



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

**EFFECTOS MORFOLÓGICOS DE LA TERAPIA GÉNICA  
RESTAURADORA DE LA TIMULINA SOBRE LA  
ADENOHIPÓFISIS DE RATONES ATÍMICOS**

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

***Autora: Médica Eliana Vanesa Martines***

***Dirección de Tesis: Prof. Dra. Gloria Miriam Cónsole***

***Co-dirección de Tesis: Dra. María Virginia Croce***

**2012**

*Dedicado a la memoria de la  
Prof. Dra. Haydeé Celia Sosa*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi más sincero y profundo agradecimiento para...*

La **Prof. Dra. Gloria Cónsole**, por brindarme dedicación, apoyo, enseñanza y ejemplo constantes en cada paso de mi Doctorado y en la preparación de esta Tesis; aún a la distancia, siempre estuvo presente.

La **Prof. Dra Virginia Croce**, por su acompañamiento y la formación recibida en el estudio de los aspectos inmunológicos del presente diseño experimental.

El **Prof. Dr. Rodolfo Goya** y todo su equipo de trabajo, por su aporte en los valiosos experimentos de construcción de vectores adenovirales que hicieron posible la terapia génica pituitaria.

El **Prof. Dr. Juan Basualdo**, por orientarme y guiarme en la fase inicial de mi Carrera y de mi Doctorado.

El **Dr. Abraham Acosta**, Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Adventista del Plata (UAP), y todo el equipo de Investigación de la UAP, por haberme dado apoyo y el soporte material imprescindible para llevar adelante mi Tesis Doctoral.

La **Dra. Paula Reggiani**, quien con gran paciencia y admirable ejemplo, me ha abierto un camino para trabajar en este tema.

El **Personal de la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología** de la Facultad de Ciencias Médicas del la UNLP, en especial al Personal de Apoyo (CIC-CONICRE): Celia Ferese, María Isabel Bracamonte, Georgina Luna, Mónica Carino y a la Docente-Investigadora Dra. Gisela Camihort, por la ayuda técnica y científica brindada durante el desarrollo de la Tesis.

El **Personal de la Cátedra de Patología B** de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, por permitirnos el uso del Espectrofotómetro para realizar parte de los experimentos.

A **Dios**, por ser mi sustento en todo momento, dándome las fuerzas necesarias para desempeñarme de la mejor manera.

***Eliana Martines***

# TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b><u>RESUMEN</u></b> .....	10
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	12
1.1. EL EJE HIPOFISARIO-TÍMICO .....	12
1.1.1. El eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco .....	12
1.1.2. La hipófisis .....	15
1.1.2.1. La adenohipófisis .....	17
1.1.3. El timo .....	27
1.1.4. Las hormonas tímicas .....	29
1.1.5. Importancia de la integridad tímica en el período perinatal .....	31
1.1.6. El sistema inmuno-neuroendócrino .....	33
1.2. TIMULINA .....	37
1.2.1. Generalidades .....	37
1.2.2. Propiedades biológicas de la timulina .....	41
1.2.3. Control neuroendócrino de la secreción de la timulina .....	46
1.2.4. Potencial terapéutico de la timulina .....	50
1.3. MODELOS ANIMALES DE TIMODEFICIENCIA .....	51
1.3.1. El ratón congénitamente atímico: <i>nude</i> .....	51
1.3.2. Los animales timectomizados (Tx) .....	56
1.4. TERAPIA GÉNICA .....	57
1.4.1. Aspectos generales .....	57
1.4.2. Los vectores adenovirales (Ad) y adenovirales recombinantes RAd..	60
<b>2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b> .....	67
<b>3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	69
3.1. DISEÑO DE LOS VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES PORTADORES DEL GEN DE LA TIMULINA PARA APLICAR EN TERAPIA GÉNICA PITUITARIA.....	69
3.1.1. Características generales del sistema de construcción .....	69

3.1.2. Construcción de los vectores para aplicar en terapia génica pituitaria .....	70
3.1.3. Obtención, purificación y titulación de RAd- <i>met</i> FTS para aplicar en terapia génica pituitaria.....	73
3.2. PROTOCOLOS DE MANEJO DE ANIMALES Y TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.....	74
3.2.1. Animales .....	74
3.2.2. Inoculación de los vectores: estereotaxia pituitaria y vía i.m. ....	75
3.2.3. Disección quirúrgica de las hipófisis bajo lupa .....	76
3.2.4. Diseño Experimental: Terapia génica pituitaria con RAd-FTS y RAd-GFP .....	76
3.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS Y MORFOMÉTRICAS.....	78
3.3.1. Reactivos .....	78
3.3.2. Antisueros .....	78
3.3.3. Procesado histológico-corte-coloración .....	78
3.3.4. Inmunohistoquímica .....	78
3.5.5. Morfometría mediante videomicroscopía .....	79
3.4. DETERMINACIONES HORMONALES .....	79
3.4.1. Bioensayo de las rosetas .....	79
3.4.2. Dosaje de la timulina .....	81
3.4.3. Radioinmunoensayos (RIA) séricos de las hormonas hipofisarias ...	81
3.5. ESTUDIO INMUNOLÓGICO .....	82
3.5.1. Valoración de la inmunidad humoral mediante espectrofotometría...	82
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	82
3.6.1. Métodos estadísticos .....	82
<b>4. RESULTADOS</b> .....	83
4.1. APLICACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN DE LA TIMULINA RAd- <i>met</i> FTS .....	83
4.2. NIVELES SÉRICOS DE TIMULINA EN RATONES <i>NUDE</i> SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA CON RAd-FTS .....	84
4.3. EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON RAD-FTS SOBRE LA MORFOLOGÍA ADENOHIPOFISARIA EN RATONES <i>NUDE</i> .....	86
4.3.1. La población lactotropa .....	86

4.3.2. La población somatotropa .....	88
4.3.3. La población tirotrópica .....	90
4.3.4. La población corticotropa .....	92
4.3.5. La población folículo-trópica .....	94
4.3.6. La población luteotropa .....	96
4.4. NIVELES SÉRICOS DE LH Y FSH EN RATONES SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA NEONATAL .....	98
4.5. MEDICIÓN DE INMUNOGLOBULINA G EN SUERO DE RATONES <i>NUDE</i> .....	99
<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	100
Efectividad de la terapia génica neonatal RAd-FTS en un modelo de ratones <i>nude</i> .....	100
El eje timo-lactotrópico .....	101
El eje timo-somatotrópico .....	102
El eje timo-tirotrópico .....	103
El eje timo-corticotrópico .....	104
El eje timo-gonadotrópico .....	106
<b>6. <u>CONCLUSIÓN</u></b> .....	108
<b>7. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	109
<b>8. <u>PUBLICACIONES ELABORADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL</u></b> .....	122
Publicaciones .....	122
Comunicaciones .....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAV: virus adenoasociados.  
ACTH: adrenocorticotrofina.  
Ad: adenovirus.  
ADN: ácido desoxirribonucleico.  
AP: adenohipófisis.  
AR: artritis reumatoidea.  
ARN: ácido ribonucleico.  
ATx: adultos timectomizados.  
cAMP: adenosín-monofosfato celular.  
CAR: virus Coxsackie.  
CER: cefaloridina.  
CET: células epiteliales tímicas.  
CFU-L: células madre linfoideas multipotenciales.  
cGMP: guanosín-monofosfato celular.  
CRH: hormona liberadora de corticotropina.  
Da: Dalton.  
DAB: diaminobencidina.  
DC: densidad de células.  
DV: densidad de volumen.  
E-CFR: células formadoras de rosetas de eritrocitos.  
eCG: gonadotropina coriónica equina.  
EM: esclerosis múltiple.  
ERK: proteín-kinasa activada por mitógenos.  
ET: endotoxina.  
FCN: factor de crecimiento neural.  
FSH: hormona folículoestimulante.  
FTH: factor tímico humoral.  
FTS: factor tímico sérico o timulina.  
GH: hormona del crecimiento.  
GH<sub>3</sub>: línea de células epiteliales hipofisarias que secretan GH y PRL.  
GHRH: hormona liberadora de GH.

HTH: hormona homeostática tímica.  
HTLA: antígenos de LT humanos.  
Hv: herpesvirus.  
IgA: inmunoglobulina A.  
IGF-I: factor de crecimiento insulino-símil tipo I.  
IgG: inmunoglobulina G.  
IgM: inmunoglobulina M.  
IL: interleuquinas.  
LB: linfocitos B.  
LES: lupus eritematoso sistémico.  
LH: hormona luteinizante.  
LHRH: hormona liberadora de LH.  
LPH- $\beta$ : lipotropina beta.  
LT: linfocitos T.  
LTc: linfocitos T citotóxicos.  
LTh: linfocitos T helper (colaboradores).  
LTs: linfocitos T supresores.  
mCMV: citomegalovirus murino.  
MSH: hormona estimulante de melanocitos.  
NK: células asesinas naturales.  
NTx: neonatalmente timectomizados.  
NZB: ratones autoinmunes de Nueva Zelandia.  
PAT: péptido sintético análogo de la timulina.  
PFU/ml: unidades formadoras de placa/ml.  
PM: peso molecular.  
PG: prostaglandinas.  
PNA: aglutinina de maní.  
POMC: proopiomelanocortina.  
PRL: prolactina.  
rhGH: hormona de crecimiento humana recombinante.  
RIA: radioinmunoensayo.  
Rv: retrovirus.  
SEM: error estándar de la media.  
SNC: sistema nervioso central.



SOD: superóxido dismutasa.  
T<sub>3</sub>: tri-iodotironina.  
T<sub>4</sub>: tetra-iodotironina.  
Tx: timentomizado.  
TC: tamaño celular.  
TdT: deoxiribonucleotidil transferasa terminal.  
TGNT: terapia génica neonatal con timulina.  
TRH: hormona liberadora de tirotrópina.  
TSH: hormona tirotrópica.  
VIP: péptido intestinal vasoactivo.  
WHN: winged helix nude.

## **RESUMEN**

**Introducción.** La integridad tímica en el período perinatal es necesaria para la maduración del eje hipofisario-tímico. La timulina es producida por las células epiteliales tímicas (CET). Consiste en un nonapéptido biológicamente inactivo denominado FTS (factor tímico sérico), acoplado al ion zinc, que le confiere actividad biológica. Participa en la diferenciación de los linfocitos T. Los niveles circulantes de esta hormona se encuentran disminuidos durante el envejecimiento normal y en patologías como el SIDA y el síndrome de DiGeorge. Existen evidencias de que la timulina posee actividad hipofisotrófica mediante un eje bidireccional hipofisario-tímico: las CET poseen receptores para las hormonas hipofisarias, y la timulina estimula la liberación de las hormonas hipofisarias LH, FSH, PRL, TSH, ACTH y GH. El ratón congénitamente atímico *nude* (homocigota) carece de un timo funcional, presentando deficiencias inmunológicas y disfunciones neuroendócrinas. Dado que hasta el momento, no se ha podido clonar el gen de la timulina, la terapia génica neonatal constituye un desafío tecnológico que pretende transferir un gen portador de la timulina (RAd-FTS) para corregir alteraciones morfológicas y séricas en los ratones congénitamente atímicos.

**Objetivo general.** Implementar una terapia génica pituitaria neonatal mediante el vector adenoviral portador del gen sintético para timulina (RAd-FTS), con el fin de prevenir deficiencias en las poblaciones adenohipofisarias, en los niveles séricos de la timulina y de las hormonas hipofisarias de ratones *nude*.

**Materiales y Métodos.** Se construyeron un vector adenoviral recombinante portador del gen sintético para la timulina (RAd-FTS) y un vector control portador de la proteína fluorescente verde (RAd-GFP), especialmente ajustados para la terapia génica pituitaria. Se utilizó la progenie de ratones *nude* machos homocigotas (nu/nu) y de hembras heterocigotas (nu/+). Al día 1 postnatal, cada ratón recibió una única inyección bilateral i.m. (en los

muslos traseros) de  $10^8$  unidades formadoras de placas (pfu) de RAd-FTS o RAd-GFP. En el día 71 postnatal los ratones fueron sacrificados. Se midió la timulina sérica y las hormonas hipofisarias. Se extrajeron las pituitarias y se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para las hormonas hipofisarias e histomorfométricas mediante videomicroscopía para determinar los parámetros: *densidad de células* (DC), *densidad de volumen* (DV) y *tamaño celular* (TC).

**Resultados.** La terapia génica neonatal con el vector adenoviral recombinante, portador del gen de la timulina (RAd-FTS), indujo en ratones *nude* adultos una restauración significativa en los niveles séricos de la timulina y en los parámetros morfológicos DC, DV y TC de las diferentes poblaciones adenohipofisarias, comparando con ratones atímicos tratados con el vector control RAd-GFP.

**Conclusión.** La terapia génica neonatal con RAd-FTS en ratones *nude* adultos previno el déficit de la timulina sérica y restauró los parámetros morfológicos en las poblaciones endócrinas de la *pars distalis*. Esto señala a la timulina como un importante mediador fisiológico en la influencia perinatal del timo sobre la maduración del eje hipofisario-tímico.

Los datos registrados en la presente Tesis Doctoral sugieren que la terapia génica neonatal con un vector portador de la timulina podría usarse como una estrategia efectiva para abordar los déficits asociados con las disfunciones del eje timo-hipofisario.

\* Las publicaciones elaboradas a partir de la presente Tesis Doctoral pueden verse en el punto 8 de la Tabla de Contenidos, a fin de facilitar la evaluación del trabajo de la Doctorando.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### **1.1. EL EJE HIPOFISARIO-TÍMICO**

#### **1.1.1. El eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco**

##### **- Nivel hipotalámico:**

El hipotálamo es una parte del sistema nervioso central (SNC), está localizado en el piso del diencefalo, formando las paredes laterales y ventrales del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis (pituitaria), a la cual está unida por el tallo hipofisario. Está constituido por varios núcleos, cuyas células sintetizan y secretan distintos péptidos estimuladores o inhibidores de la hipófisis. Constituye un puente vital entre el SNC y el sistema endócrino, regulando la actividad de las glándulas hipófisis, suprarrenales, tiroides y gónadas, así como el crecimiento tisular, la lactancia y el equilibrio hidrosalino. Además, interviene en otras funciones tales como la regulación de la temperatura corporal y en el control del apetito.

En el hipotálamo se secretan neurotransmisores y hormonas que pueden ser efectores o reguladores. Entre los neurotransmisores se hallan: dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, ácido gamma-amino-butírico (GABA), histamina, opiáceos y péptidos. Las hormonas efectoras oxitocina y antidiurética (ADH) son producidas por el sistema magnocelular (núcleos supraóptico y paraventricular).

Las hormonas reguladoras son sintetizadas en el sistema parvocelular, cuyas neuronas se encuentran distribuidas en distintos núcleos y áreas del hipotálamo. Sus axones forman el haz túbero-infundibular que termina en la una red de capilares de la eminencia media, donde se liberan de manera intermitente factores hipotalámicos estimuladores e inhibidores. Las hormonas hipofisotrópicas hipotalámicas (HHH) son transportadas por el

sistema porta hipotálamo-hipofisario hasta la adenohipófisis (hipófisis anterior, AP) donde se encuentran sus células diana.

Las HHH comprenden: hormona inhibidora de la secreción de GH o somatostatina (GHI), hormona estimulante de la secreción de GH (GHRH), factores liberadores e inhibidores de la secreción de PRL, hormona estimulante de la secreción de TSH (TRH), hormona estimulante de la secreción de gonadotropinas: LH y FSH (GnRH) y hormona estimulante de la secreción de ACTH (CRH). Algunas de las HHH no han sido aisladas aún, pero se conocen sus efectos regulatorios sobre la adenohipófisis. Se han descrito mecanismos de retroalimentación hipotálamo-hipofisarios que permiten la regulación de los diferentes niveles (**Fig. 1**).

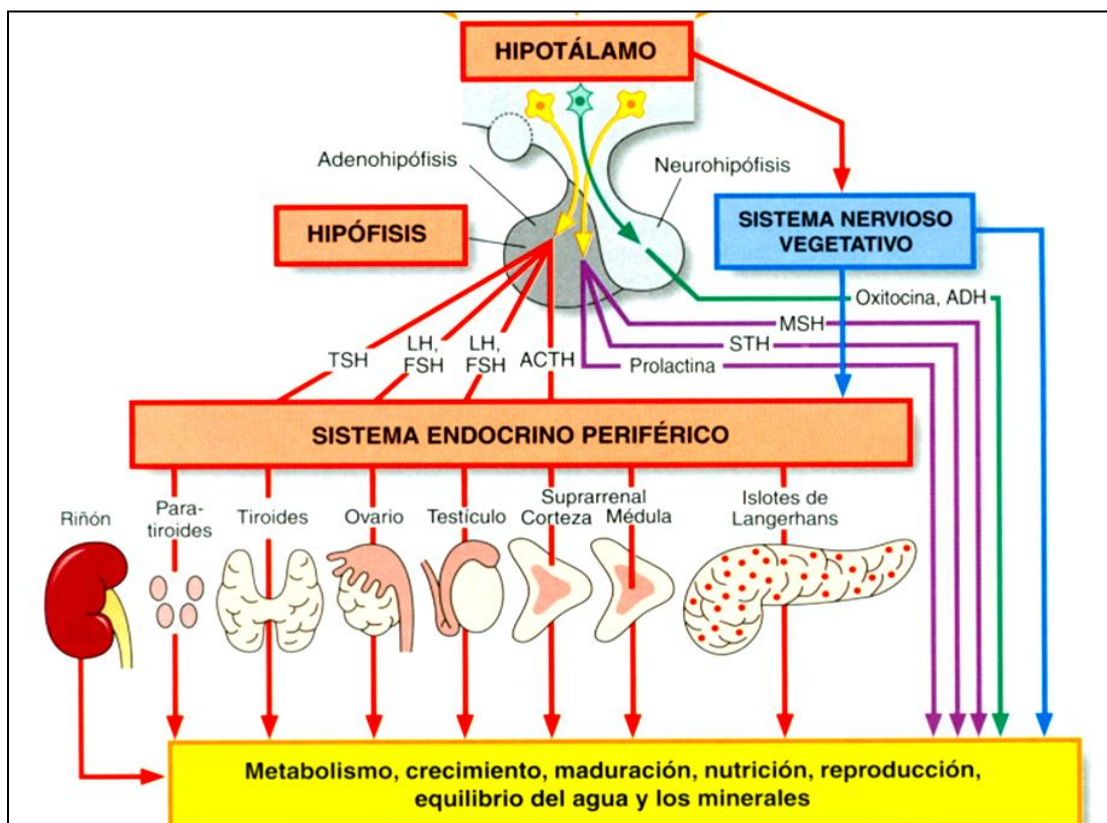


Figura 1. Esquema del eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco (Welsch, 2009).

- **Nivel hipofisario:** La adenohipófisis sintetiza y libera a la circulación sanguínea seis hormonas hipofisarias (HH): *hormona de crecimiento o somatotropina* (GH o STH), *prolactina* (PRL), *hormona corticotropina* (ACTH), *hormona tirotrópica* (TSH), *hormona folículo-estimulante* (FSH) y *hormona luteinizante* (LH), todas ellas de naturaleza peptídica. La regulación

de su secreción se encuentra determinada en buena medida por el propio hipotálamo. Por su parte, la neurohipófisis almacena y libera las hormonas *oxitocina* y ADH o *vasopresina*, provenientes del hipotálamo (neurocrinia) (Fig. 2).

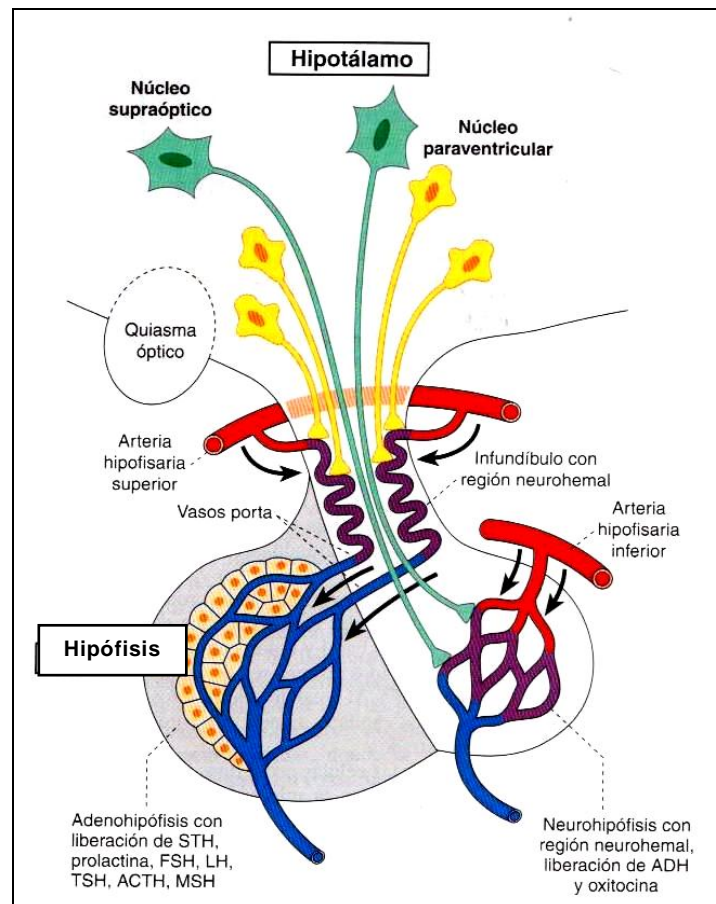


Figura 2. Esquema del eje hipotálamo-hipofisario (Welsch, 2009).

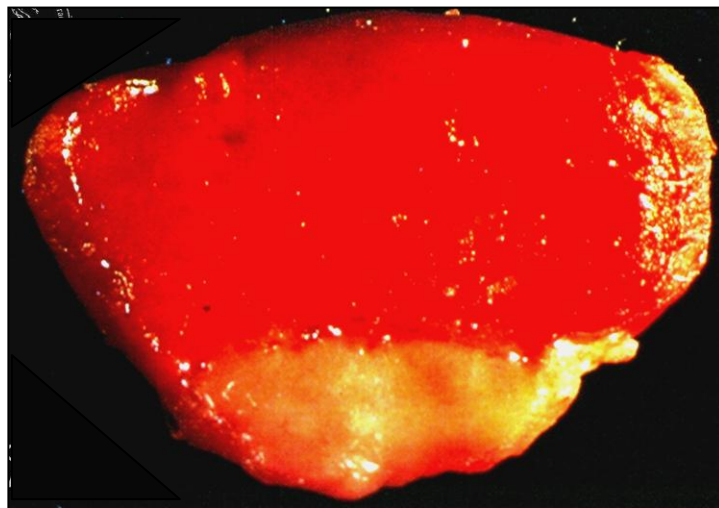
- **Nivel del órgano blanco:** cada una de las hormonas de la hipófisis tiene uno o más blancos localizados en otras glándulas, órganos y tejidos. Un sistema de retrocontrol regula la función endócrina en diferentes niveles: liberación de las hormonas hipotalámicas, de las hormonas hipofisarias, y de las hormonas en los órganos blanco (ejemplos: *estrógenos*, *progesterona*, *andrógenos*, *hormonas tiroideas*, *glucocorticoides*). La concentración de hormona circulante producida en un órgano diana puede actuar directamente sobre las células adenohipofisarias o hipotalámicas para regular su secreción. Los tres niveles de retrocontrol permiten una gran sensibilidad en la regulación de la función endócrina.

### 1.1.2. La hipófisis

La *hipófisis o pituitaria* es una glándula endócrina compuesta que cumple una función integradora neuroendócrina, regulando glándulas periféricas y tejidos blanco hormono-dependientes. Actúa sobre el metabolismo, la reproducción y el crecimiento tisular.

#### - **Características anatómicas y embriológicas:**

Se localiza en la zona central de la base del cerebro y se halla alojada en una concavidad del esfenoides denominada silla turca (**Fig. 3**). Está revestida por la duramadre que le forma una cápsula en la porción intraselar y una cubierta superior que constituye el *diafragma selar*. El mismo permite el paso del *tallo infundibular* que la une al hipotálamo.

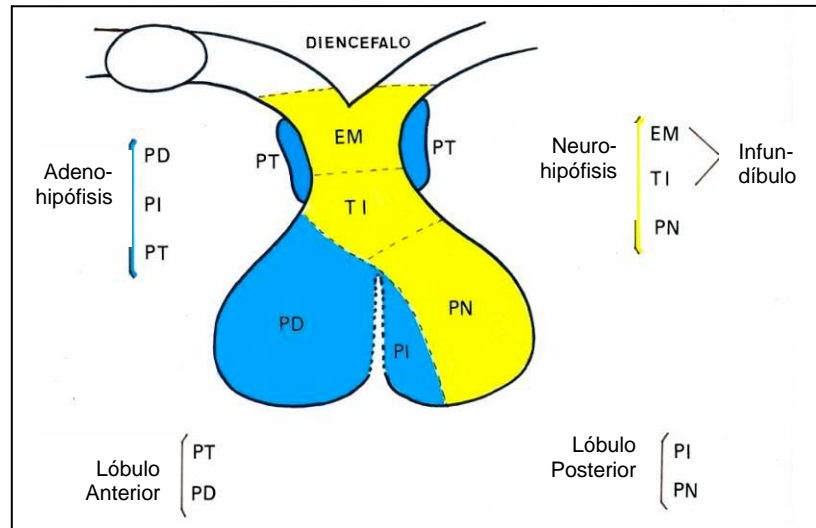


**Figura 3. Macroscopía hipofisaria: adeno y neurohipófisis.**

En el humano, mide aproximadamente 1 cm de longitud, 1-1.5 cm de ancho y 0.5 cm de alto. Pesa 0.5 a 0.9 g en el adulto, con incremento en los períodos de gestación y lactancia.

Pueden reconocerse dos subdivisiones principales con varias porciones cada una: 1) la *adenohipófisis* formada por el lóbulo anterior o *pars distalis* (PD), el lóbulo intermedio o *pars intermedia* (PI) y el lóbulo infundíbulo-tuberal o *pars tuberalis* (PT) y 2) la neurohipófisis formada por la eminencia media (EM), el tallo infundibular (TI) y el lóbulo posterior o *pars neural* (PN) (**Fig. 4**).

Ambas porciones tienen un origen embriológico diferente. La *adenohipófisis* deriva de la bolsa de Rathke, una evaginación del ectodermo oral localizada en el estomodeo. La *neurohipófisis* es de origen nervioso y surge en el piso del diencefalo, como una extensión del hipotálamo, que se contacta con la bolsa de Rathke.

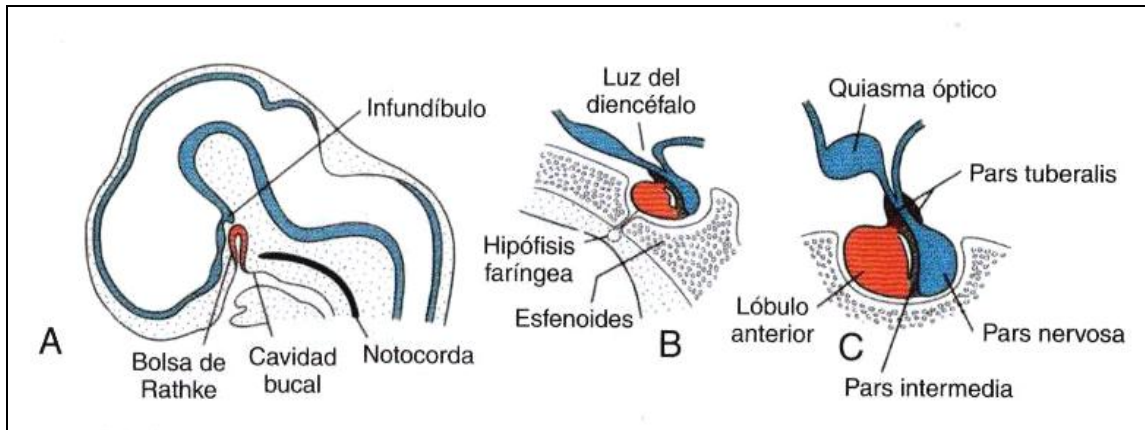


**Figura 4. Esquema de las regiones hipofisarias.**

La irrigación, proveniente de dos grupos de arterias, es peculiar, dado que la arteria hipofisaria superior origina vasos porta que llegan desde un plexo capilar primario a un plexo capilar secundario en la *pars distalis*. Este sistema vascular explica por qué las hormonas hipotalámicas, aún siendo secretadas en cantidades muy bajas, llevan a cabo su función sobre la adenohipófisis de una forma eficiente, ya que antes de diluirse en la circulación sistémica, llegan concentradas a la adenohipófisis.

La adenohipófisis desarrolla varios tipos celulares que se originan de una célula madre común cuyo desarrollo fenotípico es determinado por factores pituitarios específicos del desarrollo, tales como factores de transcripción, receptores de superficie y señales hipotalámicas y/o periféricas (Rosenfeld y col., 1996; Mengalam y col., 1989; Theill y Karin, 1993; Ray y Melmed, 1997) (Fig. 5).





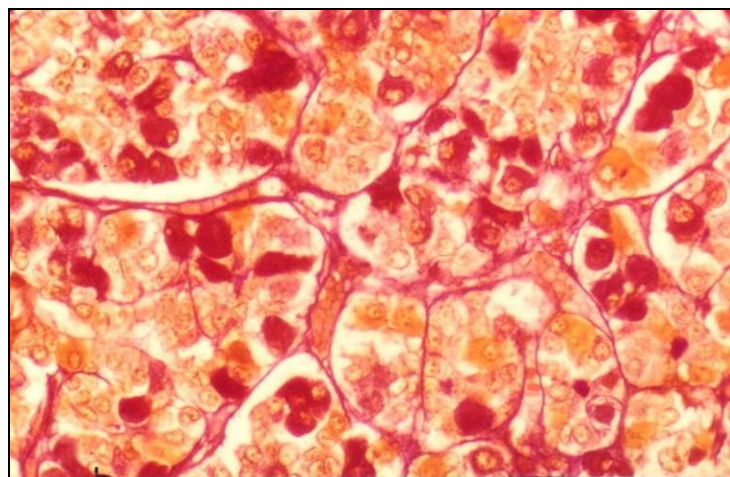
**Figura 5. Esquema de la embriología hipofisaria.**

**A.** Corte sagital de zona cefálica a las 6 semanas. **B, C.** Cortes sagitales de hipófisis en desarrollo en semanas 11 y 16 respectivamente (Sadler, 2008).

**- Características estructurales y funcionales:**

**1.1.2.1. La adenohipófisis**

Al realizar la observación microscópica, la mayor parte del lóbulo anterior de la hipófisis exhibe una histoarquitectura cordonal y una rica red sinusoidal (**Figs. 6 y 7**).



**Figura 6. Vista de *pars distalis* en adenohipófisis.**

PAS-Orange, 400x. Células somatotropas y lactotropas: orange positivas. Resto de células: PAS positivas. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

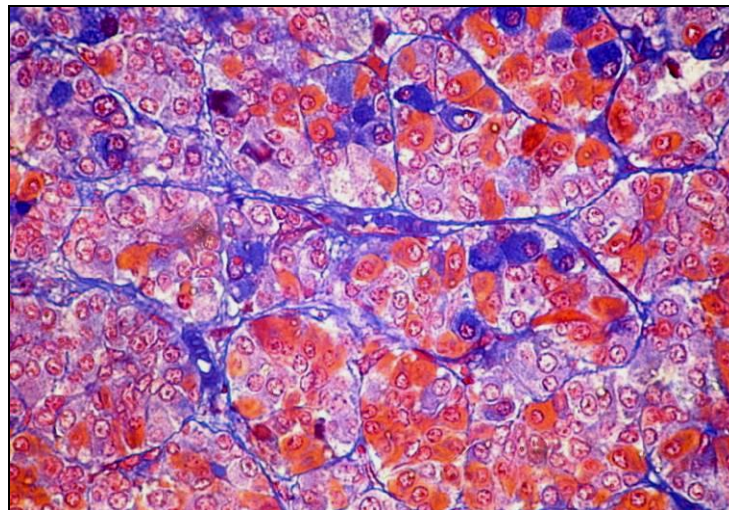
Las células se distribuyen en cordones irregulares, separados por capilares fenestrados de diámetro relativamente grande. Con la microscopía de luz, pueden observarse diferentes tipos celulares.

## **Poblaciones celulares adenohipofisarias:**

- ***Pars distalis***: La hipófisis anterior es una glándula endócrina productora de seis hormonas tróficas: corticotropina o ACTH, hormona de crecimiento o GH, prolactina o PRL, tirotropina o TSH, hormona folículo estimulante o FSH y hormona luteinizante o LH. Cada una de estas hormonas es expresada por un tipo celular altamente diferenciado que se han clasificado de acuerdo a sus características tintoriales, utilizando mezclas de colorantes ácidos y básicos. Las células que se colorean se denominan *cromófilas* y pueden ser *acidófilas* o *basófilas*. Las células que no se colorean se denominan *cromófobas*.

### **1) Células cromófilas:**

Son las que se colorean con los colorantes. Se dividen en acidófilas y basófilas.



**Figura 7. Vista de la *pars distalis*.**

Tetracromico de Herlant, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

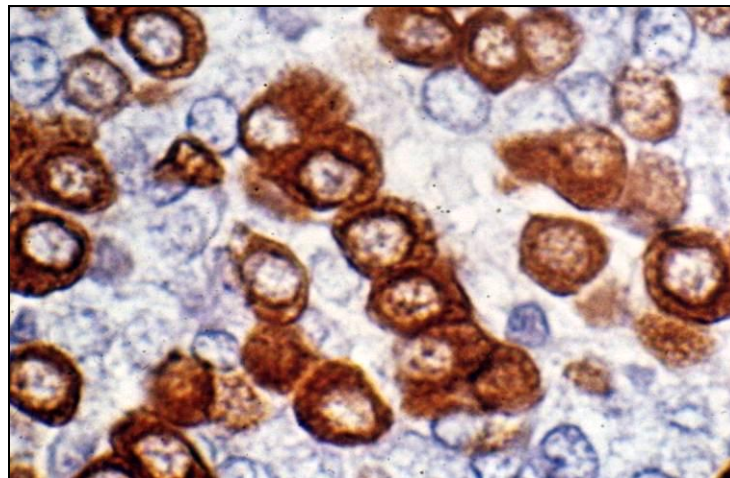
### ***Población somatotropa:***

a) **Microscopía de luz**: Son las células más voluminosas (12 a 16  $\mu\text{m}$ ) y presentan forma ovoidea a esférica. Constituyen la población más numerosa (del orden del 50% en machos y 30% en hembras). Secretan GH, proteína

de peso molecular (PM) 21500 Dalton (Da). Son de localización difusa, de modo que el muestreo al azar resulta representativo. Presentan núcleos redondeados y algo excéntricos. En las zonas con granulaciones poco numerosas, se observa una zona clara correspondiente al Golgi.

b) **Coloración histoquímica:** con hematoxilina-eosina son células acidófilas y el Orange-G las tiñe de color naranja.

c) **Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ):** las células somatotropas presentan un patrón citoplasmático granular difuso, de color ocre si se usa diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las reacciones son antígeno (GH)-anticuerpo (suero anti-GH). Algunas células se ven más cargadas de gránulos (células oscuras) y otras con menos gránulos (células claras). Estas técnicas han significado un gran avance debido a la especificidad en la respuesta al anticuerpo anti-GH utilizado (**Fig. 8**).



**Figura 8. Células somatotropas marcadas con suero anti-GH.**  
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

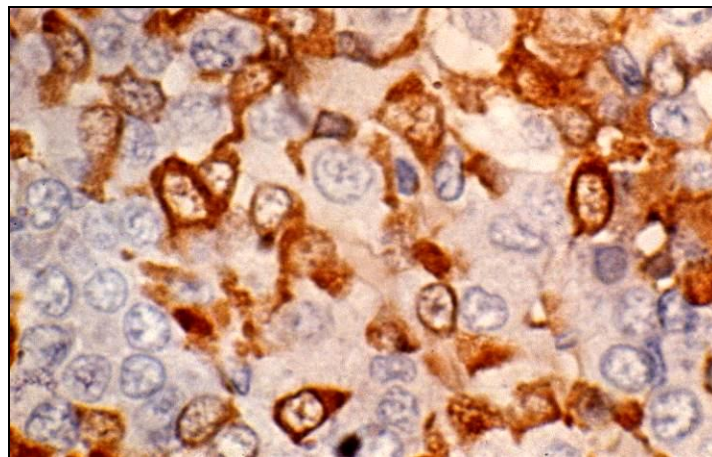
### ***Población lactotropa:***

a) **Microscopía de luz:** Aparecen como una población abundante (40% en hembras y 20% en machos). Presentan forma y tamaño heterogéneos. Algunas tienen forma poligonal alargada con cortas prolongaciones, con diámetro promedio de 12 a 14  $\mu\text{m}$ . La distribución es difusa, aunque se alude a un ligero predominio en las regiones póstero-laterales de la *pars distalis*. Secretan PRL, proteína de PM 23500 Da. Algunas células, en plena

actividad secretoria, tienen gran número de granulaciones; otras muestran gránulos dispersos y una zona golgiana bien delimitada. Los núcleos son grandes, de localización central y contienen un nucléolo voluminoso.

b) **Coloración histoquímica:** mediante la hematoxilina-eosina son células acidófilas y se tiñen de naranja con el Orange-G. Para diferenciarlas de las somatotropas, es necesario recurrir a la eritrosina que permite teñirlas de rojo.

c) **Técnicas IHQ:** las células lactotropas muestran un patrón granular citoplasmático, variando el color según el cromógeno empleado en el revelado de la reacción (suero anti-PRL) (**Fig. 9**). Pueden utilizarse métodos comunes o amplificadas con peroxidasa o fosfatasa alcalina.



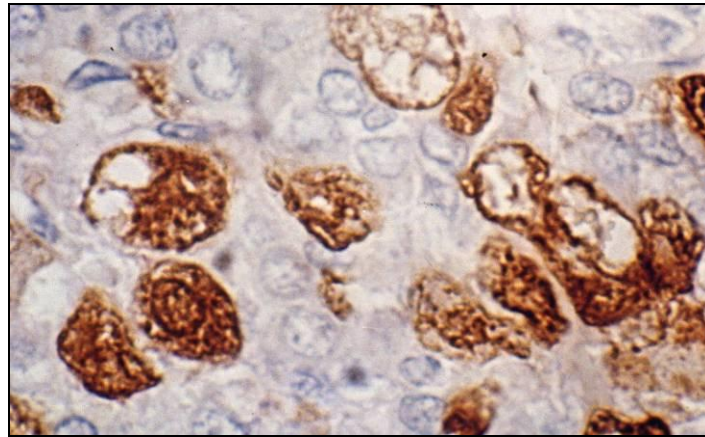
**Figura 9. Células lactotropas marcadas con suero anti-PRL.**  
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

### ***Población folículo­tropa:***

a) **Microscopía de luz:** junto con las luteinizantes constituyen un 10% de la *pars distalis*. Secretan FSH, glicoproteína de PM 31500 Da. Presentan un aspecto redondeado y un diámetro promedio de 15  $\mu\text{m}$ . Tienen un núcleo esférico, rico en eucromatina y, a menudo, excéntrico. Se distribuyen en grupos irregulares en toda la *pars distalis*.

b) **Coloración histoquímica:** con la hematoxilina-eosina se muestran como células basófilas. Son PAS (prueba con el ácido periódico de Schiff) y azul alcian positivas; con el tetracromo de Herlant se tiñen de azul claro.

c) **Técnicas IHQ:** se observan células redondeadas con cierto grado de vacuolización citoplasmática. Los gránulos secretorios se inmunomarcán de modo específico cuando al antígeno (FSH) se le agrega anticuerpo anti-FSH (fracción beta) (**Fig. 10**).



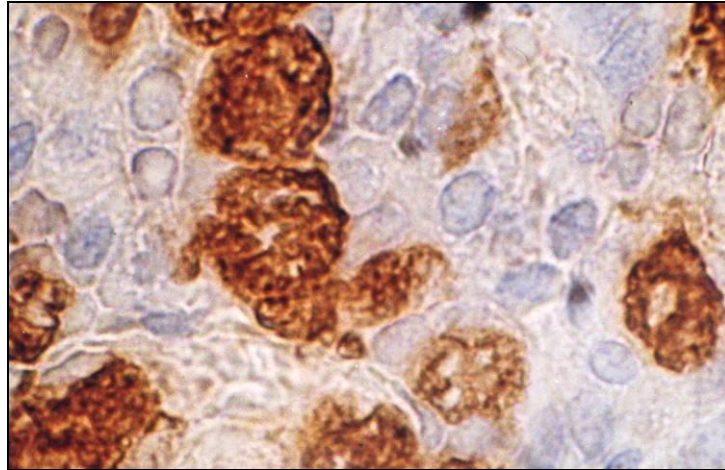
**Figura 10. Células folículo-tropas marcadas con suero anti-FSH.**  
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

#### ***Población luteotropa:***

a) **Microscopía de luz:** representan, con las células folículo-tropas, un 10% del total de la *pars distalis*. Secretan LH, glicoproteína de PM 28260 Da. Tienen distribución irregular en toda la *pars distalis*, con tendencia a la localización periférica ventral. Presentan un aspecto globular, pero son más pequeñas que las folículo-tropas (menos de 9  $\mu\text{m}$  de diámetro). Los núcleos son redondeados y, a veces, excéntricos.

b) **Coloración histoquímica:** son basófilas cuando se tiñen con hematoxilina-eosina. Resultan azul alcian y PAS positivas. Con el tetracromo de Herlant toman color púrpura.

c) **Técnicas IHQ:** se observan células redondeadas con cierto grado de vacuolización citoplasmática. El citoplasma muestra gránulos de secreción inmuno-reactivos (antígeno: LH-anticuerpo: fracción beta anti-LH) (**Fig. 11**).



**Figura 11. Células luteotropas marcadas con suero anti-LH.**

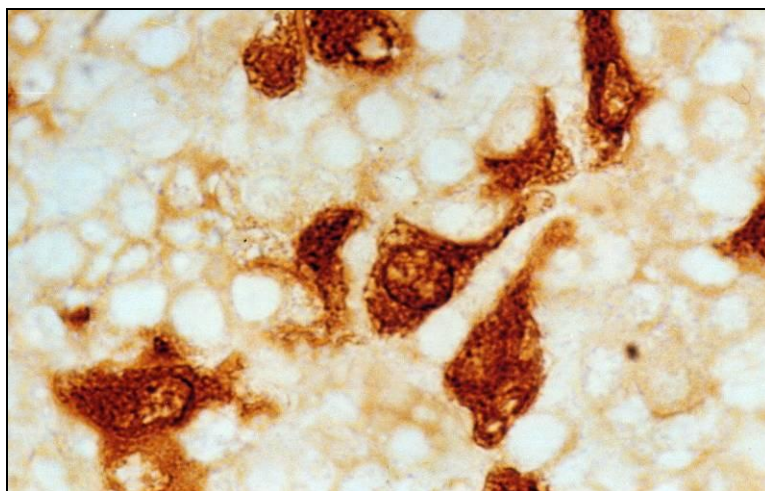
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

***Población tirotrópica:***

a) **Microscopía de luz:** constituyen la población menos numerosa (menos del 5% del total). Secretan TSH, glicoproteína de PM 28000 Da. Miden unos 10  $\mu\text{m}$ , son poligonales y presentan núcleos esféricos. Predominan en la región ventro-medial.

b) **Coloración histoquímica:** en la hematoxilina-eosina aparecen basófilas. Son azul alcian y PAS positivas. Con la aldehído-fucsina se tiñen de violeta y con el tetracromo de Herlant toman color azul intenso.

c) **Técnicas IHQ:** se inmunomarcán como células poligonales angulares. Las granulaciones del patrón citoplásmico difuso muestran especificidad ante el suero anti-TSH (**Fig. 12**).



**Figura 12. Células tirotropas marcadas con suero anti-TSH.**

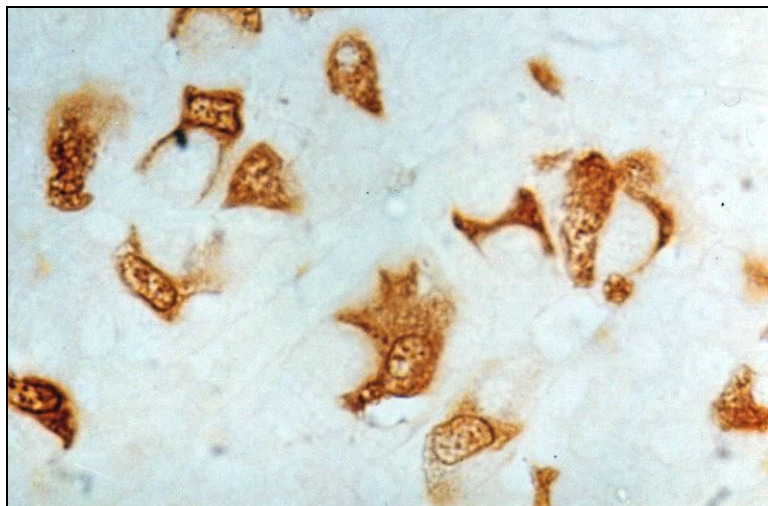
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

### ***Población corticotropa:***

a) **Microscopía de luz:** constituyen del 15 al 20% de la población de la *pars distalis*. Secretan ACTH, proteína de PM 4507 Da, obtenida por escisión del precursor POMC (*propiomelanocortina*). Predominan en la zona centro-dorsal de la *pars distalis*, aunque forman grupos dispersos de localización irregular. Son globulares con algunas prolongaciones y tienen un diámetro aproximado de 12 a 14  $\mu\text{m}$ . Presentan núcleos algo excéntricos con un pequeño nucléolo.

b) **Coloración histoquímica:** en la hematoxilina-eosina se tiñen como basófilas. Son PAS positivas. Con el tetracromo de Herlant toman azul intenso. A fin de diferenciar tirotropas de corticotropas, es necesario efectuar una hematoxilina plúmbica que las tiñe de color azul-negro.

c) **Técnicas IHQ:** se detectan como células positivas irregulares con prolongaciones cortas. Los gránulos secretorios citoplasmáticos se inmunomarcaban al unirse el antígeno (ACTH) con el anticuerpo (anti-ACTH) y se evidencian con el cromógeno correspondiente (**Fig. 13**).



**Figura 13. Células corticotropas marcadas con suero anti-ACTH.**  
Cromógeno: DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

### **2) Células cromófobas:**

No se colorean, ya que carecen de gránulos secretorios.

a) **Microscopía de luz:** representan un 50% con respecto a las células cromófilas descritas. Se las ve irregulares y con ausencia de gránulos secretorios.

b) **Coloración histoquímica:** no se tiñen frente a los diversos colorantes utilizados para explorar los distintos tipos celulares cromófilos.

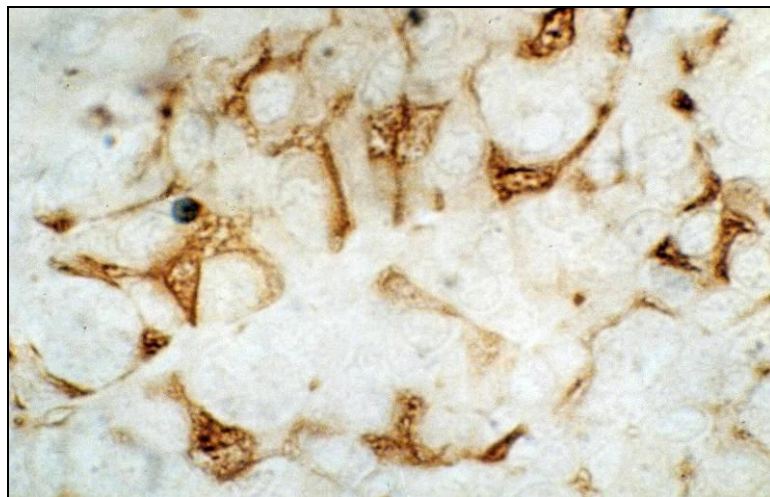
c) **Técnicas IHQ:** resultan negativas debido a la escasez o ausencia de gránulos secretorios.

***Células folículo-estelares:***

a) **Microscopía de luz:** no son detectadas de modo particular. Pertenecen al grupo de las células cromófobas.

b) **Coloración histoquímica:** no se tiñen con los colorantes marcadores de células cromófilas, por lo que engrosan el grupo de células cromófobas.

c) **Técnicas IHQ:** se observan células irregulares estrelladas que presentan reacción a la proteína anticuerpo S<sub>100</sub> y a la GFAP (proteína gliofibrilar ácida) (**Fig.14**).



**Figura 14. Células folículo-estelares marcadas con suero anti-S<sub>100</sub>.**  
Coloreadas con DAB, 400x. Microfotografía cedida por la Prof. Dra. G. Cónsole.

Algunas de las prolongaciones envuelven a las células secretorias. Se relacionan especialmente con las células gonadotropas, corticotropas y tirotropas.



### **Patrón de histoarquitectura característico y secreción hormonal:**

Los diversos tipos celulares descritos se disponen en *cordones*, existiendo una rica red de capilares fenestrados.

La co-localización de hormonas hipofisarias puesta en evidencia mediante técnicas inmunohistoquímicas permite estudiar las relaciones entre las diferentes poblaciones endócrinas entre sí y la población de células folículo-estelares.

Las células lactotropas se relacionan especialmente con las células gonadotropas. En algunos casos, una lactotropa está completamente rodeada de gonadotropas.

Las células somatotropas son envueltas por largas prolongaciones de células corticotropas. Las células tirotropas tienen afinidad topográfica por las células somatotropas.

Las células gonadotropas reaccionan simultáneamente para sueros anti-FSH y anti-LH (fracción beta) en un 80%. El 20% restante se inmunomarca para uno de los dos antisueros. Estas hormonas serían producidas en fases diferentes del ciclo secretor de una única población gonadotropa (Cónsole y col., 1997).

Un grupo de células respondería co-localizando PRL y GH y se denominan *células mamosomatotropas*. De acuerdo a estímulos hipotalámicos y factores paracrinos intraglandulares, se activarían una de las dos líneas celulares, constituyendo el grupo mamosomatotrofo un paso de conversión bidireccional. Estos hallazgos deben ser precisados mediante la inmunohistoquímica electrónica simultánea, con partículas de oro marcadoras de diferentes tamaños para cada tipo hormonal co-localizado (Cónsole y col., 1997).

En la **Tabla 1** se reseñan las principales funciones de las hormonas adenohipofisarias.

**Tabla 1.** Células endócrinas y principales acciones de las hormonas adenohipofisarias.

<b>Hormona</b>	<b>Células</b>	<b>Acciones principales</b>
<b>GH</b>	Somatotropas Mamosomatotropas	Estimulan la síntesis proteica y la lipólisis. Induce el crecimiento de los huesos largos por división de los discos epifisarios y músculos esqueléticos: GH→somatomedina: IGF-I. Inducen el crecimiento corporal.
<b>PRL</b>	Lactotropas Mamosomatotropas	Promueven la lactancia. Favorecen la absorción de calcio en el intestino y moviliza el calcio óseo.
<b>LH</b>	Luteotropas	Regulan la maduración del folículo ovárico, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Estimulan esteroidogénesis y la secreción de andrógenos (células de Leydig).
<b>FSH</b>	Folículotropas	Estimulan la ovogénesis y la espermatogénesis.
<b>TSH</b>	Tirotropas	Estimulan el crecimiento de las células tiroideas. Liberan tiroglobulina y hormonas tiroideas.
<b>ACTH</b>	Corticotropas	Estimulan la secreción de glucocorticoides y gonadocorticoides (zonas fasciculada y reticular de la corteza suprarrenal respectivamente).

La hipófisis es una glándula que regula el crecimiento somático. Los factores de crecimiento locales también median el desarrollo, regulando la función y la organización celular de la hipófisis anterior. Dichos factores de crecimiento y citoquinas, además de mediar la división celular, regulan la expresión de genes específicos de las hormonas tróficas.

Por lo tanto, esta red de señales intrahipofisarias provee otro nivel de control integrado con señales centrales y periféricas que modulan la secreción de hormonas tróficas y la proliferación celular. Los factores de crecimiento hipofisarios, por ejemplo, el factor de crecimiento insulina similar tipo I (IGF-I), presentan una función dual: regulan el desarrollo-replicación celular y controlan la expresión de genes de diferenciación. La mayoría de los factores de crecimiento hipofisarios parecen ser sintetizados por las células endócrinas secretoras de hormonas tróficas (Ray y Melmed, 1997; Halper y col. 1992; Thapar y col., 1995).

- **Pars intermedia:** en ratas y otros mamíferos se hallan células epiteliales grandes y poligonales, con buen desarrollo del retículo endoplásmico y del

Golgi. Tienen gránulos secretorios de 200-250 nm de desigual densidad electrónica.

Secretan POMC que se escinde para dar *lipotropina* ( $\beta$ -LPH) y dos formas (alfa y beta) de *hormona estimulante de melanocitos* (MSH). En anfibios y reptiles la MSH produce oscurecimiento de la piel. En mamíferos se induciría la síntesis de melanina. La *pars intermedia* humana involuciona tomando aspecto quístico.

- ***Pars tuberalis***: presenta cordones de células secretorias en disposición longitudinal, en una red capilar ricamente ramificada. Predominan las células gonadotropas y secundariamente, se hallan células corticotropas y tirotropas. Se observan algunos nidos de células escamosas, a partir de los cuales pueden desarrollarse quistes.

- ***Pars neural***: forma parte del lóbulo posterior y de la neurohipófisis. Está compuesta por los axones provenientes de los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos y por pituicitos (astrocitos).

### 1.1.3. El timo

- ***Origen, características estructurales y funcionales***: El timo es un órgano linfopitelial ubicado en el mediastino anterior. Deriva bilateralmente de la tercera bolsa faríngea. Durante el desarrollo embrionario humano, el epitelio endodérmico faríngeo se invagina y el esbozo tímico crece caudalmente dentro del mediastino. Al desarrollarse, pierde conexión con el epitelio faríngeo (Sadler, 2008), luego es revestido e invadido por mesénquima derivado de las crestas neurales que origina la cápsula y las trabéculas. La interacción entre las crestas neurales y el componente endodérmico se hace necesaria para que éste último se diferencie y funcione (**fig. 15**).

Las células madre linfoides multipotenciales (CFU-L) de la médula ósea cuyo destino es convertirse en linfocitos T (LT) inmunocompetentes invaden el esbozo epitelial como protimocitos y ocupan los espacios entre las células epiteliales, formando las zonas cortical y medular (Gómez Dumm y col., 2003), de manera que el timo se transforma en un órgano linfopitelial.

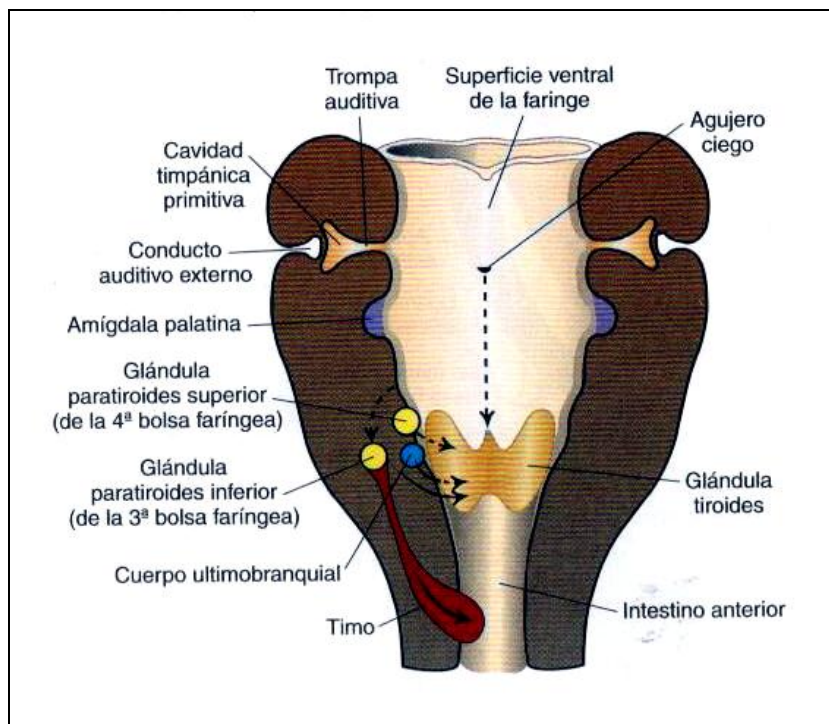
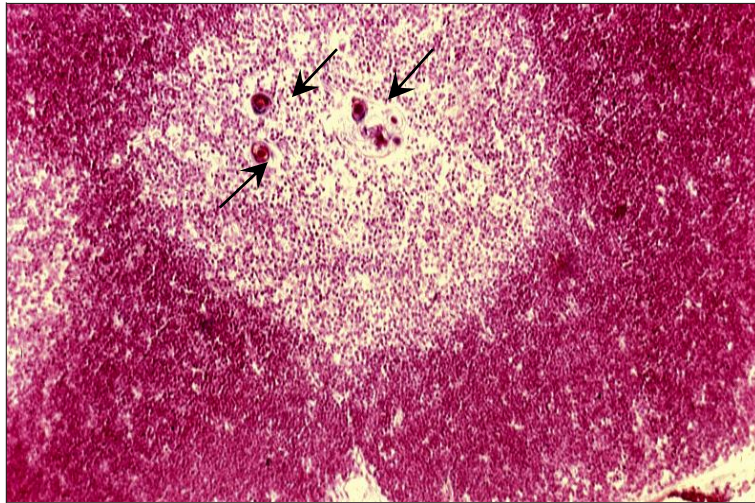


Figura 15. Esquema del desarrollo y migración del timo (Sadler, 2008).

Estructuralmente, el timo posee una cápsula desde la cual se extienden trabéculas hacia el interior del parénquima, delimitando regiones llamadas *lobulillos tímicos* que presentan *médula* y *corteza*. Estas regiones son casquetes de corteza sobre porciones de tejido medular central. El parénquima tímico contiene LT en desarrollo que ocupan los espacios en una malla estromal extensa de *células retículo-epiteliales tímicas* (CET) (**Fig. 16**). Se reconocen seis tipos de CET según su función, tres en la corteza (I a III) y tres en la médula (IV a VI). También en la médula se encuentran los *corpúsculos de Hassall*, que son componentes multicelulares, exclusivos del timo y están compuestos por masas aisladas de CET tipo VI, consideradas involutivas y dispuestas concéntricamente.

Los estudios al microscopio electrónico de transmisión permiten la detección de gránulos de queratohialina, entre otros. Aunque su función no se conoce bien, se cree que los corpúsculos de Hassall producen interleuquinas (IL-4 e IL-7) que actúan en la diferenciación y educación de los LT en el timo (Ross, 2007).



**Figura 16. Microfotografía del timo humano de un niño.**  
H-E, 25x. Corteza (coloreada) y médula (clara) con corpúsculos de Hassall (flechas).

#### **1.1.4. Las hormonas tímicas**

Desde hace aproximadamente un siglo, se postuló que el timo posee un rol endócrino. Actualmente, las CET son consideradas el componente endócrino del timo debido a que producen y secretan interleuquinas (IL) y péptidos bioactivos (hormonas tímicas).

La diferenciación de los LT comprende una serie de eventos que comienzan con un precursor linfóide y culminan con un LT 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 LT y sus precursores inmaduros: la inducción de marcadores antigénicos y la promoción de varias de las funciones de los LT. Las preparaciones principales, parcialmente purificadas del timo bovino y de la sangre, estudiadas inicialmente fueron: la timosina- $\alpha$ 1, el factor tímico humoral- $\gamma$ 2 (FTH), la timopoyetina y la timulina o factor tímico sérico (FTS) (**Tabla 2**).

Según criterios endocrinológicos y fisiológicos, la timopoyetina y la timulina pueden ser reconocidas como verdaderas hormonas tímicas. Ambas son exclusivamente producidas por las CET e inducen la diferenciación de los LT (Bach y col., 1991).

**Tabla 2.** Péptidos tímicos y sus principales acciones.

<b>Péptidos tímicos</b>	<b>Acciones principales</b>
<b>Timosina-<math>\alpha</math>1</b>	Induce la expresión de antígenos Thy 1-2 y Iy1 1-2-3 en la diferenciación de los LT.  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).
<b>Factor tímico humoral <math>\gamma</math>2 (FTH- <math>\gamma</math>2)</b>	Otorga reactividad inmunológica a las poblaciones de linfocitos no competentes (Kook y Trainin, 1974).  Aumenta la proliferación de LT y la secreción IL-2 en el bazo de ratones NTx (Bach y col., 1991).
<b>Timopoyetina</b>	Promueve varias de las funciones de los LT (Bach y Dardenne, 1988).
<b>Timulina (FTS-Zn)</b>	Acciones varias: ver descripción en apartado 1.2.

El mecanismo de acción de las hormonas tímicas aún no ha sido del todo aclarado. Sin embargo, la maduración inmune de células linfoides derivadas del timo después de la exposición *in vitro* e *in vivo* al FTH ocurre rápido mediante una vía que incrementa los niveles intracelulares de cAMP y actuaría como un requerimiento indispensable (Kook y Trainin, 1974).

En experimentos *in vitro*, se observó que la incubación de los timocitos con la timosina fracción 5 indujo un aumento en los niveles intracelulares de cGMP y la entrada de calcio. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que un incremento de cGMP calcio-dependiente mediaría la maduración y la activación de linfocitos tímicos y esplénicos (Oates y Goldstein, 1984).

En otros estudios, se observó que tanto la timosina fracción 5 como la timosina- $\alpha$ 1 estimularon la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> en linfocitos inmaduros derivados del bazo de ratones adultos timentomizados (ATx) o del timo de ratones intactos (Rinaldi-Garaci y col., 1983). La timosina puede afectar la vía de la lipoxigenasa y, tal vez, modular la síntesis de leucotrienos (Oates y Goldstein, 1984). La timopoyetina se une a los receptores de membrana plasmática presentes en los protimocitos y en los LT maduros induciendo la estimulación de la adenilato o la guanidilato ciclasa,

respectivamente. Otros estudios sugirieron que la timopoyetina podría unirse al receptor de acetilcolina.

#### **1.1.5. Importancia de la integridad tímica en el período perinatal**

En el momento del nacimiento, el timo está funcionando y bien formado. Persiste como un órgano grande aproximadamente hasta el momento de la pubertad, cuando la proliferación y la diferenciación de los LT se reducen y la mayor parte del tejido linfático es reemplazado por tejido adiposo. No se conoce bien la causa de la “atrofia” pospuberal, pero esta involución se asocia con el aumento de las hormonas sexuales (Welsch, 2009). El timo es una de las primeras glándulas en atrofiarse, y en consecuencia, declina la inmunidad timo-dependiente con la edad. También puede ser reestimulado en situaciones en las que se necesite una proliferación rápida de los LT. Existen factores que pueden contribuir con la disminución del tamaño del timo, tales como las infecciones, la malnutrición, las experiencias traumáticas y el estrés (Fisher, 1964) (**fig. 17**). La pérdida de un timo funcionando durante la infancia resulta en un deterioro del número de LT y de la inmunidad mediada por células.

La actividad tímica aberrante en adultos está normalmente asociada con una inmunodeficiencia selectiva que se manifiesta en distintas enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas, pudiendo ocasionar un deterioro de los subtipos de LT (Oates y Goldstein, 1984). Un caso severo de deficiencia tímica es el síndrome de DiGeorge, considerado como el prototipo de las inmunodeficiencias mediadas por células (Kornfeld, 2000), descrito en 1965. Es una enfermedad causada por una malformación congénita con 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 por migración defectuosa de las células de la cresta neural. Esta inmunodeficiencia se caracteriza por el bajo número de LT, entre otras anomalías (Sadler, 2008).

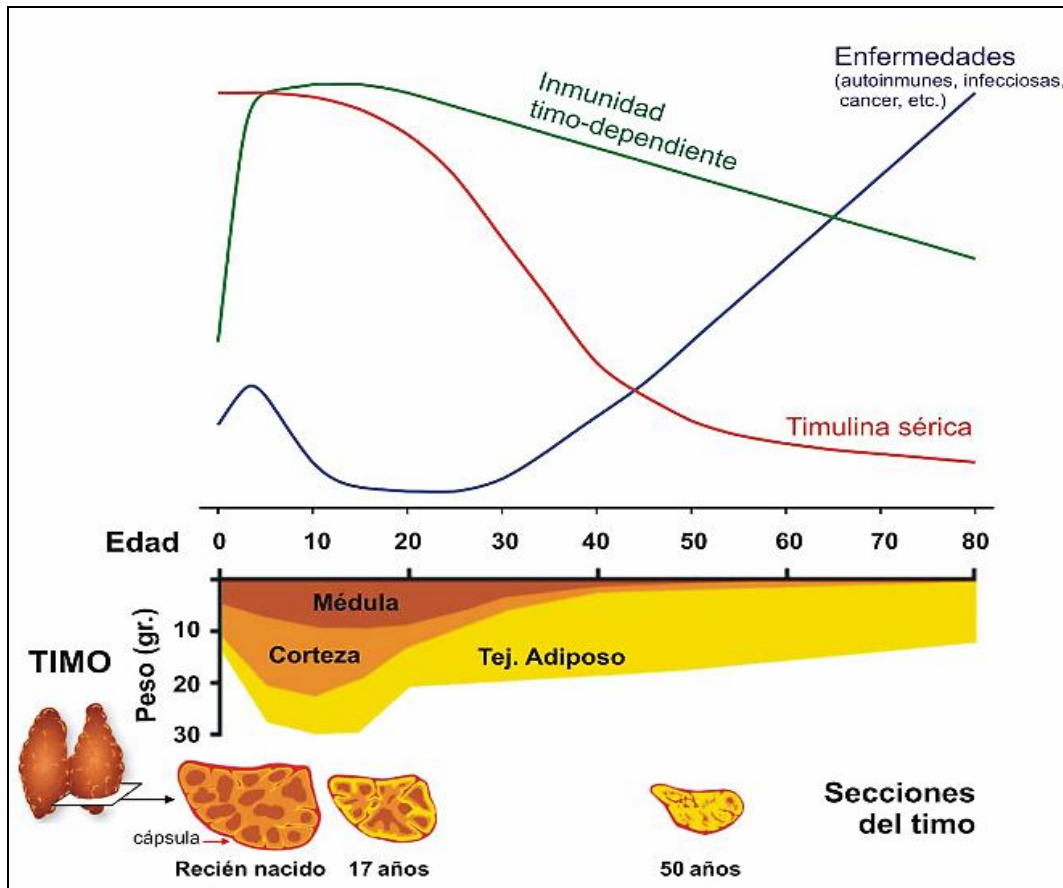


Figura 17. Representación de la involución tímica.

La importancia del timo para una maduración apropiada del sistema neuroendócrino se evidencia en las alteraciones endócrinas causadas por la timectomía neonatal (NTx) o por la ausencia congénita del timo. En los ratones hembras congénitamente atímicos (*nude*) se hallaron niveles reducidos de gonadotropinas, que estarían relacionados causalmente con un número de trastornos reproductivos descritos en estos mutantes (Rebar y col., 1981a). Por lo tanto, en hembras homocigotas (*nu/nu*) la primera ovulación sufre retraso (Besedovsky y Sorkin, 1974), la fertilidad se encuentra reducida (Rebar y col., 1981a) y la atresia folicular se incrementa, produciéndose insuficiencia ovárica prematura (Lintern-Moore y Pantelouris, 1975). Anormalidades similares resultaron de la NTx de ratones hembras normales (Michael y col., 1980; Nishizuka y Sakakura, 1971).

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 nódulos linfoides (Besedovsky y Sorkin, 1974; Pierpaoli y Besedovsky, 1975; Strich y col., 1985). Debido a que el suplemento de células inmunocompetentes 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. Ciertamente, se ha documentado que distintas secreciones tímicas afectan la actividad ovárica e hipofisaria (Aguilera y Romano, 1989; Mendoza y Romano, 1989).

Se ha establecido que aunque los ovarios de los ratones *nude* presenten anomalías, serían aptos para responder normalmente a la administración exógena de LH (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Este hecho 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 factor tímico sérico puede inducir, en general, una disminución en la concentración de la hormona liberadora de LH (LHRH) hipotalámica y un aumento, variable, en los niveles de gonadotropinas hipofisarias (Strich y col., 1985).

#### **1.1.6. El sistema inmuno-neuroendócrino**

La comunicación entre los sistemas inmune y neuroendócrino ha sido bien demostrada. Estos sistemas usan ligandos y receptores similares para establecer circuitos fisiológicos de comunicación intra- e intersistemas que juegan un importante rol en la homeostasis. Evidencias cada vez más firmes han colocado a las hormonas y neuropéptidos entre los inmunomoduladores potentes, participando en varios aspectos de la función del sistema inmune en la salud y la enfermedad (Savino y Dardenne, 2000).

En efecto, el timo es un órgano que recibe influencias endócrinas, las cuales incluyen a las interleuquinas, los péptidos tímicos y otros moduladores neuroinmunes, con acción parácrina y autócrina. Además, 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 endócrinos es restaurativa. Asimismo, 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).

Estudios previos han postulado que el eje hipófiso-tímico regula el sistema inmune. Se ha observado que las hormonas tímicas afectan a la hipófisis (Pierpaoli y col., 1976) del mismo modo que las hormonas hipofisarias modulan la actividad funcional de las células linfoides (Fabris y col., 1971). Cuando se realiza un trasplante de piel a ratones congénitamente atímicos, éstos no rechazan el trasplante, pero cuando son previamente trasplantados con timo normal al nacer, se reconstituye la inmunidad y rechazan el trasplante de piel.

Si se realiza una intervención inmunológica mediante el bloqueo de la función adenohipofisaria en dichos ratones atímicos y se los trasplanta con timo neonatal y posteriormente con piel, se previene la reconstitución de la inmunidad. La reconstitución dependiente del timo de las reacciones inmunes mediadas por células en el ratón atímico requiere de una normal función e integridad hipofisaria (Pierpaoli y col., 1976).

Paralelamente, se encuentra bien documentado que el eje hipófiso-tímico regula el sistema reproductor. Los ratones atímicos *nude* presentan niveles anormales de progesterona y LH en sangre. Durante la pubertad, los niveles de LH de los ratones *nude* se reduce a la mitad cuando se los compara con 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 las hembras (Pierpaoli y col., 1976).

Además, resultados previos demostraron 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, la PRL es probablemente la más necesaria de las hormonas para la generación de LT inmunocompetentes, vía su actividad timotrópica y timoestimulante (Pierpaoli y col., 1970; 1971; 1976). Estos estudios contribuyeron a la concepción de que el timo participa, durante la ontogenia temprana, en la

programación definitiva del cerebro para la regulación hipotalámica de las funciones endócrinas que se desarrollarán en el adulto.

La influencia del sistema neuroendócrino sobre la función tímica e inmune parece continuar durante la vida adulta, ya sea a través de una acción directa de las hormonas pituitarias o de las hormonas periféricas, actuando sobre las CET y/o sobre los timocitos inmaduros intraglandulares (Savino y Dardenne, 2000).

El eje hipófiso-tímico juega un importante rol en la atrofia tímica y en la disminución de la actividad de los LT que ocurre durante el proceso del envejecimiento. Distintos estudios han demostrado que esta involución tímica no es irreversible sino que, por el contrario, el timo es un órgano dinámico capaz de responder al medio ambiente endócrino, aún en animales viejos.

Es así como la atrofia tímica causada por la edad puede parcialmente revertirse por una manipulación endócrina, como se ha observado mediante el uso de células GH<sub>3</sub> (una línea de células epiteliales hipofisarias que secretan GH y PRL) (Davila y col., 1987), la castración en ratas macho viejas (Greenstein y col., 1986; Fitzpatrick y Greenstein, 1987), la administración de una mezcla de hormonas en roedores viejos hipofisectomizados (Harrison y col., 1982) y el uso de las hormonas tiroideas que aumentan la respuesta endócrina tímica en humanos (Fabris y col., 1986) y ratones viejos (Fabris y Mocchegiani, 1985).

Desde la década del '60 se realizaron importantes contribuciones en el estudio de la relación entre el timo y el eje adrenal, demostrando que los corticoides adrenales afectan el tamaño y la morfología tímica. En este contexto, la administración de ACTH o las condiciones de estrés resultaron en una marcada disminución de los linfocitos tímicos y una disminución en el tamaño del timo. Además, la adrenalectomía en animales determinó una hiperplasia tímica (Fisher, 1964), mientras que la Tx disminuyó los niveles de ACTH y corticosterona en sangre de ratas recién nacidas (Deschaux y col., 1979) y de ACTH y  $\beta$ -endorfinas en monos jóvenes (Healy y col., 1983).

Los productos del timo pueden influenciar la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Por ejemplo, una preparación tímica bovina estimuló la secreción hormonal de la células corticotropas adenohipofisarias (Farah y col., 1987). La terapia de reemplazo con extractos de timo en los animales Tx no sólo restauró la función inmune, sino que también normalizó los niveles de la ACTH y la corticosterona (Deschaux y col., 1979).

Finalmente, el extremadamente complejo control neuroendócrino 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 las células tímicas. En efecto, se ha demostrado que en las CET se produce, aunque en niveles muy bajos, corticosterona, GH, ACTH, somatostatina, vasopresina, oxitocina, insulina, IGF-I,  $\beta$ -endorfina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y, tal vez, TSH y FSH. Del mismo modo, en los timocitos se ha detectado la producción de PRL, GH, LH, LHRH, GHRH, hormona liberadora de CRH, hormona liberadora de tirotrópina (TRH),  $\beta$ -endorfina y VIP (Savino y Dardenne, 2000). En la **Tabla 3** se ha resumido la expresión y localización de los receptores tímicos.

En igual forma, distintas hormonas tímicas han sido implicadas en el control neuroendócrino. Se ha documentado que la administración de la timosina fracción 5 y de la hormona homeostática tímica (HTH, una proteína dimérica) ejercieron una inhibición significativa sobre la secreción de tirotrópina en ratas jóvenes, pero no en animales viejos (Goya y col., 1987; 1988). Además, se ha observado que la HTH también resultó activa sobre el eje adrenal (Goya y col., 1990). Las timosinas son capaces de modular la liberación de las hormonas adenohipofisarias, incluyendo ACTH, PRL, GH y  $\beta$ -endorfina (Bach y col., 1991). Se ha observado que la timosina- $\beta_4$  estimuló la liberación de LH y LHRH, cuando se la administró intraventricularmente (Rebar y col., 1981b), no alterando los niveles de ACTH o glucocorticoides circulantes (Healy y col., 1983).

**Tabla 3.** Resumen de la expresión y localización de los receptores tímicos (Savino y Dardenne 2000, modificado).

<b>Receptores</b>	<b>Localización</b>
<b>Glucocorticoides</b>	Citoplasma-núcleo de los timocitos y cultivos de CET.
<b>Esteroides sexuales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrógenos Preparaciones tímicas de células no linfoides. CET. Timocitos.</li> <li>• Progesterona Preparaciones tímicas de células no linfoides. CET.</li> <li>• Andrógenos Preparaciones tímicas de células no linfoides. Fracciones enriquecidas con CET. Timocitos.</li> </ul>
<b>T3/T4</b>	Timocitos. CET de roedores y humanos.
<b>ACTH</b>	CET.
<b>PRL</b>	CET. Timocitos. Las hiperprolactinemias aumentan los receptores.
<b>GH</b>	Cultivo de CET. Timocitos humanos.
<b>GHRH</b>	Timocitos de rata.
<b>TRH</b>	Extractos de timo.
<b>Somatostatina</b>	Timocitos de ratón y CET humanas. La somatostatina inhibe <i>in vitro</i> la proliferación de CET humanas.
<b>Oxitocina</b>	Timocitos.
<b>Vasopresina</b>	Timocitos.
<b><math>\beta</math>-endorfina</b>	Preparaciones de membrana de extractos de timo.
<b>VIP</b>	Timocitos y CET humanas.
<b>Insulina</b>	Timocitos.
<b>IGF-I</b>	Timocitos. CET humanas y de roedores.

## 1.2. TIMULINA

### 1.2.1. Generalidades

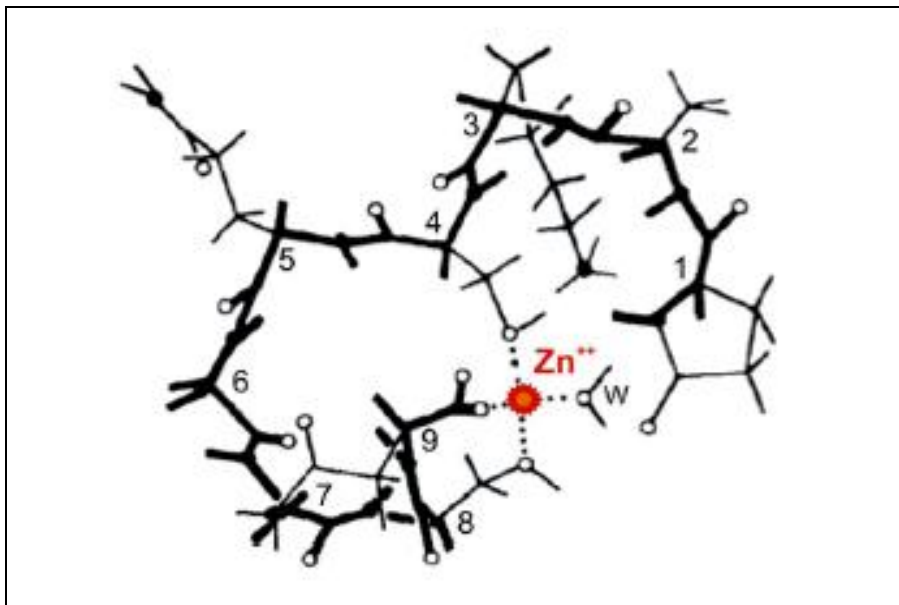
La existencia de un factor tímico presente en el suero normal y en extractos tímicos ha sido descrita por Bach y Dardenne (1973). Este factor tímico fue aislado originalmente de suero de cerdo y secuenciado, consistiendo en un

nonapéptido de 847 Da de PM, que fue denominado *factor tímico sérico* (FTS, del francés "*facteur thymique sérique*") (Bach y col., 1977). La ausencia del FTS en el suero de los ratones Tx y de los ratones *nude* (congénitamente atímicos) y su presencia tras el trasplante del timo, demostró su exclusivo origen tímico (Bach y Dardenne, 1973).

En efecto, mediante técnicas de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica y electroinmunocitoquímica pudo confirmarse la localización del FTS en el citoplasma de las CET. En estos estudios *in vitro* se usó un suero anti-queratina para demostrar que las células que contenían el FTS eran de origen epitelial. En un estudio posterior de Auger y col. (1984), utilizando dos anticuerpos monoclonales (anti-FTS sintético y anti-FTS intracelular), se halló que inmunomarcaron células del timo de ratones normales y ratones autoinmunes de Nueva Zelanda (NZB) en la región medular y raramente se observó en la corteza, excepto en la región subcapsular, la cual puede corresponder a las células nodrizas (CET I). En la región medular, el elevado número de células positivas correlaciona positivamente con las CET V y VI. La secuencia de aminoácidos del FTS circulante fue establecida a partir del péptido intacto y del péptido tratado con enzimas proteolíticas por el método de Edman (Pléau y col., 1977). Esta secuencia no mostró ninguna homología con los péptidos secuenciados.

Para confirmar la estructura primaria completa así generada, se sintetizó un péptido que mostró una actividad biológica, *in vitro* e *in vivo*, exactamente idéntica a la del FTS natural (Bach y col., 1977). Sin embargo, en preparaciones fortuitas de FTS sintéticos inactivos o inestables, se sugirió la existencia de dos formas del péptido, una biológicamente activa y otra que no lo era. De hecho, la incubación del péptido con agentes quelantes resultó en la pérdida de su actividad, la cual fue recuperada tras la adición de sales de  $Zn^{+2}$ . 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 las vacuolas citoplasmáticas en cultivo de CET y en secciones tímicas, sugiriendo que la interacción con el FTS ocurre en estas células (Dardenne y col., 1982).

En un estudio *in vitro* en CET humanas se sugirió que el  $Zn^{+2}$  se une al FTS principalmente dentro de las vacuolas citoplasmáticas, previo a su secreción (Savino y Dardenne, 1986). 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 (Pléau y col., 1979; Auger y col., 1987). A raíz de estos estudios precursores, el complejo activo formado por FTS-Zn fue denominado "**timulina**". En otro estudio se determinó: a) la existencia de dos complejos (1:1 y 1:2) en la asociación del  $Zn^{+2}$  con el nonapéptido, b) en el complejo 1:1, las Ser<sub>4,8</sub> y la Asn<sub>9</sub> son los tres aminoácidos que se acoplan covalentemente al ión  $Zn^{+2}$  (**Fig. 18**), c) la diferencia entre los dos complejos depende de la Ser<sub>8</sub> y d) la estructuración de la secuencia Ser<sub>8</sub>-Asn<sub>9</sub> alrededor del metal es un factor determinante en la expresión de la actividad biológica (Cung y col., 1988).



**Figura 18. Representación esquemática del complejo nonapéptido-zinc de la timulina, postulado por Cung.**

Muestra la relación estequiométrica 1:1 en el complejo FTS-Zn, evidenciado por resonancia nuclear magnética. Los residuos aminoacídicos 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).

La actividad biológica de esta hormona ha sido evaluada por un bioensayo desarrollado por Dardenne y Bach (1975), que utilizó la formación de las rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja. Desde que se desarrolló, a

principios de los '70, este bioensayo ha sido utilizado para dosar los niveles de la timulina en fluidos biológicos. La timulina sérica se ha detectado después del día 14 de gestación en ratones hembras preñadas Tx, probablemente secretada por el timo fetal (Bach, 1983).

En el humano, los niveles más elevados de timulina sérica se detectan desde el período neonatal hasta la adolescencia, momento en el que comienzan a declinar alcanzando valores muy bajos a los 36 años y a partir de este momento, permanecen constantes durante el envejecimiento.

Hasta el momento, se ha descrito la existencia de un receptor específico para el FTS en dos líneas celulares tumorales de LT humanos, la 1301 y la HSB2, utilizando FTS tritado ( $[^3\text{H}]$ -FTS) (Pléau y col., 1980). El receptor de la línea 1301 fue el más estudiado. Se describieron dos sitios de unión independientes que no presentan cooperatividad negativa. Además, se observó que la interacción del  $[^3\text{H}]$ -FTS con la membrana plasmática de las 1301 fue estable, saturable y reversible como en las células intactas (Gastinel y col., 1982). Sin embargo, en estos estudios no se pudo corroborar la presencia de receptores citoplasmáticos, necesitándose otros estudios para determinarlos. Actualmente, tampoco se ha podido demostrar la presencia de receptores para el FTS en LB o en LT normales.

En estudios basados en el bioensayo de las rosetas se observó que el cAMP actuó 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. Sin embargo, otros trabajos proponen a las prostaglandinas (PG), debido a que la presencia de inhibidores de PG inhibió el efecto de la timulina (Bach, 1983). Las evidencias disponibles hasta el presente no son suficientes como para sostener tal presunción.

Se han documentado interacciones de la timulina con proteínas aún no caracterizadas. Varias observaciones están a favor de la existencia de proteínas presentes en el suero normal que poseen una acción inhibitoria sobre la timulina. En efecto, la actividad de la timulina en el bioensayo de las rosetas sólo aparece después de la eliminación por diálisis o por filtración de



moléculas con un PM entre 100-300 kDa (Pléau y col., 1981). 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, moléculas con un PM del orden de la albúmina o la prealbúmina de 40-60 kDa (Bach, 1983).

### **1.2.2. Propiedades biológicas de la timulina**

La timulina ejerce distintas acciones relacionadas con el sistema inmune. Entre las acciones más importantes podemos nombrar, su participación en la diferenciación de los LT y en la modulación de la mayoría de sus funciones.

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 LT de pacientes y animales inmunológicamente suprimidos (Bach, 1983). Es decir, dependiendo del estado inmunológico del modelo experimental la timulina es capaz de estimular, inhibir o dejar intactas las funciones de los LT (**Tabla 4**).

En un estudio con el FTS sintético se halló una selectiva capacidad para inducir la aparición de marcadores presentes en los timocitos y los LT circulantes, por ejemplo el HTLA (antígenos de LT humanos) y el E-CFR (células formadoras de rosetas de eritrocitos). También se detectó la desaparición de marcadores presentes en los pro-linfocitos y en los LT inmaduros, por ejemplo la lectina PNA (aglutinina de maní) y la enzima TdT (deoxiribonucleotidil transferasa terminal) (Incefy y col., 1980).

Además, se ha observado que esta hormona estimuló: a) la activación de los LT citotóxicos (LTc), los LT colaboradores o *helper* (LTh) y los LT supresores (LTs), b) la proliferación de los LT y c) la síntesis de la IgG anti-ADN, la IgA y la IgG y de la IL-2 (Charreire y Bach, 1975; Bach, 1983). En general, los efectos mencionados de la timulina son inmunoestimuladores, pero un ejemplo de su efecto inmunosupresor es el retardo en el rechazo del trasplante de piel en los animales normales, tal vez por estimulación de los LTs (Kaiserlian y col., 1981).

**Tabla 4:** Resumen de los efectos de la timulina sobre las funciones de los linfocitos (Bach, 1983, modificado).

<b>Efecto de la timulina</b>	<b>Modelo experimental</b>
<b>Estimulación de la proliferación de LT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferación inducida por la fitohemaglutinina en ratones-ratas ATx y en humanos inmunodeficientes.</li> <li>• Lupus.</li> </ul>
<b>Aumento de la citotoxicidad e hipersensibilidad retardada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción citotóxica alogénica en ratones ATx.</li> <li>• Citotoxicidad anti-trinitrofenol en los timocitos normales.</li> <li>• Reacción de rechazo de injerto-contra-huésped en ratones normales.</li> <li>• Estimulación de la hipersensibilidad retardada en ratones ATx.</li> </ul>
<b>Estimulación de la actividad de los LTh</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inducción de la síntesis de los anticuerpos en ratones senescentes y en pacientes inmunodeficientes.</li> <li>• Inducción de la producción de la IL-2 en timocitos normales y esplénicos de ratones <i>nude</i>.</li> <li>• Aumento en la producción de los autoanticuerpos (IgG anti-ADN) en ratones hembras jóvenes de la cepa B/W.</li> </ul> <p>Estos efectos se observaron con bajas dosis de timulina (&lt;10<sup>-7</sup> M).</p>
<b>Estimulación de la actividad de los LTs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retardo en el rechazo a injertos de piel en ratones normales.</li> <li>• Depresión de la producción de los autoanticuerpos (IgG anti-ADN) en ratones machos jóvenes de la cepa B/W.</li> <li>• Estimulación de la supresión inducida con la concanavalina A en personas normales y con lupus.</li> </ul> <p>Estos efectos se observan con altas dosis de timulina (&gt;10<sup>-7</sup> M).</p>
<b>Modificación de la actividad de las células <i>natural killer</i> (NK)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de la actividad de las NK.</li> <li>• Disminución de la actividad de las NK.</li> </ul>
<b>Aumento en la respuesta de los LB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Favorece la activación policlonal de los LB del ratón, inducida por LPS.</li> </ul>

En un modelo de ratón híbrido (B/W), conocido por desarrollar una forma espontánea del cuadro de autoinmunidad severa y un síndrome linfoproliferativo (Síndrome de Sjögren), se estudió el efecto del tratamiento con timulina. Así, la inyección i.p. de timulina (durante cuatro semanas) en

animales machos viejos aumentó los niveles de autoanticuerpos y en la glomerulopatía se incrementaron los depósitos de las Ig (Israel-Biet y col., 1983).

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

Por consiguiente, se ha considerado que la timulina tiene un papel inmunomodulador. Evidencias recientes demostraron que la inyección sistémica de esta hormona, a bajas dosis (nanogramos), es capaz de producir hiperalgesia y citoquinas inflamatorias (Safieh-Garabedian y col., 2000). Sin embargo, puede inducir el efecto opuesto cuando se inyecta a dosis altas (en microgramos), previo a la inyección periférica de la endotoxina (ET) (Safieh-Garabedian y col., 2000).

Otros estudios realizados en un modelo de leishmaniasis cutánea en ratones, que induce hiperalgesia y estimulación de IL-1 $\beta$  y del factor de crecimiento neural (FCN), aportaron evidencias de la acción moduladora que ejerce la timulina sobre la hiperalgesia. En este modelo, las inyecciones de esta hormona (1, 100 y 1000 ng/ip) produjeron una reducción, dosis dependiente y reversible, de la hiperalgesia y de los niveles de los factores proinflamatorios IL-1 $\beta$  y NGF (Kanaan y col., 2002).

Más aún, la timulina parecería ejercer un rol neuroprotector evidenciado por su acción antiinflamatoria sobre el SNC. En un modelo de inflamación cerebral por inyección 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 $\beta$  e IL-6 (inducidos por la ET) según el área del cerebro (Safieh-Garabedian y col., 2003).

Debido a la ambigüedad de las acciones de la timulina este grupo de investigadores desarrolló experimentos con un péptido sintético análogo de la timulina (PAT). En un primer trabajo se estudió la acción del PAT en el

tratamiento del dolor por inflamación y demostró ejercer un poderoso efecto anti-hiperalgésico y anti-inflamatorio en modelos animales de hiperalgesia inflamatoria inducida por ET, sistémica y local, que puede atribuirse a su efecto inhibitorio de la cascada inflamatoria (Safieh-Garabedian y col., 2002).

Complementariamente, se estudió el efecto del PAT en cuatro modelos animales de dolores neurogénicos. Los resultados de este trabajo demostraron que el PAT ejerció un poderoso efecto analgésico. Por lo tanto, el PAT parece reproducir los efectos analgésicos de la timulina sin ejercer ninguna acción hiperalgésica (Saadé y col., 2003).

Recientemente se ha documentado que la timulina posee actividad protectora en otros tejidos, 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, ha sido significativamente atenuado por la administración intravenosa de timulina. En este estudio se demostró que el pre-tratamiento con timulina inhibió la activación de ERK inducida por CER y, por lo tanto, se previno la disfunción renal en ratas (Kohda y col., 2005).

Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual la timulina ejerce su protección en los tejidos dañados aún permanece en estudio. Se ha demostrado que este péptido es capaz de incrementar los niveles de la superóxido dismutasa (SOD) en ratones con senescencia acelerada (Zhao y col., 1990), alterando la producción de radicales libres.

Un número creciente de investigaciones le otorgan a la timulina un rol modulador del eje hipófiso-gonadal. En efecto, en condiciones *in vitro*, la adición de timulina a fragmentos hipofisarios obtenidos de ratas machos adultas indujo una estimulación en 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 de 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 gonadotropinas varía durante del ciclo estral de la rata. Concretamente, tiene un efecto estimulador sobre la liberación de LH durante todo el ciclo, y de FSH durante el diestro 1, pero es inhibitorio 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, dichos resultados sugieren que la influencia de este péptido tímico depende del estado hormonal de las 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 ser mediado por una acumulación intracelular de cAMP y cGMP (Hadley y col., 1997).

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, sin una significativa modificación en los niveles de ACTH. Esta alteración del estado hormonal se correlacionó con modificaciones, en su mayoría compensatorias, del tamaño y número de células de las poblaciones adenohipofisarias (Camihort y col., 2006).

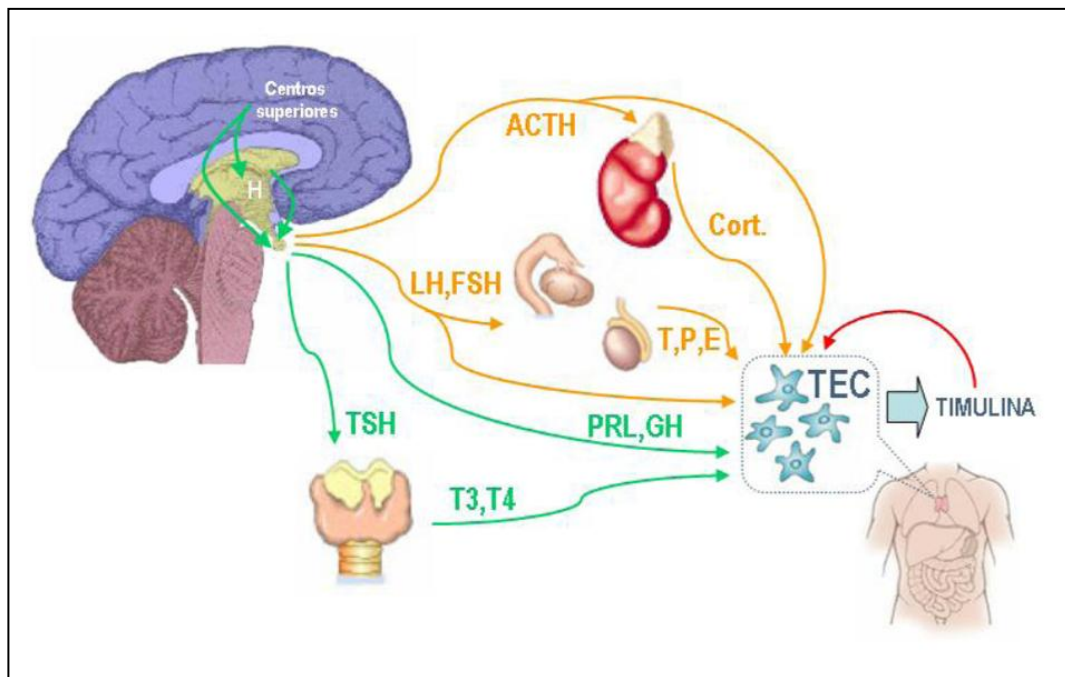
Más aún, se sugiere una participación, directa o indirecta, de la timulina sobre las gónadas. En la hembra, esta hormona puede intervenir en la función esteroideogénica ovárica, incrementando la actividad de la aromatasa (enzima limitante de la esteroideogénesis). Además, se observó que los ovarios responden a la timulina mediante un mayor incremento de las gonadotropinas durante la maduración de la granulosa y un aumento en la

secreción de progesterona (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1991). En efecto, la administración de timulina previa al tratamiento con gonadotrofina coriónica equina (eCG) indujo un incremento en el peso ovárico y en la tasa de ovulación, efecto que depende 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 endócrinos y parácrinos que controlan la esteroideogénesis testicular. Efectivamente, se ha demostrado que esta hormona afecta positivamente la acumulación del andrógeno testicular. Estos efectos son dependientes de las concentraciones de LH y timulina. Por lo tanto, apoyarían la hipótesis de que la timulina aumenta el efecto estimulador de la LH sobre el incremento de andrógenos *in vitro* e *in vivo* en testículos de ratas y cerdos (Wise 1998; Wise y Ford, 1999).

### **1.2.3. Control neuroendócrino de la secreción de la timulina**

Está bien establecido que el sistema inmune se encuentra funcionalmente unido a los sistemas nervioso y endócrino ya que constituyen una red homeostática integrada (Goya, 1991). Consecuentemente, la producción y secreción de la timulina está influenciada directa o indirectamente por el sistema neuroendócrino. Además de las acciones inmunomodulatorias, existe una creciente evidencia de que la timulina posee actividad hipofisotrópica (Theill y Karin, 1993). Efectivamente, se han documentado un número de secretagogos para la timulina (**Fig. 19**). Estos incluyen la dexametasona, la progesterona, la testosterona, el estradiol (E<sub>2</sub>), la PRL, la GH y las hormonas tiroideas. En cultivo de CET, cada una de estas sustancias estimula la liberación de timulina. Además de los efectos de estas hormonas, los opioides endógenos como las  $\beta$ -endorfinas, estimulan la liberación de timulina en cultivo de CET de roedores y humanas (Savino y Dardenne, 2000).



**Figura 19. Control pleiotrópico sobre la producción y secreción de timulina.**

La timulina ejerce retroalimentación negativa sobre su propia producción. Su liberación se encuentra estimulada por la TSH, T3-T4, PRL y GH.

Existen evidencias que avalan la existencia de un eje PRL-timulina. En primer lugar, se ha identificado la presencia de receptores para PRL en las CET (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 CET (Dardenne y col., 1986) 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 función de los LT (Hadden, 1992; Pierpaoli y col., 1976). Algunos investigadores sugirieron que la PRL actúa sobre una población de células accesorias para inducir IL-1, la cual actúa sobre las CET para promover la proliferación y secreción de timulina (Hadden, 1992).

Las fluctuaciones en los niveles de GH modulan la síntesis y secreción de timulina. En perros viejos tratados con GH bovina se observó una restauración parcial de los bajos niveles de timulina (Goff y col., 1987). En ratones viejos, el tratamiento con GH ovina incrementó los bajos niveles de

timulina (Goya y col., 1992), mientras que en ratas viejas, el tratamiento combinado de GH y tiroxina (T<sub>4</sub>) fue capaz de restaurar parcialmente los bajos niveles de la timulina (Goya y col., 1993). La hipofisectomía en ratas condujo a una profunda, aunque transitoria, disminución de los niveles séricos de la timulina.

En estudios clínicos, se ha comunicado que los niños con deficiencia congénita de GH, que mostraban niveles bajos de timulina plasmática, respondieron exitosamente a la terapia con GH, con incremento de los valores de las hormonas tímicas que se correlacionaron con las cantidades circulantes de IGF-I (Mocchegiani y col., 1990 a; 1996).

Los pacientes acromegálicos mostraron elevados niveles de timulina sérica en comparación con personas normales, lo cual también se correlacionó con elevados niveles de IGF-I (Timsit y col., 1992). En experimentos *in vitro*, la rhGH (GH humana recombinante) estimuló la liberación de la timulina a partir de las CET, 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-I y contra el receptor de IGF-I, lo que ha llevado a postular al IGF-I como un posible mediador de los efectos de la GH sobre las CET (Timsit y col., 1992).

Las hormonas tiroideas también modulan la secreción de timulina. Se ha comunicado que la timulina estimuló la liberación de TSH en células pituitarias dispersas de rata en dosis que varían desde 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-3</sup> M (Brown y col., 1998; 2000). El tratamiento *in vivo* con tri-iodotironina (T<sub>3</sub>), en CET 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 6*N*-propil-2-tiouracilo, un inhibidor de la síntesis de hormonas tiroideas (Savino y col., 1984). En los ratones viejos, la inyección de T<sub>4</sub> incrementó los niveles de timulina sérica a valores correspondientes con animales jóvenes. Los pacientes con hipertiroidismo exhibieron niveles elevados de la timulina sérica y los pacientes portadores de hipotiroidismo mostraron niveles disminuidos de



dicha hormona (Fabris y col., 1986). En estudios *in vitro*, se observó que las hormonas tiroideas estimularon la secreción de la timulina por una acción directa sobre las CET (Mocchegiani y col., 1990 a; Villa-Verde y col., 1993). Se ha documentado que el tratamiento de animales viejos con T<sub>4</sub> puede revertir los niveles disminuidos de timulina sérica (Fabris y Mocchegiani, 1985; Villa-Verde y col., 1993).

Aún no se ha documentado un efecto directo de la ACTH o las gonadotropinas sobre la secreción de timulina. 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, coincide con un aumento de la liberación de timulina (Safieh-Garabedian y col., 1992). La atimia congénita causó una menor respuesta pituitaria a estímulos hipotalámicos y un descenso significativo de la ACTH pituitaria en ratones *Swiss nude* sometidos a estrés (Gaillard y col., 1998). En ratones atímicos se halló un marcado descenso de la secreción de la corticosterona (con estímulo de serotonina) en las células adrenocorticales, aunque la corteza adrenal mantendría su respuesta ante la ACTH (Yang y col., 1995). En un estudio *in vitro* se determinó que la ACTH incrementó los niveles de la timulina de manera dosis dependiente y esta actividad fue Ca<sup>+2</sup> dependiente (Buckingham y col., 1992). Se ha sugerido que la timulina modula la secreción de ACTH con aumento del nucleótido cíclico a nivel pituitario (Hadley y col. 1997).

El efecto de los esteroides adrenales y gonadales sobre la secreción de timulina parece ser complejo y 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 de los niveles de la timulina sérica, durante un mes. Mientras que la adrenalectomía junto con la gonadectomía determinó una disminución más prolongada de la timulina sérica (durante 3 meses, volviendo a valores normales a los 6 meses). En ambos procesos de cirugía simple o doble se ha observado un incremento en el contenido intratímico de la timulina (Dardenne y col., 1986). En cultivo de CET, de roedores y humanos, se

observó que la exposición a niveles fisiológicos de glucocorticoides, estradiol, progesterona o testosterona aumentó la concentración de la timulina en los sobrenadantes celulares (Savino y col., 1988). A su vez, se ha demostrado que la timulina estimuló la liberación de la LH a partir de las hipófisis de ratas perifundidas (Zaidi y col., 1988).

Aunque no existen evidencias concluyentes, se sugiere que hay factores hipotalámicos capaces de influir en la producción de la timulina mediante una acción directa sobre la actividad endócrina de las CET. En efecto, 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 la timulina sérica (Folch y col., 1986).

En cultivos de CET la exposición a extractos hipotalámicos o hipofisarios derivados de ratones jóvenes indujo un aumento de la concentración de la 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 vivo* como *in vitro*, la timulina es capaz de regular su propia secreción (Savino y Dardenne, 2000). En efecto, se ha observado que el tratamiento de anticuerpos monoclonales anti-timulina en ratones resultó en un incremento en el contenido intratímico de la hormona (Savino y col., 1983). Más aún, la incubación de CET, en cultivo con estos anticuerpos incrementó el número de la timulina en cultivos de CET y resultó en una disminución de su liberación (Cohen y col., 1986).

#### **1.2.4. Potencial terapéutico de la timulina**

En humanos y en animales se ha demostrado que el envejecimiento conduce a una severa involución del timo y de los niveles de la timulina sérica (Goff y col., 1987; Goya y col., 1992; Consolini y col., 2000). La timulina podría utilizarse en el tratamiento de enfermedades que desarrollen inmunodeficiencia (Iwata y col., 1981), las que presentan en su mayoría atrofia tímica y anormalidades en las CET, habiéndose comunicado en todos los casos una significativa reducción en los niveles de la timulina (Safieh-Garabedian y col., 1992).

Estos cuadros incluyen el síndrome de DiGeorge, la ataxia telangiectasia, la deficiencia de IgA con bajo número de LT, las infecciones crónicas asociadas con la deficiencia de LT, las leucemias, los linfomas y las enfermedades autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoidea (AR), la esclerosis múltiple (EM) y la diabetes autoinmune (Incefy y col., 1980). En estudios con niños y adultos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se observó que los niveles de la timulina sérica se encontraban disminuidos en comparación con voluntarios sanos. Además, estos pacientes presentaban una disminución en el número de los LT, 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 la timulina y las anomalías de los LT en estos pacientes aportan firmemente a la hipótesis de que la timulina está involucrada en la inmunocompetencia (Safieh-Garabedian y col., 1992). Se han realizado algunos abordajes clínicos preliminares con la timulina sintética. En pacientes con síndrome de DiGeorge la timulina restauró el número y función de los LT. En tres casos de niños con síndrome de inmunodeficiencia, la administración intravenosa de la timulina sintética (10 µg/Kg), diaria durante dos semanas y luego quincenalmente, indujo un mejoramiento clínico general, una disminución de la frecuencia de las infecciones, una corrección del déficit de LT y una rápida producción de IgA (Bordigoni y col., 1982). En el caso del tratamiento de la AR se observó una mejoría clínica, en particular aquellos aspectos relacionados con la inflamación (Amor y col., 1987).

### **1.3. MODELOS ANIMALES DE TIMODEFICIENCIA**

#### **1.3.1. El ratón congénitamente atímico: *nude***

Los roedores inmunodeficientes son utilizados en estudios del sistema inmune y patologías asociadas a la inmunodeficiencia. Actualmente la producción de modelos murinos constituye una de las temáticas de

vanguardia dentro de la ciencia de los animales de laboratorio (Carbone y Maschi, 2006).

La mutación *nude* (*nu*) fue descubierta en 1962 en una colonia exocriada de ratones; luego se determinó que era autosómica recesiva y que causaba disgenesia tímica (Flanagan, 1966). Es decir, los mutantes *nude* carecen de un timo funcional, permaneciendo como rudimentario (o ausente) y producen un número muy reducido de LT maduros (Rygaard, 1973). Además de fallar en la formación del timo, el ratón *nude* (homocigota) presenta 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* representa el gen *nude*. El clonado del gen *whn* (*winged helix nude*) permitió una serie de investigaciones que produjeron las siguientes conclusiones: a) los dos clones generados con la mutación *whn* (homocigotas) exhibieron las mismas características macroscópicas del ratón *nude*, atimia y carencia de pelo; b) el gen *whn* codificó para una proteína nuclear, el factor de transcripción WHN; c) las CET subcorticales, corticales y medulares expresan el gen *whn*; d) para la formación del primordio tímico no fue requerida la expresión del gen *whn*; e) para una exitosa colonización de los precursores de los LT en el rudimento tímico fue necesaria la expresión de gen *whn* y por último, f) la actividad del gen *whn* también fue necesaria para el mantenimiento de la diferenciación de las células precursoras primitivas en los fenotipos de CET en el timo maduro (Nehls y col., 1996; Schlake y col., 1997). Cabe aclarar que existen varios genes mutantes generadores del fenotipo desnudo: *nude*, *naked*, *hairless*, *rhino*. Estos genes mutantes no se deben confundir uno con el otro, por lo cual los términos ratón *nude* y ratón sin pelo no se deben usar indistintamente (Carbone y Maschi, 2006). Los ratones heterocigotas (*nu/+*) son inmunocompetentes y fenotípicamente normales, mientras que los homocigotas para el gen *nude* (*nu/nu*) (**Fig. 20**) son los inmunocomprometidos.



**Figura 20. Fotografía del fenotipo del ratón *nude* homocigota.**

Estos mutantes 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 determinan en una falla durante la colonización del rudimento tímico por los protimocitos migrantes, acompañado de alteraciones en las células estromales y epiteliales (Holub, 1989).

En consecuencia, estos animales presentan deficiencias de los LT competentes, aunque pueden mantener niveles elevados de los NK y de los macrófagos (Holub y col., 1989), su principal mecanismo de defensa.

La inmunidad humoral también se ve afectada en los ratones *nude*. Los niveles séricos de las inmunoglobulinas han sido objeto de varias investigaciones, debido a la posible influencia de un sistema de LT deficiente que influencia la producción de Ig. En general, tuvieron niveles séricos de IgM comparables con sus contrapartes heterocigotos, mientras que los niveles de IgG y de IgA estuvieron disminuidos (Pantelouris, 1970). Algunos estudios han sugerido que el isotipo IgG2 podría estar descendido (Klein-Schneegans y col., 1990). Un estudio sobre inmunidad y envejecimiento en ratones *nude* mostró a las 40 semanas, niveles normales de IgM, pero con valores disminuidos de IgG2b, IgG3 e IgA al compararlos con sus contrapartes eutéimicos. El mismo estudio mostró a las 110 semanas, niveles

también más bajos de IgG2 y de IgA en los ratones *nude*. Los niveles de IgM, IgG1 y de IgG3 eran similares en ratones homo y heterocigotos (Mink y col., 1980). Resultados semejantes se encontraron en un estudio de ratones atímicos y esplenectomizados (Eckels y col., 1979).

En general, la formación de anticuerpos en estos mutantes estuvo principalmente limitada a las IgM y a una respuesta primaria. Los niveles de IgG fluctuaron considerablemente entre individuos de la misma colonia. Se observó un déficit general en las IgA y una heterogeneidad disminuida de las Ig (Mink y col., 1980; Klein y col., 1990).

En la piel de los ratones *nude*, se detectó una queratinización defectuosa del pelo y degeneración de los folículos pilosos, resultando en calvicie a pesar de que se incrementó la frecuencia de los ciclos de crecimiento capilar (Eaton, 1976), pudiendo presentar histológicamente escasos folículos pilosos normales y también algunos pelos finos. Como consecuencia de la calvicie estos animales tuvieron problemas de termorregulación (Holub, 1989).

Además de las características fenotípicas descritas en los ratones *nude* (atimia y carencia de pelo), presentaron menor peso corporal que el de los heterocigotas. Dichas anomalías en el peso podrían estar determinadas genéticamente y/o por una acción prenatal del timo (Rebar y col., 1982). Los ratones *nude* han mostrado una reducción de sus niveles de gonadotropinas que no está genéticamente ligadas al sexo. En efecto, se ha observado que machos *nude* poseen concentraciones reducidas de LH y FSH en la hipófisis y en el suero, en comparación con sus contrapartes heterocigotas. Además, las reducidas concentraciones de gonadotropinas séricas e hipofisarias estuvieron más acentuadas en el período previo a la maduración sexual (Rebar y col., 1982; Goya y col., 2001) y fueron parcialmente prevenidas mediante la implantación de timos provenientes de animales heterocigotas (Rebar y col., 1981b). Otras hormonas séricas que se han observado disminuidas en estos mutantes son TSH, GH, T<sub>3</sub> y PRL, sin mostrar cambios

en los niveles de T<sub>4</sub> y en un primer estudio morfológico cualitativo de las poblaciones tirotrona, somatotropa y lactotropa (Goya y col., 1995b; 1996).

También se ha observado que los ratones congénitamente atímicos respondieron anormalmente al estrés. Por ejemplo, la inmovilización indujo una reducción en los niveles de GH, TSH y gonadotropinas 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). Estos resultados sugieren que dichos mutantes presentan una disfunción neuroendócrina en relación con las gonadotropinas.

Consecuentemente, se ha observado que en los ratones machos *nude* adultos los niveles séricos de testosterona se encontraron disminuidos (Rebar y col., 1982). El estrés por frío indujo un incremento en los niveles séricos de TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en los ratones homo y heterocigotas, siendo mayor la respuesta en los ratones atímicos, aunque los niveles basales de TSH y T<sub>3</sub> estuvieron disminuidos. Por consiguiente, la respuesta neuroendócrina a un agente estimulador como el frío, parece estar bien preservada en los ratones *nude* por medio del eje hipófiso-tiroideo (Goya y col., 1995b).

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

significativas, mientras que los niveles séricos de LH permanecieron disminuidos durante toda la vida (Rebar y col., 1980).

La PRL es otra hormona que se encontró afectada en estos mutantes. Se ha observado que, el trasplante de timo, de hipófisis y de timo más hipófisis en hembras *nude* de 30 días de edad, indujo 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). Más aún, las hembras *nude* homocigotas de 30 días han mostrado niveles de estrona y androstenediona disminuidos, en comparación con los niveles de las heterocigotas (Rebar y col., 1980). Las hembras homocigotas *nude* presentaron alteraciones en su eje reproductivo.

En condiciones de crianza convencionales se ha documentado que los ratones atímicos tuvieron una vida corta (2-4 meses) (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Sin embargo, bajo condiciones libres de gérmenes, se ha observado que la supervivencia máxima del ratón *nude* es la misma que la del ratón salvaje (Holland y col., 1978). Sin embargo, el promedio de supervivencia de los ratones *nude* es menor que el de su contraparte heterocigota porque desarrollan frecuentes linfomas. Además, el mutante *nude* fue más susceptible a ciertos patógenos naturales (virus y parásitos intestinales) (Holub, 1992). Todas estas características mencionadas han convertido a estos roedores en el primer modelo animal de experimentación en la inmunodeficiencia (Carbone y Maschi, 2006).

### **1.3.2. Los animales Timectomizados (Tx)**

La timectomía (Tx) en ratones recién nacidos y hasta los 35 días de edad, interfiere con el desarrollo de la capacidad inmunológica de las células provenientes de sus nódulos linfáticos y esplénicos (Dalmaso y col., 1964). Se ha demostrado que la Tx en ratones induce una defectuosa producción de anticuerpos y, frecuentemente, estos animales crecen pobremente,



desarrollan el síndrome de “wasting” y mueren a edades tempranas. Un animal adulto Tx e irradiado desarrolló severos defectos en su capacidad inmunológica (Miller, 1964).

En cuanto a su estado endócrino, los ratones Tx han evidenciado poseer alteraciones en los niveles de las distintas hormonas hipofisarias, de manera similar a lo que ocurre en los ratones congénitamente atímicos. Así, tras la Tx 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).

Se ha documentado que la Tx indujo una disminución en los niveles de estrógeno circulante (García y col., 2000) y alteración de la corteza adrenal (Pierpaoli y Sorkin, 1972). La Tx en distintas cepas de ratones y ratas, realizada neonatalmente produjo importantes alteraciones reproductivas. Anomalías similares resultaron de la Tx de ratones hembra normales (Nishizuka y Sakakura, 1971).

## **1.4. TERAPIA GÉNICA**

### **1.4.1. Aspectos generales**

La terapia génica es la transferencia de genes a células para generar un efecto terapéutico (Mulligan, 1993). Surgió a partir de los años 70 para intentar tratar y paliar enfermedades de carácter genético, realizándose las primeras pruebas con virus. La expresión de los genes transferidos puede resultar en la síntesis de proteínas terapéuticas y en la potencial corrección de defectos bioquímicos. Es posible transferir fragmentos de genes o secuencias de un gen, para anular su función o las secuencias reguladoras de la transcripción del gen transferido (Dubé y Cournoyer, 1995). Es relevante considerar que además de los estudios terapéuticos, se están desarrollando estrategias de prevención, por ejemplo vacunas con ADN, o la corrección de factores de riesgo, tales como la hipercolesterolemia. La disponibilidad sistemática de proteínas mediante la terapia génica tiene la

capacidad potencial de mejorar la eficacia, conveniencia y costo-efectividad del tratamiento de una variedad de enfermedades. Esto significó el reemplazo de las frecuentes inyecciones de una proteína recombinante costosa por una única administración de vectores génicos terapéuticos (Rivera y col., 1999).

La terapia génica utiliza diferentes *vectores o vehículos* para administrar los ácidos nucleicos. Los *vectores* son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que éste pueda funcionar correctamente. Dichos vectores pueden ser clasificados en: *vectores no virales y vectores virales*.

**- Vectores no virales:**

Entre los más usados se pueden mencionar: el bombardeo de partículas, la inyección directa de ADN desnudo, los liposomas catiónicos, los complejos ADN-proteína y la transferencia de genes mediante receptores. Dentro de las ventajas de los vectores no virales, se encuentran su escasa o nula inmunogenicidad; su fácil preparación y manipulación, especialmente a nivel industrial; no tienen límite con respecto al tamaño del transgén y son más seguros con respecto a posibles infecciones. A pesar de esto, este tipo de vectores posee una característica que constituye una neta desventaja: la efectividad de la transferencia es muy baja en comparación a los vectores virales, especialmente *in vivo* (Bergen y col., 2008).

**- Vectores virales:**

Los virus están altamente especializados en la transferencia de ácidos nucleicos y la realizan con gran eficiencia. Esta es la principal ventaja de la utilización de virus como vectores de transferencia génica. En consecuencia, los vectores más usados en ensayos clínicos, son los vectores virales. Sin embargo, también poseen desventajas, como por ejemplo la respuesta inmune que desencadenan, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la posible oncogenicidad de algunos de ellos. Los sistemas de

vectores virales se basan en cuatro grupos de virus diferentes: *retrovirus*, *herpesvirus*, *virus adenoasociados* y *adenovirus*.

***Retrovirus (Rv):*** Comprenden una amplia clase de virus desarrollados que contienen ARN de cadena sencilla como genoma viral. Durante el ciclo de vida normal, el ARN vírico se transcribe a la inversa (por la enzima reversotranscriptasa) para producir ADN de cadena doble que se integra en el genoma de la célula huésped y se expresa por períodos prolongados. Como resultado, las células infectadas vierten virus de forma constante sin daño aparente a la célula huésped. El genoma viral es pequeño (aprox. 10 kilobases). La mayoría de los retrovirus se pueden integrar sólo en las células que se replican.

***Herpesvirus (Hv):*** Presentan un material genético compuesto, en la mayoría de los casos, por dos trozos de ADN bicatenario lineal unidos. El potencial de estos virus como vectores génicos recae en la habilidad de llevar grandes secuencias de ADN extraño insertadas y su capacidad para establecer infecciones latentes de larga duración, en las cuales el genoma del virus existe como un episoma con efectos no aparentes en la célula huésped. Los herpesvirus son muy diversos, variando en el tamaño y organización del genoma, en el contenido genético, en las células sobre las que actúa y en la patogénesis. En consecuencia, diferentes herpesvirus tienen muy diferentes usos potenciales en la transferencia de genes. La naturaleza de la latencia viral es de particular relevancia.

***Virus Adenoasociados (AAV):*** Son virus muy pequeños, muy simples, no autónomos, que contienen ADN lineal de cadena sencilla. Requieren la coinfección con adenovirus u otros para replicarse. La ventaja potencial del AAV es su capacidad de expresión a largo plazo en células que no se dividen, posiblemente por integración del ADN vírico. Los vectores son estructuralmente simples y pueden provocar menos respuesta de la célula huésped que el adenovirus. Su principal limitación en el presente es que los vectores son difíciles de desarrollar en altos títulos y poseen poco espacio para alojar genes terapéuticos.

**Adenovirus (Ad):** Comprenden una gran clase de virus carentes de envoltura membranosa que contienen ADN lineal de cadena doble.

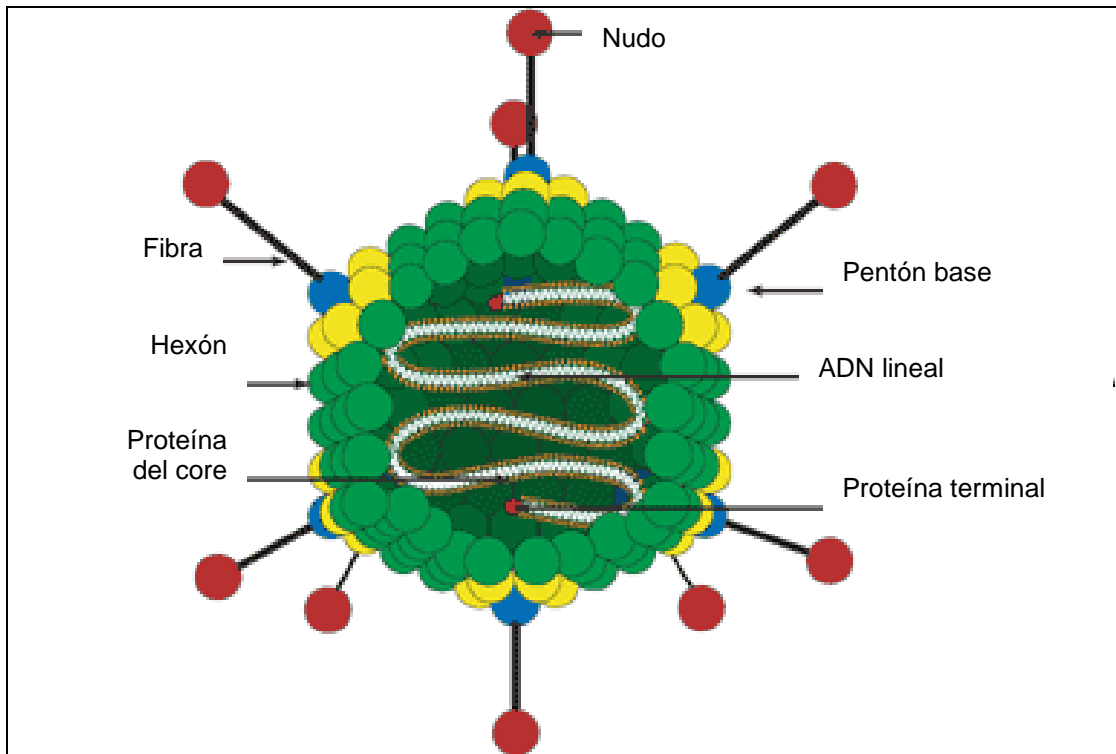
#### **1.4.2. Los vectores adenovirales (Ad) y adenovirales recombinantes (RAd)**

Los vectores virales que más han sido utilizados para transferencia génica son aquéllos derivados de los adenovirus (Ad) humanos serotipos 2 y 5. Estos virus son de ADN de doble cadena, de familia *Adenoviridae*. Las partículas de Ad son icosaédricas desnudas (no envueltos), de 60 a 90 nm de diámetro. Estos Ad causan infecciones oculares, respiratorias (Ad 5) e intestinales en humanos y no son tumorigénicos.

Los niveles de expresión en animales dependen de la cantidad de virus añadida y del vector usado, pero en general la expresión inicial es intensa y la duración de la expresión varía considerablemente.

Los vectores derivados de los Ad 5 pueden mediar altos niveles de transducción en una gran variedad de células, incluyendo las proliferantes y las estables, estando entre estas últimas las células endócrinas y las neuronas (He y col., 1998).

Los Ad codifican de 20 a 30 polipéptidos, de los cuales 15 son proteínas estructurales que constituyen una cápside de forma icosaédrica, con 20 caras y 12 vértices (**Fig. 21**). La cápside del Ad 5 está compuesta por 252 capsómeros proteicos, 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.



**Figura 21. Esquema de la estructura del adenovirus tipo 5.**

Esta proteína, compuesta por cinco subunidades es muy importante para la interacción de la partícula viral con la célula huésped. De cada uno de los pentones emerge una proteína trimérica con forma de antena, la fibra, la cual posee un dominio en el extremo denominado nudo o botón, que posee dos funciones: es responsable de la entrada del virus a la célula huésped y por otro lado, es clave para la trimerización de las subunidades que conforman la fibra (Krasnykh y col., 2000; Shayakhmetov y col., 2005).

El genoma de los Ad está compuesto por ADN lineal de doble cadena (dsDNA) de 30 - 38 kb de tamaño (el Ad 5 tiene un ADN de aprox. 36 kb). Unidas covalentemente a los extremos del genoma existen dos copias de una proteína terminal de 55 kDa y en cada extremo del genoma existen las denominadas repeticiones invertidas terminales (ITR, del inglés *inverted terminal repeats*), que son esenciales para la replicación del genoma viral y, además, le aportan estabilidad para su permanencia en el núcleo de la célula huésped. Durante un ciclo lítico, hay un orden en la expresión de los genes virales. Por lo tanto, los genes de los adenovirus han sido clasificados como genes tempranos y genes tardíos. A los primeros se los denomina E

(del inglés, *early*, temprano), son cuatro: los E1 (A y B), E2 (A y B), E3 y E4; y a los segundos L (del inglés *late*, tardío), dependen de la proteína E1, que es un activador en *trans*. Son cinco: los L1 a L5.

Los genes E son los que se expresan antes de la replicación del ADN y en su mayoría codifican para proteínas involucradas en la transcripción de genes virales, la replicación de ADN viral, la supresión de la respuesta inmune y la inhibición de la apoptosis de la célula huésped. Mientras que, los genes L son los que se expresan después de la replicación del ADN y casi todos codifican para las proteínas estructurales y para el ensamblaje de la partícula viral. Algunas regiones génicas importantes en el desarrollo de vectores adenovirales son: la región E1 que codifica para el principal transactivador viral, la E2 que codifica proteínas esenciales para la replicación viral y la E3 que codifica proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune y la inhibición de la apoptosis (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999).

Los adenovirus son capaces de infectar una amplia variedad de células. La entrada del virus a las células, está mediada por la interacción de proteínas de la cápside viral con los receptores de la superficie de la célula blanco (**Fig. 22 A**). Los Ad5 se unen mediante el botón terminal de la fibra viral a los receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus Coxsackie (CAR). Por lo tanto, los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de la Ig que interviene en la endocitosis de los Ad (Bergelson y col., 1997).

La interacción mediada por el 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 recubiertas de clatrina con viriones en su interior entran a la vía endosomal. Así, después de la endocitosis, mediante un proceso natural de acidificación endosomal se 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

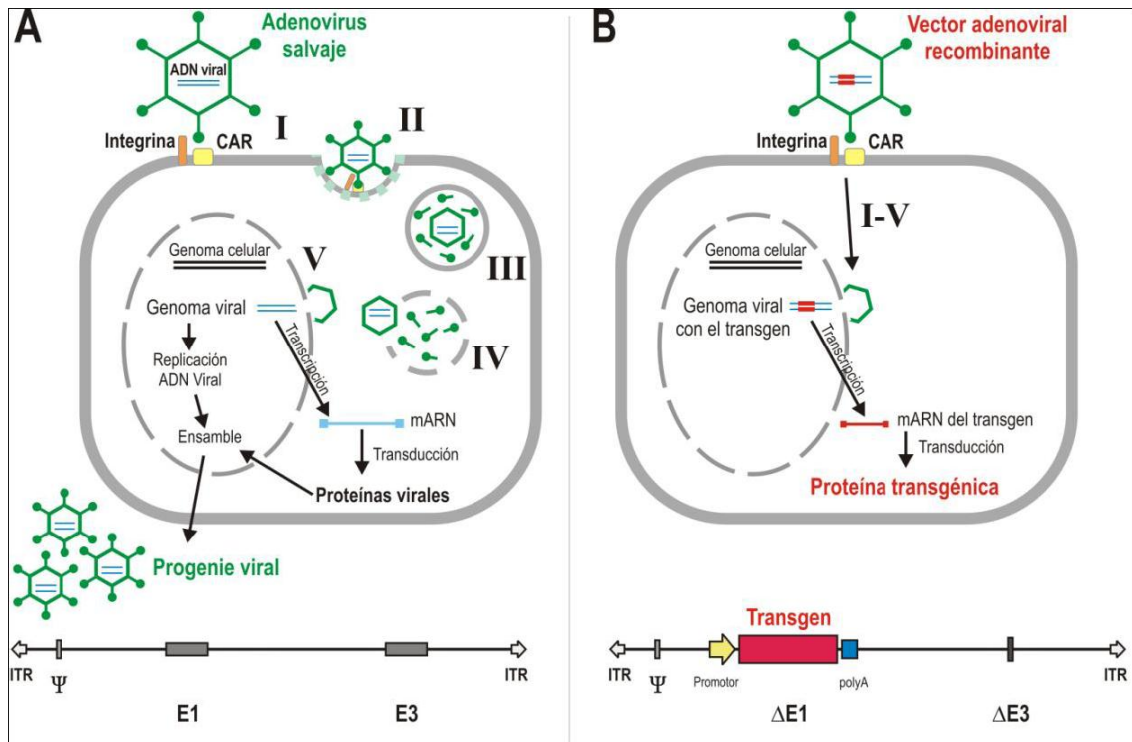
citoplasma, el virión con su cápside parcialmente desensamblada viaja utilizando el citoesqueleto hasta la membrana nuclear. Finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear que resulta en el desensamble de la cápside y el ingreso del ADN viral al núcleo (Campos y Barry, 2007).

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 replicación del genoma viral. En la iniciación de la replicación del genoma adenoviral, proceso sumamente eficiente, se requiere la presencia de tres proteínas virales, codificadas por la región génica E2, y al menos tres proteínas celulares (De Jong y Van der Vliet, 1999). Estos procesos culminan con el ensamble de la progenie de viriones en el núcleo de las células permisivas.

A lo largo de los últimos años, debido al conocimiento de la biología de los Ad, se han desarrollado nuevas generaciones de vectores adenovirales.

Los primeros en construirse fueron los vectores adenovirales recombinantes (RAd) con *genes inactivados* (Castro y col., 1997), también denominados *vectores adenovirales de primera generación* (**Fig. 22 B**). Dichos RAds eran incapaces de replicarse, por lo que no eran infectivos para la célula huésped y, por lo tanto, se evitaba una infección generalizada. Dichos vectores se basaron en adenovirus a los que se les suprimió los genes tempranos E1 y E3 (Bett y col., 1994).

El producto del gen temprano E1 es el principal *trans*-activador de la transcripción de los genes adenovirales, incluyendo aquéllos necesarios para la replicación viral. Por esta razón, la eliminación de la región E1 del genoma viral llevó a la incapacidad del virus para replicar y generar progenie (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999).



**Figura 22. Esquemas del ciclo de infección de adenovirus (A) y de vectores adenovirales recombinantes (B).**

**A: I:** Ad salvajes se unen a la superficie celular por interacción CAR-fibra viral-integrina-pentón base.

**II:** → cascada de señales y endocitosis de los viriones en vesículas de clatrina.

**III:** El endosoma se acidifica y cambia → liberación de las fibras y exposición de proteínas estructurales.

**IV:** Lisis de la membrana endosomal y el escape de los viriones.

**V:** Los viriones se unen a proteínas del citoesqueleto y llegan a la membrana nuclear, complejo del poro nuclear: desensamble de la cápside y liberación del genoma viral dentro del núcleo de la célula huésped.

En el núcleo, el genoma viral permanece como un episoma, se replica y se traducen sus proteínas. El ADN viral es empaquetado y la cápside se ensambla. Se genera la progenie viral que lisa la célula infectada.

Los RAD replicación defectiva entran a la célula blanco mediante los mismos pasos que los Ad (**I a V**). No se produce la replicación del ADN (debido a que carecen de los genes E1 y E3), ni se producen nuevas partículas virales. Por lo tanto, el transgen se expresa produciendo grandes concentraciones de la proteína transgénica.

Parte inferior: se observa la representación del genoma del Ad salvaje que consta de los ITRs, la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ) y todos los genes, incluyendo las regiones E1 y E3 (A), y el 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 cassette de expresión del transgen de interés, con un promotor y una señal de poliadenilación (polyA) (B).

La supresión de la región la E3 genera más espacio dentro del genoma para ubicar secuencias exógenas. Estos RAD (no replicativos) fueron replicados en líneas celulares específicas, como la línea celular transgénica derivada de riñón de embrión humano (HEK293) que contuvo la región genómica E1 faltante del Ad5 y, por lo tanto, expresó los genes necesarios para iniciar la replicación (Graham y Prevec, 1992).



En células 293 se pudieron amplificar estos RAds obteniéndose títulos muy elevados después de la purificación (centrifugación en gradiente de CICs) que alcanzan las  $10^{13}$  unidades formadoras de placa (pfu)/ ml (Campos y Barry, 2007). Sin embargo, a pesar de la eliminación de E1, se expresaron residualmente proteínas virales que desencadenaron una respuesta inmune muy intensa, caracterizada por LT citotóxicos, la cual eliminó a las células infectadas (Yang y col., 1994; 1995).

Debido a esto, se han construido *vectores adenovirales de segunda generación*, para reducir la inmunogenicidad. Estos han sido delecionados en las regiones E2 y E4, permitiéndoles una expresión más duradera (Gorziglia y col., 1999). Sin embargo, con estos RAd se mejoró levemente la duración de la expresión génica y aún está en discusión su ventaja respecto de los vectores de primera generación.

Las deleciones citadas resultaron no ser suficientes para evitar el elevado riesgo de inmunotoxicidad de estos vectores, debido a la expresión remanente de proteínas virales. Consecuentemente se desarrollaron los *vectores eviscerados* o *RAd de tercera generación*. A estos vectores adenovirales se les han removido todos sus genes excepto las secuencias necesarias en *cis*, incluyendo los dos orígenes de replicación en los extremos del genoma (ITRs), así como las secuencias de empaquetamiento. Estos vectores fueron denominados "*gutless*" (eviscerados) o *adenovirus de alta capacidad* (Puntel y col., 2006) Para generar el vector *gutless* es necesario proveer *in trans* todos los genes adenovirales faltantes, generalmente esto se logra mediante la coinfección con un adenovirus denominado virus colaborador (*helper*). Estos vectores son menos tóxicos e inmunogénicos y la expresión de transgenes más prolongada (Józkowicz y Dulak, 2005). Los vectores adenovirales *oncolíticos* surgieron con el descubrimiento de que ciertas estirpes de adenovirus presentaban mutaciones en la zona E1B del genoma (gen que codifica una proteína capaz de inactivar el gen supresor de tumor p53). En la replicación viral normal, el Ad se une e inactiva al p53 para asegurarse una replicación eficiente. Por lo tanto, estos *vectores virales oncolíticos* son incapaces de

replicarse en las células normales (que presentan p53), pero sí pueden hacerlo en las células cancerígenas, deficientes en p53, y causar la lisis de las mismas (Relph y col., 2004). Estudios con estos tipos de vectores prometen el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales.

Las principales ventajas de los RAd respecto de otros vectores se resumen en que: 1) son capaces de transferir el gen episomal de forma eficiente en una amplia cantidad de células y tejidos, en estado proliferativo o quiescente, 2) tienen una capacidad de hasta 34 Kb de ADN (*gutless*), 3) son fáciles de producir en grandes cantidades y de manipular en el laboratorio, 4) el genoma del RAd no se integra dentro del genoma de la célula huésped, descartando el riesgo de mutagénesis insercional, y 5) poseen una alta eficiencia de transferencia y de expresión génica (Yeh y Perricaudet, 1997; Benihoud y col., 1999).

La principal desventaja de los vectores adenovirales es la fuerte respuesta inmune del huésped dirigida contra la partícula viral y contra las células infectadas. Dicha respuesta inmune limita la expresión a largo plazo de los transgenes y la readministración del vector, al menos con altas dosis de vectores de primera generación (Yang y col., 1994). En la actualidad los mayores esfuerzos se centran en el desarrollo de vectores virales más eficientes. En tal sentido, se persiguen dos objetivos principales: la transferencia de genes a tipos celulares específicos y el diseño de vectores regulables, en los cuales una vez que el transgén es transferido a la célula blanco su expresión pueda ser regulada por medio de pequeñas moléculas (p.ej. tetraciclina).

Esto ha sido aplicado al sistema neuroendócrino, implementando el uso de vectores virales a diversos modelos experimentales (Stone y col., 2000; Bolognani y Goya., 2001; Morel y col., 2008).

## CAPÍTULO 2

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### Hipótesis

a. La temprana involución del timo actúa como un marcapaso fisiológico relevante en la declinación asociada a la edad del eje hipofisario-tímico.

b. La terapia génica neonatal con timulina en el ratón *nude* adulto normaliza algunas de las alteraciones endócrinas descritas. Estimamos que una ventaja adicional del modelo *nude* 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 a largo plazo de la timulina.

c. La terapia génica neonatal eleva los niveles séricos de la timulina y de las hormonas hipofisarias que se hallan deficientes en ratones *nude*.

d. La terapia génica neonatal restaura las alteraciones morfológicas y morfométricas en las diferentes poblaciones adenohipofisarias.

e. Un mejor conocimiento de las interrelaciones entre el timo endócrino y el sistema neuroendócrino provee nuevas aproximaciones para el tratamiento de las timodeficiencias asociadas al envejecimiento y a las enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas.

Para poder acercarnos a llevar a cabo este promisorio desafío, este trabajo propuso los objetivos que se detallan a continuación:

#### Objetivo general

**Implementar una terapia génica pituitaria neonatal** mediante el vector adenoviral portador del gen para timulina RAd-*met*FTS, con el fin de prevenir deficiencias en las poblaciones adenohipofisarias y en los niveles séricos de

la timulina y las hormonas hipofisarias, en ratones congénitamente atímicos *nude*.

### **Objetivos específicos**

- 1. Valorar las diferentes poblaciones adenohipofisarias** de ratones *nude* sometidos a terapia génica neonatal mediante técnicas inmunohistoquímicas morfométricas, estudiando la morfología de las poblaciones: somatotropa, lactotropa, tirotrópica, corticotropa y gonadotropa (luteotropa y folículo-trópica).
- 2. Medir la timulina sérica** mediante bioensayo de las rosetas y ELISA.
- 3. Cuantificar los niveles séricos de algunas hormonas pituitarias** mediante radioinmunoensayos séricos.
- 4. Medir valores de inmunoglobulina G** en ratones *nude* machos.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. DISEÑO DE LOS VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES PORTADORES DEL GEN DE LA TIMULINA PARA APLICAR EN TERAPIA GÉNICA PITUITARIA**

##### **3.1.1. Características generales del sistema de construcción**

Para amplificar los ADN plasmídicos fue necesario incorporar dichos vectores dentro de una cepa apropiada de *Escherichia coli*. Este protocolo se desarrolló en los Laboratorios del INIBIOLP y de la Cátedra de Histología B, permitiendo generar y almacenar bacterias competentes de la cepa de *E. coli* JM109 para su transformación posterior con ADN plasmídico. La cepa JM109 hospedó vectores multicopia en alta concentración, a la vez que careció de la T7 ARN polimerasa necesaria para la expresión de las proteínas recombinantes. La incorporación de ADN plasmídico en el citoplasma bacteriano se logró gracias a que las células bacterianas (JM109) han sido pretratadas. Se realizó la selección de las bacterias portadoras del ADN plasmídico, creciendo en colonias aisladas en un medio sólido que contuvo al agente de selección (Reggiani y col., 2006).

La obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias de *E. coli*, se realizó según Sambrook y Russell (2001). Para la transfección de plásmidos en cultivos celulares fue necesario obtener ADN de alta pureza y para tal fin, se empleó el sistema de purificación *Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System* (cat. # A7270, Promega) (Reggiani y col., 2006). Al ADN plasmídico se le midió su concentración en una dilución apropiada mediante la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

Las absorbancias medidas a 280 nm se determinan para evaluar su grado de pureza, es decir, la contaminación con proteínas. Se procedió a la digestión del ADN con enzimas de restricción que generaron terminales ligables de fragmentos de ADN. Esto permitió el corte del ADN plasmídico en

lugares específicos. Las enzimas de restricción permitieron el corte de los ADN plasmídicos en lugares específicos para su posterior análisis. Las digestiones fueron realizadas según el mismo protocolo básico y empleando un *buffer* adecuado en el cual la combinación de enzimas empleadas en la mezcla tuvo una actividad igual o mayor al 50% (Reggiani y col., 2006).

Las variantes de oligonucleótidos de doble cadena (oligos ds) codificadores para *metFTS* (Invitrogen) se generaron mediante el *annealing* (hibridación) de los dos oligonucleótidos de cadena simple (oligos ss) antiparalelos y complementarios. La ligasa del fago T4 catalizó la formación de enlaces fosfodiéster, pudiendo unir así los fragmentos de ADN con extremos complementarios, obteniéndose fragmentos de ADN complementarios lineales (Reggiani y col., 2006).

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: las HEK293, BHK, rCET y hCET. Las células 293 (cat. # PD-02-01, Microbix Biosystems Inc.) fueron empleadas para los procedimientos de generación, expansión y titulación de vectores adenovirales recombinantes. Dichas células estuvieron genéticamente modificadas de manera que expresaron constitutivamente las proteínas codificadas de la región E1 delecionada en los vectores adenovirales. Las cotransfecciones del plásmido lanzadera con el plásmido genómico para generar el RAd-FTS se realizaron utilizando lipofectamina (Cat. # 11668-027, Invitrogen) en células HEK293 (Reggiani y col., 2006).

### **3.1.2. Construcción de los vectores para aplicar en terapia génica pituitaria**

- **RAd-*metFTS* o RAd-FTS:** se construyó utilizando una variante de última generación del método de los dos plásmidos (Hitt y col., 1995) empleando el kit plasmídico AdMax® (Microbix, Canadá) que utilizó un plásmido *lanzadera* (pDC515) con *minicassette* de expresión constituido para el promotor del gen inmediato temprano del citomegalovirus murino (mCMV), un MCS, la señal de poliadenilación del Simian Virus 40 (SV40pA) y un sitio de reconocimiento FRT para la recombinasa FLP de levadura (**Fig. 23**). Dicho *cassette* estuvo flanqueado por los extremos de la región E1 del adenovirus

tipo 5 (Ad 5). Además, el plásmido poseía la señal de encapsidación del adenovirus ( $\psi$ ) y secuencias de repeticiones terminales invertidas enfrentadas (ITR-ITR). El segundo plásmido del kit, el plásmido genómico pBHfrt(del)E1,3FLP (35.552 pb), consistió en el genoma completo del Ad 5, conteniendo deleciones en las regiones E1 y E3. Además, contuvo un *cassette* de expresión para el gen de la FLP recombinasa de levadura, bajo el control del promotor del CMV humano, una señal de poliadenilación del SV40 y un sitio de reconocimiento para la recombinasa *frt*. La enzima FLP recombinasa (levadura *Saccharomyces cerevisiae*) reconoció el sitio *frt* de 34 pb, de ambos plásmidos, y permitió su recombinación sitio-específica. La deleción en la región E3 contuvo un único sitio de clonado Pacl, donde fue posible insertar un gen reporter o una secuencia reguladora. Este plásmido genómico también tuvo ITR-ITR pertenecientes a los adenovirus salvajes.

Las secuencias ITR facilitaron 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 poseyeron un gen de resistencia a la ampicilina, para permitir expandirlos en bacterias. La tercera variante de la secuencia *met*F<sub>TS</sub> diseñada se insertó en el MCS del plásmido *shuttle*, pDC515 (3.957 pb). El oligo ds *met*F<sub>TS</sub> y el pDC515 se digirieron con las ER BamHI. Los fragmentos lineales se purificaron en geles de agarosa, se ligaron entre sí y con el producto del ligado se transformaron las bacterias competentes. Se obtuvieron colonias que fueron chequeadas, confirmándose la correcta construcción del plásmido lanzadera, pDC515-*met*F<sub>TS</sub> y se cotransfectó con el plásmido genómico pBHGfrt(del)E1,3FLP en células 293, una línea celular humana modificada genéticamente para expresar constitutivamente los genes de la región adenoviral E1, delecionada en los vectores adenovirales.

En las células 293 cotransfectadas, la recombinasa FLP se expresó reconociendo los sitios FRT en ambos plásmidos y catalizó la recombinación sitio-dirigida, generando así el genoma del vector adenoviral deseado, portador del gen sintético para la timulina. En las células 293, dicho genoma se replicó y generó una producción masiva de viriones. A partir de los lisados

de las células 293 cotransfectadas y purificadas se obtuvo el vector viral RAd-FTS, titulado (ensayo de dilución en placas) y caracterizado (*in vitro* e *in vivo*) usando como control un RAd-βgal que expresó β-galactosidasa. Aquí la región genómica E1 fue reemplazada por un *cassette* de expresión conteniendo el gen que codifica para el operón 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 Institute Gustave Roussy, CNRS (Paris, Francia) (Reggiani y col., 2006).

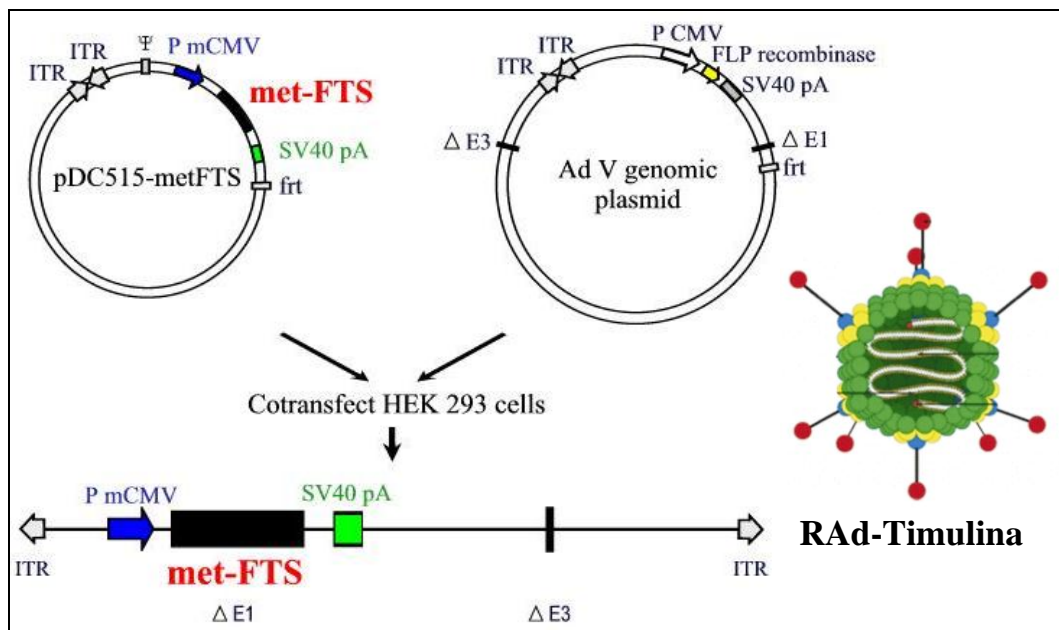


Figura 23. Esquema de la construcción del vector RAd-metFts.

- **RAd-(GFP/TK)<sub>fus</sub>** o **RAd-GFP**: el segundo vector utilizado fue el RAd-(GFP/TK)<sub>fus</sub>, construido por el Dr. Goya y colaboradores, en el Laboratorio Cátedra de Histología B-INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, mediante el proceso general empleado en la construcción del RAd-FTS.

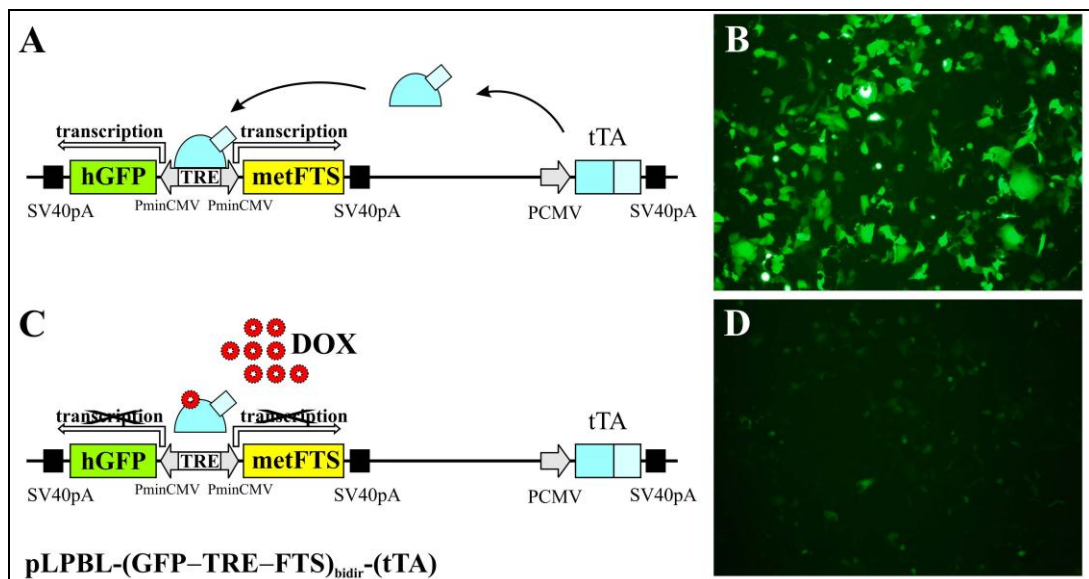
En dicho vector se insertó el gen híbrido GFP/TK que codifica para la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* fusionada a la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* tipo 1 (donado por el Dr. Jacques Galipeau, McGill University, Montreal, Canadá). Ambos vectores adenovirales recombinantes controles fueron expandidos en células 293,



purificados y titulados como se indica para el RAD-FTS (Reggiani y col., 2006).

### 3.1.3. Obtención, purificación y titulación de RAD-*met*FTS para aplicar en terapia génica pituitaria

El plásmido *pmet*FTS-hMGFP, portador de la secuencia híbrida *met*FTS-hMGFP, fue transfectado en dos líneas celulares, la HEK293 y la BHK con el fin de determinar si dicho vector era capaz de expresar la proteína de fusión. En este vector, la hMGFP actuó como una marca fluorescente para permitir la fácil identificación de la expresión. Se capturaron imágenes y se analizaron mediante fluorescencia (**Fig. 24**).



**Figura 24 Representación diagramática del genoma de un sistema plásmido regulable bidireccional Tet-Off expresando los genes GFP y *met*FTS.**

**Panel A:** muestra el sistema activo. **Panel C:** a pesar de que el sistema está inhibido por doxiciclina. **hGFP:** Proteína humana Fluorescente *Green*; **TRE:** Tetracycline; **metFTS:** *met*FTS codificando secuencia; **tTA:** proteína reguladora quimérica; **PminCMV:** promotor mínimo de citomegalovirus; **SV40pA:** señal de poliadenilación. **Paneles B y D:** Las imágenes corresponden a las células 293 transfectadas con un plásmido portador del sistema Tet-Off para *met*FTS y GFP en ausencia (**B**) o en presencia (**D**) de DOX. 20x. Cedido por el Dr. R. Goya.

Las células en cultivo que no producen timulina, HEK293 y BHK, fueron incubadas con  $6,5 \times 10^9$  pfu/ml del vector RAD-FTS o del RAD- $\beta$ gal (control negativo). Se detectaron elevados niveles de timulina bioactiva en los

sobrenadantes y lisados de dichas líneas celulares respecto de las células incubadas con el vector control (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Niveles de timulina en células HEK293 y BHK transducidas con el RAd-FTS. Datos: media  $\pm$  SEM. N=3 en cada grupo. Timulina (pg/ml).

<b>Cultivos celulares + vector</b>			
<b>Timulina (pg/ml)</b>	c293 + RAd-FTS	BHK + RAd-FTS	c293 + RAd- $\beta$ gal
<b>Sobrenadantes</b>	267 $\pm$ 53	133 $\pm$ 27	0,6 $\pm$ 0,02
<b>Lisados</b>	1.066 $\pm$ 213	533 $\pm$ 107	0,7 $\pm$ 0,02

Se incubaron células productoras de timulina, rCET (células epiteliales tímicas de rata) y las hCET (células epiteliales tímicas de feto humano), con  $6,5 \times 10^{10}$  y  $6,5 \times 10^9$  pfu/ml del RAd-FTS. Dichos cultivos se marcaron con DAPI para evidenciar por fluorescencia la morfología y la viabilidad de los núcleos de las células transducidas por el RAd-FTS. No se observaron diferencias entre los cultivos que recibieron el RAd-FTS y las células intactas. Es decir, no se detectaron núcleos alterados ni apoptóticos en los cultivos con niveles elevados de timulina.

### **3.2. PROTOCOLO DE MANEJO DE ANIMALES Y TÉCNICAS QUIRÚRGICAS**

#### **3.2.1. Animales**

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

- *Ratones nude* machos y hembras provenientes de la CNEA. Los apareamientos se realizaron entre *hembras heterocigotas nu/+* y *machos homocigotas recesivos nu/nu*. Fueron mantenidos con comida  $\gamma$ -irradiada (IONICS) y agua estéril *ad libitum*, a  $24 \pm 2^\circ$  C con ciclos luz/oscuridad de 12/12 hs, en el Bioterio de la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.
- *Ratones C57BL/6 adultos* (2 meses) de ambos sexos, provenientes del Bioterio del INIBIOLP y mantenidos a  $22^\circ$  C de temperatura, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 hs, alimento balanceado y agua *ad libitum*.

Todos los experimentos con animales fueron realizados siguiendo las indicaciones del *Animal Welfare Guidelines* de NIH (INIBIOLP-Cátedra Histología B's *Animal Welfare Assurance* N° A5647-01, Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP).

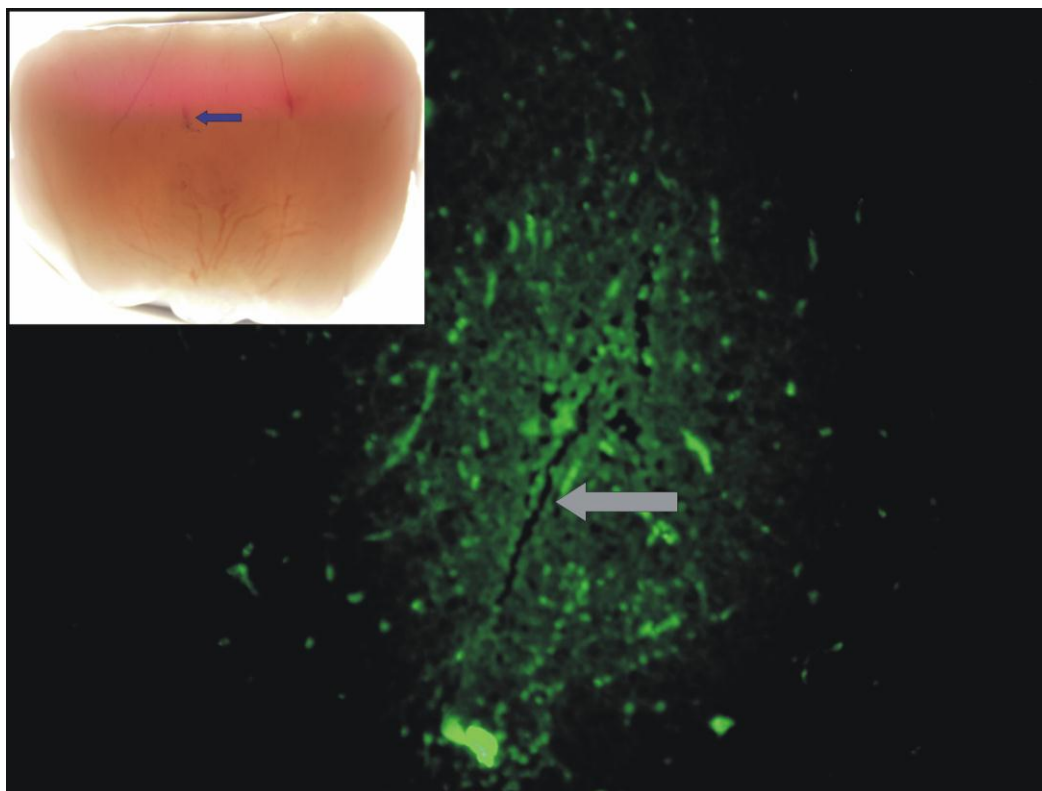
### **3.2.2. Inoculación de los vectores: estereotaxia pituitaria y vía i.m.**

Se pusieron a punto técnicas estereotáficas para inocular vectores virales recombinantes en la pituitaria, a fin de transferir los genes terapéuticos. Por medio de un aparato estereotáfico, se insertó la aguja N° 26 de una jeringa Hamilton de 10 µl hasta que la punta alcanzara las coordenadas en relación al bregma: 5.5 mm posterior, 9.6 mm ventral y 0.7 mm a derecha e izquierda (Paxinos y Watson, 1998).

Los virus a utilizarse poseían títulos del orden de  $10^{12}$  pfu/ml (unidades formadoras de placa/ml) y fueron administrados en un volumen final de 1 µl. Se retiró la aguja y se cerró la herida con un *agraffe* quirúrgico.

Como controles se utilizaron animales inyectados en la misma zona con vehículo o con soluciones tintoriales vitales que permitan identificar *postmortem* la zona anatómica alcanzada por la punta de la aguja.

En el presente diseño se obtuvieron excelentes resultados al inocular los vectores vía i.m., por lo que la puesta a punto de la estereotaxia se utilizó para la marcación intrapituitaria del RAd-GFP mediante microscopía de fluorescencia (**Fig. 25**).



**Figura 25. Expresión del transgénico (GFP/TK)<sub>fus</sub> en la hipófisis de rata.**

El panel principal muestra la fluorescencia verde en las células trasducidas alrededor del punto de entrada de la aguja (flecha) usada para liberar mediante estereotaxia el RAd-(GFP/TK)<sub>fus</sub> dentro de la pituitaria (20x). El recuadro muestra a menor aumento el punto de entrada de la aguja (flecha) en la pituitaria. No hay evidencia de daño estructural como consecuencia de la inyección (4x). Microfotografía cedida por los Dres. Cónsole y Goya.

### 3.2.3. Disección quirúrgica de las hipófisis bajo lupa

Todos los grupos de animales fueron sacrificados entre las 8 a 9 a.m. por dislocación cervical. Se realizó craneotomía y se ubicó la silla turca bajo lupa, despegando con cuidado la duramadre. Se hizo una fijación *in situ* con fijador de Bouin, a fin de evitar la autólisis glandular y se realizó una disección cuidadosa bajo lupa, a fin de separar la pituitaria de las meninges. Se procedió a su fijación en Bouin.

### 3.2.4. Diseño experimental: Terapia génica pituitaria con RAd-FTS y RAd-GFP

Se diseñaron cuatro (4) grupos denominados: nu/+ GFP, nu/+ FTS, nu/nu GFP y nu/nu FTS. En total, con la subdivisión de machos y hembras, quedaron conformados ocho (8) grupos de animales, a fin de analizar los parámetros morfológicos, bioquímicos e inmunológicos.

Se realizó la transferencia del vector adenoviral recombinante portador del gen de la timulina **RAd-FTS**: grupo experimental (N= 50) y de un vector control adenoviral recombinante portador de proteína fluorescente verde: **RAd-GFP**: grupo control (N= 50), respectivamente en ratones hembras y machos.

Al día postnatal 1, cada ratón (nu/nu y nu/+) recibió una única inyección bilateral i.m. de  $10^8$  UFP/ml de RAd-FTS o RAd-GFP (vector control), en 10 $\mu$ l de vehículo, en el músculo de cada pata trasera. Para la inyección de los virus se utilizó una jeringa Hamilton estando los animales en una campana de bioseguridad. En el día postnatal 13, tres ratones de cada grupo fueron sangrados para determinar la timulina sérica. En el día postnatal 71, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sangrados para efectuar estudios hormonales séricos. Se disecaron las pituitarias bajo lupa y se procesaron para microscopía óptica (**Fig. 26**).

Los experimentos con ratones *nude* fueron realizados de acuerdo con la *Animal Welfare Guidelines* de NIH.

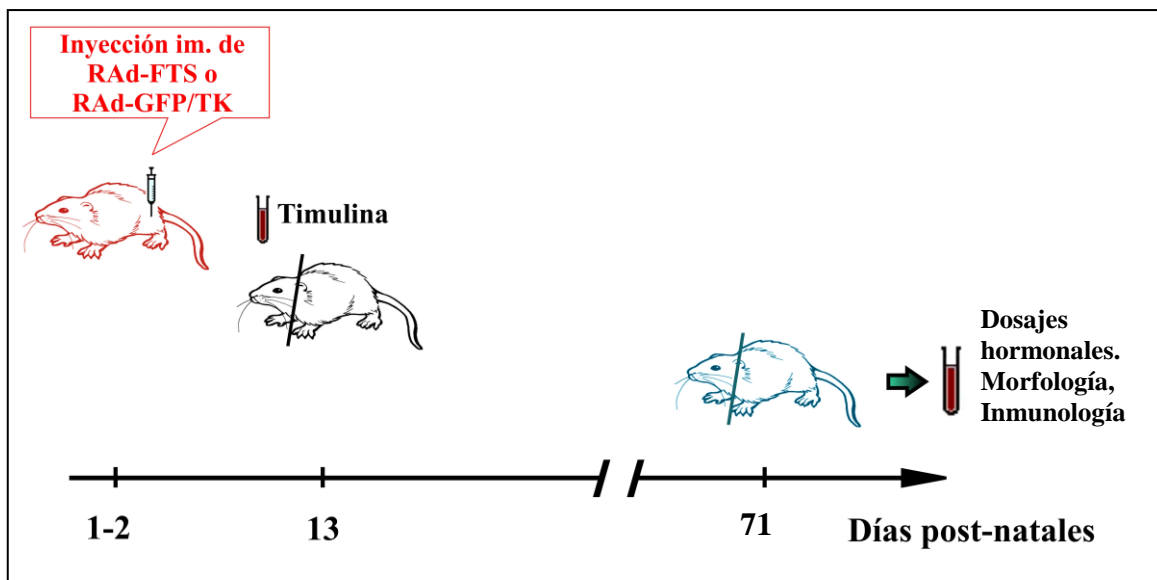


Figura 26. Diseño experimental: Terapia génica con RAd-FTS y RAd-GFP.

### **3.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS Y MORFOMÉTRICAS**

#### **3.3.1. Reactivos**

Se utilizaron los materiales necesarios para el procesado de las muestras para microscopía de luz (paraplast, solventes, etc.) y los colorantes para efectuar las técnicas de la microscopía de luz convencional e histoquímicas especiales.

#### **3.3.2. Antisueros**

Se usaron antisueros anti-hormonas hipofisarias (GH, PRL, ACTH, TSH, LH y FSH), sistema EnVision (Dako, USA) y cromógeno diaminobencidina (DAB).

#### **3.3.3. Procesado histológico-corte-coloración**

Las hipófisis fueron rápidamente fijadas en líquido Bouin (85% v/v de solución saturada de ác. pícrico, 10% v/v de Formol 40% y 5% v/v de ác. acético glaciar) durante 4 horas y se pasaron a alcohol 70%. Se procesaron para ser incluidas en paraplast. Se efectuaron cortes histológicos seriados de 4 µm de espesor, en los dos niveles de la glándula pituitaria (ventral y dorsal) mediante un micrótomo Reichert-Jung 2040. Se hicieron coloraciones de rutina con hematoxilina-eosina y técnicas histoquímicas como PAS-orange y Herlant.

#### **3.3.4. Inmunohistoquímica**

Las secciones fueron inmunomarcadas para detectar las diferentes poblaciones adenohipofisarias: somatotropa, lactotropa, corticotropa, tirotrópica, luteotropa y folículotropa. Se procedió a detectar las células positivas incubando durante una hora, a temperatura ambiente, con los antisueros primarios (Dako Corp., CA, USA): anti-GH, anti-PRL, anti-ACTH, anti-TSH, anti-LH y anti-FSH (Cónsole y col., 2001) Las secciones fueron lavadas y tratadas durante 30 min con un sistema de reacción del polímero marcado (EnVision, Dako) y DAB como cromógeno sensible a la peroxidasa.

### 3.3.5. Morfometría mediante videomicroscopía

Se realizaron muestreos al azar de las poblaciones somatotropa y lactotropa ya que presentan distribución homogénea dentro de la *pars distalis*, mientras que se cuantificaron todas las células con inmunomarcación positiva, cuando se trabajó con las restantes poblaciones de distribución irregular.

Se calcularon el **tamaño celular (TC)**, la **densidad de volumen (DV)** y la **densidad de células (DC)** en relación a un *área de referencia (AR)*. Se utilizó un analizador de imágenes *Imaging Technology* y un programa *Optimas 5.2* (Cónsole y col., 2002).

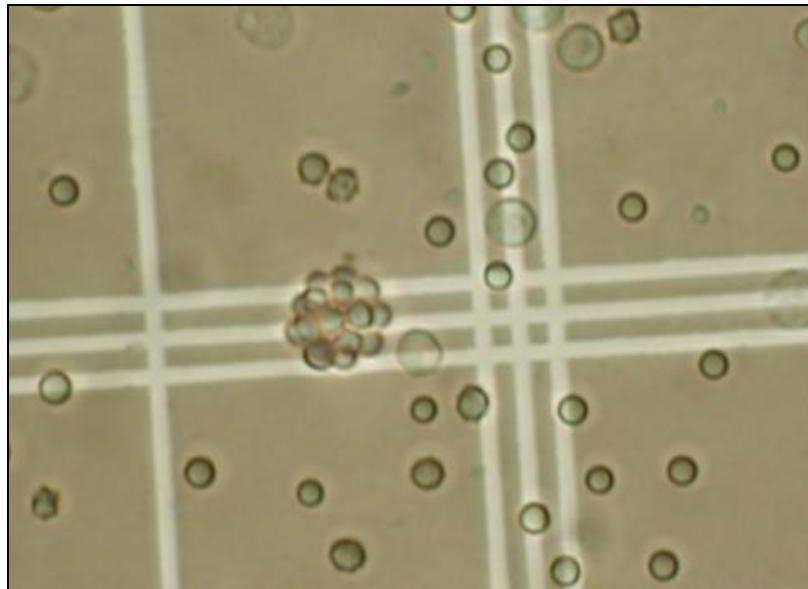
Las células y el área de referencia (AR) fueron analizadas en cada campo en base a un promedio de diez microfotografías tomando dos niveles (ventral y dorsal). Estas mediciones fueron registradas y procesadas automáticamente. Se calcularon los siguientes parámetros morfológicos: *densidad de volumen* ( $DV = \Sigma$  o suma de áreas celulares/AR), *densidad celular* ( $DC = \text{número de células/AR}$ ), y *tamaño celular* (TC, expresado en  $\mu\text{m}^2$ ). AR representa el total del área a través de la que son contadas todas las células positivas. La suma ( $\Sigma$ ) de las áreas celulares individuales (A) dividida por el área de referencia (AR) permite obtener la *densidad de volumen* (DV), un parámetro que representa una estimación de la masa celular de acuerdo a criterios generalmente aceptados. El número de células (DC) fue calculado dividiendo el área inmunomarcada del tejido pituitario por el área promedio celular individual. Para este parámetro, fueron registradas 100 células en cada campo.

## 3.4. DETERMINACIONES HORMONALES

### 3.4.1. Bioensayo de las rosetas

La timulina bioactiva fue medida en el suero por un bioensayo de rosetas (Dardenne y Bach, 1975). El método midió la capacidad de la timulina para restaurar el efecto inhibitorio de la azatioprina sobre la formación de rosetas en esplenocitos de ratón Tx (**Fig. 27**). Los valores séricos se expresaron

como fg/ml de timulina bioactiva. Por lo tanto, a mayor cantidad de timulina activa presente en la muestra, mayor cantidad de diluciones serán necesarias para observar formación de las rosetas. La actividad inhibitoria de las muestras se compara con una curva estándar de concentraciones conocidas de la timulina sintética.



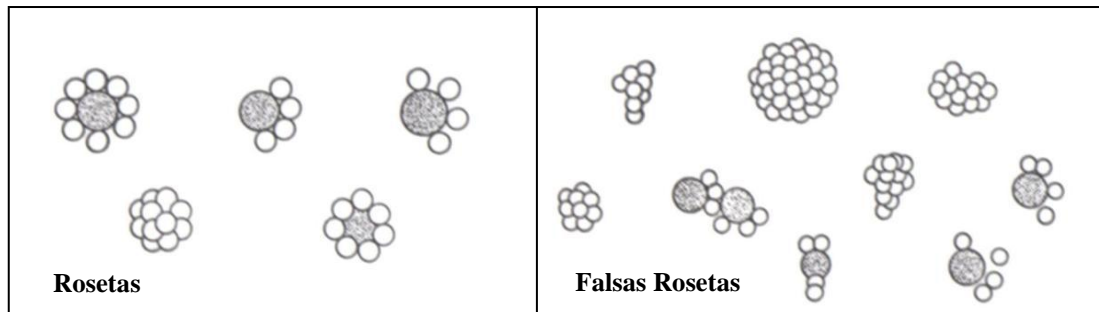
**Figura 27. Fotografía de una roseta formada por glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón timectomizado. 45x.**

Este método es el único con la sensibilidad suficiente para detectar los bajísimos niveles de timulina que existen en sangre (del orden de los fg/ml). Los valores se expresaron como la concentración de FTS-Zn en la muestra. Brevemente, la curva estándar de timulina se realizó con timulina sintética (donada por el Dr. Peter Heinklein, Humboldt University, Berlín) con los siguientes puntos: 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 fg/ml. Las muestras se filtraron en frío a través de membranas de 30 kDa *cut-off* (YMT micropartition system, PMS-I Amicon Corporation, Denver). Luego, se realizaron diluciones seriadas de las mismas. Por ejemplo, si correspondían a animales Tx o *nude* se usaron como diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64 y para animales tratados (con RAd-FTS) las diluciones fueron: 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024.

Una roseta está constituida por un linfocito con por lo menos 3 eritrocitos pegados a él (**Fig. 28**). Cuando en toda la cámara se observaron de 1 a 3



rosetas se consideró inhibición o negativo. Si se contaron 6 rosetas, se consideró positivo y la concentración de timulina se tomó como la última dilución donde se observó inhibición (Dardenne y Bach, 1975).



**Figura 28. Esquema de las rosetas en sus distintas variedades (panel izq.) y otras agrupaciones que no se consideran rosetas (panel der.).**

Modificado de Dardenne y Bach, 1975.

### **3.4.2. Dosaje de la timulina**

La timulina inmunorreactiva (FTS y FTS-Zn) se determinó por un ELISA con modificaciones (Mestreau y col., 1987). Brevemente, en placas se mezclaron 60  $\mu$ l de muestra o de FTS sintético (estándar) con 60  $\mu$ l de anti-FTS (dilución 1/ 2.000, preparado por el Dr. JM Pléau, Paris) y se incubó toda la noche a 4° C. La mezcla se transfirió a una placa de ELISA 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), empleando el sustrato de la peroxidasa ABTS para el desarrollo del color. La sensibilidad de este método es de 300 pg FTS/ml.

### **3.4.3. Radioinmunoensayos (RIA) séricos de las hormonas hipofisarias**

Los niveles séricos de LH y FSH fueron determinados por RIA usando materiales provistos por el Dr. A. F. Parlow (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA Med. Center, U.S.A). Las concentraciones séricas de LH y FSH fueron expresadas según LH RP-2 de ratón y FSH RP-2 de rata, respectivamente.

### **3.5. ESTUDIO INMUNOLÓGICO**

#### **3.5.1. Valoración de la inmunidad humoral mediante espectrofotometría**

Con el propósito de determinar los niveles de IgG en el suero de ratones *nude* se empleó el *Kit Easy-Titer® Mouse IgG Assay*, de Pierce Biotechnology Products que contiene esferas cubiertas con anticuerpos anti-IgG que absorben la luz entre 340 y 405 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (facilitado por el INBIOLP de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP).

Se realizó el ensayo utilizando sueros de ratones *nude* de la cepa N: NIN (s) *nude* proporcionados por la Dra. C. Carbone de la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la UNLP.

Se realizaron diluciones seriadas de 1/1, 1/10 y 1/100 por triplicado, y se siguió el protocolo de instrucciones del *Kit Easy-Titer® Mouse IgG Assay*. Se utilizaron dos pools de suero de ratones; uno heterocigoto y otro homocigoto (ratones *nude*, cepa N: NIN (s) nu), con 1 ml cada uno.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.6.1. Métodos estadísticos**

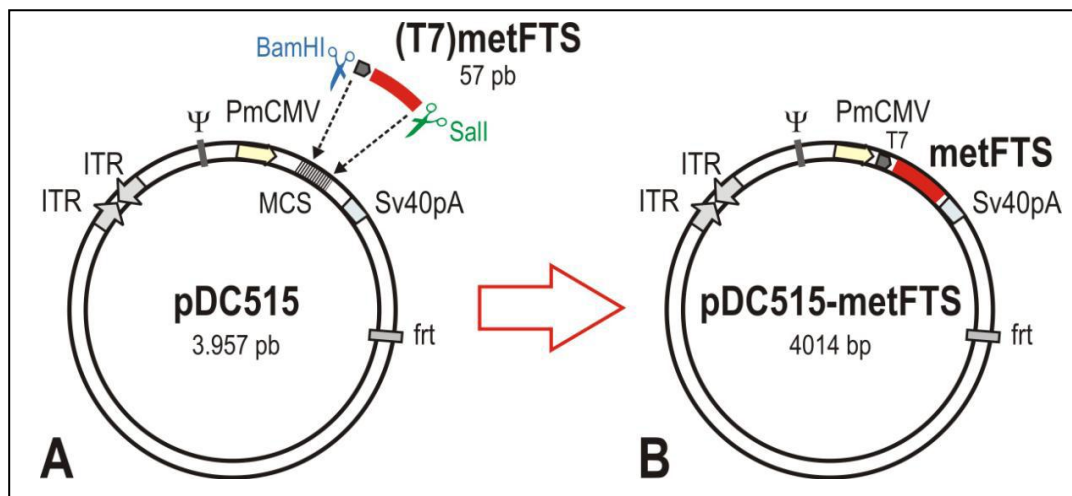
Los datos obtenidos en el presente trabajo se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre grupos experimentales se realizaron por el test-*t* de Student o por el test ANOVA. Se consideraron diferencias significativas a valores de  $p < 0,05$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

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1. APLICACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN DE LA TIMULINA RAd-*met*FTS

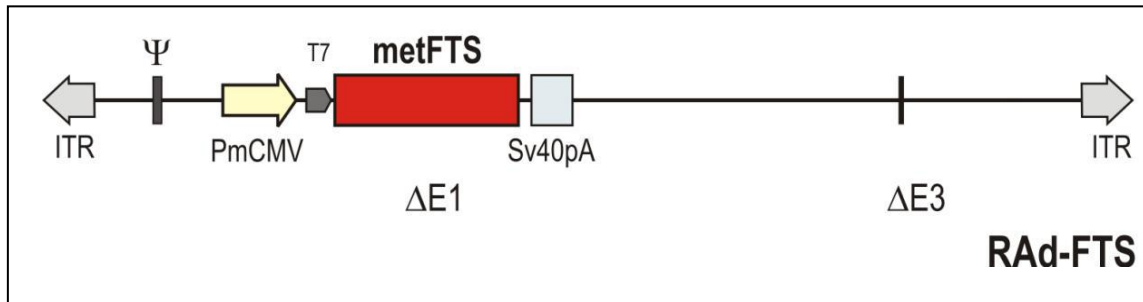
El primer paso en la construcción del vector adenoviral para expresar *met*FTS, fue generar la tercera variante del oligo ds y clonarla en el vector lanzadera (*shuttle*) pDC515 (**Fig. 29A**). A la secuencia básica *met*FTS se le agregó en el extremo 5' el sitio del promotor del fago T7 para permitir la secuenciación del plásmido pDC515-*met*FTS (**Fig. 29B**).



**Figura 29. Esquema de la construcción del pDC515-*met*FTS.**

A. El clonado de la secuencia (T7)*met*FTS se realizó mediante su digestión con las enzimas de restricción (BamHI y Sall) en el plásmido MCS shuttle pDC515.  
B. Resulta el plásmido pDC515-*met*FTS que expresa el gen sintético de la timulina. 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.

Dicho plásmido se cotransfectó con el plásmido genómico en células 293, obteniéndose el RAd-FTS (**Fig. 30**), que fue subsecuentemente purificado en gradiente de CsCl.



**Figura 30. Genoma del vector adenoviral recombinante que expresa timulina.**

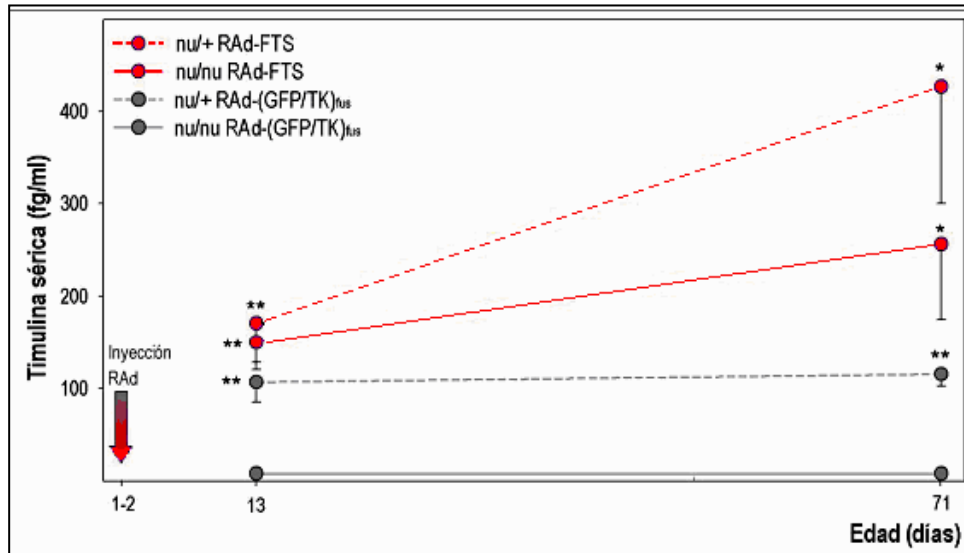
El RAd-FTS se genera por la recombinación enzimo-dirigida del cassette de expresión del pDC515-*metFTS* y el plásmido genómico, que consiste en el genoma del Ad 5 con dos deleciones, en las regiones E1 y E3. PmCMV: promotor del citomagalo virus murino; SV40: señal de poliadenilación;  $\psi$ : señal de encapsidación; ITR: repeticiones terminales invertidas;  $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ : deleciones E1, E3; frt: sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa.

#### **4.2. NIVELES SÉRICOS DE TIMULINA EN RATONES *NUDE* SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA CON RAd-FTS**

Una única inyección i.m. de RAd-FTS pero no de RAd-GFP (vector control) incrementó los niveles circulantes de la timulina biológicamente activa, tanto en los ratones heterocigotas como en los homocigotas *nude* testeados.

A los 13 días de edad los ratones nu/nu tratados con RAd-FTS alcanzaron niveles de timulina sérica comparables a aquéllos de la contraparte nu/+ controles. Efectivamente, los niveles de la timulina sérica de los ratones nu/nu tratados con RAd-GFP fueron más bajos que el resto de los grupos estudiados, y tuvieron diferencias significativas al compararlos mediante el test de ANOVA (**Fig. 31**).

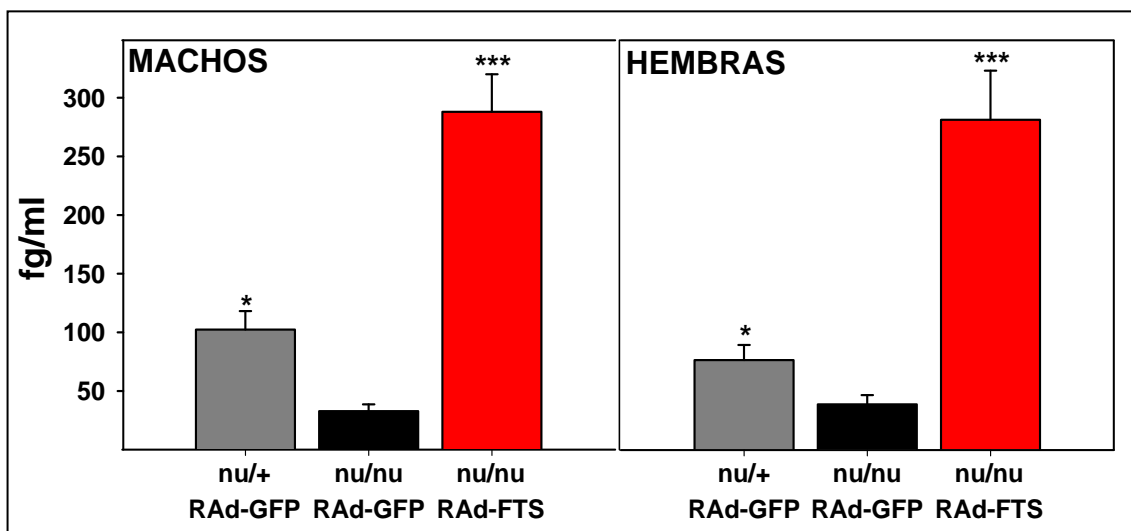
A los 71 días de edad también se observaron resultados similares: los niveles de timulina sérica de los ratones nu/nu tratados con RAd-FTS eran más altos que los de los ratones nu/nu tratados con RAd-GFP, y sus diferencias fueron significativas al compararlos mediante el test de ANOVA (**Fig. 31**).



**Figura 31. Efecto de la TGNT sobre los niveles séricos de timulina en ratones heterocigotas y homocigotas *nude*.**

Los valores de la timulina sérica (fg/ml) se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, ANOVA: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

Simultáneamente, a los 71 días, se observó que tanto en machos como en hembras, los niveles circulantes de la timulina alcanzaron niveles suprafisiológicos en los ratones *nude* tratados con RAd-FTS. Estos valores tuvieron diferencias significativas al aplicar el test de ANOVA entre los ratones *nude* control y los otros grupos (**Fig. 32**).



**Figura 32. Efecto de la terapia génica neonatal sobre los niveles séricos de timulina en ratones *nude* homo y heterocigotas de ambos sexos.**

Los valores de la timulina sérica (fg/ml) se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, ANOVA: \*( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

### 4.3. EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON RAd-FTS SOBRE LA MORFOLOGÍA ADENOHIPOFISARIA EN RATONES NUDE

#### 4.3.1. La población lactotropa

a. **Morfología pituitaria:** los ratones *nu/nu* tratados con vector control presentaron descenso de la población lactotropa al compararlos con sus contrapartes *nu/+*. En la población lactotropa *nu/nu* tratada con RAd-FTS se observó restauración de la morfología con respecto a los controles atímicos RAd-GFP, tanto en machos como en hembras (**Fig. 33**).

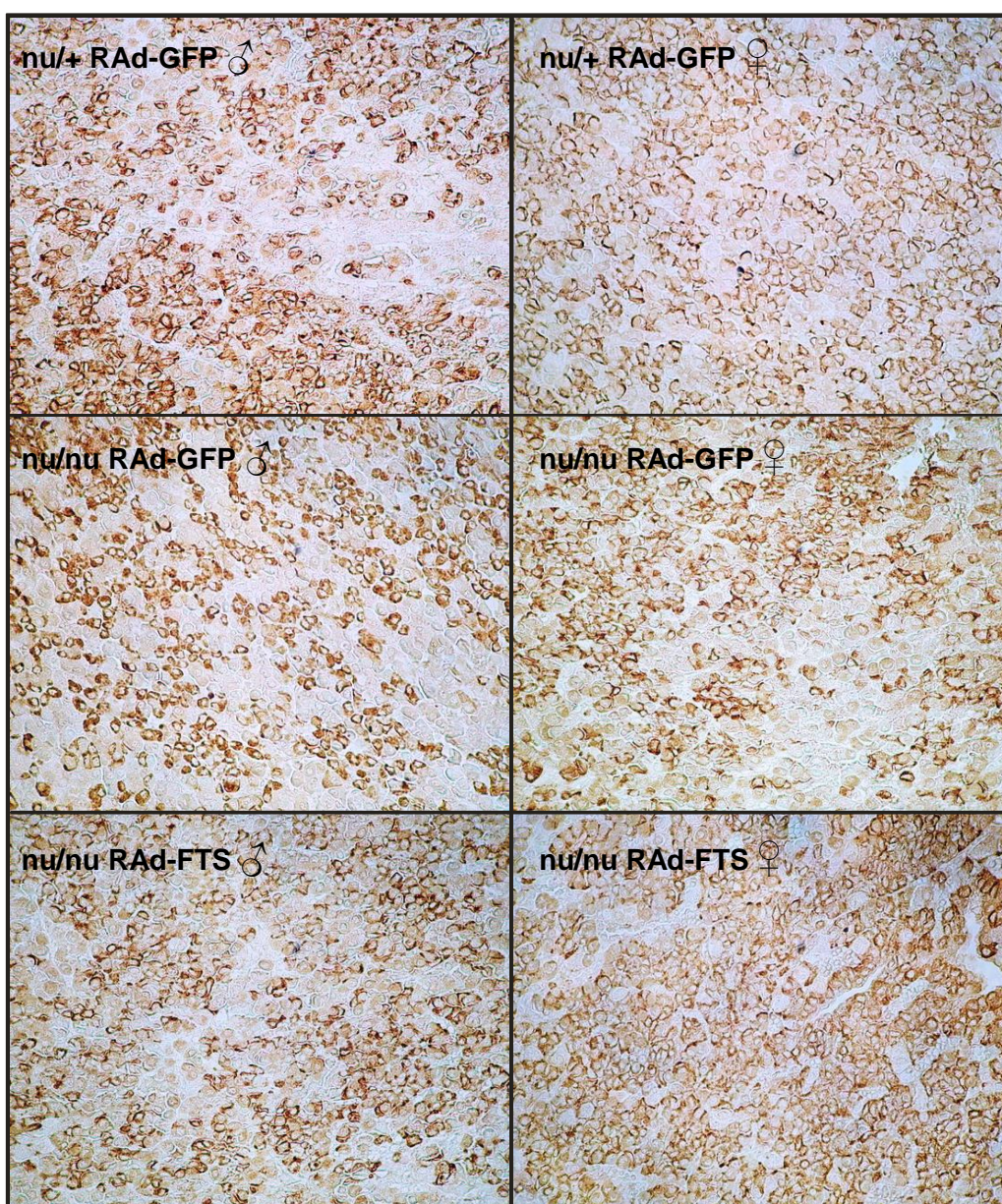
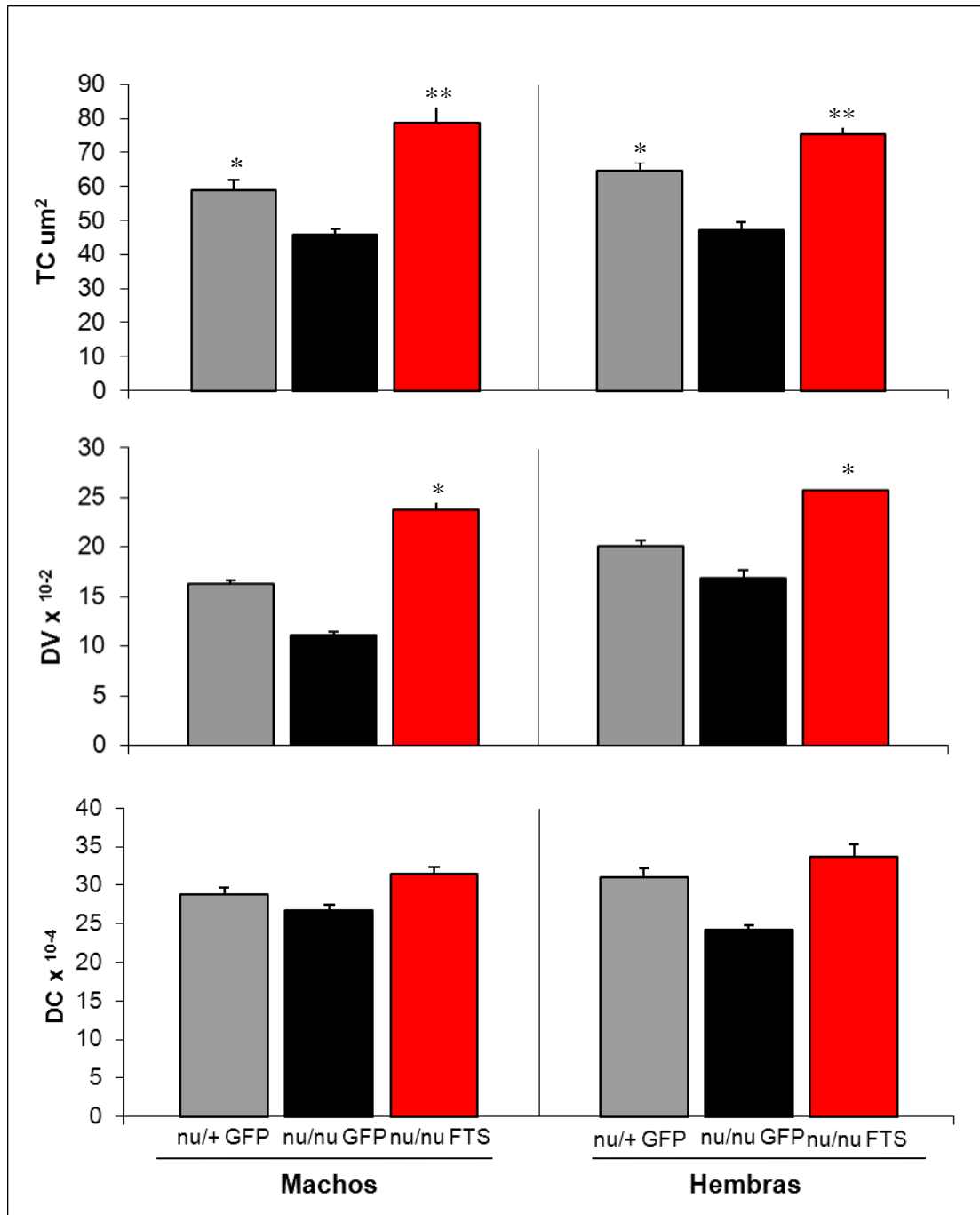


Figura 33. Microfotografías representativas de la población lactotropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.

**b. Morfometría pituitaria:** Los promedios de los tres parámetros histométricos estudiados (DC, TC y DV) mostraron mayores valores en hembras respecto a machos. Esta diferencia sugiere la presencia de dimorfismo según sexo. La población lactotropa con TGNT reveló aumento significativo de TC y DV, con tendencia a un aumento no significativo en DC, respecto de los animales atímicos tratados con el vector control de ambos sexos (**Fig. 34**).



**Figura 34. Análisis histométrico de la población lactotropa.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAD-GFP, test-*t* de Student: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 4.3.2. La población somatotropa

a. **Morfología pituitaria:** La población somatotropa mostró un patrón citoplasmático granular ocre. En la siguiente figura, los campos son representativos de la restauración de la población somatotropa inmunomarcada con RAd-FTS al comparar con los controles RAd-GFP atímicos, tanto machos como hembras (**Fig. 35**).

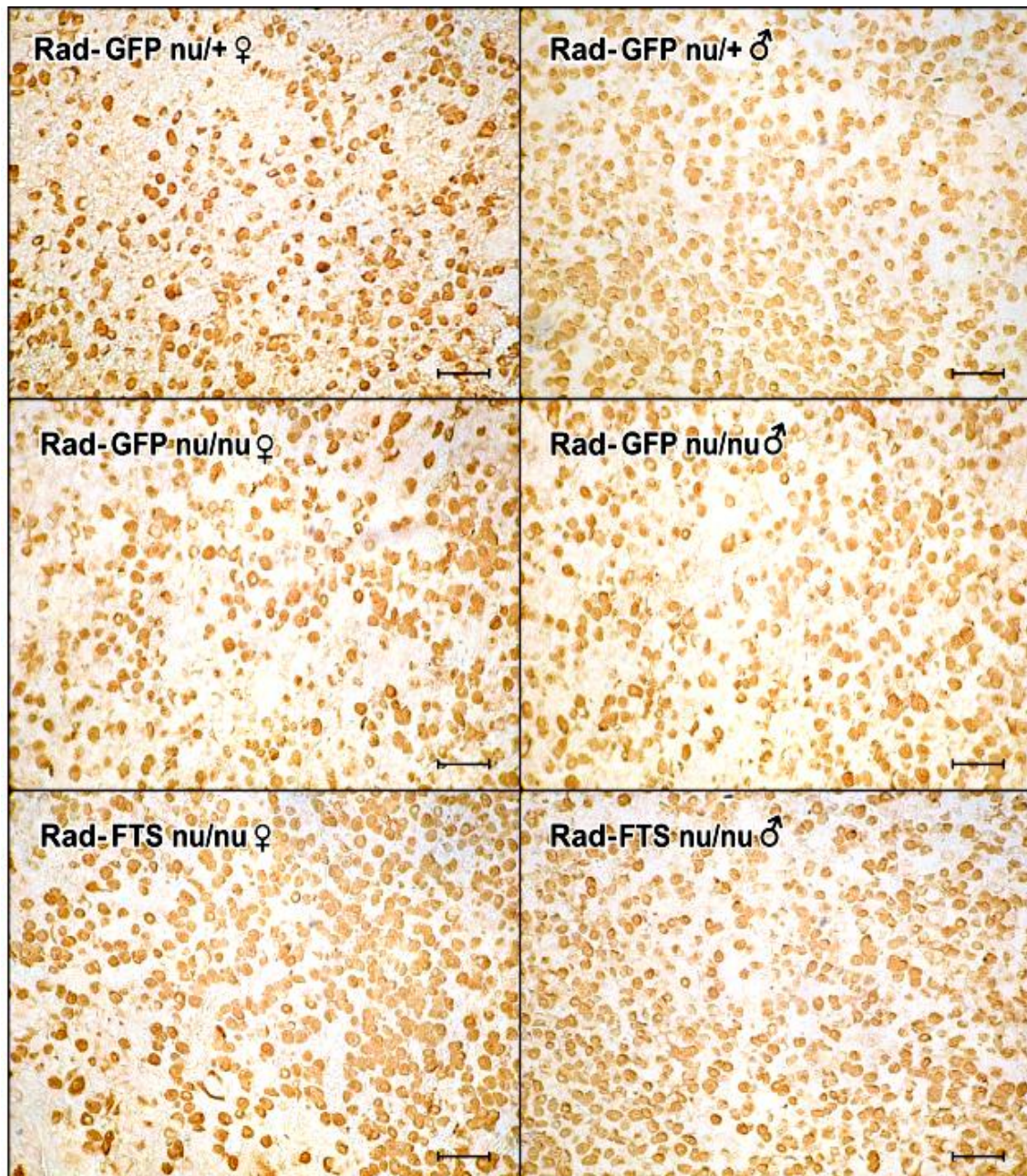
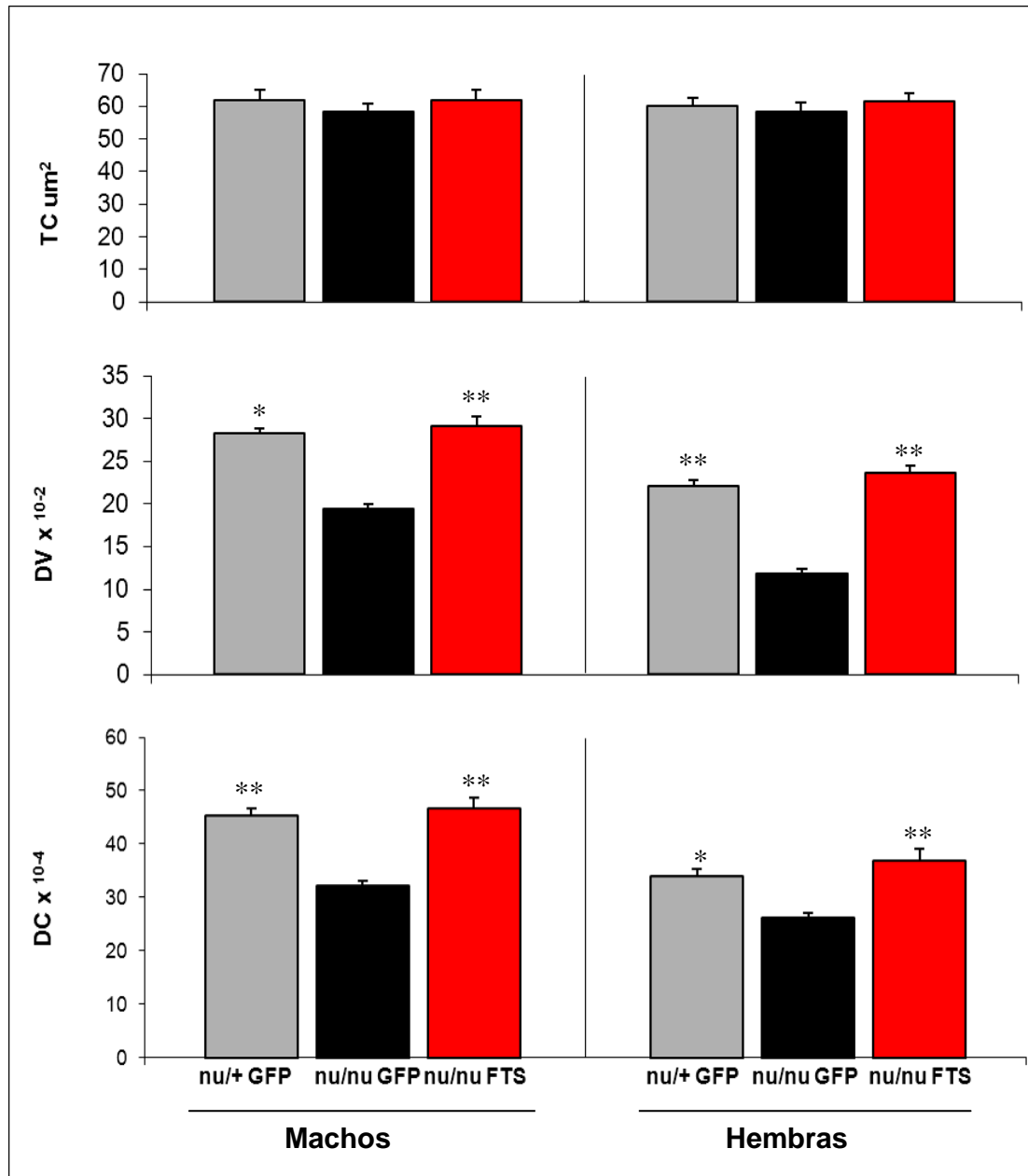


Figura 35. Microfotografías representativas de la población somatotropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.



**b. Morfometría pituitaria:** La distribución de los promedios entre los grupos fue mayor en machos que en hembras. Se sugiere la presencia de dimorfismo según sexo. Los animales que recibieron TGNT mostraron un aumento en los tres parámetros histométricos en ambos sexos, que fue significativo en DV y DC, respecto de los animales atímicos inyectados con el vector control RAd-GFP (Fig. 36).

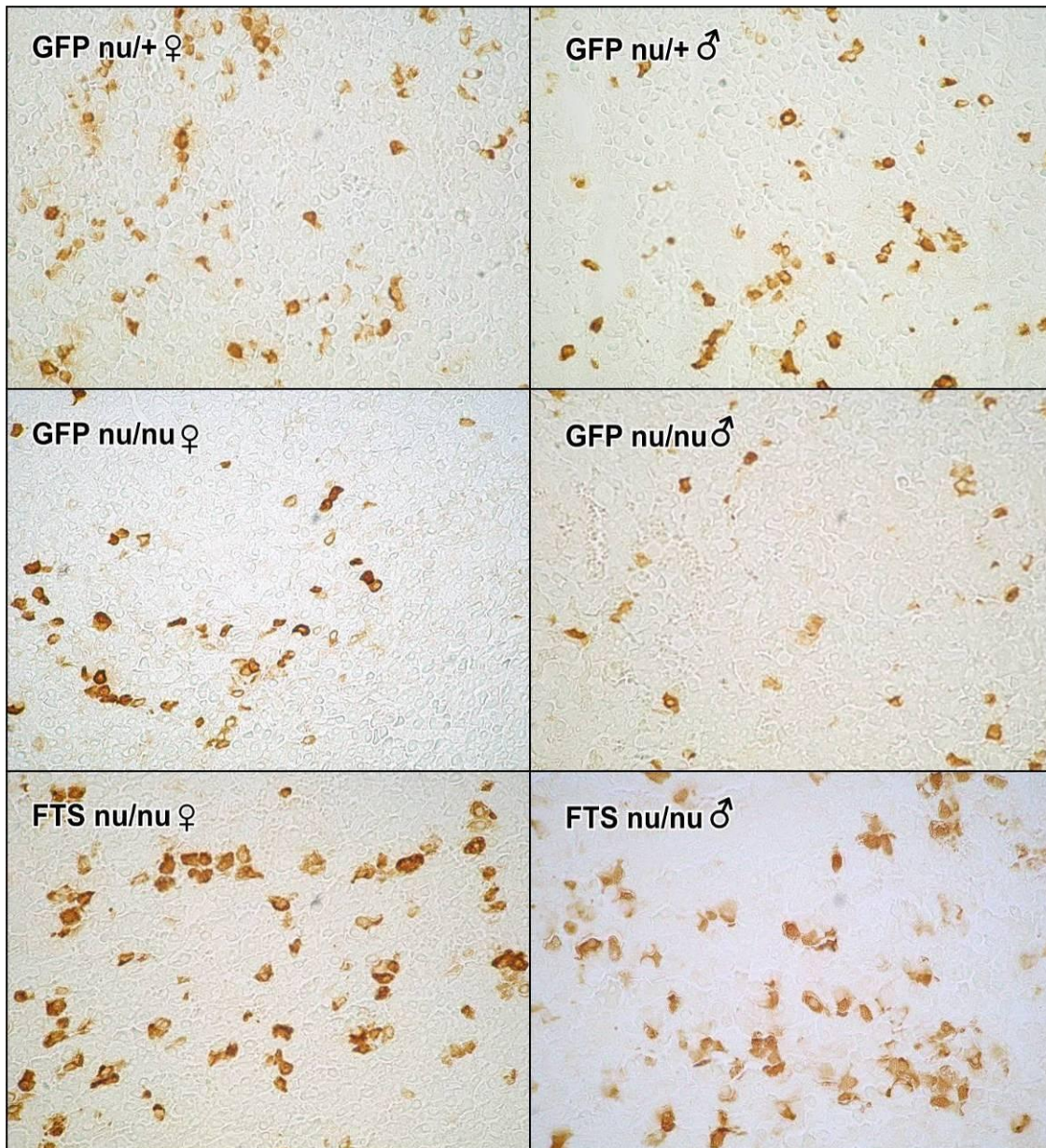


**Figura 36. Análisis histométrico de la población somatotropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, test-*t* de Student: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

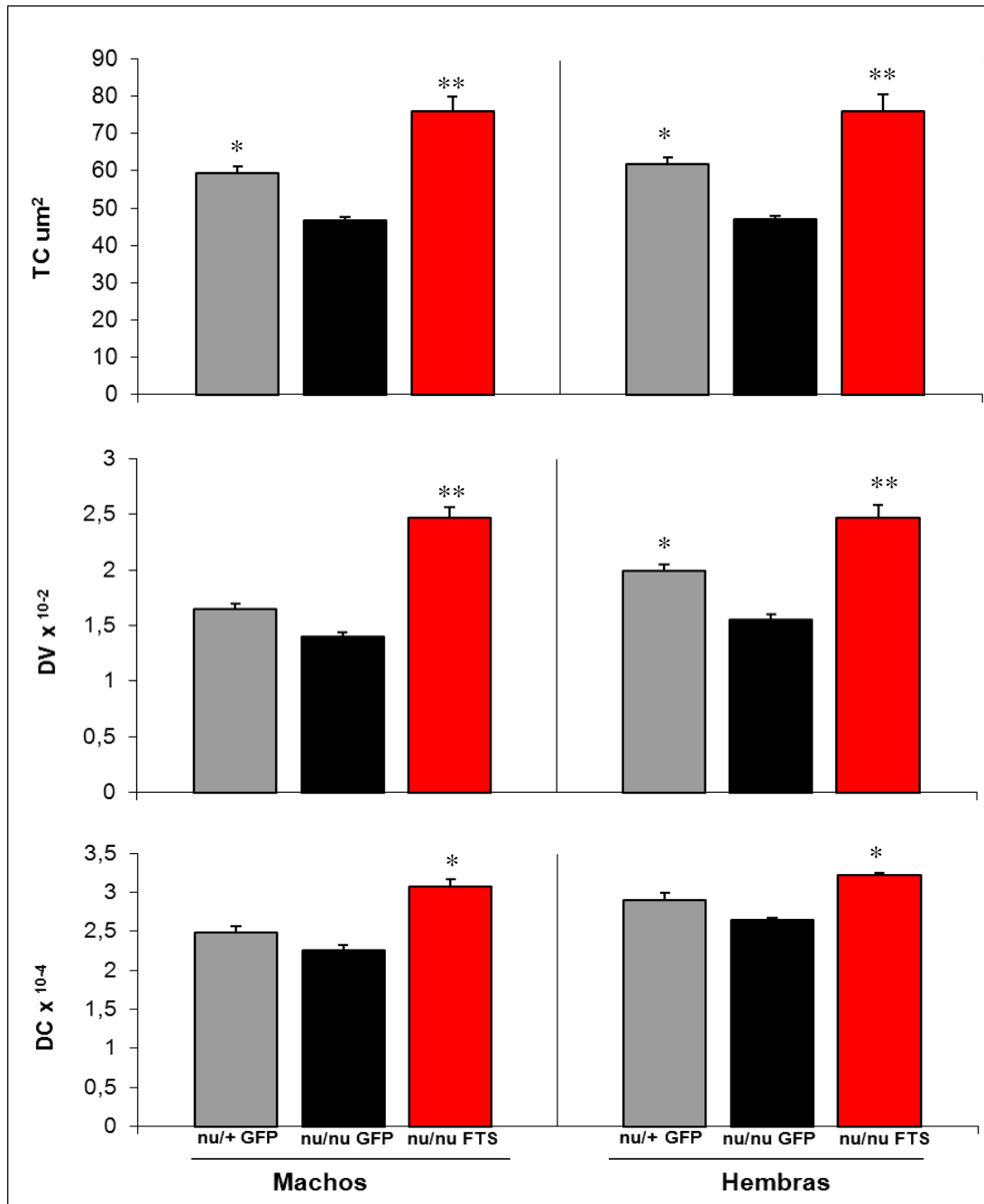
### 4.3.3. La población tirotrópica

**a. Morfología pituitaria:** La población tirotrópica de ratones nu/nu tratados con vector control se encontró disminuida al compararla con sus contrapartes nu/+. En la población tirotrópica nu/nu tratada con RAd-FTS se observó restauración de la morfología con respecto a los controles atímicos RAd-GFP, tanto en machos como en hembras (**Fig. 37**).



**Figura 37. Microfotografías representativas de la población tirotrópica de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.**

**b. Morfometría pituitaria:** El análisis histométrico de la población tirotrona mostró una disminución de todos los parámetros celulares (TC, DV y DC) en los ratones *nude*, respecto de los heterocigotas controles. En los animales que recibieron la TGNT, la morfometría reveló un aumento significativo de todos los parámetros respecto de los animales inyectados con el vector control, en ambos sexos (**Fig. 38**).

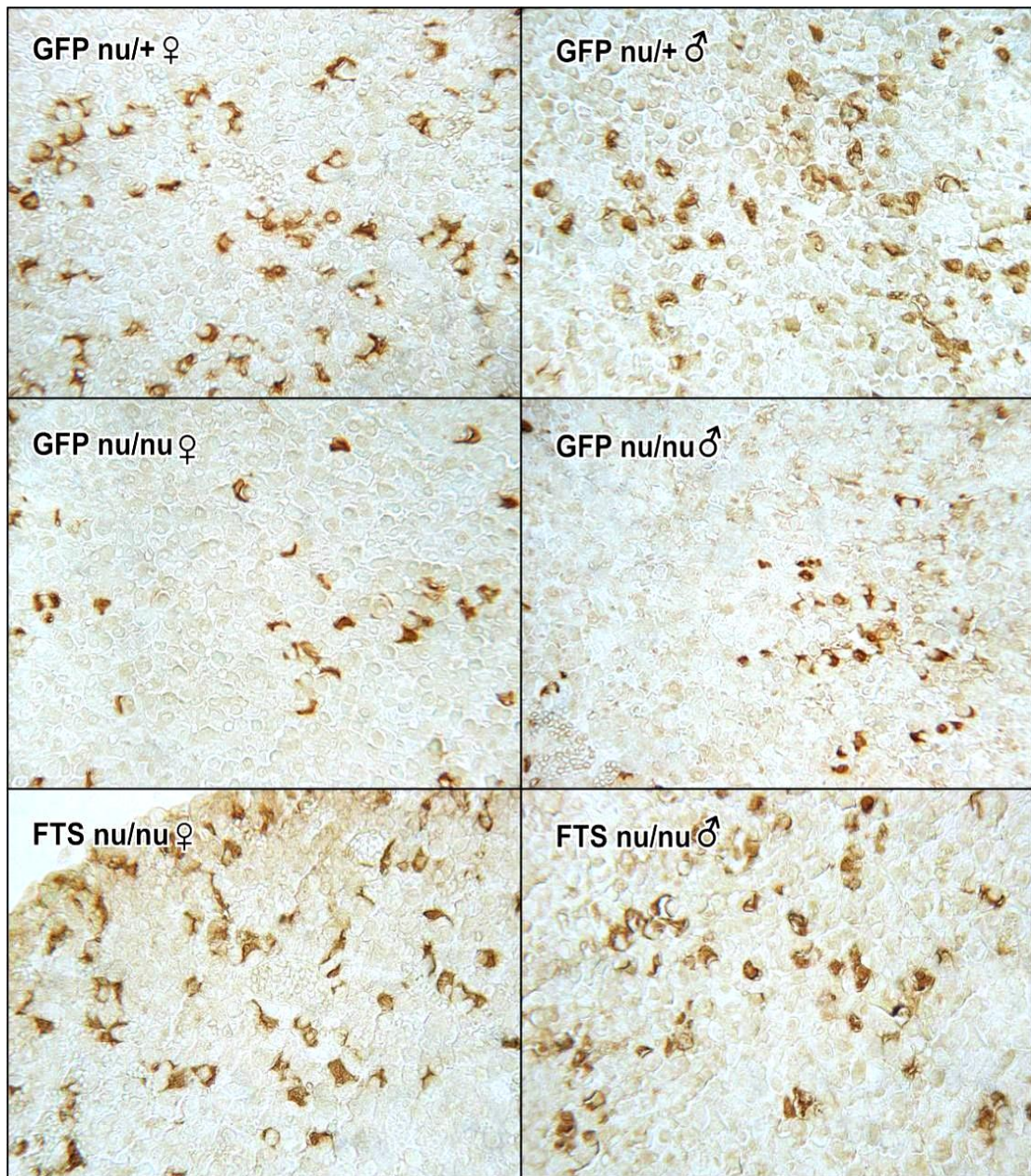


**Figura 38. Análisis histométrico de la población tirotrona.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales *nu/nu* inyectados con RAAd-GFP, test-*t* de Student: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

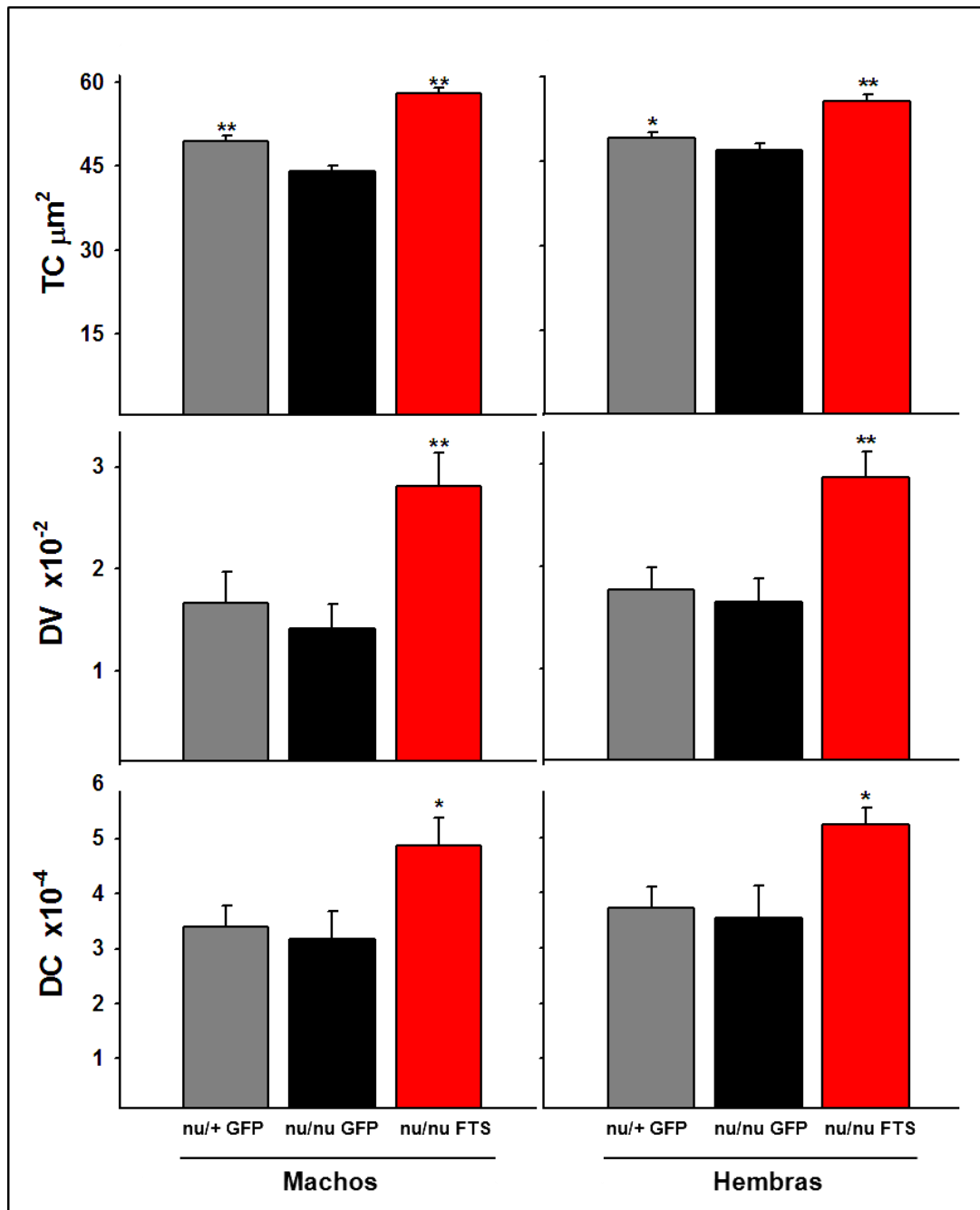
#### 4.3.4. La población corticotropa

**a. Morfología pituitaria: Morfología pituitaria:** La población corticotropa de ratones nu/nu tratados con vector control se halló disminuida al compararla con sus contrapartes nu/+. En la población corticotropa nu/nu tratada con RAd-FTS se observó restauración de la morfología, tanto en machos como en hembras, respecto de sus contrapartes (**Fig. 39**).



**Figura 39. Microfotografías representativas de la población corticotropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.**

**b. Morfometría pituitaria:** La población corticotropa mostró una disminución de todos los parámetros celulares (TC, DV y DC) en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas controles. En los animales que recibieron la TGNT la morfometría reveló un aumento significativo de todos los parámetros, respecto de los animales inyectados con el vector control, en ambos sexos (**Fig. 40**).

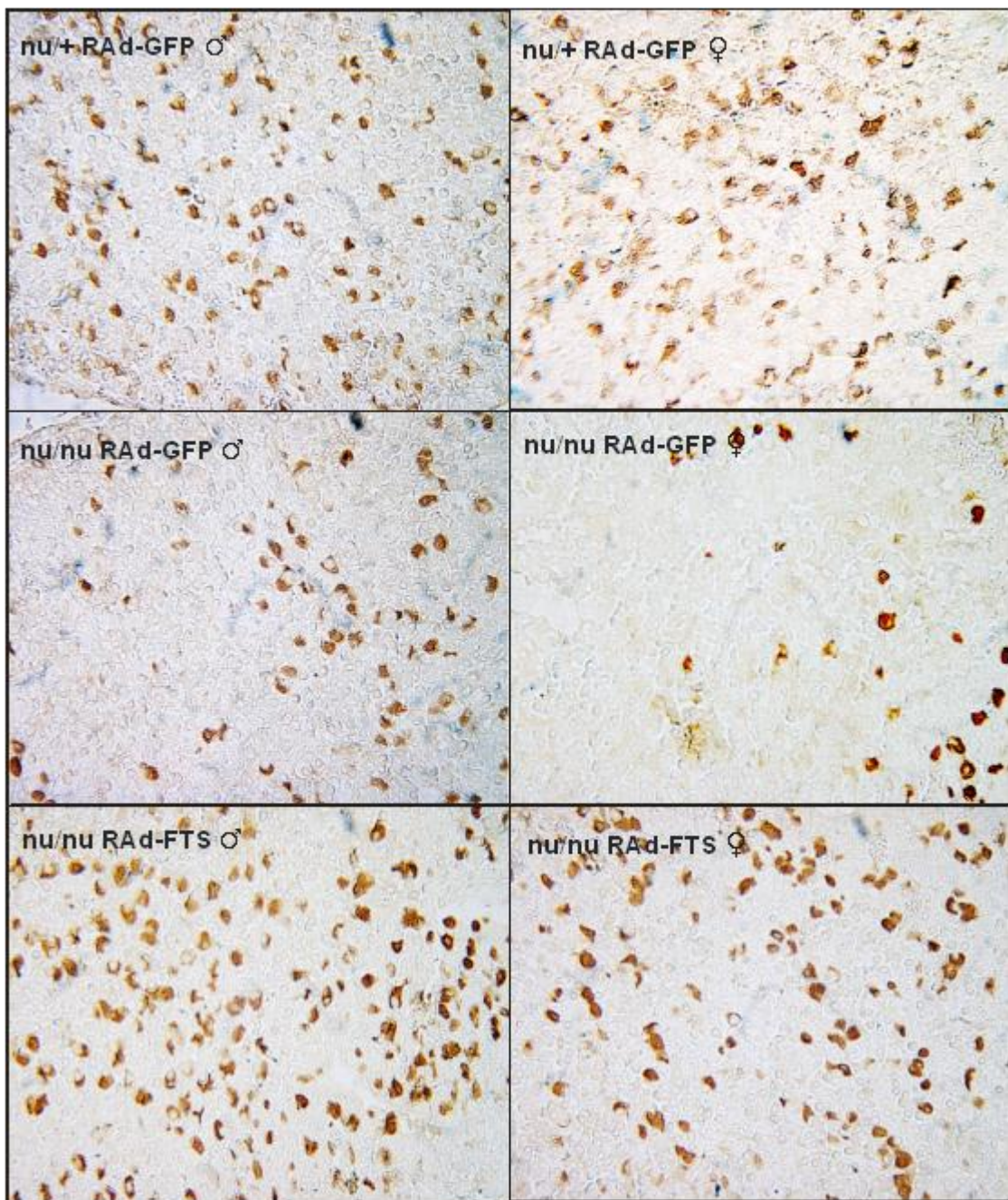


**Figura 40. Análisis histométrico de la población corticotropa.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, test-*t* de Student: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

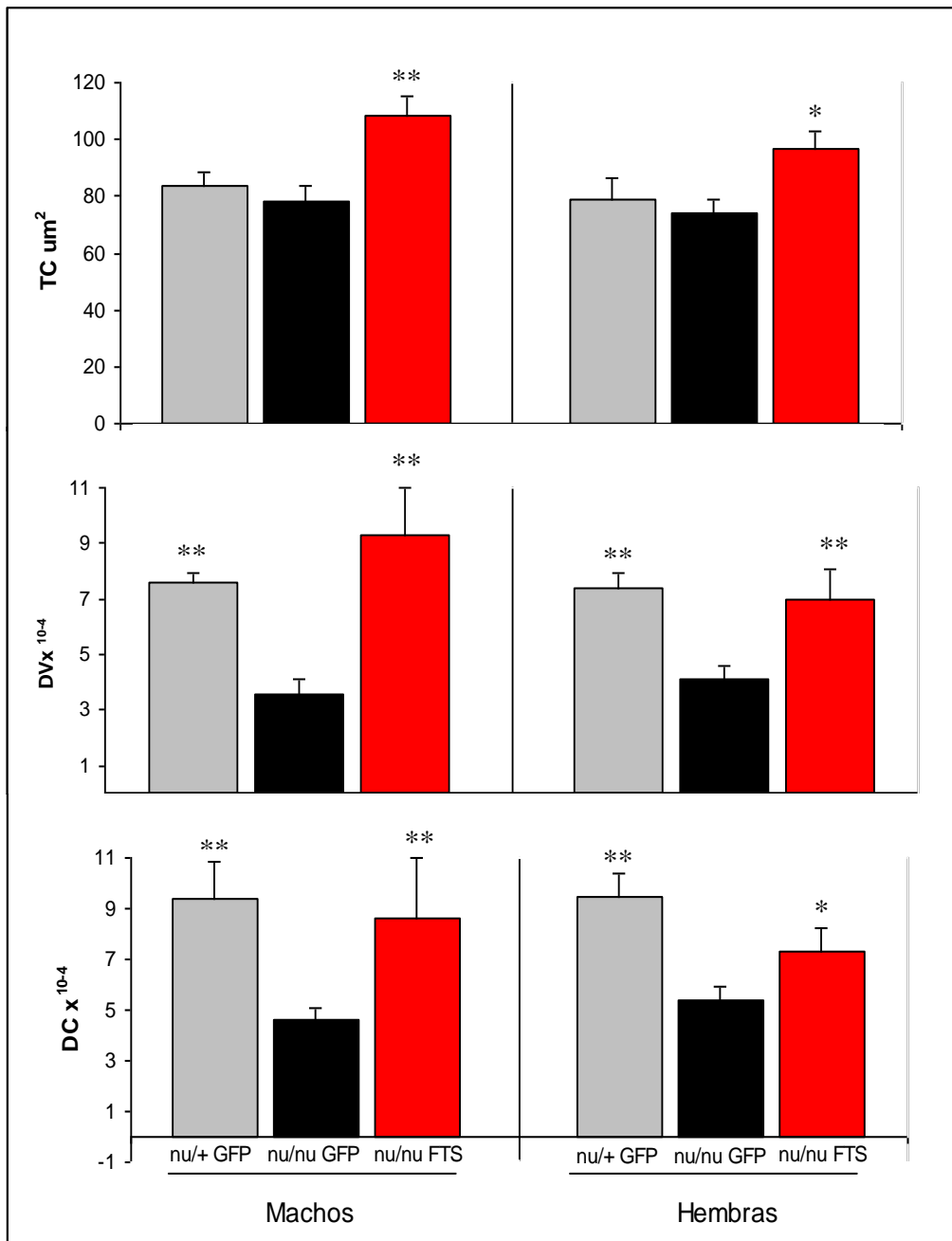
#### 4.3.5. La población folículo­tropa

**a. Morfología pituitaria:** La población folículo­tropa de ratones nu/nu tratados con vector control se encontró disminuida al compararla con sus contrapartes nu/+. En la población folículo­tropa nu/nu tratada con RAd-FTS se observó restauración de la morfología, tanto en machos como en hembras (**Fig. 41**).



**Figura 41. Microfotografías representativas de la población folículo­tropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.**

**b. Morfometría pituitaria:** La población folículo­tropa mostró una disminución de todos los parámetros celulares (TC, DV y DC) en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas controles. En los animales que recibieron la TGNT la morfometría reveló un aumento significativo de todos los parámetros al aplicar el test-*t* de Student, respecto de los animales inyectados con el vector control, tanto en machos como en hembras (**Fig. 42**).



**Figura 42. Análisis histométrico de la población folículo­tropa.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales *nu/nu* inyectados con RAD-GFP, test-*t* de Student: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.3.6. La población luteotropa

**a. Morfología pituitaria:** La población luteotropa de ratones nu/nu tratados con vector control se halló disminuida al compararla con sus contrapartes nu/+. En la población nu/nu tratada con RAd-FTS se observó restauración de la morfología, tanto en machos como en hembras (**Fig. 43**).

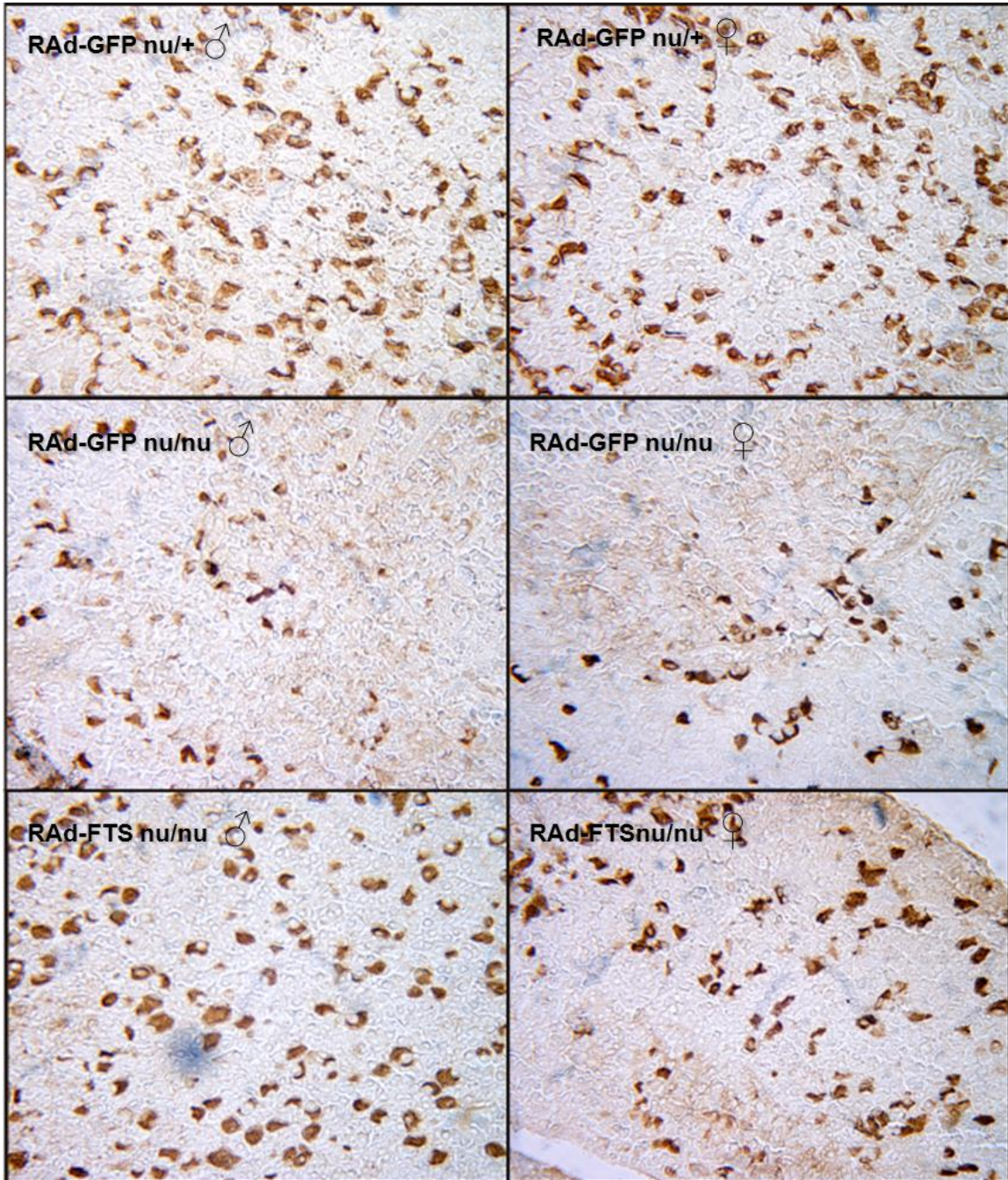
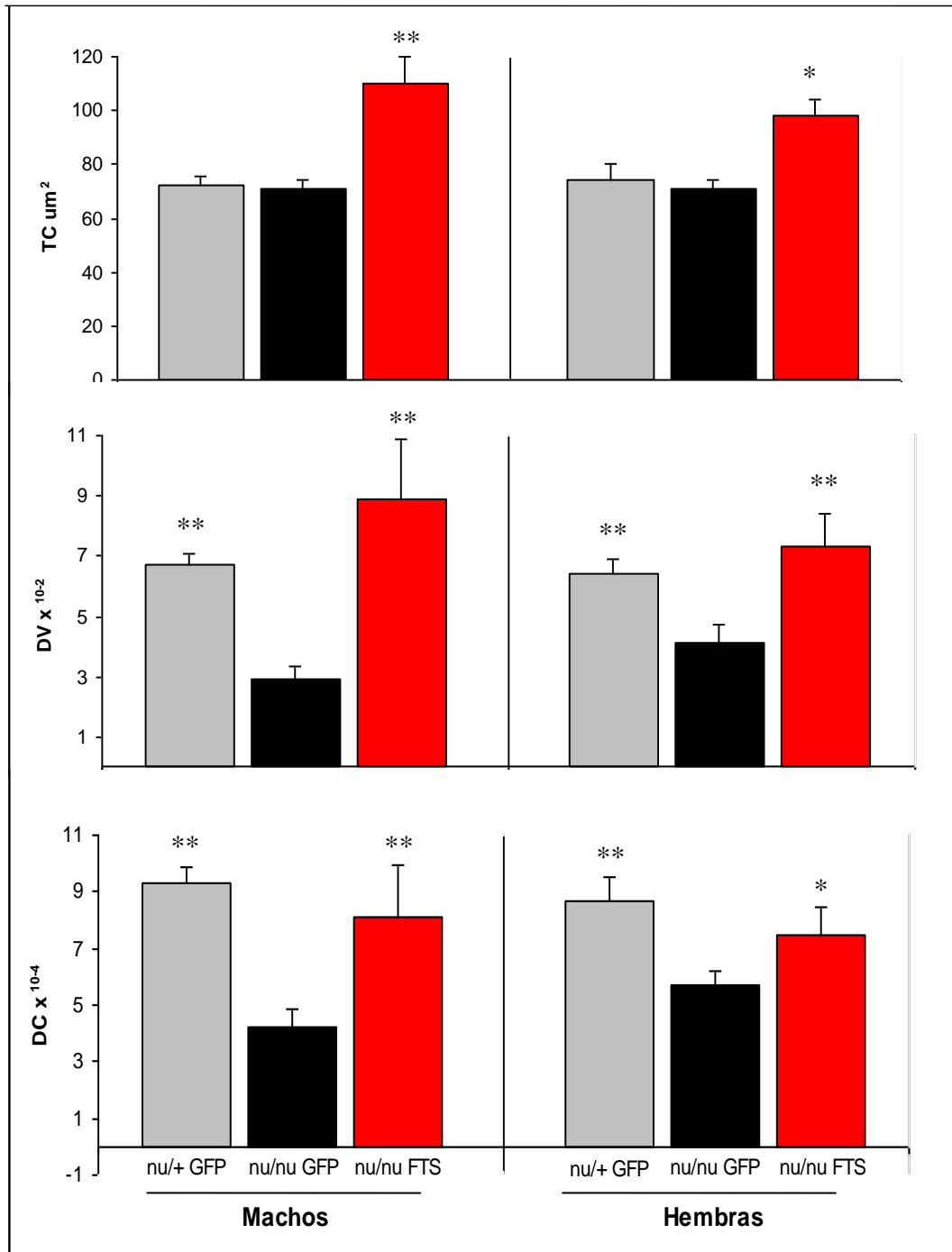


Figura 43. Microfotografías representativas de la población luteotropa de hipófisis de ratones machos-hembras y homo-heterocigotas.



**b. Morfometría pituitaria:** La población luteotropa mostró una disminución de todos los parámetros celulares (TC, DV y DC) en los ratones *nude* respecto de los heterocigotas controles. La morfometría reveló un aumento significativo de todos los parámetros al aplicar el test-*t* de Student, respecto de los controles, en ambos sexos (**Fig. 44**).

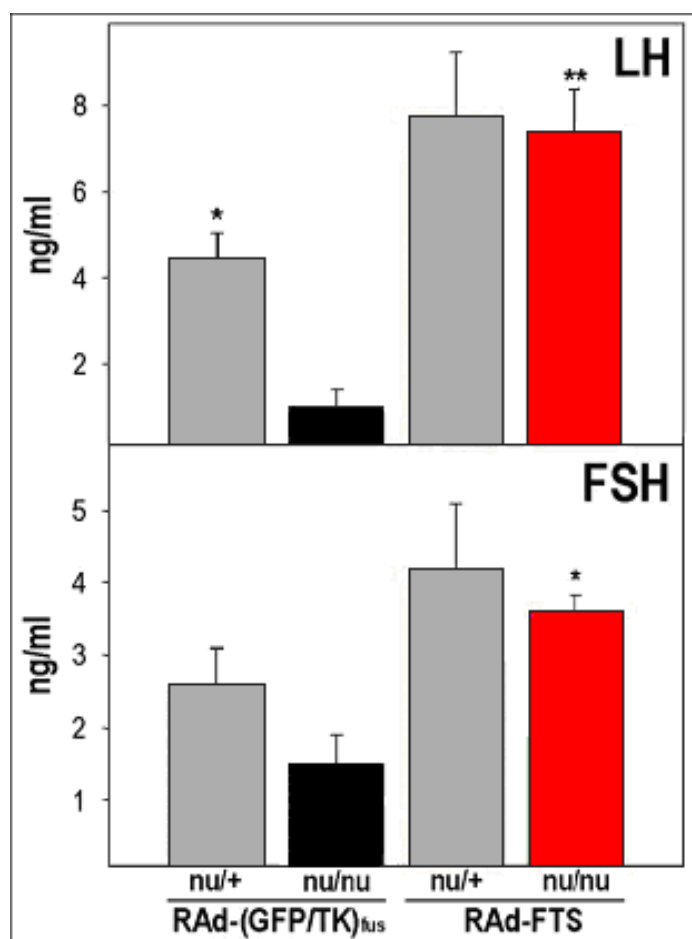


**Figura 44. Análisis histométrico de la población luteotropa.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales *nu/nu* inyectados con RAD-GFP, test-*t* de Student: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.4. NIVELES SÉRICOS DE LH Y FSH EN RATONES SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA NEONATAL

Los radioinmunoensayos para gonadotropinas mostraron que la terapia génica con timulina neonatal regularizó el déficit de LH y FSH en *nudes* adultos. La única inyección neonatal i.m. de RAd-FTS (pero no de RAd-GFP, vector control) previno el desarrollo de hipogonadotropinemia en *nudes* postpuberales e indujo niveles séricos suprafisiológicos de LH y FSH. Dichos niveles tuvieron diferencias significativas al compararlos mediante el test de ANOVA (**Fig.45**).



**Figura 45. Efecto de la terapia génica neonatal con timulina sobre los niveles séricos de LH y FSH en ratones *nude*.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, ANOVA: \*( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

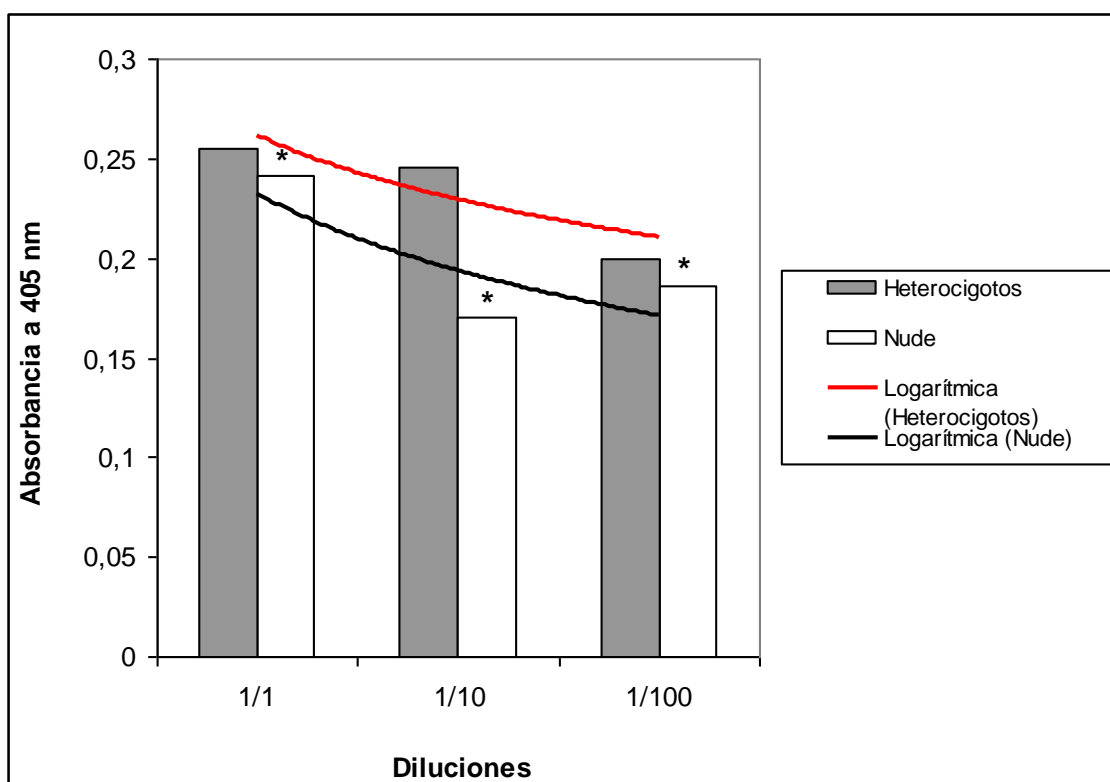
#### 4.5. MEDICIÓN DE INMUNOGLOBULINA G EN SUERO DE RATONES NUDE

Se midió la concentración de IgG sérica de ratones machos homocigotos nu/nu (*nude*) y de ratones machos heterocigotos nu/+ (grupo control) en distintas diluciones (Tabla 6).

**Tabla 6.** Niveles de IgG en sueros de ratones heterocigotos y homocigotos en diluciones crecientes.

Niveles de IgG		Promedios	
Diluciones	nu/+	nu/nu	
1/1	0,2554	0,2411	
1/10	0,2458	0,1699	
1/100	0,2001	0,1860	

Los niveles de IgG fueron inferiores en el grupo de ratones nu/nu al compararlos con los ratones nu/+ en todas las diluciones. Sus diferencias fueron significativas al aplicar el test-*t* de Student (Fig. 46).



**Figura 46. Niveles de IgG en suero de ratones homocigotos y heterocigotos en distintas diluciones. Esquema logarítmico.**

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Significancia estadística respecto de animales nu/nu inyectados con RAd-GFP, test-*t* de Student: \*( $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

#### **Efectividad de la terapia génica neonatal con RAd-FTS en un modelo de ratones *nude***

Las funciones endócrinas de más relevancia del timo parecen estar circunscriptas, tanto en ratas como en ratones, al período delimitado entre los últimos días de la preñez y los primeros días postnatales (Pierpaoli y Besedovsky, 1975). Goya y col. (2002; 2003) comunicaron el potencial de la terapia génica con timulina para restaurar la función tímica endócrina en modelos experimentales.

La presencia de timulina parece ser determinante no sólo en la correcta maduración de los LT sino también en los niveles IgG, en las concentraciones de ciertas hormonas hipofisarias y en la morfología de las poblaciones adenohipofisarias. En los laboratorios de la Cátedra de Histología B e INIBIOLP, hemos construido una secuencia de ADN sintético que codifica para un análogo de FTS biológicamente activo denominado *metFTS*, siendo clonado en un vector adenoviral RAd-*metFTS* o RAd-FTS. Cuando dicho vector fue inoculado vía i.m. a ratas y a ratones timectomizados, con niveles circulantes de timulina indetectables, se registraron niveles séricos suprafisiológicos de timulina biológicamente activa que permaneció elevada hasta al menos 112 días en ratones y más de 320 días en ratas (Reggiani y col., 2006).

El vector adenoviral recombinante (RAd), portador del gen de la timulina (*metFTS*), mostró ser efectivo para inducir cambios morfológicos y séricos en ratones *nude* de ambos sexos, a lo largo del presente estudio. No era de esperarse que el gen sintético *metFTS* se expresara por períodos tan prolongados en los animales *nude* inyectados con el RAd-FTS. En el modelo del ratón *nude* se cuenta con una ventaja adicional ya 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 a largo plazo de la timulina.

Se ha documentado que los niveles elevados de timulina inducen una atenuación de la respuesta inflamatoria celular por la inhibición local de la síntesis de citoquinas y quimioquinas (Safieh-Garabedian y col., 1997; Kanaan y col., 2002; Henriques-Coelho y col., 2008) y 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 produjeron en las células transducidas, es probable que la expresión a largo plazo de *metFTS in vivo* podría deberse a la actividad antiinflamatoria de la timulina. Esta característica de la timulina hace del RAd-FTS una herramienta prometedora para la implementación de terapia génica con dicho péptido por períodos prolongados.

Las anomalías endócrinas observadas en ratones neonatalmente Tx o congénitamente atímicos se han podido revertir mediante el trasplante de timo neonatal o la administración de extractos tímicos (Besedovsky y Sorkin, 1974; Pierpaoli y Besedovsky, 1975; Strich y col., 1985). Algunos ratones atímicos *nude* mostraron niveles detectables, pero muy bajos, de timulina circulante, probablemente producidos por un rudimento tímico (Groscurth y col., 1975).

El presente estudio ha permitido una TGNT con una única inyección i.m. del RAd-FTS en ratones *nude*, para producir una sostenida elevación de los niveles séricos de timulina durante 71 días y una restauración morfológica de las diferentes poblaciones adenohipofisarias, disminuidas en estos mutantes.

### **El eje timo-lactotropo**

Se ha comunicado que las CET poseen receptores para PRL (Dardenne y col., 1989). La PRL puede estimular la síntesis y secreción de la timulina *in vitro* e *in vivo* y su administración a ratones viejos elevó los reducidos niveles circulantes de timulina (Dardenne y col., 1991). Se ha sugerido que una deficiencia de la timulina sérica durante la vida temprana podría comprometer la proliferación de la población lactotropa.

La respuesta y los niveles basales de PRL estuvieron reducidos frente al estrés por inmovilización y frío, en homocigotos CD-1 adultos machos respecto a los heterocigotos (Goya y col., 1996) y durante el proceso de envejecimiento, manteniendo el dimorfismo según sexo (Cónsole y col., 1997).

La inmunoneutralización neonatal de la timulina circulante en ratones C57BL/6 indujo un descenso en la población lactotropa, en la timulina sérica y en los niveles circulantes de PRL (Camihort y col., 2006).

La TGNT con RAd-FTS permitió, mediante el presente estudio, la restauración de los parámetros morfológicos de la población lactotropa y de la timulina sérica, confirmando la existencia de un eje timo-lactotropo.

### **El eje timo-somatotropo**

Una hormona pituitaria particularmente relevante es la GH que regularía la síntesis y liberación de la timulina. Hay evidencias de un eje bidireccional timo-somatotropo. *In vitro*, la GH humana estimuló su liberación a partir de las líneas de CET (Timsit y col., 1992), las que presentaron receptores específicos para GH (Ban y col., 1991).

El envejecimiento impactó en la morfología y función de la población somatotropa (Cónsole y col., 1993) y la respuesta de la GH al estrés por inmovilización y frío, estuvo reducida en los ratones *nude* CD-1 homocigotos adultos, así como sus niveles séricos basales, que fueron comparados con sus contrapartes heterocigotas (Goya y col., 1995 b).

La inmunoneutralización de la timulina circulante en ratones normales C57BL/6 indujo descenso de los parámetros morfológicos en la población somatotropa adenohipofisaria y en los niveles de timulina sérica y de GH. Los datos morfométricos mostraron que la hipotimulinemia tuvo un impacto significativo sobre la población somatotropa, induciendo una reducción en el número, pero hubo un incremento en el tamaño, posiblemente para prevenir el descenso de los niveles basales de GH (Camihort, 2006).

La TGNT con RAd-FTS permitió la restauración de los parámetros morfológicos de la población somatotropa con aumento del número y del tamaño celular, así

como de los niveles circulantes de timulina, confirmando la existencia de un eje timo-somatotropo (Goya y col., 2007).

Los experimentos realizados de inmunoneutralización y de terapia génica se contrabalancean, permitiendo avalar la hipótesis de que la timulina es un relevante modulador de dicho eje.

### **El eje timo-tirotopo**

Los ratones normales Tx al nacer y los *nude*, desarrollaron no sólo una inmunodeficiencia severa, sino también alteraciones degenerativas en la glándula tiroides (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Diferentes estudios han demostrado que la involución tímica no es irreversible. Por el contrario, el timo es un órgano dinámico capaz de responder al ambiente endócrino, aún en animales viejos. De esta manera, la atrofia tímica causada por la edad puede revertirse parcialmente mediante manipulaciones endócrinas, tales como el uso de células GH3 (Davila y col., 1987), la castración de ratas macho viejas (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 que aumentaron la respuesta endócrina tímica en humanos (Fabris y col., 1986) y en ratas envejecidas (Fabris y Mocchegiani, 1985).

Existe evidencia de que el eje tiroideo modula la secreción de timulina, como se demostró al detectar receptores para las hormonas tiroideas en las CET de rata (Villa-Verde y col., 1992). Las fluctuaciones en los niveles de las hormonas tiroideas *in vivo* permitieron modular la secreción de la timulina en las CET de ratones jóvenes (Savino y col., 1984). En experimentos *in vitro* se ha observado que las hormonas tiroideas estimularon la secreción de timulina actuando directamente sobre las CET (Mocchegiani y col., 1990 b; Villa-Verde y col., 1993).

La timulina estimuló la liberación de TSH trabajando en ratas con células pituitarias dispersas, a dosis que variaban de  $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M y este efecto disminuía con la edad de los donantes (Brown y col. 1999; 2000). La timulina ejercería una acción moduladora sobre la secreción de TSH mediante

receptores específicos y tendría una actividad hipofisiotropa *in vitro* (Zaidi y col., 1988; Goya y col. 2004), por la que actuaría directamente sobre la adenohipófisis *in vivo* al modular la respuesta de la glándula frente a secretagogos o inhibidores. Los machos *nude* adultos presentaron niveles séricos bajos de TSH y tiroxina, así como una disminución en las respuestas a estímulos ambientales como el estrés por inmovilización y frío (Goya y col., 1995 b).

La mayoría de los trabajos publicados se realizaron en ratones *nude* o Tx, evaluando los cambios en los niveles circulantes de las hormonas pituitarias y tímicas. Durante el envejecimiento se hallaron alteraciones en la morfología y función del eje tirotrópico (Cónsole y col. 1995), pero existe escasa información documentada acerca del impacto de la atimia sobre la morfología pituitaria, aporte realizado con el presente diseño experimental de terapia génica. Se ha hallado que la inmunoneutralización de la timulina sérica disminuyó de modo significativo el número de las tirotropas en el grupo FTS respecto de los controles en ambos sexos, con aumento del tamaño celular, posiblemente para mantener los niveles de TSH en condiciones basales (Camihort y col., 2006).

Los resultados de la TGNT indicaron que una única inyección i.m. neonatal de RAd-FTS, pero no de RAd-GFP (vector control), aumentó los niveles circulantes de timulina biológicamente activa y restauró el número y el tamaño de las tirotropas adenohipofisarias en los ratones homocigotos *nude* de ambos sexos, examinados a los 71 días de edad. Esto evidenciaría un posible efecto modulador de la terapia génica con timulina, confirmando la existencia de un eje timo-tirotrópico bidireccional.

### **El eje timo-corticotropo**

Se han realizado importantes contribuciones al estudio de la relación entre el timo y el eje adrenal, demostrando así que los corticosteroides adrenales afectan el tamaño y la morfología de la glándula tímica. En un estudio *in vitro*, la ACTH aumentó la liberación de la timulina de manera dosis-dependiente (Hadley y col., 1997). Además, la adrenalectomía en animales derivó en una hiperplasia tímica (Fisher, 1964) y produjo una reducción transitoria de la



timulina sérica, con el consiguiente aumento de su contenido intratímico (Dardenne y col., 1986).

Se ha documentado un buen número de secretagogos para la timulina que incluyen la dexametasona, la progesterona, la testosterona, el estradiol (E<sub>2</sub>), la PRL, la GH y las hormonas tiroideas. En cultivos de CET, cada una de estas sustancias presentó receptores y estimuló la secreción de timulina (Savino y Dardenne, 2000).

La liberación de ACTH inducida por estrés y la respuesta pituitaria *in vitro* a la CRH, resultaron significativamente menores en ratones *Swiss nude* comparados con los controles (Daneva y col., 1995; Gaillard y col., 1998). A la inversa, la integridad tímica durante la vida perinatal es necesaria para una adecuada maduración del eje timo-hipofisario, como revelaron las alteraciones endócrinas causadas por la Tx neonatal (Michael y col., 1980) o la ausencia congénita del timo en ratones *nude* (Rebar y col., 1980). Pocos días después del nacimiento, tanto los ratones congénitamente atímicos (*nude*) como los ratones normales Tx en etapa neonatal, desarrollaron un severo cuadro de inmunodeficiencia y una serie de alteraciones degenerativas en las glándulas adrenales que pudieron prevenirse mediante el trasplante neonatal de timo (Pierpaoli y Sorkin, 1972).

Es sabido que la atimia congénita causa hiporrespuesta adrenal a la serotonina y ya que la corteza adrenal de ratones atímicos es capaz de realizar su función en respuesta a la ACTH, se ha sugerido que la timulina podría también ejercer una acción directa sobre la misma (Yang y col., 1995).

Se ha demostrado una marcada disminución en el número de las células corticotropas y un aumento en su tamaño, en ratones machos normales C57BL/6 tratados desde el nacimiento hasta la pubertad con suero anti-timulina. El aumento del tamaño de las corticotropas se explicaría como un intento para mantener los niveles basales de ACTH (Camihort y col., 2006).

El presente estudio permitió observar que la TGNT aumentó significativamente el número y tamaño de las corticotropas, tanto en ratones *nude* heterocigotos como homocigotos (Martines y col. 2011).

La inmunoneutralización de la timulina sérica y la terapia génica con RAd-FTS, como experimentos contrapuestos, sugieren un posible efecto modulador de la timulina sobre la población corticotropa durante los primeros días de vida, confirmando de esta manera la existencia de un eje timo-corticotropo bidireccional.

### **El eje timo-gonadotropo**

Los ratones *nude* mostraron niveles significativamente reducidos de gonadotropinas circulantes (Rebar y col., 1982). Las hembras homocigotas (nu/nu) presentaron un retraso en la primera ovulación (Besedovsky y Sorkin, 1974), una disminución de la fertilidad (Rebar y col., 1981 b) y un aumento de la atresia folicular, provocando un cese prematuro de la función ovárica (Lintern-Moore y Pantelouris, 1975). Anormalidades similares resultaron de la Tx neonatal en ratones hembras normales (Michael y col., 1980; Nishizuka y Sakakura, 1971). En ratones machos adultos *nude* homocigotos CD-1, las respuestas de las gonadotropinas al estrés se encontraron disminuidas, al igual que los niveles basales al comparar con sus contrapartes heterocigotas (Goya y col., 2001). También, los ratones machos atímicos mostraron una disminución en la secreción de gonadotropinas, pero estas anormalidades hormonales no estuvieron asociadas a las deficiencias reproductivas (Rebar y col., 1982).

Se ha comunicado que el proceso de envejecimiento afectó la morfología y función del eje gonadotropo en rata (Cónsole y col., 1994) y se ha determinado que la timulina tiene un rol relevante en el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico en roedores (García y col., 2000; Hinojosa y col., 2004; García y col., 2005). Existiría una relación bidireccional hipofisario-tímica, a través de la cual la LH y la FSH influirían sobre la secreción de timulina y ésta regularía la producción de dichas gonadotropinas.

La inmunoneutralización de la timulina sérica en etapa neonatal de ratones normales disminuyó los niveles de gonadotropinas circulantes y aumentó el tamaño celular de las gonadotropas, probablemente para mantener los niveles basales de LH y FSH (Camihort y col., 2006).

Paralelamente, las concentraciones reducidas de gonadotropinas halladas en los animales atímicos parecen estar causalmente relacionados con la ausencia de timo y fundamentan la idea de que el timo es directa o indirectamente necesario para el desarrollo de la función normal del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Reggiani y col., 2009). De acuerdo con este hallazgo, la TGNT previno tanto el déficit de gonadotropinas circulantes en ratones *nude* adultos como las alteraciones morfológicas registradas en la población gonadotropa. Esto avalaría el rol de la timulina como mediador en la maduración del sistema neuroendócrino en los primeros meses de vida y confirmaría la existencia de un eje bidireccional timo-gonadotropo.

También pudo confirmarse la importancia de la presencia de timulina durante la vida perinatal en parte de la inmunidad humoral, dado que los ratones *nude* presentaron niveles significativamente más bajos de IgG que sus contrapartes.

La implementación de la TGNT en la vida perinatal de los ratones *nude*, muestra una perspectiva promisoriosa para su posible aplicación en humanos, a fin de tratar diferentes afecciones endócrinas del eje timo-gonadotropo.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIÓN**

En el presente estudio se logró implementar una efectiva TGNT para timulina a fin de restaurar en ratones *nude* (71 días, ambos sexos) los niveles circulantes de timulina y prevenir las alteraciones morfológicas que presentan estos mutantes a nivel adenohipofisario. A tal fin, se utilizó un vector adenoviral recombinante para timulina (RAd-FTS).

Las técnicas inmunohistoquímicas morfométricas han permitido demostrar la restauración de las diferentes poblaciones adenohipofisarias (*pars distalis*).

La aplicación del RAd-FTS, capaz de inducir elevados niveles de timulina biológicamente activa, ha representado un significativo paso inicial para el potencial uso terapéutico de esta molécula en el tratamiento de los déficits asociados con disfunciones endócrinas del eje hipofisario-tímico.

El presente trabajo confirma las hipótesis planteadas y cumple con los objetivos propuestos.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aguilera G y Romano MC. Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cells *in vitro*. J Endocrinol 1989;123:367-373.
- Amor B, Dougados M, Mery C, Dardenne M y Bach JF. Nonathymulin in rheumatoid arthritis: two double blind, placebo controlled trials. Ann Rheum Dis 1987;46:549-554.
- Auger C, Monier JC, Savino W y Dardenne M. Localization of thymulin (FTS-Zn) in mouse thymus. Comparative data using monoclonal antibodies following different plastic embedding procedures. Biol Cell 1984;52:139-146.
- Auger G, Blanot D, Magnin M, Gastinel LN, Pléau JM, Dardenne M y Bach JF. Synthesis and biological activity of eight thymulin analogues. Biol Chem Hoppe-Seyler 1987;368:463-470.
- Bach JF y Dardenne M. Studies on thymus products. II. Demonstration and characterization of a circulating thymic hormone. Immunology 1973;25(3):353-66.
- Bach JF, Dardenne M y Pléau JM. Biochemical characterisation of a serum thymic factor. Nature 1977;266:55-57.
- Bach JF, Pléau JM y Dardenne M. Thymic Hormones. En: Encyclopedia of Immunology. London. Saunders Scientific Publishers; 1991.
- Bach JF. The thymus in immunodeficiency diseases: new therapeutic approaches. Birth Defects Orig Artic Ser 1983;19(3):245-53.
- Bach JF. Thymulin (FTS-Zn). Clin Immunol Allergy 1983;3:133-156.
- Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F, y Dardenne M. Specific bindings sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. Life Sci 1991;48:1241-1248.
- Benihoud K, Yeh P y Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. Curr Opin Biotechnol 1999;10:440-447.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL y Finberg RW. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 1997;275:1320-1323.
- Bergen JM, Park IK, Horner PJ y Pun SH. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. Pharm Res 2008;25:983-998.
- Besedovsky HO y Sorkin E. Thymus involvement in female sexual maturation. Nature 1974;249:356-358.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L y Graham FL. 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 1994;91:8802-8806.

- Bolognani F y Goya RG. Gene therapy in the neuroendocrine system: Its implementation in experimental models using viral vectors. *Neuroendocrinology* 2001;73:75-83.
- Bordigoni P, Faure G, Bene MC, Dardenne M, Bach JF, Duheille J y Olive D. Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with serum thymic factor (FTS). *LanCRE* 1982;2:(8293):293-297.
- Brown OA, Sosa YE y Goya RG. Hormonas tímica como mediadoras de la integración inmunogonadotropa. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1994;28:203-209.
- Brown OA, Sosa YE, Bolognani F y Goya RG. Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech Age Dev* 1998;104:249-262.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM y Goya RG. Growth hormone-releasing activity of thymulin: effects of age. *Neuroendocrinology* 1999;69:20-27.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pleau JM y Goya RG. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol (Biol Sci)* 2000;55:170-176.
- Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover PO y Kendall MD. 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* 1992;4(3):295-301.
- Camihort G, Luna G, Vesenbeckh S, Ferese C, Dardenne M, Goya R y Cónsole G. Morphometric assessment of the impact of serum thymulin immunoneutralization on pituitary cell populations in peripubertal mice. *Cells Tissues Organs* 2006;184:23-30.
- Campos SK y Barry MA. Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther* 2007;7:189-204.
- Carbone C y Maschi F. El ratón *nude (nu/nu)* como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva* 2006;1(5):19-23.
- Castro M, Goya R, Sosa Y, Rowwe J, Larregina A, Morelli A y Lowenstein PR. Expression of transgenes in normal and neoplastic anterior cells using recombinant adenoviruses: long term expression, cell cycle dependency and effects on hormone secretion. *Endocrinology* 1997;138:2184-2194.
- Charreire J y Bach JF. Binding of autologous erythrocytes to immature T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3201-3205.
- Cohen S, Berrih S, Dardenne M y Bach JF. Feed-back regulation of the secretion of a thymic hormone (thymulin) by human thymic epithelial cells in culture. *Thymus* 1986;8:109-119.

- Cónsole GM, Gómez Dumm CLA, Brown OA, Ferese C y Goya, RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997;95:157-166.
- Cónsole G. Capítulo: Poblaciones adenohipofisarias. Aspectos estructurales, inmunohistoquímicos, moleculares y ultraestructurales. En: *Temas de Histología y Embriología animal. Parte 2*. Buenos Aires: Ediciones Inarbite; 1997.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CLA y Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994;73:87-95.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CLA y Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anatomica* 1995;152(1):28-32.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CLA y Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993;70:45-51.
- Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology and function of pituitary lactotropes in male golden hamster. *Neuroendocrinology* 2002;75:316-325.
- Cónsole GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS y Gómez Dumm CL. Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by non steroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepuberal male rats. *Cells Tissues Organs* 2001;169:64-72.
- Consolini R, Legitimo A, Calleri A y Milani M. Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clin Exp Immunol* 2000;121:444-447.
- Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF y Laussac JP. NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. *J Biol Chem* 1988;263:5574-5580.
- Dalmaso AP, Martinez C y Good RA. Capítulo 26: Studies of immunologic characteristics of lymphoid cells from thymectomized mice. En: *The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease*. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row; 1964.
- Daneva T, Spinedi E, Hadid R y Gaillard RC. Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in swiss nude athymic mice. *Neuroendocrinology* 1995;62:79-86.
- Dardenne M y Bach JF. The sheep cell rosette assay for the evaluation of thymic hormones. En: *Biological Activity of Thymic Hormones*. Kooyker Scientific Publications; 1975. Rotterdam, Netherlands.
- Dardenne M, Bach JF y Safai B. Low serum thymic hormone levels in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl J Med* 1983;309:48-49.

- Dardenne M, Kelly PA, Bach JF y Savino W. Identification and functional activity of Prl receptors in thymic epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:9700-9704.
- Dardenne M, Papiernik M, Bach JF y Stutman O. Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. Immunology. 1974;27:299-304.
- Dardenne M, Pléau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J y Bach JF. Contribution of zinc and metals to the biological activity of serum thymic factor (FTS). Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:5370-5373.
- Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J y Bach JF. Thymic hormones containing cells. VII. Adrenal and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. J Immunol 1986;136:1303-1308.
- Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T y Bach JF. 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 1989;125:3-12.
- Davila DR, Brief S, Simon J, Hammer RE, Brinster RL y Kelley KW. Role of growth hormone in regulating t-dependent immune events in aged, nude and transgenic rodents. J Neurosci Res 1987;18:108-116.
- De Jong RN y Van der Vliet PC. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. Gene 1999;236:1-12.
- Deschaux P, Massengo B y Fontanges R. Endocrine interaction of the thymus with the hypophysis, adrenals and testes: effects of two thymic extracts. Thymus 1979;1:95-108.
- Dokhelar MC, Tursz T, Dardenne M y Bach JF. Effect of a synthetic thymic factor (facteur thymique serique) on natural killer cell activity in humans. Int J Immunopharmacol 1983;5:277-282.
- Dubé ID y Cournoyer D. Gene therapy: here to stay. CMAJ 1995;152:1605-1613.
- Eaton GJ. Hair growth cycles and wave patterns in "nude" mice. Transplantation. 1976;22:217-222.
- Eckels DD, Gershwin ME, Drago J y Faulkin L. Comparative patterns of serum immunoglobulin levels in specific-pathogen-free congenitally athymic (nude), hereditarily asplenic (Dh/ +), congenitally athymic-asplenic (lasat) and splenectomized athymic mice. Immunology 1979;37:777-783.
- Fabris N y Mocchegiani E. Endocrine control of thymic serum factor production in young-adult and old mice. Cell Immunol 1985;91:325-335.
- Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F y Pinchera A. Thyroid function modulates thymic endocrine activity. J Clin Endocrinol Metab 1986;62:474-478.
- Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F y Pinchera A. Thyroid-thymus interactions during development and aging. Horm Res 1989;31:85-89.



- Fabris N, Pierpaoli W y Sorkin E. 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* 1971;9:227-240.
- Farah JM, Hall NR, Bishop JF, Goldstein AL y O'Donohue TL. Thymosin fraction 5 stimulates secretion of immunoreactive  $\beta$ -endorphin in mouse corticotropic tumor cells. *J Neurosci Res* 1987;18:140-146.
- Fisher ER. Capítulo 36: Pathology of the thymus and its relation to human disease. En: *The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease*. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row; 1964.
- Fitzpatrick FT y Greenstein BD. Effects of various steroids on the thymus, spleen, ventral prostate and seminal vesicles in old orchidectomized rats. *J Endocrinol* 1987;113:51-55.
- Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8(3):295-309.
- Folch H, Eller G, Mena M y Esquivel P. Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of FTS level. *Cell Immunol* 1986;102:211-216.
- Gaillard R, Daneva T, Hadid R, Muller K y Spinedi E. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis of athymic swiss nude mice. *Ann NY Acad Sci* 1998;840:480-490.
- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice. Role of thymulin. *J Endocrinol* 2000;166:381-387.
- García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R y Rosas P. Effects of injecting thymulin into the anterior or medial hypothalamus or the pituitary on induced ovulation in prepubertal mice. *Neuroimmunomodulation* 2005;12:314-320.
- Gastinel LN, Dardenne M, Pleau JM y Bach JF. Studies on the zinc-binding site to the serum thymic factor. *Biochem Biophys Acta* 1984;797:147-155.
- Gastinel LN, Pléau JM, Dardenne M, Sasaki A, Bricas E, Morgat JL y Bach JF. High Affinity binding sites on plasma membrane obtained from the lymphoblastoid cultures 1301 cell line for highly radioactive serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 1982;684:117-126.
- Gaufo GO y Diamond M. Thymus graft reverses morphological deficits in dorsolateral frontal cortex of congenitally athymic nude mice. *Brain Res* 1997;756:191-199.
- Goff BL, Roth JA, Arp LH e Incefy GS. Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 1987;68:580-587.
- Gómez Dumm C. *Embriología Humana*. 1ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.
- Gorziglia MI, Lapceovich C, Roy S, Kang Q, Kadan M, Wu V, Pechan P y Kaleko M. Generation of an Adenovirus Vector Lacking E1, E2a, E3, and All of E4 except Open Reading Frame 3. *J Virology* 1999;73:6048-6055.

- Goya R, Reggiani PC, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P y Dardenne M. Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:182-187.
- Goya RG, Sarkar DK, Brown OA y Hereñú CB. Potential of Gene Therapy for the treatment of pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 2004;4(1):79-87.
- Goya RG, Brown OA, Pléau JM y Dardenne M. Thymulin and the neuroendocrine system. *Peptides* 2003;25:39-142.
- Goya RG, Cónsole G, Hereñú C, Brown O y Rimoldi O. Thymus and aging: potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Gerontology* 2002;48:325-328.
- Goya RG, Cónsole GM, Sosa YE, Gómez Dumm CLA y Dardenne M. Altered functional responses with preserved morphology of gonadotrophic cells in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 2001;15:85-92.
- Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM y Dardenne M. Altered regulation of serum prolactin in nude mice. *Med Sci Res* 1996;24:279-280.
- Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, y Dardenne M. Reduced ability of pituitary extracts from old mice to stimulate thymulin secretion *in vitro*. *Mech Age Dev* 1995a;83:143-154.
- Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM y Dardenne M. Altered thyrotropic and somatotropic responses to environmental challenges in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 1995b;9:79-86.
- Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bevilacqua JA y Dardenne M. Effects of growth hormone and thyroxine. *Neuroendocrinology* 1993;58(3):338-43.
- Goya RG, Gagnerault MC, De Moraes MC, Savino W y Dardenne M. *In vivo* effects of growth hormone on thymus function in aging mice. *Brain Behav Immunol* 1992;6:341-354.
- Goya RG. The immune-neuroendocrine homeostatic network and aging. *Gerontology* 1991;37(4):208-13.
- Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Reichhart R y Meites J. Homeostatic thymus hormone stimulates corticosterone secretion in a dose- and age-dependent manner in rats. *Neuroendocrinology* 1990;51:59-63.
- Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Gottschall PE, Goldstein AL y Meites J. Differential activity of thymosin peptides (thymosin fraction 5) on plasma thyrotropin in female rats of different ages. *Neuroendocrinology* 1988;47:379-383.
- Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL y Meites J. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent thyrotropin-inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 1987;41:219-227.
- Graham FL y Prevec L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* 1992;20:363-390.

- Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Adcock IM, Kendall MD y Wheeler MJ. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinology* 1986;110:417-422.
- Groscurth P, Müntener M y Tondury G. Histogenesis of the immune system of the "nude" mouse. II. Postnatal development of the thymus: a light microscopical study. *Beitr Pathol* 1975;154:125-139.
- Hadden JW. Thymic endocrinology. *Int J Immunopharmac* 1992;14:345-352.
- Hadley A, Rantle C y Buckingham J. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 1997;4(2):62-69.
- Halper J, Parnell PG, Carter BJ, Ren P y Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992;66:639-645.
- Harrison DE, Archer JR y Astle CM. The effect of hypophysectomy on thymic aging in mice. *J Immunol.* 1982;129:2673-2677.
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW y Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514.
- Healy DL, Hodgen GD, Schulte HM, Chrousos GP, Loriaux DL, Hall NR y Goldstein AL. The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates. *Science* 1983;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. Thymulin inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension modulating interleukin-6 expression and suppressing p38 pathway. *Endocrinology* 2008;149:4367-4373.
- Hinojosa L, Chavira R, Domínguez R y Rosas P. Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* 1999; 163:255-260.
- Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, Castillo L y Rosas P. Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by in vitro pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci* 2004; 76:795-804.
- Hitt M, Bett A, Prevec L y Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. London. Academic Press: 1998.
- Hitt M, Bett AJ, Addison CL, Prevec L y Graham LF. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Methods Mol Genet* 1995;7:13-30.
- Holland JM, Mitchell TJ, Gipson L y Whitaker MS. Survival and cause of death in aging germfree athymic nude and normal inbred C3Hf/He mice. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:1357-1361.

- Holub M, Větvicka V, Houstek J, Janikoa D, Rychter , A. Vrana, y L. Dazdova. 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; 1989.
- Holub M. Immunodeficient Rodents. The Nude Mouse. ILAR Journal 1992;34:1-2.
- Holub M. Immunology of Nude Mice. Boca Raton, Fla.: CRC Press: 1989.
- Incefy GS, Mertelsmann R, Yata K, Dardenne M y Bach JF. Induction of differentiation in human marrow T cell precursors by synthetic serum thymic factor, FTS. Clin Exp Immunol 1980;40:396-406.
- Israel-Biet D, Noel LH, Bach MA, Dardenne M y Bach JF. Marked reduction of DNA antibody production and glomerulopathy in thymulin (FTS-Zn) or cyclosporin A treated (NZB x NZW) F<sub>1</sub> mice. Clin Exp Immunol 1983;54:359-365.
- Iwata TT, Incefy GS, Cunningham-Rundles S, Cunningham-Rundles C, Smithwick E, Geller N, O'Reilly R y Good RA. Circulating thymic hormone activity in patients with primary and secondary immunodeficiency diseases. Am J Med 1981;71:385-394.
- Józkwicz A y Dulak J. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. Acta Biochim Pol 2005;52:589-599.
- Kaiserlian D, Dujic A, Dardenne M, Bach JF, Blanot D y Bricas E. Prolongation of murine skin grafos by FTS and its synthetic analogues. Clin Exp Immunol 1981;45:338-343.
- Kanaan SA, Safieh-Garabedian B, Karam M, Khansa H, Jabbur SJ, Jurjus AR y Saadé NE. Thymulin reduces the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. Brain Behav Immun 2002;16:450-460.
- Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Trembleau S, Fonteneau P y Loor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the nu(nude) locus. Thymus 1990;16(1):45-54.
- Kohda Y, Matsunaga Y, Yonogi K, Kawai Y, Awaya A y Gemba M. Protective effect of serum thymica factor, FTS, on cephaloridine-induced nephrotoxicity in rats. Biol Pharm Bull 2005;28:2087-2091.
- Kook AI y Trainin N. Hormone-like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in lymphoid cells. J Exp Med 1974;139:193-207.
- Kornfeld SJ, Zeffren T, Christodoulou CS, Day NK, Cawkwell G y Good RA. DiGeorge anomaly: A comparative study of the clinical and immunologic characteristics of patients positive and negative by fluorescence in situ hybridization. J Allergy Clin Immunol 2000;105(5):983-987.
- Krasnykh VN, Douglas JT y van Beusechem VW. Genetic targeting of adenoviral vectors. Mol Ther 2000;1:391-405.

- Ledwitz-Rigby F y Scheid PG. G. Gibori, editor. Thymulin modulates porcine granulosa cell responsiveness to Gonadotrophins *in vitro*. En: Signaling Messages and Gene Expression in the Ovary. New York: Springer-Verlag; 1991.
- Lintern-Moore S y Pantelouris EM. Ovarian development in nude mice. The size and composition of the follicle population. *Mech Age Dev* 1975;4:385-390.
- Maestroni GJ, Conti A y Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. *Immunology* 1988;63:465-469.
- Martines E, Reggiani PC, Schwerdt JI, Goya RG, Cónsole G. Neonatal thymulin gene therapy in nude mice: Effects on the morphology of the pituitary corticotrope population. *Histol Histopathol* 2011;26(4):471-479.
- Mendoza ME y Romano MC. Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 1989;14: 233-242.
- Mengalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson I, Nelson C, Elsholtz H y Rosenfeld MG. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 1989;3:946-958.
- Metreau E, Pléau JM, Dardenne M y Bach JF, Pradelles P. An enzyme immunoassay for synthetic thymulin. *J Immunol Meth* 1987;102:233-242.
- Michael SD, Taguchi O y Nishizuka Y. Effects of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol Reprod* 1980;22:343-350.
- Miller JFAP. Capítulo 24: Effect of thymic ablation and replacement. En: The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row; 1964.
- Mink JG, Radl J, van den Berg P, Haaijman JJ, van Zwieten MJ y Benner R. Serum immunoglobulins in nude mice and their heterozygous littermates during aging. *Immunology* 1980;40: 539-545.
- Mocchegiani E, Amadio L y Fabris N. Neuroendocrine-thymus interactions. I. *In vitro* modulation of thymic factor by thyroid hormones. *J Endocrinol Invest* 1990 b;13:139-147.
- Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacci E y Fabris N. Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* 1990a;33:7-14.
- Mocchegiani E, Sartorio A, Santarelli L, Ferrero S y Fabris N. 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* 1996;19:630-637.
- Morel GR, Reggiani PC, Console GM, Rimoldi OJ, Vesenbeckh SM, Garcia-Bravo MM, Rodriguez SS, Brown OA y Goya RG. Potential of gene therapy for

restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Current Gene Therapy* 2008;8:49-53.

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993;260:926-932.
- Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz K, Schüddekopf K, Smith AJH y Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996;272:886-889.
- Ng P y Baker MD. The molecular basis of multiple vector insertion by gene targeting in mammalian cells. *Genetics* 1999;151:1143-1155.
- Nishizuka Y y Sakakura T. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* 1971;89:889-893.
- Oates KK y Goldstein AL. Thymosins: hormones of the thymus gland. *Trends Pharm Sci* 1984;5:347-352.
- Pantelouris EM y Hair J. Thymus dysgenesis in *nude* (nu nu) mice. *J Embryol Exp Morph.* 1970; 24:615-623.
- Paxinos G y Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, Spiral Bound; 1998.
- Pierpaoli W y Besedovsky HO. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin Exp Immunol* 1975;20:323-328.
- Pierpaoli W y Sorkin E. Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus. *Nature* 1972;238:282-285.
- Pierpaoli W, Bianchi E y Sorkin E. 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* 1971;9:889-901.
- Pierpaoli W, Fabris N y Sorkin E. Developmental hormones and immunological maturation. *Ciba Found Study Group* 1970;36:126-53.
- Pierpaoli W, Kopp HG y Bianchi E. Interdependence of thymic and neuroendocrine functions in ontogeny. *Clin Exp Immunol* 1976;24:501-506.
- Pléau JM, Dardenne M y Bach JF. The serum thymic factor (FTS). Chemical and biological aspects. *Mol Cell Biochem* 1981;41:67-72.
- Pléau JM, Fuentes V, Morgat JL y Bach JF. Specific receptors for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:2861-2865.
- Pléau JM, Dardenne M, Blanot D, Bricas E y Bach JF. Antagonistic analogue of serum thymic factor (FTS) interacting with the FTS cellular receptor. *Immunol Lett* 1979;1:179-182.
- Pléau JM, Dardenne M, Blouquit Y y Bach JF. Structural study of circulating thymic factor: a peptide isolated from pig serum. *J Biol Chem* 1977; 252:8045-8047.

- Puntel M, Curtin JF, Zirger JM, Muhammad AK, Xiong W, Liu C, Hu J, Kroeger KM, Czer P, Sciascia S, Mondkar S, Lowenstein PR y Castro MG. 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* 2006;17:531-544.
- Ray D y Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocrine Rev* 1997;18(2):206-227.
- Rebar RW, Miyake A, Low TL y Goldstein AL. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 1981b;214: 669-671.
- Rebar RW, Morandini IC, Benirschke K y Petze JE. Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology* 1980;107:2130- 2132.
- Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF y Petze JE. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice. *Endocrinology* 1981a;108:120-126.
- Rebar RW, Morandini IC, Petze JE y Erickson GF. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol Reprod* 1982;27:1267-1276.
- Reggiani P, Hereñú C, Rimoldi O, Brown O, Pléau J, Dardenne M y Goya R. Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene Ther* 2006;13:1214-1221.
- Reggiani P, Martines E, Ferese C, Goya R y Cónsole G. Morphological restoration of gonadotrope population by thymulin gene therapy in nude mice. *Histol Histopathol* 2009;24(6):729-735.
- Relph K, Harrington K y Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using vectors in the United Kingdom. *BMJ*. 2004;329:839-842.
- Rinaldi-Garaci C, Garaci E, Del Gobbo V, Favalli C, Jezzi T y Goldstein AL. Modulation of endogenous prostaglandins by thymosin-alpha 1 in lymphocytes. *Cell Immunol* 1983;80:57-65.
- Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli Jr F, Wilson JM y Gilman M. Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 8657-8662.
- Rosenfeld MG, Bach I, Erkman L, Lin P, Lin S, McEvelly R, Ryan A, Rhodes S, Schonemann M y Scully K. Transcriptional control of cell phenotypes in the neuroendocrine system. *Recent Prog Horm Res* 1996;51:217-239.
- Ross MH y Wojciech P. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Rygaard J. *Thymus and Self-immunobiology of the Mouse Mutant Nude*. Copenhagen: F.A.D.L.; 1973.
- Saadé NE, Atweh SF, Jabbur SJ, Dardenne M, Bach JF y Safieh-Garabedian B. A thymulin analogue peptide with powerful inhibitory effects on pain of neurogenic origin. *Neuroscience* 2003;119:155-165.

- Sadler TW. Langman: Embriología Médica con Orientación Clínica. 10ª ed. Murcia: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Kanaan SA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE. The role of cytokines and prostaglandin-E(2) in thymulin induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2000;39:1653-1661.
- Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Pléau JM y Saadé NE. Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. *Br J Pharmacol* 2002;136:947-955.
- Safieh-Garabedian B, Kendall MD, Khamashta MA y Hughes GRV. Thymulin and its role in immunomodulation. *J Autoimm* 1992;5:547-555.
- Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad CA, Atweh SF, Jabbur SJ y Saadé NE. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience* 2003;121:865-873.
- Sambrook J y Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Savino W y Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Rev* 2000;21(4):412-443.
- Savino W y Dardenne M. 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* 1986;34:1719-1723.
- Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T y Dardenne M. Thymic hormones containing cells. IX. Steroids *in vitro* modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 1988;30:479-484.
- Savino W, Dardenne M y Bach JF. Thymic hormone containing cells. II. Evolution of cells containing the serum thymic factor (FTS or thymulin) in normal and autoimmune mice, as revealed by anti-FTS monoclonal antibodies. Relationship with Ia bearing cells. *Clin Exp Immunol* 1983;52(1):1-6.
- Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S y Dardenne M. 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* 1984;55:629-635.
- Schlake T, Schorpp M, Nehls M y Boehm T. 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* 1997;94:3842-3847.
- Shayakhmetov DM, Eberly AM, Li ZY y Lieber A. 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 Virology* 2005;79(7):4553.
- Stone D, Bolognani F, Lowenstein PR y Castro MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol*. 2000;164:103-108.



- Strich G, Petze JE, Silva de Sa MF y Rebar RW. 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* 1985;7:351-359.
- Thapar K, Kovacs K y Laws ER. The classification and molecular biology of pituitary adenomas. *Adv Techn Standards Neurosurg* 1995;22:3-53.
- Theill LE y Karin M. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* 1993;14:670-689.
- Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC y Bach JF. GH and IGF-1 stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:183-188.
- Villa-Verde DM, Defresne MP, Vannier-dos-Santos MA, Dussault JH, Boniver J y Savino W. Identification of nuclear triiodothyronine receptors in the thymic epithelium. *Endocrinology* 1992;131(3):1313-20.
- Villa-Verde DMS, Mello-Coelho V, Farias de Oliveira DA, Dardenne M y Savino W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 1993;133(2):867-75.
- Welsch U. *Histología: Sobotta. 2ª ed.* Alemania: Editorial Médica Panamericana; 2009.
- Wise T y Ford JJ. Effects of the thymic peptide thymulin on *in vitro* and *in vivo* testicular steroid concentrations in White Composite and Meishan boars. *J Anim Sci* 1999;77:2240-2251.
- Wise T. *In vitro* and *in vivo* effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;66:129-135.
- Yang H, Koyanagi M, Matsumoto I, Shimada T, Han L y Aikawa T. Corticosterone secretion in response to serotonin and ACTH by perfused adrenal of normal and athymic nude mice. *Life Sci* 1995;56(20):1727-1739.
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E y Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4407-4411.
- Yara S, Kawakami K, Kudeken N, Tohyama M, Teruya K, Chinen T, Awaya A y Saito A. FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. *Clin Exp Immunol* 2001;124:77-85.
- Yeh P y Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 1997;11:615-623.
- Zaidi SA, Kendall MD, Gillham B y Jones MT. The release of LH from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 1988;12:253-264.
- Zhao XH, Awaya A, Kobayashi H, Ohnuki T, Tokumitsu Y y Nomura Y. Effects of repeated administrations of facteur thymique sérique (FTS) on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mouse (SAM). *Jpn J Pharmacol* 1990;53:311-319.

## **8. PUBLICACIONES ELABORADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL**

### **Publicaciones**

1. Reggiani P, **Martines E**, Camihort G, Goya R, Cónsole G.  
*Restauración de la función reproductiva en ratones inmunodeficientes por medio de terapia génica con el gen del péptido timulina.*  
AMA 2007;3:1-6. ISSN 1666-2687.
2. 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 2009; 24:13-20. ISSN 0213-3911.
3. **Martines E**, Reggiani P, Schwartd J, Goya R, Cónsole G.  
*Neonatal thymulin gene therapy in nude mice: Effects on the morphology of the pituitary corticotrope population.*  
Histology and Histopathology 2011;26:471-479. ISSN 0213-3911.
4. **Martines E**, Reggiani P, Schwartd J, Goya R, Cónsole G.  
*Thymulin gene therapy prevents the histomorphological changes induced by thymulin deficiency in the thyrotrope population of mice.*  
Cells, Tissues & Organs 2011;194:67-75. ISSN 1422-6405.
5. Reggiani P, **Martines E**, Camihort G, Poch B, Goya R, Cónsole G.  
*Gene therapy reverses the effects on body weight and the morphological changes induced by thymulin deficiency on the somatotropic population in mice.*  
Life Sciences. Enviado 2011. ISSN 0024-3205.
6. Reggiani P, **Martines E**, Camihort G, Luna G, Goya R, Cónsole G.  
*The thymulin-lactotropic axis in rodents: thymectomy, immunoneutralization and gene transfer studies.*  
Histology and Histopathology. Enviado 2012. ISSN 0213-3911.

### **Comunicaciones**

1. Reggiani P, **Martines E**, Vidal M, Ferese C, Goya R, Cónsole G.  
*Efectos morfológicos y funcionales de la terapia génica con el gen de la timulina en ratones atímicos.*  
Jornadas de Presentación de Trabajos Medicina 2007. Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.  
La Plata, 23 de octubre de 2007.
2. **Martines E**, Reggiani P, Ferese C, Goya R, Cónsole G.  
*Restauración de la función reproductiva en ratones inmunodeficientes mediante terapia génica con el gen de la timulina.*  
LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Mar del Plata, 21-24 de noviembre de 2007.  
Publicado en Medicina, Buenos Aires. 2007;67(3):81.

3. **Martines E**, Reggiani P, Ferese C, Goya R, Cónsole G.  
*Restauración de la función reproductiva en ratones inmunodeficientes mediante terapia génica con el gen de la timulina.*

Expo Universidad 2008.  
La Plata, octubre 2008.

4. **Martines E**, Reggiani P, Ferese C, Goya R, Cónsole G.  
*Terapia génica neonatal con el gen de timulina sobre la población corticotropa en ratones atímicos.*

Jornada de Presentación de Trabajos Medicina 2008. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.  
La Plata, octubre 2008.

5. **Martines E**, Reggiani P, Ferese C, Goya R, Cónsole G.  
*Efectos de la terapia génica neonatal con el gen de timulina sobre la población corticotropa en ratones atímicos.*

LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.  
Mar del Plata, 19-22 de noviembre de 2008.  
Publicado en Medicina, Buenos Aires 2008;68(2):222.

6. **Martines E**, Reggiani P, Bracamonte M, Goya R, Cónsole G.  
*Efectos de la terapia génica con el gen de la timulina sobre la población tirotrópica en ratones atímicos.*

LIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.  
Mar del Plata, 18-21 de noviembre de 2009.  
Publicado en Medicina, Buenos Aires 2009;69(1):206.

7. **Martines E**, Reggiani P, Goya R, Cónsole G.  
*Morphological restoration of pituitary thyrotrope population by thymulin gene therapy in nude mice.*

Congress of Experimental Biology. American Association of Anatomists.  
Anaheim, California, USA, 24-28 de abril de 2010.  
Resumen *on line*: [http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting\\_abstract/24/1-MeetingAbstracts/627](http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting_abstract/24/1-MeetingAbstracts/627).

8. **Martines E**, Reggiani P, Bracamonte M, Luna G, Goya R, Cónsole G.  
*Cambios morfométricos en la población lactotropa inducidos por terapia génica neonatal con el vector RAd-FTS en ratones nude.*

Jornadas de Medicina 2010. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.  
La Plata, 2010.

9. **Martines E**, Reggiani P, Bracamonte M, Luna G, Goya R, Cónsole G.  
*Cambios morfométricos en la población somatotropa inducidos por terapia génica neonatal con el vector RAd-FTS en ratones nude.*

Jornadas de Medicina 2010. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.  
La Plata, 2010.

10. **Martines E**, Reggiani P, Bracamonte M, Luna G, Goya R, Cónsole G. *Cambios morfológicos en la población lactotropa inducidos por terapia génica neonatal con el vector RAd-FTS en ratones nude.*

LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Mar del Plata, 17-20 de noviembre de 2010.

Publicado en Medicina, Buenos Aires 2010;70(2): 255.

11. **Martines E**, Reggiani P, Bracamonte M, Luna G, Goya R, Cónsole G. *Cambios morfológicos en la población somatotropa inducidos por terapia génica neonatal con el vector RAd-FTS en ratones nude.*

LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Mar del Plata, 17-20 de noviembre de 2010.

Publicado en Medicina, Buenos Aires 2010;70(2):152.

12. **Martines, EV**, Reggiani P, Bracamonte M, Luna G, Goya R, Cónsole G. *Efectos de la terapia génica con timulina sobre las poblaciones adenohipofisarias en ratones nude.*

LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Mar del Plata, 16-19 de noviembre de 2011.

Publicado en Medicina, Buenos Aires 2011;(3):104.