

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Exactas

**TERAPIA GENICA EN EL SISTEMA
NEUROENDOCRINO: ABORDAJE DE
DIFERENTES ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES**



Tesista: Lic. en Bioquímica Claudia Beatriz Hereñú

Director: Dr. Rodolfo G. Goya

Codirectores: Dres. Omar J. Rimoldi y Ana M. Cortizo

Lugar de realización: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Cátedra de Histología B y Cátedra de Patología B de la Facultad de Ciencias Médicas; Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata-

“Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata”

A mi querida familia

Agradecimientos

A Lucía y Esteban, por todo su cariño, apoyo constante y por haber cedido tanto tiempo de sus vidas para que pueda lograr este proyecto personal.

A mis padres, por haberme brindado la posibilidad de obtener mi título de grado facilitándome siempre el camino y estimulándome en todas mis actividades desarrolladas pasadas, presentes y futuras.

A mis amigos, cordobeses y platenses, y a todos aquellos quienes me acompañaron incondicionalmente siempre alentándome en cada tramo a lo largo de este periodo. A mis compañeros del Instituto, especialmente a Jole, Mauro, Sabina, Magali, Mónica, Marina, Vanesa, Oscar y Gustavo, quienes desde un plano profesional y personal estuvieron siempre compartiendo mi vida.

A la Universidad Nacional de Córdoba – Facultad de Ciencias Químicas- por haberme brindado la formación básica necesaria para el eficaz inicio de trabajos de investigación.

A la Universidad Nacional de La Plata – Facultad de Ciencias Exactas- por otorgarme la posibilidad de crecer profesional y personalmente aspirando a un título superior de post-grad.

A Rodolfo Goya, porque más allá de la dirección de la presente tesis doctoral, siempre ha sido con su permanente abnegación y dedicación al trabajo, un constante estímulo para mi desarrollo, compartiendo conmigo amable y generosamente sus conocimientos y proyectos, colaborando en mi crecimiento intelectual con todo lo que estuvo a su alcance y permitiendo que hoy alcanzar este título sea una realidad.

A Yoli por su voluntariosa colaboración al posibilitarme tantos aprendizajes relacionados con el manejo de animales experimentales e innumerables técnicas diversas. Y en el plano personal, por acompañarme en momentos felices, como así también en los difíciles.

A Omar Rimoldi y Susana González, por su constante apoyo y compañía durante este periodo. A Omar también por su dirección y colaboración profesional intensa durante mis tres primeros años de trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) y a la Cátedra de Histología B de la Facultad de Ciencias Médicas-UNLP, quienes por intermedio de sus directivos Dr. Rodolfo Brenner y Dra. M. Josefina Tacconi; Dr. Cesar Gómez Dumm y Dra. Gloria Cónsole, me brindaron el espacio, la infraestructura y el equipamiento para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Gloria Cónsole y a todo su equipo de trabajo por su buena voluntad y colaboración otorgada durante este periodo inicial en mi carrera científica. A Ruben especialmente por la atención prestada en el cuidado de los animales de bioterio empleados en este trabajo.

A la cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas-UNLP, por permitirme el desarrollo de gran parte experimental en su espacio, ofreciéndome en todo momento un clima cálido de trabajo. A Inés especialmente por su colaboración constante en el acondicionamiento de los materiales que he necesitado.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP , Cátedra de Anatomía Comparada especialmente a Zucco y Vanina por sus valiosas y desinteresadas enseñanzas; a la Cátedra de Patología General, a Enrique Portiansky, Eduardo Gimeno y sus respectivos equipos de trabajo. Gracias a todos por otorgarme el soporte de conocimientos neuroanatómicos e histopatológicos que he necesitado para llevar a cabo las tareas desarrolladas.

“Al gran grupo de trabajo perteneciente al INIBIOLP, Cátedra de Histología B, Cátedra de Patología B y Cátedra de Ciencias Biológicas (Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP), con quienes establezco interacción profesional y personal constantemente; gracias por su cariñosa interacción diaria y por los numerosos conocimientos generosamente transmitidos”.

INDICE GENERAL

<i>Resumen</i>	1
<i>Objetivos</i>	3

INTRODUCCION

1- Impacto del envejecimiento en los sistemas neuronales dopaminérgicos del Sistema Nervioso Central

1-1 Generalidades.....	4
1-2 Biosíntesis de dopamina.....	5
1-3 Receptores Dopaminérgicos.....	6
1-4 Circuitos dopaminérgicos del Sistema nervioso central	7
1-4 a Vías dopaminérgicas mesencefálicas.....	8
1-4 b Vías dopaminérgicas diencefálicas.....	10
1-5 Eje Hipotálamo- Hipofisario / Regulación lactotropa.....	12
1-6 Modelo de estudio	14

2- Factores de Crecimiento / IGF-I

2-1 Generalidades.....	15
2-2 Identificación y distribución de los IGFs.....	17
2-3 Proteínas unidoras de IGFs.....	20
2-4 Receptores de IGFs / Conceptos generales.....	21
2-5 Receptores de IGF-I en sistema nervioso.....	22
2-6 IGF-I como factor neurotrófico	23
2-6 a Generalidades.....	23
2-6 b IGF-I y estrógenos en el sistema nervioso.....	24
2-7 IGF-I y envejecimiento	25

3- Adenovirus y Vectores Adenovirales

3-1 Generalidades	27
3-2 Adenovirus	27
3-2 a Estructura de los adenovirus.....	27
3-2 b Interacción entre el virus y la célula huésped.....	29
3-2 c Internalización del adenovirus.....	30
3-2 d Ciclo infectivo del adenovirus.....	31
3-2 e Estrategias de transcripción del adenovirus	32
3-2 f Replicación del genoma adenoviral.....	33
3-2 g Traducción de genes virales y empaquetamiento de la progenie.....	34
3-2 h Liberación de las partículas virales.....	35
3-3 Vectores Adenovirales	
3-3 a Características estructurales y funcionales de los vectores adenovirales..	36
3-3 b Utilización de vectores adenovirales	37

MATERIALES Y METODOS

1- Protocolos generales de trabajo con plásmidos

1-1 Transformación bacteriana con los plásmidos de interés.....	39
1-1-a Preparación de bacterias competentes con Cloruro de Calcio.....	39
1-1-b Transformación de bacterias competentes.....	39
1-2 Procedimiento de obtención de plásmidos en escala analítica (minipreparación)...	40
1-3 Digestión con enzimas de restricción (ER).....	41
1-4 Electroforesis de inmersión en geles de agarosa.....	42
1-5 Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	42
1-6 Ligación.....	43
1-7 Protocolo de obtención de plásmidos en escala preparativa (maxipreparación) ...	43

2-Construcción de Vectores Adenovirales Recombinantes (RAds):

2-1 Características del sistema de construcción.....	44
2-2 Estrategia de construcción del plásmido de transferencia (shuttle) para el gen de IGF-I.....	48
2-3 Purificación de los plásmidos para su empleo en cultivos celulares.....	51
2-3 a Purificación de los plásmidos por ultracentrifugación en gradiente de CsCl ..	51
2-3 b Purificación de plásmidos a escala preparativa: Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System	52

3- Cultivos celulares

3-1 Líneas celulares empleadas.....	54
3-2 Procedimientos generales de cultivo de células.....	54
3-2-a Descongelamiento de células.....	54
3-2-b Repique de las células.....	55
3-2-b 1 Método con tripsina.....	55
3-2 b 2 Método con ácido cítrico salina.....	55
3-2-c Congelamiento de células.....	55
3-3 Cotransfección	56
3-3 a Cotransfección por la técnica de CaCl ₂	56
3-3 b Cotransfección con lipofectamina.....	57
3-4 Procesamiento y controles de las células cotransfectadas.....	58
3-5 Screening de las placas de lisis conteniendo el vector adenoviral recombinante rescatado mediante purificación en placa.....	60
3-6 Expansión a escala preparativa del Vector Recombinante.....	60
3-7 Purificación del stock viral para su utilización in vivo.....	61
3-7-a Ultracentrifugación en gradiente discontinuo de CsCl.....	61
3-7-b Ultracentrifugación isopícnica de CsCl ($\rho=1,35\text{g/ml}$).....	61
3-7-c Diálisis a través de membrana	62

3-8 Titulación del vector adenoviral recombinante.....	62
--	----

4-Protocolos de transferencia génica

4-1 Transferencia génica in vitro.....	62
4-2 Transferencia génica in vivo.....	63
4-2 a Animales.....	63
4-2 b Cirugía estereotáxica.....	63
4-2 c Eutanasia, perfusión y procesamiento del encéfalo.....	64
4-2 d Técnica de obtención de bocados (punches) de tejido encefálico.....	66

5-Técnicas Histológicas

5-1 Inmunohistoquímica.....	67
5-2 Enzimo histoquímica.....	68

6-Análisis de imágenes

6-1 Organización de las secciones cerebrales.....	69
6-2 Conteo de neuronas TH+.....	69

7- Radioinmunoensayos (RIA).....

8-Análisis estadístico.....

RESULTADOS OBTENIDOS

1- Construcción del Vector Adenoviral Recombinante para IGF-I (RAd IGF-I).....

2- Transferencia Génica con RAd-IGF I in vitro.....

3- Cambios séricos e hipotalámicos asociados a la edad.....

4- Transferencia Génica hipotalámica de RAd IGF- I in vivo.....

4-1 Estudios de expresión a corto plazo

4-2 Estudios de expresión a largo plazo.....	79
<u>5- Terapia Génica hipotalámica de RAd-IGF I in vivo</u>	81
5-1 Terapia Génica a corto plazo (4 días).....	81
5-2 Terapia Génica de mediano plazo (17 días) para IGF-I en el hipotálamo de ratas hembras jóvenes y seniles.....	82
5-2 a Diseño experimental para los estudios in vivo con RAd IGF I.....	82
5-2 b Expresión Génica de mediano plazo con RAd IGF-I y RAd β gal.....	83
5-2 c Impacto del tratamiento sobre la hiperprolactinemia de las hembras seniles...	85
5-2 d Impacto del tratamiento sobre los esteroides sexuales séricos.....	88
5-2 e Impacto de la terapia génica de mediano plazo sobre las poblaciones hipotalámicas TIDA seniles	88
 <u>DISCUSION</u>	93
<u>CONCLUSIONES</u>	98
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	99

RESUMEN

La terapia génica o transferencia de material genético con fines terapéuticos, ha experimentado un desarrollo explosivo en los últimos años. Dentro de este contexto, el desarrollo de abordajes de terapia génica en el sistema neuroendócrino, aunque incipiente, ya ha generado un núcleo de resultados los cuales emergen como un área promisorio de investigación en neuroendocrinología.

El factor de crecimiento insulino similar –I (IGF-I o Insulin- like growth factor I) está emergiendo como una potente molécula neuroprotectora inducida vigorosamente en el sistema nervioso central en situaciones de injuria o enfermedad. En la presente tesis se construyó un vector adenoviral recombinante (RAd- IGF1) que expresa el gen codificante para IGF-I de rata, utilizándose para implementar terapia génica neurorestauradora en el hipotálamo de ratas hembras seniles. Dichos animales poseen una disfunción dopaminérgica hipotalámica asociada a su condición senil y como consecuencia una hiperprolactinemia crónica concomitante al desarrollo de una hiperplasia hipofisaria lactotropa.

Cultivos celulares neuronales (N2a) y gliales (B92) incubados por tres días con RAd-IGF1 sobreexpresaron IGF-I comparadas con células incubadas con un vector adenoviral recombinante control que expresa β -galactosidasa (RAd- β gal). En ratas hembras jóvenes se observó que después de una única inyección bilateral intrahipotalámica (1,5 μ l por lado) ocurre una sobreexpresión hipotalámica de IGF-I cuya duración es de unos 50 días. Este fenómeno no se observó en controles inyectados con RAd- β gal. En una etapa subsiguiente se implementó terapia génica restauradora con IGF-I en ratas hembras jóvenes (5 meses) y seniles (28 meses), los cuales recibieron una única inyección intrahipotalámica de 3×10^9 unidades formadoras de placas (pfu) de RAd- β gal o RAd- IGF1 (según correspondan a grupos controles o experimentales respectivamente) y fueron sacrificadas 17 días posteriores a la inyección. En los animales jóvenes ninguno de los vectores modificó sus valores séricos de prolactina (PRL) pero en las ratas seniles inyectadas con RAd- IGF1 pudo observarse una clara reversión de su hiperprolactinemia. El análisis morfométrico reveló un aumento significativo del número total de células tirosina hidroxilasa (TH) positivas (neuronas dopaminérgicas) en el hipotálamo de los

animales seniles experimentales comparados con los animales seniles controles (5.874 ± 486 y 3.390 ± 498 , respectivamente). Los resultados obtenidos a lo largo de la presente tesis indican que la terapia génica con RAd-IGF-I en ratas hembras seniles es altamente efectiva para revertir la neurodegeneración hipotalámica dopaminérgica que estos animales presentan. Estos hallazgos abren promisorios horizontes para la utilización de IGF-I como molécula neuroprotectora.

OBJETIVOS

Objetivos generales

El presente plan de tesis se enmarca en un proyecto que apunta a construir y emplear vectores adenovirales conteniendo genes para factores neurotróficos, a fin de aplicar estas herramientas biotecnológicas *in vivo* al sistema hipotálamo-adenohipofisario de la rata.

Objetivos específicos

I. Se construirá un vector adenoviral recombinante para el gen del IGF-I. Luego de evaluar su funcionalidad en cultivos celulares, será utilizado en parte de los estudios referidos al objetivo III.

II. Poner a punto la metodología de transferencia génica en hipotálamo utilizando un adenovirus portador del gen reporter de la β galactosidasa de *E. coli* (ver sección de Métodos para mayores detalles). Se pondrá también a punto la metodología de conteo de neuronas hipotalámicas que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH), un marcador de neuronas catecolaminérgicas.

III. Una vez puesta a punto la metodología de transferencia de genes y técnicas asociadas, se comenzará con el protocolo específico de terapia génica, empleando adenovirus portadores del gen del IGF-I a nivel hipotalámico a fin de reconstituir la función dopaminérgica tuberoinfundibular en animales seniles .

INTRODUCCION

1- Impacto del envejecimiento en los sistemas neuronales dopaminérgicos del Sistema Nervioso Central

1-1 Generalidades

Con el paso del tiempo, las células que conforman los seres vivos sufren un deterioro morfofuncional progresivo que las conduce a la muerte en el proceso irreversible denominado envejecimiento. Participan en este proceso dos componentes: uno genético y otro ambiental (Peinado MA, 1998; Jazwinsky SM, 1998). El envejecimiento está asociado a la aparición y manifestación de enfermedades neurodegenerativas tanto en animales de laboratorio como en humanos. Varios autores han postulado que el envejecimiento cerebral implica pérdida de conectividad nerviosa (Jones DG y Calverley RKS, 1992) y disminución de la capacidad autorestaurativa de esta conectividad. En el tejido nervioso joven, circundando una zona de pérdida neuronal, se ha observado un aumento del árbol dendrítico. Dicho fenómeno se encontró alterado en el tejido nervioso de animales seniles (Cotman CW y Anderson KJ, 1988).

Las poblaciones celulares gliales (astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales) son también de gran importancia en el proceso de envejecimiento debido a sus funciones de vital influencia sobre las neuronas, tales como el suministro de glucosa y el aporte de factores de crecimiento. También dentro de sus numerosas funciones, las células gliales eliminan el exceso de determinados neurotransmisores excitatorios del espacio interneuronal, los cuales en demasía resultan tóxicos (Thomas RJ, 1995).

En animales seniles se ha encontrado un proceso de hipertrofia e hiperplasia de astrocitos (Amenta F et al., 1998) observados también en procesos patológicos de daño tisular. (Streit WJ et al., 1999). Estas alteraciones en la línea astrocítica originada por la activación de células microgliales se observa con posterioridad a lesiones o a distintas enfermedades neurodegenerativas (Davis EJ et al, 1994). La exacerbación en la respuesta

de las células de la microglia cobra interés en la patología de la enfermedad de Parkinson la cual se caracteriza por una importante degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales del mesencéfalo. Esta es la región cerebral que posee más células microgliales (Lawson LJ et al., 1990) lo cual ha llevado a la hipótesis de que la ocurrencia de repetidos procesos de activación microglial en respuesta a agentes inflamatorios a lo largo de la vida, sería un rol etiológico relevante en la génesis de esta enfermedad.

En seres humanos, la enfermedad de Parkinson afecta al 0,1-0,3% de la población mayor de 50 años, constituyendo un claro reflejo de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas frente al envejecimiento (Moussa BH et al., 1997).

Múltiples factores participan en el proceso de deterioro celular asociado a la edad, dentro de los que no se puede obviar a los radicales libres, por su acción tóxica a nivel neuronal. Estos radicales libres oxidan directamente a macromoléculas tales como lípidos (fundamentalmente ácidos poliinsaturados de membranas), proteínas (principalmente enzimas) o ácidos nucleicos (con el riesgo de mutaciones) y llevan a la célula a la muerte por apoptosis (Douglas Wallace and Simon Melov, 1998). Se podría decir que tanto a nivel del organismo completo como en el caso de sistemas complejos como el sistema nervioso central (SNC), la senescencia es la consecuencia del cumplimiento de un programa genético que comienza a ejecutarse con el desarrollo (etapa prenatal y postnatal), que continúa en el adulto y culmina, tras la etapa reproductiva, con la vejez (Kirkwood TB, 1998).

1-2 Biosíntesis de dopamina

Las neuronas dopaminérgicas del SNC están entre las células más susceptibles al daño generado por el proceso de envejecimiento. Este riesgo se potencia aún más al ser la dopamina la catecolamina más abundante en el cerebro.

Este neurotransmisor se sintetiza a partir del aminoácido aromático L-tirosina luego de ser captado por las neuronas. A continuación es hidroxilado en el anillo aromático para producir L-Dopa (L-3,4-Dihidroxifenilalanina) (Figura 1-Introducción). Esta reacción es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) la cual requiere como cofactor a

tetrahidrobiopterina. Posteriormente la L-Dopa es descarboxilada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos y piridoxal fosfato como cofactor, generando el neurotransmisor DOPAMINA el cual se acumula en vesículas de secreción. Esta vía de biosíntesis es regulada por la enzima TH, la cual debe conservar su conformación activa (la que depende del estado de fosforilación de la misma) y estar presente en cantidad adecuada. Además la TH es inhibida por la dopamina, lo cual genera un ciclo de autorregulación en la vía de biosíntesis (Zigmond, et al. 1999).

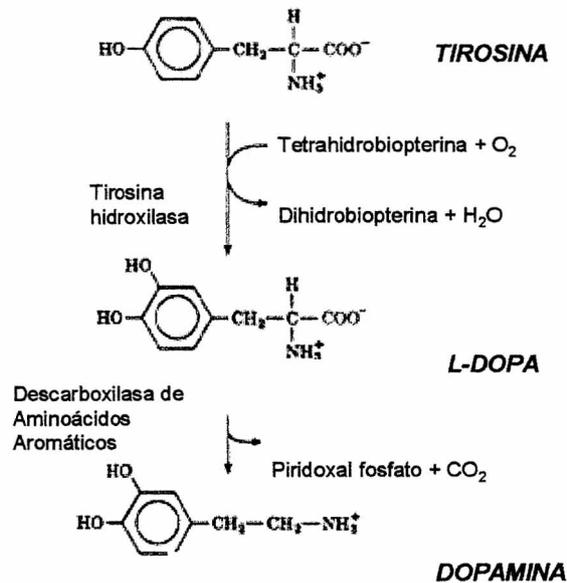


Figura 1-Introducción.- Síntesis de Dopamina

1-3 Receptores Dopaminérgicos

La dopamina ejerce su acción uniéndose a receptores específicos de membrana los que pertenecen a la familia de receptores acoplados a Proteína G con siete dominios transmembrana. Las regiones génicas que los codifican están altamente conservadas. Hay cinco tipos de receptores dopaminérgicos en humanos: D1, D2, D3, D4 y D5. La unión de la dopamina a dichos receptores regula la actividad de la enzima adenilato ciclasa vía

Proteína Gi (la cual cataliza la conversión de ATP a AMPc). Los receptores D2 y sus derivados D3 y D4 inhiben la enzima adenilato ciclasa provocando la disminución del AMPc celular; mientras que la activación de los receptores D1 y D5 genera un aumento intracelular del AMPc como consecuencia de la activación de dicha enzima (**Kandel et al., 2000 - Capítulos 15 y 60-**).

Todos estos receptores contienen sitios de fosforilación y palmitoilación en su extremo C-terminal, los cuales participan en la formación de 4 loops intracelulares dando origen a isoformas estructurales de estos receptores.

El receptor D2 se encuentra codificado por un gen compuesto por 8 exones, 7 de los cuales son codificantes para 415 a.a. El sexto exón codifica para una inserción de 29 a.a. que por corte y empalme alternativo es capaz de generar las isoformas D2 L (long) o D2 S (short). La isoforma D2 L es la que más abundantemente se expresa y la que posee más afinidad para unir proteína G con respecto a D2 S. Este receptor D2 es el que se expresa predominantemente en el tejido cerebral con una localización presináptica en contraste con la familia de receptores D1 de localización exclusivamente postsináptica. Mas allá de su ubicación cerebral, y siendo relevante para el presente trabajo de tesis, el receptor D2 también se encuentra localizado en retina, riñón, sistema vascular e hipófisis (**Picetti R et al, 1997; Vallone et al, 2000**).

1-4 Circuitos dopaminérgicos del Sistema nervioso central

La dopamina es el principal transmisor monoaminérgico en el SNC y como se mencionó anteriormente, las neuronas que la sintetizan son células muy sensibles al deterioro ocasionado por la edad. Durante cada década en el proceso normal de envejecimiento del adulto, se pierde un cuatro por ciento de la población dopaminérgica. Pero en distintas patologías seniles la pérdida es mucho mayor con la consecuente manifestación de diferentes enfermedades neurodegenerativas (**Korell y Tanner, 2004**).

Los sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo o cerebro medio están constituidos por tres grandes circuitos (no corresponden a áreas estudiadas directamente en el presente trabajo de tesis motivo por el cual no se profundizará en ellas); mientras que en el diencéfalo existen dos circuitos dopaminérgicos que se describirán en mayor detalle.

1-4 a Vías dopaminérgicas mesencefálicas

Las vías mesencefálicas representan el 80% del total de neuronas dopaminérgicas del cerebro y se las conoce también como sistemas largos. Estos cuerpos neuronales dopaminérgicos mesencefálicos se encuentran agrupados principalmente en la Sustancia Nigra parte compacta (SNpc), Area Tegmental Ventral (VTA) y se encuentran en menor cantidad en la Sustancia Nigra parte reticular (SNpr) y Sustancia Nigra parte Lateral (SNpl) cuya población es predominante GABAérgica. (Zigmond et al.,1999-Capítulos 8 y 34-). Es posible clasificar estas vías de la siguiente manera:

1- El *trayecto nigroestriatal* (engloba la mayoría de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo) posee sus cuerpos celulares en SNpc y proyecta axones al cuerpo estriado (caudado y putamen).

La SN (incluyendo parte reticular y parte compacta), el núcleo estriado, el globus pallidus y los núcleos subtalámicos, constituyen los cuatro núcleos principales que forman los ganglios basales. Estos ganglios basales juegan un rol principal en los movimientos voluntarios normales. No presentan un ingreso o egreso de conexiones directas con la médula espinal sino que reciben impulsos desde la corteza cerebral y el tálamo y vía éste último envían nuevamente la señal hacia la corteza prefrontal, premotora y motora. Observaciones clínicas sugieren que los ganglios basales participan en el control de los movimientos y en los desórdenes relacionados a ellos (enfermedad de Parkinson, Huntington, hemiballismus). Estas enfermedades son de importancia en la clínica neurológica, sobre todo el mal de Parkinson, con su depleción dopaminérgica en el núcleo estriado, por ser la patología más común con una incidencia bastante alta. Además, fue ésta la primer enfermedad del sistema nervioso en identificarse como un problema de origen molecular causado por un defecto específico en el metabolismo de un transmisor.

La SNpc proyecta al núcleo estriado axones dopaminérgicos que actúan en este circuito por vía directa (facilitadora de los movimientos por interacción dopaminérgica con receptores D1) y por una vía indirecta (inhibidora de los movimientos por la interacción con receptores D2). Estas vías se encuentran en un balance crítico regulando la función del sistema motor del organismo (Kandel et al., 2000 -Capítulo 43-). La función normal de los ganglios de la base es inhibir constantemente, a nivel del tálamo cortical, los movimientos voluntarios del músculo esquelético. Este estado basal se modifica en respuesta a estímulos periféricos facilitando el movimiento. Los cambios en estas vías de regulación por disminución de la dopamina en el núcleo estriado, generan baja actividad en el paso indirecto vía receptores D2 con la aparición de los signos característicos de la enfermedad de Parkinson, observándose movimientos espontáneos descontrolados donde se encuentra alterada la iniciación voluntaria de dichos movimientos (aquinesia), reducida la amplitud y velocidad de los mismos (bradiquinesia) con temblor en reposo (Ebadi y Pfeiffer, 2004 – Capítulos 3 y 16-).

2- *Circuito mesolímbico* . Se origina en el cerebro medio desde el VTA e inerva el núcleo estriado ventral (núcleo accumbens), el tubérculo olfatorio (OT) y otras regiones del sistema límbico. Es importante en la motivación y emoción del individuo.

3- *Circuito mesocortical* comienza su trayecto desde el VTA e inerva diferentes regiones de la corteza frontal. Este circuito participa en algunos aspectos de la memoria y del aprendizaje.

Estos últimos dos circuitos se encuentran afectados en la esquizofrenia, sin manifestar alteración alguna en el sistema motor del organismo.

En la siguiente figura (**Figura 2-Introducción**) se pueden observar esquemáticamente en cortes sagitales, los diferentes circuitos dopaminérgicos del encéfalo.

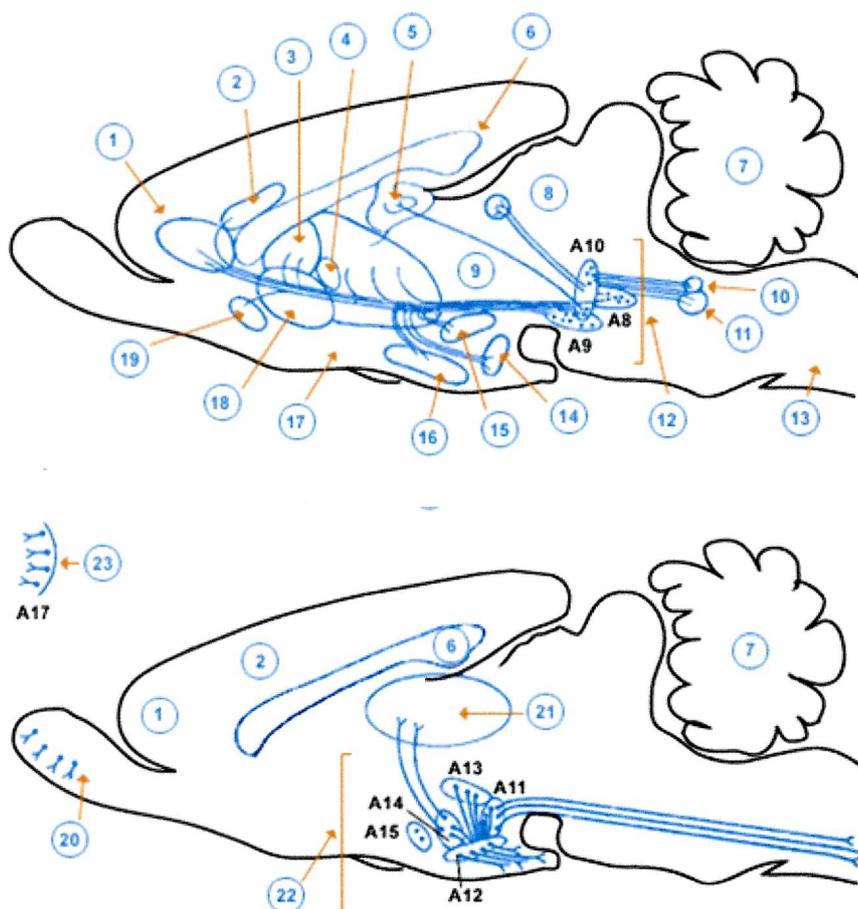


Figura 2-Introducción.- Sistemas DA del mesencéfalo y diencefalo: Corteza cerebral región prefrontal (1), Corteza cingulada anterior (2), Septum (3), Núcleo lecho de la estria terminal (4), Hipocampo (5), Cuerpo calloso (6), Cerebelo (7), Habénula (8), Cuerpo estriado (9), Locus ceruleus (10), Núcleo parabraquial lateral (11), Areas A₈, A₉, y A₁₀, origen de vías dopaminérgicas mesencefálicas (12), Bulbo raquídeo (13), Corteza entorinal (14), Amígdala (15), Corteza piriforme (16), Tubérculo olfatorio (17), Núcleo accumbens (18), Corteza pecirinal (19), Bulbo olfatorio (20), Tálamo (21), Areas A₁₁, A₁₂, A₁₃, A₁₄, y A₁₅, origen de vías dopaminérgicas hipotalámicas (22), Retina (23).

1-4 b Vías dopaminérgicas diencefálicas

Los circuitos dopaminérgicos diencefálicos pertenecen al hipotálamo, el cual se extiende bajo el tálamo y comprende la zona gris que rodea al tercer ventrículo. Esta estructura puede dividirse en cuatro regiones principales organizadas rostro-caudalmente

en: área preóptica, hipotálamo anterior, hipotálamo medio e hipotálamo posterior (**Palkovits, 2000**).

Los circuitos dopaminérgicos (**Figura 2, parte inferior**) comprendidos en el diencefalo pueden clasificarse de la siguiente manera:

--**Sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (TIDA)**, perteneciente al hipotálamo medio basal (MBH). En este circuito los cuerpos neuronales DA se encuentran en el núcleo arcuato (ARC), región también denominada área A12 según la nomenclatura de Dahlström y Fuxe, (**Dahlström y Fuxe 1964**) y en la región periarcuata, con proyección de sus axones a la zona externa de la Eminencia Media (ME) (**Figura 3**). Aquí las vesículas de las terminales axonales secretan su neurotransmisor a los plexos capilares del sistema porta hipofisario logrando de esta forma acceder por vía hemática a la glándula pituitaria (**Zuccolilli, 2003**).

--**Sistema dopaminérgico periventricular (PeVDA)** formando parte del hipotálamo anterior, con localización de sus neuronas DA en los núcleos paraventricular y periventricular del hipotálamo (región denominada también A14 según nomenclatura de Dahlström y Fuxe. Estas neuronas proyectan sus axones pasando a través de la porción interna de la ME para terminar en los lóbulos neural e intermedio de la hipófisis (**Figura 3- Introducción**).

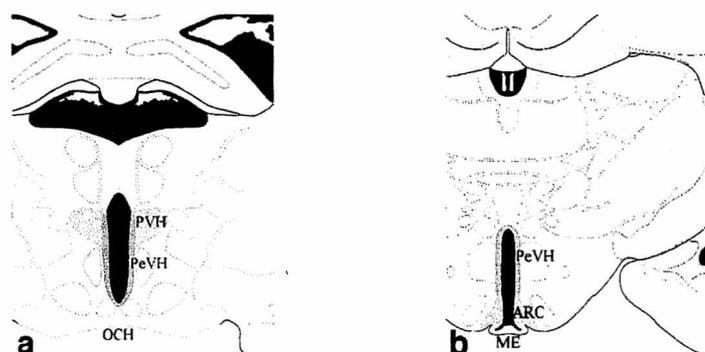


Figura 3-Introducción.- Localización de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas de los sistemas TIDA y PeVDA.

3a) Hipotálamo anterior- PVH: núcleos paraventriculares; PeVH: núcleo periventricular; OCH: quiasma óptico.

3b) Hipotálamo medio- PeVH: núcleo periventricular; ARC: núcleo arcuato; ME: eminencia media.

1-5 Eje Hipotálamo- Hipofisario / Regulación lactotropa

Se describe al hipotálamo como el centro integrador esencial para la supervivencia del organismo y la reproducción de la especie. Sistemas regulatorios e interacciones complejas emergen de este centro. El hipotálamo se comunica con el sistema de órganos periféricos por conversión de señales sinápticas en humorales, participando en esta interacción neuronas neurosecretorias que regulan en forma compleja la fisiología del organismo. En esta regulación neurohumoral el hipotálamo libera péptidos a la circulación periférica y éstos ejercen su acción fisiológica en varios sistemas (Zigmond et al., 1999).

La regulación hipotalámica sobre las células lactotropas hipofisarias es ejercida a través de la secreción de dopamina al sistema porta hipofisario (Figura 4-Introducción).

Los axones dopaminérgicos se proyectan hacia la capa externa de la eminencia media, la cual se encuentra en íntimo contacto con el plexo capilar primario del sistema porta hipofisario. Aquí se produce la liberación de dopamina por parte de las vesículas que la almacenan. De esta forma el neurotransmisor ingresa al torrente circulatorio hipofisario ejerciendo un control tónico inhibitorio sobre la secreción de prolactina (PRL) por parte de las células lactotropas adenohipofisarias, como así también inhibiendo la proliferación de las mismas (Sarkar DK et al., 1982).

Las células lactotropas expresan el receptor dopaminérgico D2 en sus membranas plasmáticas. Por intermedio de él se desencadenan las cascadas de señalización intracelulares que regulan la función lactotropa (Vallone et al., 2000).

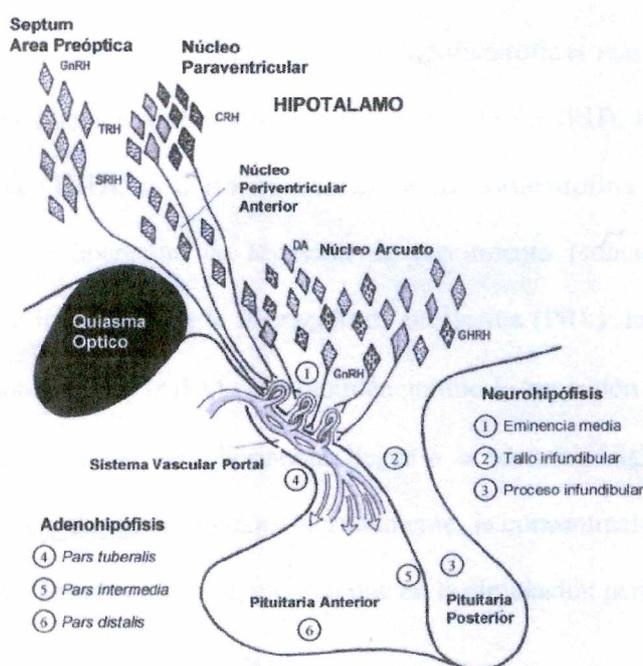


Figura 4-Introducción.-
Sistema porta hipofisario- regulación neurohumoral

1-6 Modelo de estudio

El modelo principal de trabajo en la presente tesis es el de animales seniles que manifiestan una progresiva neurodegeneración hipotalámica dopaminérgica, con la consecuente pérdida de neuronas y disfunción de las mismas en los distintos núcleos del hipotálamo medio anterior y basal (**Sánchez HL et al, 2003**). Esta pérdida excesiva de neuronas TIDA durante el envejecimiento desencadena una hiperprolactinemia progresiva (**Goya RG et al, 1990**) y subsecuente el desarrollo de prolactinomas pituitarios (**Console G et al., 1997**). Este tipo de prolactinomas con origen en lesiones neuronales en diencéfalo genera alteraciones funcionales en el eje hipotálamo-PRL y se ha visto también en humanos, como patología asociada, en pacientes parkinsonianos manifestando su clara debilidad funcional en áreas cerebrales dopaminérgicas (**Franceschi M et al, 1988**). Resultan en la actualidad de gran interés los factores neurotróficos capaces de restaurar o prevenir la neurodegeneración dopaminérgica. Dentro de los más estudiados cabe mencionar al factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) (**Le Roith D. et al., 1997**) y el emergente factor de crecimiento insulino símil I.

El objetivo central del presente trabajo de tesis fue evaluar la efectividad de la terapia génica para IGF-I (mediante vectores adenovirales recombinantes) como estrategia restauradora de la función TIDA en ratas hembras seniles crónicamente hiperprolactinélicas.

2- Factores de Crecimiento / IGF-I

2-1 Generalidades

La mayoría de los factores de crecimiento efectúan otras acciones además de la regulación del crecimiento y la división celular. Pueden controlar la supervivencia, la migración o el funcionamiento de las células dependiendo de las circunstancias (Alberts et al., 2004). En el sistema nervioso, muchos de estos factores tienen una manifiesta acción trófica que promueve la sobrevivencia neuronal, la diferenciación y la neuritogénesis, disminuyendo además la tasa de muerte celular. A partir de la combinación de un factor con su receptor celular se activa una cascada de segundos mensajeros que inducen la proliferación y diferenciación celular, ejerciendo una acción anti-apoptótica. Este perfil protector ante la injuria, hoy se denomina efecto neuroprotector. Las acciones mencionadas se explicarían en base a que los factores de crecimiento actuarían sobre CREB que estimularía la transcripción de los genes Bcl-XL y Bcl-2, los cuales protegen la integridad de las mitocondrias (preserva in situ al citocromo C) previniendo la apoptosis. (La familia CREB consiste en una serie de factores que activan la transcripción génica en respuesta a señales extracelulares como son los factores tróficos.)

Los factores neurotróficos son polipéptidos que ejercen su acción a través de la unión y activación de receptores celulares específicos de superficie conocidos como receptores de tirosin quinasa (trk). Dichos factores poseen un importante rol en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de neuronas del SNC. Estos factores podrían proveer neuroprotección a poblaciones neuronales específicas por inhibición de mecanismos que inducen a la célula a sufrir apoptosis. Estos factores neurotróficos están generando un creciente interés en cuanto a su aplicación clínica con el propósito de prevenir o reducir la pérdida neuronal y la atrofia cerebral observada en algunos desórdenes neurodegenerativos en humanos, y de facilitar la recuperación de neuronas dañadas en el proceso normal de envejecimiento (Carri et al., 1999 –Capítulo 4-).

Los factores neurotróficos pertenecen al amplio grupo de factores de crecimiento y son moléculas que afectan de manera trófica a células y tejidos regulando el crecimiento, la

diferenciación y la sobrevivencia por medio de mecanismos autócrinos y parácrinos (**Connor B. and Dragunow M. 1998**). Existen distintas familias según sus receptores, relaciones estructurales y funcionales. Han recibido sus nombres como indicación sintética de la acción que poseen, como es el caso de los factores de crecimiento y transformadores (TGF), o según de donde derivan como en el caso del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) o en referencia a sus estructuras químicas como el caso del factor de crecimiento insulino similar I (IGF-I).

Los factores de crecimiento como la neurotrofina 3 (NT-3) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) promueven la sobrevivencia/regeneración de neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales en la enfermedad de Parkinson experimental (**Connor B. and Dragunow M. 1998**). En 1993, el GDNF, un glicopéptido de 211 aminoácidos, fue purificado y clonado (**Lin, LFH et al., 1993**). El GDNF es un factor trófico DAérgico potente y específico que promueve la recaptación de dopamina, la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas embrionarias y la regeneración de neuronas dopaminérgicas en ratones tratados con la neurotoxina dopaminérgica 1 metil-4fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (**Tomac A, et al., 1995**) y en ratas tratadas con la toxina 6-OH dopamina (**Lapchak P, et al., 1997**). Estas propiedades neuroprotectoras del GDNF han generado gran interés en el desarrollo de estrategias de terapia génica basadas en el GDNF para tratar la enfermedad de Parkinson. Además se ha demostrado que la inyección estereotáxica de vectores adenovirales o adenoasociados portadores del gen para GDNF en el núcleo estriado o en la sustancia nigra, es capaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas nigrales de la acción tóxica de la toxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina (**Mandel RJ et al., 1997**).

Estos resultados son prometedores en lo que concierne a la posibilidad de lograr una acción protectora similar en neuronas hipotalámicas TIDA por medio de vectores virales que expresen genes para otros factores con potencial neuroprotector como es el caso del IGF-I que es vigorosamente inducido en el SNC luego de diferentes agresiones tales como la isquemia (**Beilharz et al., 1998**), el daño cortical (**Li et al., 1998; Walter et al., 1997**) o lesiones de la médula espinal (**Yao et al., 1995**).

2-2 Identificación y distribución de los factores de crecimiento insulino similares (IGFs)

El sistema de los IGFs constituye una familia de péptidos estructuralmente relacionados con la insulina, que participan en diferentes aspectos de la regulación de la función celular y tisular, como así también en el desarrollo y el crecimiento corporal.

La familia de los IGFs posee la capacidad de ejercer su acción como hormona circulante o localmente como factor de crecimiento autócrino y parácrino. A nivel sistémico existe un estrecho vínculo de acción con la hormona de crecimiento (GH). Numerosos factores participan en el crecimiento postnatal desempeñando el eje GH-IGF-I un rol esencial en este proceso. El crecimiento normal postnatal es dependiente de una correcta secreción pulsátil de GH a partir de células somatotropas hipofisarias. Esta secreción es regulada por factores intermediarios dentro de los cuales el IGF-I es el más conocido e intensamente estudiado. Cuando los niveles circulantes de GH son bajos, se encuentran también disminuídos los niveles de IGF-I, y cuando son elevados los valores de GH se acompañan de un aumento concomitante del IGF-I. Los principales efectos de GH sobre el crecimiento son dependientes de la expresión de IGF-I hepático (**Le Roith D. et al., 2001**).

Dentro de los efectos a nivel sistémico se pueden mencionar: A nivel óseo, la estimulación de la actividad y diferenciación a osteoclastos y el incremento de la masa ósea. Sobre el tejido adiposo actúa con propiedades efectoras similares a la insulina, induciendo un incremento de la lipólisis, inhibiendo la lipoprotein lipasa, disminuyendo el transporte de glucosa y disminuyendo también la lipogénesis. Sobre músculo, aumenta el transporte de aminoácidos e incrementa la retención de nitrógeno.

Además de actuar como un eje neuroendócrino, la hormona de crecimiento y el IGF-I poseen acciones independientes. Esto se pone de manifiesto en los distintos síndromes clínicos observados en el crecimiento y al notar que no todos los efectos a nivel sistémico producidos por GH son reproducidos por IGF-I. Ambos participan de igual medida en el crecimiento. El hígado es la principal fuente de IGF-I y aporta la mayor parte del péptido circulante aunque también los distintos tejidos poseen una producción local regulada de modo autócrino o parácrino, existiendo una expresión diferencial de los receptores de IGF-

I. En distintos modelos experimentales se demostró el rol activo de los IGFs en la regeneración de tejidos; por ejemplo, en la isquemia de músculo esquelético, en procesos de cicatrización y en la prevención de la pérdida de masa muscular asociada a la edad (Barton –Davis et al., 1998).

El IGF-I en particular, estimula la supervivencia celular, el metabolismo celular y colabora con otros factores de crecimiento estimulando la proliferación celular. Regula la progresión de muchas células en su ciclo celular favoreciendo el paso desde la fase presintética (G1) del ciclo a la fase de síntesis de ADN (S1) (Alberts, B et al., 2004).

La familia de los IGFs está constituida por 2 polipéptidos con actividad metabólica similar a la insulina, (Figura 5-Introducción) que han sido identificados como IGF-I (70 aminoácidos) e IGF-II (67 aminoácidos).

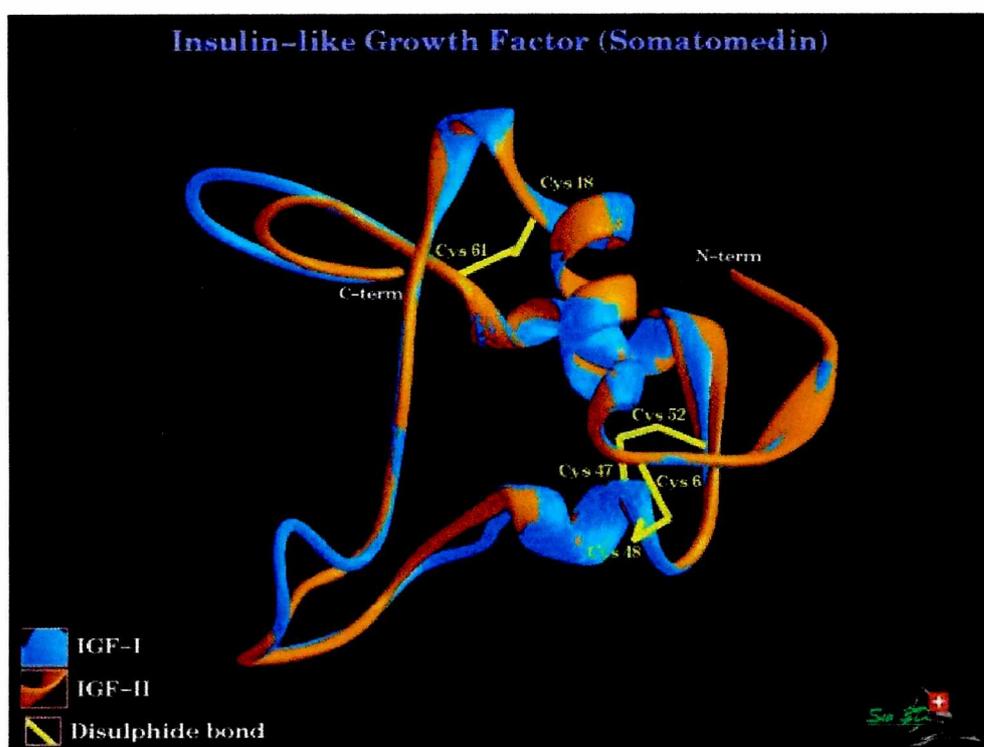


Figura 5-Introducción.- Representación correspondiente a las estructuras de IGF I e IGF II.

Los IGFs tienen similar estructura primaria de aminoácidos (comparten el 50% de homología), receptores de unión y actividad biológica que la insulina. Se los ha identificado tanto en rata como en humanos, adultos y en desarrollo (Cortizo AM y McCarthy A., 1998). Poseen dos cadenas (dominios A y B) conectadas por puentes disulfuro. El péptido conector C es una región de 12 a.a. para IGF-I y de 8 a.a. para IGF-II.

Los genes humanos y de rata que codifican para los IGFs son expresados diferencialmente en embriones, fetos, niños, adultos e individuos seniles. El gen para IGF-I humana se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 12 y contiene 6 exones (Figura 6-Introducción). Presumiblemente por corte y empalme del gen para IGF-I entre los exones 5 y 6 se generan 2 ARNm que darían origen a las formas A y B del péptido precursor, que luego se procesan a una única forma molecular de IGF-I nativa. El ARNm del precursor A está codificado por los exones 1, 2, 3, 4 y 6; mientras que el ARNm para el precursor B es codificado por los exones 1, 2, 3, 4 y 5 (Rotwein P, 1991).

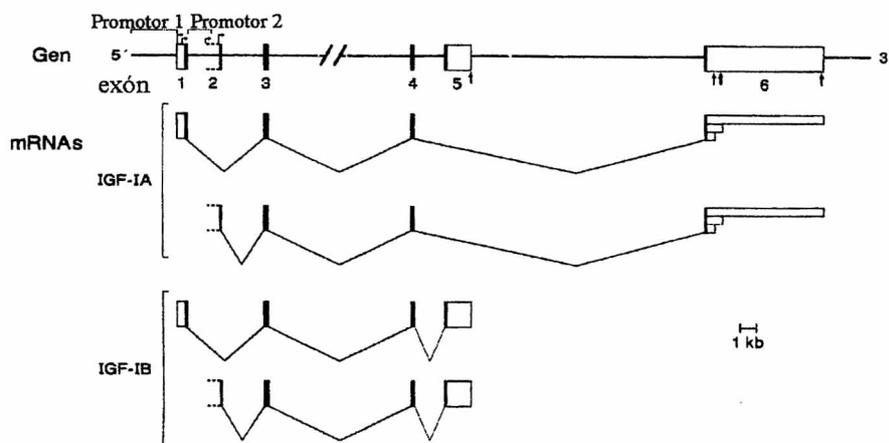


Figura 6-Introducción.- Estructura y expresión del gen humano que codifica para IGF-I. (Rotwein P., 1991)

El gen para IGF-II humana se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11, y contiene 9 exones. Combinaciones de estos exones también genera diferentes ARNm dando origen a distintos subtipos de IGF-II.

Estas múltiples especies de ARNm para el precursor de ambos genes permite una expresión diferencial tejidospecífica. Los mecanismos que regulan la expresión de dichos genes son muy complejos, e incluyen la existencia de múltiples promotores, inicios de transcripción heterogéneos dentro de estos promotores, splicing alternativo de varios exones, poliadenilación diferencial de ARNm como así también diferentes estabilidades de esos ARNm (Adamo M. et al., 1994; Brissenden JE et al., 1984).

En la etapa fetal, el principal factor de crecimiento involucrado es el IGF-II, cuyos niveles luego decaen en un 50% en el adulto (en rata o ratón descienden a niveles no detectables a diferencia de los seres humanos). El IGF-I también participa en la etapa fetal pero cobrando un rol principal en el crecimiento postnatal con su doble acción dependiente e independiente de GH. Luego de la adolescencia, los niveles de IGF-I sistémico muestran un progresivo descenso, el cual podría ser responsable del decrecimiento de la masa muscular y la osteoporosis características de la vejez (Larsen et al., 2003 – Capítulo 23-).

2-3 Proteínas unidoras de IGFs

Los IGFs circulan unidos a proteínas específicas llamadas Proteínas unidoras de IGF (IGFBPs) las que modifican en forma estimulatoria o inhibitoria la acción biológica de los IGFs. Los IGFs circulan en niveles del orden de los nanomoles, su unión a IGFBPs les prolonga la vida media y los transporta hasta la superficie de sus células blanco para facilitar la interacción con sus receptores celulares apropiados (Rechler M. y Clemmons D., 1998).

Las IGFBPs son glicoproteínas ácido-estables de entre 22 y 31 kDa y seis variantes han sido identificadas. La IGFBP 3 une aproximadamente el 90% de los IGF I y II circulantes formando un complejo ternario (IGFBP3-IGF-subunidad ácido lábil) muy estable de 150kDa.

En lo que concierne al sistema nervioso, los IGFs aparentemente son sintetizados localmente por células de la glia y neuronas.

Las IGFBPs modulan la acción de los IGFs formando complejos de alta afinidad con ellos (entre uno a dos órdenes de magnitud mayor que la afinidad por sus receptores) tomándolos en muchas circunstancias inactivos. Tal es la eficacia de esta regulación que desplazando estos pools endógenos de IGFs unidos a sus IGFBPs se ha logrado elevar los niveles de IGF libre obteniendo efectos neuroprotectores comparables a la administración de IGF exógeno (Loddick S. et al., 1998).

2-4 Receptores de IGFs / Conceptos generales

Se han sido identificados dos tipos de receptores para IGFs: el tipo 1 y el tipo 2. El receptor tipo 1 es estructuralmente similar al receptor de insulina y es reconocido por IGF I con alta afinidad y también por IGF II, y en menor medida por insulina. El receptor tipo 2 se une predominantemente a IGF II con alta afinidad, a IGF-I con baja afinidad y no es reconocido por la insulina.

El receptor de IGF tipo I consiste en una glicoproteína de 330-350 kDa conformada por dos subunidades α y dos subunidades β conectadas por puentes disulfuro para formar un complejo heterotetrámero de receptor funcional β - α - α - β (LeRoith D. et al., 1992). La subunidad α es totalmente extracelular con un peso molecular de aproximadamente 115 kDa y contiene dominios ricos en cisteínas lo cual es crítico para la unión de IGF I o II. La subunidad β posee una corta región extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular tirosin quinasa con un sitio de unión para ATP. Luego de su unión al dominio extracelular, el IGF I estimula intracelularmente la actividad de la proteína quinasa, induciendo la autofosforilación de múltiples residuos tirosina, entre ellos de su propia subunidad β , como así también del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) activando a sus proteínas de señalización intracelulares asociadas como son PI 3-quinasa, Syp, Fyn y Nck (**Figura 7-Introducción**). Estas proteínas interactúan con otros sustratos intracelulares los que activan cascadas de proteínas quinasa incluyendo Raf y MAP quinasa. Estas proteínas a su vez activan otros elementos entre los que se incluyen factores de transcripción nucleares. En síntesis, este complejo mecanismo de cascada de señalizaciones generado específicamente por IGF-I conduce a la activación de componentes

citoplasmáticos y nucleares los que regulan en forma positiva el crecimiento y la función de la célula.

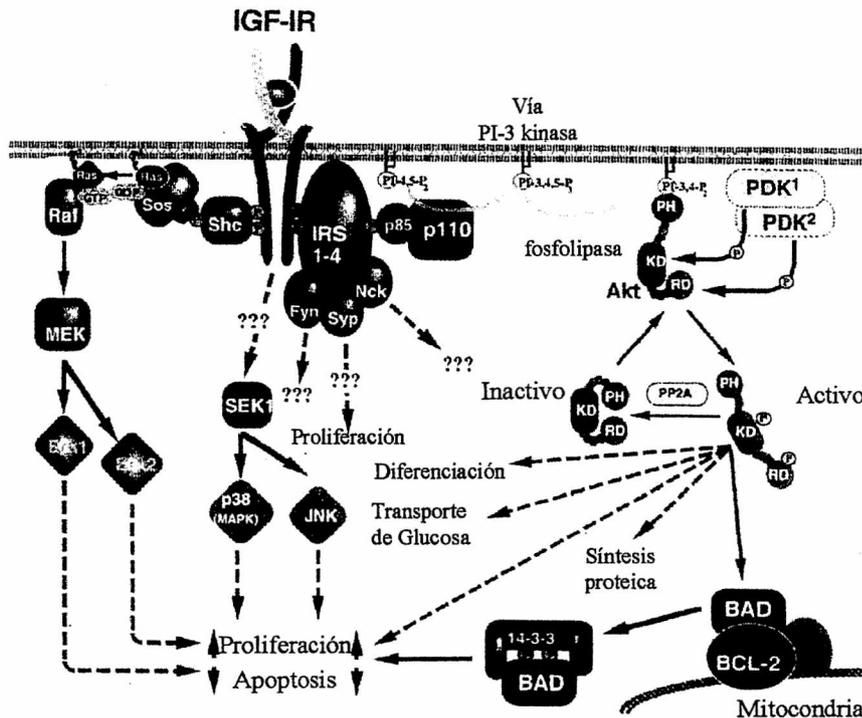


Figura 7-Introducción.-Modelo de cascada de señales de transducción para el receptor de IGF-I. (Le Roith et al., 2001).

2-5 Receptores de IGF-I en el sistema nervioso

Los receptores cerebrales de IGF-I juegan un rol primordial en las funciones tróficas y metabólicas básicas celulares en el SNC. Los IGFs secretados por los plexos coroideos a la circulación del fluido cerebroespinal ejercen su efecto por intermedio de dichos receptores.

El efecto trófico brindado por las IGFs, en cultivos de tejidos neuronales, es mediado por receptores tipo 1. Los receptores cerebrales y los receptores periféricos para IGFs poseen igual estructura peptídica pero difieren en el grado de glicosilación. Aparentemente esto constituiría la base para las funciones específicas mediadas por esta familia de receptores

en el cerebro (LeRoith D., et al 1992). Si bien los linajes neuroepiteliales poseen niveles uniformes y estables de expresión del receptor de IGF-I tipo I, se encontraron altos niveles de los mismos (tanto en adultos como en neonatos) en el hipocampo, amígdala, gyrus parahipocampal, y bajos en cerebelo, corteza y núcleo caudado.

Se ha descrito la existencia de dos patrones distintos en la expresión de los receptores de IGF-I (R IGF-I): En el desarrollo temprano hay un patrón estable y uniforme en la expresión del gen (ARNm) de R IGF-I en todos los linajes de células neuroepiteliales. Luego en el curso de la diferenciación y etapa postnatal del desarrollo existe un aumento en los niveles de expresión de R IGF-I en forma local en distintas regiones (regiones con proyecciones sensoriales y cerebelares) fenómeno que se acompaña de un aumento en la expresión de IGF-I en estos mismos grupos neuronales (Bondy C. et al., 1992).

2-6 IGF-I como factor neurotrófico

2-6 a Generalidades

Se ha observado, en células neuronales y gliales embrionarias, la existencia de ARNm para IGF-I, mientras que ARNm para IGF-II se observó solamente en células de la glía. En cuanto a la distribución de IGF-I en el SNC, se detectaron neuronas inmunorreactivas para IGF-I en el bulbo olfatorio, la neocorteza, el hipocampo, la amígdala, el cuerpo estriado, los núcleos del diencefalo y la sustancia nigra entre otras regiones. La intensidad de la marca de estas células inmuno positivas para IGF-I se vió disminuída en animales postnatales y adultos cuando se los comparó con embriones (García-Segura et al., 1991). Se ha observado que el IGF-I posee efectos manifiestos sobre las neuronas, participando en procesos que involucran la diferenciación, crecimiento y supervivencia neuronal. Estudios in vitro han mostrado que este factor aumenta la sobrevivencia neuronal en células primarias hipotalámicas fetales de rata (Torres-Aleman et al., 1990), estimula la proliferación de células septales colinérgicas y neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Knusel et al., 1990), observándose además efecto

neuroprotector de esta molécula en el cuerpo calloso e hipocampo donde se la administró luego de lesiones traumáticas (Kazanis et al., 2003).

2-6 b IGF-I y estrógenos en el sistema nervioso

La actividad neural se encuentra afectada por las secreciones humorales de las glándulas endócrinas periféricas. Entre las hormonas que mas afectan al desarrollo y función cerebral se encuentran las hormonas sexuales: andrógenos, estrógenos y progestágenos. Estas hormonas son esteroides, derivan del colesterol, y actúan sobre los somas neuronales, las sinapsis, la síntesis de neurotransmisores y la expresión de receptores para transmisores. Regulan la actividad de las células gliales y también la supervivencia, diferenciación y plasticidad en la conectividad de grupos neuronales específicos, tanto en el cerebro como en la médula espinal. En la actualidad se sabe que el cerebro es capaz de sintetizar estas mismas moléculas, las que localmente actúan como neuromoduladores, denominándose las neuroesteroides. Las células nerviosas presentan enzimas esteroideogénicas capaces de sintetizar esteroides a partir del colesterol como así también de metabolizar los esteroides periféricos que alcanzan el SNC por el vía sanguínea (Veiga S. et al., 2004).

Las principales células esteroideogénicas en el SN son las gliales, y en menor medida las neuronales. De hecho, ambos tipos celulares presentan diferentes enzimas pertenecientes a la vía sintética de estas hormonas. Por ejemplo, la enzima aromatasa (o P450aro), capaz de catalizar la conversión de testosterona en estradiol, se encuentra normalmente restringida casi exclusivamente a las neuronas pero puede expresarse en astrocitos reactivos bajo condiciones estresantes o en respuesta a injurias, con la finalidad de lograr una mayor síntesis local de estradiol, el cual se encuentra involucrado en un potente mecanismo de neuroprotección (Azcoitia I. et al., 2003). No se conoce exactamente el proceso por el cual los estrógenos inducen los efectos neurotróficos. Se plantea la posibilidad de que puedan controlar la capacidad de las neuronas de extender neuritas y establecer conexiones entre células mediando la acción de factores neurotróficos. Es sabido que los estrógenos modulan la síntesis y liberación de factores de crecimiento esenciales para la neuritogénesis (como NGF, BDNF, IGF-I y TGF β). También se

hipotetiza que el estradiol podría proteger a las células nerviosas afectando el balance crítico entre la activación de genes apoptóticos y anti-apoptóticos; ya que la estimulación de receptores estrogénicos ER α induce la expresión de Bcl-2 y BclXl (conocidos como genes antiapoptóticos) (Maggi A. et al., 2004).

Está documentado que el estradiol interactúa con IGF-I en el cerebro. La ovariectomía induce una disminución en la densidad del receptor de IGF-I en hipocampo, hipotálamo y corteza parietal, la cual es revertida luego del tratamiento con estrógenos (Nahid K El-Bakri, et al., 2004). También se estudió esta interacción estrógenos-IGFI en modelos animales de Parkinson con lesiones en las vías dopaminérgicas nigro-estriatales inducidos con 6-OHDA o MPTP. Aquí pudo observarse que el pretratamiento con 17 β estradiol o IGF-I previene significativamente la pérdida de TH en las fibras dopaminérgicas (Quesada y Micevych, 2004). Este y otros trabajos enfocados a dilucidar la interacción entre estrógenos e IGF-I, sugieren que ambas moléculas interactúan y participan co-activando cascadas de señalización intracelulares las cuales poseen un potente sinergismo resultando en un marcado efecto final de neuroprotección para el SNC (Cardona-Gomez G. et al., 2001).

2-7 IGF-I y envejecimiento

Numerosos estudios documentan que con la edad disminuyen los valores de IGF-I séricos. A este descenso se le atribuyen cuantiosos cambios funcionales y estructurales como la pérdida de masa muscular, masa ósea, deterioro de la función inmune y cambios en el grosor de la piel. Incluso se postula que esta disminución está involucrada en los déficits cognoscitivos y enfermedades neurodegenerativas asociadas a la vejez (Dick M., et al. 2003). En distintas regiones del SNC de ratas adultas (hipocampo y corteza cerebral), se ha encontrado una disminución en los valores de IGF-I tisular como así también de receptores para IGF-I (Sonntag W. et al., 1998). En dichas regiones, la administración intracerebroventricular de IGF-I, logra mejorar los déficits comportamentales y cognoscitivos asociados a la edad (Markowska AL et al., 1998).

Otro cambio notable que se ha observado en el sistema nervioso durante el proceso de envejecimiento, es que con la edad disminuye la densidad de la microvasculatura en la

superficie del cerebro, siendo ésta de gran importancia para que el IGF-I pueda accionar en forma parácrina con las células vecinas. La administración de GHRH que estimula la liberación endógena de GH como de IGF-I en modelos animales, mostró un efecto beneficioso en relación al deterioro vascular observado en el proceso normal de envejecimiento (Sonntag W.E. et al., 2000).

Estas acciones beneficiosas del IGF-I en el cerebro senil han despertado gran interés en evaluar más profundamente el potencial terapéutico de los IGFs en procesos neurodegenerativos (Trejo J. et al., 2004).

En cuanto a la funcionalidad de esta interesante proteína sobre el SNC, se puede resumir destacando que el IGF-I posee una manifiesta acción favorecedora del crecimiento celular en diferentes tejidos. Específicamente en el SNC se lo considera un promotor general del crecimiento de células del cerebro resultando especialmente importante la correcta expresión en etapas embrionarias para un buen desarrollo del individuo. En el adulto el IGF-I parece jugar un rol primordial para contrarrestar efectos deletéreos asociados a la edad manteniendo el normal funcionamiento de las células nerviosas.

3- Adenovirus y Vectores Adenovirales

3-1 Generalidades

La terapia génica posee un gran potencial como estrategia para el tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y síndromes neurodegenerativos (**Bohn M., 2000**). Para transferir material genético con fines terapéuticos se emplean como herramienta sistemas de vectores. Existen dos tipos de vectores, los virales y los no virales (**Friedman T. 1997**). Los vectores virales son los más efectivos por su en células animales, pero tienen asociado problemas como tales como la inmunogenicidad, la patogenicidad y la duración de los niveles y expresión del transgen. Los vectores no virales, como liposomas y conjugados de ADN, son no patógenos pero menos efectivos para la transferencia de genes *in vivo*. Entre los vectores virales recombinantes empleados para la transferencia de genes, los adenovirales y herpesvirus son los más utilizados en el sistema neuroendócrino (**Bolognani F. and Goya R., 2001**).

Los adenovirus humanos causan infecciones menores por lo general, en el tracto respiratorio superior siendo los serotipos más comunes el Ad 2 y el Ad 5 los que se han empleado para desarrollar vectores adenovirales recombinantes. Por lo anteriormente mencionado, los vectores adenovirales ofrecen un alto nivel de bioseguridad para su manejo. Además, son relativamente sencillos de construir, expandir y purificar, pudiéndose alcanzar altos títulos (10^{12} pfu/ml) (**Lowenstein P. et al., 1999**).

3-2 Adenovirus

3-2 a Estructura de los adenovirus

La familia Adenoviridae comprende un gran número de especies de origen humano y animal. Se divide en dos géneros: mastadenovirus y aviadenovirus. El género mastadenovirus incluye a los adenovirus humanos, de primates, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y murinos, entre otros. En el género aviadenovirus se encuentran las especies aviares y de anfibios. Todos son específicos de especie, presentan una gran

variabilidad genética (existiendo 42 serotipos diferentes de adenovirus humanos) y por lo general infectan a sus huéspedes a través de las mucosas ocular, faríngea o intestinal.

Toda la familia Adenoviridae está constituida por virus de tamaño medio (80nm), sin envoltura, compuestos por una cápside de simetría icosaédrica bastante compleja, que comprende al menos 10 polipéptidos diferentes (**Figura 8 B-Introducción**). La cápside está conformada por 252 unidades (denominadas capsómeros) las cuales están constituidas a partir de las principales proteínas estructurales. De estas unidades, 240 son hexones que conforman cada una de las caras o facetas triangulares equiláteras del prisma y 12 son pentones que se ubican en cada uno de los vértices. Por microscopía electrónica (**Figura 8 A-Introducción**) se observa también la existencia de fibras (emergiendo de cada pentámero), las que juegan un rol muy importante en la interacción y anclaje del virus. Los adenovirus poseen un genoma grande, de 36Kbp, consistente en una doble cadena lineal de ADN con un peso molecular que oscila entre los 20 y los 30 mega Da dependiendo de la especie (**Shenk T. 1996**). Los adenovirus presentan además dos rasgos característicos: 1) las secuencias nucleotídicas terminales de cada cadena son repeticiones invertidas; 2) en el extremo 5' de cada cadena se encuentra unida covalentemente una proteína de 55kDa (pTP).

Las unidades de empaquetamiento adenoviral que contactan con el ácido nucleico son las proteínas VII, V y μ . La asociación del ADN genómico a los polipéptidos V y VII forma un "core" organizado en forma de 12 subunidades esféricas, cada una de las cuales está en contacto con un vértice de la cubierta icosaédrica. La proteína fundamental es la VII; la proteína V probablemente ocupa la posición más externa dentro del grupo de las nucleoproteínas y hace contacto con proteínas de la cápside. Aunque el rol de la nucleoproteína μ no se conoce con certeza, se cree que esta molécula es capaz de unirse a las cargas negativas del ADN.

Dos estructuras asociadas conforman los pentones ubicados en los vértices: la base (constituída por un pentámero de proteína III) y la fibra (trímero de proteína IV). Trímeros de proteína II forman el hexón con ayuda de la proteína L4-100 kDa cuya función molecular es todavía desconocida.

Los polipéptidos IIIa, VI, VIII y IX interconectan los capsómeros estabilizando la estructura de la cápside.

Para una eficiente replicación, los adenovirus poseen proteasas como L3 23K para la producción eficiente de viriones infectivos y para desensamblar virus entrantes.

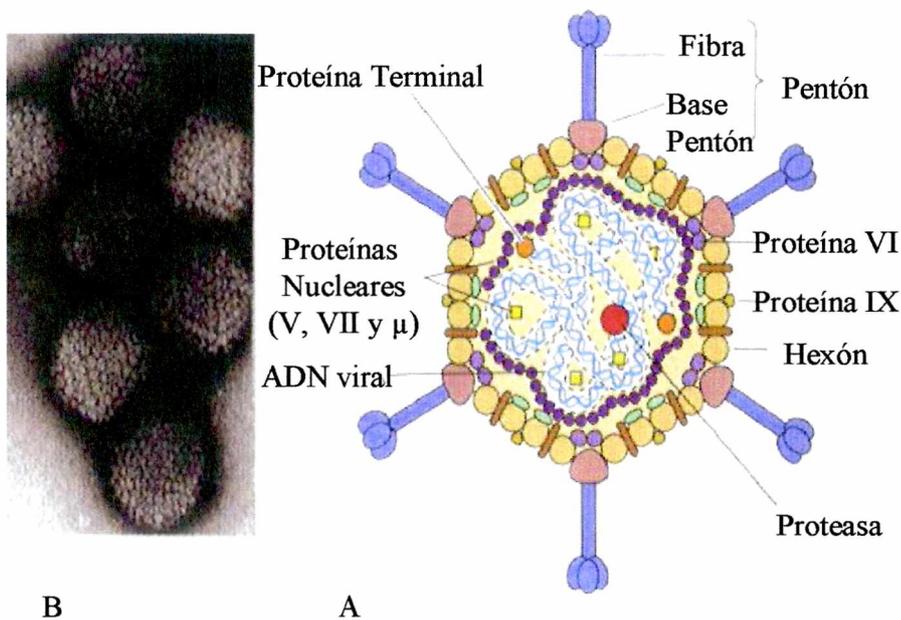


Figura 8-Introducción.-: A-Representación esquemática de la estructura correspondiente al Adenovirus tipo V. B- Foto de Microscopía electrónica perteneciente al adenovirus tipo V.

3-2 b Interacción entre el virus y la célula huésped

La infección viral es iniciada por el reconocimiento de receptores de superficie celular que interactúan específicamente con el virus. Este es un proceso de alta selectividad y crucial para permitir una infección exitosa con el posterior desarrollo de su ciclo replicativo. La presencia de tales receptores determina que la célula sea susceptible al virus.

La mayoría de los virus logran el acceso a células susceptibles por interacción con componentes específicos de la matriz extracelular. En el caso particular de los adenovirus, el receptor denominado CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) es el que se adhiere a la proteína viral (**Bergelson et al., 1997**). La mayoría de los adenovirus

(subgrupos A, C, D, E y F) se unen a CAR. Los adenovirus tipo 2 pueden también unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I, mientras que los adenovirus de tipo 5 se unen a integrinas $\alpha\beta 2$. Sin embargo, en el caso de muchos adenovirus, la unión a CAR, CMH clase I o $\alpha\beta 2$ no es suficiente para lograr la infección. Subsecuentemente, los adenovirus interaccionan con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ de la superficie de la célula identificadas como correceptores con la base del pentón viral (Wickham et al., 1993). Esta interacción es también requerida para anclar la cápside a la célula e incorporar el virus por endocitosis (siendo una excepción el adenovirus tipo 9 el cual aparentemente puede unirse en forma directa a αv integrinas).

3-2 c Internalización del adenovirus

Luego de la interacción con la membrana celular, el adenovirus es internalizado por endocitosis mediada por el receptor. El virus es transportado por endosomas desde la superficie celular hacia la membrana nuclear donde sufre múltiples cambios en los que se eliminan secuencialmente proteínas estructurales. En el endosoma, las fibras, proteína IIIa y proteína VIII son disociadas de la cápside. Debido a que el endosoma comienza a acidificarse, el descenso del pH causa la liberación de la base del pentón y de la proteína estabilizadora de las caras número IX. La proteína VI es degradada en el endosoma ácido probablemente por la acción de la proteasa viral L3 p23 que se activa (Greber et al, 1996). La cápside viral queda desprovista de muchos componentes excepto el ADN viral, nucleoproteínas y un pequeño número de proteínas del hexón. La membrana del endosoma se rompe debido probablemente a la acción de una proteína lítica de membrana de la base del pentón viral que es activada por la disminución del pH, liberando así el resto del virus al citoplasma. Muchos de los cambios son inducidos por la disminución del pH en el endosoma, otros por la acción de la proteasa viral y otros como la liberación de las fibras son el resultado de la interacción de la cápside con los receptores de la célula. El virión parcialmente desensamblado transloca su ADN al núcleo a través del complejo del poro en la membrana nuclear (Davis, 1995). Las nucleoproteínas que acompañan al ADN viral poseen secuencias de localización nuclear básicas, las que primeramente se unen a

proteínas receptoras citoplasmáticas solubles. Posteriormente este complejo interacciona con proteínas del poro de la membrana nuclear y el ADN es finalmente traslocado al interior del núcleo celular donde, permaneciendo de manera episomal, se da lugar a la replicación y transcripción del genoma viral.

3-2 d Ciclo infectivo del adenovirus

El ciclo lítico de los adenovirus comprende básicamente las siguientes etapas: una FASE TEMPRANA que precede a la duplicación del ADN y una FASE TARDIA posterior a la replicación caracterizada por la expresión de las proteínas estructurales del virus. Las etapas del ciclo lítico podrían mencionarse secuencial y brevemente como:

1-FASE TEMPRANA, en la cual el genoma viral se transcribe según un programa complejo, existiendo 6 regiones diferentes de transcripción temprana que se localizan en ambas cadenas complementarias: E1a, E1b, E2a, E2b, E3 y E4. La transcripción se inicia con los productos de los genes codificados por E1a. Las regiones E1a y E1b contienen genes esenciales involucrados en la regulación de la transcripción temprana de los demás genes adenovirales (**Bolognani F. y Goya R., 2001**).

Los genes E2a y E2b codifican para varias proteínas necesarias en la duplicación del ADN. A partir de la región E2a se transcribe el ARNm de una proteína capaz de unirse al ADN (DBP o ADN binding protein). La región E2b codifica para la proteína terminal (pTP) de 55kDa unida covalentemente a los extremos 5' del genoma viral y la ADN polimerasa viral de 140 kDa.

Los genes E3 y E4 no son esenciales para la replicación viral ya que se ha comprobado que mutantes con importantes deleciones en estas zonas del genoma pueden multiplicarse.

2-DUPLICACION DEL ADN. Utiliza como iniciador a la proteína pTP (en el extremo 5'), siguiendo la duplicación del ADN a partir de ambas cadenas en forma semiconservadora.

3-FASE TARDIA. La transcripción de los mensajeros tardíos se inicia al poco tiempo de comenzada la duplicación del ADN. Los ARN mensajeros de las 5 regiones de

transcripción tardía L1, L2, L3, L4 y L5 codifican todas las proteínas estructurales del virus con excepción de los polipéptidos IX y IVa2.

4-ENSAMBLAJE Y MADURACION. Los polipéptidos estructurales del virus son transportados al núcleo donde comienza el ensamblaje. En cada célula infectada se ensamblan alrededor de 100.000 partículas virales dentro de las 30 hs post-infección.

5-LIBERACION DEL VIRUS. En esta etapa, participan proteínas adenovirales, las cuales contribuyen a la liberación de la progenie viral.

3-2 e Estrategias de transcripción del adenovirus

Para su transcripción, los adenovirus dependen de la ARN polimerasa de la célula. Poseen una región TATA donde distintas subunidades de factores de transcripción (Tf) se unen en forma ordenada y consecutiva (TfIIa, TfIIb-ARN polimerasa II, TfIIc y TfIIh) formando el complejo que dará inicio a la transcripción de genes tempranos y principales tardíos.

Los promotores que inician la transcripción, están controlados por reguladores que reconocen secuencias específicas de ADN. Entre ellos se pueden citar a la proteína Cp1 (proteína 1 unidora CCAAT) y al Usf (factor estimulador), los cuales regulan al principal promotor tardío del Adenovirus tipo 2. La proteína Atf (activador de la transcripción del gen E2), la cual controla los promotores E2, E3 y E4. Y el factor E2 (E2f) el cual regula al promotor E2 del Adenovirus 2.

Los genes virales son transcritos en una secuencia ordenada y la transcripción de genes determinados es activada durante períodos específicos en el ciclo de infección, lo que asegura en forma eficiente la transcripción de los genes adenovirales.

En cuanto el adenovirus es internalizado, el gen E1A es transcrito, siendo su producto necesario para una transcripción eficiente y regulada de todas las unidades virales de transcripción temprana y con posterioridad, de las tardías. Esta proteína E1A puede interactuar con otras proteínas Tbp asociadas, regulando la transcripción genómica viral. Puede generalmente definirse a la proteína E1A como coactivador, que estimulan a

proteínas unidoras de secuencias específicas de ADN para una transcripción más efectiva (Russell W.C. 2000).

Generalmente las enzimas virales y las proteínas reguladoras son sintetizadas por genes inmediatos tempranos durante el período inicial de la infección o fase temprana; las proteínas estructurales con las cuales se autoensambla la partícula viral son expresadas por los genes tardíos después de comenzada la síntesis del ADN del virus.

3-2 f Replicación del genoma adenoviral

El genoma viral contiene cortas secuencias constituidas por repeticiones terminales invertidas (ITR) en los extremos 5' y 3', las cuales son necesarias para la replicación del ADN viral; en ellas se ensambla la ADN polimerasa y la primer proteína (pTP). Al encontrarse estos sitios ITR en ambos extremos del ADN viral lineal, los adenovirus, como así también los vectores adenovirales recombinantes derivados de ellos, logran una replicación más efectiva de su genoma.

La interacción de la proteína preterminal viral pTP (Lieber A et al., 1997) con la ADN polimerasa, activa la transcripción de unidades correspondientes al gen E2a, las que codifican para la proteína DBP necesaria para el proceso de replicación. Como los segmentos terminales del genoma adenoviral comprenden una secuencia terminal invertida, en ambos extremos hay un origen de replicación en cada extremo y ambas hebras se pueden replicar de la misma manera.

En síntesis, las proteínas primordiales necesarias para la replicación del genoma adenoviral son las siguientes:

-ADN polimerasa, que inicia la replicación formando un complejo con la proteína preterminal (pTP) y completando la síntesis de todas las cadenas hijas.

-Proteína Terminal, unida covalentemente al extremo 5' del genoma lineal, facilita el desenrollamiento del origen de replicación y también es importante en dirigir la molécula de ADN viral a un sitio nuclear especializado donde tiene lugar la replicación.

-Proteína unidora de ADN de cadena simple, se une a la simple cadena de ADN y permite que pueda actuar la ADN polimerasa viral.

El origen de replicación es reconocido por un complejo de proteínas virales, la pTP y ADN polimerasa. Estas proteínas son sintetizadas en el citoplasma de la célula infectada y se unen específicamente a secuencias conservadas. Luego con la unión adyacente de las proteínas celulares Nf-1 y Oct-1, comienza la síntesis del ADN viral desde la hebra que lleva la pTP madura unida covalentemente en su extremo 5'.

3-2 g Traducción de genes virales y empaquetamiento de la progenie

Posteriormente a que el pre-ARN viral es producido y procesado en el núcleo, debe ser exportado al citoplasma para su traducción. Es necesaria la adición de Cap y Poli A en los extremos 5' y 3' respectivamente para estabilizar los ARNm virales. Los ARNm son traslocados del núcleo al citoplasma para su traducción, participando en esta exportación nucleoporinas específicas del complejo del poro nuclear. Regulan la exportación de dichos ARNm dos proteínas tempranas virales E1B y E4ORF6 libres o asociadas a otras proteínas. El mecanismo por el cual el complejo E1B-E4 induce selectivamente la exportación de ARNm no está aún dilucidado.

La traducción de ARNm virales se realiza sin variación alguna al proceso universal ya conocido (síntesis peptídico ribosomal desde ARNm en dirección 5'-3', con crecimiento de la cadena polipeptídica desde el amino al carboxilo terminal).

Una vez sintetizados todos los componentes virales, comienza el ensamblaje de la progenie de viriones. Para ello las proteínas estructurales poseen señales de localización nuclear y son transportadas al núcleo. Se produce el ensamble apropiado de todas las proteínas para formar la cápside (trímeros de proteína IV formarán las fibras, pentámeros de proteína III la base del pentón y trímeros de proteína II formarán el hexón). El ADN se inserta dentro de la cápside estructural debido a una señal de empaquetamiento localizada cerca del extremo izquierdo terminal del genoma. En primer término se conforma la estructura de ensamble inmediato, constituida por una cápside inmadura asociada a fragmentos de ADN del extremo izquierdo del genoma. A continuación son incorporadas las proteínas nucleares generando viriones jóvenes no infecciosos. Por último los viriones maduros son producidos con posterioridad al clivaje de proteínas precursoras (pIIIa, pTp, pVI, pVII, pVIII y pμ) (Shenk T, 1996).

Las mencionadas señales de empaquetamiento o encapsidación del ADN viral están contenidas en el genoma del adenovirus. Comprenden secuencias cortas y repetidas, muchas de las cuales son también parte de promotores o enhancer, posicionados después del origen de replicación izquierdo, cercano al gen E1A y su capacidad de dirigir la encapsidación de ADN depende de su localización. Dicha región de empaquetamiento es una zona rica en AT, de secuencias repetidas, varias de las cuales coinciden con enhancers que estimulan la transcripción de genes tempranos. Enhancer I estimula específicamente la transcripción del gen inmediato temprano E1A, mientras que enhancer II aumenta la eficiencia de transcripción de todos los genes virales, sin embargo los mecanismos moleculares de empaquetamiento todavía no son del todo comprendidos.

3-2 h Liberación de las partículas virales

En una infección natural, la gran respuesta inmune que desencadenan los adenovirus contribuye a la liberación de los virus por el importante daño y destrucción de células huésped que se genera. Los adenovirus inhiben la expresión de información genética celular por efectos específicos en la transcripción celular, exportación de ARN desde el núcleo, o traducción. El ciclo infeccioso es relativamente largo (1 a 2 días) y la disminución en la producción de proteínas celulares durante la fase tardía de la infección contribuye importantemente a la eventual destrucción de la célula infectada.

En cultivo, las células huésped son destruidas por un efecto citopático más directo. Un número de proteínas adenovirales pueden contribuir a la liberación del virus por alteraciones en la estructura celular. La proteína temprana E1B induce el colapso de algunos filamentos intermedios y una disrupción de la lámina nuclear. Posteriormente en el ciclo de infección otros filamentos intermedios, citoqueratinas específicas, son clivadas por la proteasa L3 en polipéptidos que ya no se pueden polimerizar. Esta destrucción de la red de filamentos intermedios no se puede reconstruir debido a la disminución de la síntesis de proteínas celulares, con un consecuente daño en la integridad estructural de la célula facilitando de esta forma la liberación de los adenovirus generados.

3-3 Vectores Adenovirales

3-3 a Características estructurales y funcionales de los vectores adenovirales

Los vectores adenovirales recombinantes son adenovirus modificados genéticamente con la finalidad de transferir genes terapéuticos a las células de interés. Poseen deleciones en la región E1 para tomarlos replicación defectivos y prevenir la expresión de los genes virales (Hitt M. et al., 1995). En esta región se incorporan los promotores y cADN de interés que serán transportados por el vector para su posterior expresión.

Con respecto al ciclo lítico, en el caso de los vectores adenovirales recombinantes (a diferencia de un adenovirus salvaje) este ciclo es incompleto debido a la deleción del gen E1A (que como ya se describió anteriormente, es esencial para la replicación del ADN viral y activación de los genes tardíos). Por lo tanto el genoma viral no se replica y la mayor parte de lo que se transcribe del mismo es el transgén insertado, que generalmente se encuentra bajo el control de promotores virales potentes (Stone D, et al., 2000).

Las funciones virales codificadas pueden separarse en elementos cis y trans. Los elementos cis tales como el origen de replicación o la señal de empaquetamiento (Ψ) son transportadas por el virus en sí mismo. Sin embargo los elementos trans pueden ser complementados desde secuencias de ADN insertadas en el genoma hospedador o en plásmidos transfectados. En virus con genomas pequeños usualmente los genes trans son removidos para crear espacios de inserción de genes terapéuticos o para convertir en replicación defectivo al vector. Los genes deleccionados pueden transfectarse establemente en líneas celulares de empaquetamiento o expresarse en forma transitoria por transfección de plásmidos helper.

Los vectores adenovirales poseen varias ventajas con respecto a otros sistemas virales en lo que refiere a su aplicación en el sistema neuroendócrino (Bolognani F. and Goya R., 2001)

1-Son capaces de infectar tanto células en estado replicativo como células en estadios Go o Gtd (como células endócrinas y nerviosas, respectivamente).

2-La biología de los adenovirus está estudiada muy a fondo, existe una amplia gama de sistemas viables desarrollados y es relativamente sencilla la manipulación de este tipo de vectores.

3-Poseen una alta capacidad (aproximadamente 35kpb de ADN en vectores gutless) de transporte de genes y secuencias reguladoras.

4-No se integran al genoma de la célula huésped, lo que evita el riesgo de mutagénesis.

5-Poseen altos niveles de expresión del transgén por unidad de ADN si se los compara con otros sistemas virales existentes.

Como contrapartida, los vectores adenovirales desencadenan una respuesta inmune considerable, por lo que se han desarrollado distintas estrategias para contrarrestar dicho efecto, como la coadministración de inmunosupresores (ciclosporina), o la eliminación de determinados genes inmunogénicos propios del virus, hasta llegar al desarrollo de los vectores gutless (o eviscerados) ya prácticamente no-inmunogénicos. De todos modos en lo que concierne a su aplicación en el sistema nervioso y endócrino, las características de la respuesta inmune por parte de los linfocitos T en estos sistemas es bastante particular, por lo que la respuesta inmunológica desencadenada es menos efectiva, favoreciendo la persistencia de una expresión transgénica más prolongada (**Wood et al., 1996**).

Existen diferentes generaciones de vectores adenovirales recombinantes. La primer generación carece de las regiones E1 y E3, luego se desarrollaron los de segunda generación con eliminación de la región E2 (E2a y E2b), con disminución de los niveles de inflamación y respuesta inmune mediada por linfocitos T. Luego se incluyeron deleciones en regiones E3 y E4 y recientemente deleciones de todos los genes virales (vectores gutless) que contienen solo elementos que determinan el comienzo y fin del genoma viral (ITR) y la señal de empaquetamiento (**Robbins P. et al., 1998**).

3-3 b Utilización de vectores adenovirales

Específicamente en el sistema endócrino y nervioso los vectores adenovirales han sido usados para diversos fines en terapia génica (**Mata M. et al., 2003, Russell WC, 2000**;

Goya R. et al., 2004). Entre ellos se puede mencionar haber logrado mediante terapia génica con adenovirus recombinantes expresando el gen supresor tumoral p53 en células provenientes de un modelo animal de cáncer de próstata andrógeno independiente, la inhibición del crecimiento celular como así también la expresión por parte de las mismas del antígeno prostático específico (**Ko et al., 1996**). También en ratones diabéticos, inyecciones intravenosas de este tipo de vectores portando un ADNc codificante para proinsulina resultó en una expresión normal de insulina y normalización de la glucemia (**Short D. et al., 1998**). Además fueron exitosos los tratamientos de terapia génica en modelos de ratas Brattleboro, animales que presentan una mutación en el gen de arginina-vasopresina AVP, lo cual causa en el animal la aparición de una diabetes insípida muy notable (fenotipo caracterizado por la excreción de volúmenes importantes de orina hiposmótica y polidipsia compensadora). En estos animales se logró revertir la diabetes insípida después de la inyección en el hipotálamo de vectores adenovirales recombinantes codificando para arginina-vasopresina (**Geddes et al., 1997; Geddes et al 1999**).

En hipófisis, varios estudios se han publicado (**Kaiser Ursula, 2001; Castro M.G., 1999**) documentando, entre otros trabajos, el tratamiento exitoso de tumores pituitarios en ratones retinoblastoma (Rb) Rb^{+/-}, utilizando un vector adenoviral expresando el gen de retinoblastoma (**Riley et al., 1996**). Así mismo, **Freese et al., (1996)** documentaron una disminución de la liberación de prolactina in vitro de células provenientes de un adenoma lactotrofo humano, expuesto a un vector adenoviral recombinante codificando para la enzima tirosina hidroxilasa. También se ha logrado expresión exitosa de βgalactosidasa mediada por vectores adenovirales en neuronas magnocelulares del hipotálamo (**Vasquez E. et al., 1999**). Estas y otras aplicaciones constituyen antecedentes que permiten concluir que es posible el empleo de vectores adenovirales recombinantes en el sistema neuroendócrino como herramienta de transferencia de genes terapéuticos (**Goya et al., 2001**).

MATERIALES Y METODOS

1- Protocolos generales de trabajo con plásmidos

1-1 Transformación bacteriana con los plásmidos de interés

Los plásmidos generalmente se recibieron precipitados en etanol al 70%, conteniendo 10 µg/vial. Para utilizarlos en las transformaciones se centrifugaron dichos viales 10 minutos a 15.000 x g, luego se secaron al vacío y se resuspendieron los sedimentos en 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM PH=7,4; 0,1 mM EDTA PH= 8) obteniéndose una concentración final de 200ng/µl.

1-1-a.- Preparación de bacterias competentes con Cloruro de Calcio

Para tales fines se emplearon bacterias *E. coli* cepa JM109, la cuales se sembraron en placas de agar 1,5%-LB (triptona 10g/l; extracto de levadura 5g/l; NaCl 10g/l; PH=7) y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Luego se transfirió una colonia a 50ml de medio LB y se la incubó en iguales condiciones con agitación intensa hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0,3-0,5. Las células se transfirieron asépticamente a un tubo de centrifuga estéril y se las mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugaron a 2.500 x g durante 10 min. y se resuspendieron en 5 ml de solución 0,1 M de CaCl₂ estéril enfriado en hielo. Se centrifugó nuevamente (a 2.500 x g. durante 10 min.) y el pellet se volvió a resuspender en 1 ml de solución 0,1 M de CaCl₂ estéril, conservándose a 4 °C entre 12 y 24 hs.

Las bacterias competentes así preparadas pueden ser utilizadas inmediatamente o guardarse congeladas por varios meses, para lo cual se les adiciona 20% de glicerol estéril, se las congela inmediatamente y se las mantiene en freezer a -70 °C hasta el momento de utilizarse.

1-1-b.- Transformación de bacterias competentes

Se adicionó a 0,2 ml de una suspensión de células competentes, 100 ng del ADN transformante y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se transfirió el tubo a un baño de agua

a 42°C y se mantuvo durante 90 seg. Inmediatamente se colocó en hielo y se agregó 0,8 ml de medio SOC [bacto-triptona 20g/l; extracto de levadura 5g/l; NaCl 0,584g/l; KCl 0,186g/l; 10ml de Glucosa 2M y 10ml de solución stock de Mg (MgCl₂.6H₂O 20,33%, MgSO₄.7H₂O 24,65%); Ph 7] incubándose 1 h. a 37 °C,

Se sembraron placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml de medio de cultivo) con las bacterias preparadas previamente y se incubaron en estufa a 37°C durante una noche para que desarrollen los transformantes.

1-2 Procedimiento de obtención de plásmidos en escala analítica (minipreparación)

Básicamente consiste en la lisis alcalina con el detergente Dodecil Sulfato de sodio (SDS) para producir la liberación del plásmido de las bacterias transformadas. El lisado se purifica para eliminar restos celulares, proteínas y el ADN cromosómico. Este método permite obtener suficiente cantidad de ADN plasmídico para un rápido análisis de digestión con enzimas de restricción.

Método

Se transfirieron colonias individuales a tubos con 2 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg / ml) y se incuban al menos una noche a 37°C con agitación fuerte. Luego se transfirió en forma estéril aproximadamente 1,5 ml del cultivo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml (conservándose el resto a 4°C). Se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min a 4°C resuspendiendo luego el pellet con 100µl de solución I (25mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0; Glucosa 50 mM), con agitación en vórtex. A fin de disolver el pellet, se agregaron 200 µl de solución II (NaCl 0,2M; 1%SDS) recientemente preparada, manteniéndose la mezcla en hielo por 5 min. A continuación se adicionaron 150 µl de solución III (60 ml de Acetato de potasio 5M; 11,5ml de ácido acético; agua destilada csp 100 ml) previamente enfriada en hielo. Se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 12.000 x g por 5 min a 4°C transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio. A continuación se adicionaron 450 µl de fenol-cloroformo (SS-fenol; 0.1% de 8-

hidroxiquinoleína; cloroformo; 2% de alcohol isoamílico) y luego de incubar 5 min se centrifugó la mezcla a 12.000 x g rescatándose la fase acuosa superior.

A este sobrenadante se lo mezcló con 2,5 volúmenes de etanol al 96% y 0,1 volúmenes de solución de acetato de sodio 3M (pH 7,4) y se mantuvo a -20°C durante 15-30 min. Se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min, rescatándose el sedimento y lavándose con alcohol al 70%. Luego se lo centrifugó a 15.000 x g durante otros 5 min y se secó al vacío. El sedimento fue resuspendido en 200 μl de buffer TE al cual se le adicionó 200 μl de solución de PEG 13% en 1,6M de NaCl se mezcló e incubó en hielo 30 min. Fue centrifugado a 15.000 x g durante 15 min y el nuevo sedimento obtenido lavado con etanol al 70%, centrifugado, secado al vacío y resuspendido en 20 μl de TE. Se adicionó solución de RNAsa hasta una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se conservó a -20°C hasta su utilización (Sambrook and Russell, 2001).

##Alternativamente se empleó el kit de promega de minipreparación de plásmidos acorde a protocolo estipulado por el fabricante. (QIAprep Miniprep kit Spin Procedure cat. Número 27104)

1-3 Digestión con enzimas de restricción (ER)

Una mezcla típica (como las que aquí se emplearon) de digestión con enzimas de restricción consistió en: agua destilada estéril (6 μl), buffer 10x adecuado (1 μl), DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y ER (10U/ μl).

Se incubó la mezcla de reacción 1 hora a la temperatura adecuada. Finalizada la incubación se adicionaron 2 μl de buffer stock 6X. Los volúmenes de la mezcla de reacción, la cantidad de ER agregada y el tiempo de incubación dependerán en cada caso de la cantidad de DNA a digerir.

1-4 Electroforesis de inmersión en geles de agarosa

Por lo general se utilizaron geles de agarosa al 0,8% p/v los que resultaron adecuados para resolver los fragmentos de ADN correspondientes a los plásmidos de trabajo. El buffer de corrida en todos los casos fue 1X buffer TBE (Tris-borato/EDTA) y las bandas fueron observadas previa incubación del gel con solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Los standards de peso molecular para ADN empleados fueron de 1kb y 100pb, según correspondiese. La corriente empleada fue de 5 V / cm de gel. Para obtener la resolución máxima de fragmentos de ADN, los geles se corrieron a 70 vts.

Para la visualización de los fragmentos, los geles fueron sumergidos por 30 min en buffer 1X TBE conteniendo bromuro de etidio (concentración final 0,5µg/ml) con agitación orbital lenta. Iluminando el gel con luz UV, se pudo observar la presencia de las bandas de ADN, tomándose las fotos correspondientes para registrar los datos.

Una vez elegida la minipreparación que contenía el plásmido de interés, se procedió a realizar una expansión a mayor escala (maxiprep) con el fin de obtener cantidades preparativas del plásmido.

1-5 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para el aislamiento de fragmentos de ADN separados previamente en geles de agarosa, usualmente se utilizó agarosa de bajo punto de fusión. La preparación y corrida del gel son las mismas detalladas anteriormente, con la sola excepción de que la cuba de electroforesis se colocó en hielo durante la corrida, para evitar que el calor generado durante el paso de la corriente eléctrica funda el gel. Una vez corrido el gel e individualizados, los fragmentos de interés por fluorescencia con bromuro de etidio, se cortó con bisturí el segmento del gel de agarosa conteniendo el fragmento a aislar, agregándose a un tubo conteniendo 3 volúmenes de buffer TE. Se colocó este tubo en baño de agua a 65°C durante 10 minutos para fundir el gel. Se adicionó igual volumen de fenol, y luego de vigorosa agitación se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 20°C. Se trasvasó la fase acuosa superior a un tubo limpio y se purificó secuencialmente con igual volumen de fenol-cloroformo y luego con un volumen igual de cloroformo. La fase acuosa

fue rescatada nuevamente y se le agregó el 0,1 volumen de acetato de sodio 3M mas 2,5 volúmenes de etanol al 95%, conservándosela a -20°C durante 15 min. Luego de esta incubación se centrifugó 15min a 15.000 x g a 4°C, se lavó el sedimento con etanol al 70%, se secó al vacío y se disolvió en un volumen adecuado de buffer TE.

##También para estos fines fue empleado en algunos casos el Gel extraction kit (150) de Qiagen (Cat. 20021) acorde al protocolo estipulado.

1-6 Ligación

Para una reacción típica de ligación, se utilizaron 200 ng del vector y una relación molar inserto/vector de 3:1. Se empleó el buffer ligasa a 1X y 1U de la enzima ligasa. La mezcla fue llevada a volumen final 10µl con agua libre de nucleasas. La incubación se realizó a 15°C durante aproximadamente 16 h.

1-7 Protocolo de obtención de plásmidos en escala preparativa (maxipreparación)

El cultivo de bacterias que incorporaron el plásmido de interés se incubó en 100 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg / ml) durante 12-16 hs a 37°C con agitación enérgica. Se centrifugó a 5.000 x g por 10 min y las bacterias fueron resuspendidas en 2 ml de Solución I, (idem a protocolo de minipreparación). Se adicionaron 4ml de Solución II y se incubó 5-10 min a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó 3 ml de Solución III y se incubó en hielo por 10 min. Luego de centrifugar a 12.000 x g durante 10 min y rescatar el sobrenadante, se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min rescatándose los sedimentos obtenidos, los cuales fueron posteriormente resuspendidos en buffer TE. Se adicionó RNAsa (libre de DNAasa) a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente por 15-30 min. Se agregó 0,5 ml de fenol, se mezcló en vortex por 1-2 min y se centrifugó a 12.000 x g por 5 min. La fase acuosa superior fue rescatada y se

repitió esta operación sobre la fase acuosa, tantas veces como fuese necesario para purificar el plásmido obtenido.

La fase acuosa fue rescatada y se le adicionó un 10% del volumen total de solución de acetato de sodio 3M más 2,5 volúmenes de etanol al 96%. Se incubó a -20°C por 15-30 min y se centrifugó a $12.000 \times g$ por 15 min. Los sedimentos luego de ser lavados con alcohol al 70% y secados al vacío fueron disueltos en buffer TE para ser utilizados.

Para su cuantificación se empleó un espectrofotómetro, determinándose su absorbancia a 260nm (con absorbancias medidas a 280 nm se evaluó la contaminación con proteínas).

2-Construcción de Vectores Adenovirales Recombinantes (RAds):

2-1 Características del sistema de construcción

La construcción de un vector adenoviral por el método de los dos plásmidos (Hitt M et al., 1995), sistema que es el empleado en el presente trabajo, requiere de la cotransfección de células HEK293 (células de riñón de embrión humano) con dos plásmidos: a) un plásmido de transferencia (o shuttle), que contiene el transgén de interés inserto en un minicassette de expresión constituido por el promotor viral del citomegalovirus (CMV murino) hacia el extremo 5' del inserto y una señal de poliadenilación (SV40) en el extremo 3' de dicho inserto. b) Un segundo plásmido, denominado plásmido genómico que posee todo el genoma del Ad5 con excepción de dos porciones delecionadas, las correspondiente al gen temprano E1 y E3. La deleción en E1 es la que convierte al vector en replicación defectivo.

En la presente tesis se trabajó con una serie de plásmidos los cuales contienen la información para construir un vector adenoviral Recombinante (RAd) derivado del Adenovirus tipo V. Para tales fines se empleó el kit plasmídico AdMax (Microbix Inc., Canadá).

El cDNA codificante para el factor de crecimiento insulino similar I b (IGF-I) de rata, (donado por el Dr. Peter Rotwein) nos fue enviado inserto en el plásmido **pBluescript KS**.

Este cDNA (800pb) fue escindido de dicho plásmido por doble digestión con las enzimas de restricción XhoI (en el extremo 5') y EcoR I (en el extremo 3').

El plásmido **pCA14** (6.955pb) fue utilizado para un subclonado intermedio del inserto con el fin de obtener sitios de corte apropiados para incorporarlo al sistema de generación de vectores adenovirales por éste método. En éste plásmido fue posible clonar el inserto con las enzimas de restricción XhoI (extremo 5') y EcoRI (extremo 3') y luego escindirlo del mismo por doble digestión con las enzimas de restricción BamH I (en el extremo 5') y Sal I (en el extremo 3') sitios necesarios para la inserción del fragmento en el plásmido shuttle.

El mencionado kit está constituido por los plásmidos siguientes:

--El plásmido shuttle **pDC515**, (3.957pb) que está provisto del promotor del gen inmediato temprano del citomegalovirus murino (pCMVm), de un sitio de clonado múltiple (MCS) en el que cortes con BamH I (extremo 5') y Sal I (extremo 3') permitieron clonar el inserto de IGF-I, obteniéndose así el plásmido de transferencia (denominado comúnmente shuttle) con el que se trabajó posteriormente en células. El shuttle posee también la señal de encapsidación del adenovirus (ψ) y sitios de repeticiones terminales invertidas enfrentados (ITR-ITR). Detrás del MCS se ubica una señal de poliadenilación del virus SV40, que permitirá que el ARNm del inserto pueda ser estable para la posterior traducción en la célula huésped. Este plásmido posee un elemento **Frt** que permite el reconocimiento por la FLP recombinasa a fin de producir la recombinación sitio-dirigida con el plásmido genómico.

--El plásmido genómico **pBHGfrt (del)E1,3FLP**, (35.552pb) contiene el genoma del Ad5 salvo deleciones en la región E1 y E3. Este plásmido posee además el gen de la FLP recombinasa (de levadura) bajo el control del promotor del CMV murino y una señal de poliadenilación del SV40. Contiguo al gen posee también un elemento **Frt**, que permitirá la recombinación sitio-específica con el plásmido shuttle. Los sitios de recombinación específicos catalizados por la recombinasa FLP, dan alta eficiencia para recombinar el cassette de expresión en la región E1. La deleción en la región E3 contiene un único sitio de clonado Pac I, donde es posible insertar un gen reporter o una secuencia reguladora. Este plásmido genómico también posee (ITR-ITR) pertenecientes a los adenovirus salvajes.

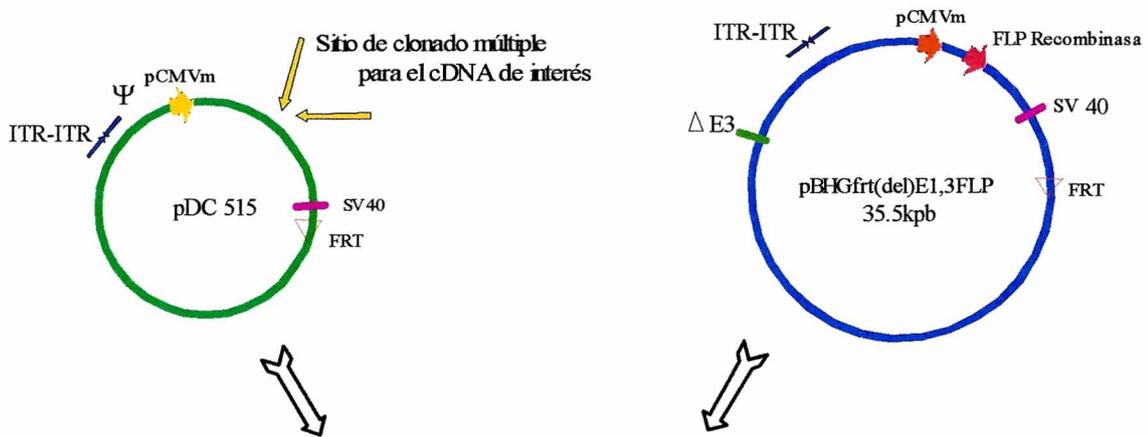
--El plásmido **pFG140** contiene el genoma del Ad5 salvaje que se usa como control positivo de transfección.

Los plásmidos anteriormente mencionados poseen un sitio de origen de replicación y un gen de resistencia a la ampicilina, para permitir expandirlos en bacterias.

Dos características importantes cabe destacar en este sistema:

- Tanto el shuttle como el plásmido genómico poseen 2 secuencias ITR encontradas (ITR-ITR). Esto facilita la apertura de los plásmidos para el momento de la recombinación, haciendo más eficiente el origen de replicación del DNA del adenovirus (Ng P, et al., 2000).
- El método lleva incorporado un cassette de expresión para la enzima FLP recombinasa. Este cassette, como se mencionó anteriormente, es aportado por el plásmido genómico y codifica para FLP recombinasa, (característica de levadura *Saccharomyces cerevisiae*) la cual reconoce el sitio *frt* de 34 pb. Ambos plásmidos tienen sitios *frt* donde cortará la enzima mediando la producción de adenovirus recombinantes entre los dos plásmidos cotransfectados por recombinación sitio específica. De este modo los sitios de recombinación específica reconocidos por FLP recombinasa dan alta eficiencia al proceso de recombinación que generará el vector deseado (Ng P et al., 1999).

Las cotransfecciones de los plásmidos fueron realizadas en una línea derivada de células de riñón de embrión humano, denominadas HEK293, siendo ésta una línea celular modificada genéticamente para expresar constitutivamente los genes de la región adenoviral E1 que está delecionada en los vectores adenovirales a ser construídos. Cuando estos plásmidos son cotransfectados se produce la recombinación sitio-dirigida entre los sitios FRT del shuttle y el plásmido genómico, proceso que lleva a la obtención eficiente del vector deseado portando el transgén de interés (ADNc correspondiente a IGF-I en este caso) (Figura 1 – Metodología-).



Cotransfección en células HEK 293.

Recombinación sitio-específica catalizada por FLP Recombinasa

Célula HEK 293

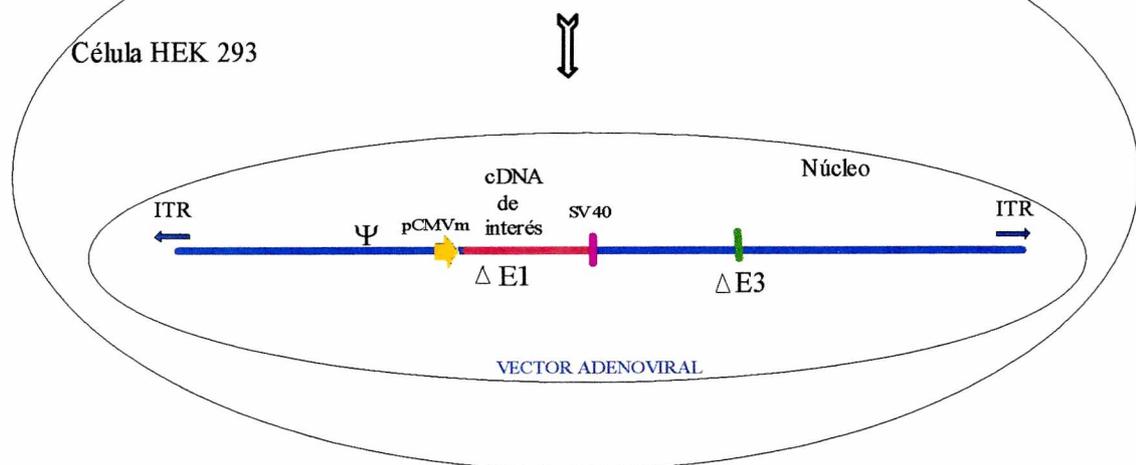


Figura 1- Metodología.- Esquema general de recombinación sitio específica mediada por FLP recombinasa en la construcción de vectores adenovirales recombinantes.

pCMVm: promotor del citomegalovirus murino; SV40: señal de poliadenilación; ψ : señal de encapsidación; ITR: repeticiones terminales invertidas; $\Delta E1$, $E3$: deleciones $E1$, $E3$; FRT: sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa.

2-2 Estrategia de construcción del plásmido de transferencia (shuttle) para el gen de IGF-I

La primer etapa de la construcción consistió en subclonar el cDNA de la región codificante de IGF-I en un vector intermedio, pCA14, con el objeto de introducir los sitios de restricción requeridos para la inserción del transgen en el plásmido shuttle apropiado (pDC515). Se procedió del siguiente modo:

El ADNc que contiene la región codificante del gen IGF-I (800pb), denominado inserto, fue rescatado del plásmido pBluescriptKS, de donde se escindió mediante doble digestión con las enzimas de restricción XhoI (extremo 5') y EcoRI (extremo 3'). El inserto se purificó mediante geles de agarosa y se subclonó en el plásmido pCA14, que había sido previamente cortado con las mismas enzimas de restricción, extraído y purificado.

Ya extraídos y purificados el inserto por un lado y el pCA14 linealizado por otro, se ligaron ambos fragmentos para recircularizar el plásmido conteniendo el cDNA del gen de IGF-I (plásmido pCA14-IGF-I). Se transformaron bacterias, se seleccionaron las colonias que habían incorporado el plásmido (con la visualización de las bandas correspondientes a 0,8 Kpb (inserto) y 6,95 Kpb (pCA14 linealizado) y fue amplificado (**Figura 2- Metodología**).

De la construcción obtenida se escindió nuevamente el cDNA del gen IGF-I mediante doble digestión con las enzimas de restricción BamH I (extremo 5') y Sal I (extremo 3') y el mismo se insertó a continuación del promotor del citomegalovirus murino del plásmido pDC515. Se transformaron bacterias con este plásmido pDC515-IGF-I y se amplificó a escala preparativa. También fue amplificado el plásmido genómico luego de transformar bacterias. Ambos plásmidos fueron purificados para empleárselos posteriormente en células (a continuación se detalla) y finalmente fueron cuantificados. Posteriormente, tanto el shuttle generado (pDC515-IGF-I) como el plásmido portador del genoma del adenovirus [pBHGfit(del)E1,3FLP] fueron cotransfectados en células HEK 293 (ver procedimientos de cotransfección en Metodología, mas adelante) para obtener así el vector adenoviral recombinante para IGF-Ib (RAd IGF-I).

Como vector adenoviral recombinante control (RAd β gal), tanto en los experimentos in vitro como in vivo, se utilizó un adenovirus recombinante cuya 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 Rous sarcoma virus long terminal repeat (RSV-LTR) (Stratford-Perricaudet et al., 1992). Este vector fue donado por el Dr. Michael Perricaudet (París) y en fue luego expandido en células 293, purificado y titulado como se indica para RAd- IGF I.

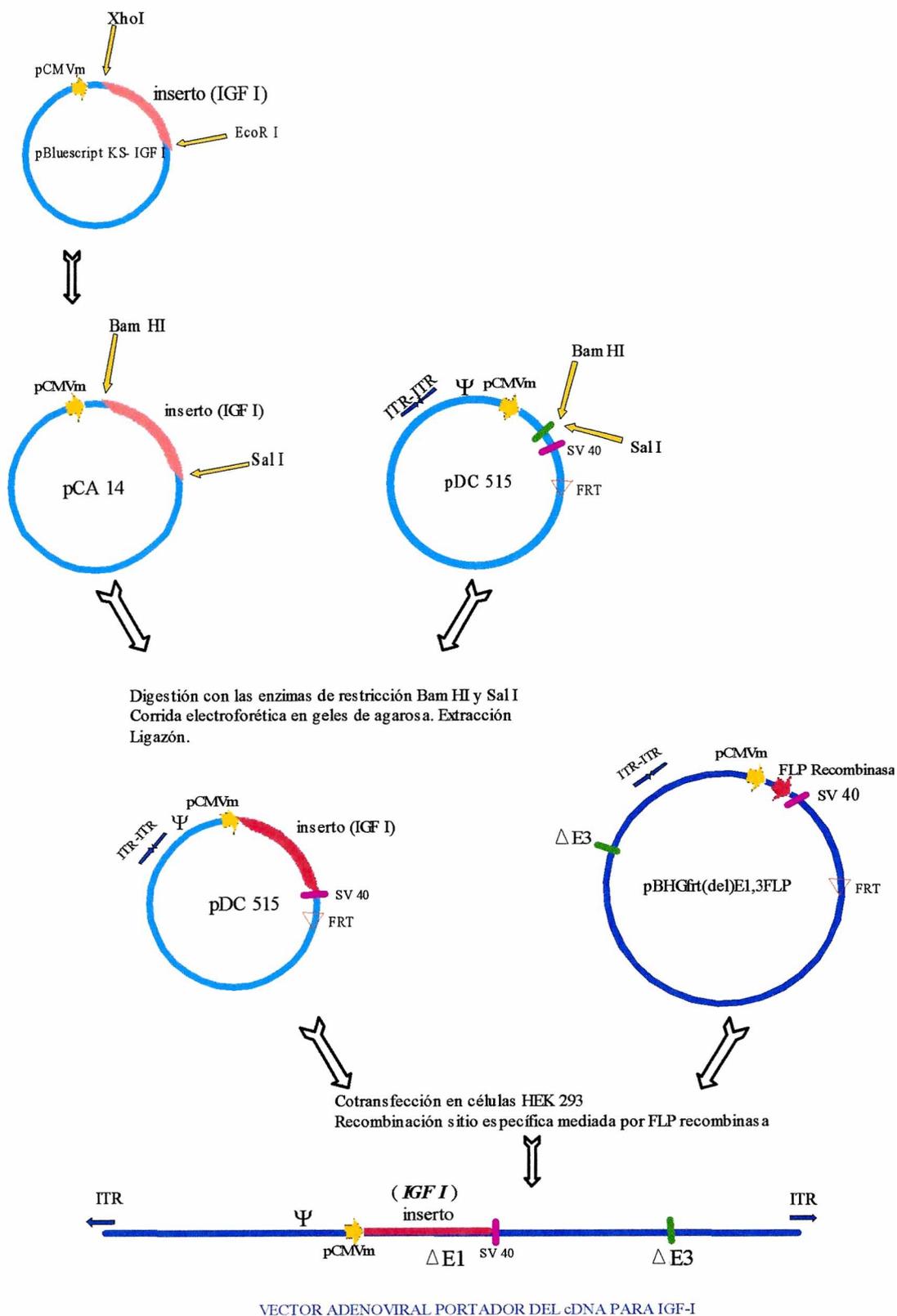


Figura 2- Metodología

Figura 2- Metodología. Diagrama descriptivo de la construcción del vector adenoviral portador del gen de IGF-1. Método de los dos plásmidos con recombinación sitio-dirigida por la FLP recombinasa.

pCMVm: promotor del citomegalovirus murino; SV40: señal de poliadenilación; ψ : señal de encapsidación; ITR: repeticiones terminales invertidas; $\Delta E1, E3$: deleciones E1, E3; FRT: sitios de reconocimiento de la FLP recombinasa.

2-3 Purificación de los plásmidos para su empleo en cultivos celulares

Para la transfección de células es necesario obtener plásmidos de alta pureza y para tales fines inicialmente se utilizó el método de ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Subsecuentemente se empleó el sistema de purificación Wizard Plus de Maxiprep, que es más rápido y generó también buenos resultados. A continuación se describen ambos métodos.

2-3 a Purificación de los plásmidos por ultracentrifugación en gradiente de CsCl

Por cada ml de la solución de ADN se colocó 1g de CsCl sólido, se mezcló hasta disolver y se incubó 30min en hielo para precipitar el ARN y proteínas. A continuación se centrifugó a 2.500 x g por 20-30min a 5°C en un rotor vasculante y se recogió el sobrenadante en un tubo de ultracentrifuga Beckman (rotor basculante SW60Ti). Se agregaron 80 μ l de bromuro de etidio (10mg/ml) por cada ml de la mezcla ADN-CsCl (con la finalidad de visualizar las fracciones en el tubo) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 49.000rpm (246.000 x g) por 24hs a 20°C.

Se obtuvieron 2 bandas (**Figura 3-Metodología**) una superior de ADN cromosómico y otra por debajo que corresponde al plásmido purificado. También se obtuvo un sedimento de ARN remanente. Se extrajo la banda correspondiente al plásmido y se le adicionó un volumen igual de butanol saturado con agua. Luego de centrifugar a 2.000 x g por 5 minutos se recuperó la fase acuosa inferior y este procedimiento se repitió 4 veces hasta la desaparición del bromuro de etidio. Se agregaron 3 volúmenes de agua; 2,5 veces del volumen total (agua + ADN) de etanol 96% y se incubó 20min a -20°C. Luego se centrifugó a 15.000 x g 15min, se lavó el sedimento con etanol 70%, se secó al vacío y el ADN precipitado fue luego resuspendido en buffer TE. En una alícuota se midió la

densidad óptica a 260 y 280 nm, a fin de determinar la concentración del plásmido purificado.

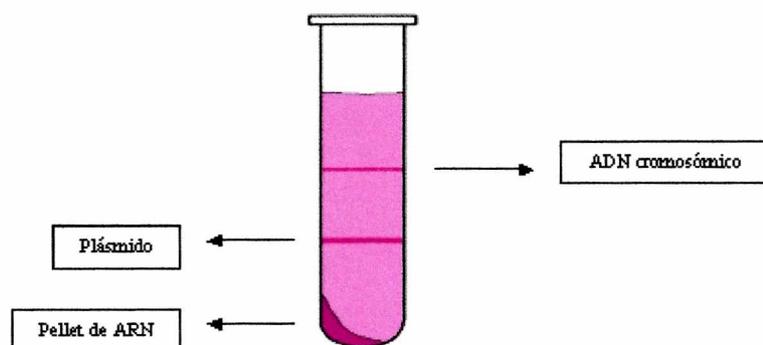


Figura 3-Metodología Gráfico descriptivo de las bandas obtenidas al realizar una purificación de plásmidos por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

2-3 b Purificación de plásmidos a escala preparativa: Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega Cat. A7270).

Para la obtención del ADN a partir de las células bacterianas, se centrifugó el medio de cultivo líquido (100-500ml) donde fueron crecidas las bacterias productoras del plásmido de interés, a 5.000x g durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en 15ml de la solución de resuspensión de células y se agregó 15ml de la solución de lisis incubándose por aproximadamente 20 min hasta que la mezcla se tornó clara y viscosa indicando lisis de las bacterias. Se adicionaron 15ml de la solución de neutralización y se centrifugó a 14.000 x g por 15min a temperatura ambiente. Se filtró el sobrenadante (Whatman GFA o GFC) y se le agregó 0,5 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 14.000 x g por 15min a temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante. El sedimento de ADN fue resuspendido en 2ml de buffer TE.

Para la purificación del ADN plasmídico así obtenido se agregaron 10ml de la resina Wizard para purificar ADN y se colocó la mezcla en una columna provista en el kit, conectándose el sistema completo a una bomba de vacío. La columna fue lavada con 25ml del buffer de lavado mientras se aplicaba vacío. Se adicionaron 5ml de etanol 80% a la

columna y se continuó aplicando vacío hasta lograrse la elución completa del etanol. La columna se colocó en un tubo de 50ml y fue centrifugada a 1.300 x g (2.500 rpm en rotor basculante Beckman JS-4,3) durante 5 min. Se secó la columna con vacío y se eluyó con 1,5 ml de agua caliente libre de nucleasas (a 65-70°C para plásmidos \geq 10 kb y a 80°C para plásmidos \geq 20 kb) centrifugándose la columna/reservorio a 1.300 x g durante 5 min. El eluato se filtró con filtro de 0,2 μ m y se centrifugó a 14.000 x g por 1 min. El precipitado de ADN obtenido fue resuspendido en buffer TE, cuantificado y almacenado -20°C hasta el momento de la cotransfección.

Los plásmidos purificados por ultracentrifugación en CsCl o por medio del kit Wizard quedaron de este modo listos para ser utilizados en los procedimientos de transfección de células que se describen en las secciones siguientes.

3- Cultivos celulares

3-1 Líneas celulares empleadas.

Las líneas celulares utilizadas para los distintos procedimientos que se describirán en las secciones siguientes fueron:

- Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293). Esta es una línea celular genéticamente modificada que expresa constitutivamente los productos de los genes adenovirales de la región E1 (delecionada en los vectores adenovirales) lo cual permite que nuestros vectores adenovirales recombinantes, que son replicación-deficientes, se repliquen en ellas. Estas células fueron empleadas para los procedimientos de generación, expansión y titulación de vectores adenovirales.
- Células B92 (derivadas de glía de rata) y N2a (derivadas de neuroblastoma de ratón), fueron empleadas en procedimientos in vitro para determinar la funcionalidad del vector construido.

El medio de cultivo utilizado para mantener estas tres líneas fue medio esencial mínimo enriquecido (MEM) (Sigma) suplementado con glucosa (4g/l), NaCO₃H (2,3g/l), HEPES-Na (4 g/l). Al medio se le adicionó 10% de suero fetal bovino (salvo aclaración en contrario). El medio se esterilizó por filtración a través de filtro con un diámetro de poro de 0,22µm. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera controlada al 5% CO₂.

Con el objeto de evitar posibles contaminaciones fúngicas o bacterianas, se adicionó al medio anfotericina B (3,3 mg/l) y penicilina/estreptomicina (20mg/l) (PAA Laboratory 100X y se emplea 1X cat P11-010).

Las tres líneas celulares crecen en monocapa, adhiriéndose a la base del pocillo que las contiene.

3-2 Procedimientos generales de cultivo de células

3-2-a Descongelamiento de células

Se retiraron las células de su sitio de almacenamiento en Nitrógeno líquido y se colocaron en un recipiente con agua a 37°C, pasándolas por inversión rápida a un tubo cónico apto para centrifugar (de 15 ml) conteniendo abundante medio de cultivo

(aproximadamente 10 ml) a fin de lavar el dimetilsulfóxido (DMSO) en el que se encontraban congeladas. Se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10min. El sedimento correspondiente fue suavemente resuspendido en 10 ml de medio de cultivo, distribuido en botellas y colocado en estufa en las condiciones ya descritas.

3-2-b Repique de las células

Los repiques se realizaron cuando las células alcanzaron aproximadamente un 90% de confluencia, procediéndose a diluirlas 1/3. El despegado de las células se realizó con tripsina o cítrico-salina, habiéndose obtenido buenos resultados con ambos procedimientos.

3-2-b 1 Método con tripsina

Se despegaron las células de sus pocillos contenedores con tripsina (PAA Laboratorios GMBH) 1x diluida en buffer PBS estéril y conservada a 4°C. La misma fue adicionada en cantidad suficiente para cubrir las monocapas. El desprendimiento de las células se controló al microscopio y al completarse el mismo se procedió a adicionar medio de cultivo para diluir la mezcla. La misma se centrifugó a 1.000 rpm durante 10min rescatándose el sedimento celular.

3-2-b 2 Método con ácido cítrico salina

Se utilizó una solución 1X de cítrico salina (partiendo de una solución madre 10X estando constituida por: 100g/l de KCl y 44g/l de NaCitrato en agua destilada). La dilución se realizó en agua destilada y se esterilizó, conservándose a 4°C hasta su empleo. El procedimiento de repique se realizó de igual manera que el de tripsina anteriormente descrito.

3-2-c Congelamiento de células

Para congelar células se utilizaron cultivos con un 75-90% de confluencia. Las células se despegaron por el procedimiento anteriormente descrito y fueron fraccionadas en alícuotas de aproximadamente 10^6 células por criotubo, en un volumen de 1 ml de medio de congelación (compuesto por: 50% de suero fetal bovino, 40% de medio MEM y 10% de

dimetilsulfóxido). Se las enfrió progresivamente siguiendo las siguientes etapas: 30 minutos a 4°C, 1 hora a -20°C, 1 hora a -70°C y finalmente se las almacenó en N₂ líquido.

3-3 Cotransfección

Las cotransfecciones se realizaron en células HEK293 de bajo número de pasaje (<40) según uno de los siguientes protocolos alternativos.

3-3 a Cotransfección por la técnica de CaCl₂

El día anterior a la cotransfección se sembraron placas con células 293 a una confluencia del 80%. Al día siguiente se les cambió el medio de cultivo (las células fueron crecidas y mantenidas durante todo el procedimiento en medio MEM 5% de suero fetal bovino).

Se emplearon placas de 6 pocillos, empleándose el siguiente esquema:

En un primer tubo se mezclaron 15µg de plásmido shuttle con 20µg del plásmido genómico, luego se completó el volumen a 90µl con agua destilada estéril y se adicionó gota a gota 10 µl de CaCl₂ 2,5M (tubo número 1).

Este contenido del tubo 1 fue transferido a otro tubo (número 2) conteniendo 100µl de HeBs 2x filtrado (para 500ml: Na₂HPO₄ 0,105g, NaCl 8,2g y Hepes 5,95g, PH 7,05-7,12). Se incubó la mezcla resultante del tubo 1 más el tubo 2, durante 20 min a temperatura ambiente, observándose al cabo de este lapso un fino precipitado blanco.

Luego, sobre el medio de cultivo recién incorporado a la monocapa, se agregó gota a gota la mezcla conteniendo los plásmidos, manteniéndose las células a 37°C toda la noche.

Al día siguiente se realizó un shock de glicerol. Para tales fines se agregó a la monocapa celular, MEM conteniendo 10% de glicerol estéril y se dejó interactuar por 2 minutos. A continuación se lavaron las monocapas 3 veces con 3ml de PBS, se les adicionó medio de cultivo para restablecerlas y se mantuvieron en estufa a 37°C hasta la visualización del efecto citopático (**Jordan M et al., 1996; Castro M. et al., 1996**).

3-3 b Cotransfección con lipofectamina (*Lipofectamine 2000 Reagent Invitrogen Cat N: 11668-027*)

(Cálculos realizados para 1 pocillo perteneciente a placas de 24-pocillos)

El día antes de la transfección las células fueron repicadas (colocando aprox $1-3 \times 10^5$ células por pocillo). Las mismas fueron conservadas en las condiciones habituales con 0,5ml del medio de cultivo al 10% suero fetal bovino. En estas condiciones, las células alcanzaban una confluencia máxima al 90% en el día de la cotransfección.

Al día siguiente se removió el medio de cultivo en el que se encontraban las células a transfectar y fue reemplazado por 0,5 ml de medio sin suero. En un primer tubo se colocó 1µg de DNA más 50µl de medio de cultivo sin suero (tubo 1). En un segundo tubo se pipetearon 3 µl de Lipofectamine2000 Reagent más 50µl de medio de cultivo sin suero, incubándose a temperatura ambiente por 5 minutos. Ambos tubos fueron mezclados e incubados por 30 min para permitir la formación del complejo DNA-LF2000. Luego se agregaron los 100µl finales resultantes de la mezcla del tubo 1 más el tubo 2, directamente sobre las células a transfectar. Las placas fueron rotadas para lograr una distribución uniforme de la lipofectamina. Las células se incubaron con el complejo DNA-LF2000 a 37°C durante 4-6hs. Se aspiró el sobrenadante de las monocapas y se les agregó MEM 5% suero fetal bovino, condiciones en las que se mantuvieron hasta la visualización del efecto citopático.

Las placas de lisis se observaron a partir de aproximadamente 8-14 días después de la cotransfección. Se adicionó medio de cultivo cada 3 días a las células para mantenerlas viables mientras se esperaba la aparición del efecto citopático evidenciado por el desarrollo de placas de lisis. Como control positivo se preparó una muestra de pFG140 de 0,5-1µg/placa. Este plásmido contiene el genoma completo del AdV salvaje y debe producir al menos 50-100 placas de lisis.

Si bien se obtuvieron resultados satisfactorios con ambas técnicas de cotransfección, la lipofectamina ofreció mejor eficiencia y agilidad por lo que fue adoptada como técnica de rutina en el laboratorio.

3-4 Procesamiento y controles de las células cotransfectadas.

Una vez que el efecto citopático (CPE) fue completo (esencialmente todas las células aparecen redondeadas y se ven muchas flotando), se procedió a procesar los cultivos transfectados. Aunque el 100% de los virus recuperados deberían contener y expresar el transgén deseado, es aconsejable obtener una preparación monoclonal del vector generado por medio de purificación por placas y posteriormente confirmar la estructura del virus aislado.

Se raspó cuidadosamente con una pipeta las células que todavía permanecían adheridas y se recogió el medio con las células. Se centrifugó a 1.000 rpm rescatándose el sedimento celular (con el fin de concentrarlas). Se resuspendió el sedimento celular en un volumen menor (2 o 3ml de PBS o medio de cultivo, dependiendo de la cantidad de células obtenidas). Se congeló y descongeló esta suspensión 3 veces para lisar las células y liberar su contenido viral, centrifugándose las luego durante 10min a 1.000rpm y recuperándose los sobrenadantes ricos en virus (**Lowenstein et al., 1996**).

Parte de estos sobrenadantes se mezclaron con igual volumen de glicerol para empleárselos ulteriormente como inóculos iniciales (que denominamos lisados crudos). Se los almacenó a -70°C. Una alícuota de dichos lisados fue procesada para correr geles e identificar la banda correspondiente al genoma del vector adenoviral esperado, confirmando de este modo que el vector deseado fue realmente generado. Para tales fines se lisó la cápside viral empleando un buffer de lisis con proteinasa K cuya composición es: 0,5mg/ml de proteinasa K (solución madre empleada 20mg/ml la cual se conservó a -20°C); 0,5% SDS; 10 mM EDTA pH: 8,0; 10 mM TRIS pH: 7.4.

A la alícuota destinada para el chequeo se le adicionó igual volumen de buffer de lisis y se incubó a 37°C por 6 horas (también funcionó con incubación durante toda una noche, acorde a otros protocolos probados). Con el fin de purificar la muestra, se adicionó igual volumen (sobrenadante + buffer de lisis) de SS- fenol y se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 min rescatándose la fase acuosa. A esta última se le adicionó 0,1 volúmenes de AcNa más 2,5 volúmenes de etanol 96% y se dejó la mezcla precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 15.000rpm durante 15min, se lavó el sedimento con igual volumen de

alcohol 70%, centrifugándose nuevamente en iguales condiciones. Se rescató el sedimento de ADN, se secó al vacío y se resuspendió en aproximadamente 30 μ l de agua destilada.

Se corrió un gel al 0.7% de agarosa para chequear la banda de 31,82kpb correspondiente al genoma del vector adenoviral construido. El gel fue resuelto en una cuba electroforética de campo pulsante (Field Inversion Gel Electrophoresis o FIGE) dado que por el gran tamaño del ADN viral, la banda no se pueden resolver en sistemas comunes (mayores detalles en sección 1 de Resultados).

También se digirió con la enzima de restricción Hind III una alícuota del ADN procedente del vector viral generado (RA_d-IGF-I). Esta alícuota fue procesada de la manera recién descrita (para el chequeo del genoma viral entero por FIGE), pero fue resuelta en cubas electroforéticas clásicas donde pudo observarse la presencia del patrón correcto (de 13 bandas) en geles de agarosa al 0,8% (**Figura 4-Metodología**)

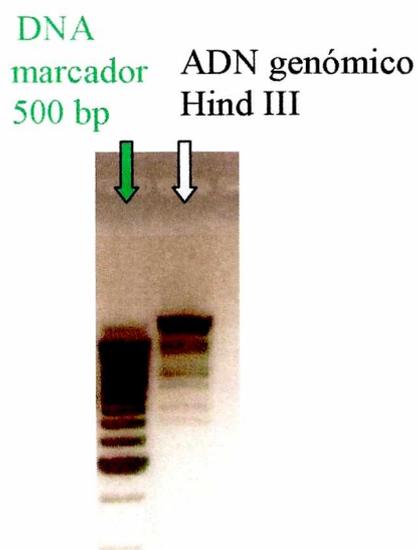


Figura 4-Metodología.

Corrida electroforética correspondiente al ADN genómico viral (RA_d-IGF-I) luego de la digestión con la enzima de restricción Hind III.

3-5 Screening de las placas de lisis conteniendo el vector adenoviral recombinante rescatado mediante purificación en placa

Con dicho propósito, se emplearon células 293 y fueron crecidas en placas de 6 pocillos. Se prepararon 5 diluciones crecientes (1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32) del lisado crudo del vector rescatado en el procedimiento anteriormente descrito. Cuando las células alcanzaron un 60% de confluencia, se les aspiró el medio de cultivo y se adicionó 200µl de la dilución viral correspondiente. A la sexta fosa se le agregó medio de cultivo solamente, como control. Se realizaron movimientos circulares para una mejor distribución del vector viral y se incubó 1 hora en estufa para permitir la adsorción del virus a la superficie celular agitando suavemente la placa cada 15 min. Se aspiró el sobrenadante y se agregaron sobre las monocapas 2 ml de agar al 1% (preparado previamente con igual volumen de medio MEM 2X al 5% de suero fetal bovino) para que las nuevas partículas virales generadas no difundan por toda la monocapa. Las placas se mantuvieron en la estufa por una semana, agregándoseles sobre el agar medio de cultivo fresco cada 2 o 3 días (se utilizó agarosa Sheakem LE FMC Bioproducts cat 50004). Se eligieron placas bien aisladas sacando bocados del agar con una pipeta Pasteur y fueron transferidas c/u de ellas a 1 ml de PBS con 10% de glicerol. Las placas así aisladas fueron conservadas a -70°C. Algunas de ellas fueron seleccionadas y amplificadas en células 293 con la finalidad de obtener los resultados confirmatorios del análisis de estructura viral (siguiendo idéntico protocolo de chequeo para los lisados crudos descritos anteriormente) (Hitt M, 1998).

Una vez obtenida, purificada y chequeada la placa de lisis, se realizó la expansión con fines preparativos.

3-6 Expansión a escala preparativa del Vector Recombinante.

La placa aislada fue amplificada infectando monocapas de células HEK 293. Para tales fines fueron necesarias de 6-8 botellas grandes (180cm²) con monocapas a una confluencia de 60-70%. Se infectaron las células con el producto viral obtenido de la placa aislada y se esperó el efecto citopático (CPE). Una vez que el efecto citopático (puesto de manifiesto por una morfología celular tendiente a ser más redondeada, grande y por el

desprendimiento de masas celulares) se observó sobre toda la monocapa, se procedió a procesar las células, levantando las que se encontraban flotando y despegando por raspado cuidadoso las células que todavía permanecían adheridas a la base de las botellas. Se centrifugó a 1.000rpm y el sedimento celular fue resuspendido en un volumen menor, el cual se congeló y descongeló 3 veces para lisar las células y liberar así su contenido viral. Se centrifugó luego 10 min a 1.000 rpm y se rescató el sobrenadante (lisado crudo) conteniendo la progenie de los vectores recombinantes, los cuales fueron conservados a -70°C hasta su posterior purificación.

3-7 Purificación del stock viral para su utilización in vivo

3-7-a Ultracentrifugación en gradiente discontinuo de CsCl

Se utilizaron tubos plásticos de centrifuga de 4,4ml (Beckman Mod. L7-65), y a cada uno de ellos se les adicionó 0,20ml de CsCl de una densidad de 1,50 g/ml, seguido de una segunda capa de 1 ml de CsCl a una densidad de 1,35 g/ml, a continuación una tercera capa de 1ml de CsCl de densidad 1,25g/ml y sobre este gradiente discontinuo se colocó 1,7 ml de la suspensión viral obtenida previamente (lisado crudo). Para completar el volumen al ras de la boca del tubo se adicionó volumen necesario (500µl en este caso) de solución 0,1M Tris-HCl a pH 8,0.

Una vez equilibrados los tubos se ultracentrifugaron a 180.000 x g (45.000 rpm) por 1 hora en un rotor swinging SW60Ti a 18°C. Se recogió por aspiración la banda del virus (situada entre las zonas de densidad 1,25 y 1,35 g/ml) en el menor volumen posible (0,5-1 ml).

3-7-b Ultracentrifugación isopícnica de CsCl ($\bar{\rho}$ =1,35g/ml)

La banda obtenida anteriormente fue nuevamente purificada por ultracentrifugación isopícnica de densidad correspondiente a CsCl 1,35g/ml a 180.000 x g por 18 horas. Se empleó el mismo rotor y las mismas condiciones de temperatura. Se recuperó la banda correspondiente al vector adenoviral.

3-7-c Diálisis a través de membrana

La banda rescatada de la segunda ultracentrifugación fue dializada 1 h en 1 litro de buffer Tris 10mM, cloruro de magnesio 1mM, cloruro de sodio 135mM a pH 7,5. Se renovó el buffer de diálisis y se dializó otra hora.

Esta preparación altamente purificada fue alicuotada y guardada a -70°C para su empleo en los experimentos que se describen en el presente trabajo de tesis (**Precious B and Russell WC, 1985**).

3-8 Titulación del vector adenoviral recombinante

La titulación de los vectores fue realizada mediante el método de dilución por placas. Para tales fines, se sembraron células 293 y cuando las monocapas alcanzaron un 60% de confluencia se infectaron por triplicado con 200µl de diluciones crecientes, en medio MEM 10%, (desde 1×10^{-3} hasta 1×10^{-13}), de la preparación viral purificada. Al último pocillo se le adicionó medio de cultivo solo como control negativo. Se rotaron las placas y se las dejó en reposo para permitir la adsorción del virus a la superficie celular.

Al tercer día se agregó 2ml de agar 1,5% y medio MEM 5% SFB sobre las monocapas infectadas. Luego de aproximadamente una semana post-infección, a partir de la última dilución con efecto citopático, se calculó el título viral (**Precious B and Russell WC, 1985**). Una vez observadas las placas de lisis, fueron contadas y determinadas las unidades formadoras de placa/ml (pfu/ml).

4-Protocolos de transferencia génica

4-1 Transferencia génica in vitro

Para realizar los experimentos de expresión *in vitro* a partir del vector RAd-IGFI generado, se sembraron células (ver en Resultados para mayores detalles) en placas de 6 pocillos. Al llegar su confluencia al 70-80%, se les reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo 2×10^9 pfu/ml de RAd βgal o Rad-IGFI. Luego de tres días se recogieron los sobrenadantes por aspiración, y las monocapas celulares se rescataron por

raspado previa adición de 1ml de MEM por pocillo. La suspensión celular fue luego congelada y descongelada 3 veces, centrifugada a 1.000 x g por 10 min y los lisados fueron recogidos. Los niveles de IGF-I se dosaron por RIA tanto en sobrenadantes como en lisados celulares.

4-2 Transferencia génica in vivo

4-2 a Animales

En todos los experimentos in vivo del presente trabajo se emplearon ratas hembras de la cepa Sprague Dawley jóvenes (5 meses) y seniles (28 meses), provenientes de la colonia de nuestro Instituto. Las ratas se mantienen en un cuarto con temperatura controlada ($22\pm 2^\circ\text{C}$) bajo un ciclo luz/oscuridad de 12:12 hs., con alimento y agua *ad libitum*.

4-2 b Cirugía estereotáxica

Las ratas se anestesiaron con ketamina (40 mg/kg peso corporal, i.p.) y xilazina (8 mg/kg de peso corporal, i.m.). Los animales se ubicaron en un aparato estereotáxico tipo Kopf y fueron fijados por tres puntos: ambos meatos acústicos externos y el par de dientes incisivos (**Figura 5-Metodología**).

Se efectuó una incisión en la línea media de la piel que cubre la superficie dorsal del cráneo y con una fresa odontológica de 0.9 mm de diámetro, se practicó un orificio en las coordenadas apropiadas, que en todos los casos fueron referidas al punto bregma (**Paxinos y Watson, 2000**). Para acceder al hipotálamo, (región arcuato-periventricular) se utilizaron las siguientes coordenadas: 3 mm en el eje anteroposterior (AP), 10 mm en el dorsoventral y 0,6 mm en el lateral.

Una vez introducida la aguja se esperaron 5 minutos antes de inyectar a fin de permitir que se equilibrara la presión mecánica que ejerce la aguja. Se inyectaron bilateralmente 1,5 μl de la suspensión viral apropiada, utilizando una jeringa Hamilton de 10 μl ; la inyección se efectuó en dos etapas de 3 minutos cada una, inyectando el 50 % en cada etapa. Antes de

retirar la jeringa se esperan otros 5 minutos a fin de evitar el reflujo del fluido inyectado. Por último, la herida de la piel se suturó y el animal fue devuelto a su jaula, donde en general se recuperan rápidamente.

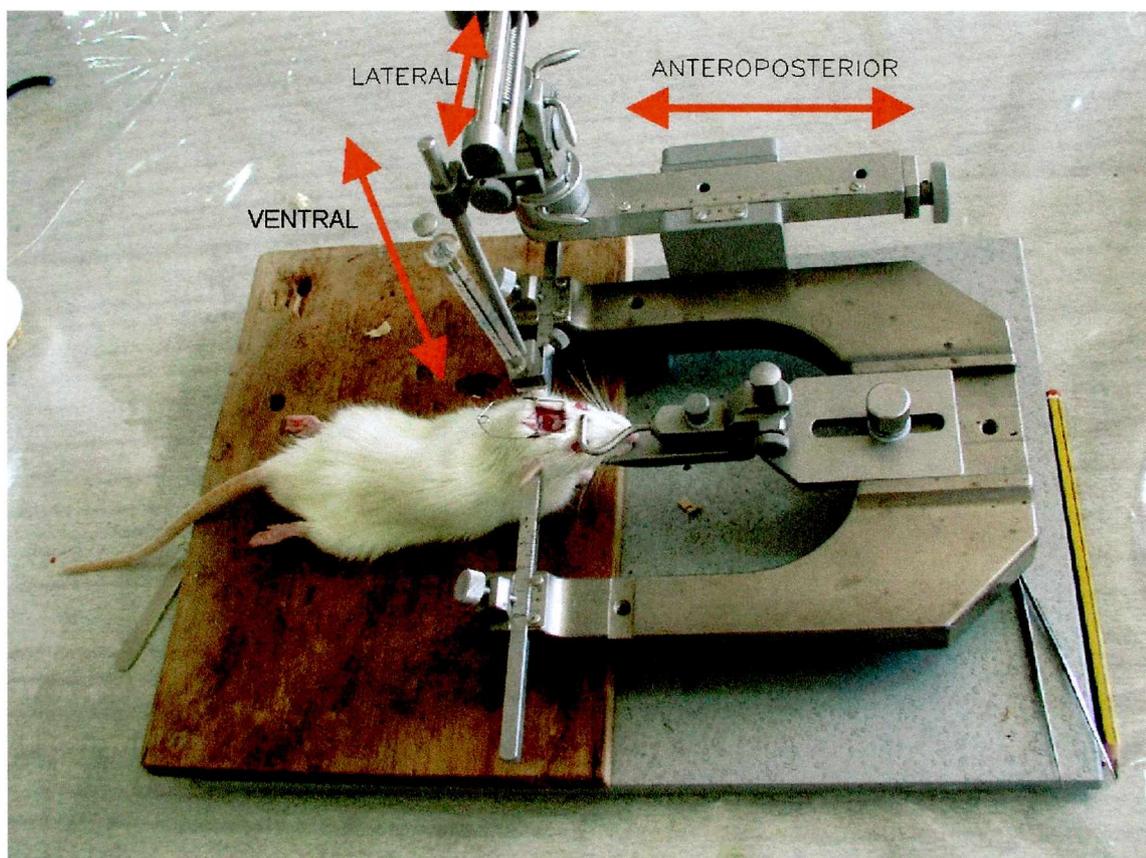


Figura 5- Metodología.- Inyección estereotáxica.- El animal se encuentra colocado en un aparato estereotáxico tipo Kopf. Pueden observarse las tres guías del instrumento (flechas rojas), una anteroposterior (AP), otra lateral (L) y la tercera ventral (V) que permiten fijar las coordenadas de inyección (Cortesía de Gustavo Morel).

4-2 c Eutanasia, perfusión y procesamiento del encéfalo

Los animales fueron anestesiados con ketamina (40 mg/kg peso corporal, i.p.) y xilazina (8 mg/kg de peso corporal, i.m.) y luego fueron perfundidos. Para acceder al corazón se efectuó una incisión a la altura del esternón, se cortó el diafragma y las costillas. Luego se canuló en el ventrículo izquierdo (**Figura 6-Metodología- panel B**) efectuándose

un pequeño corte en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Se perfundió a una velocidad de 15 ml/min con una bomba peristáltica (Gilson modelo MP312), primero pasando 100 ml de solución salina al 0,9% heparinizada (0,86 UI/ml), luego otros 100 ml de salina y finalmente 200 ml de fijador de Zamboni en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (detalle de la preparación de las soluciones a continuación). El fijador de Zamboni posee la ventaja de contener ácido pícrico, que por su color amarillo actúa como indicador del nivel de penetración del fluido en el encéfalo (**Figura 6- Metodología-panel A**).



Figura 6-Metodología.- Fijación por perfusión.- El animal es perfundido a través del corazón. La bomba peristáltica impulsa el fijador que ingresa a la circulación del animal por el ventrículo izquierdo (V.I.) y luego de bañar los tejidos emerge por la aurícula derecha. (A) Vista panorámica del sistema de perfusión. (B) Vista más detallada de la aguja insertada en el ventrículo izquierdo (V.I.). (Cortesía de Gustavo Morel)

Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina y el encéfalo se disecó cuidadosamente, se fijó en solución de Zamboni durante toda la noche. Al día siguiente los cerebros se transfirieron a solución crioprotectora de Zamboni con 30% de sacarosa manteniéndolos en ella durante un mínimo de 24 hs antes de su procesamiento. En aquellas ocasiones en las que los cortes no fueron efectuados en lo inmediato, los cerebros se conservaron en solución criopreservadora hasta su procesamiento.

Los bloques encefálicos fueron cortados en secciones coronales de 40 μ m con un micrótopo Reichert de congelación, que utiliza nieve carbónica (CO₂ sonda; -70°C), recogiendo las secciones en una placa plástica de seis pocillos (six-well plate) en grupos de cortes no contiguos en solución salina tamponada con fosfato (PBS, phosphate buffered saline).

Soluciones necesarias para el procedimiento de perfusión:

-Fijador de Zamboni: paraformaldehído al 10% (Concentración final: 40%), buffer fosfato (PB) 0,2M (Concentración final: 50%), solución de ácido pícrico saturado (Concentración final: 7%) y Agua destilada (Concentración final: 3%).

-Solución criopreservadora: Para preparar 100ml: Sacarosa 30grs, Polivinilpirrolidona (PVP) 1gr, Etilenglicol 30ml, Buffer fosfato 0,4M 25ml. Para la preparación de paraformaldehído al 10% se disolvieron 8 gr de paraformaldehído en 80 ml de agua destilada, se calentó a 50-60 °C en una platina caliente durante 1 día y se adicionaron 5 gotas de NaOH 1M. Luego se filtró en PBS (100ml) frío conteniendo 8,2 g de sacarosa PH 7.4 y se llevó a volumen final de 200ml con agua destilada.

-Solución de Buffer fosfato (PB) 0,4M PH 7,4 para 1 litro de agua destilada: 14,34 g de NaH₂PO₄, 2H₂O y 100,30 g de NaH₂PO₄, 12H₂O)

4-2 d Técnica de obtención de bocados (punches) de tejido encefálico

En los experimentos donde el tejido cerebral fue destinado al dosaje por RIA de IGF-I (y no al análisis histológico) se procedió a extraer los cerebros inmediatamente luego de ser decapitado el animal y se los congeló en hielo seco. Luego con un bisturí fue seccionado el diencefalo mediante cortes coronales de aproximadamente 2 mm de espesor. Se seleccionó el corte que se encuentra entre los límites frontal y caudal de la EM donde se encuentra localizada la región del hipotálamo medio basal (MBH). Con un sacabocado de 4mm de diámetro interno, se extrajo la región hipotalámica conteniendo los núcleos periventricular, paraventricular y arcuato. Estas regiones se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su procesamiento por radioinmunoensayo para dosaje de IGF-I en el tejido.

5-Técnicas Histológicas

5-1 Inmunohistoquímica

Los cortes destinados a inmunohistoquímica fueron lavados en buffer fosfato PBS Tritón (PBST) 2 veces durante 10min (detalle de la preparación de las soluciones a continuación). Luego se les realizó el bloqueo inespecífico de los sitios de pegado de los anticuerpos, incubándose los con 4 gotas de suero normal de caballo en 20 ml de PBST (acorde al protocolo de Vector Laboratories) durante 40min-60min. Posteriormente se lavaron con PBST por 10min y se incubaron con el anticuerpo primario durante 48 hs a 4°C. Con la finalidad de observar marcación de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas se empleó como anticuerpo primario Anti Tirosina hidroxilasa (TH) monoclonal (Calbiochem cat# 657010) con una dilución 1/200 en PBST.

A continuación se lavaron los cortes cerebrales durante 10min con PBST y se procedió a revelar la reacción con el kit ABC (Vectastain Universal Elite ABC kit Cat# PK-6200 Vector Laboratories). Se incubaron los cortes con el Anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se realizaron 2 lavados de 10min en PBST. Luego se eliminó la peroxidasa endógena con H₂O₂ 0,3% incubándose los cortes durante 30min. Posteriormente se lavaron 2 veces por 10min con PBST y se incubaron en el complejo ABC durante 1 1/2 h. A continuación se lavaron nuevamente 2 veces por 10min con PBST.

El revelado de las secciones encefálicas se realizó con solución de 3,3-diaminobencidina (DAB), de acuerdo al protocolo del Kit de Vector empleado. Los cortes fueron luego incubados por tan solo 3-4segundos en DAB hasta que los bordes tomaron un tono marrón tenue. Inmediatamente fueron sumergidos en Solución Salina tamponada con fosfato (PBS) para luego ser montados sobre vidrios recubiertos previamente con una capa de gelatina al 0,6%. Se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 48 hs. Los vidrios con los cortes ya secos fueron colocados en agua destilada 30 seg (en caso de realizar una coloración de fondo se incubaron con Violeta de Cresilo al 1% durante 1 min siguiéndose la coloración al microscopio). Luego se procedió a comenzar la deshidratación con etanol (EtOH) 70 % durante 30seg, luego EtOH 90 % por 1min, EtOH 96 % 1 min, EtOH 100 % 3 min, 2 pasajes por Xilol 30 seg cada uno y finalmente fueron fijados con la

solución de montaje Vectamount (Vecta Mount Cat# H-5000 Vector laboratories) para la visualización microscópica.

Soluciones necesarias para realizar las inmunohistoquímica:

- Solución Salina tamponada con fosfato (PBS): 9 grs/l de Na Cl y 250ml de PB 0,4M.

-PBST: Para volumen final de 500ml, fue preparado con 125ml de solución de buffer fosfato 0,4M PH 7,2-7,4; 4,5grs de NaCl y 2 ml de triton al 10%.

-Preparación del Anticuerpo secundario biotinilado acorde a protocolo estipulado: 2 gotas del Ac biotinilado y 2 gotas de suero de caballo en 10 ml de buffer PBST.

-H₂O₂ 0,3%: 100 µl de H₂O₂ de 30 volúmenes en 10 ml de PBST.

-Preparación del complejo ABC acorde a protocolo: 2 gotas de A y 2 gotas de B en 5ml de PBST.

-3,3-diaminobencidina (DAB): 4 gotas de DAB, 2 gotas de H₂O₂, 2 gotas de buffer stock Solution y 5 ml agua destilada.

-Solución de gelatina para preparar los vidrios: 0,6 % de gelatina y 0,6 % de alumbre de cromo y aluminio AlCr (SO₄) disueltos a 60°C. En esta solución fueron sumergidos los vidrios 1 día, luego escurridos, secados en estufa a 37°C y conservados a temperatura ambiente.

5-2 Enzimohistoquímica

En los animales inyectados con RAD βgal, las secciones hipotalámicas fueron sometidas a enzimoquímica para β-galactosidasa de E.Coli. Las secciones fueron incubadas toda la noche en una solución 0,01% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido (X-gal); (Calbichem, San Diego Ca), 5mM K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆, 2mM MgCl₂. La X-gal es un sustrato soluble e incoloro de la β-galactosidasa que por acción de la enzima se convierte en un precipitado azul, permitiendo así detectar la presencia de células que expresen esta enzima bacteriana.

A continuación se lavaron los cortes cerebrales durante 10 min con PBST y fueron deshidratadas y montadas para la observación microscópica.

6-Análisis de imágenes

6-1 Organización de las secciones cerebrales

Cada bloques cerebral fue cortado en un procedimiento serial de 6 secciones, con la finalidad de obtener el hipotálamo entero en secciones seriales. Típicamente la región hipotalámica completa comprende alrededor de 48 secciones coronales, obteniéndose 6 sets de 8 secciones seriales no contiguas. Para los fines del recuento neuronal, cada set de 6 cortes fue considerado como representativo del hipotálamo completo en ese punto coronal. Para cada animal, en un set de secciones fue realizado el procedimiento de inmunohistoquímica para TH (descripta anteriormente).

6-2 Conteo de neuronas TH+

Las imágenes de las regiones dopaminérgicas hipotalámicas ARC-PeV (A₁₂) y PaV (A₁₄) fueron capturadas usando una video cámara digital RGB Olympus DP70 adosada a un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51; Tokio, Japón). Dichas imágenes digitales fueron luego analizadas con el empleo de un programa específico para tales fines (ImagePro Plus v5.1; Media Cybernetics, Silver Spring, MA).

Dichas imágenes fueron tomadas en formato TIFF, con una resolución de 1.360x1.024 pixels y el campo correspondiente fue de 0,07µm/pixel para determinaciones morfométricas y 0,21 µm/pixel para conteo de células. Para lograr aislar el objeto de interés (neuronas inmunorreactivas para TH) del tejido circundante se aplicaron filtros a las imágenes. Se realizaron conteos manuales y automáticos para verificar la confiabilidad de los datos. Solo se contaron células nucleadas. Las neuronas fueron morfométricamente caracterizadas según los siguientes parámetros: área celular (reporta el área de cada objeto), ejes mayor y menor (reporta la longitud de los ejes mayor y menor de la elipse respectivamente), aspecto (refleja la relación entre la longitud de los ejes mayor y menor de la elipse equivalente al objeto), perímetro y redondez. Este último refleja la cercanía a un círculo de cada objeto, y está determinada por la siguiente fórmula: $(\text{perímetro}^2) / (4 * \pi * \text{área})$; los objetos circulares tendrán una redondez = 1; otras formas serán redondez > 1. La densidad óptica integrada (IOD) (definida como la intensidad de marca correspondiente al

área inmunomarcada) de las secciones hipotalámicas fue determinada en ratas seniles con la finalidad de estimar el número de antígenos TH presentes en la región de análisis.

El número total de cuerpos neuronales inmunoreactivos con DAB, se estimó usando la siguiente ecuación (Sánchez HL et al., 2003):

$$N = \frac{d}{n \cdot s} \sum_{i=1}^n x$$

Donde, N = número total estimado de cuerpos neuronales teñidos con DAB; d = longitud (mm) del eje rostro-caudal de la región que se estudia; n = el número de secciones no contiguas contadas por región; s = espesor de la sección (40 μ m); x = número de células contadas por secciones no contiguas estudiadas (de la sección # 1 a la sección # n).

7- Radioinmunoensayos (RIA)

Los niveles de Prolactina (PRL), Hormona de crecimiento (GH) e IGF-I séricos como así también los dosajes de IGF-I en tejido fueron determinados mediante RIA. En el caso correspondiente a dosajes de IGF-I provenientes de tejido cerebral como de suero, debió realizarse un procedimiento previo de crioprecipitación ácida – etanólica (Breier BH et al., 1991) para lograr la liberación del péptido de sus proteínas unidoras. Los niveles de IGF-I fueron determinados como previamente se describió (Díaz-Torga et al., 2002) empleando el anticuerpo (UB2-495), provisto por los Dres L. Underwood y J.J. Van Wyk, y distribuido por el Programa de distribución de NIDDK y Dr. A.F. Parlow. Como radioligando y ligando no marcado, fue utilizado IGF- I recombinante humano (rh IGF-I, Chiron Corp., Emeryville, CA).

Para los dosajes de PRL sérica se emplearon materiales provistos por Dr. A. F. Parlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance CA.

Los valores séricos de progesterona y 17 β -estradiol fueron medidos por RIA usando kit comercial en fase sólida (Coat-A-Count, DPC, Los Angeles, CA).

La marcación con ¹²⁵I de PRL, GH e IGF-I para llevar a cabo los RIA se realizó por el método del iodógeno (1,3,4,6-tetracloro-3 α , 6 α -difenílglicourilo; Iodogen®, Pierce Chemicals, Ltd.) (Fraker Pamela J. and Speck John C. Jr., 1978).

Las curvas de referencia se realizaron con concentraciones de estándares de: 200ng/ml; 100ng/ml; 50ng/ml; 25ng/ml; 12,5ng/ml; 6,25ng/ml; 3,13ng/ml; 1,56ng/ml y 0,78ng/ml; (tanto para GH como para PRL).

8-Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre grupos de estudio, se emplearon adecuadamente el t-test o análisis de varianza (ANOVA). El método Tukey's fue elegido como post hoc test. Diferencias significativas entre áreas hipotálamicas de grupos de ratas fueron definidas a aquellas con $P < 0,05$ (*). Diferencias altamente significativas fueron definidas a aquellas que presentaron un valor de $P < 0,01$ (**).

RESULTADOS OBTENIDOS

1- Construcción del Vector Adenoviral Recombinante para IGF-I (RAAd IGF-I)

Para mencionados fines, el ADNc codificante correspondiente a IGF-I fue insertado en el sitio de clonado múltiple (MCS) del plásmido pDC515, obteniéndoselo del plásmido pCA14 (cuya estrategia de construcción y demás procedimientos se detallan en Materiales y Métodos). A continuación, células HEK293, se cotransfectaron con pDC515 (portando el cADN de IGF-I) y pBHGfrt(del)E1, 3FLP; en estas condiciones la FLP recombinasa se expresa en las células HEK293 y cataliza eficientemente la recombinación de ambos plásmidos generándose de este modo el genoma del vector RAAd-IGF I deseado (**Figura 1-Resultados**).

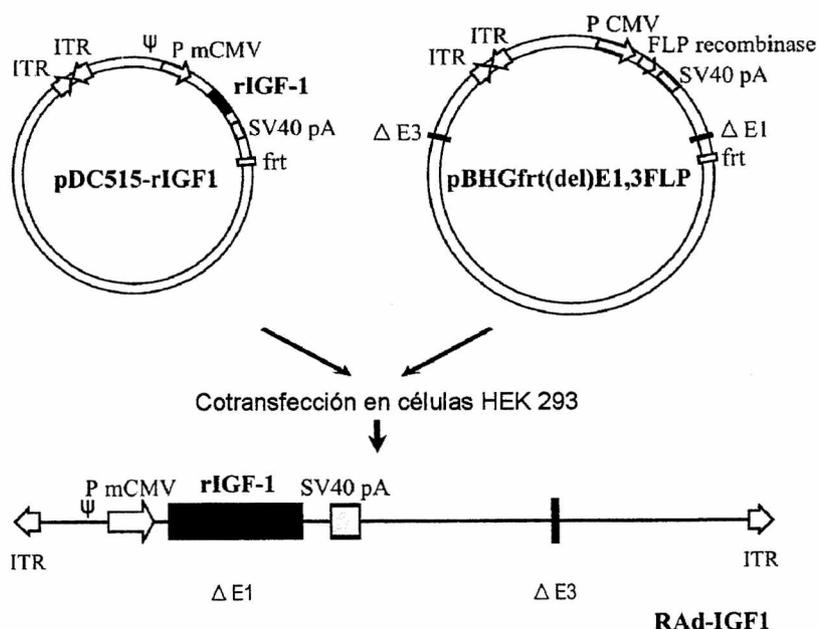


Figura 1-Resultados. Esquema ilustrativo correspondiente a la construcción del vector adenoviral recombinante para IGF-I

El vector fue construido por el método de los dos plásmidos, según se ha descrito en Materiales y Métodos. PmCMV, promotor de citomegalovirus murino; frt, elemento de

reconocimiento para la FLP recombinasa de levadura; ITR, repeticiones terminales invertidas; $\Delta 1$ y $\Delta 3$, deleciones en el genoma del Ad V; SV40, señal de poliadenilación de Simian virus 40; ψ , señal de encapsidación.

El vector así generado fue expandido y purificado a partir de células HEK293 infectadas con el vector. Se obtuvieron los lisados crudos conteniendo altos niveles de RAd-IGF I, los cuales se purificaron por ultracentrifugación en CsCl. Subsecuentemente, el ADN del virus purificado se caracterizó en geles de agarosa de campo pulsante (FIGE), pudiéndose verificar que el tamaño de su genoma coincidía con el esperado (31,82 Kpb). El resultado del FIGE realizado confirmó que el ADN del vector poseía el tamaño esperado (**Figura 2- Resultados**). El stock de virus purificado se tituló por el método de dilución en placas, determinándose que poseía un título de $1,4 \times 10^{12}$ unidades formadoras de placa (pfu) /ml.

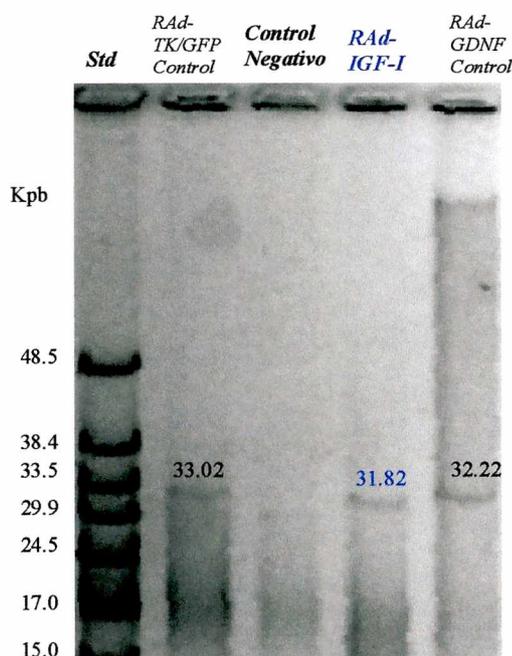


Figura 2 – Resultados.- ADN Genómico de diferentes RAds corridos en geles de electroforesis de campo invertido pulsante (Field Inversion Gel Electrophoresis –FIGE-system).

De izquierda a derecha, las bandas corresponden a un standard de ADN de peso molecular; RAd TK-GFP (empleado como vector adenoviral recombinante control);

control negativo (no virus); RAd-IGF I y RAd-GDNF (también empleado como vector adenoviral recombinante control).

Las bandas correspondientes al genoma de los vectores virales mostradas, corresponden al tamaño de los respectivos genomas virales incluyendo al de RAd-IGF-I.

2- Transferencia Génica con RAd-IGF I in vitro

RAd-IGF-I indujo un significativo aumento en la expresión de IGF-I en cultivos de células neuronales N2a (**Figura 3A-Resultados**) y gliales B92 (**Figura 3B-Resultados**), si se las compara con sus correspondientes contrapartes incubadas con el vector RAd- β gal empleado como control. Este aumento en la expresión de IGF-I fue observado, en mayor o menor medida, tanto en lisados como en sobrenadantes celulares.

En las células gliales, RAd IGF-I indujo un marcado incremento en el IGF-I liberado. Ambos tipos de células produjeron niveles basales comparables de IGF-I cuando fueron incubadas por tres días con RAd- β gal o medio de cultivo solamente.

No fue detectado efecto citotóxico por parte del vector adenoviral recombinante en ninguna de las líneas celulares empleadas.

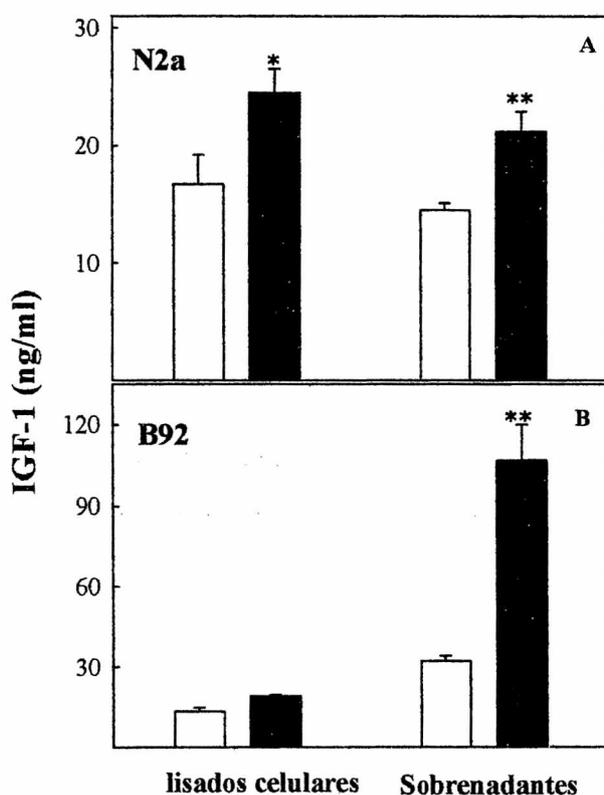


Figura 3-Resultados. Niveles de IGF-I intracelulares y secretados en células neuronales N2a (panel superior) y gliales B92 (panel inferior) transducidas con RAd-IGF I
 Los cultivos celulares experimentales se incubaron con el vector RAd-IGF1 (10^9 pfu/ml) durante 3 días. Subsecuentemente se midió IGF-I en los sobrenadantes y lisados correspondientes. Las columnas blancas (controles) corresponden a células no transducidas; columnas negras a células incubadas con RAd IGF-I.; N=3; barras sobre las columnas = SEM. * (diferencia significativa, $P < 0,05$); ** (diferencia altamente significativa, $P < 0,01$).

3- Cambios séricos e hipotalámicos asociados a la edad

Como se esperaba en base a la bibliografía, los niveles séricos de IGF-I mostraron una reducción progresiva relacionada con la edad. En las hembras jóvenes (4 meses, n=24),

adultos (24 meses, n=10) y seniles (31 meses, n=15), se obtuvieron los respectivos valores correspondientes a IGF-I total de $110,3 \pm 7,3$; $101,1 \pm 14,6$; $90,1 \pm 9,2$ ng/ml. A diferencia de esta disminución de IGF-I encontrada, los niveles de GH mostraron un significativo aumento (**Figura 4A-Resultados**). Por otro lado los niveles tisulares cerebrales de IGF-I en el hipotálamo y SN fueron comparables en hembras jóvenes y seniles. (**Figura 4B-Resultados**).

Cambios relacionados con la edad en los niveles séricos de IGF-I y GH y contenido de IGF-I en S.Nigra e Hipotálamo de ratas hembras.

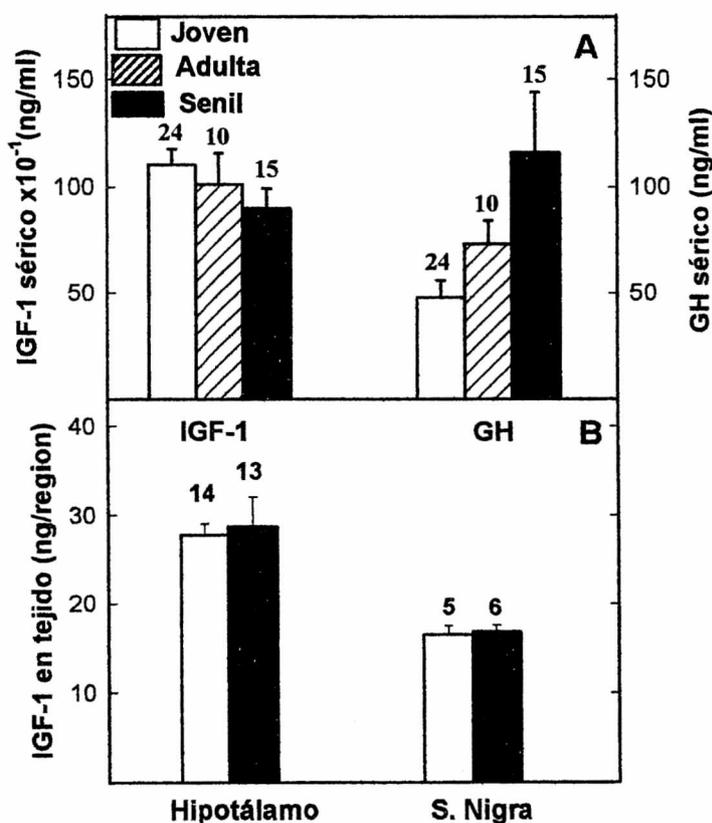


Figura 4- Resultados. Cambios séricos correspondientes a GH e IGF-I y contenido de IGF-I hipotalámico y en S.Nigra en relación a la edad. Las ratas hembras jóvenes, adultas y seniles fueron de 4, 24 y 31 meses respectivamente. Las barras sobre las columnas representan el SEM. Los números sobre las barras representan los valores del N en cada caso.

4- Transferencia Génica hipotalámica de RAd IGF- I in vivo

4-1 Estudios de expresión a corto plazo

La inyección estereotáxica del vector Rad IGF-I fue evaluada inicialmente en animales jóvenes, en distintas regiones cerebrales (mesencéfalo: substantia nigra; y diencefalo: hipotálamo) pudiéndose constatar su correcta expresión, a los cuatro días, en ambas regiones comparados con sus respectivos grupos controles inyectados con Rad β gal (Figura 5-Resultados). Este tratamiento no afectó los niveles séricos de IGF-I en las ratas experimentales (Figura 5 inset-Resultados).

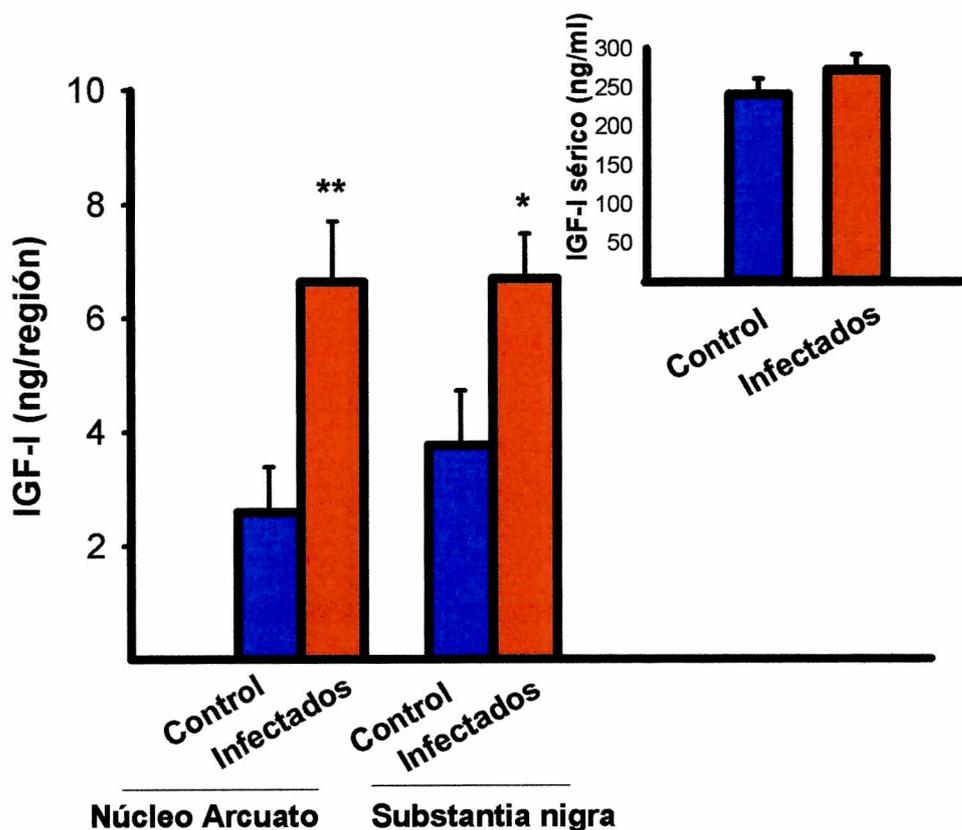


Figura 5- Resultados. Expresión de IGF-I transgénico en ratas hembras jóvenes inyectadas estereotáxicamente con RAd-IGF I en substantia nigra o núcleo arcuato. Los animales recibieron una inyección estereotáxica bilateral (1,5 μ l por lado) del vector RAd β gal (columnas azules) o RAd-IGF I (columnas rojas) cerca de la región hipotalámica ARC-PeV o en Substantia Nigra (ver Materiales y Métodos para mayores detalles). Cuatro

*días mas tarde, los animales fueron sacrificados, la sangre fue obtenida y sus hipotálamos medio basales (MBH) seccionados y procesados para la determinación de IGF-I total. Las barras sobre las columnas representan los valores de SEM. *: $P < 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.*

Experimentos de corto plazo implementando inyecciones intrahipotalámicas de RAd β gal o RAd IGF-I en ratas hembras jóvenes (5 meses) y seniles (31 meses) mostraron, luego del sacrificio, a los cuatro días post estereotaxia, un significativo aumento en la expresión de IGF-I tisular en los animales inyectados con RAd IGF-I (**Figura 6-Resultados**), no observándose dicho aumento en los animales controles. Los niveles de IGF-I hipotalámicos no difirieron significativamente entre animales jóvenes y seniles controles.

Los valores de IGF-I sérico en los animales seniles (a semejanza de los jóvenes-Figura 5 inset), no se vieron afectados por las inyecciones intrahipotalámicas de RAd IGF-I (**Figura 6 inset-Resultados**).

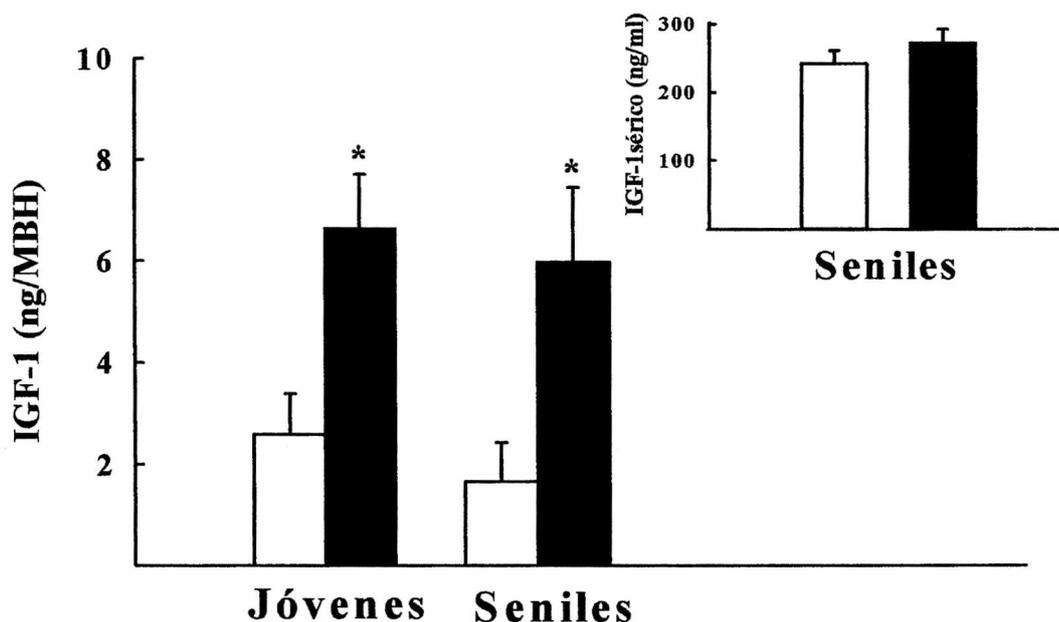


Figura 6 –Resultados.- *Expresión en hipotálamo de IGF-I transgénico en estudios de corto plazo. Los animales recibieron una inyección estereotáxica bilateral (1,5 μ l por lado) del vector RAd β gal (columnas blancas) o RAd-IGF I (columnas negras) en la región hipotalámica ARC-PeV (ver Materiales y Métodos para mayores detalles). Cuatro días mas tarde, los animales fueron sacrificados, la sangre fue recolectada y sus hipotálamos medio basales (MBH) seccionados y procesados para la determinación de IGF-I total por RIA. Las barras sobre las columnas representan los valores de SEM. *: $P < 0,05$. $n = 5$.*

4-2 Estudios de expresión a largo plazo

Inyecciones intrahipotalámicas de RAd- β gal o RAd IGF-I en ratas hembras jóvenes (5 meses), seguidas del sacrificio de los animales a diferentes tiempos post-inyección, mostraron que los animales inyectados con RAd IGF-I sobreexpresaron IGF-I en el hipotálamo por aproximadamente 50 días. Al día 70, el contenido hipotalámico de IGF-I no mostró diferencia significativa entre los animales inyectados con RAd- β gal y RAd IGF-I (Figura 7-Resultados).

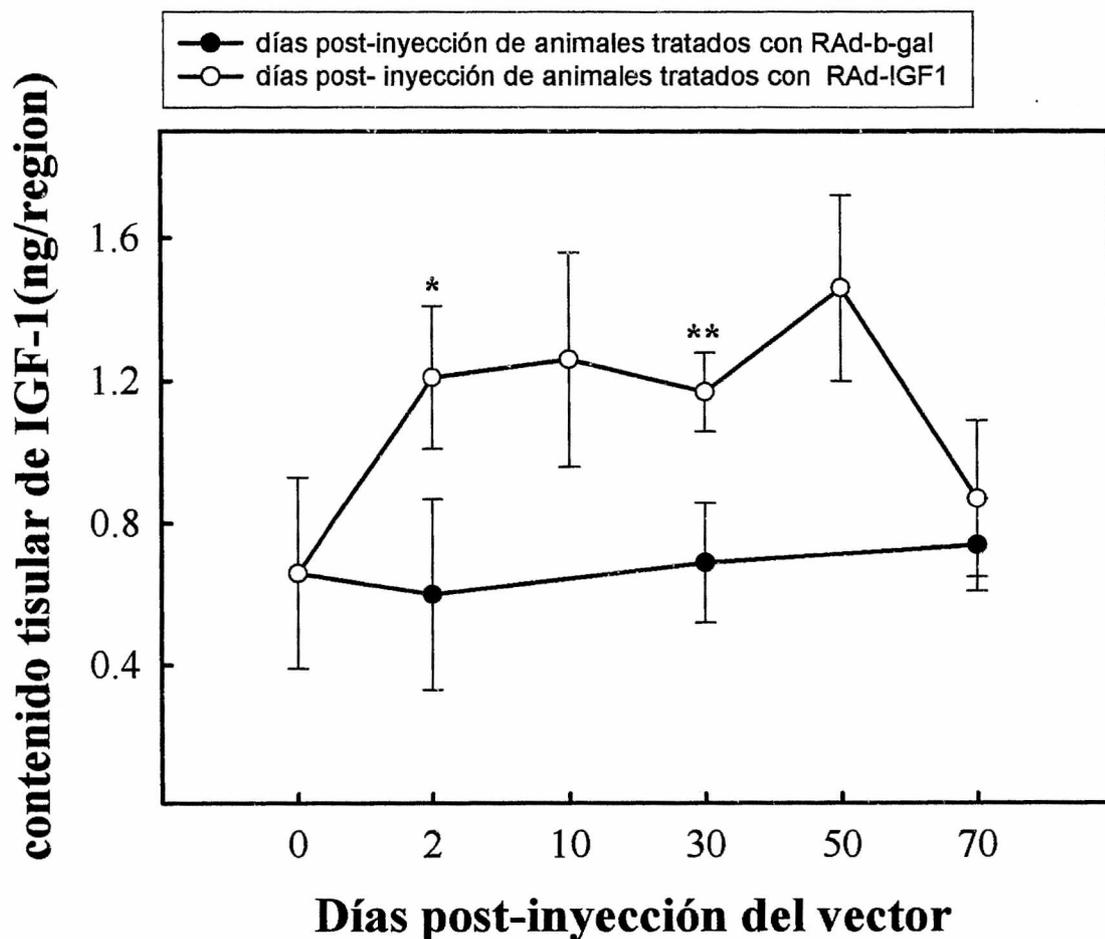


Figura 7-Resultados. Estudios a largo plazo realizados en ratas hembras jóvenes para determinar la duración de la expresión del vector RAd IGF-I en el hipotálamo. En el día experimental 0, los animales recibieron una inyección estereotáxica bilateral del vector adenoviral RAd β gal o RAd IGF-I en la región hipotalámica ARC-PeV. A los tiempos indicados, grupos de a 3-4 animales fueron sacrificados, se removió la región Eminencia Media-ARC-PeV con sacabocados y se determinó por RIA el contenido tisular de IGF-I en esta región.

5- Terapia Génica hipotalámica con RAd-IGF I in vivo

5-1 Terapia Génica de corto plazo (4 días)

La terapia génica de corto plazo con RAd IGF-I en el hipotálamo de animales seniles (31 meses) no fue tiempo para lograr una reducción significativa de la hiperprolactinemia crónica normalmente observada en estos animales, (**Figura 8-Resultados**) no obstante, manifestó ser un plazo considerable para lograr una sobreexpresión local hipotalámica de IGF-I (**Figura 8 inset**).

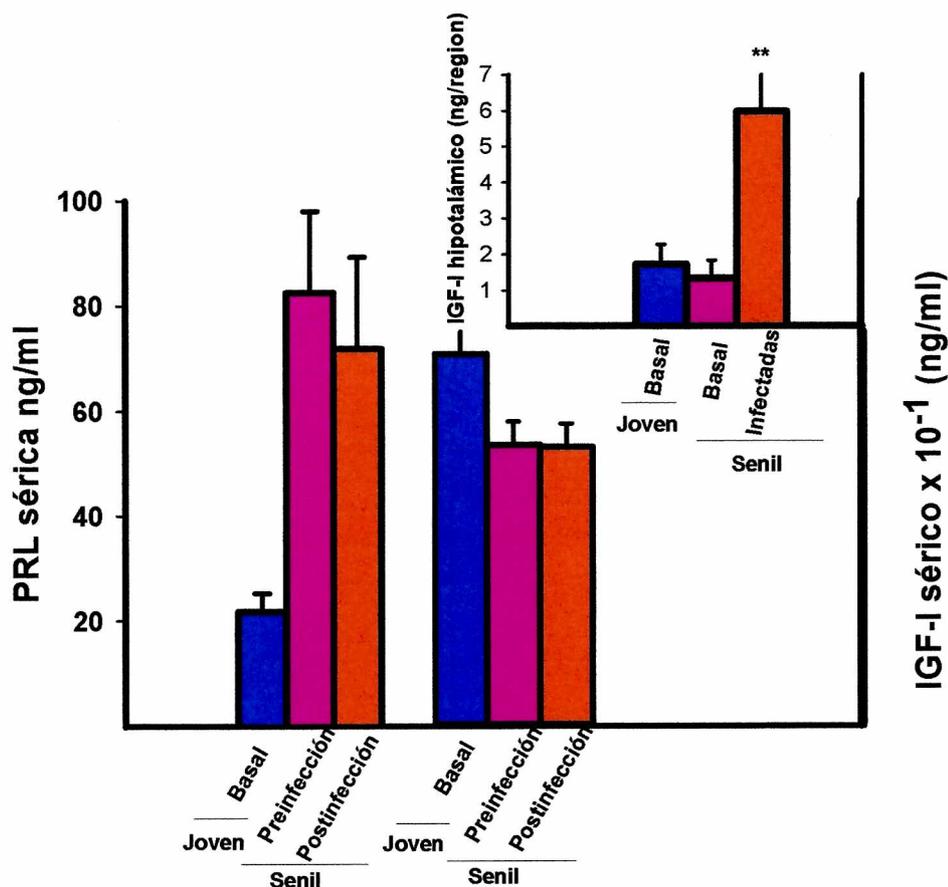


Figura 8-Resultados. Efecto a corto plazo (4 días) sobre los niveles de PRL sérica, de la inyección intrahipotalámica de RAd IGF-I en ratas hembras seniles (31 meses). Las ratas hembras seniles recibieron una inyección estereotáxica bilateral (1,5 µl por lado) del vector RAd-IGF I en la región hipotalámica ARC-PeV. Cuatro días mas tarde, los

*animales fueron sacrificados, la sangre fue obtenida y sus hipotálamo medio basales (MBH) seccionados y procesados para la determinación de IGF-I total (inset). Los altos niveles de IGF-I transgénico generados en la región hipotalámica durante este corto tratamiento no lograron corregir la hiperprolactinemia típica de las hembras seniles. El tratamiento tampoco afectó los bajos niveles circulantes de IGF-I en las hembras seniles. Las barras sobre las columnas representan los valores de SEM. ** P<0,01.*

5-2 Terapia Génica de mediano plazo (17 días) para IGF-I en el hipotálamo de ratas hembras jóvenes y seniles

5-2 a Diseño experimental para los estudios in vivo con RAd IGF I

Para la terapia génica de mediano plazo con RAd IGF-I, se utilizó el diseño experimental que esquematiza la **Figura 9-Resultados**. Los animales jóvenes y senescentes fueron clasificados como controles o experimentales formándose 4 grupos: Jóvenes control (J-βgal), jóvenes experimentales (J-IGFI), seniles control (S-βgal), seniles experimentales (S-IGF I). Comenzando con el día experimental -3 y los sucesivos tiempos indicados se obtuvo una muestra (0,3-0,4ml) de sangre de la vena de la cola previa anestesia de los animales con éter-sulfúrico. Los sueros fueron obtenidos y mantenidos a -20°C para la realización de los ensayos hormonales.

En el día experimental 0, animales controles y experimentales recibieron inyecciones estereotáxicas bilaterales intrahipotalámicas de 1,5μl conteniendo 3×10^9 pfu de RAd-βgal o Rad-IGF-I, respectivamente.

En el día experimental 17 parte de las ratas correspondientes a los 4 grupos fueron sacrificadas por decapitación, los cerebros fueron rápidamente removidos del cráneo y se procedió a la obtención de la región correspondiente a MBH. Los animales remanentes fueron anestesiados y perfundidos. Los cerebros se removieron y se cortaron en micrótopo de congelación en secciones coronales de 40μm de espesor para su posterior análisis por inmunohistoquímica o enzimo-histoquímica según corresponda (mayores detalles en la sección de Materiales y Métodos).

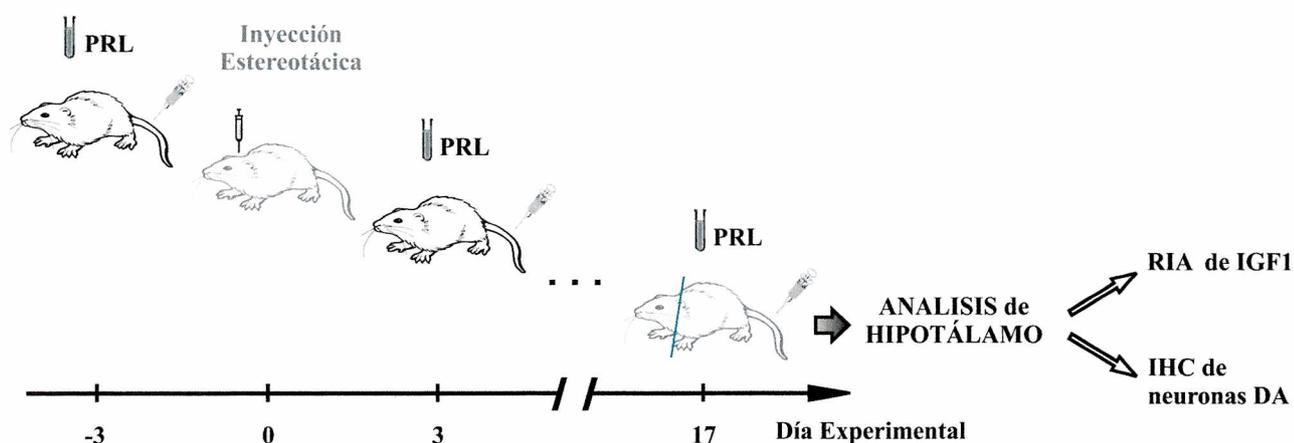


Figura 9–Resultados.- Esquema representativo correspondiente al diseño experimental. (Cortesía de Paula Reggiani).

5-2 b Expresión Génica hipotalámica de mediano plazo con RAd IGF-I y RAd β gal

Siguiendo el diseño experimental previamente descrito, se realizaron ensayos enzimohistoquímicos del hipotálamo de hembras jóvenes y seniles, 17 días después de la inyección intrahipotalámica de RAd β gal, revelándose una amplia distribución de células X-gal positivas en las regiones correspondientes a los núcleos de interés, a saber Arcuato-Periventricular (ARC-PeV) y Paraventriculares (PaV) (**Figura 10-Resultados**).

Al finalizar el tratamiento, el contenido total de IGF-I en el MBH de los animales senescentes fue mayor en aquellos que habían sido inyectados con RAd IGF-I en comparación con su contraparte inyectada con RAd- β gal (**Figura 10, inset del ángulo inferior**).

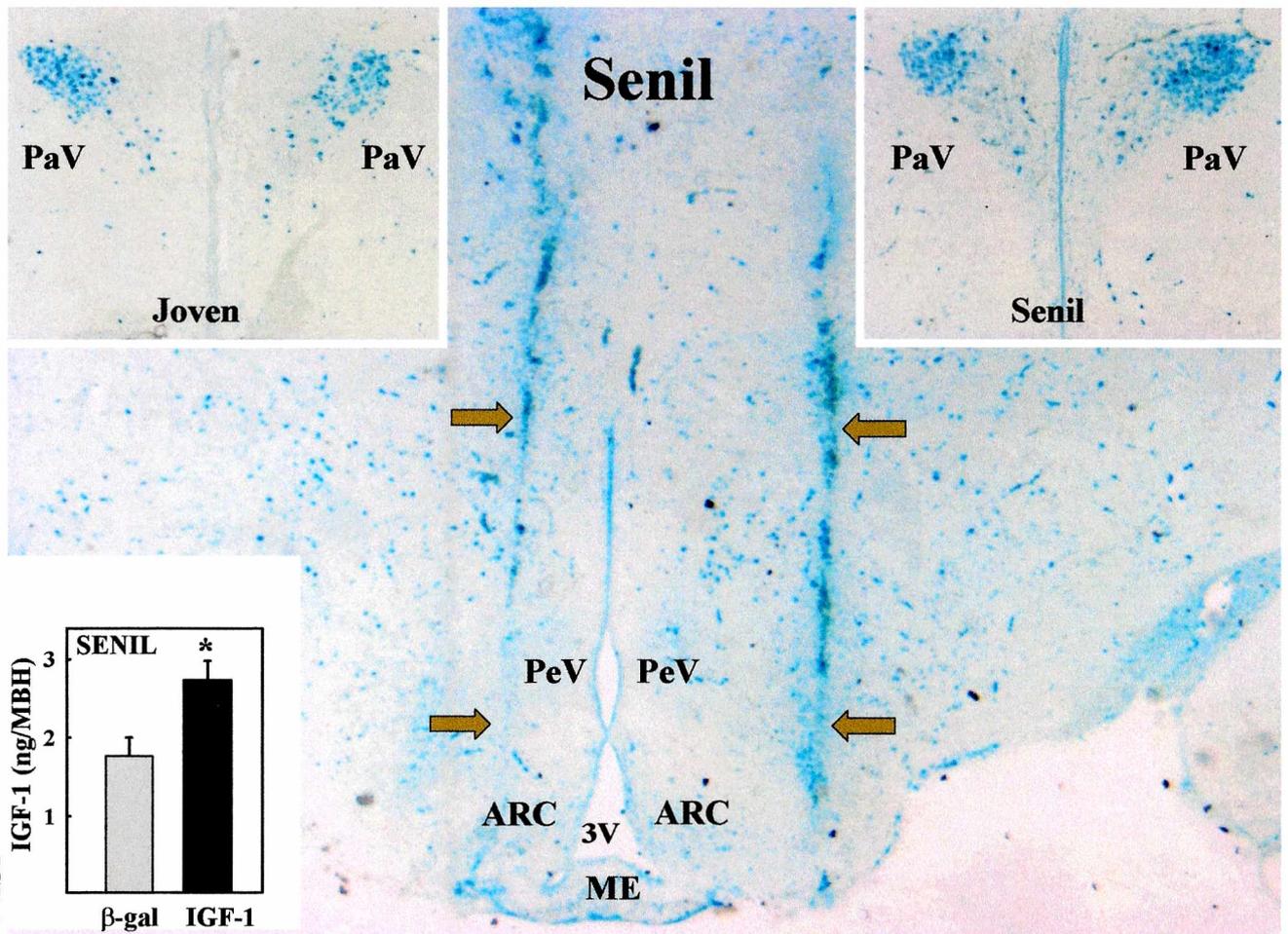


Figura 10-Resultados. Cortes coronales de cerebro correspondiente al hipotálamo medio basal (MBH) de animales hembras jóvenes y seniles, donde puede observarse la expresión de β gal 17 días después de la inyección estereotáxica del vector RAd β gal.

Los animales controles fueron sacrificados 17 días después de haber recibido una única inyección estereotáxica bilateral del vector RAd β gal. La expresión de β gal en las secciones hipotalámicas fue detectada por la técnica de X-gal (células positivas se observan marcadas en azul). El panel principal muestra la expresión de β gal en el hipotálamo medio de una hembra senil. Se observa una alta frecuencia de células positivas a lo largo del trayecto de la aguja de inyección (flechas). Los insets superiores izquierdo y derecho muestran la expresión de β gal en la región PaV de animales controles jóvenes y seniles, respectivamente. El inset inferior muestra el contenido de IGF-I en el MBH de animales seniles tratados durante 17 días con RAd β gal o RAd IGF I. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa entre los dos grupos ($P < 0,05$). ME: eminencia media; ARC: Núcleo arcuato; PeV: Núcleo Periventricular; 3V: Tercer ventrículo; PaV: Núcleos Paraventricular. Obj.X 1,5 y X10 para la imagen principal e inset, respectivamente.

5-2 c Impacto del tratamiento sobre la hiperprolactinemia crónica de las hembras

seniles

En cuanto a los efectos logrados por la terapia génica a mediano plazo sobre los niveles séricos de PRL (luego del tratamiento por 17 días), en animales jóvenes la inyección intrahipotalámica no modificó sus valores en los grupos RAd β gal ni en RAd IGF-I (**Figura 11-Resultados, panel inferior**). En contraste, en hembras senescentes, el tratamiento con RAd IGF-I, pero no con RAd β gal, indujo un marcado descenso de los niveles de PRL sérica revirtiendo la típica hiperprolactinemia crónica presente en el envejecimiento en estos animales (**Figura 11-Resultados, panel superior**).

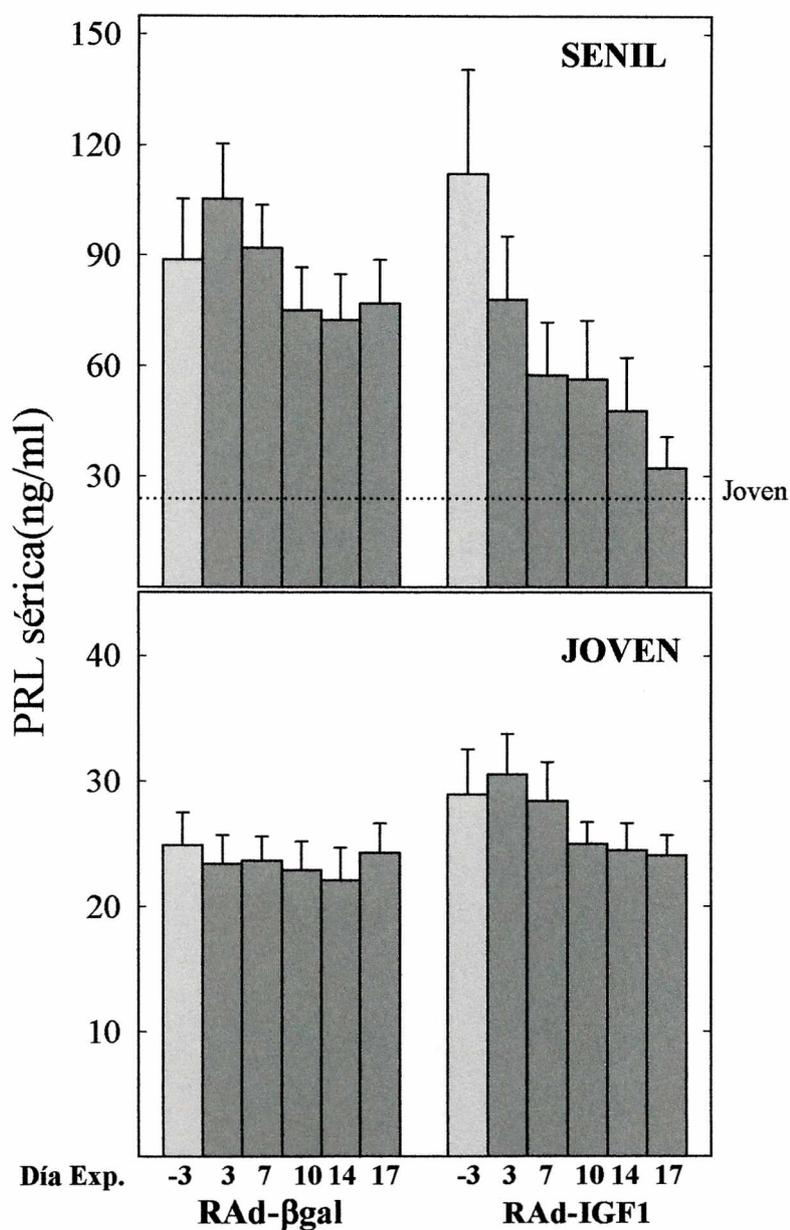


Figura 11-Resultados.- Efecto de la terapia génica intrahipotalámica con Rad IGF-I a mediano plazo sobre los niveles séricos de PRL en ratas hembras jóvenes y seniles.-

Los paneles muestran el efecto de la inyección intrahipotalámica de Rad-βgal o Rad-IGF1 sobre los perfiles séricos de PRL durante un periodo de 17-días post-inyección. El panel de abajo y arriba corresponden a animales jóvenes y (5 meses) y seniles (28 meses), respectivamente.

Las columnas en gris claro (Día experimental -3) indican los niveles séricos de PRL pre-inyección. Nótese que en el punto pre inyección, todas las ratas hembras seniles fueron

hiperprolactinémicas si se las compara con los valores de referencia de ratas hembras jóvenes intactas (línea punteada).

El número de animales en los grupos jóvenes controles, jóvenes experimentales, seniles controles y seniles experimentales fueron 10, 11, 9 y 12, respectivamente. Las barras sobre las columnas representan los valores del SEM. La comparación de los valores de PRL post-inyección versus pre-inyección se realizó por one-way ANOVA seguido por Tukey's test, indicando una diferencia altamente significativa para el grupo RAd-IGF I senil pero no así para los demás grupos animales.

El análisis individual de los perfiles de PRL correspondientes a animales seniles controles (inyectados con RAd β gal) e inyectados con el vector Rad IGF I, reveló que solo aquellos animales severamente hiperprolactinémicos fueron los que más respondieron al tratamiento, mientras que las hembras seniles con hiperprolactinemia menor o normoprolactinémicas respondieron débilmente al tratamiento con Rad-IGF-I luego de 17 días (**Figura 12-Resultados**). También puede observarse un aumento en el contenido de IGF-I hipotalámico en animales inyectados con Rad-IGF-I, a diferencia del grupo control inyectado con RAd β gal (**Figura 12 inset**).

Efecto de la terapia génica hipotalámica con RAd-IGF-I sobre los niveles de PRL en ratas hembras seniles hiperprolactinémicas

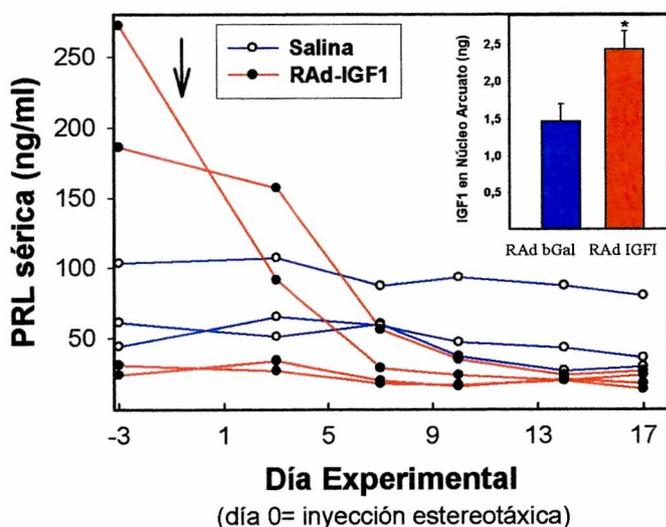


Figura 12-Resultados. Seguimiento individualizado de la progresión de los niveles de PRL sérica en los animales tratados con RAd IGF-I.- Siguiendo el diseño experimental planteado anteriormente, se inyectaron estereotáxicamente en forma bilateral (día

experimental 0) animales hembras seniles con RAd β gal o RAd IGF I. Se les realizó el seguimiento individualizado de sus valores séricos de PRL los que pueden observarse en el presente gráfico (se muestran solo 7 animales representativos por simplicidad).

5-2 d Impacto del tratamiento sobre los esteroides sexuales séricos

Con respecto a los niveles de estradiol séricos, pudo observarse un ligero aumento relacionado a la edad. La terapia génica con RAd IGF-I a mediano plazo no afectó los niveles circulantes de este esteroide. Los niveles de progesterona también mostraron un incremento asociado con la edad, los cuales no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con RAd IGF-I. (Tabla 1).

Edad del grupo	JOVEN		SENIL	
	β -gal	IGF-1	β -gal	IGF-1
E ₂ sérico (pg/ml)	28.9 ± 2.6 (4)	33.3 ± 9.6 (5)	36.5 ± 1.8 (3)§	41.4 ± 7.7 (5)
P ₄ sérica (ng/ml)	5.2 ± 1.7 (4)	7.3 ± 0.9 (4)	16.1 ± 3.9 (4)*	26.1 ± 3.5 (4)

Tabla 1.- Niveles séricos de 17 β -estradiol y progesterona en ratas hembras jóvenes y seniles tratadas con RAd- β -gal (control) y RAd-IGF-I.- Estradiol y progesterona fueron medidas en muestras de suero tomadas en los días 14 -17 post inyección del vector. Los valores se encuentran expresados como $X \pm SEM$ (n = número de muestras de suero por grupo experimental). § indica cuasi diferencia significativa ($P=0.08$) con su contraparte joven. * indica diferencia significativa ($P<0.05$) con su contraparte joven.

5-2 e Impacto de la terapia génica de mediano plazo sobre las poblaciones hipotalámicas TIDA seniles

Ensayos inmunohistoquímicos cuantitativos revelaron que en las hembras seniles pero no en las jóvenes, la terapia génica con RAd IGF-I indujo un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas cuando se comparó con su contraparte tratada con RAd- β gal (Figura 13-Resultados).

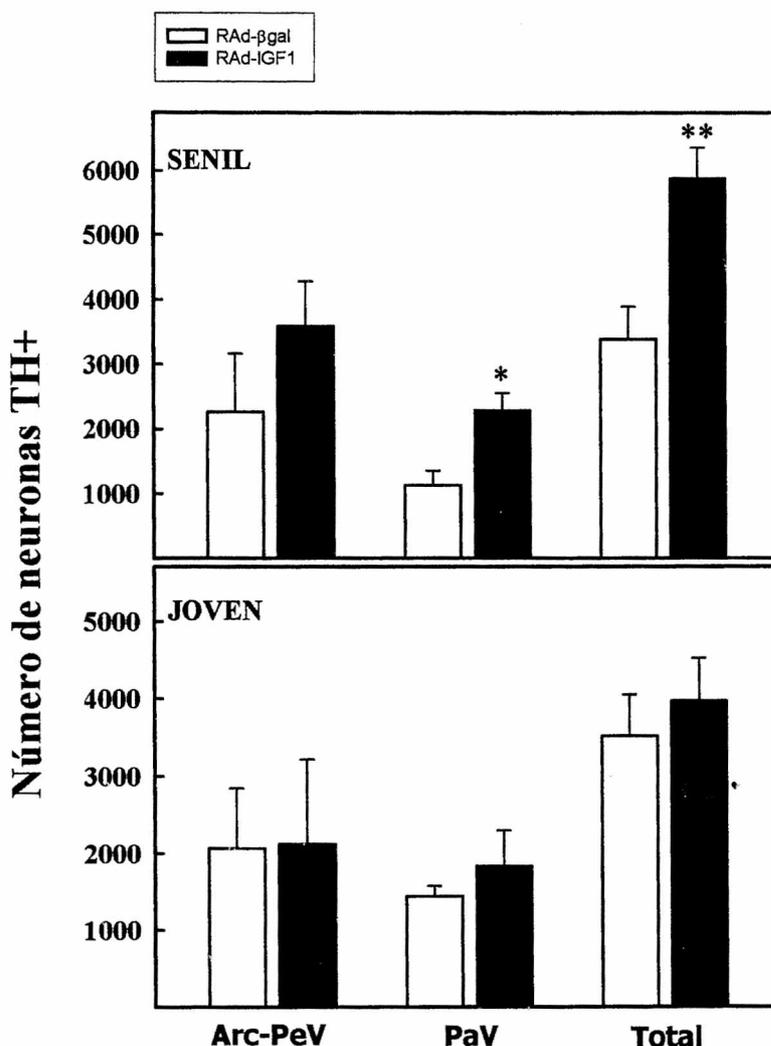


Figura 13-Resultados. Efecto de la terapia génica con RAd IGF-I sobre el número de neuronas dopaminérgicas (TH+) en el hipotálamo de ratas jóvenes y seniles.- Los gráficos muestran la cuantificación de neuronas TH+ en las regiones Arc-PeV y núcleos PaV como también el número total de neuronas TH+ en el hipotálamo. Los animales fueron sacrificados 17 días después de la inyección intrahipotalámica del correspondiente vector. Las columnas blancas y negras corresponden a animales inyectados con RAd β-gal o RAd IGF I, respectivamente. El conteo de neuronas TH+ fue realizado manual y automáticamente usando un apropiado software de imágenes (detalles en Materiales y Métodos)

Las barras sobre las columnas representan los valores de SEM. Diferencias significativas entre los grupos inyectados con RAd β-gal y RAd IGF-I para cada par de columnas, se

encuentran indicadas por asteriscos sobre las columnas negras (* $P < 0,05$); y próximo a ser significativo en la región ARC-PeV ($P = 0,07$).

Aunque el número de neuronas hipotalámicas DA fue comparable entre los animales control, jóvenes y seniles, la inmunomarcación para TH resultó mas débil en los últimos (como puede observarse en Figuras 14 y 15; en esta última se tuvo que aumentar la intensidad del color de fondo dada la dificultad de observarse marcación de TH+ en los animales senescentes controles). Esta pérdida de inmunoreactividad en los animales seniles, fue parcialmente revertida por la terapia génica con RAd-IGF I durante 17 días observable en núcleos ARC-PeV (**Figura 14-Resultados**) como en los núcleos PaV (**Figura 15-Resultados**).

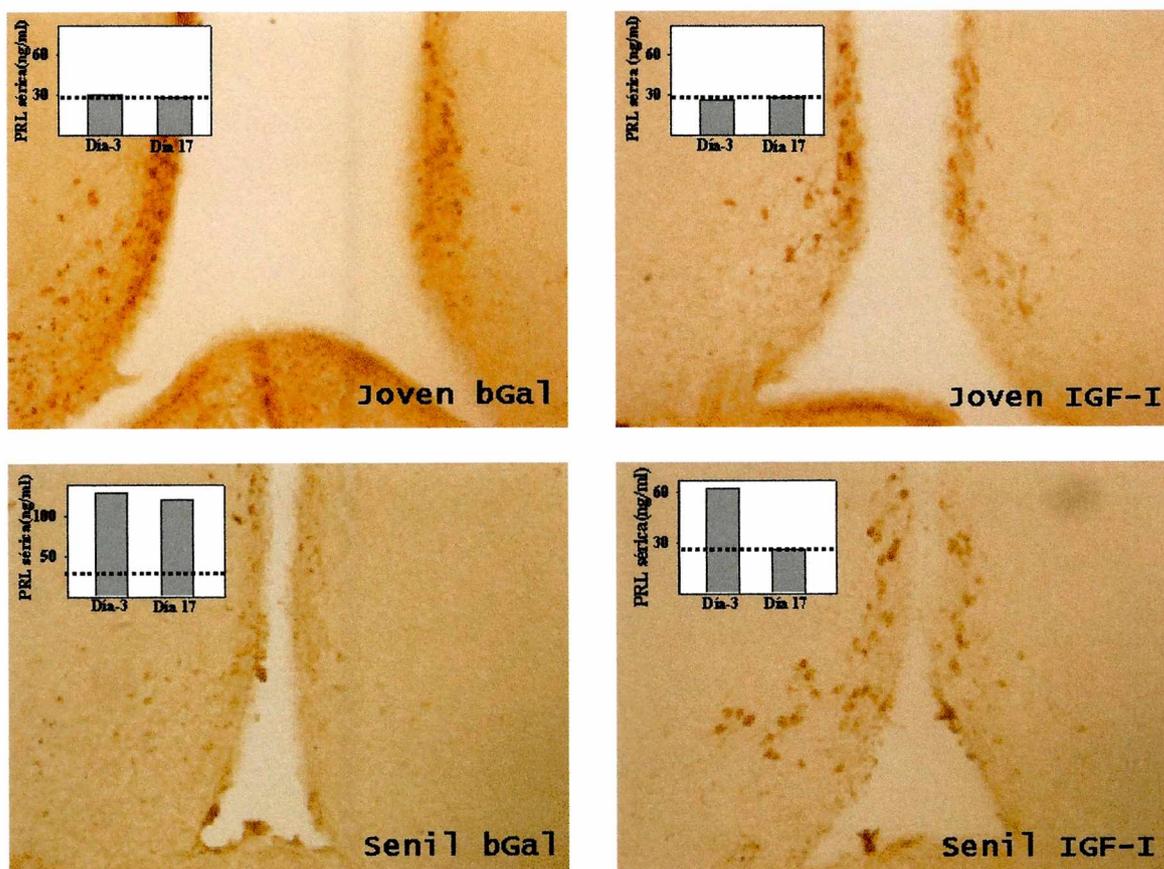


Figura 14-Resultados. Efecto de la terapia génica con Rad IGF-I sobre las neuronas DA de la región hipotalámica ARC-PeV en hembras jóvenes y seniles.-

Las secciones hipotalámicas representativas que se muestran corresponden a hipotálamo medio y fueron inmunomarcadas con un anticuerpo monoclonal anti-rata TH (detallado el procedimiento en Materiales y Métodos). Los animales fueron sacrificados 17 días después de la inyección intrahipotalámica del vector correspondiente. Los paneles superiores corresponden a animales jóvenes inyectados con RAd β gal (izquierda) o RAd IGF-I (derecha). Los paneles inferiores muestran las correspondientes contrapartes seniles. Los insets representan los niveles de PRL para el correspondiente animal, en los días experimentales -3 y 17. La línea punteada indica los valores normales de PRL sérica en animales jóvenes. Obj. X 20.

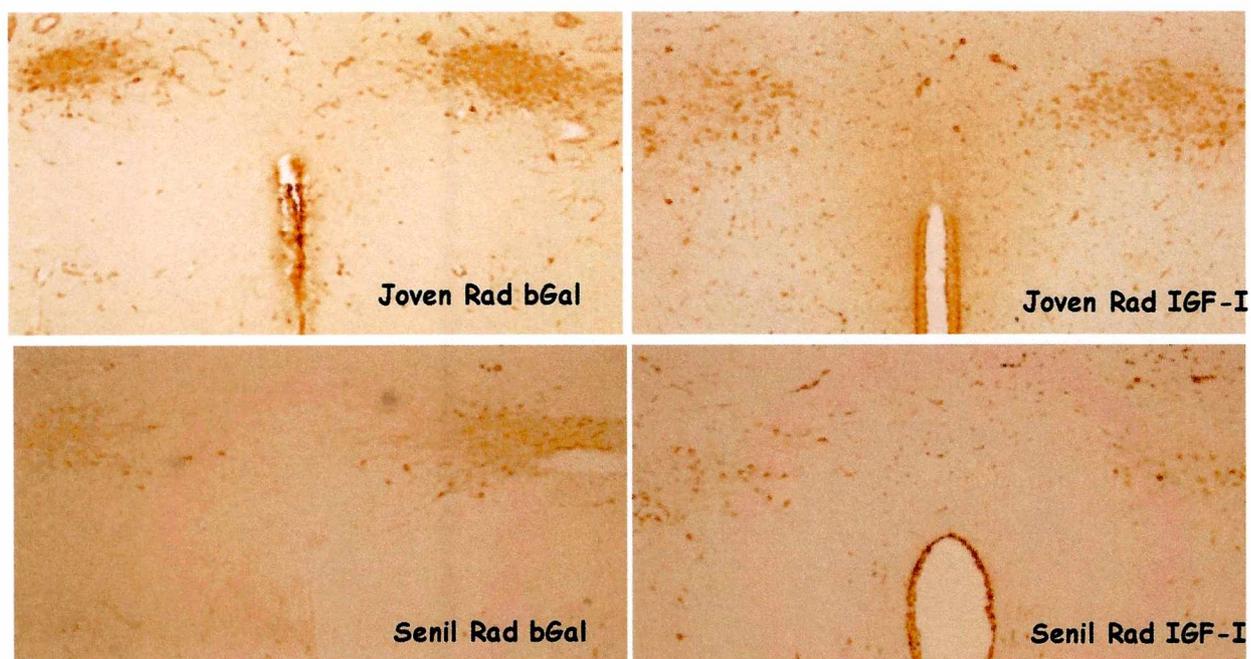


Figura 15-Resultados. Efecto de la terapia génica con RAd IGF-I sobre las neuronas DA de la región hipotalámica PaV en hembras jóvenes y seniles.-

Las secciones hipotalámicas representativas que se muestran corresponden también a hipotálamo medio y fueron inmunomarcadas con un anticuerpo monoclonal anti-rata TH. Los animales fueron sacrificados 17 días después de la inyección intrahipotalámica del vector correspondiente. Los paneles superiores corresponden a animales jóvenes inyectados con RAd β gal (izquierda) o RAd IGF-I (derecha). Los paneles inferiores muestran las correspondientes contrapartes seniles. Obj. X 10.

Análisis tendientes a evaluar el efecto del tratamiento con RAd IGF-I sobre distintas características morfométricas de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas en los núcleos mencionados, revelaron que el tratamiento no indujo cambios significativos en los animales jóvenes (**tabla 2 A**) y solamente pudieron observarse dos cambios significativos en los animales seniles (**tabla 2 B**).

A- JOVENES

Núcleos	Area (μm^2)	Eje Mayor (μm)	Eje Menor (μm)	Aspecto	Perímetro (μm)	Redondez
Arc- βgal	14.39 \pm 1.18	5.42 \pm 0.29	3.42 \pm 0.21	1.62 \pm 0.16	15.07 \pm 0.71	1.27 \pm 0.04
Arc-IGF I	16.97 \pm 0.60	5.76 \pm 0.07	3.83 \pm 0.15	1.57 \pm 0.10	16.27 \pm 0.11	1.27 \pm 0.03
PeV- βgal	14.48 \pm 2.10	5.32 \pm 0.42	3.45 \pm 0.26	1.56 \pm 0.02	14.77 \pm 1.13	1.23 \pm 0.007
PeV-IGF I	15.64 \pm 0.83	6.03 \pm 0.22	3.35 \pm 0.14	1.87 \pm 0.12	16.09 \pm 0.36	1.34 \pm 0.03*
PaV- βgal	20.58 \pm 3.17	7.00 \pm 0.61	3.76 \pm 0.24	1.90 \pm 0.04	18.41 \pm 1.60	1.34 \pm 0.03
PaV-IGF I	17.24 \pm 1.83	6.49 \pm 0.58	3.45 \pm 0.08	1.94 \pm 0.15	17.12 \pm 1.02	1.39 \pm 0.05

B- SENILES

Núcleos	Area (μm^2)	Eje Mayor (μm)	Eje Menor (μm)	Aspecto	Perímetro (μm)	Redondez
Arc- βgal	16,06 \pm 1.31	5.94 \pm 0.16	3.48 \pm 0.19	1.74 \pm 0.05	16.35 \pm 0.60	1.36 \pm 0.05
Arc-IGF I	18.66 \pm 1.62	6.21 \pm 0.23	4.07 \pm 0.23	1.65 \pm 0.09	19.66 \pm 0.98*	1.74 \pm 0.17
PeV- βgal	20.12 \pm 0.88*	6.80 \pm 0.17	3.82 \pm 0.23	1.84 \pm 0.16	18.26 \pm 0.13	1.34 \pm 0.03
PeV-IGFI	16.41 \pm 0.76	6.07 \pm 0.29	3.54 \pm 0.12	1.78 \pm 0.12	17.49 \pm 1.46	1.53 \pm 0.23
PaV- βgal	19,84 \pm 2,03	6.75 \pm 0.47	3.79 \pm 0.24	1.81 \pm 0.19	18.05 \pm 1.03	1.33 \pm 0.07
PaV-IGFI	18.54 \pm 1.26	6.83 \pm 0.35	3.58 \pm 0.25	2.01 \pm 0.17	20.22 \pm 1.90	1.81 \pm 0.23

Tabla 2. Efecto de la terapia génica con RAd IGF-I sobre las características morfométricas de neuronas TH+ en el hipotálamo de los grupos de animales jóvenes (tabla 2 A) y seniles (tabla 2 B).

Los datos se encuentran expresados como $X \pm \text{SEM}$ para los parámetros morfométricos indicados. Los asteriscos denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el control y su grupo experimental correspondiente para cada núcleo y parámetro. El número de animales por grupo (n) utilizado para determinar dichos parámetros es de 5.

DISCUSION

La idea de considerar al envejecimiento como una forma posible de comienzo de un proceso neurodegenerativo se encuentra sustentada por la inevitable asociación de ambos procesos con la muerte neuronal (**Przedborski S. et al., 2003**). Debido a su alta incidencia, han sido desarrollados numerosos modelos in vivo para estudiar la patofisiología de la enfermedad de Parkinson, así como para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra esta devastadora enfermedad. Estos incluyen el uso de neurotoxinas para lesionar las neuronas dopaminérgicas nigrales en primates y roedores, y la generación de modelos transgénicos que sobreexpresan α -sinucleína (**Shimohama et al., 2003**). Aunque cada uno de estos modelos han aportado información útil para comprender la enfermedad de Parkinson, comparten una significativa limitación, que las lesiones neurológicas que estudian son causadas por manipulaciones experimentales y no por el proceso natural de envejecimiento, el único e inequívoco factor de riesgo conocido (**Mayeux et al., 1995**). En el contexto mencionado, la rata hembra senil emerge como un modelo interesante de disfunción dopaminérgica espontánea y progresiva, relacionada con la edad. Además, el estado funcional de las neuronas TIDA puede ser fácilmente monitoreado en los animales, midiendo los niveles de PRL circulante.

Las ventajas del sistema neurondócrino para evaluar estrategias de terapia génica en el SNC han sido ya demostradas en la rata Battleboro, un mutante carente de arginina-vasopresina (AVP), que se ha usado como modelo de diabetes insípida (**Valtin, 1992**). Cuando un vector adenoviral portador del ADNc de la AVP de rata fue inyectado estereotáxicamente en el núcleo supraóptico de estos mutantes, se detectó una expresión sustancial de AVP en las células magnocelulares así como la presencia de AVP, detectada por inmunohistoquímica, en los axones que proyectan hacia la hipófisis posterior. Medidas de la excreción y la osmolalidad de la orina mostraron una reducción significativa de los síntomas de diabetes insípida en estas ratas hasta cuatro meses después de la inyección del vector viral (**Geddes et al., 1997**).

El presente estudio es, hasta donde conoce la autora, el primer intento de usar terapia génica con IGF-I para restaurar la función de las neuronas hipotalámicas DA en ratas seniles. El vector RAd-IGFI construido con este propósito, mostró ser efectivo induciendo la sobreexpresión de IGF-I en líneas celulares neuronales y gliales, así como

en el hipotálamo de ratas jóvenes y seniles. La expresión durante 50 días del IGF-I transgénico lograda in vivo con nuestro vector adenoviral, puede considerarse de relativamente largo tiempo y es consistente con los estudios, antes mencionados, en las ratas Brattleboro. Las mediciones morfológicas realizadas 17 días post-cirugía en ratas inyectadas con RAd- β gal, revelaron una amplia distribución de células transducidas en el hipotálamo medio, lo cual indica que el IGF-I transgénico debió haber alcanzado plenamente las regiones PaV y ARC-PeV.

Las neuronas DA del hipotálamo de rata están agrupadas en dos áreas principales, A₁₂ y A₁₄ (**Dahlström y Fuxe, 1964**), con los cuerpos neuronales DA del área A₁₂ localizado en el núcleo ARC y en la región del periarquato (**Kawano y Daikoku, 1987**). Las neuronas DA del área A₁₄ están principalmente localizadas dentro de los núcleos PaV y PeV, con unas pocas neuronas DA dispersas en el área hipotalámica ventromedial anterior (AVM) (**Kawano y Daikoku, 1987**). El área A₁₂ y sus correspondientes axones terminales constituyen el sistema TIDA, mientras que el área A₁₄ y sus fibras son conocidas como el sistema dopaminérgico periventricular (mayores detalles en sección número 1 correspondiente a Introducción). Ambos sistemas regulan la secreción de PRL ejerciendo un control tónico inhibitorio tanto sobre la secreción de PRL como sobre la proliferación lactotropa (**Ben-Jonathan et al., 1989**). En estudios tempranos, fue descrita una disminución de la función de las neuronas TIDA en ratas seniles, observándose una marcada reducción en el contenido DA hipotalámico, eminencia media y lóbulo intermedio en ratas viejas (24-26 meses) comparadas con ratas jóvenes (4 meses) (**Porter et al., 1980**). Más significativo aún fue el hallazgo de que la secreción de DA en sangre porta-hipofisiaria cae drásticamente en machos y hembras viejas (20-26 meses) en comparación con sus contrapartes jóvenes (2-4 meses) (**Reymond y Porter, 1981**). Aunque las mencionadas alteraciones en la secreción de DA relacionadas con la edad fueron atribuidas a una disminución funcional de las neuronas TIDA más que a una pérdida de neuronas (**Porter et al., 1994**), trabajos más recientes en ratas hembras senescentes (32 meses) mostraron que, a edades extremas, en efecto ocurre una pérdida de neuronas DA en el hipotálamo de rata, particularmente en los núcleos PaV (**Sánchez et al., 2003**). En el presente estudio, la comparación del número total de neuronas DA entre ratas hembras control de 5 versus 28 meses de edad (3.516 vs. 3.390, respectivamente) muestra una ligera disminución, no significativa, que está en acuerdo con los estudios mencionados.

La marcada hiperprolactinemia de nuestros animales seniles sin pérdida sustancial de neuronas TIDA, respalda la hipótesis propuesta por otros autores acerca de que en la rata envejeciente la mayor parte de las neuronas TIDA sobreviven, pero pasan a ser progresivamente disfuncionales (Porter et al., 1994). De acuerdo a esta idea, la baja inmunoreactividad a TH de las secciones hipotalámicas de las ratas seniles control, sugiere bajos niveles de TH neuronal. En este contexto, la marcada reversión de la hiperprolactinemia crónica en las ratas hembras seniles tratadas con RAd-IGFI, pero no así en las tratadas con RAd β -gal, sugiere que la sobreexpresión de IGF-I en el hipotálamo de animales senescentes restauró la función y/o el número de las neuronas DA (ver más abajo). La falta de efecto del RAd-IGFI en los perfiles de PRL circulante en ratas jóvenes sugiere que, en las ratas envejecientes, las neuronas hipotalámicas disfuncionales pueden tener una sensibilidad aumentada al IGF-I. Dentro del grupo RAd-IGFI senil, los animales con el más alto nivel de PRL generalmente fueron los que más respondieron a RAd-IGFI.

En el hipotálamo de rata hay una elevada frecuencia de colocación de los receptores de IGF-I y estrógenos en neuronas y células de la glia (Cardona-Gomez et al., 2000). Además, la acción neuroprotectora del IGF-I parece estar potenciada por los estrógenos (Mendez et al., 2005). Consecuentemente, la asociación observada entre bajos niveles séricos de IGF-I circulante y niveles de estrógeno circulante aumentados en nuestras ratas seniles, puede haber sensibilizado sus neuronas TIDA a la terapia génica con IGF-I. Los estrógenos también actúan directamente sobre la adenohipófisis como poderosos estimulantes de la secreción de PRL. Por lo tanto, resultó importante verificar que la inyección intrahipotalámica de RAd-IGFI no disminuyese los niveles séricos de estrógenos (reduciendo de este modo la PRL sérica). Los datos mostrados en la tabla 1 (sección correspondiente a Resultados), documentan la falta de efecto de la terapia génica con IGF-I en hipotálamo, sobre los esteroides gonadales séricos.

Aunque desconocemos estudios previos sobre la actividad protectora del IGF-I en las neuronas DA del hipotálamo adulto, los resultados aquí presentados no son inesperados en vista de la bien establecida actividad neuroprotectora del IGF-I en otras regiones del cerebro, como así también en ensayos *in vitro* donde en células de neuroblastoma se ha evidenciado claramente la actividad facilitadora de IGF-I sobre la movilidad del cono de crecimiento y el crecimiento de neuritas (Feldman E. et al., 1997). En efecto, estudios en ratas lesionadas con 6-hidroxi dopamina, sugieren que el IGF-I media el efecto neuroprotector del estrógeno en las neuronas DA nigrales

(Quesada y Micevych, 2004). En un modelo de rata con ataxia cerebral (inducida por 3-acetilpiridina (AC)), la administración s.c o intracerebroventricular de IGF-I restauró la coordinación motora y rescató parcialmente las neuronas olivares inferiores de los efectos tóxicos de la AC (Fernández et al., 1998). La infusión continua por 2 y 4 semanas de IGF-I en el ventrículo lateral, restauró parcialmente la memoria referencial y de trabajo en ratas macho de 32 meses comparada con ratas de 4 meses (Markowska et al., 1998). También se describió que el efecto neuroprotector del ejercicio físico en modelos de roedores con ataxia, daño en el hipocampo mediado por ácido domoico o neurodegeneración de las células de Purkinje (modelo de ratón pcd), es mediado por IGF-I circulante (Carro et al., 2001). En razón de que el IGF-I estimula la neovascularización cerebral, la disminución de los niveles de IGF-I con la edad ha sido, potencialmente, ligada al envejecimiento cerebrovascular (Sonntag et al., 1997).

Los datos morfológicos aquí presentados muestran un aumento en las neuronas TH⁺ del hipotálamo de las ratas seniles tratadas con RAd-IGFI. Este aumento podría obedecer a un efecto trófico del IGF-I transgénico sobre las neuronas DA disfuncionales preexistentes, que expresan bajos niveles de TH (neuronas DA TH⁻ putativas), las cuales volverían a ser TH⁺ por efecto del tratamiento. Sin embargo, estos hallazgos también son coherentes con un efecto neurogénico del IGF-I en el hipotálamo de animales seniles. Aunque el estudio de la neurogénesis estuvo fuera del marco del presente trabajo, esta posibilidad debe ser mencionada debido a la conocida existencia de células progenitoras neurales multipotentes (Gage FH, 2000) y su factible diferenciación selectiva mediada por distintos factores de crecimiento hacia células nerviosas maduras (Hsieh J. et al., 2004; Lichtenwalner RJ, et al., 2001).

Se ha descrito que el IGF-I induce selectivamente la neurogénesis en el hipocampo de rata adulta (Aberg et al., 2000). Más cercano aún al objetivo principal del presente trabajo de tesis, se ha observado que la sobreexpresión de IGF-I in vivo (mediada por vectores virales adenoasociados) en la región del hylus del gyrus dentado correspondiente al hipocampo (región naturalmente dotada de alta concentración de oligodendrocitos), logró aumentar la intensidad de marcadores de oligodendrocitos maduros e inmaduros (Hsieh J. et al., 2004). Adicionalmente a estos hallazgos y subrayando la relevancia del estudio del mencionado factor de crecimiento, se ha mostrado que el aumento en el número de neuronas hipocampales inducido por el ejercicio es mediado por IGF-I circulante (Trejo et al., 2001). Es interesante destacar que recientemente se ha observado que existen células progenitoras neuronales en la

capa ependimal del tercer ventrículo de la rata adulta y que estas pueden migrar y diferenciarse a neuronas hipotalámicas (Xu et al., 2005).

Los hallazgo anteriormente mencionados, en combinación con estudios de pacientes post-mortem que manifestaron Alzheimer durante su existencia, en los cuales se constató neurogénesis hipocampal (Jin K. et al., 2003), deja abierta la posibilidad de tratar exitosamente diferentes patologías neurodegenerativas con IGF-I u otros factores neurotróficos mediante la terapia génica.

En síntesis, el presente estudio describe la implementación de terapia génica restaurativa en un modelo animal no explorado de disfunción asociada a la edad de neuronas DA centrales. Usando este paradigma, se ha demostrado que la terapia génica con IGF-I en el hipotálamo de ratas hembras hiperprolactinémicas seniles es altamente efectiva en la reversión de la disfunción TIDA. Estudios futuros explorando la capacidad restaurativa de IGF-I en la sustancia nigra de modelos de enfermedad de Parkinson, así como la posible actividad neurogénica de este factor en el hipotálamo y la sustancia nigra pueden resultar altamente fructíferos.

CONCLUSIONES

- El vector adenoviral RAd-IGF I construido en el curso del presente trabajo de tesis resulta una herramienta biotecnológica eficiente para la transferencia génica tanto in vitro como in vivo.
- La neurodegeneración TIDA en el hipotálamo de la rata hembra senil y la hiperprolactinemia crónica asociada a este proceso, constituyen un modelo animal inexplorado de enfermedad de Parkinson, que según se ha demostrado en este trabajo, resulta superior a otros que emplean lesiones farmacológicas nigrales. Esta superioridad surge de la simpleza con que se puede monitorear a lo largo del tiempo (midiendo la PRL sérica) la efectividad de la terapia empleada. Así mismo, los resultados que se obtengan en este modelo animal de neurodegeneración dopaminérgica espontánea resultarán más extrapolables a la enfermedad humana que los que surjan de los modelos farmacológicos. La noxa en la enfermedad de Parkinson y en nuestro modelo es la misma: el envejecimiento.
- La terapia génica con IGF-I aplicada al mencionado modelo animal resulta altamente efectiva, al menos en el mediano plazo, para restaurar la función TIDA senil, evaluada ésta a través de la evolución de la prolactinemia en los animales tratados y del conteo de neuronas hipotalámicas TH+.
- Si bien en este trabajo no se evaluó neurogénesis, los resultados obtenidos son compatibles con la posibilidad de que el efecto restaurativo de la terapia génica con IGF-I sea mediado, al menos en parte, por una acción neurogénica de IGF-I en el hipotálamo de las ratas seniles.
- La terapia génica con IGF-I podría estar mimetizando o potenciando mecanismos neurorestaurativos fisiológicos que *per se*, resultarían insuficientes en la rata senil para compensar los efectos deletéreos del envejecimiento. Esta hipótesis posee implicancias de particular relevancia para el diseño de futuras estrategias de terapia génica restaurativa para enfermedades neurodegenerativas seniles.

BIBLIOGRAFIA

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896- 2903
- Adamo M., Koval A., LeRoith D., Roberts C. (1994) Posttranscriptional regulation of IGF-I gene expresión. The insulin like growth factors and their regulatory proteins. Elsevier Science. Baxter, Gluckman and Rosenfel, editors
- Alberts, Jonson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. (2004) *Biología Molecular de La Célula*. Cuarta Edición. Barcelona.
- Amenta F, Bronzetti E, Sabbatini M, Vega JA. (1998) Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc Res Tech* 43: 29-33
- Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., Garcia-Segura L. (2003) Aromatase expresión by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann NY Acad Sci* 1007: 298-305.
- Barton -Davis E., Shoturma D., Musaro A., Rosenthal N., Lee Sweeney. (1998) Viral mediated expresion of insulin-like growth factor I blocks the aging- related loss of skeletal muscle function. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* Vol 95,pp 15603-15607.
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A (1998) Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol. Brain Res* 59:119-134.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF (1989) Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 33:399-477.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*; 275:1320-1323.
- Bohn Martha (2000) Parkinson's Disease: A Neurodegenerative Disease Particulary amenable to gene therapy. *Molecular Therapy* Vol 1, No6 (pp; 494-496).
- Bolognani F. y Goya R. (2001) Gene Therapy in the Neuroendocrine System: Its Implementation in Experimental Models using Viral Vectors. *Neuroendocrinology*; 73:75-83.
- Bondy C., H.Werner, C.T. Roberts, Jr and D. LeRoith (1992). Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expresión during maturation of the rat brain: Comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* Vol 46, Issue 4, pages 909-923.
- Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD (1991) Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol* 128:347-357.
- Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. (1984) Human Chromosomal mapping of gene for insulin -like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature*; Vol 310: 781-784.
- Cardona-Gomez G., Mendez P., DonCarlos Lydia M., Azcoitia I., Garcia-Segura L. (2001) Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implication for neuroprotection. *Brain Research Reviews* 37; 320-334.

Cardona-Gomez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM (2000) Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience*. 99:751-760.

Carri NG, Villegas Surcar G, Villegas N. (1999) Neurogénesis: Aspectos moleculares del desarrollo neural embrionario. Capítulo 4: Neurogénesis y neuritogénesis en sistemas trófico-dependientes. Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Buenos Aires, Argentina. Barsa SRL, La Plata.

Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678-5684.

Castro M.G.(1999) Gene therapy strategies for the treatment of pituitary tumors. *Journal of Molecular Endocrinology* 22; 9-18.

Castro M.G., J.Rowe, E.Morrison, P.Tomasec, C.A. Murray, A.F. Shering and P.R. Lowenstein (1996) Calcium-phosphate, DEAE-dextran coprecipitation, and Electroporation to transfer genes into neuronal and glial cell lines. Chapter 2 Protocols for gene transfer in neuroscience.

Connor B. and Dragunow M. (1998). The role of neural growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research reviews* 27: 1-39.

Cónsole G, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG(1997) Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Age Devel* ; 95: 157-166

Cortizo, Ana María y Antonio D. McCarthy (1998) Factores de crecimiento insulino similares: estructura, bioactividad y métodos de ensayo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* Vol XXXII Núm.4 471-516.

Cotman CW, Anderson KJ. (1988) Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: possible role in Alzheimer's disease. *Adv Neurol* ; 47: 313-35.

Dahlström y Fuxe y (1964) Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62:1-55.

Davis EJ, Foster TD, Thomas WE, (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* ; 34: 73-8.

Davis L.I. (1995) The nuclear pore complex. *Annu Rev. Biochem* 1995. 64: 865-96 Review.
Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Nelly MA, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. (2002) Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 143:1270-1279.

Dick M., Pluijm S., Jonker C., Deeg D., Lomecky M., Lips P. (2003) Insulin-like growth factor I and cognitive decline in older persons. *Neurobiology of Aging*, 24 (573-581).

Douglas Wallace and Simon Melov. (1998). Radicals r'aging. *Nature Genetics* vol 19p:105-106.

Ebadi and Pfeiffer (2004) Parkinson's Disease. Chapter 3: The role of dopamine in Parkinson's disease. Chapter 16: Classical of motor features of Parkinson's disease.

Feldman EL, Sullivan KA, Kim B, Russell JW. (1997) Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis*. 1997;4(3-4):201-14.

- Fernandez AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I (1998) Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *PNAS USA* 95:1253-1258.
- Fraker Pamela J. and Speck John C. Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 80, No 4.
- Franceschi M, Camerlingo M, Perego L, Bottacchi E, Truci G, Mamoli A (1988) Tuberoinfundibular dopaminergic function in Parkinson's disease. *Eur Neurol* ; 28:117-119.
- Freese A, Doring MJ, Davidson BL, Gennarelli TA, Kaplitt MG, Flamm ES, Snyder PJ. (1996) Transfection of human lactotroph adenoma cells with an adenovirus vector expressing tyrosine hydroxylase decreases prolactin release. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun; 81(6):2401-4.
- Friedman T. (1997) Overcoming the obstacles to gene therapy. *Scientific American*. pp: 80-85.
- Gage F.H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*. 287: 1433-1438.
- García-Segura L.M., Pérez J., Pons S., Rejas M., Torres-Aleman I. (1991) Localization of IGF-I immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Research Volume 560, Sigues 1-2*, pages 167-174.
- Geddes BJ, Harding TC, Lightman SL, Uney JB. (1997) Long-term gene therapy in the CNS: reversal of hypothalamic diabetes insipidus in the Brattleboro rat by using an adenovirus expressing arginine vasopressin. *Nat Med*. 1997 Dec; 3 (12):1402-4.
- Geddes BJ, Harding TC, Lightman SL, Uney JB. (1999) Assessing viral gene therapy in neuroendocrine models. *Front Neuroendocrinol*. Vol20(4):296-316.
- Goya RG, Bolognani F, Herenu CB, Rimoldi OJ. (2001) Neuroendocrinology of aging: the potential of gene therapy as an interventional strategy. *Review Gerontology*. May-Jun; 47 (3):168-73.
- Goya RG, Lu JKH, Meites J (1990) Gonadal function and pituitary and mammary pathology in the aging rat. *Mech Age Devel* 1990;56: 77-88.
- Goya RG, Sarkar DK, Brown OA, Herenu CB (2004) Potential of gene therapy for the treatment of pituitary tumors. *Curr Gene Ther*. Mar; 4 (1):79-87.
- Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A. (1996) The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*. Apr 1996; 15(8): 1766-77.
- Hitt Mary, Andrew Bett, Ludvik Prevec and Frank Graham (1998) Construction and propagation of Human Adenovirus Vectors. *Cell Biology, a laboratory handbook*. Second Edition Vol. 1 pp: 500-512.
- Hitt Mary, Bett Andrew, Addison Christina L., Ludvik Prevec, and Frank L. Graham. (1995) Techniques for Human Adenovirus Vector Construction and Characterization. *Methods in Molecular Genetics*, Volume 7: 13-30.
- Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH. (2004) IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol*. 5; 164(1):111-22.
- Jazwinsky SM. (1998) Genetics of longevity. *Experimental Gerontology* Vol 33: 773- 83.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;101(1):343-7.

Jones DG, Calverley RKS. (1992) Changes of synapses with age: the respective contributions of non-perforated synapses in neocortex. In Fujisawa K, Morimatsu Y, eds. Development and Involution of Neurones. Tokyo: Japan Scientific Societies Press. P: 249-62.

Jordan Martin, Annette Schallhorn and Florian M. Wurm. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucleic Acids Research, 1996 pag 596-601.

Kaiser Ursula (2001) Pituitary gene therapy- Hypothesis on the hypophysis. Endocrinology Vol 142.No2.

Kandel Eric, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell (2000) Principles of Neural Science, Fourth Edition. International Edition. Chapter 60: Disorders of Thought and Volition: Schizophrenia. Chapter 15: Neurotransmitters.

Kandel Eric, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell (2000) Principles of Neural Science, Fourth Edition. International Edition. Chapter 43

Kawano H, Daikoku S (1987) Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. J Comp Neurol 265:242-253.

Kazanis Ilias, Bozas E., Philippidis H., Fotini Stylianopoulou. (2003) Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) following a penetrating brain injury in rats. Brain Research 991 34-45.

Kirkwood TB. (1998) Biological theories of aging: an overview. Aging (Milano) Vol 2: 144-146.

Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F. (1990) Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factors I and II. J. Neurosci 10: 558-570.

Ko SC, Gotoh A, Thalmann GN, Zhou HE, Johnston DA, Zhang WW, Kao C, Chung LW. (1996) Molecular therapy with recombinant p53 adenovirus in an androgen-independent, metastatic human prostate cancer model. Hum Gene Ther. 1996 Sep 10; 7(14):1683-91.

Korell and Tanner. (2004) Epidemiology of Parkinson's disease: An overview. In : Parkinson's Disease, Ebadi and Pfeiffer, Chapter 5, CRC Press.

Lapchak P., Miller P., Collins F., Jiao S. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates behavioral deficits and regulates nigrostriatal dopaminergic and peptidergic markers in 6-OH dopamine-lesioned adult rats: Comparison of intraventricular and intranigral delivery. Neuroscience Vol 78, pp. 61-72.

Larsen, Kronenberg, Melmed and Polonsky (2003). Williams Textbook of Endocrinology; tenth edition. Section six ; 23: Normal and aberrant growth.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience. 39, Issue 1, pages 151-170.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S. (2001) The somatomedin hypothesis. Endocr Rev; 22: 53-74. (The endocrine Society).

- Le Roith Derek., Choi-Lundberg, Qing Lin, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* Vol 275:838-841.
- Le Roith Derek, Louis Scavo and Andrew Butler (2001) What is the role of circulating IGF-I ?. *Trends in Endocrinology & Metabolism* Vol 12 No 2.
- LeRoith D., Werner H., Faria T., Kato H., Adamo M., Roberts C. (1992) Insulin-like growth factor Receptors. Implications for Nervous System Function. *Annals New York Academy of Science* pages 22-32.
- Li XS, Williams M, Bartlett WP. (1998) Induction of IGF-1 mRNA expression following traumatic injury to the postnatal brain. *Brain Res Mol Brain Res* 57:92-96 .
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*. 2001;107(4):603-13.
- Lieber A, He CY, Kay MA (1997) Adenoviral preterminal protein stabilizes mini-adenoviral genomes in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 1997 Dec; 15(13):1383-7.
- Lin, L F H, Doherty DH, Lile JD, Bektes S, Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132.
- Loddick S., Liu X., Lu Z., Liu C., Behan D., Chalmers D., Foster A., Vale W., Ling N., Errol B. de Souza. (1998) Displacement of insulin – like growth factors from their binding proteins as a potential treatment for stroke. *Proc Natl. Acad. Sci USA* vol95 pp 1894-1898.
- Lowenstein PR, Thomas CE and Castro MG (1999) Politically correct gene therapy? A "clean environment" improves gene delivery to the brain! *Gene Therapy* 1999 Apr; 6 (4): 463-464.
- Lowenstein PR, Shering AF, Bain D, Castro MG and Wilkinson GWG (1996) The use of adenovirus vectors to transfer genes to identified target brain cells in vitro. In: Lowenstein PR and Enquist LW (Eds) , *Protocols for gene transfer in neuroscience: Towards gene therapy or neurological disorders*. Wiley, Chichester , pp 169-186.
- Maggi A., Ciana P., Belcredito S., Vegeto E. (2004). Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol* 66: 291-313.
- Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE. (1997) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *PNAS* 94: 14083-14088.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. (1998) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* 87:559-569.
- Mata M., Glorioso J., Fink D. (2003) Gene transfer to the Nervous System: Prospects for novel treatments directed at disease of the aging nervous system. *Journal of Gerontology* Vol 58 A. No12. 1111-1118.
- Mayeux R, Marder K, Cote LJ, Denaro J, Hemenegildo N, Mejia H, Tang MX, Lantigua R, Wilder D, Gurland B (1995) The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol* 142:820-827.

- Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2005) Interdependence of oestrogen and insulinlike growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *J Endocrinol* 185:11-17.
- Moussa B.H.Youdim and Peter Riederer. (1997) *Understanding Parkinson's Disease*. Scientific American .
- Nahid K El-Bakri, Atiqui Islam, Isam Suliman, Urban Lindaren, Bengt Winblad, Abdu Adem. (2004) Ovarectomy and gonadal hormona treatment: effects on insulin-growth factor-I receptors in the rat brain. *Growth Hormone & IGF Research* 14: 388-393.
- Ng P, Parks RJ, Cummings DT, Evelegh CM, Graham FL (2000) An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum Gene Ther*. 2000 Mar 20;11(5):693-9.
- Ng P, R.J.Parks, D.T.Cummings, C.M. Evelegh, U.Sankar and F.L.Graham. (1999) A high Efficiency Cre/lox P-Based System for Construction of Adenoviral Vectors. *Human gene Therapy* November 10: 2667-2672.
- Palkovits,M (2000) Micro-and Macroscopic Structure, Innervation and Vasculature of Hypothalamus. In Conn, P.M. & Freeman, M.E (eds), *Neuroendocrinology in Physiology ann Medicine*. Humana Press, New Jersey, pp.23-40.
- Paxinos y Watson (2000) - *The rat brain*.
- Peinado MA (1998) Histology and histochemistry of the aging cerebral cortex: an overview. *Microscopy Res Tech* Vol 43: 1-7.
- Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. (1997) Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior . *Crit Rev Neurobiol* Vol 11: 121-42.
- Porter JC, Aguila-Mansilla N, Ramin SM, Kedzierski W (1994) Secretion by hypothalamic dopaminergic neurons of the aged brain. *Neurobiol Aging* 15:535-539.
- Porter JC, Nansel DD, Guselsky, GA, Reymond MJ, Pilotte NS, Foreman MM, Tilders FJH (1980) Some aspects of hypothalamic and hypophysial secretion in aging rats. *Peptides* 1:135-139.
- Precious B and Russell WC. (1985) Growth, purification and titration of adenoviruses. In: Mahy, BWJ, (Ed) *Virology: a practical approach*, pp. 193-205. IRL Press, Oxford.
- Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*. 2003 Jan; 111(1):3-10.
- Quesada A., Micevych P. (2004) Estrogen interacts with the IGF-I system to Project nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxidopamine lesions. *Journal of Neuroscience Research* 75: 107-116.
- Rechler M. and Clemmons D., (1998) Regulatory Actions of Insulin-like growth factor-binding proteins. *TEM* Vol.9, No5 pp176-183.
- Reymond MJ, Porter JC (1981) Secretion of hypothalamic dopamine into pituitary stalk blood of aged female rats. *Brain Res Bull* 7:69-73.
- Riley DJ, Nikitin AY, Lee WH. (1996) Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb+/- mice. *Nat Med*. Dec; 2(12):1316-21.

- Robbins P., Tahara H., Ghivizzani S. (1998) Viral vectors for gene therapy. *HBTECH. Review. Vol 16 p: 35-40.*
- Rotwein P. (1991) Structure, evolution, expresión, and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth factors Vol 5: 3-18.*
- Russell W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. Review article. *Journal of general Virology Vol 81; 2573-2604.*
- Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning a laboratory Manual Third Edition, New York.*
- Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO (2003) Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: A morphometric study. *J Comp Neurol 458:319-325.*
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. (1982) Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science Vol 218:684-686.*
- Shenk T. (1996) Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Field Virology edn 3, ch,pp 979-1016, Eds BN Fields, DM Knipe, PM Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.*
- Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T (2003) Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med. 9:360-365.*
- Short DK, Okada S, Yamauchi K, Pessin JE (1998) Adenovirus-mediated transfer of a modified human proinsulin gene reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Am J Physiol. Nov; 275(5 Pt 1):E748-56.*
- Sonntag W., Lynch C., Bennet A., Khan S., Thornton L., Cooney P., Ingram R., McShane T., Brunso-Bechtold J. (1998) Alterations in insulin-like growth factor-I gene and protein expresión and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brain of ageing rats. *Neuroscience Vol 88 No 1. pp 269-279.*
- Sonntag W.E., Lynch C., Thornton P., Khan A., Bennett S., Ingram R. (2000) The effects of growth hormone and IGF-I deficiency on cerebrovascular and brain ageing. *J. Anat. Nov; 197 Pt 4:575-85.*
- Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM (1997) Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology 138:3515-3520.*
- Stone D, David A, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. (2000) Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol. 2000 Feb;164(2):103-18.*
- Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P (1992) Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest 90:626-630.*
- Streit WJ, Walter SA, Pennel NA. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol. ; 57: 563-81.*
- Thomas RJ. (1995) Excitatory amino acids in health and disease. *J Am Geriatr Soc ; 43: 1279-89.*
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LFH, Ögrenn SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature 1995; 373:335-339.*
- Torres-Aleman I, Naftolin F, Robbins RJ, (1990) Trophic effects of insulin-like growth factor I on fetal rat hypothalamic cells in cultura. *Neuroscience 35:601-608.*

Trejo J., Carro E., Lopez-Lopez C., Torres-Aleman I. (2004) Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Hormone & IGF Research* 14 S39-S43

Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21:1628-1634.

Vallone D, Picetti R and Borrelli E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Review* 24: 125-132.

Valtin H (1992) Genetic models of diabetes insipidus. In: *Handbook of Physiology* (Windhager EE, ed), pp 1281-1316. New York, Oxford University Press.

Vasquez E., Beltz T., Meyrelles S., Jonson A. (1999). Adenovirus-mediated gene delivery to Hypothalamic Magnocellular Neurons in mice. *American Heart Association. Hipertensión* Oct.1999; 34 [part2]: 756-761.

Veiga S., Garcia-Segura L.M., Azcoitia I. (2004). Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Revisiones en Neurociencia*. Editor: J.V.Sánchez-Andrés. Vol 39 (11): 1043-1051.

Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Logan A. (1997) Spatial and temporal changes in the Insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/ paracrine actions of within wounds of the rat brain. *Endocrinology* 138:3024– 3034.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA & Nemerow GR (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73 309-319.

Wood M., Charlton H., Wood K., Kajiwara K., Byrnes A. (1996) Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system. *TINS* Vol.19 No.11 p: 497-501.

Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192:251-264.

Yao DL, West NR, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J, Collins GH, Webster HD (1995) Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res* 40:647–659.

Zigmond , Bloom, Landis, Roberts, Squire. (1999) *Fundamental Neuroscience Chapter 37*. Academic press

Zigmond, Bloom, Landis, Roberts, Squire. (1999) *Fundamental of Neuroscience. Chapter 8: Neurotransmitters*. Academic press.

Zuccolilli G.(2003) *Neurobiología Básica. Conceptos para medicina veterinaria. 2da Ed.* Editor , Zuccolilli G. UNLP.