakakura, 1969; Michael y *col.*, 1980; Nishizuka y Sakakura, 1971). Análogamente, se observó que la NTx (día 2 de vida) de ratones inducía un retraso en la apertura vaginal (ApV) y una disminución en el tamaño del útero y los

ovarios (Besedovsky y Sorkin, 1974). Además, se ha indicado que la NTx promovió la incidencia de tumorigénesis ovárica durante el envejecimiento (Michael y col., 1981)

De manera similar, las hembras congénitamente atímicas *nude* presentan severas deficiencias reproductivas determinadas por un retraso en la ApV y primera ovulación que, además, cesa tempranamente. A nivel ovárico, los ratones *nude* mostraron al nacer un número normal de ovocitos pero a los 2 meses de vida el número de folículos disminuyó marcadamente y, por lo tanto, se incrementó la atresia folicular. Adicionalmente, se ha observado que estos animales poseen una fertilidad reducida y que como consecuencia de estas anomalías desarrollan una falla prematura de la función ovárica (Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y col., 1981b). Conjuntamente con las anomalías a nivel ovárico, un número importante de animales atímicos presenta una inflamación inespecífica de la pared uterina a partir de las 5 semanas de edad. Es probable que el proceso inflamatorio uterino afecte la fertilidad de estos animales (Alten y Groscurth, 1975).

Los roedores completan posnatalmente la maduración del timo, el hipotálamo, la adenohipófisis y los ovarios, mientras que en los primates estos eventos se desarrollan únicamente en el período fetal (intrauterino). En efecto, se ha observado que la timectomía fetal en primates induce una anormal diferenciación ovárica, una disminución en el tamaño de los ovarios e inhibe la ovogénesis (Healy y col., 1985). En mujeres con aplasia tímica (ataxia telangiectasia) se ha observado la presencia de ovarios alterados (Dunn y col., 1964; Ammann y col., 1970).

En relación al estado hormonal, se ha demostrado que la ausencia del timo en ratones adultos induce una reducción en los niveles séricos de P_4 , 17- β -estradiol, Gn (Rebar y col., 1980), GH (Michael y col., 1980) y PRL (Goya y col., 1996). En animales de 6 días se han observado niveles disminuidos de testosterona (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Adicionalmente, se ha observado que ratones *nude* peripuberales presentaban reducidos niveles de LH y FSH en sus hipófisis en comparación con los animales heterocigotas (Rebar y col., 1981b).

En síntesis, los ratones hembras NTx y *nude* presentan reducidos niveles de gonadotrofinas séricas, un retraso en su pubertad y en la maduración de los ovarios y del útero y, además, una reducción de la fertilidad y un envejecimiento

premature de la función ovárica. Algunas de estas anomalías han podido prevenirse mediante el trasplante de timo neonatal o por la administración diaria de ciertos extractos de timo bovino, mientras que no pudo evitarse con la inyección de timocitos, células del bazo y células de ganglios linfáticos (Besedovsky y Sorkin, 1974; Pierpaoli y Besedovsky, 1975; Strich y col., 1985).

Consecuentemente, los resultados presentados demuestran que el timo está involucrado en un complejo mecanismo endocrino que controla la maduración sexual durante un período crítico de la vida. Debido a que la inyección de células inmunocompetentes en animales timoprivos no es capaz de compensar la ausencia del timo, es posible presumir que, uno o más factores hormonales tímicos son responsables de tal acción madurativa del timo sobre el eje reproductivo.

Ciertamente, se ha documentado que distintas preparaciones de origen tímico afectan la actividad ovárica e hipofisaria. En efecto, en un estudio se utilizaron células ováricas dispersas de ratas pretratadas con gonadotropina coriónica humana (hCG), las cuales fueron posteriormente expuestas a: 1) una fracción de timo de aprox. 28 kDA, 2) medio proveniente de timos incubados, o 3) medio de cultivo de células retículoepiteliales; como resultado se observó que estas preparaciones tímicas inducían una disminución en la producción de P_4 , E_2 y testosterona, estimuladas por la hCG de manera dosis dependiente (Aguilera y Romano, 1989). Esto sugiere que un factor tímico es capaz de interaccionar con la hCG en su acción sobre las células ováricas, modificando la secreción de esteroides *in vitro*.

Adicionalmente, estas secreciones tímicas suplementadas a cultivos de células hipofisarias, preestimuladas con GnRH, han mostrado inducir un incremento en la secreción de LH y FSH. Por lo tanto, se concluyó que existía un factor tímico capaz de potenciar (o facilitar) el efecto de la GnRH sobre las células hipofisarias (Mendoza y Romano, 1989).

Se ha establecido que, aunque presentan anomalías, los ovarios de los ratones *nude* son aptos para responder normalmente a la administración exógena de LH (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Esto sugiere que la anomalía ocasionada por la atimia se presenta a nivel hipotálamo-hipofisario. En efecto, en experimentos *in vivo* en ratones heterocigotas y *nude* se ha observado que la administración de

extractos tímicos y de FTS puede inducir, en general, una disminución en la concentración de la LHRH hipotalámica y un aumento variable en los niveles de gonadotrofinas hipofisarias (Strich y col., 1985).

Análogamente, se ha observado *in vitro* que fracciones de perifusatos de timo de ratas adultas son capaces de inducir liberación de LH en perfusiones de fragmentos hipofisarios. Debido a que en estas fracciones de perifusatos de timo había una mezcla de factores tímicos, se determinó el efecto de diferentes péptidos tímicos sobre la liberación de LH en incubaciones estáticas de hipófisis. En estos ensayos, se determinó que solo el FTS causó la secreción de LH de una manera dosis dependiente y comparable con el efecto de la LHRH (Zaidi y col., 1988). Coincidiendo con estos resultados, se ha observado que la perfusión de células adenohipofisarias (AH) de ratas hembras, jóvenes y viejas, con timulina estimuló la secreción de LH, siendo menor la respuesta de las células AH senescentes (Brown y col., 2000). La actividad liberadora de gonadotrofinas de la timulina ha manifestado ser dependiente de la edad del donante hipofisario y de la dosis de timulina. Probablemente, dicha actividad está mediada por el calcio, el cAMP y el inositol fosfato (Hinojosa y col., 1999; Brown y col., 2000).

En experimentos *in vivo*, se ha observado que la timulina estimula la ovulación inducida por gonadotrofinas equinas en ratones prepuberales (Hinojosa y col., 1999). Se mostró que la TX en ratones de 10 días de vida (TX-10) induce un retraso en la pubertad, una disminución en los niveles séricos de 17β -estradiol y una disminución en el número de folículos totales. La administración de timulina a ratones TX-10 resultó en un adelantamiento en el día de ApV y en un incremento de los niveles séricos de 17β -estradiol. Cuando estos animales fueron tratados con gonadotrofinas, previo a la administración diaria de timulina, se observó un incremento en el número de ovocitos, en las concentraciones séricas de 17β -estradiol y en el peso del útero (García y col., 2000).

Por lo mencionado previamente, se ha sugerido que la presencia del timo es crítica durante el período perinatal a fin de asegurar una normal maduración del sistema neuroendocrino y es también necesaria después del período neonatal para el normal desarrollo y función de los ovarios. Asimismo, se ha propuesto que la timulina juega un rol en la regulación del comienzo de la pubertad, a través de su efecto sobre las adrenales y los ovarios, constituyendo de este modo una

molécula mediadora crítica de la acción del timo sobre la maduración sexual femenina y quizás, en menor medida, de la masculina.

1.4 TERAPIA GENICA

1.4.1 ASPECTOS GENERALES

La transferencia de genes (*gene delivery*) tiene numerosas aplicaciones en las ciencias básicas y en la clínica. Típicamente, la transferencia de genes se refiere al uso de ácidos nucleicos para incrementar, disminuir o suprimir la expresión de una proteína de interés (De Laporte y *col.*, 2006).

Se puede transferir una diversidad de ácidos nucleicos con fines terapéuticos, los que incluyen genes, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, aptámeros y ARN pequeños de interferencia (siRNA) (Patil y *col.*, 2005; Basarkar y Singh, 2007). La aplicación más ambiciosa de la transferencia de genes es la terapia clínica. Precisamente, distintas moléculas codificadas por ácidos nucleicos pueden ser usadas para atenuar enfermedades en diferentes etapas, así como en la prevención de la progresión de las enfermedades y sus complicaciones (Patil y *col.*, 2005).

En general, se define a la terapia génica como la transferencia de material genético con fines terapéuticos. Alternativamente se la puede definir como el tratamiento de enfermedades, hereditarias o adquiridas, mediante la transferencia *in vivo* de polinucleótidos que alteran la expresión de proteínas específicas resultando en un beneficio terapéutico (Dubé y Cournoyer, 1995; Basarkar y Singh, 2007). Este objetivo puede lograrse, básicamente, mediante la producción de una proteína o ARNm, por reemplazo o suplementación del producto de un gen que está ausente o defectuoso (Dubé y Cournoyer, 1995). Asimismo, el beneficio terapéutico puede lograrse mediante la supresión de genes, ARNm o por la interacción con proteínas (aptámeros) resultando en el bloqueo selectivo de la expresión o de la actividad de una proteína implicada en la enfermedad (Patil y *col.*, 2005).

La terapia génica puede realizarse por medio de estrategias “*ex vivo*” o “*in vivo*”. En las estrategias “*ex vivo*”, al paciente se le extraen las células blanco o las

células madre e *in vitro* se les transfiere el material génico (terapéutico), luego estas células son reintegradas al organismo. Estos métodos mejoran la eficiencia de la transferencia génica y minimizan la respuesta inmunológica. Sin embargo, están limitados a las células que están disponibles para su extracción o al cultivo a partir de células madre (Räty y col., 2008). En las estrategias "*in vivo*" el material génico se administra directamente al paciente utilizando distintos métodos de transferencia de ácidos nucleicos (Worgall y Crystal, 2007).

Desde 1990, el campo de la medicina basada en la transferencia génica ha sido testigo de un gran progreso a partir del primer ensayo de terapia génica realizada en un ser humano, en células somáticas. Brevemente, este ensayo clínico se realizó para tratar una de las formas de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) ocasionada por un defecto genético en el gen que codifica a la adenina deaminasa (ADA), la cual es imprescindible para la diferenciación de las células madre en células maduras del sistema inmune, tal como los linfocitos T y B. La manipulación se realizó *ex vivo*: se extrajeron células de la médula ósea del paciente, se las infectó *in vitro* con retrovirus portadores del gen normal de la ADA y luego se lo transfirió al paciente. Cuatro años después los niños tratados llevaban a cabo una vida normal (Blaese y col., 1995). Durante esta década, se llevaron a cabo cientos de pruebas de terapia génica en humanos, en muchas de las cuales los resultados fueron desalentadores. Actualmente, están en proceso más de 1500 ensayos clínicos de terapia génica (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

Las moléculas terapéuticas codificadas por ácidos nucleicos presentan una ventaja significativa respecto de las drogas actualmente disponibles, que es el reconocimiento selectivo de los blancos moleculares, proporcionando una significativa especificidad de acción (Patil y col., 2005). Por consiguiente, en los casos en los cuales la terapia génica involucra la corrección de la disfunción de un gen a través de la introducción y expresión de su copia correcta, se obtiene como resultado la producción de una única proteína. Similarmente, cuando la terapia génica involucra el silenciamiento de genes, solo los genes seleccionados son apagados, asegurándose la especificidad en el control de la enfermedad.

Más aún, la disponibilidad de proteínas terapéuticas mediante la terapia génica tiene la capacidad potencial de mejorar la eficacia, la conveniencia y la efectividad

de costo en el tratamiento de una variedad de enfermedades. Efectivamente, las frecuentes inyecciones de una costosa proteína recombinante pueden ser reemplazadas por una única o poco frecuente administración de vectores génicos terapéuticos (Rivera y col., 1999).

En general, la captación celular de moléculas de ADN desnudo y polinucleótidos en general, independientemente de sus tamaños, sigue siendo un proceso ineficiente. Además, estas moléculas son inestables *in vivo*, por ser rápidamente degradadas por exo- y endonucleasas hidrolíticas (Patil y col., 2005). Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia de polinucleótidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para facilitar la inserción de estas moléculas en las células blanco y para protegerlas de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue determinan la elección de la estrategia a utilizar.

La transferencia funcional de polinucleótidos al interior celular es el primer paso y el más crítico para lograr una terapia génica eficiente. Efectivamente, el mayor desafío de la terapia génica es el desarrollo de métodos que transfieran un gen terapéutico (transgen) a las células seleccionadas y que logren una apropiada expresión del gen.

Un método óptimo de transferencia génica debe lograr, como mínimo, tres objetivos: 1) proteger al transgen de la degradación por las nucleasas en la matriz intercelular, 2) transportar el transgen a través de la membrana plasmática y, si es necesario, introducirlo al núcleo de las células blanco, y 3) no generar efectos perjudiciales (Gao y col., 2007).

Los métodos de transferencia de ác. nucleicos (**Tabla 3**) pueden ser clasificados en físicos y en vectoriales. Generalmente, los métodos físicos inducen lesiones transitorias o defectos en la membrana celular para facilitar el ingreso, por difusión, del ADN a las células blanco (Gao y col., 2007).

Los sistemas de transferencia génica vectoriales, como su nombre lo indica, utilizan vectores (vehículos) para administrar los ácidos nucleicos. Precisamente, los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y la biodisponibilidad intracelular del mismo, de modo tal que el gen exógeno pueda funcionar correctamente. Los vectores pueden ser clasificados en: vectores no-virales y vectores virales.

Tabla 3: Principales métodos de transferencia de ácidos nucleicos (Patil y col., 2005; Basarkar y Singh, 2007; Gao y col., 2007; Rätty y col., 2008)		
Físicos		<ul style="list-style-type: none"> • Mecánicos: Microinyección y Bombardeo de partículas • Eléctricos: Electroporación • Ultrasonido • Hidrodinámica
Sistemas de transferencia mediados por vectores	No-virales	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas poliméricos (polímeros catiónicos) • Sistemas liposomales, por ej.: inmunoliposomas, liposomas catiónicos • Híbridos lípido-polímeros • Lípidos catiónicos • Nanopartículas, por ej.: poliméricas, de oro y magnéticas
	Virales	<ul style="list-style-type: none"> • Vectores adenovirales • Vectores retrovirales y lentivirales • Vectores hepáticos • Vectores adenoasociados

Algunas de las propiedades que debería poseer un vector de transferencia génica ideal con propósitos terapéuticos son: un alto grado de especificidad, una elevada eficiencia de transferencia, una expresión duradera y una aceptable bioseguridad (i.e., que no induzca ningún efecto colateral o respuesta inmunológica) (Patil y col., 2005; Li y Huang, 2007). Actualmente, ninguno de los vectores usados en terapia génica cumple con estas características (Rätty y col. 2008).

La mayoría de los vectores no-virales incluyen el uso de polímeros y lípidos para transferir el material génico al interior celular. Durante este proceso, protegen al ADN de la degradación enzimática extracelular e intracelular y de los componentes de la sangre (Basarkar y Singh, 2007). Los vectores no-virales deben superar múltiples barreras a nivel sistémico, tisular y celular, que reducen la eficiencia de la transferencia génica hacia el núcleo. Además, en cada paso se pierde una cantidad significativa de ADN que finalmente resulta en la disminución

de la expresión terapéutica del transgen (Basarkar y Singh, 2007). Estos vectores, conteniendo el ADN, son captados por las células por endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis; una vez en las vesículas intracelulares, una pequeña porción de ADN es liberada al citoplasma, migra hacia el núcleo y entra en él (Gao y col., 2007).

Los vectores no-virales poseen una escasa o nula inmunogenicidad; son fáciles de preparar y manipular, especialmente a nivel industrial; pueden transportar mayor cantidad de material génico y, aunque no están exentos de riesgo, son más seguros que los vectores virales. Sin embargo, este tipo de vectores posee una significativa desventaja: su efectividad es muy inferior a la de los vectores virales, especialmente *in vivo* (Gao y col., 2007; Basarkar y Singh, 2007; Bergen y col., 2008).

A pesar de esta desventaja, se ha postulado que los vectores no-virales son superiores a los virales. Tal afirmación se basa, principalmente, en la seguridad de la transferencia y en que se han desarrollado métodos que son cada vez más específicos, como los nano-inmunoliposomas (Li y Huang, 2007).

Los virus están altamente especializados en la transferencia de ácidos nucleicos, por lo tanto la realizan con alta eficiencia. Esta es la principal ventaja de la utilización de virus como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas, tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgen que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagenesis insercional que pueden producir (Patil y col., 2005; Gao y col., 2007; Basarkar y Singh, 2007).

Actualmente, más del 66% de los ensayos clínicos de terapia génica que se están conduciendo emplean vectores virales, de los cuales el 70% son vectores adenovirales y retrovirales (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Sin embargo, debido a eventos adversos ocurridos en ensayos clínicos que emplearon estos vectores virales, en los últimos años, se ha incrementado el uso de vectores no-virales (Li y Huang, 2007). Por ejemplo, se produjo la muerte de un paciente tratado con un vector adenoviral, en 1999, a causa de una masiva respuesta inmune sistémica. Asimismo, durante el 2002-2003, en un ensayo clínico realizado para tratar una SCID ligada al cromosoma X, que empleaba un vector retroviral,

dos pacientes de diez en total desarrollaron trastornos linfoproliferativos como consecuencia del tratamiento.

A continuación se describen brevemente los principales tipos de vectores virales en uso.

1.4.2 VECTORES RETROVIRALES

Los retrovirus son una familia de virus envueltos, esféricos de 80 a 100 nm de diámetro, que contienen ARN de simple cadena (+) como genoma viral (Flint y col., 2000). Los retrovirus están subdivididos en siete grupos, incluyendo a 5 grupos de retrovirus oncogénicos (oncoretrovirus), a los lentivirus y a los spumavirus (Scaffer y col., 2008).

Algunos retrovirus se consideran simples debido a que poseen tres genes: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para proteínas estructurales tales como la proteína de la matriz, de la cápside, de la nucleocápside y para una proteasa. El gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN), y el gen *env* codifica para las proteínas de la envoltura: transmembrana y de superficie (TM y SU, respectivamente). Otros retrovirus son complejos porque además de los genes conservados, *gag*, *pol* y *env*, poseen secuencias génicas adicionales. Tal es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) que posee los genes: *tat* y *rev*, para regular la expresión del genoma viral, y *vpu*, *vif*, *vpr* y *nef*, importantes en la replicación viral (Anson, 2004).

Sucintamente, los retrovirus inician su infección a través de la unión de las proteínas SU y TM a receptores celulares específicos. Esta interacción desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular y la liberación de la nucleocápside viral al interior del citoplasma de la célula infectada. El ARN genómico viral se transcribe de modo inverso mediante la RT en ADN lineal de doble cadena (ADNdc). Este ADN viral ingresa al núcleo y se integra en el genoma de la célula hospedadora por la acción de la IN. El ADN viral integrado se denomina provirus y se transcribe para producir los ARN mensajeros que codifican para las proteínas virales (*gag*, *pol* y *env*) y el ARN genómico. En los sitios de brotación de la membrana plasmática se ensamblan las proteínas *gag* y *gag-pol* y el ARN genómico es empaquetado, constituyendo las nucleocápsides de la progenie viral. Las partículas virales brotan de la superficie celular llevándose con

ellas la envoltura viral (derivada de la membrana plasmática) conteniendo la glicoproteína *env* (Flint y *col.*, 2000; Anson, 2004; Cannon y Anderson, 2004).

Los retrovirus poseen en cada extremo secuencias terminales repetidas largas (LTR): U3-R-U5; la región entre los R es la que se transcribe a ADN por la RT. Las LTRs en la forma de ARN (genómico) contienen secuencias importantes para la transcripción reversa, mientras que en la forma de ADN (provirus), la LTR del extremo 5' (LTR 5') actúa como un promotor transcripcional y la LTR del extremo 3' (LTR 3') como señal de poliadenilación (Anson, 2004). Además, cada LTR contiene un sitio de unión reconocido por la IN para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Chang y Zaiss, 2003).

La integración requiere que el ADNdc lineal retroviral tenga acceso a los cromosomas de la célula huésped. Los oncoretrovirus son incapaces de atravesar la membrana celular por lo que la integración sólo puede llevarse a cabo cuando se disuelve la membrana nuclear durante la división celular; tal es el caso del virus de la leucemia Murina de Molones. Es decir, estos retrovirus sólo pueden infectar células que se replican y, en consecuencia, las células que de estas deriven contendrán los genes virales integrados a su genoma. Sin embargo, un grupo de retrovirus complejos, los lentivirus, pueden integrarse al genoma de células no-mitóticas. Por lo tanto, el ADNdc lineal de los lentivirus entra al núcleo por los complejos del poro nuclear; tal es el caso del HIV (Schaffer y *col.*, 2008).

La integración al genoma celular permite una expresión estable y prolongada del transgen (o transgenes) terapéutico transferido, lo que hace a los retrovirus atractivos como vectores de transferencia génica (Cannon y Anderson, 2004). Otra ventaja de los retrovirus es su baja inmunogenicidad y su capacidad de empaquetamiento relativamente grande (8 kbp). Sin embargo, también presentan desventajas: se obtienen en títulos bajos y la integración puede provocar mutagénesis insercional (Schaffer y *col.*, 2008).

La estructura genética de los retrovirus y la constitución del provirus hacen sencilla la manipulación de estos virus en el desarrollo de vectores retrovirales recombinantes de replicación defectiva (Anson, 2004). Para tal propósito, se puede eliminar la mayor parte de los genes virales y en su lugar se procede a la inserción de un casete de expresión (constituido por un promotor, el transgen y una señal de poliadenilación) (Worgall y Crystal, 2007).

Para prevenir la activación oncogénica y mejorar la seguridad de los vectores oncoretrovirales y los lentivirales, se han desarrollado vectores auto-inactivables (SIN, *self-inactivating*) por medio de la eliminación del promotor-enhancer de la región U3 de la LTR 3'. Durante la transcripción reversa del ARN viral la eliminación U3 de la LTR 3' es transferida a la LTR 5' (del ADN), resultando en la inactivación del promotor transcripcional en el provirus (Chang y Zaiss, 2003; Anson, 2004). Un beneficio adicional de esta manipulación es la eliminación de una potencial interferencia entre el promotor interno (del casete de expresión) y el promotor-enhancer del LTR, lo que puede resultar en un incremento en la expresión del transgen (Watson y Wolfe, 2003).

Sin embargo, algunos vectores SIN a los que se les escindió la región U3 3' mostraron contener virus salvaje en sus preparaciones. Para prevenir esta reversión es recomendable reemplazar la región U3 5' por un promotor-enhancer heterólogo. Adicionalmente, se han desarrollado vectores lentivirales SIN con modificaciones en ambas LTRs. A estos vectores SIN, se les ha eliminado parte de la U3 5', toda la región U3 3' (conservando solo el sitio de unión a la IN) y se les ha reemplazado la región U5 3' por la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Estas son algunas de las modificaciones que resulta posible realizar para generar vectores SIN (Chang y Zaiss, 2003; Anson, 2004). Asimismo, un avance importante en cuanto a la seguridad biológica es el desarrollo de vectores lentivirales SIN portadores de promotores heterólogos tejido-específicos que permitan restringir la expresión del transgen a las células blanco (Malik y Arumugam, 2005).

1.4.3 VECTORES HEPÉTICOS

Los vectores herpéticos se basan en el Virus Herpes Simplex tipo I (HSV-1). El HSV es un virus neurotrófico que puede infectar un amplio rango de diferentes tipos celulares y no requiere de la división celular para la infección y la expresión génica (Wolfe y *col.*, 2004).

El HSV se replica inicialmente en la superficie epitelial o en las células mucosas. Las partículas virales recientemente generadas son captadas por las terminales nerviosas sensitivas que inervan el sitio de infección primaria, siendo llevadas por transporte axonal retrógrado hacia los cuerpos neuronales ubicados

en los ganglios sensitivos de la raíz dorsal. El HSV es capaz de establecer una infección productiva o ciclo lítico (la cual ocurre en las mucosas o células epiteliales) con la consecuente producción de progenie viral; o entrar en un estado de latencia (en las neuronas sensitivas) caracterizado por la persistencia de ADN viral y la ausencia de la expresión de los genes virales líticos. El único promotor que permanece activo es el promotor activo en latencia (LAP, *latency active promotor*). El genoma herpético latente no altera la función ni la supervivencia celular (Jacobs y col., 1999; Sundaresan y col., 2000; Wolfe y col., 2004).

Las partículas virales tienen 200 nm de diámetro y consisten en los siguientes componentes: 1) una envoltura; 2) el tegumento; 3) una cápside icosaédrica; y 4) una nucleocápside conteniendo el genoma viral. En la envoltura bilaminar están ancladas algunas proteínas no glicosiladas y al menos 11 glicoproteínas virales responsables del ingreso a la células huésped (por unirse a receptores de la membrana plasmática). El tegumento es una matriz proteica amorfa que forma una capa entre la cápside y la envoltura; sus proteínas intervienen en la activación de los genes inmediatos tempranos (IE, *Immediate Early*), en el silenciamiento de la síntesis proteica de la célula huésped, inmediatamente después de la infección, y en el ensamblaje del virion. La cápside icosaédrica (de 80 a 100 nm de diámetro) está compuesta por 162 capsómeros y es típica de familia *Herpetoviridae*. Por último, el genoma viral se encuentra unido a un complejo proteico con forma de toroide (nucleocápside) (Jacobs y col., 1999; Burton y col., 2004).

El genoma del HSV está formado por ADN lineal de doble cadena, de 152 kbp aproximadamente, el cual codifica más de 85 genes. El genoma viral esta compuesto por dos segmentos, denominados S (corto) y L (largo). Cada componente está formado por secuencias únicas (US y UL, respectivamente), flanqueadas por repeticiones invertidas relativamente largas (Whitley y Roizman, 2002).

Brevemente, para iniciar la infección el virus se une a la superficie de la célula blanco (epiteliales o mucosas) mediante la interacción de las glicoproteínas virales con las moléculas de heparán sulfato y, luego, con una proteína transmembrana. De estas interacciones resulta la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática y, la liberación de las proteínas del tegumento y la cápside al citoplasma. Una vez dentro de la célula, con la ayuda de los microtúbulos, la

cápside es transportada hacia el núcleo. El genoma viral se libera de la cápside y entra al núcleo por los poros nucleares. Durante el ingreso el ADN viral se circulariza y, luego, permanece como un episoma, asociado a histonas (Wolfe y col., 2004).

La replicación viral se desarrolla de una manera coordinada y regulada siguiendo un mecanismo en cascada, en el cual se expresan los genes en tres etapas. Primero, los genes α o IE codifican proteínas que regulan el ciclo reproductivo del virus y bloquean la presentación antigénica en la superficie celular de las células infectadas. Segundo, los genes β o tempranos (E, *Early genes*) codifican proteínas necesarias para la síntesis de ADN y enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN (por ejemplo, la timidina quinasa y la ADN polimerasa viral). Por último, los genes γ o tardíos (L, *Late genes*) codifican para componentes estructurales de la cápside, el tegumento y la envoltura. Consecutivamente, se produce el ensamblaje de la cápside, el empaquetamiento del ADN y la envoltura de la cápside y el egreso de las partículas virales recientemente formadas (Jacobs y col., 1999; Whitley y Roizman, 2002; Wolfe y col., 2004).

Aproximadamente la mitad de los genes del HSV son esenciales para la replicación viral mientras que la otra mitad son accesorios y participan en la infección viral en tejidos o tipos celulares específicos del hospedador. Se han construido vectores HSV recombinantes con propósitos terapéuticos. En algunos casos, a los vectores HSV se les eliminaron los genes accesorios virales (por ej. el de la timidina quinasa); estos genes son importantes para la replicación en neuronas y contribuyen a la neurovirulencia (Glorioso y Fink, 2009). De manera similar, a algunos vectores se les extrajeron genes requeridos para la replicación en células post-mitóticas; de esta manera pueden replicarse específicamente en células en división (Wolfe y col. 2004). Los vectores replicación-competentes atenuados han mostrado ser eficaces en el tratamiento de una variedad de modelos de tumores experimentales (Sundaresan y col., 2000).

A otros vectores HSV se les eliminaron los genes esenciales para la replicación viral (los vectores replicación defectiva); dichos vectores son incapaces de replicarse pero mantienen el targeting del virus salvaje. Por lo tanto, pueden usarse para transferir genes terapéuticos a las neuronas; en este caso, el vector

establece un estado similar a la latencia en el cual los genes líticos están reprimidos (Glorioso y Fink, 2009).

Los vectores derivados del HSV cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: poseen una gran capacidad de transportar ADN exógeno, tienen la capacidad de entrar en un estado de latencia en neuronas y de replicarse específicamente en células en división (Jacobs y col., 1999).

1.4.4 VECTORES ADENO-ASOCIADOS

Los virus adeno-asociados (AAV) pertenecen a la familia *Parvoviridae*, del género *Dependovirus*. Estos virus no son considerados patógenos y, hasta el momento, se han aislado de tejido humano y no humano más de 100 serotipos de AAV. Todos los serotipos son similares en su estructura, el tamaño del genoma y la organización genética (Giacca, 2007). La mayor parte de los estudios se han enfocado en el AAV serotipo 2 (AAV-2).

Los AAV son virus desnudos cuyas partículas presentan simetría icosaédrica entre 18 a 25 nm de diámetro. El genoma consiste en ADN lineal de simple cadena de 4,7 kbp con dos marcos abiertos de lectura, correspondientes a los genes *rep* y *cap*. En sus extremos contienen repeticiones terminales invertidas (ITRs, *inverted terminal repeats*) de 145 bp, las primeras 125 bp de cada ITR son complementarias y constituyen una horquilla en forma de T en ambos extremos del genoma. Estos ITRs son importantes para la replicación del ADN, el ensamblaje de las partículas virales y la integración-escisión en el genoma hospedador. Los genes *rep* codifican para proteínas (dependientes de los ITRs) que intervienen en la replicación viral, en la regulación de la expresión génica, en la integración sitio-específica y en el ensamblaje de los viriones. Los genes *cap* codifican para las tres proteínas de la cápside viral (Giacca, 2007; Daya y Berns, 2008).

Los AAV requieren, para completar su ciclo vital, la presencia de ciertas proteínas de un virus asistente (*helper*), generalmente un adenovirus o un herpesvirus (Scaffer y col., 2009). Por lo tanto, después de la infección los AAV pueden entrar en un ciclo lítico o en un estado de latencia, dependiendo de la presencia o ausencia del virus asistente en la célula blanco.

Los AAV se unen a la superficie de la célula blanco por medio de la interacción de las proteínas de la cápside con distintos receptores celulares. Primero, se unen al proteoglicano heparán sulfato o al ácido siálico; luego, para lograr una internalización eficiente, interaccionan con uno o más coreceptores, incluyendo al receptor del factor de crecimiento fibroblástico, a las integrinas $\alpha_v\beta_5$ y las $\alpha_v\beta_1$, al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, al receptor del factor de crecimiento plaquetario y al receptor de laminina. Una vez internalizada la partícula viral por endocitosis, el genoma viral entra al núcleo por un mecanismo que no se conoce exactamente (Carter y *col.*, 2004; Daya y Berns, 2008).

En presencia del virus asistente, el AAV inicia una infección productiva caracterizada por la replicación del genoma, la expresión de los genes virales y la producción de viriones. Para ayudar en estas etapas, los adenovirus y los herpesvirus aportan grupos diferentes de genes pero ambos regulan la expresión génica celular, proporcionando un medio intracelular que permita la infección productiva del AAV (Daya y Berns, 2008).

En ausencia del virus asistente, la replicación del AAV se encuentra limitada, la expresión de los genes virales está reprimida y su genoma puede entrar en un estado de latencia de duración indefinida. Este período de latencia se caracteriza por la integración específica en el cromosoma 19 humano, en la región conocida como AAVS1. De esta manera, los AAV se convierten en los únicos virus de ADN caracterizados que presentan un integración sitio-específica en células de mamífero (Giacca, 2007; Daya y Berns, 2008).

La utilización de este evento podría permitir la inserción segura de genes exógenos en el genoma humano, un objetivo ampliamente deseado en el campo de la terapia génica (Giacca, 2007). No obstante, debido a que la integración sitio-específica depende de las proteínas *rep*, y los genes *rep* son eliminados de los vectores AAV recombinantes actuales, estos vectores persisten adentro de células post-mitóticas principalmente como elementos extracromosómicos o, si el genoma viral se integra lo hace de una manera aleatoria (Giacca, 2007).

Los vectores AAV pueden ser considerados candidatos ideales para la transferencia de genes debido a que, en general, no inducen reacción inflamatoria ni una respuesta inmune deletérea, presentan una elevada eficiencia de transducción y mantienen la expresión de genes por largos plazos, en un amplio

rango de células post-mitóticas *in vivo* (Giacca, 2007; Daya y Berns, 2008; Scaffer y col., 2009).

Las principales desventajas de los vectores AAV son su difícil producción, el poco espacio que poseen para alojar genes terapéuticos (por el tamaño de su genoma) y la inmunidad preexistente (Scaffer y col., 2009). Sin embargo, se han desarrollado líneas celulares para que los vectores AAV se repliquen eficientemente en ellas y de esta manera lograr una buena producción de los mismos. Más aún, se han desarrollado nuevas tecnologías para incrementar la capacidad de clonado y la expresión génica (Daya y Berns, 2008).

1.4.5 VECTORES ADENOVIRALES

Los adenovirus (Ad) pertenecen a la familia *Adenoviridae*, siendo los que infectan a mamíferos del género *Mastadenovirus*. Las partículas adenovirales consisten en una cápside icosaédrica desnuda de 70 a 100 nm de diámetro, la cual encapsula el ADN genómico de doble cadena (Schaffer y col., 2008).

Actualmente, más de 51 serotipos de Ad han sido aislados en humanos y no humanos y se los han clasificado en subgrupos (de la A a la F). Los Ad pueden infectar células de diversos tejidos, tales como las vías respiratorias, urinarias, los ojos y el hígado. En humanos, los Ad causan infecciones oculares, respiratorias (subgrupo C) e intestinales y no son oncogénicos (Hackett y Crystal, 2004).

La cápside de los Ad está formada por 20 caras triangulares y 12 vértices (**Fig. 7**). Dicha cápside está compuesta por 252 capsómeros protéicos, de los cuales 240 son hexones y forman cada cara del icosaedro (12 por cara), y los 12 capsómeros restantes son los pentones base y constituyen los vértices de la cápside. El pentón base está compuesto por cinco subunidades y de cada uno emerge una proteína trimérica con forma de antena, la fibra. El pentón es importante para la interacción de la partícula viral con la célula huésped. La fibra posee un dominio en su extremo, denominado nudo o botón, que posee dos funciones: 1) es responsable, en parte, de la entrada del virus a la célula huésped y 2) es clave para la trimerización de las subunidades que conforman la fibra (Krasnykh y col., 2000; Dmitry y col., 2005). Además de las tres proteínas mayoritarias que forman la cápside (los hexones, los pentones y las fibras), existen

proteínas estructurales que le proveen estabilidad a la misma y otras que se asocian al genoma (Hackett y Crystal, 2004).

El genoma de los Ad consiste en ADN lineal de doble cadena (ADNdc) de 30 a 38 kbp de tamaño (el Ad 5 tiene un ADN de aprox. 36 kbp) y, en el extremo 5' de cada cadena, se halla unida covalentemente una proteína terminal (PT) de 55 kDa. Asimismo, el genoma de los Ad presenta en sus extremos ITRs de aprox. 100 bp. Los ITRs son esenciales para la replicación del genoma viral. Por medio del splicing alternativo y de la transcripción bidireccional, el genoma adenoviral codifica más de cincuenta proteínas (Hackett y Crystal, 2004; Schaffer y *col.*, 2008).

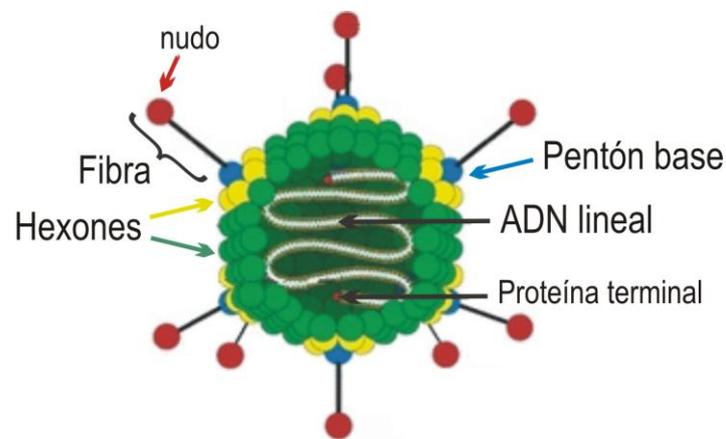


Figura 7. Esquema de la estructura del adenovirus tipo 5.

Los adenovirus son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. La infección viral se inicia con el reconocimiento e interacción específica entre proteínas de la cápside viral y receptores de la superficie de la célula blanco. De este modo, la entrada del virus a las células blanco, mediante este proceso de reconocimiento e interacción altamente selectivo, es un paso limitante para que se desarrolle un ciclo de infección exitoso.

Los Ad 5 se unen a la célula blanco, inicialmente, por la interacción del botón terminal de la fibra viral con receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus coxsackie B, denominados CAR (**Fig. 8A**). Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que intervienen en la endocitosis de la mayor parte de los Ad (Bergelson y *col.*, 1997). Además, se están estudiando otras moléculas capaces de actuar como receptores

primarios de Ad, pero son menos eficientes; entre ellas se encuentran el ácido siálico, el heparán sulfato, el receptor del ácido hialurónico y factores sanguíneos (Bangari y Mittal, 2006; Campos y Barry, 2007).

En adición a estos receptores primarios y de manera consecutiva, las integrinas ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_3\beta_1$) de la célula hospedadora sirven como co-receptores para la entrada de los Ad. Estas integrinas interactúan con la secuencia arginina-glicina-aspartato del pentón base de la cápside viral (Hidaka y col., 1999; Schneider-Schaulies, 2000).

La interacción mediada por los CAR proporciona la unión inicial con una alta afinidad del adenovirus a la célula huésped. La interacción con las integrinas desencadena cascadas de señalización intracelulares que permiten la endocitosis dependiente de clatrina. Las vesículas con viriones en su interior entran a la vía endosomal. Luego, la acidificación endosomal produce un cambio conformacional en la cápside (se liberan proteínas estructurales, tales como, el pentón base y la fibra, entre otras) que desencadena la endosmólisis y la liberación del virión al citoplasma. En el citoplasma, el virión con su cápside parcialmente desensamblada viaja utilizando el citoesqueleto hasta la membrana nuclear. Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el ADN viral ingresa al núcleo (**Fig. 8A**) (Campos y Barry, 2007).

En el núcleo el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral. La transcripción de los genes de los adenovirus ocurre en dos etapas consecutivas: una fase *temprana*, durante la cual se expresan los genes tempranos, denominados E (*early*), y una fase *tardía*, durante la cual se expresan los genes tardíos, denominados L (*late*).

Los genes E, que comprenden los E1 (A y B), E2 (A y B), E3 y E4 (**Fig. 9**), son aquellos que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción de los genes virales, la replicación de ADN viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Los genes L, que comprenden los L1 a L5 (**Fig. 9**), se expresan después de la replicación del ADN y codifican para las proteínas estructurales y para algunas pocas proteínas no-estructurales necesarias para el ensamblaje de la cápside.

El gen E1A es el primero en transcribirse. Después del splicing alternativo de los ARNm de E1 se traducen dos proteínas E1A. Estas proteínas inducen a las células a entrar en la fase S del ciclo celular y, de esta manera, promueven la expresión de genes celulares necesarios para la replicación del ADN viral. Las proteínas E1A son casi idénticas excepto en que una de ellas posee una región única conservada de 46 aminoácidos y la otra no; esta región es requerida para estimular los promotores de los otros genes tempranos. Es decir, las proteínas E1A son necesarias para la transcripción eficiente de los ARNm virales tempranos.

Entre los productos más importantes inducidos por las E1A se encuentran las proteínas codificadas por el gen E1B. Las proteínas E1B interactúan con el factor de transcripción p53 y, por consiguiente, bloquean la apoptosis dependiente de p53. Además, las E1B colaboran con proteínas E4 en la regulación de la expresión de los genes virales tardíos.

La región E2, expresada por E2A y E2B, codifica por splicing alternativo tres proteínas necesarias para la síntesis del ADN viral: la ADN polimerasa, la proteína de unión al ADN de cadena simple y la pre-proteína terminal (pre-PT). La región E3 codifica proteínas involucradas en la inhibición de la apoptosis y en la protección de las células infectadas contra la respuesta inmune del hospedador. La región E4 es esencial para la expresión de los genes virales y la subsiguiente replicación viral, debido a que actúa promoviendo la expresión selectiva de los genes virales a expensas de los genes celulares. Por ejemplo, algunas proteínas E4 inhiben el transporte de ARNm celulares desde el núcleo al citoplasma mientras que promueven el transporte de los transcritos virales tardíos (Flint, 1999; Branton, 1999; Hackett y Crystal, 2004)

La replicación del ADN viral comienza cuando es suficiente la concentración de las proteínas necesarias, tanto virales como celulares (De Jong y Van der Vliet, 1999).

La fase tardía en el ciclo infeccioso de los Ad se inicia con el comienzo de la replicación viral. La mayoría de las proteínas L son productos de traducción de ARNm tardíos que derivan de una unidad transcripcional tardía mayor (MLTU: *major late transcriptional unit*). Pasadas las 6 a 8 horas post-infección, el ADN se encuentra eficientemente replicado y, tras el ensamble de las proteínas de la

cápside, se genera una abundante progenie viral (10^5 - 10^6 /cél) (Ramachandra y Padmanabhan, 1999).

Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores adenovirales recombinantes (RAds), las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgen de interés. La mayor parte de los trabajos con RAds se basó en el uso de adenovirus humanos tipo 2 y 5 del subgrupo C (Glasgow y col., 2006; Schaffer y col., 2008); esto se debe a que sus genomas se encuentran sumamente bien caracterizados y a que demostraron no inducir tumores en modelos animales (Katayose y Seth, 1999).

Inicialmente, las regiones de mayor relevancia a manipular para tal propósito fueron: la E1 porque codifica para el principal transactivador viral (E1A), la E2 porque codifica proteínas esenciales para la replicación viral y la E3 porque no es esencial para la viabilidad del vector y permite contar con mayor espacio de clonado (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999).

Los primeros vectores Ad en construirse se basaron en adenovirus a los que se les suprimieron los genes tempranos E1 o E1 y E3 del genoma viral, denominados *vectores adenovirales de primera generación* (**Fig. 8B y Fig. 9**). La eliminación de la región E1 lleva a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999) y la supresión de la región E3 genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7,5 kbp) (Katayose y Seth, 1999). En consecuencia estos RAds son incapaces de replicarse (replicación defectivos) evitando así la infección viral generalizada.

Generalmente, el sistema utilizado para construir el genoma Ad de primera generación ($E1^-$, $E3^-$) se basa en la recombinación homóloga entre un plásmido *shuttle*, el cual consiste en los extremos del genoma de los Ad y el casete de expresión del transgen en el lugar de la región E1, y un plásmido *genómico*, el cual consiste en la mayor parte del genoma del Ad salvo por las regiones E1 y E3 (Hacket y Crystal, 2004).

Estos RAd pueden replicarse en líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano 293 (HEK293), que contiene la región genómica E1 faltante del Ad5 y, por lo tanto, expresa los genes necesarios para iniciar la replicación (Graham y Prevec, 1992). En dichas células

293 se pueden amplificar los RAd, obteniéndose títulos muy elevados que alcanzan las 10^{13} unidades formadoras de placa (pfu)/ml (Campos y Barry, 2007). Sin embargo, se ha observado que, a pesar de la eliminación de E1, se expresan residualmente proteínas virales que desencadenan una respuesta inmune muy intensa, caracterizada por linfocitos T citotóxicos, la cual elimina las células infectadas (Yang y col., 1994; 1995).

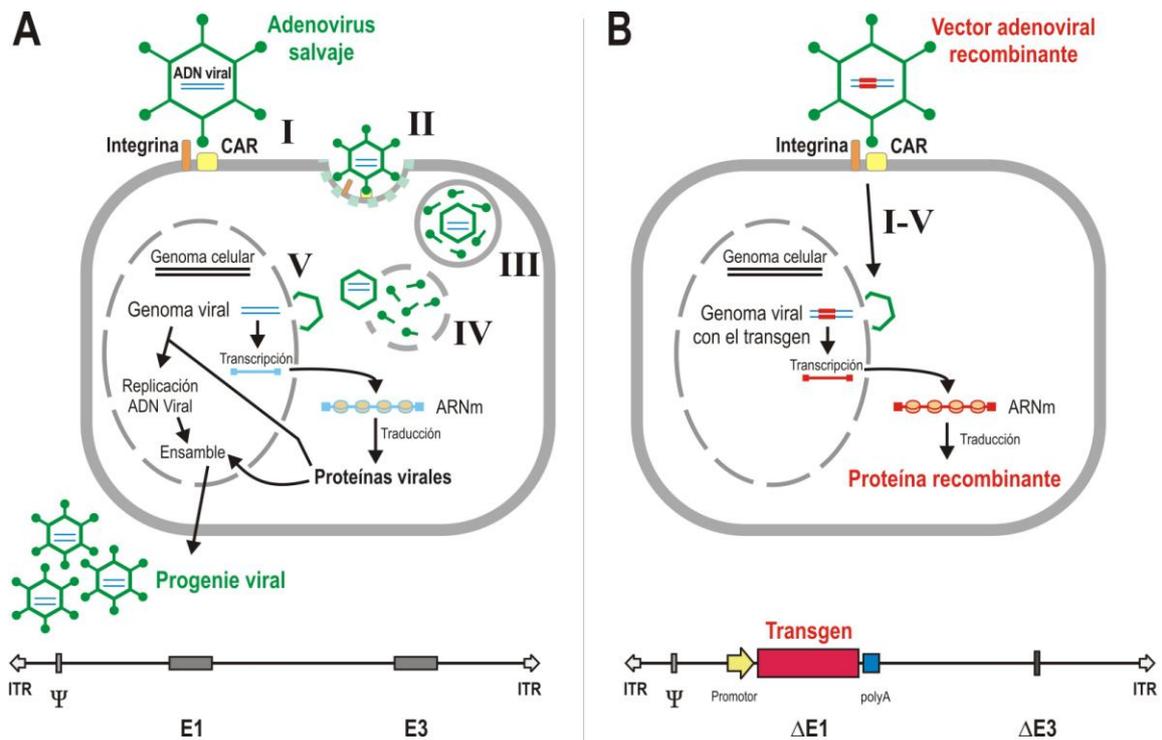


Figura 8. Esquemas del ciclo de infección de los adenovirus salvajes y de vectores adenovirales recombinantes.

A: Los Ad salvajes se unen a la superficie celular, primero mediante la interacción CAR-fibra viral y, luego, por la interacción integrina-pentón base (I), que desencadena una cascada de señales y la endocitosis de los viriones en vesículas recubiertas de clatrina (II). El endosoma se acidifica, lo que causa cambios en la cápside, resultando en la liberación de las fibras, el desensamblado de los vértices, la exposición de proteínas estructurales (III). Se produce la lisis de la membrana endosomal y el escape de los viriones parcialmente desensamblados (IV). Estos viriones se unen a proteínas del citoesqueleto y llegan a la membrana nuclear donde se unen al complejo del poro nuclear, lo que resulta en el desensamblado de la cápside y en la liberación del genoma viral dentro del núcleo de la célula hospedadora (V). En el núcleo, el genoma viral permanece como un episoma, se replica y se traducen sus proteínas, primero las necesarias para la replicación del ADN y luego las estructurales. El ADN viral es empaquetado y la cápside se ensambla en el núcleo, de esta manera se genera la progenie viral, que lisa la célula infectada para esparcirse. En la parte inferior de la figura se observa la representación del genoma del Ad salvaje que consta de los ITRs, la señal de empaquetamiento (Ψ) y todos los genes, incluyendo las regiones E1 y E3.

B: Los RAd, replicación defectiva, entran a la célula blanco mediante los mismos pasos que los Ad salvajes (I a V). Sin embargo, una vez que el ADN viral, portador del trasgen de interés, se encuentra como un episoma en el núcleo, no se produce la replicación del ADN (debido a que carecen de la región E1), ni se producen nuevas partículas virales. Por lo tanto, el transgen se expresa produciendo grandes concentraciones de la proteína recombinante (típicamente detectable dentro de las 24 hs). En la parte inferior se observa la representación del genoma del RAd que carece de las regiones E1 y E3 ($\Delta E1$ y $\Delta E3$) y contiene el resto de los genes virales, los ITRs, la señal de empaquetamiento y, en la región $\Delta E1$, el casete de expresión del transgen de interés, con un promotor y una señal de poliadenilación (polyA).

Un factor importante a considerar para los estudios *in vivo*, con animales de experimentación, es la duración de la expresión del transgen mediada por los Ad. Generalmente, el nivel de expresión del transgen tiene un pico durante los días 1 a 7 y disminuye rápidamente a valores indetectables durante la segunda a cuarta semana. Esto se observa para la mayoría de las rutas de administración con la excepción de la inyección directa en tejidos inmunoprivilegiados, tal como lo es el cerebro (Hacket y Crystal, 2004).

Otra cuestión importante a considerar para los estudios *in vivo* es la respuesta inmune que se genera contra los vectores Ad. Para tratar de evitar este problema se han realizado eliminaciones y mutaciones adicionales en el genoma de los Ad. Una estrategia fue generar vectores E1⁻ con una mutación en E2A, la cual resulta en un vector de replicación defectiva a 37°C. Este vector, sensible a la temperatura, ha inducido una respuesta inflamatoria reducida y ha permitido una expresión génica más prolongada; sin embargo, esta mutación ha resultado ser inestable (Hacket y Crystal, 2004).

Una generación más reciente de vectores adenovirales son los oncolíticos (replicación condicionada). A dichos vectores se les eliminó sólo la región E1B, en lugar de toda la región E1 eliminada en los vectores de primera generación. De esta manera, se eliminó su capacidad para inactivar la proteína p53 de la célula blanco. La inactivación de p53 es esencial para el Ad salvaje porque bloquea la apoptosis dependiente de p53, con lo que se asegura una replicación viral eficiente. Por lo tanto, cuando la actividad de E1B es suprimida en el vector Ad se bloquea la replicación viral en células normales (que expresan p53) permitiendo solo la replicación en células cancerosas deficientes de p53; la proliferación viral conduce a lisis de estas células. En consecuencia, después de la transducción inicial con el vector Ad oncolítico E1B⁻ continúa la replicación viral en las células vecinas deficientes de p53, incrementando el efecto del tratamiento y reduciendo la cantidad inicial de vector necesario para obtener un efecto terapéutico (Relph y col., 2004; Rätty y col., 2008).

Otras mutaciones en los genes tempranos han sido realizadas en vectores Ad para reducir la inmunogenicidad. De este modo, se procedió a la eliminación completa o parcial de las regiones E2 y E4. Ambos genes son esenciales para la replicación viral y, por lo tanto, el vector necesita producirse en líneas celulares

que le provean las regiones suprimidas E2 y E4, además de la E1. Este tipo de líneas celulares son difíciles de trabajar y la producción del vector es, frecuentemente, poco eficiente (Hacket y Crystal, 2004). Los vectores construidos de esta manera se denominaron **vectores adenovirales de segunda generación (Fig. 9)**. Se ha sugerido que la eliminación de E2 y E4 en estos vectores logra la prolongación de la expresión del transgen (Gorziglia y col., 1999). Sin embargo, puesto que existen contradicciones al respecto, los datos resultan ser inconsistentes con relación a la duración de la expresión génica y al bloqueo de la respuesta inmune (Benihoud y col., 1999; Hacket y Crystal, 2004). Consecuentemente, aún está en discusión su ventaja respecto de los vectores de primera generación.

La eliminación de las regiones anteriormente citadas no resultaron ser suficientes para evitar el elevado riesgo de inmunotoxicidad de los vectores Ad. Por esta razón, se han desarrollado métodos para eliminar todos los genes adenovirales del vector. Este tipo de vectores se denominó **vectores adenovirales de tercera generación, eviscerados (gutless), helper-dependent** o adenovirus de alta capacidad (Puntel y col., 2006). Precisamente, a dichos vectores se les han removido todos sus genes salvo las secuencias necesarias *en cis*, tales como los dos orígenes de replicación (en los ITRs) y la señal de empaquetamiento (**Fig. 9**). Para generar y producir los vectores gutless se necesitan *in trans* todos los elementos necesarios para la replicación y el empaquetamiento. Generalmente esto se logra con la coinfección de las células productoras con un adenovirus denominado virus auxiliar (*helper*). El desafío de este tipo de metodología es eliminar o, al menos, disminuir la presencia de virus auxiliar en la preparación final de los gutless.

En tal sentido, es posible reducir la contaminación con el virus auxiliar por medio de la eliminación de su señal de empaquetamiento, empleando la Cre recombinasa (del bacteriofago P1). La recombinación puede efectuarse mediante la utilización de células 293 que expresan la recombinasa (293Cre) y un virus auxiliar que contiene, adyacente a su señal de empaquetamiento, dos sitios específicos (*loxP*) de reconocimiento de la enzima (Katayose y Seth, 1999; Józkwicz y Dulak, 2005). Análogamente, se ha desarrollado una estrategia de recombinación que utiliza la FLP recombinasa (de levadura), la cual es expresada

por células 293 y, en este caso, el vector auxiliar contiene sitios *frt*, reconocidos por la FLP (Hurtado-Lorenzo y col., 2003).

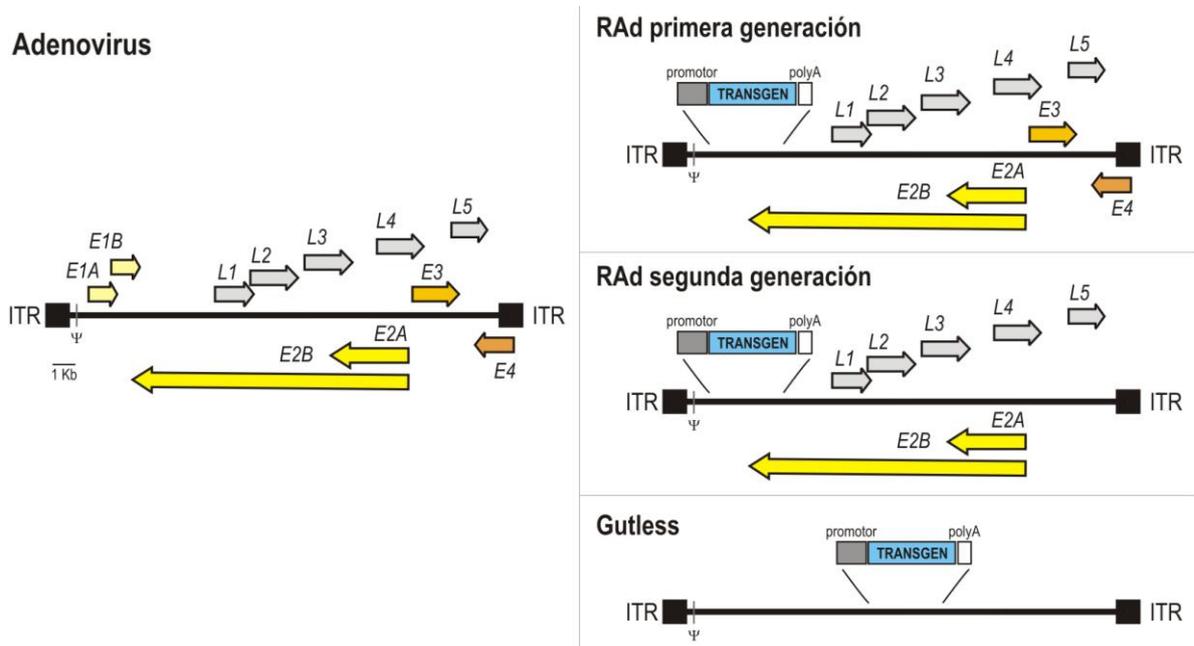


Figura 9: Representación esquemática de la organización genética de los Ad y sus respectivos vectores. En los vectores Ad se indica la localización de la inserción del casete portador del transgen. ITR, repeticiones invertidas terminales. Ψ, señal de empaquetamiento. Modificado de Giacca, 2007.

Los vectores gutless que se han generado utilizando los sistemas mencionados son menos tóxicos e inmunogénicos y, por lo tanto, son convenientemente tolerados *in vivo* e inducen una expresión génica más prolongada (Józkowicz y Dulak, 2005). Adicionalmente, poseen una gran capacidad de clonado (teóricamente entre 28 a 32 kbp), lo cual posibilitaría la transferencia de cADN largos o regiones genómicas enteras incluyendo sus elementos génicos regulatorios normales (Giacca, 2007).

Los RAds cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: 1) son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tejidos y tipos celulares, en estado proliferativo o quiescente; 2) poseen una capacidad de clonado de hasta 32 kbp de ADN (en *gutless*); 3) son fáciles de manipular en el laboratorio; 4) son factibles de producirse en títulos elevados; 5) el genoma de los RAds no se integra al genoma de la célula huésped, permanece en un estado episómico, descartando el riesgo de mutagénesis insercional; y 6) poseen una alta

eficiencia de expresión génica (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999; Schaffer y col., 2008).

Sin embargo, los vectores Ad poseen una importante limitación, la intensa respuesta inmune que inducen en el hospedador, dirigida contra la partícula viral y las células infectadas. Como consecuencia de dicha respuesta inmune se limita la duración de la expresión del transgen (la cual generalmente es transitoria) y se restringe la readministración del vector. Si bien esta limitación se ha superado en el caso de los vectores gutless, estos son difíciles de producir en estado de suficiente pureza (Yang y col., 1994; Schaffer y col., 2008).

De los diferentes vectores virales descritos más arriba elegimos para el presente trabajo a los vectores adenovirales de primera generación. Esta decisión se fundamentó en las siguientes razones:

- 1) Se consideraron las ventajas, antes mencionadas, de los Ad respecto a los otros vectores virales y se especuló que la respuesta inmune desencadenada por estos vectores, su principal desventaja, podría verse atenuada por las características intrínsecas de la timulina. Es decir, siendo la timulina una molécula inmunosupresora y trabajando además en ratones inmunodeficientes (*nude*), era razonable anticipar que un adenovector portador de un gen sintético para timulina poseería una prolongada expresión de su transgén, como efectivamente sucedió.
- 2) Había además una razón práctica para nuestra elección. Durante los últimos 10 años hemos desarrollado la tecnología necesaria para la construcción de vectores adenovirales recombinantes de primera generación, por lo que esta tecnología estaba bien establecida en nuestro laboratorio al momento de trazarse los objetivos de esta tesis.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La presencia del timo durante la vida perinatal parece esencial, no sólo para el normal desarrollo del sistema inmune, sino también para una apropiada maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y col., 1981b). Los ratones congénitamente atímicos muestran severas deficiencias en su función reproductiva tales como bajos niveles de gonadotrofinas circulantes (Rebar y col., 1981b; 1982; Goya y col., 2001), retraso en la apertura vaginal y primera ovulación, fertilidad disminuida y un aumento de la atresia folicular que conduce a un cese prematuro de la función ovárica (Rebar y col., 1981b). La timectomía neonatal de ratones hembras normales induce anomalías similares (Michael y col., 1980; Nishizuka y Sakakura, 1971).

Considerando los efectos antes mencionados de la timulina sobre los sistemas inmune y endocrino, principalmente su acción facilitadora de la secreción de hormonas hipofisarias (Goya y col., 1999), se ha propuesto la hipótesis de que esta hormona tímica posee un rol relevante como mediadora de la comunicación entre el timo y el sistema neuroendocrino. En el presente trabajo decidimos evaluar dicha hipótesis.

Dado este marco conceptual general nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- 1)** Diseñar y construir una secuencia sintética de ADN codificante para un análogo biológicamente activo de timulina.

- 2)** Determinar el targeting de la timulina recombinante producida por este nuevo gen sintético. Para tal fin se decidió construir un vector eucariótico de expresión conteniendo la secuencia del nuevo gen sintético fusionada a la hMGFP (proteína moster verde fluorescente humanizada).

- 3)** Construir una vector adenoviral recombinante (RAd) que exprese el gen sintético para timulina y evaluar su funcionamiento *in vitro* e *in vivo* y su posible toxicidad.

4) Implementar terapia génica neonatal para timulina (con el gen sintético construido) en ratones *nude* a fin de determinar si esta intervención es capaz de prevenir la aparición de las disfunciones neuroendocrinas y/o reproductivas características de la hembra *nude* adulta.

Consideramos que el conocimiento de las interrelaciones entre del timo endocrino con otros sistemas, particularmente el nervioso y el endocrino, podría proveer nuevos abordajes terapéuticos para el tratamiento de desórdenes endocrinos o neurológicos asociados a situaciones de hipofunción del timo endocrino. En esta línea, un objetivo a largo plazo en el cual la presente tesis se inserta es el desarrollo de estrategias terapéuticas de avanzada, potencialmente aplicables en la clínica humana al tratamiento de timodeficiencias asociadas a procesos patológicos (enfermedades autoinmunes, infección y cáncer) o normales (envejecimiento).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROTOCOLOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON LOS PLÁSMIDOS DE INTERÉS

Todos aquellos protocolos que incluyeron trabajo con material plasmídico comprendieron en algunos de sus pasos la transformación de bacterias. Las bacterias empleadas en todos los casos fueron de la cepa *Escherichia coli* JM109. Dichas bacterias debieron hacerse competentes como paso previo a su utilización en los protocolos de transformación.

3.1.1.1 Preparación de bacterias competentes utilizando cloruro de calcio

Las bacterias se replicaron a partir de *stocks* conservados a -70°C , los cuales contienen los microorganismos en medio Luria (LB) (Tryptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7) con el agregado de 15 % v/v de glicerol. Primeramente las bacterias se crecieron por estría en placas de LB + 1,5 p/v de agar (LB agar) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se transfirió una colonia aislada a 50 ml de medio LB y se incubó el cultivo a 37°C con agitación. Las bacterias se transfirieron asépticamente a un tubo estéril manteniéndolo en hielo durante 10-15 minutos, se centrifugaron a $2.500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 ml de solución 0,1 M de CaCl_2 estéril, enfriado en hielo y se centrifugó nuevamente ($2.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de solución 0,1 M de CaCl_2 estéril, conservándose a 4°C entre 12 y 24 hs. Antes de alicuotar las bacterias se les adicionó 20 % v/v de glicerol y se almacenaron a -70°C .

3.1.1.2 Transformación de bacterias competentes

Se adicionaron aproximadamente 50 ng del ADN transformante a 200 μl del stock de bacterias competentes, manteniéndolos en hielo durante 30 minutos. El tubo se transfirió a un baño de agua a 42°C para realizar un *shock* térmico de 45 segundos de duración, rápidamente se le colocó en hielo, se incubó durante dos

minutos y luego se agregaron 800 µl de medio SOC (peptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl KCl 0,186 g/l; glucosa 20 mM; pH 7) y se incubó 1 h a 37°C. Luego de la incubación, las bacterias se sembraron en placas con LB agar, con el antibiótico de selección a la concentración correspondiente y se incubaron a 37°C durante una noche.

3.1.2 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS

La obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias de *E. coli* se realizó siguiendo los protocolos de Sambrook y Russell (2001). Básicamente, este protocolo consiste en la lisis alcalina de las bacterias con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) para producir la liberación del plásmido a partir de las mismas. El lisado se purifica para eliminar restos celulares, proteínas y el ADN cromosómico.

3.1.2.1 Obtención de plásmidos en pequeña escala (minipreparación)

Se transfirieron colonias individuales a tubos con 2-5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico apropiado. Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación enérgica. Se transfirieron aproximadamente 1,5 ml de cultivo a tubos eppendorf y se centrifugaron a 10.000 x g durante 2 min. a 4°C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspendió con 100 µl de Solución I (25 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA, glucosa 50 mM, ARNasa 10 µg/ml). La lisis alcalina se realizó adicionando 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 M; SDS 1%) mezclando por inversión, hasta la resuspensión del pellet, y se la incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se adicionó 150 µl de Solución III (3M de acetato de potasio; 2 M ácido acético) previamente enfriada en hielo, se incubó en hielo durante 5 min, se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. A continuación, se adicionaron 450 µl de SS-fenol:cloroformo:acohol isoamílico (24:24:1 v/v/v) agitando vigorosamente. Se centrifugó a 15.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. El ADN se precipitó mediante el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 96% y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M, pH 5,2. Se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos, el pellet se lavo con etanol al 70% y se secó al vacío; el ADN plasmídico se resuspendió en buffer TE (10 mM Trs-Cl pH

7,4; 0,1 mM EDTA). La cuantificación del ADN plasmídico se realizó por absorbancia a 260 nm (Espectrofotómetro UV/Visible, Ultrapec 2100, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU).

Alternativamente, las minipreparaciones se efectuaron empleando kits comerciales (Promega, Madison, WI, EEUU o Qiagen, Valencia, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.2.2 Obtención de plásmidos a gran escala (maxipreparación)

Se incubaron 0,5 ml de cultivo primario de bacterias conteniendo el plásmido de interés en 100 ml de medio LB, conteniendo el antibiótico correspondiente, durante 12 a 16 horas a 37°C con agitación enérgica. El cultivo se centrifugó a 5.000 x g por 10 min. El pellet de bacterias se resuspendió en 2 ml de Solución I, se agregaron 4 ml de Solución II mezclando por inversión, y 3 ml de Solución III incubando en hielo por 10 min.. Luego, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. y se recogió el sobrenadante. Se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó por 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min.; el pellet se resuspendió en buffer TE. Se adicionó ARNasa a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente por 15-30 min.. Se agregó 0,5 ml de fenol-cloroformo, se mezcló en vortex por 1-2 min. y se centrifugó a 12.000 x g por 5 min. Se extrajo la fase superior acuosa y el ADN plasmídico se precipitó con etanol 96%, se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min, se secó al vacío y se disolvió en buffer TE. La cuantificación del ADN plasmídico se realizó por absorbancia a 260 nm.

3.1.3 DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER)

Las reacciones de digestión con una enzima de restricción consistieron en una mezcla de reacción que incluye agua libre de nucleasas, un buffer de reacción adecuado, 0,5 a 1 µg de ADN plasmídico y 2 a 5 unidades (U) de la enzima de restricción. La mezcla de reacción se incubó durante 1 a 2 horas a la temperatura óptima de la enzima de restricción utilizada. Finalizada la incubación se adicionó la cantidad correspondiente de buffer muestra 6X (0,25% p/v brofenol blue; 0,25% p/v xileno cianol; 30% glicerol) y se procedió a su siembra en un gel de agarosa.

3.1.4 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA

La separación, analítica o preparativa, de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-1,3%). La corrida electroforética se realizó en cubas de electroforesis sumergidas (HE 33 Mini Submarine Unit, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU), a aproximadamente 10 V/cm durante el tiempo requerido para la correcta separación de los fragmentos obtenidos. En todos los casos el buffer de corrida fue TBE 1X (Tris 0,05M; ácido bórico 0,05 M, EDTA 0,01mM, pH 8,3). Las muestras se sembraron en paralelo con estándares comerciales de peso molecular de ADN. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se sumergieron durante 15 min en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las bandas de ADN se observaron a través de un transiluminador UV (Hoefer MacroVue UV-20, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU), se fotografiaron utilizando una cámara digital KD120 (Kodak, Rochester, NY, EEUU) y se analizaron con el software Kodak Digital Sciences 1D (Kodak, Rochester, NY, EEUU).

3.1.4.1 Electroforesis preparativa en geles de agarosa

Cuando la electroforesis en geles de agarosa implicó la posterior utilización de los fragmentos de ADN separados, el gel se preparó utilizando una agarosa de bajo punto de fusión (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU), realizando la corrida electroforética bajo las mismas condiciones detalladas en el punto anterior, pero manteniendo la temperatura de la cuba electroforética por debajo de los 10°C para evitar deformaciones debidas a la generación de calor por el paso de la corriente eléctrica.

Una vez individualizadas, las bandas de interés se cortaron y se transfirieron a tubos eppendorf. Se les adicionó 3 volúmenes de buffer TE y los tubos se calentaron a 65°C durante 10 min.. Al gel fundido se le adicionó un volumen de SS-fenol y, luego de una agitación vigorosa, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min. a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo limpio repitiendo la operación anterior con un volumen de SS-fenol-cloroformo (1:1 v/v) y luego con cloroformo-1% alcohol isoamílico. Se precipitó el ADN de la última fase acuosa por medio del agregado de 0,1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de

etanol al 95% (v/v) y la centrifugación a 15.000 x g durante 15 min. a 4°C. El pellet de ADN se lavó con alcohol 70% (v/v), se secó al vacío y se redisolvió en un volumen adecuado de buffer TE.

3.1.5 PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE DOBLE CADENA QUE CODIFICAN PARA *met*FTS

Las variantes de oligonucleótidos de doble cadena (oligos dc) que codifican para *met*FTS se generaron mediante la hibridización de los dos oligonucleótidos de simple cadena (oligos sc) antiparalelos y complementarios, diseñados según se detalla en la sección **3.2.1**.

La hibridización se realizó con una mezcla de 1 nmol de cada oligo sc en 50 µl de buffer de annealing (10 nM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA). La mezcla se colocó en un termociclador (Hybaid, model PCR Express, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se sometió a una secuencia de calentamiento en dos pasos, uno a 95°C durante 10 min. seguido por otro a 89°C durante 15 min.. A continuación del proceso de calentamiento se realizó un proceso de enfriamiento que consistió en la disminución de 1°C por minuto hasta los 4°C. La correcta hibridización se verificó mediante una corrida electroforética en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 20%, en buffer TBE 1X a 40 V durante 16 hs. El oligo dc así obtenido se digirió con las enzimas de restricción correspondientes, se separó mediante una electroforesis en geles de agarosa preparativa y se utilizó en la ligación con los diferentes vectores de expresión.

3.1.6 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para una reacción de ligación típica se utilizaron 200 ng de ADN, con una relación inserto/vector 3:1 (mol:mol), empleando buffer ligasa 1X, 1 U de enzima T4 DNA ligasa (Promega, Madison, WI, EEUU) y H₂O libre de nucleasas hasta completar el volumen final de 10 µl. La incubación se realizó a 15°C durante 16 horas.

3.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PORTADORES DEL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA

3.2.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIOTA pcDNA-*met*FTS.

A partir de la secuencia de aminoácidos que conforman el nonapéptido FTS nativo, Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn (Pléau y *col.*, 1977), se diseñó una secuencia de ADN codificante para un análogo de timulina, *met*FTS, de manera tal que la misma fuese óptima para su expresión en células de rata. Así, se diseñó la siguiente secuencia de ADN: 5'-ATGGAGGCCAAGTCGCCGGGGGGTCTGAAGTCTAG-3', que codifica para *met*FTS (Met-Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn) e incluye un codón de iniciación ATG en el extremo 5' y dos codones de terminación contiguos en el extremo 3' (**Fig. 10, A**). A partir de esta construcción, que se denominó "secuencia básica para *met*FTS", se diseñaron tres variantes para lograr el clonado en distintos vectores de expresión. Los diseños de inserción de las variantes del gen sintético de la timulina en los vectores utilizados se realizaron mediante el empleo del programa Clone Manager Professional Suite, versión 8-2005 (Sci-Ed Software. Cary, NC, EEUU).

A la primera variante se le agregaron cuatro sitios de corte para las siguientes enzimas de restricción: BamHI y MluI (en el extremo 5') y EcoRV y EcoRI (en el extremo 3') (**Fig. 10, B**). Esta variante se insertó en el sitio de clonado múltiple (MCS) del vector de expresión eucariota pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Dicho plásmido contiene el promotor del citomegalovirus humano (CMV) y la secuencia de la señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH). El oligo dc que codifica para *met*FTS se generó mediante la hibridización de los dos oligos sc complementarios de 66 bases cada uno (Invitrogen), como se describió en la sección 3.1.5. Luego, se purificó y se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. El plásmido pcDNA3.1(+) se digirió con estas mismas enzimas. Ambos fragmentos se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparativa, se ligaron entre sí y con el producto de la ligación se transformaron bacterias competentes. Se obtuvieron colonias que fueron analizadas para confirmar la correcta construcción del vector portador de la secuencia para *met*FTS que denominamos pcDNA-*met*FTS (**Fig.**

11, A). Se trasfectaron células BHK y HEK293 (293) con el vector generado a fin de determinar si era capaz de expresar el péptido *met*FTS.

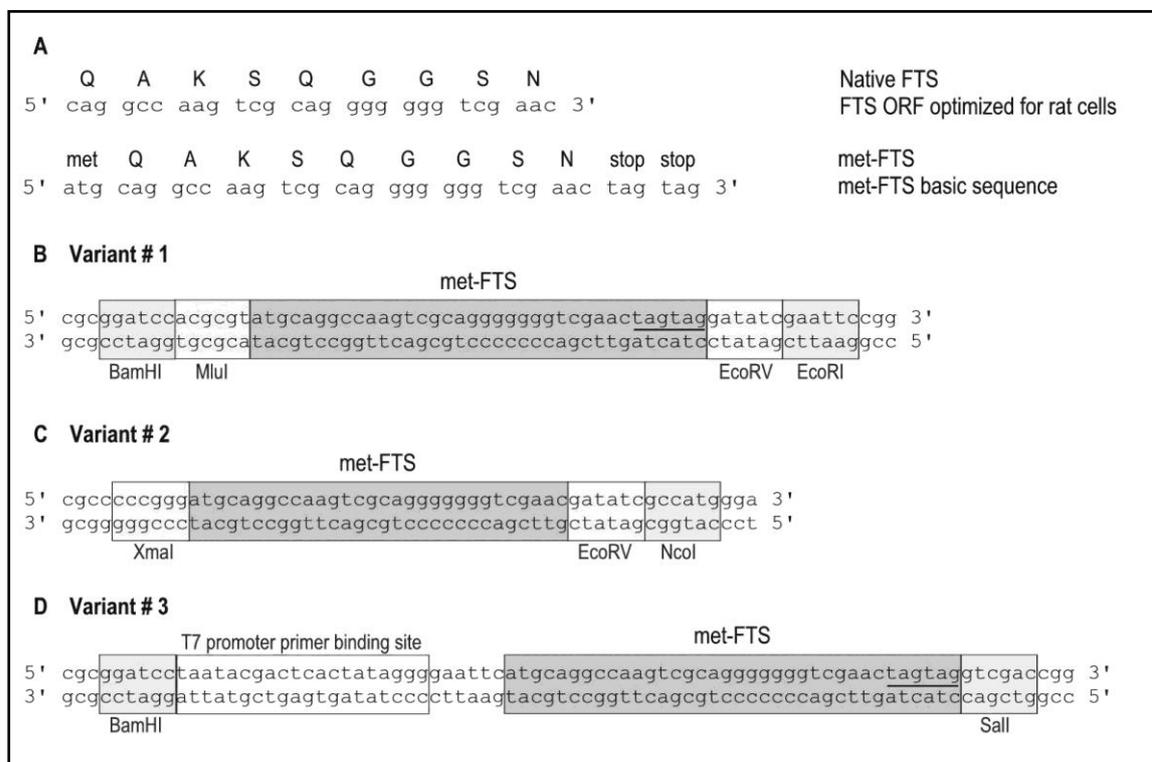


Figura 10. Construcciones de ADN que codifican para *met*FTS. **A:** Secuencia de aminoácidos de la FTS nativa. Por debajo, se observa la secuencia ORF diseñada, optimizada para su expresión en células de rata, que codifica para la FTS nativa. La secuencia básica del gen sintético para *met*FTS se constituyó al agregarle a la secuencia nativa, en el extremo 5', un codon ATG de iniciación (que además codifica para metionina) y, en el extremo 3', dos codones de terminación. **B, C y D:** Variantes de la secuencia básica construidas para ser insertadas en los vectores de expresión pCDNA3.1(+), pHMGFP, y pDC515, respectivamente. La variante #2 carece de los codones de terminación. La variante #3, construida para ser insertada en el vector pDC515, consta de la secuencia del promotor del fago T7 para su secuenciación.

3.2.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICO *pmet*FTS- hMGFP

La segunda variante del gen *met*FTS diseñada (**Fig. 10, C**), que carece de los codones de terminación, se insertó en el MCS del vector de expresión eucariótico pHMGFP (Promega), portador del gen de la hMGFP (proteína moster verde fluorescente humanizada), posicionado en el extremo 3' del MCS. Siguiendo el protocolo antes descrito, el oligo de *met*FTS y el pHMGFP se digirieron con las enzimas de restricción XmaI y EcoRV. Ambos fragmentos lineales se purificaron en geles de agarosa, se ligaron entre sí y con el producto de la ligación se transformaron

bacterias competentes. Se obtuvieron colonias que fueron analizadas, confirmándose la correcta construcción del vector *pmetFTS-hMGFP* (**Fig. 11, B**), portador de un gen híbrido codificante para la proteína de fusión *metFTS-hMGFP*. Se transfectaron células BHK y 293 con el vector generado a fin de determinar si era capaz de expresar dicha proteína de fusión.

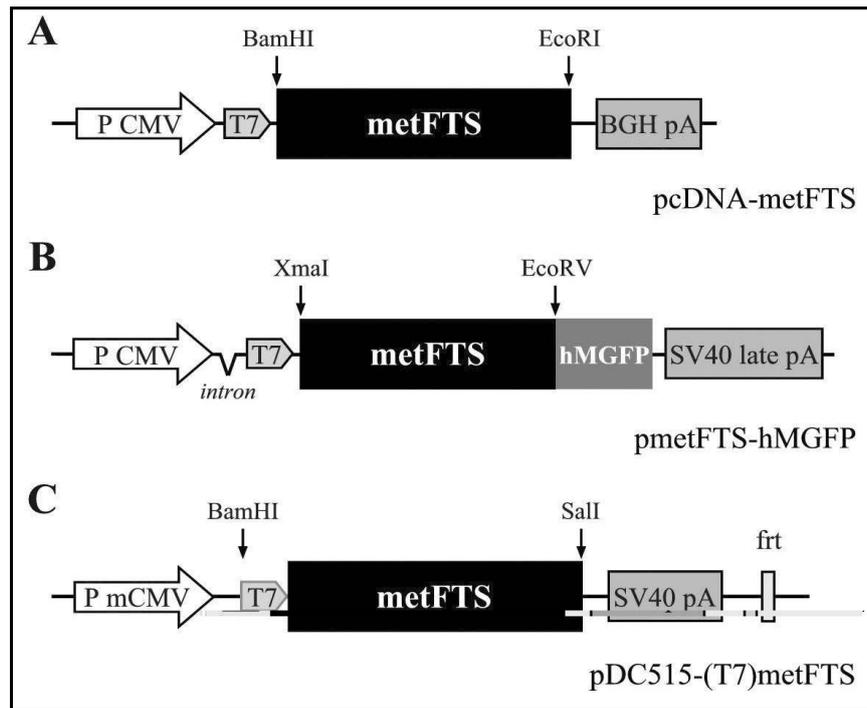


Figura 11. Vectores de expresión eucarióticos conteniendo el gen sintético para *metFTS*. **A:** El *pcDNA-metFTS* se generó por clonación del gen sintético *metFTS* en los sitios BamHI y EcoRI del sitio de múltiple clonado (MCS) de *pcDNA3.1(+)*. **B:** El *pmetFTS-hMGFP* se generó insertando la variante de la secuencia *metFTS*, que carece de los dos codones de terminación, en los sitios XmaI y EcoRV del MCS del vector de fusión *phMGFP*. Esto resultó en la secuencia *metFTS* insertada en el mismo marco de lectura que el gen para *hMGFP* y, por lo tanto, se constituyó un gen híbrido que codifica la proteína de fusión *metFTS-hMGFP*. **C:** El *pDC515-metFTS* se generó insertando la secuencia (T7)*metFTS* en los sitios BamHI y SalI del MCS del shuttle *pDC515*.

3.3 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA (Rad-FTS)

3.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SISTEMA DE CONSTRUCCIÓN

El RAd-FTS se construyó utilizando una variante del método de los dos plásmidos (Hitt y col., 1995) empleando el kit plasmídico AdMax[®] (Microbix,

Canadá). Este kit utiliza un plásmido lanzadera o shuttle (pDC515) que contiene un minicasete de expresión constituido por el promotor del gen inmediato temprano del citomegalovirus murino (mCMV), un MCS (para el clonado del gen de interés), la señal de poliadenilación del *Simian Virus 40* (SV40pA) y un sitio de reconocimiento *frt* para la recombinasa FLP de levadura (característica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). Este casete está flanqueado por los extremos de la región E1 del adenovirus tipo 5 (Ad 5). Además este plásmido shuttle posee la señal de empaquetamiento del adenovirus (ψ) y las secuencias de repeticiones terminales invertidas enfrentadas (ITR-ITR).

El segundo plásmido del kit, el plásmido genómico pBHfrt(del)E1,3FLP (35.552 pb), consiste en el genoma completo del Ad 5, conteniendo deleciones en las regiones E1 y E3. Además, río arriba de la deleción E1, contiene un casete de expresión para el gen de la FLP recombinasa de levadura, bajo el control del promotor del CMV humano, y una señal de poliadenilación del SV40. Inmediatamente, río abajo de la deleción E1, contiene un sitio de reconocimiento para la recombinasa *frt*. La enzima FLP recombinasa reconoce el sitio *frt* de 34 pb (de ambos plásmidos) y permite la recombinación sitio-específica. De este modo los sitios de recombinación específica reconocidos por FLP recombinasa dan alta eficiencia al proceso de recombinación que genera el vector deseado (Ng y Baker, 1999). El plásmido genómico también posee las ITR-ITR.

Las secuencias ITRs enfrentadas facilitan la apertura de los plásmidos para la recombinación, haciendo más eficiente el origen de replicación del ADN del adenovirus (Ng y Baker, 1999). Los plásmidos mencionados poseen un gen de resistencia a la ampicilina, para permitir expandirlos en bacterias.

3.3.2 CONSTRUCCIÓN DEL RAd-FTS

La tercera variante de la secuencia *met*FTS diseñada (**Fig. 10, D**) se insertó en el MCS del plásmido shuttle, pDC515. El oligo dc *met*FTS y el pDC515 se digirieron con las enzimas de restricción BamHI (extremo 5´) y Sall (extremo 3´). Ambos fragmentos lineales se purificaron por electroforesis en geles de agarosa preparativos, se ligaron entre sí y con el producto de la ligación se transformaron bacterias competentes. Se obtuvieron colonias que fueron analizadas, confirmándose la correcta construcción del plásmido lanzadera, pDC515-*met*FTS

(Fig. 11, C). Este plásmido se cotransfectó con el plásmido genómico pBHGfrt(del)E1,3FLP en células 293. En las células 293 exitosamente cotransfectadas, la recombinasa FLP se expresa tempranamente, reconociendo los sitios *frt* en ambos plásmidos, y cataliza eficientemente la recombinación sitio-dirigida generando así el genoma del vector adenoviral deseado, portador del gen sintético para la timulina (Fig. 12). En las células 293, dicho genoma se replicó y generó una producción masiva de viriones. Se obtuvo un lisado de las células 293 cotransfectadas y, por medio de una purificación en placas (según el protocolo sugerido por AdMax®), se aisló una preparación monoclonal del vector viral generado, que se denominó RAd-FTS. Dicha preparación se amplificó, se purificó en gradiente de CsCl (sección 3.4.4) y se tituló por medio del ensayo de dilución en placas. El RAd-FTS construido fue caracterizado biológicamente *in vitro* e *in vivo*.

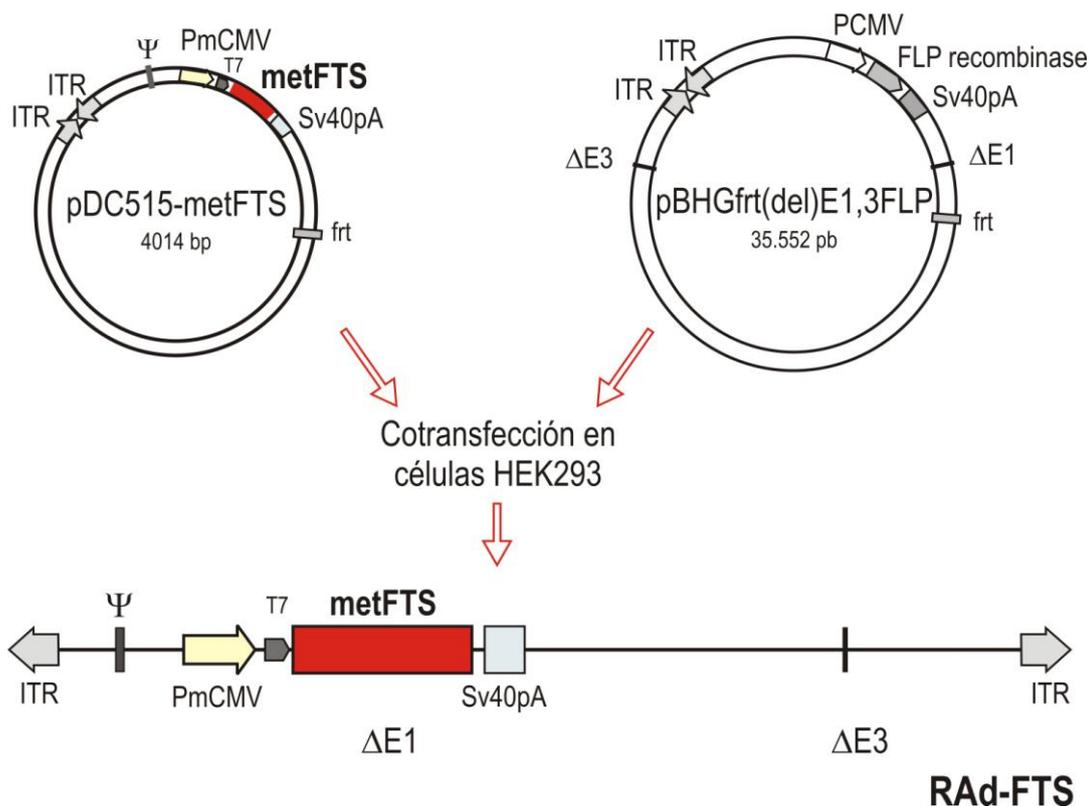


Figura 12. Esquema de la construcción del vector adenoviral portador del gen sintético de la timulina. Luego de la cotransfección en células 293, los plásmidos lanzadera pDC515-*metFts* y genómico pBHGfrt(del)E1,3FLP se recombinaron por la acción de la FLP recombinasa. Como resultado se obtuvo el genoma del RAd-FTS. pmCMV: promotor del citomegalovirus murino; SV40: señal de poliadenilación; ψ : señal de empaquetamiento; ITR: repeticiones terminales invertidas; Δ E1, E3: delecciones E1, E3; *frt*: sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa.

Se utilizaron como controles dos RAdS. Uno fue el denominado RAd- β gal que expresa β -galactosidasa de *E. Coli*; en dicho vector la regi3n gen3mica E1 fue reemplazada por un casete de expresi3n conteniendo el gen que codifica para el oper3n lac Z de *E. Coli*, ubicado bajo el control del promotor del virus del Sarcoma de Rous-*long terminal repeat* (RSV-LTR). Este vector fue donado por el Dr. Michael Perricaudet del Institute Gustave Roussy (CNRS, Par3s, Francia). El segundo vector utilizado fue el RAd-(GFP/TK)_{fus}, construido en nuestro laboratorio mediante el proceso general empleado en la construcci3n del RAd-FTS. En dicho vector se insert3 el gen h3brido GFP/TK que codifica para la prote3na verde fluorescente de *Aequorea victoria* fusionada a la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* tipo 1 (donado por el Dr. Jacques Galipeau, McGill University, Montreal, Canad3). Este gen h3brido se encuentra bajo el control del promotor mCMV. Ambos vectores adenovirales recombinantes controles fueron expandidos en c3lulas 293, purificados y titulados como se indica para el RAd-FTS.

3.4 PROTOCOLOS DE CULTIVO CELULAR

3.4.1 C3LULAS

Se utilizaron las siguientes l3neas celulares: las HEK 293 (de ri3n3n de embri3n humano), las BHK (de ri3n3n de h3mster beb3), las rTEC (c3lulas epiteliales t3micas de rata), y las hTEC (c3lulas epiteliales t3micas de feto humano).

Las cuatro l3neas celulares fueron empleadas en procedimientos *in vitro* con los vectores construidos. De estas l3neas, las c3lulas 293 (Microbix Biosystems Inc.) fueron empleadas para los procedimientos de generaci3n, expansi3n y titulaci3n de vectores adenovirales recombinantes. Estas c3lulas est3n gen3ticamente modificadas de manera que expresan constitutivamente las prote3nas codificadas por los genes adenovirales de la regi3n E1 (delecionada en los RAdS). Dichas prote3nas son requeridas para la expresi3n de los genes adenovirales que permiten la replicaci3n de nuestros Rads, que son replicaci3n-deficientes.

3.4.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES DE CULTIVO DE C3LULAS

3.4.2.1 Mantenimiento de los stocks

Las l3neas celulares se cultivaron en medio de cultivo: Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco-Invitrogen), 2 mM glutamina, 0,1 mM amino3cidos

no esenciales, NaHCO_3 (2,2 mg/l) y 16,8 mM Hepes buffer (pH 7,0), esterilizado por filtración a través de filtro con un diámetro de poro de 0,22 μm . A este medio se le adicionó, en esterilidad, penicilina/estreptomicina (20mg/l) (PAA Laboratory, GMBH) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba).

Las líneas celulares empleadas, que crecen en monocapa, se mantuvieron a 37°C en atmósfera controlada al 5% de CO_2 en frascos de cultivo de 75 cm^2 hasta el momento de su utilización. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se procedió a repicarlas, diluyéndolas 1/3. Para separar las células se utilizó tripsina (para las células BHK y las TECs) o cítrico salina (para las células 293). La tripsina (0,5 mg/ml) (Trypsin-EDTA PAA Laboratory, GMBH), diluida en buffer PBS estéril conservada a 4°C, se agregó en cantidad suficiente para cubrir las monocapas. El desprendimiento de las células se controló al microscopio y al completarse, se procedió a agragar medio de cultivo (MEM 10% SFB) para neutralizar la tripsina. Las células 293 se repicaron dispersándolas mediante el agregado de la solución cítrico salina (10 g/l de KCl, 4,4g/l de citrato de sodio, estéril, conservada a 4°C) según el protocolo indicado por el fabricante (Microbix).

3.4.2.2 Congelamiento de células

Para congelar células se utilizaron cultivos con un 75-80% de confluencia. Las células disgregadas por tripsina o cítrico salina se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 minutos rescatándose el sedimento celular y se resuspendieron en medio de congelación (50% SFB, 40% MEM y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU)) a una concentración de aproximadamente 10^6 células/ml. Se fraccionaron en alícuotas de 1 ml por criotubo y se procedió a la siguiente secuencia de congelación: 30 minutos a 4°C, 1 hora a -20°C, y 1 hora a -70°C. Se conservaron congeladas en nitrógeno líquido.

3.4.2.3 Descongelamiento de células

Las alícuotas, retiradas del nitrógeno líquido, se descongelaron rápidamente en un baño a 37°C. Las células se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml que contenía medio de cultivo (aprox. 10 ml) para evitar la acción tóxica del DMSO. Se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se

resuspendió en 10 ml de medio de cultivo. Estas células en suspensión se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² y se colocaron en estufa.

3.4.3 COTRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA

Las cotransfecciones del plásmido lanzadera pDC515-*met*FTS con el plásmido genómico para generar el RAd-FTS se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) en células HEK293 de bajo número de pasaje (<40). De la misma manera se operó en las transfecciones con el pcDNA-*met*FTS y con el p*met*FTS-hMGFP en células BHK y 293.

Se realizaron transfecciones en placas de 6, 12 y 24-pocillos, donde se variaron los volúmenes y las cantidades de ADN y la lipofectamina utilizada, siguiendo en todos los casos el procedimiento sugerido por el fabricante.

Generación del RAd-FTS: en este caso, luego de la transfección con lipofectamina, se reemplazó el medio de cultivo por uno con 5% SFB. Las células se mantuvieron con MEM 5% SFB, renovado cada 3 días, hasta la visualización del efecto citopático (CPE). Se observó diariamente la monocapa y aproximadamente 15 días después de la cotransfección se observaron las placas de lisis producidas por el RAd generado.

3.4.4 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL RAd-FTS

El inóculo de RAd-FTS inicial se amplificó infectando de 6-8 botellas grandes (180 cm²) con monocapas de células 293 con una confluencia del 70-80%. Cuando se observó el CPE en toda la monocapa, se recogió el medio con las células que se encontraban flotando y se despegaron cuidadosamente las células que todavía permanecían adheridas a la base de las botellas por raspado. Las células se centrifugaron a 1.000 rpm y el sedimento celular fue resuspendido en un menor volumen. Las partículas virales fueron liberadas al medio mediante la lisis de las células por congelamiento y descongelamiento repetido (3 veces) de las mismas. Luego, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo un sobrenadante (lisado crudo) conteniendo la progenie del RAd-FTS generado. Se guardó a -70°C hasta su purificación.

La purificación de las partículas virales se realizó mediante dos ultracentrifugaciones sucesivas en gradiente de CsCl. Ambas ultracentrifugaciones se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman Coulter modelo L7-65, con el rotor SW-60Ti (Bekman Coulter, Palo Alto, CA, EEUU). La primera centrifugación se llevó a cabo en un gradiente discontinuo de CsCl, en tubos de policarbonato estériles de 4,4 ml de capacidad. Se depositaron sucesivamente, desde el fondo, las siguiente soluciones de CsCl: 0,2 ml de densidad 1,5 g/ml, 1,1 ml de densidad 1,35 g/ml y 1,35 ml de densidad 1,25 g/ml; a continuación se colocó en la superficie 2 ml de la suspensión de partículas virales y se centrifugó a 180.000 x g durante 1 hora a 18°C. Al finalizar la ultracentrifugación se pudo observar una banda blanquecina correspondiente a las partículas virales a una densidad aproximada de 1,35 g/ml (**Fig. 13**).

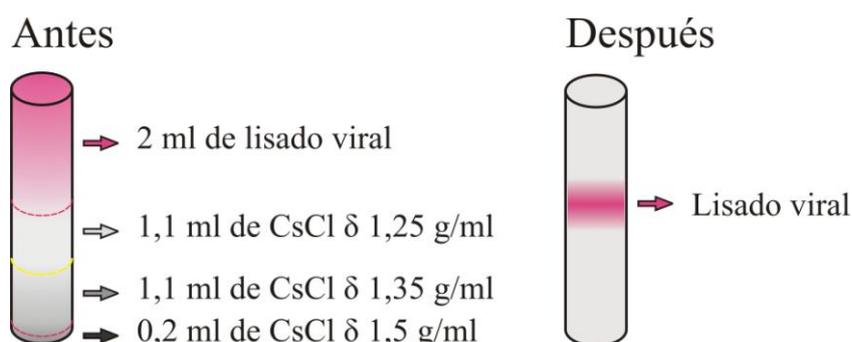


Figura 13. Representación del patrón de las bandas que aparecen después de la ultracentrifugación en gradiente discontinuo de CsCl. A la izquierda se observa en tubo cargado con las soluciones de distintas densidades de CsCl y el lisado viral, previo a la ultracentrifugación. A la derecha se observa el lugar donde se sitúa la banda de lisado viral semipurificada, después de la primera ultracentrifugación.

Se recogió dicha banda y se la depositó (1 ml de la suspensión de partículas virales) sobre 3,4 ml de una solución de CsCl de densidad 1,35 g/ml y se realizó una segunda ultracentrifugación a 180.000 x g durante 18 horas a 18°C. Se recogió la banda correspondiente a la suspensión viral y se dializó durante 18 horas a 4°C contra una solución de buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 135 mM, Cl_2Mg 1 mM. A la preparación del RAd-FTS purificado se le adicionó 10% de glicerol y se conservó a -70°C hasta su titulación y fraccionamiento.

3.4.5 TITULACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE

La titulación del RAd-FTS fue realizada mediante el método de dilución por placas. Se sembraron placas con células 293 y cuando las monocapas alcanzaron un 60% de confluencia se infectaron, por duplicado, con 200 µl de diluciones crecientes (desde 1×10^{-3} hasta 1×10^{-13}) en medio MEM 10% SFB de la preparación viral purificada. Como control negativo se utilizaron células sin infectar. Luego de cuatro días se les adicionó igual volumen de medio MEM 10% SFB de esta manera las células se mantuvieron con MEM 5% SFB. Aproximadamente una semana post-infección se observó el CPE y en la última dilución (con CPE) se contaron las placas de lisis. Se calculó el título viral (Precious y Russell, 1985) a partir del número de las placas de lisis contadas y de la dilución donde se determinaron, obteniéndose el título como unidades formadoras de placa/ml (pfu/ml).

3.5 PROTOCOLOS DE MANEJO DE ANIMALES Y TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

3.5.1 ANIMALES

En los experimentos *in vivo* del presente trabajo se emplearon:

- 1) ratas hembras de la cepa Sprague Dawley (SD) adultas (9 meses), provenientes de la colonia de nuestro Instituto;
- 2) ratones C57BL/6 (C57) adultos de ambos sexos (2 meses), provenientes de la colonia de nuestro Instituto;
- 3) ratones *nude* provenientes del bioterio de la Facultad de Veterinaria (UNLP) y de la CONEA. Los apareamientos de ratones *nude* se realizaron entre hembras heterocigotas (nu/+) con machos homocigotas recesivos (nu/nu).

Las ratas y los ratones C57 se mantuvieron en distintos bioterios, en cuartos con temperatura controlada (22 ± 2 °C), bajo un ciclo luz/oscuridad de 12/12 hs., y con alimento y agua *ad libitum*.

Los ratones *nude* fueron mantenidos con comida γ -irradiada (IONICS) y agua estéril *ad libitum*, a 24 ± 2 °C, y con ciclo luz/oscuridad de 12/12 hs.

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Animal Welfare Guidelines de NIH. Certificación de bienestar animal N° A5647-01 otorgada por los National Institutes of Health al INIBIOLP.

3.5.2 TIMECTOMÍA

En el presente trabajo de tesis se timectomizaron ratas SD y ratones C57.

3.5.2.1 Timectomía en ratas

Las ratas se anestesiaron con ketamina (40 mg/kg peso corporal, i.p.; Holliday-Scott SA., Beccar, Bs As, Argentina) y xilazina (8 mg/kg de peso corporal, i.m.; Laboratorios Richmond, División Veterinaria S.A., Córdoba, Argentina). Cada animal fue recostado sobre su dorso de manera de exponer su lado ventral. Se realizó una incisión de 2-2,5 cm en la línea media desde la base del cuello hacia el tórax. Luego se separó el tejido conectivo entre las dos glándulas salivales submandibulares, expuestas por la incisión; este procedimiento expone el músculo esternohioideo que se encuentra sobre la tráquea, el cual también fue separado. El tórax se abrió, con una tijera de punta roma, en la línea media cortando los músculos pectorales y el manubrio esternal hasta la tercera costilla. La longitud del corte fué de 1-1,5 cm, permitiéndose de este modo la clara observación de la parte superior de la glándula tímica (**Fig. 14**); si el corte es muy largo puede producirse un neumotórax en la rata (Waynforth y Flecknell, 1992).

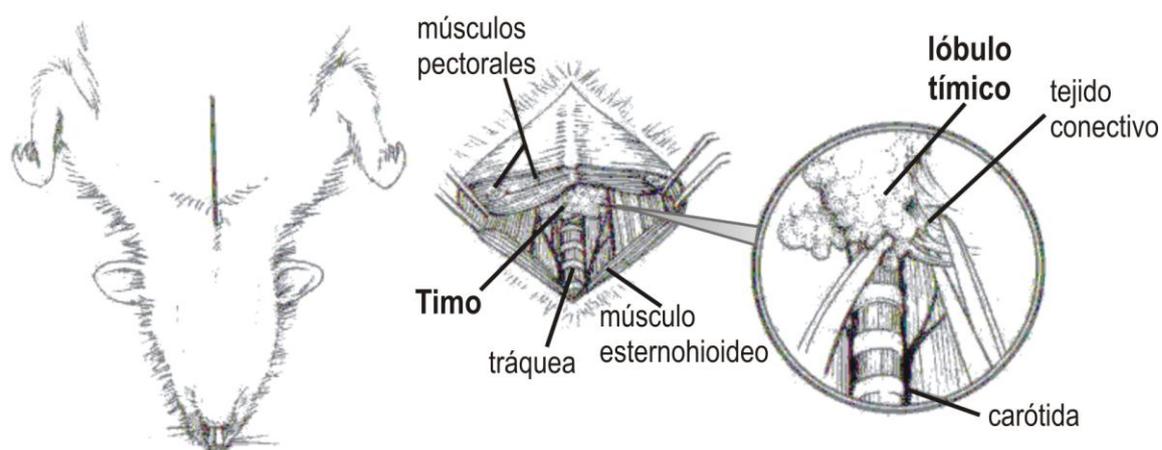


Figura 14. Esquema de algunos pasos de la timectomía. Se muestra el posicionamiento de la rata, el lugar de la incisión, la localización del timo y los tejidos circundantes. En la ampliación de la región de la incisión se muestra uno de los lóbulos tímicos y la manera en la que se debe cortar el tejido conectivo que lo sujeta. Modificado de Waynforth y Flecknell, 1992.

Los lóbulos tímicos, más o menos separados, se mantienen unidos por el tejido conectivo circundante. Con un par de fórceps semicurvos se sujetó el timo y se fue separando muy cuidadosamente del tejido conectivo, tratando de extraer el timo (movimiento hacia afuera-arriba) y empujando hacia adentro el conectivo. Se utilizó un hisopo para ayudar a realizar este procedimiento, sosteniendo firmemente el timo y tratando de que la parte expuesta no se retraiga hacia la cavidad torácica. Inmediatamente después de la remoción del timo, los animales frecuentemente mostraron signos de distrés respiratorio, apnea y, a veces, neumotórax. Para prevenir o detener esto se unieron rápidamente ambos lados del esternón cortado y se suturaron los músculos pectorales para cerrar el tórax. Los animales se dejaron recuperar y se devolvieron a sus respectivas cajas. La sobrevivencia fue de alrededor del 90%.

3.5.2.2 Timectomía en ratones

Los ratones se anestesiaron con avertina (2,2,2 tribromoethanol, 0,4 mg/g peso i.p) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU). Cada animal fue colocado en posición horizontal exponiendo su torso y se realizó una incisión de 1-1,5 cm en la línea media desde la base del cuello hacia el tórax. De manera similar a la explicada para la rata, se expuso el timo realizando un corte del esternón de 0,5 cm. Luego, se aspiró el timo con una pipeta pasteur ensanchada y conectada a una bomba eléctrica de succión (SILFAB, Silvestrini Fabris SRL, Argentina) y, rápidamente, se suturó la incisión. Los animales se recuperaron y se devolvieron a sus respectivas cajas. La sobrevivencia fue de alrededor del 80%.

3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN NO VIRALES

3.6.1 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE pcDNA-*met*FTS.

El plásmido pcDNA-*met*FTS portador de la secuencia para *met*FTS fue transfectado en dos líneas celulares que no producen timulina, la HEK293 y la BHK. La transfección de estas células se realizó utilizando lipofectamina, como se describió en **3.4.3**. Como control negativo se transfectaron las mismas líneas celulares con el plásmido vacío. Tras la transfección correspondiente se

recogieron los sobrenadantes y las células. Las células fueron lisadas por congelación-descongelación (3 ciclos), centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min y se recogieron los sobrenadantes (lisados celulares). En los sobrenadantes y en los lisados celulares obtenidos de ambas líneas celulares se determinó la actividad biológica de timulina mediante un ELISA (ver 3.9.2.1) y por el bioensayo de formación de rosetas (ver 3.9.2.2).

Se caracterizaron los lisados de células 293 transfectadas con el pcDNA-*met*FTS mediante dos experimentos:

1- *In vivo*: A ratones C57 timectomizados de 40 días de edad (carecen de FTS sérica) se los inyectó intraperitonealmente (i.p.) con 200 μ l de lisados de células 293 transfectadas con el pcDNA-*met*FTS, con y sin adición de ZnCl₂ (30 min. antes de la inyección). Luego de 45 min post-inyección se determinó la actividad biológica de timulina en suero mediante el bioensayo de rosetas. Los animales control recibieron i.p. lisados de células 293 transfectadas con el pcDNA3.1(+).

2- *In vitro*: Los lisados de células 293 transfectadas con el pcDNA-*met*FTS se mezclaron con igual volumen (100 μ l) de un anticuerpo de conejo anti-FTS o con un anticuerpo de conejo anti-KLH, como control negativo. Se incubó la mezcla durante 90 min. a 37°C. Luego de la inmunoneutralización se filtró la mezcla en membrana Amicon (30 kDa cut-off; AMICON Inc, Massachusetts, EEUU) y se determinó el contenido de FTS remanente mediante el bioensayo de rosetas. El suero anti-FTS fue producido por inmunización de conejos con FTS sintético acoplado a la *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH; Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO) utilizada como transportador. El anti-KLH, usado como un antisuero irrelevante, fue producido por inmunización de conejos con KLH.

3.6.2 CARACTERIZACIÓN DE *pmet*FTS-hMGFP.

El plásmido *pmet*FTS-hMGFP portador de la secuencia híbrida *met*FTS-hMGFP fue transfectado en dos líneas celulares, la HEK 293 y la BHK, con el fin de determinar el targeting de la correspondiente proteína de fusión. Para ello se sembraron células, de las dos líneas, sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en placas de 12-pocillos. Cuando alcanzaron un 80-90% de confluencia fueron transfectadas con lipofectamina. En el *pmet*FTS-hMGFP la hMGFP actúa como un marcador fluorescente para permitir la fácil identificación de la expresión

de nuestra construcción. Después de 48 hs de la transfección se procedió a fijar las células con paraformaldehído 4% durante 30 minutos, se lavaron 3 veces con agua destilada y los cubreobjetos se montaron con Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Se mantuvieron en la heladera hasta su evaluación, la cual consistió en la captura de imágenes por medio de una cámara digital DP70 (Olympus, Tokio, Japón) anexada a un microscopio Olympus BX51 (Tokio, Japón) y la observación de la fluorescencia en las células transfectadas.

3.7 CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL RAd-FTS

3.7.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

- Células 293 y BHK fueron sembradas en placas de 6-pocillos (con MEM 10% SFB) y, al día siguiente, la monocapa fue incubada durante 48 hs. con $2,5 \times 10^9$ pfu/pocillo del vector RAd-FTS o del RAd- β gal (control negativo). Se obtuvieron y caracterizaron los sobrenadantes y lisados de ambas líneas celulares; para ello se determinó la actividad biológica de timulina presente en los mismos mediante el bioensayo de formación de rosetas (ver **3.9.2.2**).

- A fin de estimar si los elevados niveles de timulina recombinante producidos por nuestro vector poseían efecto citotóxico sobre células en cultivo, se incubaron células TEC con el RAd-FTS. Se procedió a sembrar células rTEC y hTEC en placas de 6-pocillos (2 ml de MEM 10% SFB) que contenían cubreobjetos redondos esterilizados de 18 mm de diámetro. Al día siguiente, la monocapa con un 80% de confluencia fue transducida con el RAd-FTS ($2,5 \times 10^{10}$ y $2,5 \times 10^9$ pfu/pocillo); se utilizaron células intactas como control negativo. Dos días después se recogió el sobrenadante para determinar los niveles de timulina. Las células se fijaron con formol al 10% durante 15 minutos, se lavaron y se procedió a la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU), un agente que al unirse con el ADN genera una intensa fluorescencia azul. Para la tinción, se agregó 1 ml de DAPI (100 μ g/ml), se incubó en oscuridad durante 15 min., se aspiró la solución de DAPI y se lavó la monocapa. De esta manera se marcaron los núcleos de ambas líneas celulares. Finalmente, se procedió al montaje con el medio acuoso Fluoromount G. Esta técnica permitió

evaluar la morfología y, de un modo aproximado, la viabilidad de las células transducidas por el RAd-FTS.

3.7.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Se utilizaron ratones C57 adultos y ratas hembras SD timectomizados, como se describió en **3.5.2**. Los animales fueron usados al menos 10 días después de la TX para asegurar la ausencia de timulina circulante. Luego de la TX, tanto las ratas como los ratones fueron inyectados con RAd-FTS o con RAd- β gal (vector control que expresa β -galactosidasa).

Los ratones C57 TX recibieron una única inyección intramuscular (im.) bilateral de 5×10^7 pfu/animal (50 μ l en cada muslo trasero) de los RAds, según el grupo de animales: los experimentales con RAd-FTS (N=30) y los controles con RAd- β gal (N=30). Luego, para determinar los niveles séricos de timulina se les extrajo sangre del plexo vascular ocular retroorbital a los días post-inyección: 3, 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91 y 110. Al mismo animal se le extrajo sangre 2 o 3 veces durante el experimento, alternando los ojos y con 30 días entre extracciones. Se observó el comportamiento y el estado de salud general de los animales. El experimento finalizó el día 110 post-inyección de los RAds.

Las ratas hembras TX recibieron una única inyección i.m. bilateral de 1×10^9 pfu/animal (100 μ l en cada muslo trasero) de los RAds según el grupo de animales: RAd-FTS (N=10) y RAd- β gal (N=10). Luego, se les extrajo sangre de la vena caudal cada 10 días para determinar los niveles séricos de timulina. Los animales se mantuvieron hasta que los niveles de timulina detectados comenzaron a decaer, momento en el cual fueron sacrificados. Durante el experimento se monitoreó el comportamiento de los animales, su estado de salud general y su peso corporal.

3.8 TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON TIMULINA

3.8.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se realizaron dos experimentos en los cuales se utilizaron ratones hembras *nude* nacidas de padres homocigotas (nu/nu) y de madres heterocigotas (nu/+). Para el primer experimento los progenitores se adquirieron en el bioterio de la Fac.

de Veterinaria de la UNLP y para el segundo se compraron en el bioterio de la CONEA.

En el primer experimento (EXP-1), en el día postnatal 1 o 2 cada ratón (nu/nu y nu/+) recibió una única inyección bilateral i.m. de 1×10^8 pfu de RAd-FTS (N=32) o RAd-(GFP/TK)_{fus} (vector control, N=32) en 10 µl de vehículo, en el músculo de cada pata trasera. En el día postnatal 13, tres ratones de cada grupo fueron sangrados para determinar la timulina sérica. Cuando todas las hembras fueron post-puberales, al día 50-51 (adultos jóvenes), se procedió a la extracción de sangre del plexo retroorbital y a su sacrificio por dislocación cervical. Se determinaron los niveles séricos de timulina y de gonadotrofinas, y el peso de los animales (Fig. 15).

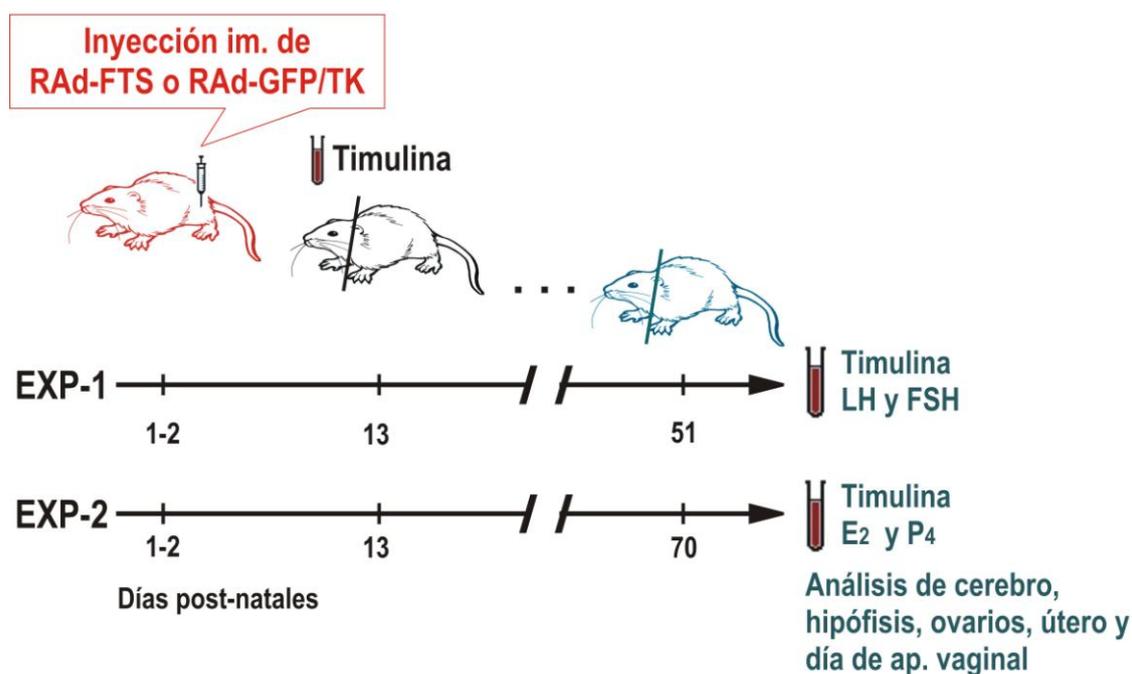


Figura 15. Protocolos de terapia génica neonatal para timulina en ratones hembras nude. En ambos experimentos (EXP-1 y EXP-2) en el día 1-2 de vida se inyectaron 10^8 pfu de RAd-FTS o RAd-GFP/TK (vector control), en 10µl de vehículo. En el EXP-1 se sacrificaron los animales a los 50-51 días de edad y en el EXP-2 a los 70 días de edad.

En el segundo experimento (EXP-2), se prosiguió realizando el mismo protocolo experimental de administración de los RAd pero se sacrificaron los animales a los 70 días de edad (hembras adultas) (N=50). Además, a partir del día postnatal 22 se monitoreó el momento de la apertura vaginal, registrándose el día en el que

ocurrió como el día de comienzo de la fertilidad. En el día del sacrificio todos los animales fueron sangrados e inmediatamente algunos de ellos fueron sacrificados por dislocación cervical y otros por perfusión intracardíaca. Se recogieron para su análisis morfométrico: el cerebro, la hipófisis, los ovarios y el útero. En el suero se determinaron los niveles séricos de timulina, estrógeno y progesterona (**Fig. 15**).

3.8.2 PERFUSIÓN INTRACARDÍACA DE RATONES HEMBRAS DEL EXP-2

En el EXP-2 algunos animales se fijaron por perfusión intracardíaca. Durante la perfusión la bomba peristáltica impulsa el fijador que ingresa a la circulación del animal por el ventrículo izquierdo, baña los tejidos y emerge por la aurícula derecha.

Los animales se anestesiaron con éter y fueron colocados en una plataforma. Se expuso la región torácica y la cavidad peritoneal para acceder al corazón. Luego, se canuló (con aguja 27 ½ G) el ventrículo izquierdo efectuándose un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito (**Fig. 16**). Se perfundió a una velocidad de 3 ml/min con una bomba peristáltica (Gilson modelo minipuls 2 MP312), primero pasando 80 ml de solución salina (NaCl 0,9%) heparinizada (0,86 UI/ml), luego, otros 80 ml de salina y, finalmente, 200 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4%).



Figura 16. Fotografías de la fijación por perfusión intracardíaca. Se observa, en detalle, el posicionamiento de un ratón heterocigota, la exposición del corazón y la canulación del ventrículo izquierdo.

Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina, el encéfalo se disecó cuidadosamente (**Fig. 17**) y se dejó en solución fijadora durante toda la

noche. Al día siguiente los cerebros se transfirieron a una solución criopreservadora (sacarosa 30%, polivinilpirrolidona 1%, etilenglicol 30%, buffer fosfato 1M 1%), se mantuvieron en ella durante un mínimo de 24 hs a 4°C y luego se guardaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

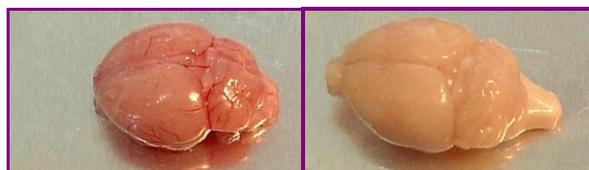


Figura 17. Fotografía de dos cerebros de ratones *nude*. El cerebro de la izquierda no está perfundido. En el cerebro de la derecha, que se ha perfundido, puede apreciarse la carencia de sangre, por el lavado, y al aspecto de firmeza del tejido, por la fijación del mismo.

3.9 ENSAYOS HORMONALES

3.9.1 INMUNOENSAYOS.

En el EXP-1 de terapia génica neonatal en *nude* se midieron los niveles séricos de LH y FSH por radioinmunoensayo (RIA) usando materiales provistos por el Dr. A. F. Parlow, del Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA Med. Center, U.S.A. Las concentraciones de LH y FSH se expresaron según LH RP-2 de ratón y FSH RP-2 de rata, respectivamente.

En el EXP-2 de terapia génica neonatal en *nude* se midieron los niveles séricos de E₂ y P₄ por medio de RIAs comerciales específicos (Coat-A-Count, DPC, Diagnostic Products Corporation, LA, California, EEUU).

3.9.2 DOSAJE DE TIMULINA

3.9.2.1 ELISA

La timulina inmunoreactiva (FTS y FTS-Zn) se determinó por un ELISA (Metreau y col., 1987), con algunas modificaciones. Brevemente, en placas de *low-binding* de 96-pocillos se mezclaron 60 µl de muestra o de FTS sintético (estándar) con 60 µl de anti-FTS (dilución 1/2000, preparado por el Dr. JM Pléau, Hospital Necker, Paris) y se incubó toda la noche a 4°C. La mezcla se transfirió a una placa de ELISA de *high-binding* recubierta con 100 ng de FTS sintético por pocillo y se

incubó a 37°C durante 1 hora. Luego, se lavaron los pocillos con PBST (buffer fosfato salino con 0.1% triton X-100).

La cantidad de anticuerpo anti-FTS unido a la fase sólida se determinó por colorimetría usando un kit ABC (Universal ABC *elite*® kit, Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA, EEUU), empleando el sustrato de la peroxidasa ABTS para el desarrollo del color. La sensibilidad de este método es de 300 pg FTS/ml.

3.9.2.2 Bioensayo para timulina

El bioensayo se basa en la propiedad de la timulina de aumentar la capacidad de la azatioprina para inhibir la formación de rosetas (**Fig. 18**) de glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón timentomizado (Dardenne y Bach, 1975). Por lo tanto, a mayor cantidad de timulina activa presente en la muestra mayor cantidad de diluciones serán necesarias para observar formación de rosetas. La actividad inhibitoria de las muestras se compara con una curva estándar de concentraciones conocidas de timulina sintética. Dicho método es el único con la sensibilidad suficiente para detectar los niveles de timulina que existen en la sangre, del orden de los fg/ml.

Este bioensayo se utilizó en el presente trabajo para medir los niveles de timulina biológicamente activa (FTS-Zn), expresados en fg/ml de muestra, presentes en sueros y en lisados y sobrenadantes celulares.



Figura 18. Microfotografía de una roseta en la cámara de Neubauer. La flecha señala una roseta formada por glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón TX. Obj X45.

Brevemente, la curva estándar de timulina se realizó con timulina sintética (donada por el Dr. Peter Heinklein, Humboldt University, Berlin) con los siguientes puntos: 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 fg/ml. Trabajando en todo momento en frío se

filtraron las muestras (sueros, sobrenadantes o lisados) a través de membranas de 30 kDa cut-off (YMT micropartition system, PMS-I Amicon Corporation, Denver, EEUU), durante 10 min. a 3.000 rpm a 4°C. Luego, se realizaron diluciones seriadas de las mismas; por ejemplo, si correspondían a sueros de animales TX o *nude* se usaron las siguientes diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64. Para animales tratados (con RAd-FTS) se usaron las siguientes diluciones: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024. Cuando fue necesario se realizaron más diluciones.

Procedimiento: Se obtienen esplenocitos de ratón C57 TX mediante la homogenización del bazo en frío. El homogenato se diluye con RPMI-1640 a aprox. 40×10^6 linf/ml. La concentración de 10-20 $\mu\text{g/ml}$ inhibe el 50% de la formación de rosetas en sueros de ratones TX.

Se cargan tubos de Kahn con 50 μl de cada dilución de la muestra o curva estándar, 50 μl azatioprina (20 $\mu\text{g/ml}$) y 50 μl del homogenato de linfocitos. Se agitan los tubos horizontalmente y se incuban en estufa a 37°C durante 75 a 90 min. A esta mezcla se le adiciona 50 μl de glóbulos rojos de carnero (solución estabilizada) y se centrifuga durante 5 min. a 1.200 rpm a 4°C. Se resuspende el pellet en una rueda agitadora y se cargan cámaras de Neubauer para contar las rosetas formadas.

Una roseta está constituida por un linfocito con por lo menos 3 eritrocitos adheridos a él (**Fig. 19**). Cuando en toda la cámara se cuentan de 1 a 3 rosetas se considera inhibición. Si se cuentan 5 o 6 rosetas, se considera ausencia de inhibición y la concentración de timulina se toma como la última dilución donde se observa inhibición.

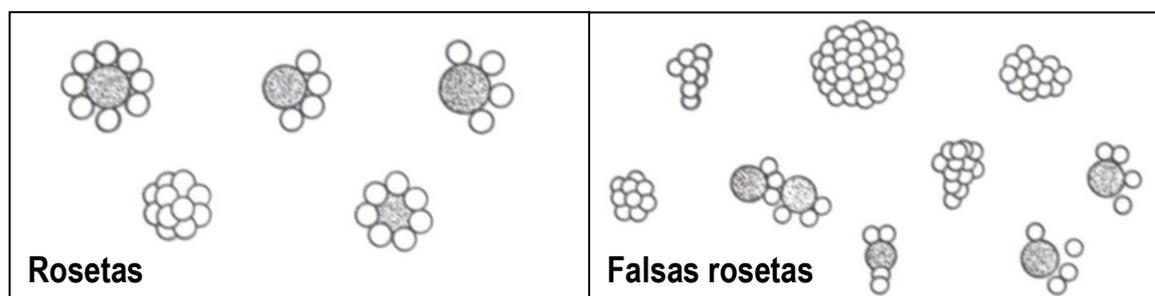


Figura 19. Esquema de las rosetas en sus distintas variedades (panel izquierdo) y otras agrupaciones que no se consideran rosetas (panel derecho). Modificado de Dardenne y Bach, 1975.

3.10 PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS

En el EXP-2 de terapia génica neonatal con timulina, el día del sacrificio (71 días de edad), el 60% de los animales se perfundió y se les extrajo el cerebro, los ovarios y el útero.

Los cerebros se cortaron en su totalidad con un micrótopo Leitz 1320 (Wetzlar, Alemania) de congelación que utiliza nieve carbónica (CO₂; -70 °C), recogándose las secciones en una placa plástica de 6-pocillos en grupos de cortes no contiguos en 0,01 M buffer fosfato salino (PBS). En este procedimiento se recogieron los cortes coronales, de 30 µm de espesor, de manera seriada en 4 pocillos. Las secciones fueron procesadas para inmunofluorescencia de fibras y neuronas GnRH. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal, dilución anti-GnRH 1/3.000 (donado por el Dr. G. Zuccollili, Instituto de Anatomía, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP) y, como anticuerpo secundario, el Alexa 488 anti-Fc de ratón (Alexa Fluor®, Invitrogen, Oregon, EEUU) diluido 1/300 en PBST. Finalmente, los cortes fueron rehidratados con agua destilada y montados con Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EEUU). Las secciones coronales montadas se observaron mediante un microscopio de alta performance para microscopía de luz blanca y de fluorescencia (Olympus BX51, Tokio, Japón), y se realizaron conteos manuales de células nucleadas GnRH positivas con un aumento de X40. Para dicho conteo el cerebro fue subdividido en dos bloques, uno anterior que incluye el órgano vasculoso (o.v.), y otro posterior, que comienza después del o.v. En los grupos de animales tratados, se determinó el número de neuronas totales GnRH positivas estimadas multiplicando por 4 el número de neuronas contadas. Se determinó el porcentaje de neuronas cuantificadas por bloque a partir del valor de neuronas totales estimadas.

Los ovarios y úteros fueron incluidos en parafina y cortados con micrótopo obteniéndose secciones seriales que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Se determinó el número de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos, y de cuerpos lúteos. En los úteros se midió la altura del epitelio.

Las microfotografías de las secciones de cerebro, ovarios y útero se obtuvieron por medio de la cámara digital DP70 anexada a un microscopio Olympus BX51.

Las imágenes fueron analizadas por medio del programa Image Pro Plus, versión 4.5 (Media Cybernetics Inc., MD, EEUU).

Las hipófisis se obtuvieron de los animales hembras que recibieron la terapia génica neonatal con timulina y que fueron sacrificadas por decapitación. Estas hipófisis fueron rápidamente fijadas en líquido Bouin (85% v/v de solución saturada de ácido pícrico, 10% v/v de Formol 40% y 5% v/v de ácido acético glacial) durante 4 horas. Luego se dejaron en alcohol 70% hasta su procesamiento. Se las incluyó en paraplast y se cortaron con un micrótopo Reichert-Jung 2040 (R Jung GmbH, Heidelberg, Alemania). Se efectuaron cortes histológicos seriados de 4 μ m de espesor en los diferentes niveles de la glándula pituitaria (ventral, medio y dorsal). Las secciones fueron procesadas por inmunohistoquímica para gonadotropinas; se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos primarios contra LH y FSH (ratón, Dako, CA) a una dilución 1/100. Luego, las secciones fueron lavadas y tratadas durante 30 min con un sistema de reacción EnVision (Dako, CA, EEUU) usando como revelador la diaminobencidina (DAB). Se determinó la densidad (DC) y el tamaño (TC) de las células gonadotropas. Para ello se utilizó el sistema de análisis de imágenes Imaging Technology y el software Optimas 5.2 (Cónsole y col., 1999).

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en el presente trabajo se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre grupos experimentales se realizaron por el test-*t* de Student o por ANOVA seguido por el test de Turkey cuando el ANOVA fue significativo. Se consideraron diferencias significativas a valores de $P < 0,05$ y marginalmente significativos a valores entre de $P > 0,05$ y $P < 0,15$. Los símbolos que se utilizaron, son los siguientes: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$).

4. RESULTADOS

4.1 DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN NO VIRALES PARA TIMULINA

4.1.1 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIOTA pcDNA-*met*FTS

4.1.1.1 Experimentos *in vitro*

4.1.1.1.1 Transfección de líneas celulares con el pcDNA-*met*FTS.

La secuencia sintética de ADN codificante para un análogo biológicamente activo de timulina (*met*FTS), fue diseñada, construida e insertada en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1(+), como se describió en M&M (ver 3.2.1). Luego, células en cultivo, HEK293 y BHK, fueron transfectadas con dicho vector (**Fig. 20**) para evaluar la funcionalidad del plásmido construido y, al mismo tiempo, para verificar si nuestro gen sintético expresaba un péptido con actividad biológica de timulina. Se obtuvieron niveles significativamente elevados de timulina bioactiva, medida el bioensayo, y de timulina inmunoreactiva, medida un ELISA, tanto en los sobrenadantes como en los lisados de dichas líneas celulares respecto de las células transfectadas con el pcDNA3.1(+) (**Fig. 21**).

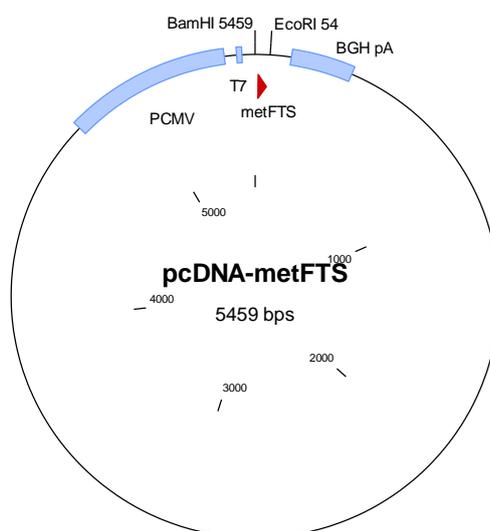


Figura 20. Mapa del vector pcDNA-*met*FTS que expresa el gen sintético de la timulina (*met*FTS). El clonado de la secuencia *met*FTS se realizó mediante la digestión con las enzimas de restricción (BamHI y EcoRI) en el MCS del plásmido eucariota pcDNA3.1(+). PCMV, promotor del citomegalovirus; T7, promotor del fago T7 (sitio de priming); BGH pA, secuencia de poliadenilación (señal de polyA del gen de la GH bovina).

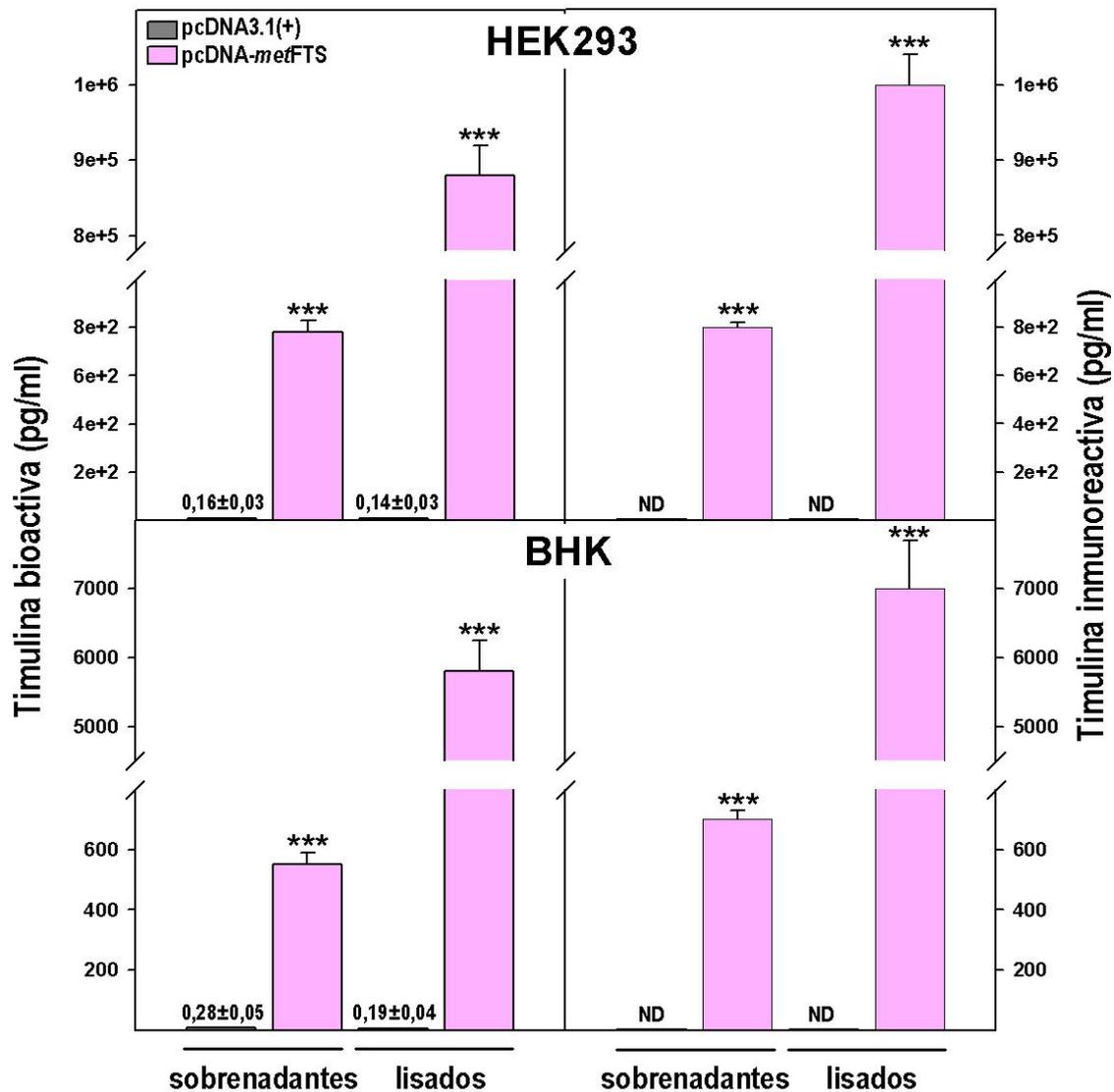


Figura 21. Actividad de timulina bioactiva e inmunoreactiva presente en células transfectadas con el pcDNA-*metFTS* o pcDNA3.1(+). Los niveles de timulina en sobrenadantes y lisados de células HEK293 y BHK transfectadas con el pcDNA-*metFTS* o pcDNA3.1(+) se midieron por el bioensayo de rosetas (panel izquierdo) y por ELISA (panel derecho). El bioensayo detecta el FTS-Zn, mientras que el ELISA detecta el FTS y el FTS-Zn. Las barras de error corresponden al SEM; *** P<0,001 (pcDNA-*metFTS* vs. pcDNA3.1(+)); N=3 en todos los casos.

4.1.1.1.2 Inmunoneutralización *in vitro* de timulina con anticuerpo anti-FTS.

Este experimento se realizó para asegurar que la bioactividad de timulina detectada en los lisados de células HEK293 transfectadas con el pcDNA-*metFTS* (lisados 293+pcDNA-*metFTS*) provenía del producto de nuestro gen sintético y no de algún artefacto experimental. Se observó una completa inmunoneutralización de la actividad de timulina presente en estos lisados por el Ac. policlonal anti-FTS

de conejo (**Tabla 3**). Como control negativo se utilizó un Ac. de conejo anti-KLH (ver M&M, 3.6.1), que como se esperaba, no tuvo efecto neutralizante de la actividad biológica de los lisados.

Tabla 3. Inmunoneutralización de la bioactividad de timulina presente en lisados de células HEK293 transfectadas con el pcDNA-*met*FTS.

Incubación de lisados 293+pcDNA- <i>met</i> FTS con:	Valor de timulina (fg/ml)	
	previo a la incubación	después de la incubación
anti-FTS (N=3)	2.500 [†]	2 ± 1
anti-KLH (N=3)	2.500 [†]	2.500

[†] El nivel de timulina bioactiva en lisados 293+pcDNA-*met*FTS fue medido por bioensayo y, luego, diluido de manera tal de obtener una concentración final de timulina de 2.500 (fg/ml). Lisados con dicha concentración de timulina fueron los utilizados en la mezcla de incubación con el correspondiente anticuerpo.

4.1.1.2 Experimentos *in vivo*

4.1.1.2.1 Actividad biológica en el suero de ratones TX luego de la inyección de lisados de células 293 transfectados con pcDNA-*met*FTS.

Este experimento contribuyó a la caracterización de los lisados 293+pcDNA-*met*FTS; el mismo se realizó para confirmar que la actividad de timulina presente en dichos lisados se mantenía *in vivo*. Luego de la inyección i.p. de lisados 293+pcDNA-*met*FTS en ratones Tx se detectaron niveles significativamente superiores ($P < 0,05$) de timulina sérica respecto de las contrapartes que recibieron lisados 293+pcDNA3.1(+). En relación con los niveles basales de timulina sérica de ratones jóvenes intactos (80 ± 16 fg/ml (N=3)), los valores de timulina observados en los animales que recibieron lisados 293+pcDNA-*met*FTS fueron suprafisiológicos. Además, cuando se administró Cl_2Zn ($1,86 \mu\text{M}$ concentración final) junto con los lisados 293+pcDNA-*met*FTS la bioactividad de timulina medida en el suero fue significativamente mayor ($P < 0,01$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Timulina sérica en ratones TX luego de la inyección de lisados de células HEK293 transfectadas con el pcDNA3.1(+) o el pcDNA-*met*FTS.

La timulina en suero se midió por bioensayo y se expresó como la media \pm SEM. N=3 en cada grupo ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Inyección de:	Timulina sérica (fg/ml)
Lisado sin plásmido	$2,6 \pm 0,6$
Lisado pcDNA3.1(+)	$2,6 \pm 0,6$
Lisado pcDNA- <i>met</i> FTS	$150 \pm 50^*$
Lisado pcDNA- <i>met</i> FTS + Cl_2Zn	$830 \pm 160^{**}$

4.1.2 VECTOR DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICO *pmetFTS-hMGFP*

4.1.2.1 Transfección de líneas celulares con el *pmetFTS-hMGFP*.

Con el objeto de determinar el targeting de *metFTS*, la secuencia sintética *metFTS* (variante sin codones de terminación) se insertó, como se detalla en M&M (3.2.2), en el vector comercial *phMGFP* que expresa la proteína monster fluorescente verde humanizada (*hMGFP*). De este proceso resultó el vector *pmetFTS-hMGFP* (**Fig. 22**) el cual se empleó para determinar el targeting de la proteína de fusión *metFTS-hMGFP*.

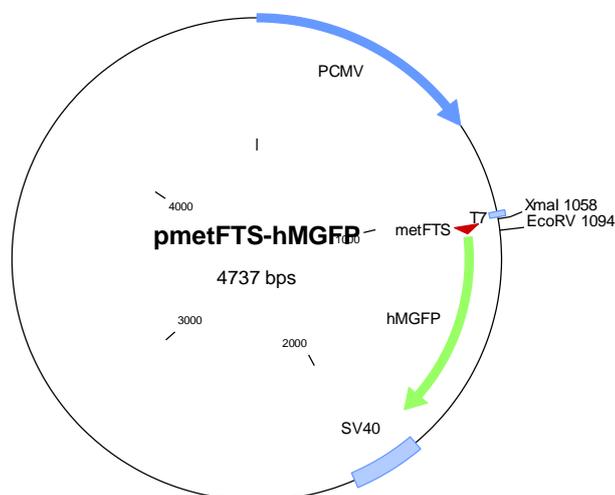


Figura 22. Mapa del vector *pmetFTS-hMGFP* que expresa el gen híbrido *metFTS-hMGFP*. El clonado de la secuencia *metFTS* (carente de los dos codones de terminación) se realizó mediante la digestión con las enzimas de restricción (*XmaI* y *EcoRV*) en el MCS del plásmido *phMGFP*. PCMV, promotor del citomagalovirus; T7, promotor del fago T7; SV40, secuencia de poliadenilación.

La transfección de las líneas celulares HEK293 y BHK con *pmetFTS-hMGFP* reveló una elevada fluorescencia en el citoplasma y una fluorescencia aún más intensa en el núcleo de las células transfectadas (**Fig. 23**) debida, probablemente, al mayor grosor de los núcleos respecto del citoplasma circundante.

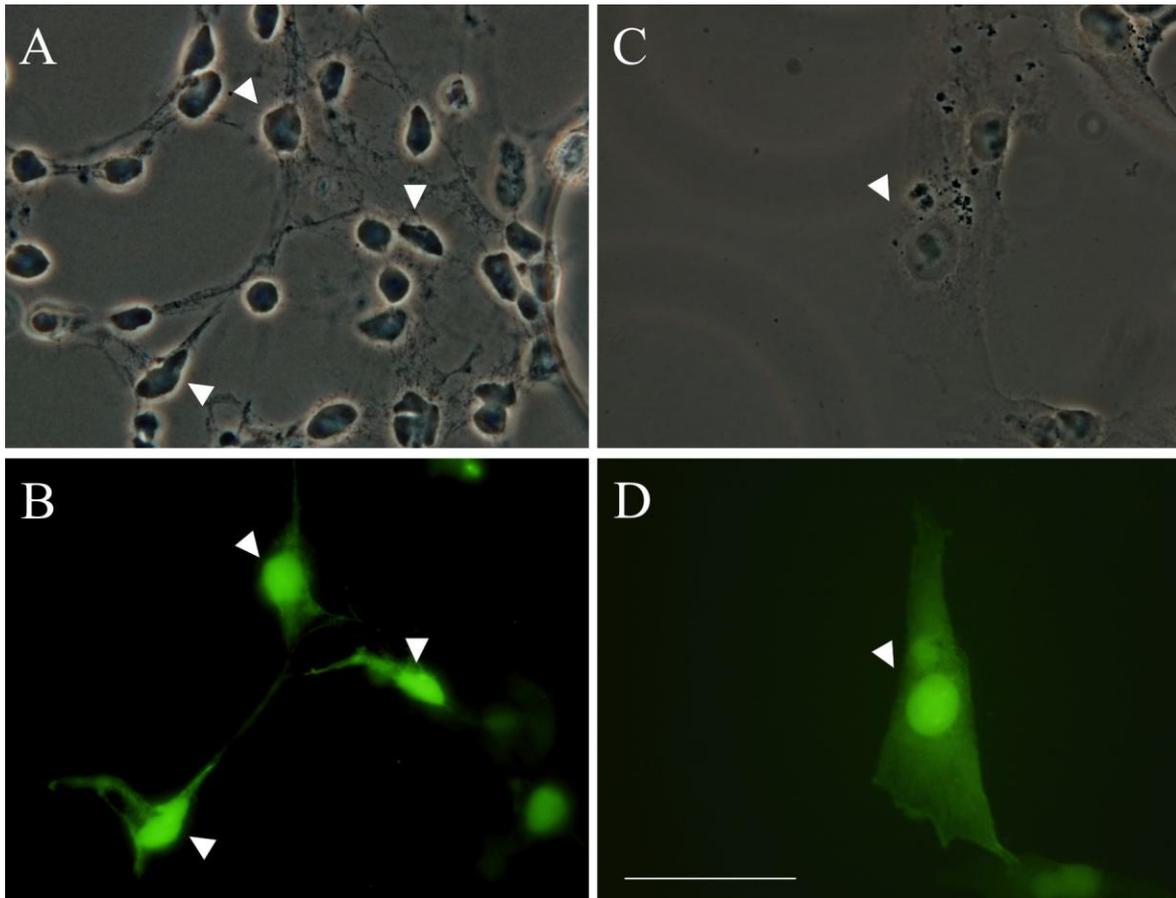


Figura 23. Localización pancelular de *metFTS*-hMGFP. Microfotografías de cultivos de células HEK293 (A y B) y BHK (C y D) transfectadas con el *pmetFTS*-hMGFP, en contraste de fase (A y C) y con fluorescencia de la correspondiente imagen en fase (B y D). Las células señaladas (▷) expresan la proteína de fusión. Barra= 50 μ m.

4.2 DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN SINTÉTICO DE LA TIMULINA

4.2.1 OBTENCIÓN DEL RA_d-FTS

El primer paso en la construcción del vector adenoviral que expresara *metFTS*, fue generar la tercera variante del oligo dc (**Fig. 24**) y clonarla en el vector lanzadera (shuttle) pCD515. A la secuencia básica *metFTS* se le agregó en el extremo 5' el sitio del promotor de T7 para permitir la secuenciación del plásmido pDC515-*metFTS*. Este plásmido (**Fig. 25**) se cotransfectó con el plásmido

genómico en células 293 obteniéndose el RAd-FTS (ver 3.3.2 para mayores detalles), que fue subsecuentemente purificado en gradiente de CsCl (**Fig. 26**).

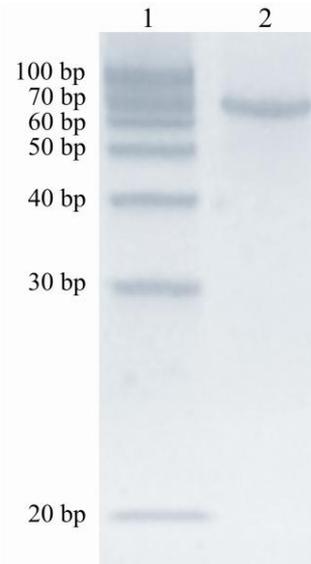


Figura 24. Fragmento de ADN dc sintético que codifica para *met*FTS. El oligo dc se obtuvo por annealing y se sembró en un gel de poliacrilamida al 20% (PAGE) para su verificación. En la calle 1 se observa el patrón de bandas del estándar de ADN (100 bp); en la calle 2 se observa una banda de 66 bp que corresponde al gen sintético *met*FTS.

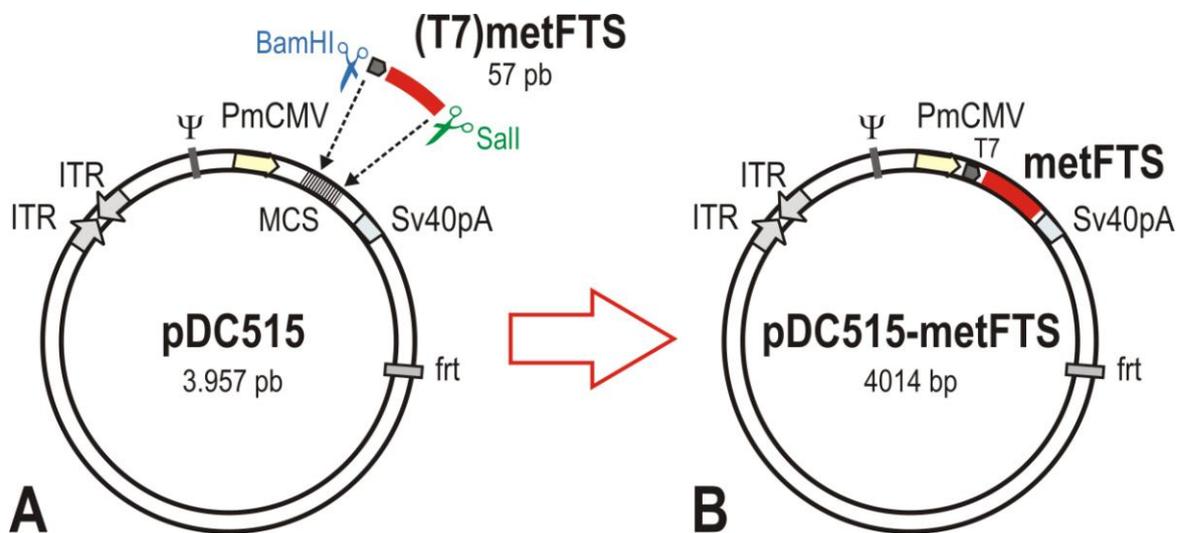


Figura 25. Esquema de la construcción del pDC515-*met*FTS. El clonado de la secuencia (T7)*met*FTS se realizó mediante su digestión con las enzimas de restricción (BamHI y Sall) en el MCS del plásmido shuttle pDC515 (A). De este proceso resulta el plásmido pDC515-*met*FTS que expresa el gen sintético de la timulina (B). PmCMV: promotor del citomagalovirus murino; SV40: señal de poliadenilación; ψ: señal de encapsidación; ITR: repeticiones terminales invertidas; ΔE1, E3: deleciones E1, E3; frt: sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa.

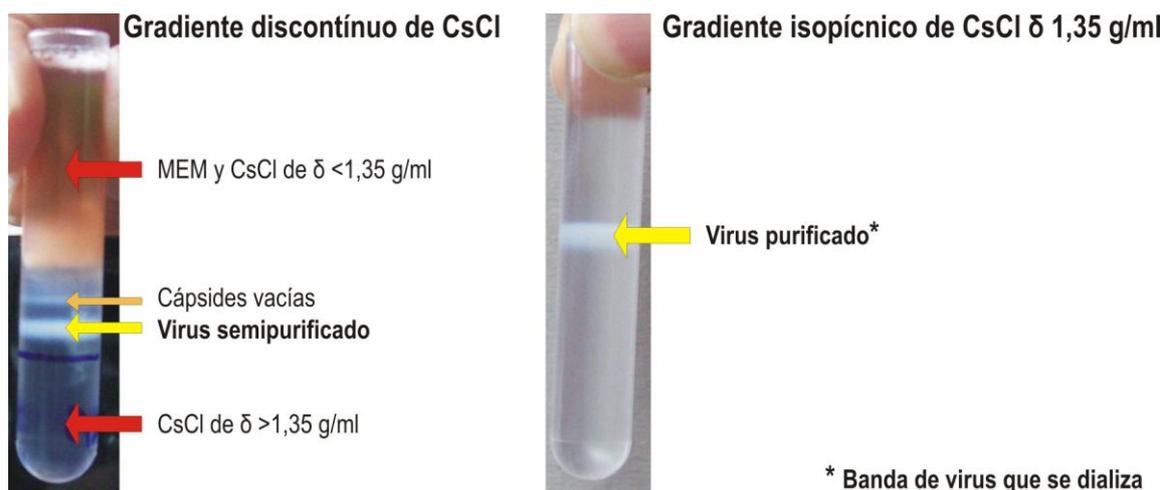


Figura 26. Fotografías de los gradientes de CsCl obtenidos en el proceso de purificación del RAd-FTS. A la izquierda se observa el gradiente discontinuo de CsCl resultado de la primera ultracentrifugación. En dicho gradiente, se localiza la banda que corresponde al virus semipurificado en la densidad de 1,35g/ml. Por encima de la banda de virus semipurificado se distingue una banda de menor grosor y densidad que corresponde a cápsides vacías (Precious y Russell, 1985). A la derecha se observa el gradiente isopícnico de CsCl ($\delta=1,35\text{g/ml}$) resultado de la segunda ultracentrifugación. En este gradiente, se destaca una gruesa banda que corresponde al virus en purificación, dicha banda se recoge por pipeteo y se dializa para completar el proceso de purificación del RAd-FTS.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL RAd-FTS

4.2.2.1 Experimentos *in vitro*

4.2.2.1.1 Incubación de cultivos celulares con el RAd-FTS.

Con el fin de determinar si el RAd-FTS expresaba timulina recombinante bioactiva se incubaron células HEK293 y BHK (que no producen timulina) con el vector RAd-FTS o el RAd- β gal (control negativo). Se detectaron niveles elevados de timulina bioactiva en los sobrenadantes y lisados de dichas líneas celulares transducidas con el RAd-FTS pero sólo trazas (probable fondo) en las células incubadas con el vector control (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de timulina en células HEK293 y BHK transducidas con el RAd-FTS. La actividad de timulina en los lisados y sobrenadantes se midió por bioensayo y se expresa como la media \pm SEM. N=3 en cada grupo.

Timulina (pg/ml)	Cultivos celulares + vector		
	293 + RAd-FTS	BHK + RAd-FTS	293/BHK + RAd- β gal
Sobrenadantes	267 \pm 53	133 \pm 27	0,6 \pm 0,02
Lisados	1.066 \pm 213	533 \pm 107	0,7 \pm 0,02

4.2.2.1.2 Incubación de células TEC con el RAd-FTS.

Se incubaron células productoras de timulina, rTEC (células epiteliales tímicas de rata) y hTEC (células epiteliales tímicas de feto humano), con $2,5 \times 10^{10}$ y $2,5 \times 10^9$ pfu/pocillo del RAd-FTS. Dichos cultivos celulares se tiñeron con DAPI para evaluar la morfología y estimar la viabilidad de las células transducidas por el RAd-FTS, determinando de este modo si los elevados niveles de timulina recombinante ejercían un efecto citotóxico detectable por este método. No se observaron diferencias entre los cultivos que recibieron el RAd-FTS y las células intactas (sin vector). Es decir, en la monocapa de ambas líneas celulares transducidas con nuestro vector no se detectó un incremento de núcleos alterados ni apoptóticos respecto a los controles (Fig. 27).

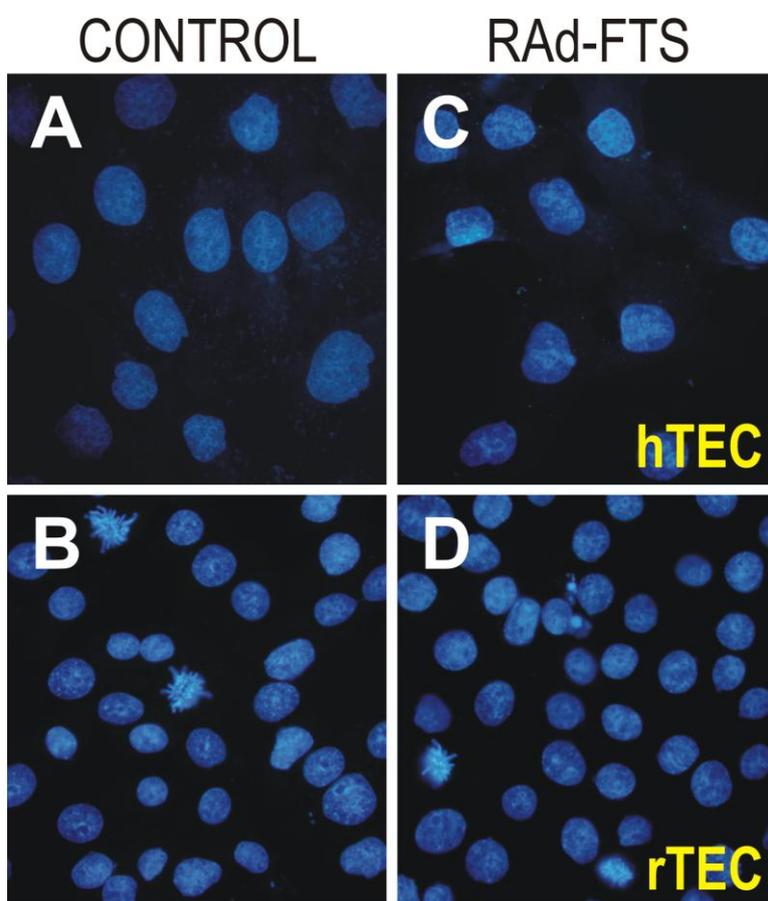


Figura 27. Incubación de cultivos de células TEC con el RAd-FTS. Microfotografías de cultivos de células hTEC (A y C) y rTEC (B y D) transducidas con $2,5 \times 10^{10}$ pfu/pocillo del RAd-FTS (C y D) o células intactas (A y B). Se observan núcleos celulares marcados con DAPI en los cultivos transducidos con el vector similares a los marcados en los cultivos sin tratamiento. Objetivo X40.

4.2.2.2 Experimentos *in vivo*

4.2.2.2.1 Terapia Génica con Timulina en Ratones TX: Expresión prolongada de los niveles séricos de Timulina. Con el propósito de caracterizar la expresión *in vivo* de nuestro RAd-FTS, el mismo se administró a ratones C57BL/6 adultos timectomizados (que poseen niveles de timulina no-detectables). En este experimento se observó que los animales inyectados i.m. con el RAd-FTS poseían niveles suprafisiológicos de timulina, a partir del día 15 post-inyección, que se mantuvieron al menos 110 días (**Fig 28**). Los animales TX inyectados con el RAd-βgal no mostraron niveles de timulina sérica detectables.

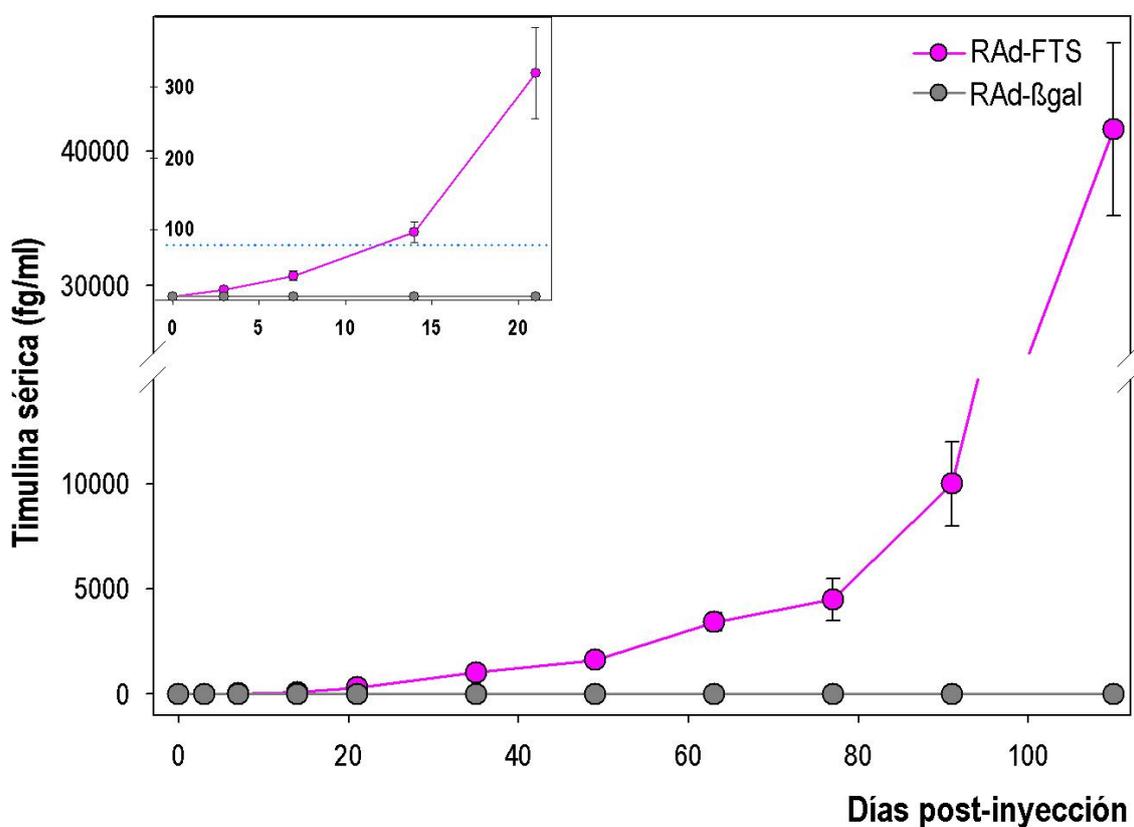


Figura 28. Expresión de timulina sérica en ratones TX inyectados con el RAd-FTS. Los animales recibieron una única inyección i.m. de 5×10^{07} pfu de RAd-FTS (círculos rosas) o de RAd-βgal (círculos grises). **Inset:** Amplificación del gráfico entre los días 0 a 21; la línea de puntos (azul) representa los niveles de timulina en ratones intactos. Los datos se expresan como la media \pm SEM (N=4), el N utilizado en todo el experimento fue de 60.

4.2.2.2.2 Terapia Génica con Timulina en Ratones TX: Restauración a largo plazo de los niveles de Timulina sérica. Con el fin de caracterizar la duración de la expresión *in vivo* de nuestro RAd-FTS, el mismo se administró a ratas adultas (9 meses) timectomizadas. Los animales TX que fueron inyectados i.m. con el RAd-

FTS mostraron niveles suprafisiológicos de timulina durante aproximadamente 400 días (**Fig 29**). Los animales TX inyectados con el RAd-βgal no mostraron niveles de timulina sérica detectables.

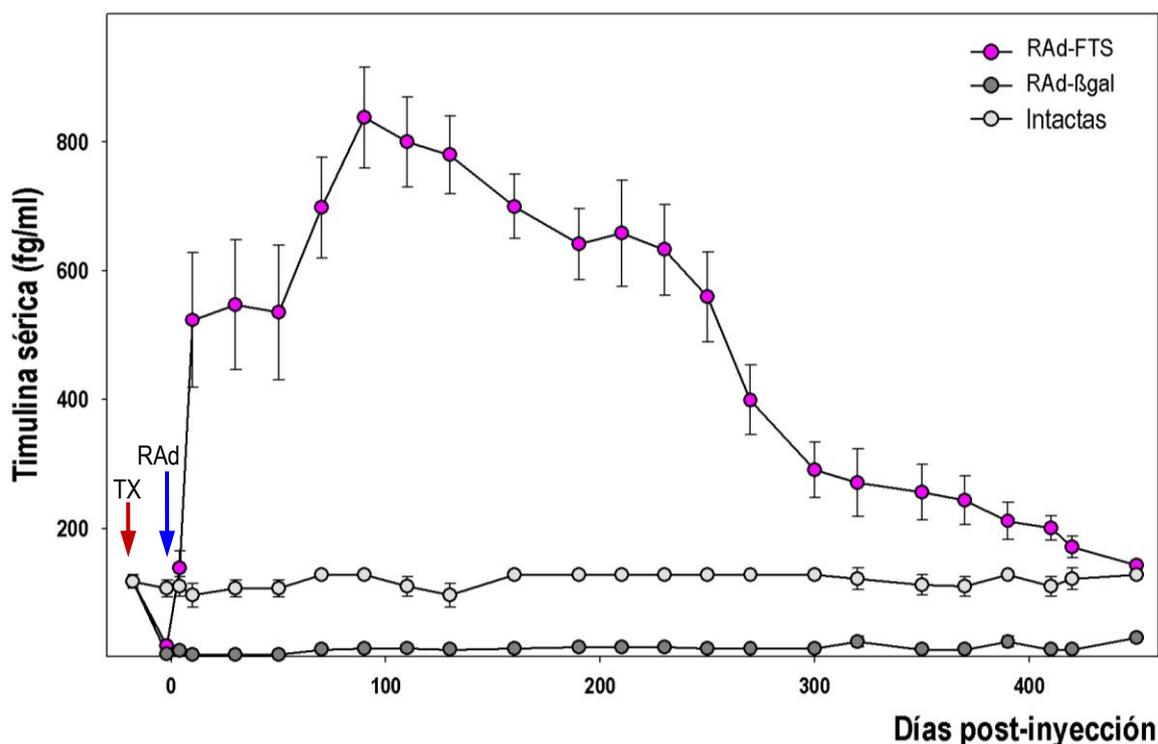


Figura 29. Expresión de timulina sérica en ratas TX inyectadas con el RAd-FTS.

Se dosaron los niveles de timulina circulante en ratas intactas (círculos grises claros) y en las ratas que recibieron una única inyección i.m. de 1×10^9 pfu de RAd-FTS (círculos rosas) o de RAd-βgal (círculos grises oscuros). La flecha roja (día -20) señala el día de la timectomía. La flecha azul (día 0) señala el día de la administración de los RAd. Los datos se expresan como la media \pm SEM (N=10).

Con el propósito de evaluar su estado de salud durante el experimento, los animales fueron monitoreados periódicamente observándose su peso corporal, su comportamiento y su ciclo estral. Las ratas hembras expuestas a elevados niveles circulantes de timulina mostraron un peso corporal comparable al de sus contrapartes inyectadas con RAd-βgal y al de los animales intactos; a modo de representación de la similitud de los pesos tomados durante todo el experimento se graficaron los datos del día del sacrificio (**Fig 30**). No se observó ninguna alteración evidente en el comportamiento de los animales inyectados con el RAd-FTS respecto de los animales controles. Con relación a la ciclicidad, los tres grupos de animales utilizados se encontraban mayoritariamente en estro; esto

sugiere que el tratamiento no afectó el ciclo, ya que las ratas intactas tienden con la edad a entrar en un estro constante. Respecto a las ratas TX inyectadas con el RAd-FTS, se observó que el porcentaje de tiempo que pasaron en los diferentes estadios estrales fue similar al de las ratas intactas (**Fig 31**).

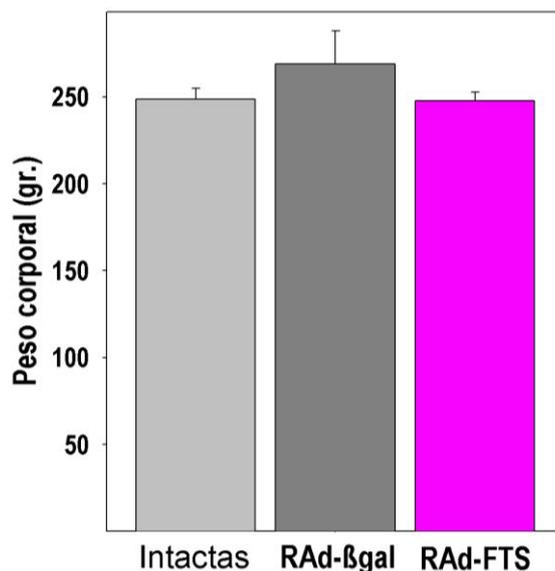


Figura 30. Peso corporal de ratas TX inyectadas con el RAd-FTS en el día del sacrificio. Se pesaron las ratas intactas (barra gris claro) y las ratas que recibieron una única inyección i.m. de 1×10^9 pfu de RAd-βgal (barra gris oscuro) o de RAd-FTS (barra rosa). Los datos se expresan como la media \pm SEM (N=10).

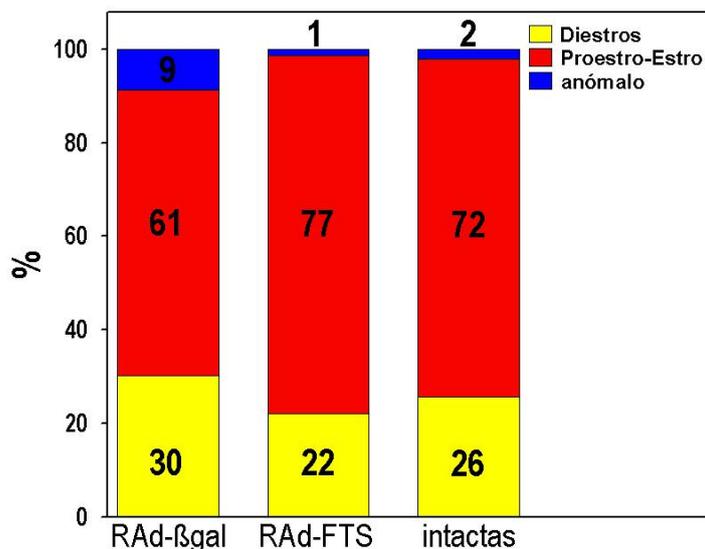


Figura 31. Porcentajes de tiempo que las ratas TX inyectadas con el RAd-FTS y las ratas controles pasaron en diferentes estadios estrales. Se tomó el extendido vaginal en 44 días y, para obtener las relaciones porcentuales, se dividieron en proestro-estro (rojo), diestro 1 y 2 (amarillo) y los anómalos-indefinidos (azul).

4.3 TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON TIMULINA (TGNT)

4.3.1 EFECTO RESTAURATIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RAd-FTS SOBRE LA TIMULINA SÉRICA DE LOS RATONES *NUDE*.

Una única inyección i.m. de 1×10^8 pfu de RAd-FTS incrementó significativamente los niveles circulantes de timulina biológicamente activa, tanto en los ratones heterocigotas como en los homocigotas *nude* testeados a los 51-52 días de edad en el EXP-1 y a los 71 días de edad en el EXP-2. Este efecto no se observó cuando se inyectó el RAd-(GFP/TK)_{fus} (vector control). En ambos experimentos, a los 13 días de edad los ratones *nu/nu* tratados con el RAd-FTS alcanzaron niveles de timulina sérica comparables a aquellos de la contraparte *nu/+* controles (**Fig. 32**).

4.3.2 LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA NEONATAL PREVIENE EL DÉFICIT DE LH Y FSH EN *NUDE* ADULTOS.

Una única inyección neonatal i.m. de RAd-FTS previno significativamente el desarrollo de hipogonadotropinemia en *nude* postpuberales e indujo niveles séricos suprafisiológicos de LH y FSH. Ninguno de estos efectos se observaron cuando se inyectó el RAd-(GFP/TK)_{fus} (**Fig. 33**).

4.3.3 EFECTO DE TGNT SOBRE EL PESO CORPORAL DE LOS RATONES *NUDE*.

Como era de esperarse, los ratones atímicos presentaron un peso corporal significativamente inferior al de sus contrapartes heterocigotas, tanto a los 13 días como al momento del sacrificio. La inyección neonatal i.m. del RAd-FTS produjo un leve aumento (no significativo) en el peso de los ratones *nude* de 51 días respecto de los *nude* inyectados con el RAd-(GFP/TK)_{fus} (**Fig. 34**), mientras que a los 13 días no se observó ninguna modificación en el peso corporal de los animales tratados con el RAd-FTS respecto de los tratados con el RAd-(GFP/TK)_{fus}.

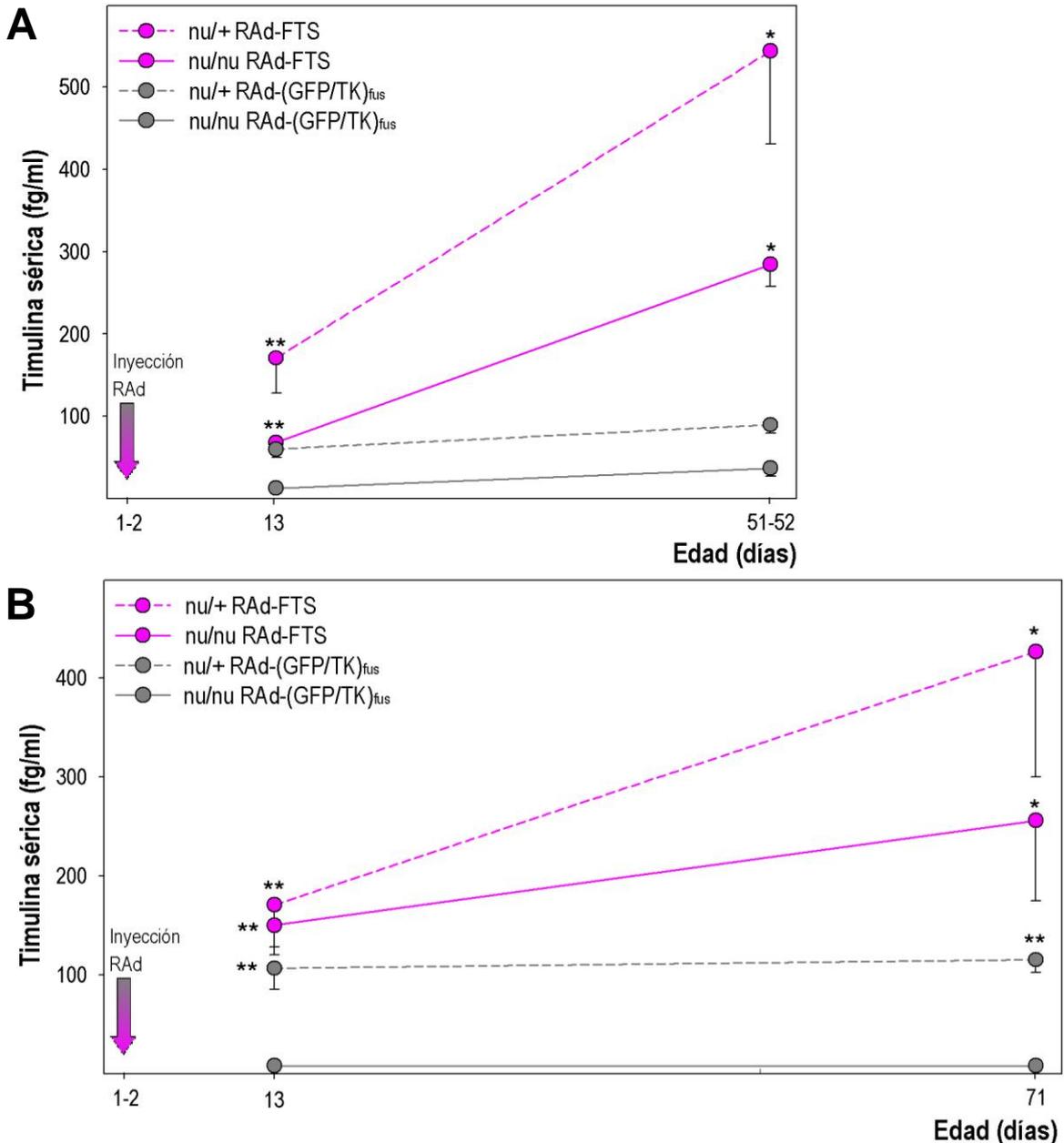


Figura 32. Efecto de la terapia génica neonatal con timulina sobre los niveles séricos de timulina en ratones heterocigotas y homocigotas *nude*. En ambos experimentos, los vectores adenovirales fueron inyectados i.m. en el día del nacimiento o un día después (flecha). Se determinaron los niveles de timulina sérica en el día 13 de edad y en el momento del sacrificio, el día 51-52 de edad en el EXP-1 (A) y el día 71 de edad en el EXP-2 (B). Los valores de timulina sérica (fg/ml) se expresaron como la media \pm SEM (EXP-1: N=64; EXP-2: N=32). Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los ratones heterocigotas inyectados con el RAd-FTS respecto de los que recibieron el RAd-(GFP/TK)_{fus}, y la misma comparación para los homocigotas *nude*. Los datos se expresan como la media \pm SEM. ** P<0,01; * P<0,05.

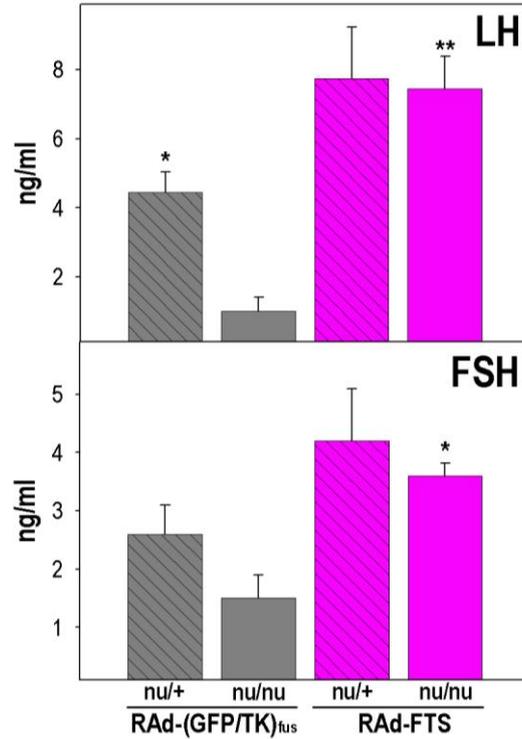


Figura 33. Efecto de la terapia génica neonatal con timulina sobre los niveles séricos de LH y FSH en ratones *nude*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los ratones heterocigotas inyectados con el RAd-FTS respecto de los que recibieron el RAd-(GFP/TK)_{fus}, y la misma comparación se efectúa para los homocigotas *nude*. Los datos se expresan como la media \pm SEM. ** P<0,01; * P<0,05.

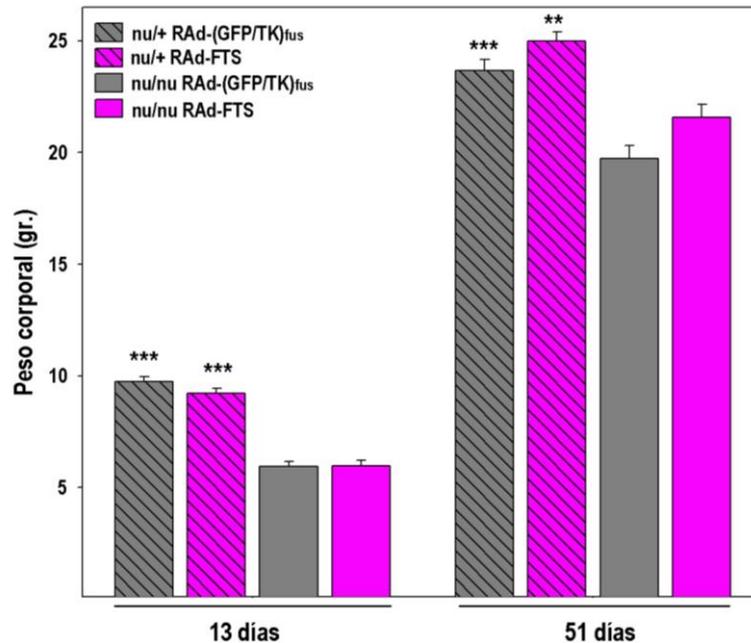


Figura 34. Efecto de la terapia génica neonatal con timulina sobre el peso corporal de ratones heterocigotas y homocigotas *nude*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los ratones heterocigotas inyectados con el RAd-FTS respecto de los que recibieron el RAd-(GFP/TK)_{fus}, y la misma comparación para los homocigotas *nude*. Los datos se expresan como la media \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01.

4.3.4 EFECTO DE LA TGNT SOBRE LAS NEURONAS GnRH.

El número de neuronas GnRH cuantificadas fue marginalmente menor ($P=0,14$) en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas controles. La TGNT en ratones *nude* indujo un incremento marginalmente significativo ($P=0,07$) del número de neuronas GnRH estimadas (**Fig. 35, A**). Con el propósito de observar la distribución espacial de las neuronas GnRH el cerebro se dividió en dos bloques, uno anterior que llegaba hasta el órgano vasculoso (o.v.) inclusive y uno posterior que comenzaba después del o.v. En el porcentaje de neuronas cuantificadas por bloque, se observó un ligero desplazamiento hacia el bloque anterior en los ratones *nude*, experimentales y controles, respecto de los heterocigotas controles (**Fig. 35, B**). La inmunofluorescencia para GnRH reveló cuerpos neuronales de localización anterior y fibras de las neuronas GnRH transcurriendo principalmente a través de la eminencia media del hipotálamo medio basal (**Fig. 36**). Pudo observarse la inmunomarcación de las varicosidades características de las fibras de las neuronas GnRH.

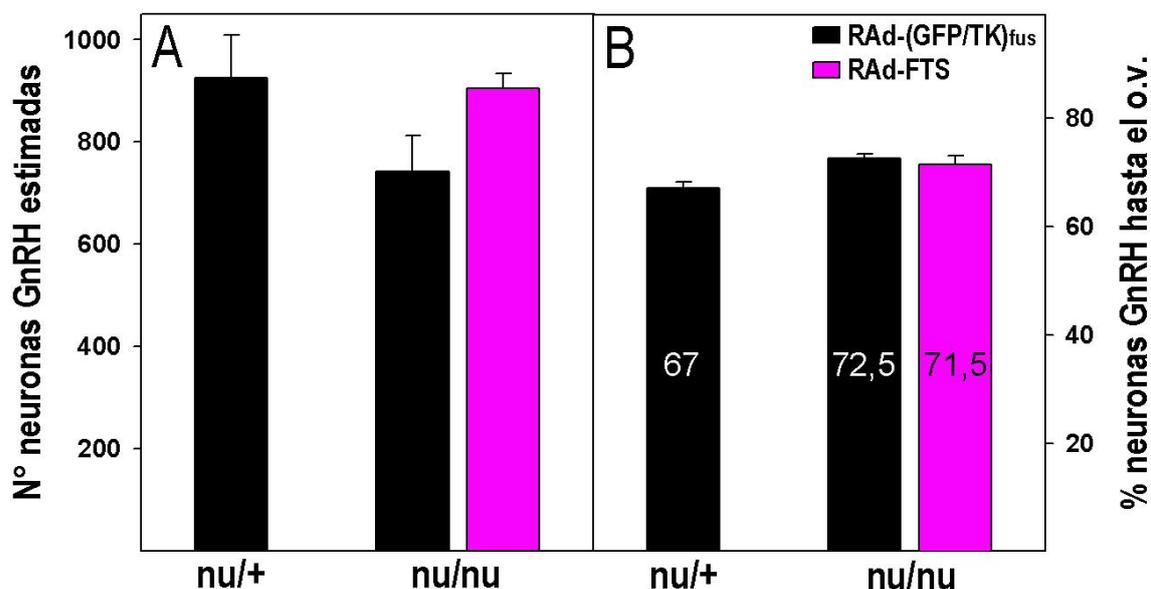


Figura 35. Número de neuronas totales GnRH estimadas en ratones heterocigotas y homocigotas que recibieron TGNT. Cuantificación de las neuronas GnRH de los ratones de 71 días de edad inyectados con RAAd-(GFP/TK)_{fus} (barras negras) o con RAAd-FTS (barra rosa) (**A**). Porcentaje de neuronas contadas en el bloque anterior (**B**), que llega hasta el órgano vasculoso (o.v.) inclusive. Los datos se expresan como la media \pm SEM (N=4).

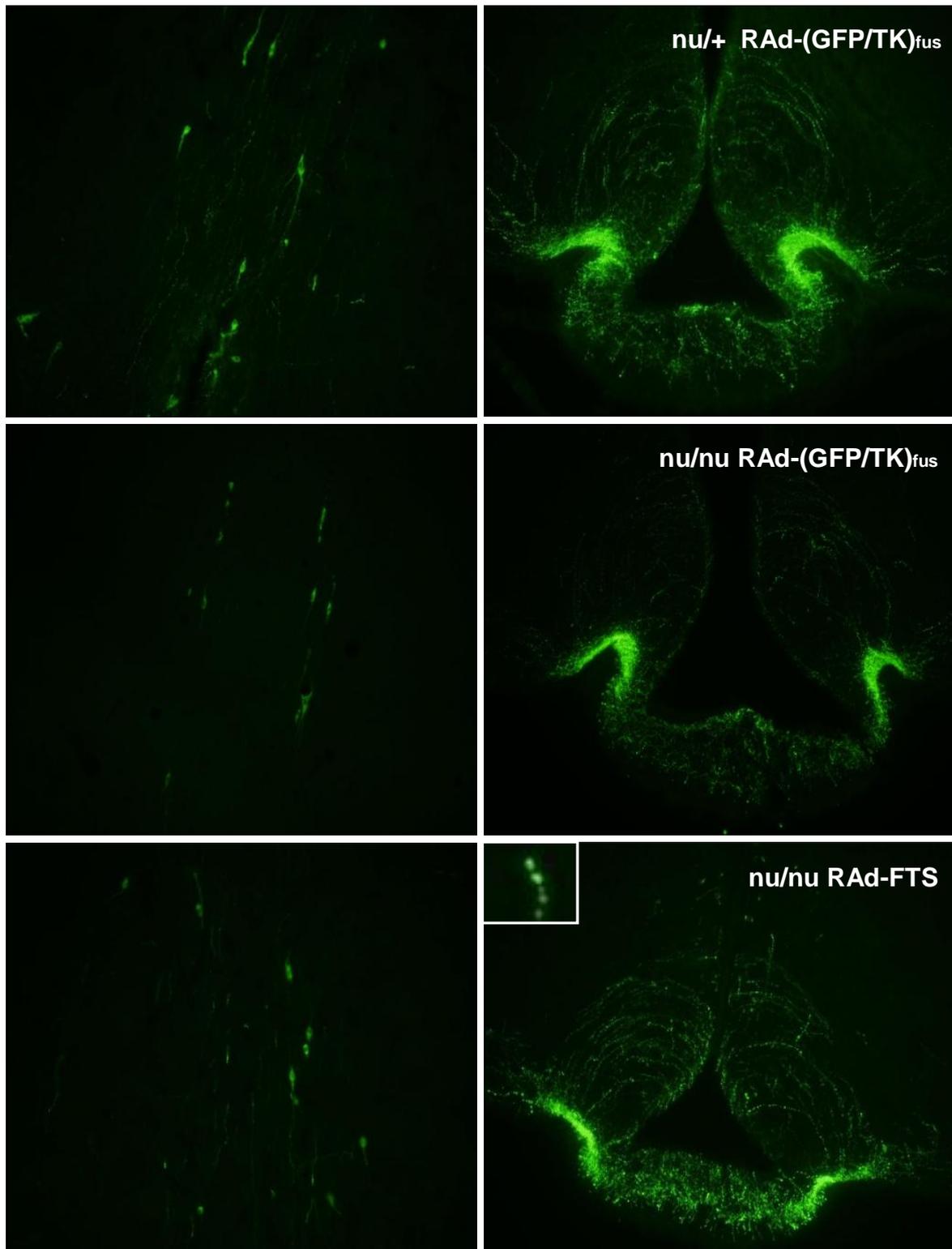


Figura 36. Fotografías de las neuronas GnRH de ratones heterocigotas y homocigotas *nude*. Inmunofluorescencia de neuronas GnRH (panel izquierdo) y sus fibras (panel derecho) en el cerebro de ratones heterocigotas y homocigotas *nude* controles y en homocigotas tratados con el RAd-FTS. Objetivo X20.
Inset: Varicosidades de una fibra GnRH inmunoreactiva.

4.3.5 EFECTO DE LA TGNT SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS POBLACIONES GONADOTROPAS HIPOFISARIAS.

Se analizaron las poblaciones foliculotropas (FSH) y luteotropas (LH) de la *pars distalis* de los ratones del EXP-2 (Fig. 37).

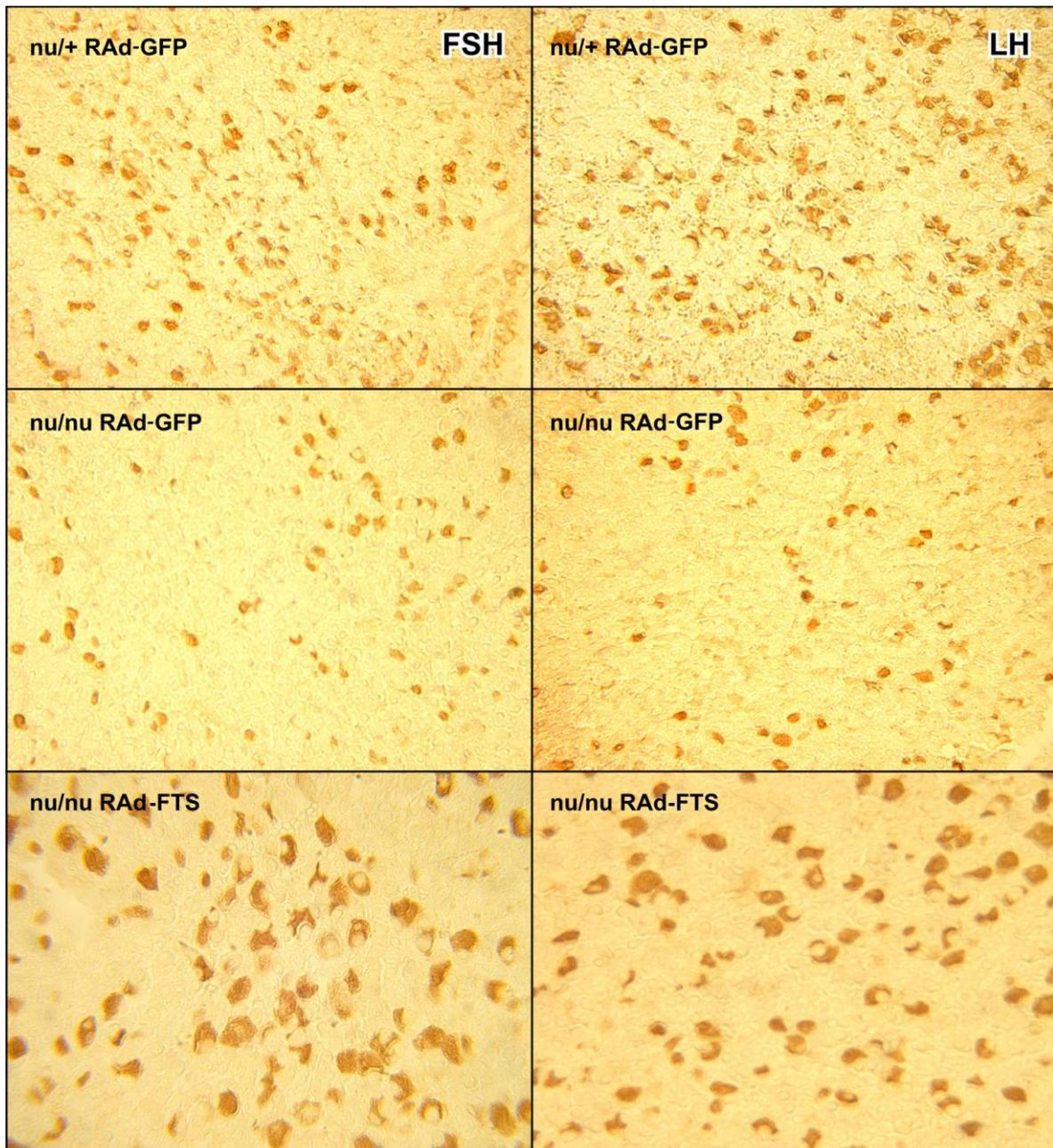


Figura 37. Micrografías de las adenohipófisis de ratones heterocigotas y homocigotas que recibieron TGNT. Inmunomarcación de las poblaciones de células FSH (panel izquierdo) y LH (panel derecho) en pituitarias de ratones hembras *nude* y heterocigotas.

El análisis histométrico mostró una significativa disminución de la densidad de células (DC) FSH y LH en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas controles. En los animales que recibieron la TGNT la morfometría reveló un aumento significativo en la DC y en el tamaño de las células FSH y LH respecto de los animales inyectados con el vector control (**Fig. 38**).

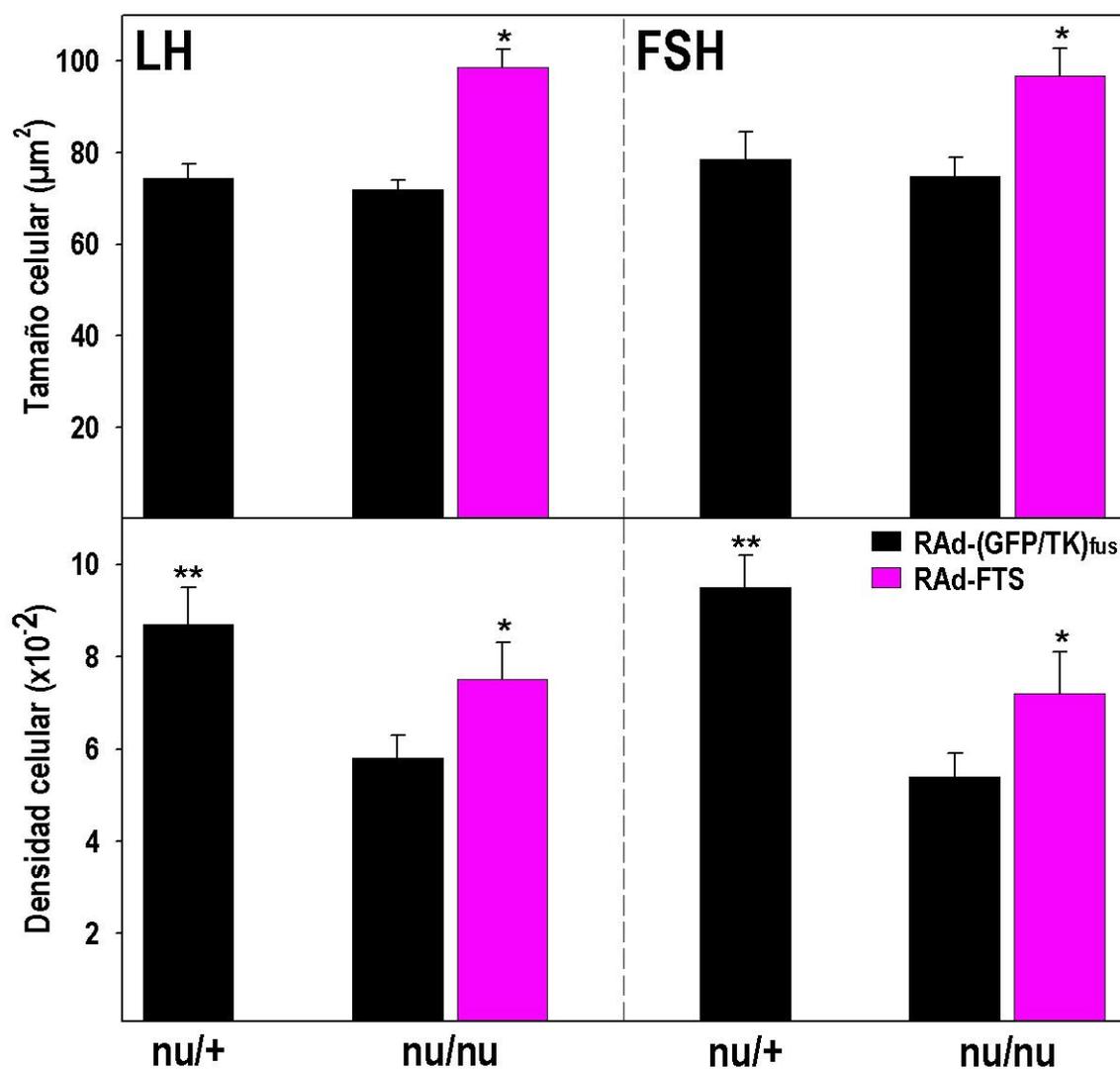


Figura 38. Cambios morfológicos de la población gonadotropa de *pars distalis* de ratones sometidos a TGNT. El análisis histométrico consistió en determinar el tamaño (panel superior) y la densidad (panel inferior) celular de las poblaciones de células LH (panel izquierdo) y FSH (panel derecho) inmunomarcadas, en pituitarias de ratones hembras *nude* y heterocigotas (N=5 en todos los grupos). Significación estadística respecto de hembras nu/nu inyectadas con RAD-(GFP/TK)_{fus}: ** P<0,01; *P<0,05.

4.3.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RAd-FTS EN LOS NIVELES SÉRICOS DE ESTRÓGENO Y PROGESTERONA DE LOS RATONES *NUDE*.

Como se esperaba, los niveles de estrógeno (E_2) circulante de los *nude* se encontraron significativamente disminuidos respecto a los niveles de sus contrapartes heterocigotas. La terapia génica neonatal con timulina parece prevenir parcialmente el déficit de E_2 de las hembras *nude* de 71 días de edad. Los niveles séricos de progesterona (P_4) no se encontraron significativamente modificados, aunque se observó una tendencia a aumentar en los animales inyectados con el RAd-FTS (Fig. 39).

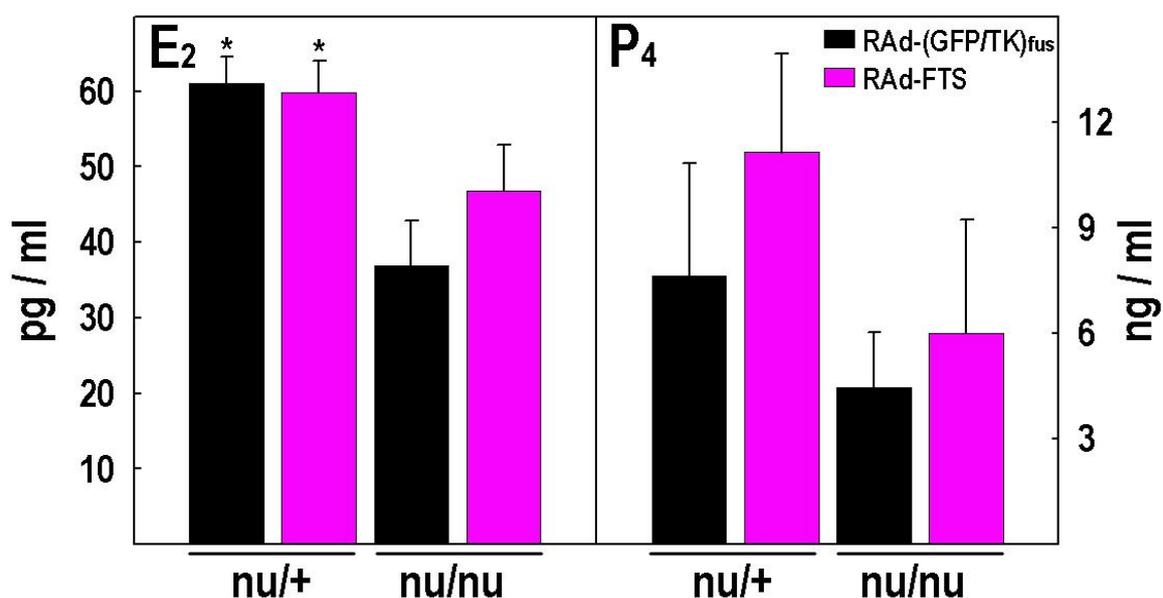


Figura 39. Niveles de estrógeno y progesterona séricos en ratones hembras *nude* y heterocigotas. Se dosaron por RIA los niveles circulantes de estrógeno (E_2) y progesterona (P_4) en ratones hembras sometidos neonatalmente a terapia génica con timulina (barras rosas) o GFP/TK_{fus} (barras negras). Los datos se expresan como la media \pm SEM (E_2 N=11; P_4 N=6). Significación estadística respecto de hembras homocigotas (nu/nu) inyectadas con RAd-(GFP/TK)_{fus} (control): ** P<0,01; *P<0,05.

4.3.7 EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA NEONATAL SOBRE EL INICIO DE LA MADUREZ SEXUAL EN RATONES HEMBRAS *NUDE*.

En todos los animales se monitoreó diariamente a partir de los 22 días de edad la apertura vaginal para determinar el inicio de la fertilidad. Como se esperaba, la edad de apertura vaginal estuvo significativamente retrasada en los ratones *nude* controles respecto a los heterocigotas controles. Una única inyección neonatal

i.m. de RAd-FTS pero no de RAd-(GFP/TK)_{fus}, redujo significativamente el retraso en el día de apertura vaginal en ratones hembras *nude* (**Fig. 40**).

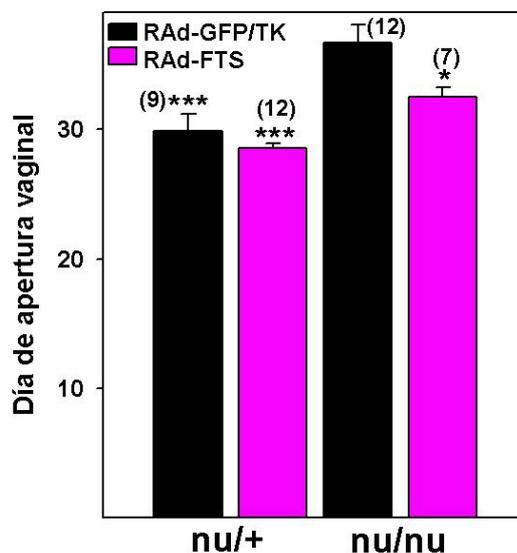


Figura 40. Día de apertura vaginal en ratones heterocigotas y homocigotas que recibieron la terapia génica neonatal con timulina. Se monitorearon los animales inyectados con el RAd-FTS (barras rosas) o el RAd-(GFP/TK)_{fus} (barras negras), a partir del día 22 de edad. Los datos se expresan como la media \pm SEM. Los N se indican entre paréntesis para cada caso. Significación estadística respecto de hembras nu/nu inyectadas con el vector control: *** P<0,001; *P<0,05.

4.3.8 CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA OVÁRICA DE LOS RATONES NUDE SOMETIDOS A TGNT.

Como se preveía, los ovarios de los ratones *nude* controles carecían de folículos antrales y maduros, poseyendo escasa cantidad de cuerpos lúteos. En estos ovarios la mayoría de los folículos presentaron distintos grados de atresia. Los ratones heterocigotas presentaron ovarios con folículos y cuerpos lúteos normales. Las hembras *nude* sometidas a TGNT presentaron gónadas con características intermedias, encontrándose algunos folículos con antro y cuerpos lúteos normales, pero en menor número que en los heterocigotas (**Fig. 41**).

Se efectuó asimismo un análisis cuantitativo de estas observaciones. Este análisis reveló que, respecto de las heterocigotas controles, las hembras *nude* presentaban una significativa disminución en el número de folículos secundarios (P=0,06), terciarios (P<0,05) y de cuerpos lúteos (P<0,001), así como un significativo aumento en el número de los folículos atrésicos (P<0,01). La TGNT

previno significativamente la aparición de estas alteraciones; en el número de folículos terciarios la prevención fue marginalmente significativa ($P=0,08$) (**Fig. 42**).

Del total de folículos cuantificados en los grupos de animales del EXP-2 se determinó la relación entre los folículos en desarrollo (primarios, secundarios y terciarios), los cuerpos lúteos (CL) y los folículos atrésicos; para ello se tomaron los valores de las medias de cada cuantificación. Los ratones hembras *nude* control presentaron una disminución de aproximadamente 35% en el total de los folículos cuantificados (en desarrollo + atrésicos + CL). Además de presentar menor número de estructuras, estos animales mostraron un 41,8% de folículos atrésicos y un 1,3% de CL, mientras que los animales heterocigotas controles mostraron un 17,3% de atresia y un 18,2% de CL. La terapia génica neonatal con timulina no solo aumentó el número total de folículos sino que restauró la relación entre los mismos al disminuir la atresia y aumentar el número de CL (**Fig. 43**).

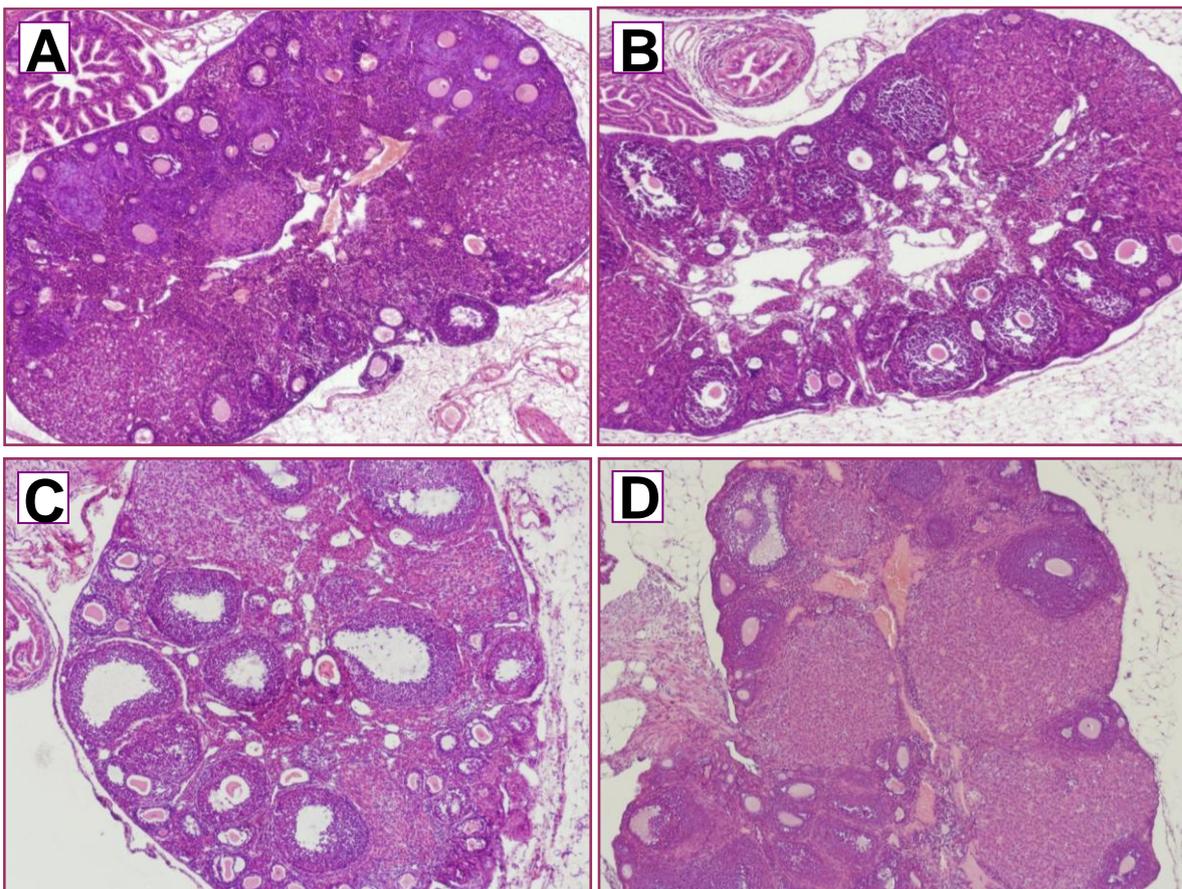


Figura 41. Microfotografías de ovarios de ratones heterocigotas y homocigotas que recibieron la terapia génica neonatal con timulina. Se tiñeron con hematoxilina-eosina los ovarios de ratones hembras heterocigotas (**A** y **B**) y *nude* (**C** y **D**) inyectados con RAD-(GFP/TK)_{fus} (**A** y **C**) o con el RAD-FTS (**B** y **D**). Objetivo X10.

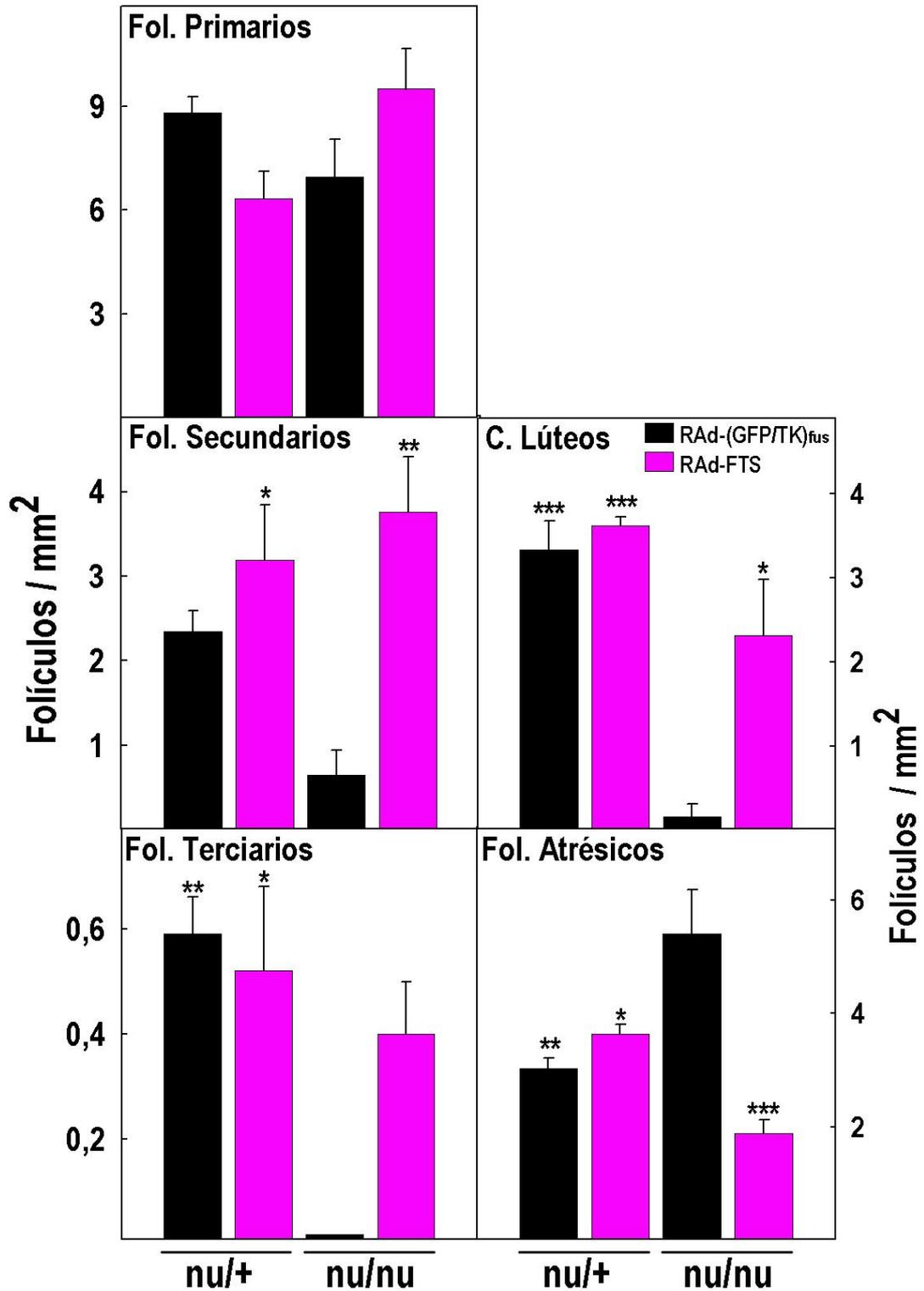


Figura 42. Morfometría de ovarios de ratones heterocigotas y *nude* sometidos neonatalmente a terapia génica con timulina. Se determinó el número de folículos en distintos estadios y de cuerpos lúteos en los animales inyectados con el RAd-FTS (barras rosas) o el RAd-(GFP/TK)_{fus} (barras negras). Los datos se expresan como la media \pm SEM (N=8 en nu/nu RAd-FTS, el resto N=6). Significación estadística referida a las hembras *nude* controles: *** P<0,001; ** P<0,01; *P<0,05.

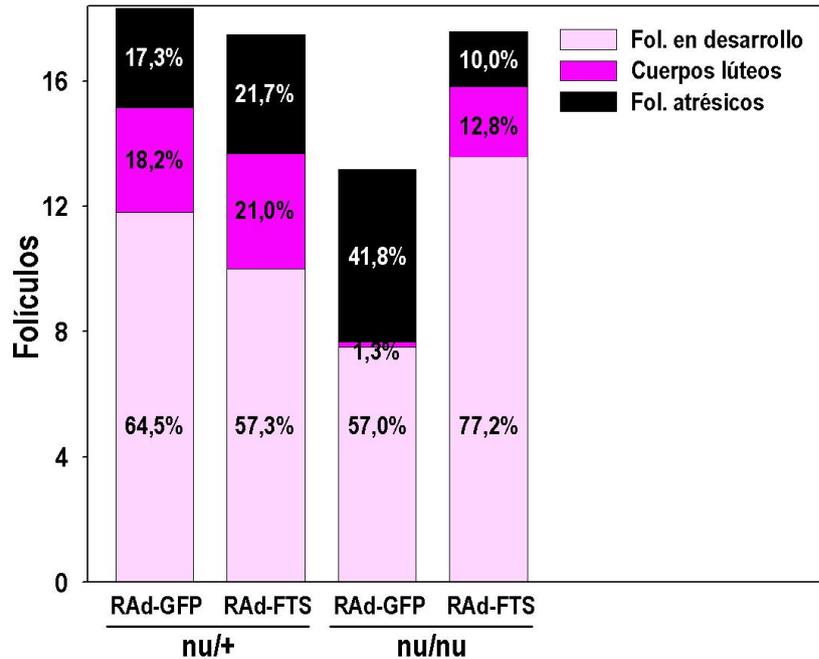


Figura 43. Relación entre los fólículos ováricos cuantificados. De la sumatoria de fólículos (media) en distintos estadios se analizó la relación y la contribución porcentual de cada tipo de estructuras. Para establecer las relaciones se dividieron los fólículos en tres categorías: 1) la suma de los fólículos en desarrollo (primarios, secundarios y terciarios) (porción rosa pálido), 2) los cuerpos lúteos (porción rosa), y 3) los fólículos atrésicos (porción negra).

4.3.9 EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA NEONATAL PARA TIMULINA SOBRE LA ALTURA DEL EPITELIO UTERINO.

Se midió la altura del epitelio uterino (μm) en los cuatro grupos de animales debido a que este parámetro es otro indicador del status reproductivo en hembras. Se observó una parcial disminución en la altura del epitelio uterino en los ratones *nude* control respecto a sus contrapartes heterocigotas, mientras que en los animales *nude* que recibieron el RAd-FTS se observó un aumento marginalmente significativo ($p=0,09$) de la altura del epitelio uterino (**Fig. 44 y 45**).

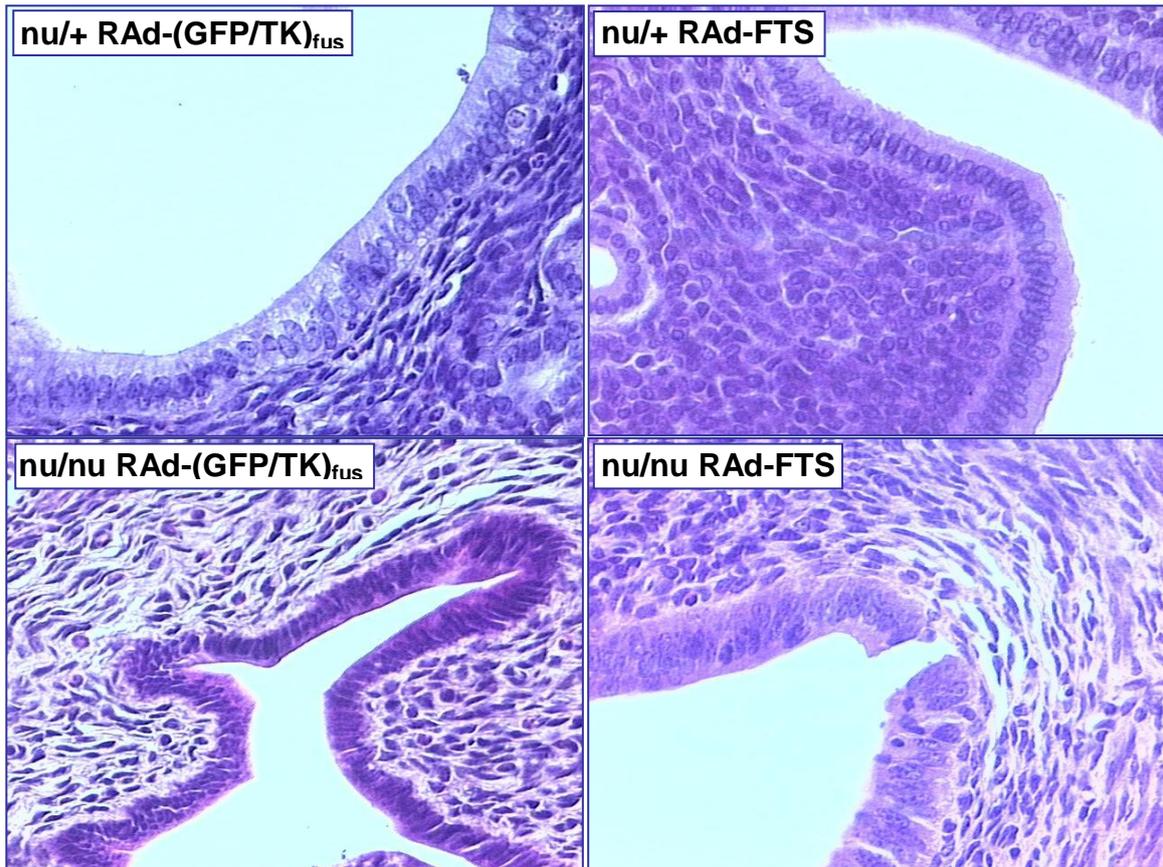


Figura 44. Microfotografías de la pared uterina de ratones heterocigotas y homocigotas que recibieron la terapia génica neonatal con timulina. Las secciones de útero se tiñeron con hematoxilina-eosina. Objetivo X40.

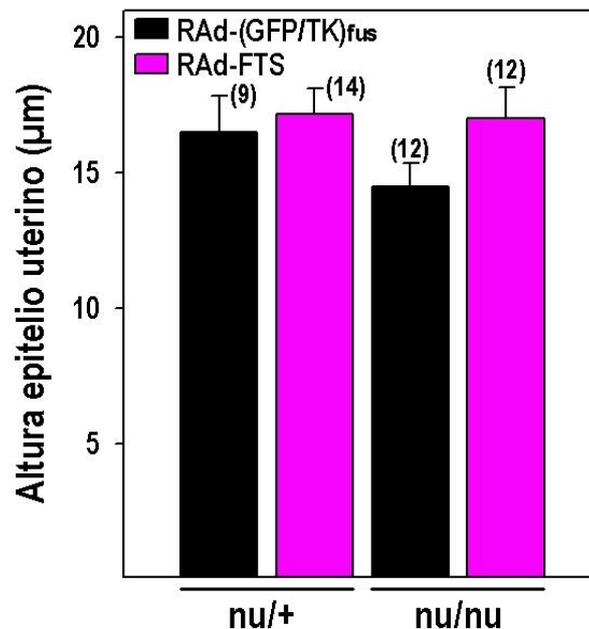


Figura 45. Altura del epitelio uterino de ratones *nude* sometidos a la TGNT. Se determinó la altura del epitelio uterino (μm) en los ratones que recibieron la inyección del RAd-FTS (barras rosas) o el RAd-(GFP/TK)_{fus} (barras negras). Los datos se expresan como la media \pm SEM. Los N se indican entre paréntesis para cada caso.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró la factibilidad de la construcción de un gen sintético para un análogo biológicamente activo de timulina, metionina-FTS (*met*FTS). Se decidió realizar esta construcción dado que el gen de la timulina aún no se ha clonado y con el objetivo de implementar terapia génica para timulina.

En numerosos estudios se sintetizaron análogos del nonapéptido timulina, modificando mínimamente su secuencia nativa, y se determinaron los aminoácidos críticos para la conservación de la actividad biológica (Pléau y col., 1979; Auger y col., 1987). La sustitución del primer aminoácido y la adición de aminoácidos en el extremo N-terminal produjo análogos con actividad biológica idéntica a la de la timulina; tal es el caso del dodecapéptido sintético Val-Lys-Arg-(N)-FTS (Pléau y col., 1979; Gastinel y col., 1982; Wan y col., 1979; Imaizumi y col., 1981). Consecuentemente, era de esperarse que el producto de nuestro gen sintético, *met*FTS, poseyera actividad biológica de timulina nativa.

En un estudio previo se construyó un gen sintético que codificaba para una proteína quimérica que consistía en la FTS fusionada al C-terminal de la β -galactosidasa de *E. coli*, el cual se expresó exitosamente en bacterias (Calenda y col., 1988). En los estudios realizados en la presente tesis se demostró, a partir de la caracterización de los sobrenadantes y lisados de células transfectadas con el vector de expresión eucariota pcDNA-*met*FTS, que nuestro gen sintético expresa eficientemente el análogo *met*FTS y que el mismo posee actividad biológica de timulina.

Con la finalidad de confirmar que la bioactividad de timulina presente en los lisados de las células transfectadas con el vector de expresión eucariota pcDNA-*met*FTS no era un artefacto *in vitro*, dichos lisados se inyectaron i.p. en ratones TX (cuya timulina sérica es no detectable) obteniéndose niveles significativos de timulina en el suero. En contraste, la inyección de lisados de células transfectadas con el pcDNA3.1 no indujo timulina detectable. Adicionalmente, los lisados pcDNA-*met*FTS se incubaron con un anticuerpo anti-FTS demostrándose la completa inmunoneutralización de la actividad de timulina presente en ellos, lo cual indica que el origen de la actividad biológica detectada es el péptido recombinante y no otro componente presente en los lisados.

En estudios *in vitro*, en los que se utilizó inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunoelectromicroscopía, pudo confirmarse la localización citoplasmática de la timulina en las TEC (Schmitt y col., 1980). En el timo del ratón, la timulina es detectada, por inmunohistoquímica, en pequeñas vesículas citoplasmáticas presentes en las células retículoepiteliales (Auger y col., 1984). La localización pancelular de la proteína de fusión *met*FTS-hMGFP generada en el presente estudio sugiere que el péptido *met*FTS es capaz de difundir libremente hacia el interior del compartimiento nuclear.

El vector adenoviral recombinante, RAd-FTS, construido en el presente trabajo, mostró ser efectivo induciendo niveles intracelulares extremadamente elevados de timulina recombinante en cultivo de células. En ninguna de las líneas celulares transducidas con el RAd-FTS se observaron signos evidentes de citotoxicidad. El método que empleamos para realizar dicha observación nos permite detectar un efecto citotóxico moderado o alto, pero no uno leve. Por tal razón esta determinación fue complementada con estudios *in vivo* en los cuales el RAd-FTS fue inyectado en ratones y ratas, los que subsiguientemente mostraron una marcada y prolongada sobreexpresión de timulina recombinante sin manifestar pérdida de peso ni signos generales de toxicidad, monitoreados mediante la observación del comportamiento y el ciclo estral de los animales. Este conjunto de resultados *in vivo* e *in vitro* coincide con los estudios toxicológicos realizados en varias especies y en estudios clínicos en los cuales la administración de dosis farmacológicas de timulina sintética no tuvo efectos tóxicos ni siquiera en tratamientos prolongados (Bach y col., 1984).

Se ha postulado al músculo esquelético como el sitio óptimo para la transferencia de genes debido a que este tejido es de fácil accesibilidad, está ricamente irrigado por vasos sanguíneos y es capaz de expresar prolongada y sostenidamente niveles terapéuticos de proteínas recombinantes en huéspedes inmunocompetentes (Maione y col., 2001). En línea con esta evidencia, los experimentos *in vivo* con el RAd-FTS indican que el músculo es un lugar efectivo para inyectar nuestro vector adenoviral y generar así una fuente ectópica de timulina recombinante.

No era de esperarse que el gen sintético para *met*FTS se expresara por períodos tan prolongados, más de 110 días en los ratones TX y de 400 días en las

ratas TX inyectados con el RAd-FTS. Normalmente la expresión de transgenes a partir de vectores adenovirales de primera generación es menos prolongada debido a la respuesta inmune que desencadenan, que es la misma que la de un adenovirus salvaje (Bangari y Mittal, 2006). La capacidad del RAd-FTS para producir una expresión a largo plazo *in vivo* fue también observada en otros estudios realizados en nuestro laboratorio, en los cuales la inyección en el cerebro de ratas inmunocompetentes produjo una expresión más prolongada de *metFTS* que la de los genes reporteros, GFP/TK y β -galactosidasa, inducida por la inyección de RAd-(GFP/TK)_{fus} y RAd- β gal, respectivamente (Morel y col., 2006).

Se ha documentado que niveles elevados de timulina inducen una atenuación de la respuesta inflamatoria celular por la inhibición local de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , NGF, IL-1 β , IL-6), quimoquinas (Bach, 1983; Safieh-Garabedian y col., 1998; Kanaan y col., 2002; Henriques-Coelho y col., 2008) y por supresión de la fosforilación de p38 (Henriques-Coelho y col., 2008); inducen además una disminución en el número de NK (Dokhelar y col., 1983), linfocitos y neutrófilos (Yara y col., 2001). Teniendo en cuenta los elevados niveles de timulina que se producen en las células transducidas por el RAd-FTS, hipotetizamos que la expresión a largo plazo de *metFTS in vivo* puede deberse a la actividad antiinflamatoria de la timulina previamente descrita. Es decir, dicho péptido podría atenuar o prevenir la respuesta inmune de los animales hacia las células transducidas con el RAd-FTS e incluso, al menos potencialmente, con otros RAds. Esta característica intrínseca de la timulina hace del RAd-FTS una herramienta prometedora para la implementación de terapia génica en procesos inflamatorios cerebrales y pulmonares, entre otros.

En el modelo del ratón *nude* se cuenta con una ventaja adicional que es que, debido a su inmunodeficiencia, estos animales no son capaces de montar una reacción inmune destructiva contra las células transducidas con el vector adenoviral, asegurándonos así una expresión de largo plazo de la timulina. Efectivamente, una única inyección i.m. del RAd-FTS en ratones *nude* recién nacidos produjo una sostenida restauración de los niveles séricos de timulina en estos mutantes durante al menos 71 días. Además, resulta interesante el hecho de que, pese a que el animal al momento del sacrificio pesaba por lo menos 20 veces más que cuando recibió el tratamiento, los niveles circulantes de timulina

recombinante no habían disminuído; es decir, dichos niveles no se diluyeron durante el crecimiento, lo cual implica que la producción de timulina recombinante fue vigorosa durante todo el período de estudio.

En el EXP-1 de terapia génica neonatal con timulina, los ratones *nude* mostraron niveles muy bajos pero detectables de timulina sérica. La timulina detectada probablemente haya sido producida por un rudimento tímico; de hecho, mediante el análisis por microscopía óptica y electrónica se describió la presencia de rudimentos tímicos en ratones *nude* (Pantelouris y Hair, 1970, Wortis y col., 1971; Groscurth y col., 1975).

Las acciones de mayor relevancia ejercidas por el timo endocrino parecen estar circunscriptas en ratas y ratones al período perinatal, delimitado entre los últimos días de la preñez y los primeros días postnatales (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). En efecto, algunas de las anomalías endocrinas observadas en ratones NTx o congénitamente atímicos se han podido prevenir mediante el trasplante de timo o la administración de extractos tímicos neonatal (Besedovsky y Sorkin, 1974; Pierpaoli y Besedovsky, 1975; Strich y col., 1985). En la presente tesis quisimos evaluar si la timulina es un mediador fisiológico importante de la influencia perinatal del timo sobre la maduración del eje reproductivo, el cual se ve particularmente deteriorado en el ratón hembra *nude*.

A este respecto, los ratones hembras *nude* poseen concentraciones reducidas de LH y FSH en la hipófisis y en el suero (Rebar y col., 1980; 1981b; 1982; Goya y col., 2001); estas mismas anomalías fueron confirmadas en nuestros experimentos. La terapia génica neonatal con timulina en ratones *nude* fue capaz de prevenir el déficit de gonadotrofinas séricas y las alteraciones morfológicas de las células gonadotropas, que presentan las hembras *nude*.

Más precisamente, nuestros resultados revelaron que la administración neonatal del RAd-FTS en las hembras *nude* induce un aumento significativo de la densidad celular y en el tamaño celular de las poblaciones gonadotropas respecto a las contrapartes no tratadas. De manera complementaria, en otros estudios de nuestro grupo la inmunoneutralización neonatal de timulina sérica en ratones normales (C57BL/6) indujo una disminución de los niveles de gonadotrofinas circulantes y un incremento del tamaño de las células gonadotropas de la hipófisis (Camihort y col., 2006), así como un déficit de hormonas adenohipofisarias

circulantes reminisciente al que se observa en los ratones *nude* (Goya y col., 2007). Por lo tanto, la timulina podría ser, durante el período perinatal, un factor fisiológico necesario para la adecuada maduración de estas células gonadotropas.

En cuanto al mecanismo fisiológico por el cuál la timulina ejerce su influencia sobre la secreción de gonadotrofinas, solamente podemos realizar especulaciones. Se ha documentado que ciertos productos tímicos, tales como la timosina fracción 5 y el medio de incubación de timos, potencian el efecto de la GnRH sobre las células hipofisarias *in vitro* (Rebar y col., 1981a; Mendoza y Romano, 1989), pero no tienen efecto sobre la secreción basal de gonadotrofinas. En el caso de la timulina, se sabe que posee actividad hipofisotrópica *in vitro*, pudiendo facilitar la liberación de GH, PRL, LH, TSH y ACTH (Zaidi y col., 1988; Brown y col., 1998; 1999; 2000; Hadley y col., 1997) y, por lo tanto, podría actuar directamente sobre la adenohipófisis *in vivo* modulando la respuesta de la glándula a secretagogos o inhibidores hipotalámicos u otros. Sin embargo, también podría ser posible que ejerza su acción a un nivel de control superior, actuando sobre las neuronas GnRH.

La función reproductiva en mamíferos está regulada centralmente por las neuronas hipotalámicas que secretan GnRH, las cuales poseen axones que terminan, principalmente, en la eminencia media (EM) (Tobet y Schwarting, 2006). Algunos investigadores proponen que las alteraciones reproductivas características de los ratones atímicos se deben a un defecto hipotalámico; esta hipótesis se sustenta en dos observaciones: la presencia de reducidos niveles de GnRH hipotalámica en ratones *nude* prepuberales, y la normal respuesta hipofisaria a la administración exógena de GnRH en estos mutantes (Weinstein, 1978; Strich y col., 1985).

En línea con estas observaciones, en nuestros ratones la inmunofluorescencia para neuronas GnRH mostró una menor fluorescencia en las hembras *nude* respecto de sus contrapartes heterocigotas controles. La terapia génica neonatal con timulina previno este déficit en el número de neuronas GnRH en la hembra *nude* adulta. Debe señalarse que todas estas diferencias fueron marginalmente significativas (P entre 0,15 y 0,05) lo cual abre la posibilidad de que el análisis de un número mayor de cerebros revele diferencias significativas. Complementariamente, se ha descrito que el bloqueo neonatal de los receptores

centrales y periféricos para GnRH induce alteraciones en el patrón de maduración de los timocitos y en la morfología del timo (disminución del volumen de los timocitos, de la región cortical y del peso del timo) (Morale y *col.*, 1991).

Durante la embriogénesis, las neuronas GnRH originadas en la placoda olfatoria migran a través del septum nasal por la región ventral del cerebro anterior hasta su destino final, principalmente la EM. Se ha documentado que defectos en la migración de las neuronas GnRH pueden producir infertilidad en humanos (Hardelin y *col.*, 1992). Aunque se desconoce el mecanismo que articula la migración de estas neuronas, se han estudiado algunos factores que podrían regular dicha migración (Tobet y Schwarting, 2006; Cariboni y *col.*, 2007).

Cuando comparamos la distribución de las neuronas GnRH en el cerebro de las hembras *nude* control respecto de su contraparte heterocigota notamos que había un 5,5 % de neuronas que estaban desplazadas de la parte anterior a la posterior. Este porcentaje se redujo levemente, a 4,5%, en las hembras *nude* que recibieron la terapia génica neonatal con timulina. Resulta deseable realizar nuevos estudios a fin de establecer, primero, si las diferencias observadas en la distribución neuronal están efectivamente asociadas a la mutación *nude*, segundo, si la reducción del porcentaje de neuronas desplazadas está efectivamente asociada a la terapia génica con timulina, y tercero, si una y otra diferencia respecto de la contraparte heterocigota tiene relevancia biológica. Adicionalmente, resultaría interesante determinar si la timulina tiene algún rol en el remodelamiento estructural de las neuronas GnRH, que según se ha descrito ocurre en un período post-natal (Cottrell y *col.*, 2006) y es clave para el comienzo de la pubertad en ratas y ratones (Terasawa, 2006).

Se sabe que durante el período perinatal los niveles hormonales determinan en gran parte la futura actividad neuroendocrina del hipotálamo (Gore, 2008). En efecto, se han presentado evidencias que demuestran que se requiere la presencia de estrógenos para el normal desarrollo del cerebro de la hembra. Sin embargo, los ovarios no serían la fuente primaria de estrógenos debido a que no secretan niveles detectables de dicho esteroide antes de los 7 días en roedores; por lo tanto, los estrógenos circulantes en la vida fetal o en el recién nacido, en ratones hembras, deben provenir de fuentes extraováricas, tales como la madre y/o las adrenales (Bakker y Baum, 2008). En adición, los niveles de testosterona

durante este período conducen a la maduración y diferenciación sexual femenina del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y son responsables del inicio de la pubertad y de la continuidad de la ciclicidad de las funciones reproductivas en hembras (Harris y Levine, 1965).

En la rata, se ha observado que durante los primeros días de vida la influencia de las hormonas gonadales sobre el cerebro de las hembras las capacita para que se genere el pico preovulatorio de GnRH-LH. Más aún, durante este período crítico postnatal la administración de andrógenos o estrógenos puede resultar en la pérdida permanente de la capacidad de generar el pico de GnRH en respuesta a la estimulación estrogénica (Becu-Villalobos y col., 1997).

En un estudio clásico en el tema se postuló que el timo posee un rol importante en la diferenciación funcional del cerebro y en la programación de ciertas funciones neuroendócrinas, hipotetizándose que el timo ejerce su rol crítico en el período fetal y perinatal en mamíferos (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Estas ideas recibieron apoyo al documentarse que la timectomía neonatal induce una disminución en los niveles de estrógeno circulante en ratones de 25 días (García y col., 2000). Además, en los ratones hembras *nude* se ha observado una disminución en los niveles séricos de progesterona, 17- β -estradiol (Pierpaoli y Besedovsky, 1975) y estrona (Rebar y col., 1981b). En línea con estas hipótesis y observaciones, hemos evidenciado que los niveles de estrógeno circulante en las hembras *nude* controles se encuentran disminuidos respecto de sus contrapartes heterocigotas. Por otro lado, en nuestros estudios los niveles de progesterona sérica mostraron una elevada dispersión, por lo que no es posible establecer conclusiones respecto a este esteroide. Teniendo en cuenta lo mencionado respecto a los procesos que ocurren en el período perinatal durante el desarrollo del cerebro en ratas y ratones, resulta factible considerar que la influencia del timo puede deberse a una acción directa sobre el hipotálamo.

Se encuentra bien documentado que la pubertad está considerablemente retrasada en los ratones hembras *nude* y en los neonatalmente timectomizados (Besedovsky y Sorkin, 1974), alteración que también observamos en nuestros ratones hembras *nude* controles. A su vez, la terapia génica neonatal para timulina redujo el retraso en el comienzo de la madurez sexual (determinado por el día de apertura vaginal) en las hembras *nude*, lo que coincide con estudios en los cuales

se logró prevenir estas anormalidades mediante el trasplante neonatal del timo pero no con la inyección de timocitos maduros (Besedovsky y Sorkin, 1974). Tomados en conjunto estos datos sugieren firmemente que la timulina es un efector fisiológico importante en la maduración sexual femenina.

Se ha sugerido que los factores tímicos podrían interaccionar con receptores ováricos de gonadotrofinas y/o con el sistema de la adenilato ciclasa para modular la esteroideogénesis, estimulada por gonadotrofinas, en células de ovario de rata (Aguilera y Romano, 1989). Asimismo, se ha documentado que la LH estimula la actividad de las enzimas aromatasa y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, involucradas en la conversión del colesterol a hormonas esteroideas, y que como consecuencia aumentan los niveles de progesterona (Chapman y col., 2005). En el proceso de degradación de la progesterona interviene la 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α -HSD), también presente en la lisis del cuerpo lúteo; la localización de esta enzima es diferente en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas (Müller, 1975). Adicionalmente, se ha observado una pérdida de la 20α -HSD en los ovarios de las hembras *nude* adultas implantadas con timo al nacer (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Resultaría interesante diseñar experimentos que estudien la acción directa de la timulina sobre dichas enzimas y sobre los receptores de las gonadotrofinas ováricas.

Por otra parte, se cree que las citoquinas participan en diferentes eventos de la reproducción, tales como la ovulación, la luteinización y la implantación (Bueno, 2000). Existe evidencia de un efecto estimulador de la timulina sobre la liberación de citoquinas de ciertos tipos de linfocitos (Palacios y col., 1982). Por lo tanto, parece posible que en algunas de las acciones de la timulina sobre el eje reproductivo intervengan citoquinas.

La baja cantidad de folículos en crecimiento observada en las hembras *nude* controles respecto de sus contrapartes heterocigotas puede ser consecuencia del déficit de gonadotrofinas circulantes ocasionado por la atimia. La terapia génica con timulina en las hembras *nude* restaura los niveles de gonadotrofinas séricas e hipofisarias, y de esta manera reproduce el ambiente hormonal, el cual es, al mismo tiempo, crítico en el período post-natal y necesario para el normal desarrollo folicular. Es importante destacar la notable disminución en la atresia folicular que mostraron los ratones *nude* que recibieron neonatalmente el RAd-

FTS. Estos hallazgos subrayan un posible rol de las hormonas tímicas, en especial la timulina, en la embriogénesis en mamíferos.

Los mamíferos hembras pasan la mayor parte de su vida post-puberal ciclando, como resultado de la interacción hipófiso-gonadal. Sin embargo, si en la rata se extrae la hipófisis los ovarios se hacen quiescentes (dejan de ovular). Recíprocamente, si se remueven los ovarios la hipófisis comienza a secretar elevados niveles de gonadotrofinas (Michael y col., 1981) y el timo incrementa su peso (Fitzpatrick y col., 1985; Greenstein y col., 1986). No obstante se ha informado que en los ratones hembras atímicos, la ovariectomía no induce un incremento en los niveles de LH séricos, pero sí lo provoca la inyección de GnRH (Weinstein, 1978). Además, los ovarios de los ratones atímicos responden a la LH normalizando los niveles de progesterona circulante, lo que indica que la alteración de la función gonadal, en estos mutantes, ocurre fundamentalmente a nivel de eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y no a nivel ovárico (Pierpaoli y Besedovsky, 1975; Strich y col., 1985).

Por otro lado, se ha documentado que con el 12% de la población de neuronas GnRH es suficiente para que se produzca la secreción pulsátil de gonadotrofinas y el comienzo de la pubertad, mientras que entre el 12 y el 34% de las neuronas GnRH son necesarias para el control cíclico en ratones hembras adultas (Herbison y col., 2008). En nuestros experimentos se observó que los ratones hembras *nude* conservan el 80% de las neuronas GnRH; por tanto, la disfunción a nivel hipotalámico en estos mutantes podría deberse a alteraciones en la ubicación de estas neuronas más que al número de las mismas, o a un ambiente hormonal desfavorable durante el período perinatal que, como ya se ha mencionado, es crítico para el normal desarrollo de la función neuroendocrina en las hembras. En suma, estos resultados sugieren que el ratón *nude* sufre una disrupción del control hipotalámico sobre la hipófisis como resultado de la falta del timo.

Dadas las acciones hipofisotrópicas de la timulina, parece lógico suponer que esta hormona actúa principalmente a nivel hipofisario y que podría producirse *in situ* como un factor hipotalámico y, de esta manera, regular la función hipofisaria. Esto es concebible si se considera que al menos uno de los péptidos tímicos, la timosina, está localizado en el cerebro con altas concentraciones particularmente en el hipotálamo medio basal (Palaszynski y col., 1983).

Conjuntamente con las anomalías a nivel ovárico, en nuestros estudios se observó que la altura del epitelio uterino en las hembras atímicas tiende a ser menor que la de los animales heterocigotas controles. En otros trabajos se ha observado un proceso inflamatorio inespecífico en el útero de estos mutantes (Alten y Groscurth, 1975); esta inflamación no se observó en el útero de nuestros ratones atímicos. Las hembras *nude* que fueron sometidas a la terapia génica neonatal con timulina no mostraron alteraciones en sus úteros.

En suma, los resultados obtenidos a partir de los trabajos realizados para la presente tesis sugieren que la timulina es el mediador o al menos uno de los mediadores fisiológicos de la influencia perinatal del timo sobre la maduración del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal. A este respecto, una única inyección neonatal de un vector adenoviral que expresa timulina, durante al menos 70 días, fue suficiente para prevenir la aparición de la mayor parte de las anomalías reproductivas en la hembra *nude*. No obstante, resulta necesario evaluar si la terapia génica con timulina es capaz de restaurar la fertilidad en estos mutantes.

Por otro lado, como se ha expuesto oportunamente en la presente discusión, son necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo de acción de la timulina. Sin embargo, podríamos considerar tres alternativas para dar cuenta del mismo: i) la timulina actúa sobre los ovarios y adrenales aumentando los niveles de estrógeno sérico, el cual actúa sobre las neuronas GnRH, que presentan receptores de estrógeno (Weiser y col., 2008) y, de esta manera, aumenta los niveles de gonadotrofinas previniéndose así las anomalías reproductivas de la hembra *nude*; ii) la timulina actúa sobre la hipófisis, ya sea modulando la acción de la GnRH sobre las células gonadotropas (observado *in vitro* por Hinojosa y col., 2004) o directamente estimulando la liberación de gonadotrofinas (observado *in vitro* por Zaidi y col., 1988; Brown y col., 2000); y iii) la timulina actúa directamente sobre las neuronas GnRH y, de esta manera, restaura las funciones neuroendocrinas de la hembra *nude* que pueden modificarse post-natalmente. En concordancia con esta tercera alternativa se ha documentado que la inyección de timulina sintética en el hipotálamo de ratones hembras prepuberales NTx tuvo una acción facilitadora sobre la ovulación inducida por gonadotrofina coriónica equina (García y col., 2005). Alternativamente, el mecanismo de acción de la timulina podría resultar de una combinación de las opciones propuestas.

Nuestros datos sugieren que la terapia génica neonatal para timulina puede ser una estrategia efectiva para el tratamiento de déficit reproductivos asociados a la disfunción del timo. Asimismo, hay potencialmente un gran número de usos para la timulina como agente terapéutico. Podría utilizarse en situaciones donde existen niveles de timulina sérica disminuidos, tales como en el envejecimiento normal y en patologías como el SIDA y el síndrome de DiGeorge. Efectivamente, la timulina ha sido usada para el tratamiento de ciertas patologías autoinmunes (Bach y *col.*, 1984). Como ya se ha mencionado, podría utilizarse la terapia génica antiinflamatoria con timulina en casos donde la inflamación juegue un rol relevante, tanto a nivel central como periférico. La inflamación cerebral es importante en el trauma y en el infarto cerebral, y posiblemente sea una potencial causa de la neurodegeneración observada en la enfermedad de Parkinson (McGeer y McGeer, 2004).

Como objetivo a futuro nos proponemos utilizar sistemas vectoriales cuya expresión transgénica sea regulable, permitiendo así la manipulación de la expresión de la timulina recombinante en diferentes modelos de timodeficiencia. Con un sistema de expresión inducible (por tetraciclina) se podría limitar la expresión del transgen dentro de la ventana terapéutica, por ejemplo, durante el período post-natal en el modelo del ratón *nude*. Además, con un vector adenoviral recombinante bidireccional regulable, que estamos construyendo actualmente, se podría lograr la coexpresión regulada del gen sintético para timulina (*metFTS*) y el gen reportero para la GFP, ambos bajo el control de un promotor inducible.

6. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo de tesis logramos diseñar, construir, caracterizar y capitalizar la disponibilidad de un gen sintético para timulina (*metFTS*). La efectividad de la terapia génica con *metFTS* para restaurar, en animales timectomizados, los niveles de timulina circulante por más de 12 meses constituye un logro muy relevante. Asimismo, el hecho de que la terapia génica neonatal con timulina en la hembra *nude* haya logrado restaurar en el animal adulto (51 días y 71 días) los niveles de timulina sérica y prevenir las alteraciones a nivel hipotalámico, gonadotropo y ovárico que típicamente ocurren en estos mutantes, revela un rol fisiológico relevante de la timulina en la maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La timulina podría actuar a través del sistema neuroendocrino y/o directamente a nivel ovárico.

Concluimos entonces que la construcción de un vector adenoviral recombinante capaz de inducir elevados y sostenidos niveles circulantes de un análogo de timulina biológicamente activo representa un significativo paso hacia el uso terapéutico de esta molécula. La terapia génica con nuestro gen sintético para timulina podría utilizarse para el tratamiento de los déficits reproductivos asociados con disfunciones endocrinas del timo y en casos donde la inflamación juegue un rol importante. Además, por su acción antiinflamatoria la timulina podría ser utilizada como un adyuvante de otras moléculas terapéuticas transferidas por medio de vectores adenovirales.

7. REFERENCIAS

- Aguilera G y Romano MC. 1989. Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. *J Endocrinol* 123: 367-373.
- Alten HE y Groscurth P. 1975. The postnatal development of the ovary in the "nude" mouse. *Anat Embryol* 148: 35-46.
- Ammann AJ, Duquesnoy RJ y Good RA. 1970. Endocrinological studies in ataxia-telangiectasia and other immunological deficiency diseases. *Clin Exp Immunol* 6: 587-595.
- Amor B, Dougados M, Mery C, Dardenne M y Bach JF. 1987. Nonathymulin in rheumatoid arthritis: two double blind, placebo controlled trials. *Ann Rheum Dis* 46: 549-554.
- Anson DS, 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 13: 2(1):9.
- Auger C, Monier JC, Savino W y Dardenne M. 1984. Localization of thymuli (FTS-Zn) in mouse thymus. Comparative data using monoclonal antibodies following different plastic embedding procedures. *Biol Cell* 52: 139-146.
- Auger G, Blanot D, Magnin M, Gastinel LN, Pléau JM, Dardenne M y Bach JF. 1987. Synthesis and biological activity of eight thymulin analogues. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 368: 463-470.
- Bach JF y Dardenne M. 1973. Studies on thymus Products. *Immunology* 23: 353-366.
- Bach JF y Dardenne M. 1984. Thymic hormones in immunological diseases. *Immunol Allergy Pract* 6: 15-20.
- Bach JF y Dardenne M. 1988. Capítulo 16: Thymic hormones and lymphocyte functions. *En Handbook of Experimental Pharmacology*. Bray MA, Marley J (eds.). Springer-Verlag, Berlin. Pág. 415-421.
- Bach JF, Dardenne M y Pléau JM. 1977. Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature* 266: 55-57.
- Bach JF, Pléau JM y Dardenne M. 1991. Thymic Hormones. *En Encyclopedia of Immunology*. Saunders Scientific Publishers.
- Bach JF. 1983. Thymulin (FTS-Zn). *Clinics in immunology and Allergy* 3: 133-156.
- Bakker J y Baum MJ. 2008. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29: 1-16.
- Bakker J y Baum MJ. 2008. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29: 1-16.
- Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F y Dardenne M. 1991. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci* 48: 2141-2148.

Bangari DS y Mittal SK. 2006. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther* 6: 215-226.

Barbul A, Shawe T, Frankel HL, Efron JE y Wasserkrug HL. 1989. Inhibition of wound repair by thymic hormones. *Surgery* 106: 373-377.

Basarkar A y Singh J. 2007. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine* 2: 353-360.

Becu-Villalobos D, Gonzalez Iglesias A, Diaz-Torga G, Hockl P y Libertun C. 1997. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 17: 699-715.

Benihoud K, Yeh P y Perricaudet M. 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447.

Bergelson JM y Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL y Finberg RW. 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323.

Bergen JM, Park IK, Horner PJ y Pun SH. 2008. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. *Pharm Res* 25: 983-998.

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

Bett AJ, Haddara W, Prevec L y Graham FL. 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8802-8806.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G y col. 1995. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* 270: 475-480.

Bordigoni Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover PO y Kendall MD. 1992. Interactions Between the Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis and the Thymus in the Rat: A Role for Corticotrophin in the Control of Thymulin Release. *J Neuroendocrinol* 4: 295-301.

Bordigoni P, Faure G, Bene MC, Dardenne M, Bach JF, Duheille J y Olive D. 1982. Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with serum thymic factor (FTS). *Lancet* ii: 293-297.

Branton P. 1999. Capítulo 5: Early Gene Expression. *En Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. Prem Seth (ed). R.G. Landes Company, Georgetown, Texas, U.S.A. Pág. 39-55.

Brown OA, Sosa YE y Goya RG. 1994. Hormonas tímicas como mediadoras de la integración inmunogonadotropa. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 28: 203-209.

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

Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J-M y Goya RG. 1999. Growth hormone-releasing activity of thymulin: effects of age. *Neuroendocrinology* 69: 20-27.

Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J-M y Goya RG. 2000. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol (Biol Sci)* 55: B170-176.

Bueno JC. 2000. Citoquinas en reproducción. *Revista Inmunoalergia* 9: 18-21.

Burton EA, Huang S, Goins WF y Glorioso JC. 2004. Capítulo 1: Use of the Herpes Simplex Viral Genome to Construct Gene Therapy Vectors. *En Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. Curtis A. Machida (ed.). Humana Press Inc. New Jersey. Pág. 1-32.

Calenda A, Cordonnier A, Lederer F, Le DKH y Pleau JM. 1988. Production of biologically active thymulin in *Escherichia coli* through expression of a chemically synthesized gene. *Biotechnol Lett* 10: 155-160.

Camihort G, Luna G, Vesenbeckh S, Ferese C, Dardenne M, Goya R y Cónsole G. 2006. Morphometric assessment of the impact of serum thymulin immunoneutralization on pituitary cell populations in peripubertal mice. *Cells Tissues Organs* 184: 23-30.

Campos SK y Barry MA. 2007. Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther* 7: 189-204.

Cannon PM y Anderson WF. 2004. Capítulo 1: Retroviral Vectors for Gene Therapy. *En Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. N.S. Templeton (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. Pág. 1-16.

Carbone C y Maschi F. 2006. El ratón *nude* (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva* N° 1, año 5: 1-4.

Cariboni A, Hickok J, Rakic S, Andrews W, Maggi R, Tischkau S y Parnavelas JG. 2007. Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 27: 2387-2395.

Carter BJ, Burstein H y Peluso RW. 2004. Capítulo 5: Adeno-associated Virus and AAV Vectors for Gene Delivery. *En Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. N.S. Templeton (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. Pág. 71-102.

Chang LJ y Zaiss AK. 2003. Capítulo 20: Self-Inactivating Lentiviral Vectors and a Sensitive. *En Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. Curtis A. Machida (ed.). Humana Press Inc. New Jersey. Pág. 367-382.

Chapman JC, Polanco JR, Min S y Michael SD. 2005. Mitochondrial 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) is essential for the synthesis of progesterone by corpora lutea: an hypothesis. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 3-11.

Charreire J y Bach JF. 1975. Binding of autologous erythrocytes to immature T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3201-3205.

Cohen S, Berrih S, Dardenne M y Bach JF. 1986. Feed-back regulation of the secretion of a thymic hormone (thymulin) by human thymic epithelial cells in culture. *Thymus* 8: 109-119.

Cónsole G. 1997. Capítulo: Poblaciones adenohipofisarias. Aspectos estructurales, inmunohistoquímicos, moleculares y ultraestructurales. *En Temas de histología y embriología animal*. Ediciones Inarbite. Parte 2. Pág. 153-173.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómes Dumm CLA. 1999. Morphologic aspects of paracrine interactions between endocrine cells types and foliculo-stellate cells in adenohypophysis. *Appl Immunohistochem & Mol Morphol* 7: 142-149.

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

Cottrell EC, Campbell RE, Han SK y Herbison AE. 2006. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147: 3652-3661.

Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF y Laussac JP. 1988. NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. *J Biol Chem* 263: 5574-5580.

Dalmasso AP, Martinez C y Good RA. 1964. Capítulo 26: Studies of immunologic characteristics of lymphoid cells from thymectomized mice. *En The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease*. Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York. Pág. 478 - 491.

Dardenne M y Bach JF. 1975. The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones. *En Biological Activity of Thymic Hormones*. International Workshop and Symposium. Van Bekkum DW, Kruisbeek AM (eds). Kooyker Scientific Publications. Halsted Press Division, Wiley: Rotterdam, Netherlands. Pág. 235-243.

Dardenne M, Bach JF y Bijan Safai MD. 1983. Low serum thymic hormone levels in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl J Med* 309: 48-49.

Dardenne M, Kelly PA, Bach JF y Savino W. 1991. Identification and functional activity of Prl receptors in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9700-9704.

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

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

Dardenne M, Savino W, Gagnerault 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.

Davila DR, Brief S, Simon J, Hammer RE, Brinster RL y Kelley KW. 1987. Role of growth hormone in regulating t-dependent immune events in aged, nude and transgenic rodents. *J Neurosci Res* 18: 108-116.

Daya S y Berns KI. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21: 583-593.

De Jong RN y Van der Vliet PC. 1999. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene* 236: 1-12.

De Laporte L, Cruz Rea J y Shea LD. 2006. Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials* 27: 947-954.

Deschaux P, Massengo B, Fontanges R. 1979. Endocrine interaction of the thymus with the hypophysis, adrenals and testes: effects of two thymic extracts. *Thymus* 1: 95-108.

Dmitry M. Shayakhmetov, Andrea M. Eberly, Zong-Yi Li y André Lieber. 2005. Deletion of Penton RGD Motifs Affects the Efficiency of both the Internalization and the Endosome Escape of Viral Particles Containing Adenovirus Serotype 5 or 35 Fiber Knobs. *J Virol* 79: 1053–1061.

Dokhlar MC, Tursz T, Dardenne M y Bach JF. 1983. Effect of a synthetic thymic factor (facteur thymique serique) on natural killer cell activity in humans. *Int J Immunopharmac* 5: 277-282.

Dubé ID y Cournoyer D. 1995. Gene therapy: here to stay. *CMAJ* 152: 1605-1613.

Dunn HG, Meuwissen H, Livingstone CS y Pump KK. 1964. Ataxia-Telangiectasia. *Can Med Assoc J* 91: 1106–1118.

Eaton GJ. 1976. Hair growth cycles and wave patterns in "nude" mice. *Transplantation* 22: 217-222.

Fabris N y Mocchegiani E. 1985. Endocrine control of thymic serum factor production in young-adult and old mice. *Cell Immunol* 91: 325-335.

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

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F y Pinchera A. 1989. Thyroid-thymus interactions during development and aging. *Horm Res* 31: 85-89.

Fabris N, Pierpaoli W y Sorkin E. 1971. Hormones and the immunological capacity. IV. Restorative effects of developmental hormones or of lymphocytes on the immunodeficiency syndrome of the dwarf mouse. *Clin Exp Immunol* 9: 227-240.

Farah JM, Hall NR, Bishop JF, Goldstein AL y O'Donohue TL. 1987. Thymosin fraction 5 stimulates secretion of immunoreactive β -endorphin in mouse corticotropic tumor cells. *J Neurosci Res* 18: 140-146.

Fisher ER. 1964. Capítulo 36: Pathology of the thymus and its relation to human disease. *En The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease.* Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York. Pág. 676 -729.

Fitzpatrick FT, Greenstein BD. 1987. Effects of various steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J Endocrinol* 113: 51-55.

Fitzpatrick FT, Kendall MD, Wheeler MJ, Adcock IM y Greenstein BD. 1985. Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J Endocrinol* 106: 7-9.

Flint J. 1999. Capítulo 3: Organization of the Adenoviral Genome. *En Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. Prem Seth (ed). R.G. Landes Company, Georgetown, Texas, U.S.A. Pág. 17-27.

Flint SJ, Enquist LW, Drug RM, Racaniello VR y Skalka. 2000. Principles of Virology. Molecular Biology Pathogenesis and Control. Amer Society For Microbiology Press. Washington D.C.

Folch H, Eller G, Mena M y Esquivel P. 1986. Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of FTS level. *Cell Immunol* 102: 211-216.

Gao X, Kim KS y Liu D. 2007. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *The AAPS Journal* 9: E92-104.

García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. 2000. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J Endocrinol* 166: 381-387.

García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. 2005. Effects of injecting thymulin into the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* 12: 314-320.

Gastinel LN, Pléau JM, Dardenne M, Sasaki A, Bricas E, Morgat JL y Bach JF. 1982. High Affinity binding sites on plasma membrane obtained from the lymphoblastoid cultures 1301 cell line for highly radioactive serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 684: 117-126.

Gaufo GO y Diamond M. 1997. Thymus graft reverses morphological deficits in dorsolateral frontal cortex of congenitally athymic nude mice. *Brain Res* 756: 191-199.

Genuth SM. 1998. Parte VIII: Sistema endocrino. *En Fisiología*. Berne RM y Levy MN (eds.). Harcourt Brace de España, S.A. Madrid, España.

Giacca M. 2007. Virus-mediated gene transfer to induce therapeutic angiogenesis: where do we stand? *Int J Nanomedicine* 2: 527-540.

Glasgow JN, Everts M y Curiel DT. 2006. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 13: 830-844.

Glorioso JC y Fink DJ. 2009. Herpes vector-mediated gene transfer in the treatment of chronic pain. *Mol Ther* 17: 13-18.

Goff BL, Roth JA, Arp LH y Incefy GS. 1987. Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 68: 580-587.

Gómez Dumm C. 2003. Embriología Humana. 1ra ed. El Ateneo. Buenos Aires.

Gore AC. 2008. Developmental Programming and Endocrine Disruptor Effects on Reproductive Neuroendocrine Systems. *Front Neuroendocrinol* 29: 358-374.

Gorziglia MI, Lapceovich C, Roy S, Kang Q, Kadan M, Wu V, Pechan P y Kaleko M. 1999. Generation of an Adenovirus Vector Lacking E1, E2a, E3, and All of E4 except Open Reading Frame 3. *J Virol* 73: 6048-6055.

Goya RG, Reggiani PC, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P, Dardenne M. 2007. Thymulin gene therapy prevents the

reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E182-187.

Goya RG, Brown OA y Bolognani F. 1999. The thymus-pituitary axis and its changes during aging. *Neuroimmunomodulation* 6: 137-142.

Goya RG, Cónsole GM, Sosa YE, Gómez Dumm CLA y Dardenne M. 2001. Altered functional responses with preserved morphology of gonadotrophic cells in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 15: 85-92.

Goya RG, Gagnerault MC, Leite de Moraes MC, Savino W y Dardenne M. 1992. *In vivo* effects of growth hormone on thymus function in aging mice. *Brain Behav Immun* 6: 341-354.

Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE y Dardenne M. 1995a. Reduced ability of pituitary extracts from old mice to stimulate thymulin secretion *in vitro*. *Mech Age Dev* 83:143-154.

Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bevilacqua JA y Dardenne M. 1993. Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in aging rats. *Neuroendocrinology* 58: 338-343.

Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM y Dardenne M. 1995b. Altered thyrotropic and somatotropic responses to environmental challenges in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 9: 79-86.

Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM y Dardenne M. 1996. Altered regulation of serum prolactin in nude mice. *Med Sci Res* 24: 279-280.

Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Gottschall PE, Goldstein AL y Meites J. 1988. Differential activity of thymosin peptides (thymosin fraction 5) on plasma thyrotropin in female rats of different ages. *Neuroendocrinology* 47: 379-383.

Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Reichhart R y Meites J. 1990. Homeostatic thymus hormone stimulates corticosterone secretion in a dose- and age-dependent manner in rats. *Neuroendocrinology* 51: 59-63.

Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL y Meites J. 1987. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent thyrotropin-inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 41: 219-227.

Graham FL, Prevec L. 1992. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* 20: 363-390.

Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Adcock IM, Kendall MD, Wheeler MJ. 1986. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol* 110: 417-422.

Groscurth P, Müntener M, Tondury G. 1975. Histogenesis of the immune system of the "nude" mouse. II. Postnatal development of the thymus: a light microscopical study. *Beitr Pathol* 154: 125-139.

Hackett NR y Crystal RG. 2004. Capítulo 2: Adenovirus Vectors for Gene Therapy. *En Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. N.S. Templeton (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. Pág. 17-37.

Hadden JW. 1992. Thymic endocrinology. *Int J Immunopharmac* 14: 345-352.

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

Hall NR, McGillis JP, Spangelo BL, Goldstein AL. 1985. Evidence that thymosins and other biologic response modifiers can function as neuroactive immunotransmitters. *J Immunol* 135: 806s-811s.

Hardelin JP, Levilliers J, del Castillo I, Cohen-Salmon M, Legouis R, Blanchard S, Compain S, Bouloux P, Kirk J, Morainet C, Chaussain JL, Weissenbach J y Petit C. 1992. X chromosome-linked Kallmann syndrome: Stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8190-8194.

Harris CA, Andryuk PJ, Cline S, Chan HK, Natarajan A, Siekierka JJ y Goldstein G. 1994. Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6283-6287.

Harris GW y Levinet S. 1965. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *J Physiol* 181: 379-400.

Harrison DE, Archer JR, Astle CM. 1982. The effect of hypophysectomy on thymic aging in mice. *J Immunol* 129: 2673-2677.

He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW y Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514.

Healy DL, Bacher J y Hodgen GD. 1995. Thymic regulation of primate fetal ovarian-adrenal differentiation. *Biol Reprod* 32: 1127-33.

Healy DL, Hodgen GD, Schulte HM, Chrousos GP, Loriaux DL, Hall NR y Goldstein AL. 1983. The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* 222: 1353-1355.

Henriques-Coelho T, Oliveira SM, Moura RS, Roncon-Albuquerque R Jr., Neves AL, Santos M, Nogueira-Silva C, La Fuente Carvalho F, Brandão-Nogueira A, Correia-Pinto J y Leite-Moreira AF. 2008. Thymulin inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension modulating interleukin-6 expression and suppressing p38 pathway. *Endocrinology* 149: 4367-4373

Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM y Hurst PR. 2008. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology* 149: 597-604.

Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P y Crystal RG. 1999. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* 103: 579-587.

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

Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, Castillo L y Rosas P. 2004. Effects of thymulin and GnRH on The release of gonadotropins by pituitary cells obtained from rat in each day of estrous cycle. *Life Sci* 76: 795-804.

Hitt M, Bett AJ, Addison CL, Prevec L y Graham LF. 1995. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Methods Mol Genet* 7: 13-30.

Holland JM, Mitchell TJ, Gipson L y Whitaker MS. 1978. Survival and cause of death in aging germfree athymic nude and normal inbred C3Hf/He mice. *J Natl Cancer Inst* 61: 1357-1361.

Holub M, Vêtvicka V, Houstek J, Janikoa D, Rychter , A. Vrana, y L. Dazdova. 1989. Influence of ambient temperature on nude mouse metabolic and immune status. *En Immune-Deficient Animals in Experimental Medicine. Sixth International Workshop on Immune-Deficient Animals, Bing-quan wu and Jie Zheng, eds. Basel. Karger. Pp. 68-77.*

Holub M. 1989. *Immunology of Nude Mice*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

Holub M. 1992. Immunodeficient Rodents. The Nude Mouse. *ILAR Journal* 34: 1-2.

Imaizumi A, Gytoku J, Terada S y Kimoto E. 1981. Structural requirement for the biological activity of serum thymic factor. *FEBS Lett* 128: 108–110.

Incefy GS, Mertelsmann R, Yata K, Dardenne M y Bach JF. 1980. Induction of differentiation in human marrow T cell precursors by synthetic serum thymic factor, FTS. *Clin Exp Immunol* 40: 396-406.

Israel-Biet D, Noel LH, Bach MA, Dardenne M y Bach JF. 1983. Marked reduction of DNA antibody production and glomerulopathy in thymulin (FTS-Zn) or cyclosporin A treated (NZB x NZW) F₁ mice. *Clin Exp Immunol* 54: 359-365.

Iwata TT, Incefy GS, Cunningham-Rundles S, Cunningham-Rundles C, Smithwick E, Geller N, O'Reilly R y Good RA. 1981. Circulating thymic hormone activity in patients with primary and secondary immunodeficiency diseases. *Am J Med* 71: 385-394

Jacobs A, Breakefield XO y Fraefel C. 1999. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part I. HSV-1 structure, replication and pathogenesis. *Neoplasia* 1: 387-401.

Jean-Pierre Hardelin, Jacqueline Levilliers, Ignacio Del Castillo, Martine Cohen-Salmon, Renaud Legouis, Stéphane Blanchard, Sylvie Compain, Pierre Bouloux, Jeremy Kirkt, Claude Morainet, Jean-Louis Chaussain, Jean Weissenbach, And Christine Petit. X chromosome-linked Kallmann syndrome: Stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8190-8194.

Józkowicz A y Dulak J. 2005. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol* 52: 589-599.

Kaiserlian D, Dujic A, Dardenne M, Bach JF, Blanot D y Bricas E. 1981. Prolongation of murine skin grafos by FTS and its synthetic analogues. *Clin Exp Immunol* 45: 338-343.

Kanaan SA, Safieh-Garabedian B, Karam M, Khansa H, Jabbur SJ, Jurjus AR y Saadé NE. 2002. Thymulin reduces the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. *Brain Behav Immun* 16: 450-460.

Katayose D y Seth P. 1999. Capítulo 10: Development of Adenoviral Vectors for Gene Therapy. *En Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. Prem Seth (ed). R.G. Landes Company, Georgetown, Texas, U.S.A. Pág. 91-99.

Kohda Y, Matsunaga Y, Yonogi K, Kawai Y, Awaya A y Gemba M. 2005. Protective effect of serum thymica factor, FTS, on cephaloridine-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 28: 2087-2091.

Kook AI y Trainin N. 1974. Hormone-like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in lymphoid cells. *J Exp Med* 139: 193-207.

Krasnykh VN, Douglas JT y van Beusechem VW. 2000. Genetic targeting of adenoviral vectors. *Mol Ther* 1: 391-405.

Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S y Polonsky KS. 2002. Williams Textbook of Endocrinology. Sección 2. Saunders. Philadelphia, PA, USA. Pág. 81-281.

Laussac JP, Cung MT, Padeloup M, Haran R, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M y Bach JF. 1986. NMR study of thymulin, a lymphocyte differentiating thymic nonapeptide. *The journal of biochemical chemistry* 261: 7784-779.

Ledwitz-Rigby F y Scheid PG. 1991. Thymulin modulates porcine granulosa cell responsiveness to Gonadotrophins *in vitro*. In: *Signaling Messages and Gene Expression in the Ovary*. G. Gibori, (ed.) Springer-Verlag, New York. Pág. 473-478.

Li S y Huang L. 2007. Non-viral is superior to viral gene delivery. *Journal of Controlled Release* 123: 181-183.

Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R y Sempowski GD. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30: 366-373.

Maestroni GJ, Conti A y Pierpaoli W. 1988. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 63: 465-469.

Maione D, Della Rocca C, Giannetti P, D'Arrigo R, Liberatoscioli L, Franlin LL, Sandig V, Ciliberto G, La Monica N y Savino R. 2001. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5986-5991.

Malik P y Arumugam PI. 2005. Gene Therapy for beta-thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 45-50.

McGeer PL y McGeer EG. 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10:S3-7.

McGeer PL y McGeer EG. 2004. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10: S3-S7.

McGillis JP, Hall NR, Vahouny GV y Goldstein AL. 1985. Thymosin fraction 5 causes increased serum corticosterone in rodents *in vivo*. *J Immunol* 134: 3952-3955.

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

Metreau E, Pléau JM, Dardenne M, Bach JF, Pradelles P. 1987. An enzyme immunoassay for synthetic thymulin. *J Immunol Meth* 102: 233-242.

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

Michael SD, Taguchi O y Nishizuka Y. 1981. Changes in hypophyseal hormones associated with accelerated aging and tumorigenesis of the ovaries in neonatally thymectomized mice. *Endocrinology* 108: 2375-2380.

Milenkovic L y McCann SM. 1992. Effects of thymosin alpha-1 on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology* 55: 14-19.

Miller JFAP. 1964. Capítulo 24: Effect of thymic ablation and replacement. *En The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease*. Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York. Pág. 436 - 464.

Mink JG, Radl J, van den Berg P, Haaijman JJ, van Zwieten MJ y Benner R. 1980. Serum immunoglobulins in nude mice and their heterozygous littermates during aging. *Immunology* 40: 539-545.

Mizutani M, El-Fotouh M, Mori M, Ono K, Doi K, Awaya A, Matsumoto Y, Matsumoto Y y Onodera T. 1996. *In vivo* administration of serum thymic factor (FTS) prevents EMC-D virus-induced diabetes and myocarditis in BALB/cAJcl mice. *Arch Virol* 141: 73-83.

Mocchegiani E, Amadio L y Fabris N. 1990a. Neuroendocrine-thymus interactions. I. In vitro modulation of thymic factor secretion by thyroid hormones. *J Endocrinol Invest* 13: 139-147.

Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E y Fabris N. 1990b. Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* 33: 7-14.

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.

Morale MC, Batticane N, Bartoloni G, Guarcello V, Farinella Z, Galasso MG y Marchetti B. 1991. Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune responses. *Endocrinology* 128: 1073-1085.

Morel GR, Brown OA, Reggiani PC, Hereñú CB, Portiansky EL, Zuccolilli GO, Pleau JM, Dardenne M y Goya RG. 2006. Peripheral and mesencephalic transfer of a synthetic gene for the thymic peptide thymulin. *Brain Res Bull* 69: 647-651.

Müller E. 1975. Histochemical studies of 3 beta- and 20alpha-hydroxysteroiddehydrogenase in the adrenals and ovaries of the nu/nu mouse. *Histochemistry* 43: 51-57.

- Mulligan RC. 1993. The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
- Nagai Y, Osanai T y Sakakibara K. 1982. Intensive suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by serum thymic factor and therapeutic implication for multiple sclerosis. *Jpn J Exp Med* 52: 213-219.
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz K, Schüddekopf K, Smith AJH y Boehm T. 1996. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 272: 886-889.
- Ng P y Baker MD. 1999. The molecular basis of multiple vector insertion by gene targeting in mammalian cells. *Genetics* 151: 1143-1155.
- Nishizuka Y y Sakakura T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166: 753-755.
- Nishizuka Y y Sakakura T. 1971. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* 89: 889-893.
- Oates KK y Goldstein AL. 1984. Thymosins: hormones of the thymus gland. *Trends Pharm Sci* 5: 347-352.
- Palacios R, Fernandez C y Sideras P. 1982. Development and continuous growth in culture of interleukin-2 producer lymphocytes from athymic nu/nu mice. *Eur J Immunol* 12: 777-782.
- Palaszynski EW, Moody TW, O'Donohue TL, Goldstein AL. 1983. Thymosin alpha 1-like peptides: localization and biochemical characterization in the rat brain and pituitary gland. *Peptides* 4: 463-467.
- Pantelouris EM y Hair J. 1970. Thymus dysgenesis in *nude* (nu nu) mice. *J Embryol exp Morph* 24: 615-623.
- Patil SD, Rhodes DG y Burgess DJ. 2005. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* 7: E61-77.
- Pierpaoli W y Besedovsky HO. 1975. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin Exp Immunol* 20: 323-328.
- Pierpaoli W y Sorkin E. 1972. Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice congenital absence of thymus. *Nat New Biol* 238: 282-285.
- Pierpaoli W, Bianchi E y Sorkin E. 1971. Hormones and the immunological capacity. V. Modification of growth hormone-producing cells in the adenohypophysis of neonatally thymectomized germ-free mice: an electron microscopical study. *Clin Exp Immunol* 9: 889-901.
- Pierpaoli W, Fabris N y Sorkin E. 1970. Developmental hormones and immunological maturation. *Ciba Found Study Group* 36: 126-53.
- Pierpaoli W, Kopp HG y Bianchi E. 1976. Interdependence of thymic and neuroendocrine functions in ontogeny. *Clin Exp Immunol* 24: 501-506.
- Pléau JM, Dardenne M y Bach JF. 1981. The serum thymic factor (FTS). Chemical and biological aspects. *Mol Cell Biochem* 41: 67-72.

Pléau JM, Dardenne M, Blanot D, Bricas E y Bach JF. 1979. Antagonistic analogue of serum thymic factor (FTS) interacting with the FTS cellular receptor. *Immunol Lett* 1:179-182.

Pléau JM, Dardenne M, Blouquit Y y Bach JF. 1977. Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. *J Biol Chem* 252: 8045-8047.

Pléau JM, Fuentes V, Morgat JL y Bach JF. 1980. Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2861-2865.

Precious B y Russell WC. 1985. Growth, purification and titration of adenoviruses. En Mahy BWJ (Ed.) *Viriology: a practical approach*. IRL Press. Oxford, UK. Pág. 193-205.

Puntel M, Curtin JF, Zirger JM, Muhammad AK, Xiong W, Liu C, Hu J, Kroeger KM, Czer P, Sciascia S, Mondkar S, Lowenstein PR, Castro MG. 2006. Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes *in vitro* and *in vivo*, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Hum Gene Ther* 17: 531-544.

Ramachandra M y Padmanabhan R. 1999. Capítulo 6: Adenovirus DNA Replication. En *Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. Prem Seth (ed). R.G. Landes Company, Georgetown, Texas, U.S.A. Pág. 59-67.

Räty JK, Pikkarainen JT, Wirth T y Ylä-Herttuala S. 2008. Gene Therapy: The First Approved Gene-Based Medicines, Molecular Mechanisms and Clinical Indications. *Curr Mol Pharmac* 1: 13-23.

Rebar RW, Miyake A, Low TL, Goldstein AL. 1981a. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 214: 669-671.

Rebar RW, Morandini IC, Benirschke K y Petze JE. 1980. Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* 107: 2130-2132.

Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF y Petze JE. 1981b. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice. *Endocrinology* 108: 120-126.

Rebar RW, Morandini IC, Petze JE y Erickson GF. 1982. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol Reprod* 27: 1267-1276.

Relph K, Harrington K y Pandha H. 2004. Recent developments and current status of gene therapy using vectors in the United Kingdom. *BMJ* 329: 839-842.

Rinaldi-Garaci C, Garaci E, Del Gobbo V, Favalli C, Jezzi T y Goldstein AL. 1983. Modulation of endogenous prostaglandins by thymosin-alpha 1 in lymphocytes. *Cell Immunol* 80: 57-65.

Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli Jr F, Wilson JM y Gilman M. 1999. Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8657-8662.

Rygaard J. 1973. *Thymus and Self-immunobiology of the Mouse Mutant Nude*. Copenhagen: F.A.D.L.

Saadé NE, Atweh SF, Jabbur SJ, Dardenne M, Bach JF y Safieh-Garabedian B. 2003. A thymulin analogue peptide with powerful inhibitory effects on pain of neurogenic origin. *Neuroscience* 119: 155-165.

Sadler TW. 2001. Embriología médica. Con orientación clínica de Langman. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Kanaan SA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE. 2000. The role of cytokines and prostaglandin-E(2) in thymulin induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 39: 1653-1661.

Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Pléau JM y Saadé NE. 2002. Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. *Br J Pharmacol* 136: 947-955.

Safieh-Garabedian B, Kendall MD, Khamashta MA y Hughes GRV. 1992. Thymulin and its role in immunomodulation. *J. Autoimm* 5: 547-555.

Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad CA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE. 2003. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience* 121: 865-873.

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

Sambrook J y Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 3ra Edición.

Savino W y Dardenne M. 1986. Thymic hormone-containing cells. VIII. Effects of colchicine, cytochalasin B, and monensin on secretion of thymulin by cultured human thymic epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 34: 1719-1723.

Savino W y Dardenne M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Rev* 21: 412-443.

Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T y Dardenne M. 1988. Thymic hormone containing cells. IX. Steroids *in vitro* modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 30: 479-484.

Savino W, Dardenne M y Bach JF. 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.

Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S y Dardene 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: 629-63.

Schaffer DV, Koerber JT y Lim K. 2008. Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles. *Annu Rev Biomed Eng* 10: 169-194.

Schlake T, Schorpp M, Nehls M y Boehm T. 1997. The *nude* gene encodes a sequence-specific DNA binding protein with homologs in organisms that lack an anticipatory immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3842-3847.

Schmitt D, Monier JC, Dardenne M, Pléau JM, Deschaux P y Bach JF. 1980. Cytoplasmic localization of FTS (facteur thymique sérique) in thymic epithelial cells. An immunoelectromicroscopical study. *Thymus* 2: 177-186.

Schneider-Schaulies J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 81: 1413-1429.

Sherman JD y Dameshek W. 1964. Capítulo 30: Post-thymectomy wasting disease of the golden hamster. *En* The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease. Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York. Pág. 542-550.

Strich G, Petze JE, Silva de Sa MF y Rebar RW. 1985. The effects of thymus-derived peptides on hypothalamic LRF and pituitary gonadotropin content in prepubertal congenitally athymic nude mice and their normal heterozygous littermates. *J Reprod Immunol* 7: 351-359.

Sundaresan P, Hunter WD, Martuza RL y Rabkin SD. 2000. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J Virol* 74: 3832-3841.

Terasawa E. 2006. Postnatal Remodeling of Gonadotropin-Releasing Hormone I Neurons: Toward Understanding the Mechanism of the Onset of Puberty. *Endocrinology* 147: 3650-3651.

Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF y Dardenne M. 1992. Growth hormone and Insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endoc Metab* 75: 183-188.

Tobet SA y Schwarting GA. 2006. Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Endocrinology* 147: 1159-1165.

Villa-Verde DMS, Mello-Coelho V, Farias de Oliveira DA, Dardenne M y Savino W. 1993. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 133: 867-875.

Wan YP, Folkers K. 1979. Synthesis of the facteur thymique sérique and an analogue also related to thymopoietin. *Bioorganic Chem* 8: 35-39.

Watson DJ y Wolfe JH. 2003. Capítulo 21: Lentiviral Vectors for Gene Transfer to the Central Nervous System: Applications in Lysosomal Storage Disease Animal Models. *En* Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols. Curtis A. Machida (ed.). Humana Press Inc. New Jersey. Pág. 383-404.

Waynforth HB y Flecknell PA. 1992. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press. London, UK, Second Edition.

Weinstein Y. 1978. Impairment of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis of the athymic "nude" mouse. *Mech Ageing Dev* 8: 63-68.

Weiser MJ, Foradori CD y Handa RJ. 2008. Estrogen Receptor Beta in the Brain: From Form to Function. *Brain Res Rev.* 57: 309-320.

Whitley RJ y Roizman B. 2002. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest.* 110: 145-151.

Wise T y Ford JJ. 1999. Effects of the thymic peptide thymulin on *in vitro* and *in vivo* testicular steroid concentrations in White Composite and Meishan boars. *J Anim Sci* 77: 2240-2251.

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

Wolfe D, Goins WF, Fink DJ, Burton EA, Kriskey DM y Glorioso JC. 2004. Capítulo 6: Engineering Herpes Simplex Viral Vectors for Therapeutic Gene Transfer. *En Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. N.S. Templeton (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. Pág. 103-130.

Worgall S y Cristal RG. 2007. Capítulo 34: Gene Therapy. *En Principles of Tissue Engineering*. Lanza R, Langer R y Vacanti J (eds.). Elsevier, Inc. Academic Press. New York. Pág. 471-492.

Wortis HH, Nehlsen S y Owen JJ. 1971. Abnormal development of the thymus in "nude" mice. *J Exp Med* 134: 681-692.

Wray S y Hoffman G. 1986. Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology* 43: 93-97.

Yamanouchi T, Moromizato H, Kojima S, Shinohara T, Sekino N, Minoda S, Miyashita H y Akaoka I. 1994. Prevention of diabetes by thymic hormone in alloxan-treated rats. *Eur J Pharmacol* 257: 39-46.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E y Wilson JM. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4407-4411.

Yang Y, Xiang Z, Ertl HC y Wilson JM. 1995. Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7257-7261.

Yara S, Kawakami K, Kudeken N, Tohyama M, Teruya K, Chinen T, Awaya A y Saito A. 2001. FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. *Clin Exp Immunol* 124: 77-85.

Yeh P y Perricaudet M. 1997. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 11: 615-623.

Zaidi SA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT. 1988. The release of LH from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 12: 253-264.

Zhao XH, Awaya A, Kobayashi H, Ohnuki T, Tokumitsu Y y Nomura Y. 1990. Effects of repeated administrations of facteur thymique sérique (FTS) on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mouse (SAM). *Jpn J Pharmacol* 53: 311-319.