

**Universidad:** Universidad Nacional de La Plata  
**Facultad/Centro/Instituto:** Facultad de Ciencias Médicas – Instituto Nacional de Investigaciones Bioquímicas de La Plata  
**Título del Trabajo:** EXPRESIÓN GÉNICA SIMULTÁNEA Y REGULADA DEL PÉPTIDO TÍMICO TIMULINA Y LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN UTILIZANDO UN SISTEMA ADENOVIRAL TET-OFF  
**Autor/es:** Poch, Brenda; Reggiani, Paula C  
**Nivel de formación del investigador principal:** Graduado  
**Orientador:** Reggiani, Paula Cecilia  
**Núcleo Disciplinario/Comité Académico/Otros Temas:** Virología Molecular  
**Correo electrónico del autor principal:** brendapoch@yahoo.com.ar  
**Palabras Clave:** Timulina, sistema regulable Tet-Off, vectores adenovirales recombinantes

## RESUMEN:

### EXPRESIÓN GÉNICA SIMULTÁNEA Y REGULADA DEL PÉPTIDO TÍMICO TIMULINA Y LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN UTILIZANDO UN SISTEMA ADENOVIRAL TET-OFF

#### Introducción

Una de las cuestiones clave en la implementación exitosa de terapias génicas radica en la capacidad de regular la expresión consistentemente. Con este propósito, y a fin de ampliar nuestros estudios en timulina y su papel en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, construimos un sistema bivectorial regulable Tet-Off que expresa, simultáneamente, los transgenes para green fluorescent protein (GFP) y metFTS (análogo de timulina).

#### Objetivos

Estudiar la funcionalidad y regulabilidad de nuestro sistema *in vitro* y evaluar la expresión *in vivo* mediante su inyección en músculos y ventrículos cerebrales de ratas.

#### Materiales y métodos

El sistema experimental consta de dos adenovectores recombinantes (RAAd): el RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>, unidad de respuesta en la cual la transcripción de los transgenes se encuentra controlada por un promotor bidireccional inducible por doxiciclina, y el RAAd-tTA, unidad transactivadora que expresa la proteína reguladora tTA. El sistema control no expresa metFTS.

La expresión de GFP se determinó por microscopía y fluorometría. La timulina bioactiva fue medida por un bioensayo de rosetas.

#### Resultados y conclusión

El sistema construido mostró ser activo tanto en experimentos *in vitro*, donde células CHO-K1 incubadas con ambos RAAds mostraron una eficiente expresión de los transgenes, pudiendo inhibirse por el agregado de doxiciclina al medio de cultivo; como *in vivo*, donde se dosaron niveles significativamente aumentados de timulina sérica y en LCR en ratas inyectadas intramuscular e intracerebrovectorialmente con ambos RAAds, respectivamente.

La utilización del gen de la GFP en nuestro sistema sirvió para comprobar, sencilla y rápidamente, la transcripción del gen de la timulina.

## INTRODUCCIÓN

La timulina es una hormona tímica descubierta, purificada y secuenciada durante los años '70 en estudios pioneros liderados por J. F. Bach, M. Dardenne y J. M. Pléau [Bach, 1983]. Producida exclusivamente por las células epiteliales tímicas, esta proteína consiste en un nonapéptido biológicamente inactivo (facteur thymique sérique o FTS) coordinado al ión  $Zn^{+2}$  en una relación equimolecular [Gastinel *et al.*, 1984], el cual le confiere su actividad biológica característica [Dardenne *et al.*, 1982].

Nuestro principal interés en la timulina se centra en su acción hipofisotrófica [Zaidi *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2000]. En estudios previos hemos implementado terapia génica neonatal para esta hormona en ratones hembras congénitamente atímicos (*nude*) utilizando nuestro vector adenoviral recombinante (RAd-FTS) que expresa, constitutivamente, un gen sintético para un análogo biológicamente activo de timulina: el decapeptido metFTS. Mediante dicha terapia se lograron restaurar los niveles de timulina sérica y prevenir las alteraciones a nivel hipotálamo-gonadotropo-ovárico que típicamente ocurren en estos mutantes en la adultez [Goya *et al.*, 2007; Reggiani *et al.*, 2008; Reggiani *et al.*, 2009].

Es conocido que la mayoría de las enfermedades son heterogéneas y dinámicas, y la expresión de proteínas transgénicas restaurativas requiere, en muchos casos, estar limitada a una ventana terapéutica [Clackson *et al.*, 2000]. Así, es lógico pensar que, en estrategias de terapia génica, es necesario un control farmacológico de la expresión de la proteína de interés para lograr concentrar la expresión del transgen dentro de dicha ventana terapéutica, maximizando el efecto y minimizando las consecuencias negativas de la sobreexpresión [Lee *et al.*, 2005]. En nuestro caso, el efecto del timo sobre el desarrollo del sistema reproductivo se ejerce dentro de una etapa crítica, la perinatal, por lo que resulta de interés acotar el tratamiento a dicho período.

Con esta premisa, y a fin de disponer de una herramienta más flexible y sofisticada que nos permitiera ampliar los estudios sobre los efectos restaurativos de la timulina, con una mejor manipulación y control sobre su producción, construimos un sistema de expresión bivectorial inducible por tetraciclina (Tet-Off) [Baron *et al.*, 1995; Gossen *et al.*, 1992]. Dicho sistema está constituido por dos vectores adenovirales recombinantes (RAd): uno de ellos contiene una unidad reguladora, que expresa la proteína transactivadora tTA, mientras que el otro alberga una unidad transcripcional bidireccional, que consta de una región central de respuesta (TRE) flanqueada por dos promotores mínimos que dirigen la expresión simultánea del metFTS, nuestro gen de interés, y del gen reportero de la green fluorescent protein (GFP). Así, la proteína tTA actúa como un regulador positivo que, al unirse al elemento TRE, activa la expresión de la unidad transcripcional bidireccional unida a éste. En el sistema Tet-Off la presencia de tetraciclina, o alguno de sus análogos, impide la unión de tTA al TRE,

por lo que se inactiva la transcripción (**Fig. 1**). Por esta característica el sistema se denomina Tet-Off, para ilustrar que en presencia del antibiótico se apaga el sistema de expresión.

## OBJETIVOS

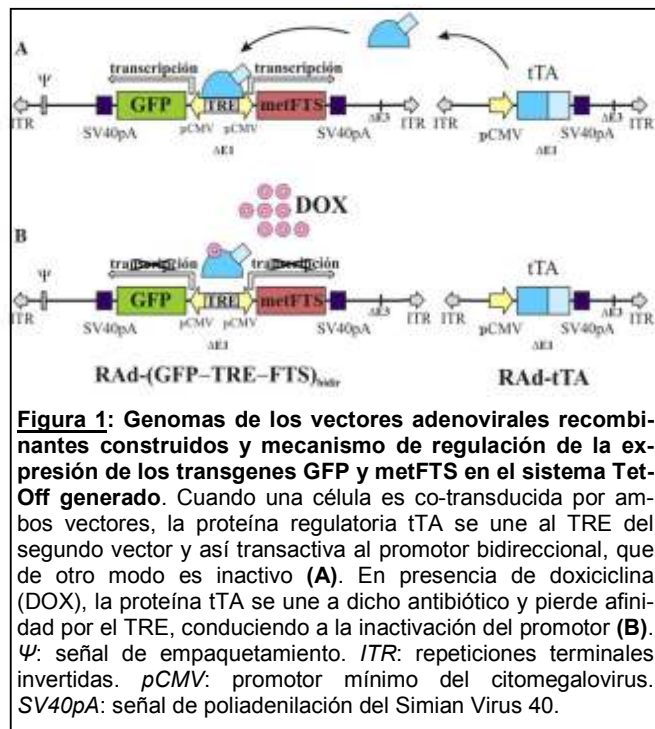
A partir de la construcción de un sistema adenoviral recombinante bidireccional regulable Tet-Off que permite, mediante la utilización de dos vectores, la co-expresión regulada del gen sintético para la timulina (metFTS) y el gen reportero para la GFP, ambos bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina:

- 1- Estudiar la expresión de metFTS y GFP y evaluar la regulabilidad del sistema bivectorial *in vitro* en células CHO-K1.
- 2- Evaluar la expresión *in vivo* del sistema bivectorial mediante su inyección en músculos y ventrículos cerebrales de ratas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Vectores adenovirales contruidos y regulación de la expresión génica por el sistema Tet-Off (Fig. 1).**

El sistema se construyó utilizando el método de los dos plásmidos (kit AdMax®, Microbix, Canadá). Consta de dos vectores: el RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>, que expresa los genes de la GFP y del metFTS bajo el control de un promotor bidireccional regulable flanqueando al elemento de respuesta a la tetraciclina (TRE); y el RAd-tTA, que contiene un gen para la proteína química regulatoria tTA. También se construyó un vector carente de metFTS, con las mismas características que el RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>, denominado RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub>, para ser utilizado como control.



**Cultivos celulares.** Células de ovario de hámster chino (CHO-K1) fueron repicadas con un 60% de confluencia en placas de 6 o 12 pocillos y cultivadas en medio MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 U de penicilina/ml, 0,1 mg de estreptomycin/ml,

y 0,25 µg de anfotericina B/ml. Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Animales.** Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 4 meses de edad, las cuales permanecieron en un cuarto con temperatura controlada (22±2°C), ciclos de luz/oscuridad de 12:12 hs y alimento y agua *ad libitum*.

**Inyecciones estereotáxicas.** Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (40 mg/kg peso corporal) e intramuscular de clorhidrato de xilazina (8 mg/kg de peso corporal), y posicionadas en un aparato estereotáxico. Se efectuó una incisión en la línea media de la cabeza y, utilizando una fresa odontológica de 0.9 mm de diámetro se practicó un orificio en el cráneo. Para acceder a los ventrículos laterales se utilizaron las siguientes coordenadas relativas al bregma: 0.8 mm posterior, 3.7 mm ventral y 1.5 mm izquierda o derecha.

**Muestreo de fluidos animales.** Para el monitoreo seriado de los niveles de timulina sérica se tomaron muestras de sangre de las venas de la cola cada 7 días, bajo anestesia ligera con éter. En el caso del líquido cefalorraquídeo (LCR), las muestras se obtuvieron por punción de la cisterna magna bajo anestesia con ketamina/xilazina, descrita en el punto anterior. Tanto el suero como el LCR fueron almacenado a -70°C hasta su análisis.

**Eutanasia y procesamiento de cerebro y músculos.** Las ratas fueron anestesiadas por inhalación de éter y luego perfundidas por vía intracardíaca con 200 ml de solución salina seguida de 200 ml de paraformaldehído 4% en PBS, pH 7.4. Los cerebros fueron cuidadosamente disecados, colocados en paraformaldehído y cortados con un vibrátomo Leica VT1000S. Los músculos de las patas traseras fueron disecados, incrustados en tacos de parafina y cortados con un micrótopo Reichert-Jung 2040. Se realizaron cortes seriados, coronales en cerebro y longitudinales en músculo, de 40 y 4 µm de espesor, respectivamente. Los mismos fueron montados con Fluoromount G (cat# 17984-25, Electron Microscopy Sciences).

**Análisis de imágenes.** Las imágenes de las regiones tisulares de interés fueron adquiridas con una cámara fotográfica digital (DP70, Olympus) acoplada a un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). El análisis de imágenes fue realizado usando el programa Image Pro Plus v5.2 (MediaCybernetics). Las imágenes de los cultivos celulares fueron adquiridas con una cámara fotográfica digital acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX-71).

**Cuantificación de la expresión *in vitro* de GFP.** Pasadas 48 hs de incubación se lavaron las placas de células con PBS, se les añadió 150 µl de buffer de lisis (0.1% de Tritón

X-100 en PBS) por pocillo y se las mantuvo a 4°C durante 30 min. Luego se raspó la superficie de los pocillos a fin de levantar las células y se recuperó el buffer en tubos de 0,5 ml. Las muestras se agitaron y centrifugaron 30 seg. a 13000 rpm. Se tomaron los sobrenadantes y se midió la intensidad de fluorescencia (Lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector: excitación 485 nm y emisión 535 nm).

**Bioensayo para timulina.** La timulina bioactiva fue medida en los sobrenadantes celulares, LCR y sueros por un bioensayo de rosetas [Dardenne *et al.*, 1975]. Este método se basa en la capacidad de la timulina de inhibir, en presencia de azatioprina, la formación de rosetas de glóbulos rojos de carnero sobre esplenocitos de ratón timectomizado. Los valores se expresaron como fg/ml de timulina bioactiva.

**Análisis estadístico.** Las comparaciones estadísticas entre grupos experimentales fueron realizadas por el test *t* de Student o mediante ANOVA seguido del test de Dunnett, según corresponda. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. Se consideraron diferencias significativas a valores de  $p \leq 0,05$ .

**Estudios de expresión y regulabilidad del sistema *in vitro*.** Luego de 24 hs de repicar las células, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por:

- **Experimento 1:** **A)** medio de cultivo solo, **B)** el RAd-tTA + RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> **C)** RAd-tTA + RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> con el agregado de 1  $\mu$ g/ml de doxiciclina (Clontech) desde el día del plaqueo, **D)** sólo el RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>, utilizando  $4 \times 10^8$  pfu/well de cada vector en todos los casos. Paralelamente, se realizó el mismo experimento utilizando el vector control RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> en lugar del experimental RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>. Pasadas 48 hs. se tomaron imágenes fotográficas de las monocapas, se recolectaron los sobrenadantes para medir los niveles de timulina y se lisaron las células para cuantificar GFP por fluorometría.
- **Experimento 2:** **A)** medio de cultivo solo, **B)** RAd-tTA + RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub>, **C)** RAd-tTA + RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> con el agregado de 1  $\mu$ g/ml de DOX desde el día del plaqueo y hasta el día 2 y **D)** RAd-tTA y RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> con el agregado de 1  $\mu$ g/ml de DOX desde el día 2 al día 6. Se utilizaron  $4 \times 10^8$  pfu/well de cada vector en todos los casos. Pasados 2 o 6 días, según el caso, se procedió a la cuantificación de GFP por fluorometría.

#### **Estudios de expresión del sistema *in vivo*.**

- **Experimento 1:** Los animales fueron timectomizados (TX) y divididos en dos grupos (N=5). Catorce días después recibieron, en cada pata trasera, una inyección intramuscular (i.m.) de 0,1 ml de suspensión viral, conteniendo una mezcla 1:1 de: **A)** RAd-(GFP-

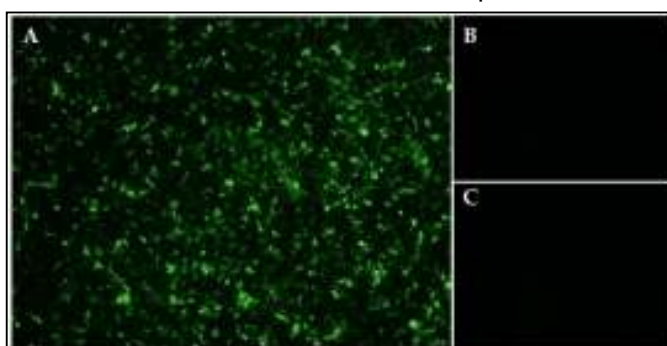
- TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAd-tTA (grupo experimental) y **B**) RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> + RAd-tTA (grupo control), utilizando  $1 \times 10^9$  pfu/ml de cada vector. Se les extrajo sangre de la cola cada 7 días para monitorear la timulina sérica. El día 2 post-administración de los vectores se sacrificó a un animal de cada grupo para procesar los músculos inyectados, mientras que los restantes fueron mantenidos durante 7 semanas hasta su sacrificio (día 49).
- Experimento 2: Los animales se dividieron en dos grupos (N=4) que recibieron una inyección intracerebral en cada ventrículo lateral (ICV) de 10  $\mu$ l de: **A**) mezcla 1:1 de RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAd-tTA y **B**) RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> ( $1 \times 10^{11}$  pfu/ml de cada vector). Pasadas 72 hs, se les extrajo LCR para el dosaje de timulina y se los sacrificó por perfusión intracardiaca. Los cerebros se procesaron para observar la expresión de GFP según se describió previamente.

## RESULTADOS

### Expresión y regulabilidad del sistema bivectorial *in vitro*.

- Experimento 1:

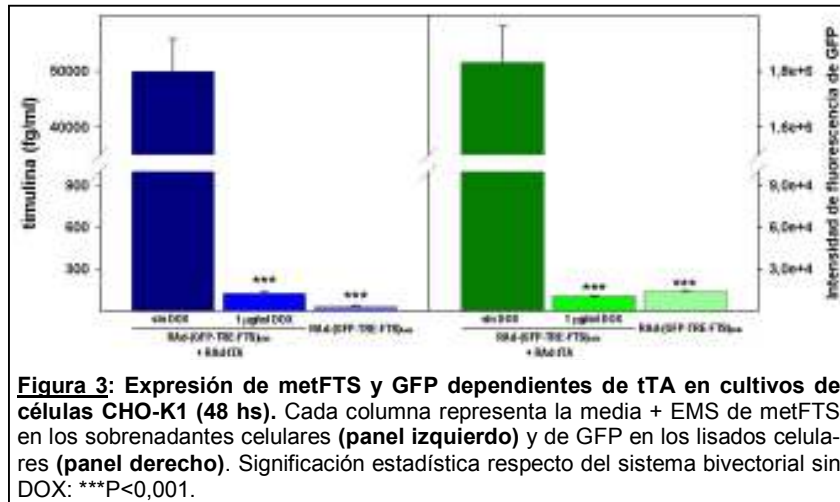
Se evaluó la expresión y regulabilidad del sistema bivectorial bidireccional regulable Tet-Off en cultivos de células CHO-K1, por medio de la observación de fluorescencia verde y



**Figura 2:** Expresión de GFP dependiente de tTA en cultivos de células CHO-K1 (48 hs). Células incubadas con el RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> y el RAd-tTA en ausencia (**A**) o en presencia (**B**) de 1  $\mu$ g/ml DOX; o incubadas sólo con RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> (**C**). Objetivo 10x.

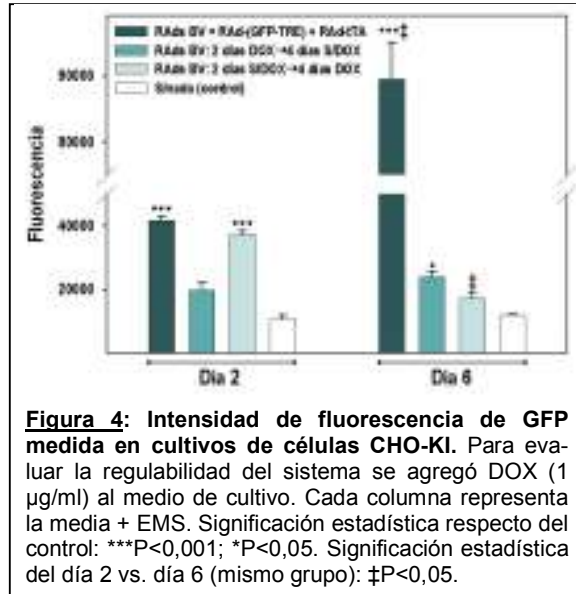
determinaciones cuantitativas de GFP y metFTS. En los sobrenadantes de las células transducidas con el sistema completo, RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAd-tTA, se dosaron elevados niveles de timulina luego de 48 hs de incubación (**Fig. 3 panel izquierdo**), lo cual se correlacionó con una intensa fluorescencia verde correspondiente a la eficiente expresión de GFP (**Fig. 2A y 3 panel derecho**). Como se esperaba, cuando la misma incubación se realizó en presencia 1  $\mu$ g/ml de DOX (**Fig. 2B y 3**), o en ausencia del vector RAd-tTA (**Fig. 2C y 3**), no se detectó expresión de ninguno de los genes de interés.

Los mismos experimentos, realizados con el vector RAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> en lugar del RAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>, arrojaron resultados similares a los mostrados para GFP y niveles indetectables de timulina en los sobrenadantes (datos no mostrados).



- Experimento 2:

Las células CHO-K1 incubadas con el sistema bivectorial bidireccional regulable Tet-Off control, en ausencia de DOX durante 48 hs, mostraron una significativa expresión de GFP evidenciada por intensidad de fluorescencia. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con el mismo sistema en presencia de DOX, la fluorescencia cayó a niveles basales, demostrándose la eficiencia del antibiótico en la down-regulación del promotor bidireccional. Por otro lado, durante el proceso de inactivación con DOX durante 2 días, seguido de 4 días de medio libre de antibiótico, el sistema no alcanzó a activarse (Fig. 4).



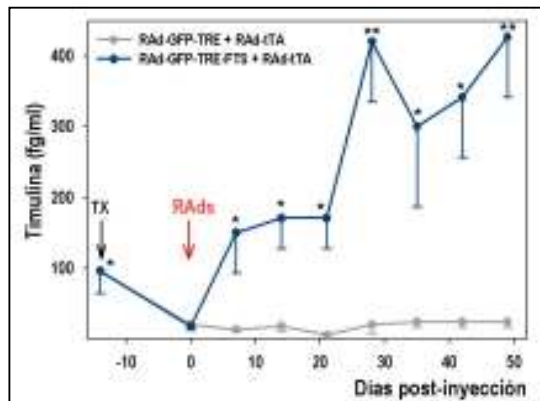
### Expresión de los transgenes *in vivo*.

- Experimento 1:

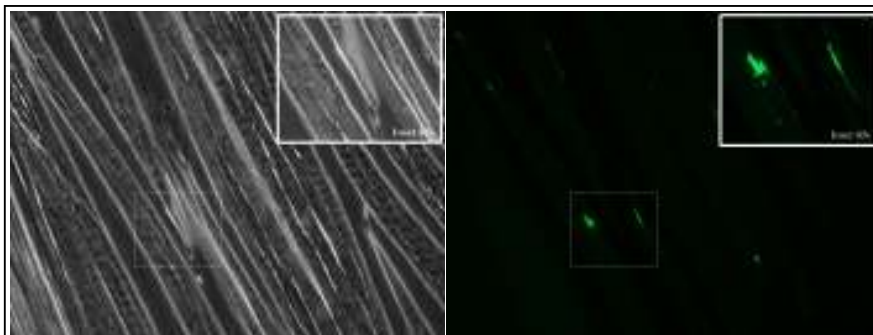
Los animales inyectados i.m. con RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAAd-tTA mostraron niveles de timulina sérica significativamente mayores respecto del grupo inyectado con el sistema bivectorial control, y mantenidos en el tiempo hasta el final del experimento (49 días post-inyección) (Fig. 5).

La expresión de GFP se estudió mediante la observación de fluorescencia verde en cortes longitudinales de músculos de patas traseras de ratas sacrificadas al día 2 post-

inyección. La fluorescencia se hizo evidente tanto en el grupo experimental (**Fig. 6**) como en el grupo control (fotografía no mostrada).



**Figura 5: Expresión a largo plazo de timulina sérica en ratas TX.** Cada punto representa la media-EMS. Significación estadística respecto del grupo control: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

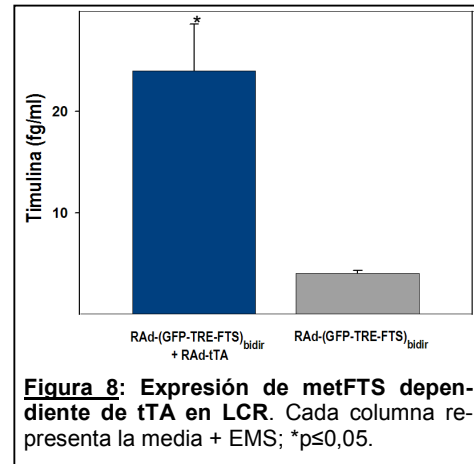
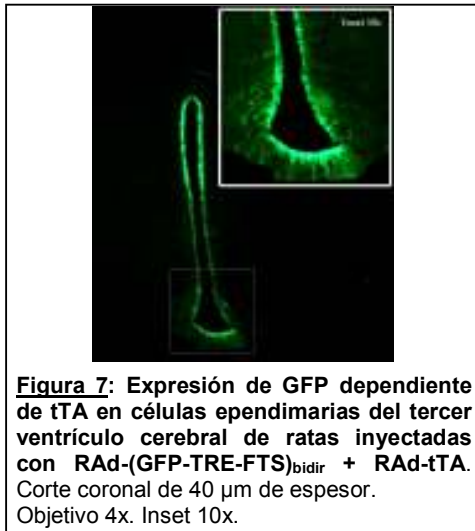


**Figura 6: Expresión de GFP dependiente de tTA en músculos de patas traseras de ratas inyectadas con RAD-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAD-tTA.** Imágenes en campo claro (**panel izquierdo**) y de fluorescencia (**panel derecho**) de fibras musculares en corte longitudinal (4  $\mu\text{m}$  de espesor) provenientes de ratas sacrificadas el día 2 post-inyección. Objetivo 20x. Inset 40x

- Experimento 2:

Las inyecciones ICV indujeron una intensa expresión de GFP en las células ependimarias de todos los ventrículos cerebrales (observada por fluorescencia verde) (**Fig. 7**) y elevados niveles de timulina en los LCR de los animales inyectados con RAD-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAD-tTA, respecto de los controles inyectados sólo con RAD-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> (**Fig. 8**).





## DISCUSIÓN

Los sistemas de expresión génica regulados por tetraciclina son ampliamente utilizados para conseguir un control temporal y cuantitativo de la expresión de transgenes de interés en cultivos celulares (Rennel E *et al*, 2002). Este control es deseable tanto en estudios funcionales de genes particulares como en aplicaciones de terapia génica en investigación básica (Mizuguchi *et al*, 2002), lo cual constituye, precisamente, nuestro campo de interés. Así, los resultados mostrados en el presente trabajo indican, en los experimentos *in vitro*, una satisfactoria expresión tanto de nuestro gen de interés (metFTS) como del gen reportero (GFP), y una correcta regulación génica por el agregado de DOX al medio de cultivo.

Asimismo, en estos experimentos observamos que se necesitan más de cuatro días de incubación con medio de cultivo libre de DOX para desinhibir a nuestro sistema (**Fig. 4**). Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Rennel y *col* (2002), quienes explicaron que estas observaciones podrían deberse a que el antibiótico se une tanto a las células como a la matriz extracelular. Luego de su remoción del medio de cultivo, el antibiótico aún está presente en las células, alcanzando niveles que suprimen completamente la expresión de los genes de interés. En futuros estudios será necesario optimizar las condiciones necesarias para la re-activación de nuestro sistema Tet-Off.

En experimentos *in vivo*, los niveles de expresión del transgen de metFTS producidos por el sistema bivectorial construido fueron semejantes a los obtenidos por el RAd-FTS en estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Estos niveles resultaron suficientes para lograr efectos restaurativos significativos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico en el modelo animal de ratones congénitamente atímicos. En efecto, la terapia génica neonatal el RAd-FTS logró restaurar los niveles séricos de timulina y prevenir la aparición del bien co-

nocido déficit reproductivo en el ratón *nude* adulto [Goya *et al.*, 2007; Reggiani *et al.*, 2008; Reggiani *et al.*, 2009]. Tales estudios brindan un sólido apoyo al concepto de que la timulina juega un importante rol fisiológico durante el desarrollo del sistema reproductor en ratones hembras. La disponibilidad del sistema regulable de expresión construido permitirá determinar cuáles son las ventanas críticas en las que actúa la timulina sobre la maduración del sistema neuroendócrino durante la vida postnatal en el modelo del ratón *nude*.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con los experimentos realizados en el presente trabajo indican que ambos sistemas construidos, el experimental (RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> + RAAd-tTA) y el control (RAAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub> + RAAd-tTA), son activos *in vitro* y regulados eficientemente con el agregado de DOX al medio de cultivo.

Asimismo, ambos sistemas mostraron una actividad satisfactoria *in vivo*, lográndose expresiones de los transgenes tanto en cerebro como en músculo estriado, siendo de largo plazo (7 semanas) en este último caso.

Dado que los vectores adenovirales recombinantes construidos, RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub> y RAAd-(GFP-TRE)<sub>bidir</sub>, expresan el transgen de una proteína reportera (green fluorescent protein de *Aequoria victoria*), constituyen una herramienta tecnológica apropiada para lograr, de una manera fácil y rápida, la detección de la sobreexpresión de metFTS en las células por ellos transducidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bach JF. 1983. Thymulin (FTS-Zn). *Clin Immunol Allergy* 3:133-156.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H. 1995. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23(17): 3605-3606.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau J-M, Goya RG. 2000. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol (Biol Sci)* 55: B170-176.
- Clackson T. 2000. Regulated gene expression systems. *Gene Ther* 7: 120-125.
- Dardenne M and Bach JF. In: *Biological Activity of Thymic Hormones. International Workshop and Symposium*, edited by Van Bekkum DW and Kruisbeek AM. Kooyker Scientific Publications, Halsted Press Division, Wiley: Rotterdam. 1975. p. 235-243.
- Dardenne M, Nabarra B, Lefrancier P. 1982. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of serum thymic factor (FTS). *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5370-5373.
- Gastinel LN, Dardenne M, Pléau JM, Bach JF. 1984. Studies on the zinc-binding site to the serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 797: 147-155.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551.
- Goya RG, Reggiani PC, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P, Dardenne M. 2007. Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice; *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E182-187.
- Lee YB, Glover CP, Cosgrave AS, Bienemann A, Uney JB. 2005. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol* 90: 33-37.

- Mizuguchi H and Hayakawa T. 2002. The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J Gene Med* 4(3):240-7.
- Reggiani PC, Flamini MA, Rodríguez SS, Goya RG, Barbeito CG. 2008. Preventive action of neonatal gene therapy with the thymic hormone thymulin on the ovarian atrophy of adult nude mice. *Biocell* 32: 137.
- Reggiani P, Martines E, Ferese C, Goya R, Cónsole G. 2009. Morphological Restoration of Gonadotrope Population by Thymulin Gene Therapy in Nude Mice. *Histol Histopathol* 24:729-35.
- Rennel E and Gerwins P. 2002. How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem* 309(1):79-84
- Zaidi SAA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT. 1988. The release of LH from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 12:253-264.