



# TERAPIA GENICA NEUROPROTECTORA A LARGO PLAZO EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO EXPERIMENTAL

Schwerdt JI<sup>1,2</sup>, Hereñú C<sup>1,2</sup>, Camihort G<sup>2</sup>, Luna G<sup>2</sup>, Spinedi EJ<sup>3</sup>, Goya RG<sup>1,2</sup>, Cónsole GM<sup>2</sup>.  
INIBIOLP<sup>1</sup>- Histología B<sup>2</sup>, CENEXA<sup>3</sup>, Facultad de Ciencias Médicas-UNLP.



## Introducción

El envejecimiento se asocia a una mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer) que abren la posibilidad de aplicar terapia génica con factores neurotróficos. Los pacientes portadores de enfermedad de Parkinson presentan alteraciones funcionales en el eje hipotálamo-lactotrofo. En la rata hembra, el envejecimiento trae aparejada una progresiva degeneración y pérdida de neuronas hipotalámicas tubero-infundibulares dopaminérgicas (TIDA) que ejercen un control tónico inhibitorio sobre la secreción de prolactina (PRL) y determinan la proliferación de la población lactotropa adenohipofisaria. Se ha propuesto el uso terapéutico de factores neurotróficos para restaurar la función TIDA y corregir la hiperprolactinemia crónica. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron un efecto restaurador de las neuronas TIDA, al inyectar en el hipotálamo medio basal vectores adenovirales de primera generación portadores del factor de crecimiento insulino similar tipo I (IGF-I) mediante un diseño de terapia génica a corto plazo (17 días) en ratas seniles de 28 meses.

## Objetivo

Determinar si la terapia génica de largo plazo (4 meses) con un vector adenoviral portador del gen IGF-I en el hipotálamo medio basal de ratas envejecidas (24 meses) resulta efectiva para prevenir la degeneración de las neuronas TIDA y regular la hiperprolactinemia crónica con cambios en la población lactotropa.

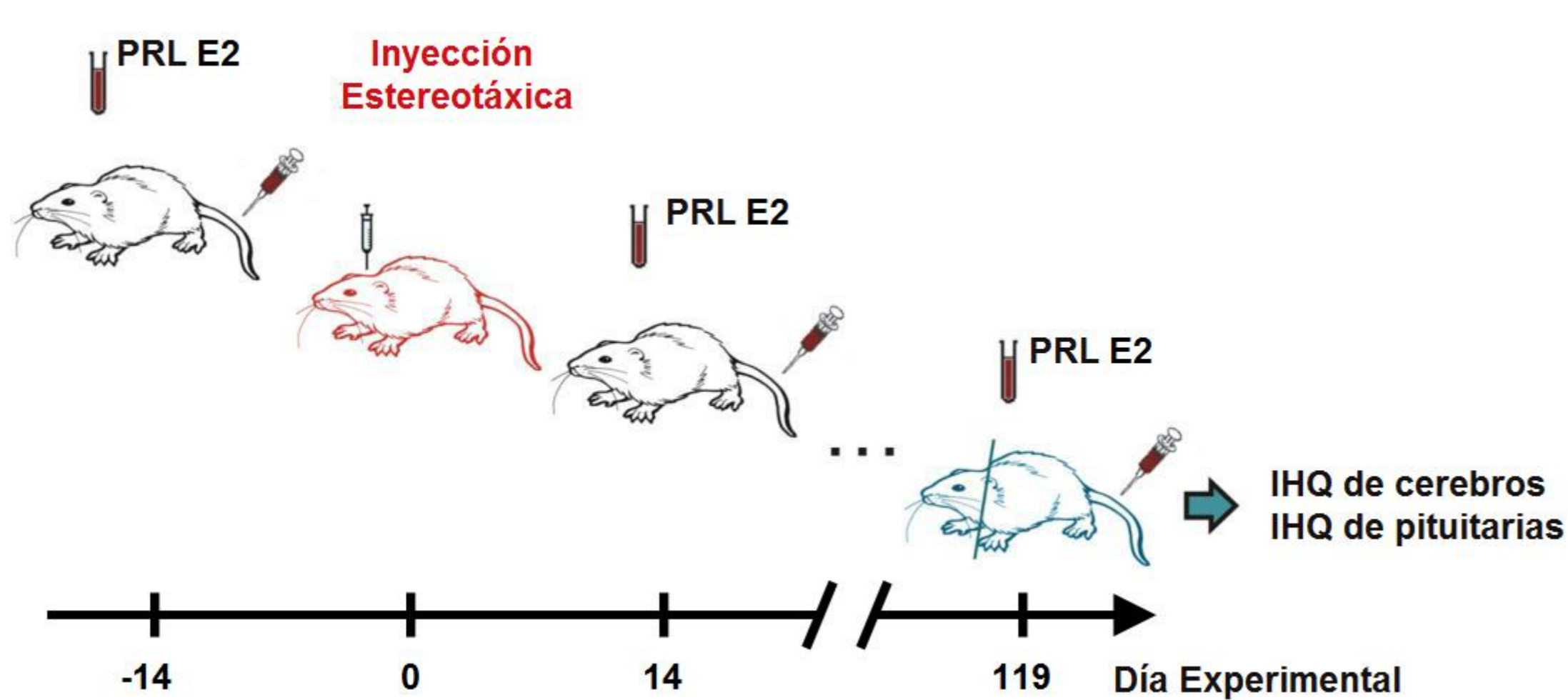
## Materiales y métodos

**Construcción de adenovectores de tercera generación (HDAd's): HDAd-IGF-I:** casete de expresión exógeno constituido por el promotor del citomegalovirus murino (pMCMV), el transgén del IGF-I de rata y la señal de poliadenilación del SV40. Título:  $2,24 \times 10^{12}$  PV/ml. **HDAd-DsRed2 (vector control):** casete de expresión exógeno constituido por el pMCMV, el transgén de la DsRed2 (proteína fluorescente en rojo) y la señal de poliadenilación del SV40. Título:  $8,45 \times 10^{12}$  PV/ml. Ambos vectores fueron construidos en nuestro laboratorio con el kit comercializado por Microbix Biosystems Inc.

**Líneas celulares:** A549: adenocarcinoma alveolar humano; B92: glial de rata; N2a: neuroblastoma de ratón.

**Animales:** ratas Sprague-Dawley hembras jóvenes y viejas (24 meses) mantenidas a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con ciclos de 12:12 horas luz/oscuridad y libre acceso al agua y la comida.

**Diseño experimental:** 6 grupos: las ratas jóvenes y viejas se dividieron en intactas (sin inyección), inyectadas con vector control e inyectadas con vector portador del gen IGF-I. Se extrajeron muestras de sangre a los animales de cada grupo en los días: -14; 14; 28; 56; 88 y 119 (inyecciones estereotáxicas: día 0) para medir PRL, como índice de funcionalidad neuronal TIDA, y estradiol (E2). Los animales fueron sacrificados a los 28 meses de edad.



**Microcirugía estereotáxica:** las ratas fueron anestesiadas y colocadas en un aparato estereotáxico. Para acceder al hipotálamo medio basal se utilizaron las siguientes coordenadas respecto al bregma: 3,0 mm posterior, 9,8 mm ventral y 0,6 mm izquierda-derecha. En todos los casos se inyectaron bilateralmente 2  $\mu\text{l}$  de la suspensión viral apropiada ( $4,22 \times 10^9$  PV).

**Eutanasia y disección de cerebros:** las ratas fueron perfundidas por vía intracardíaca con solución salina seguida de paraformaldehído 4% en PBS. El cerebro fue disecado y cortado en secciones coronales seriadas de 40  $\mu\text{m}$  de espesor con un vibrátomo.

**Inmunohistoquímica de las pituitarias:** se fijaron en Bouin y se procesaron para microscopía óptica. Se efectuaron cortes histológicos seriados en dos niveles de la glándula pituitaria (ventral y dorsal). Se procedió a detectar las células positivas mediante un sistema anticuerpo primario anti-PRL-Envision (Dako)-cromógeno diaminobencidina (DAB).

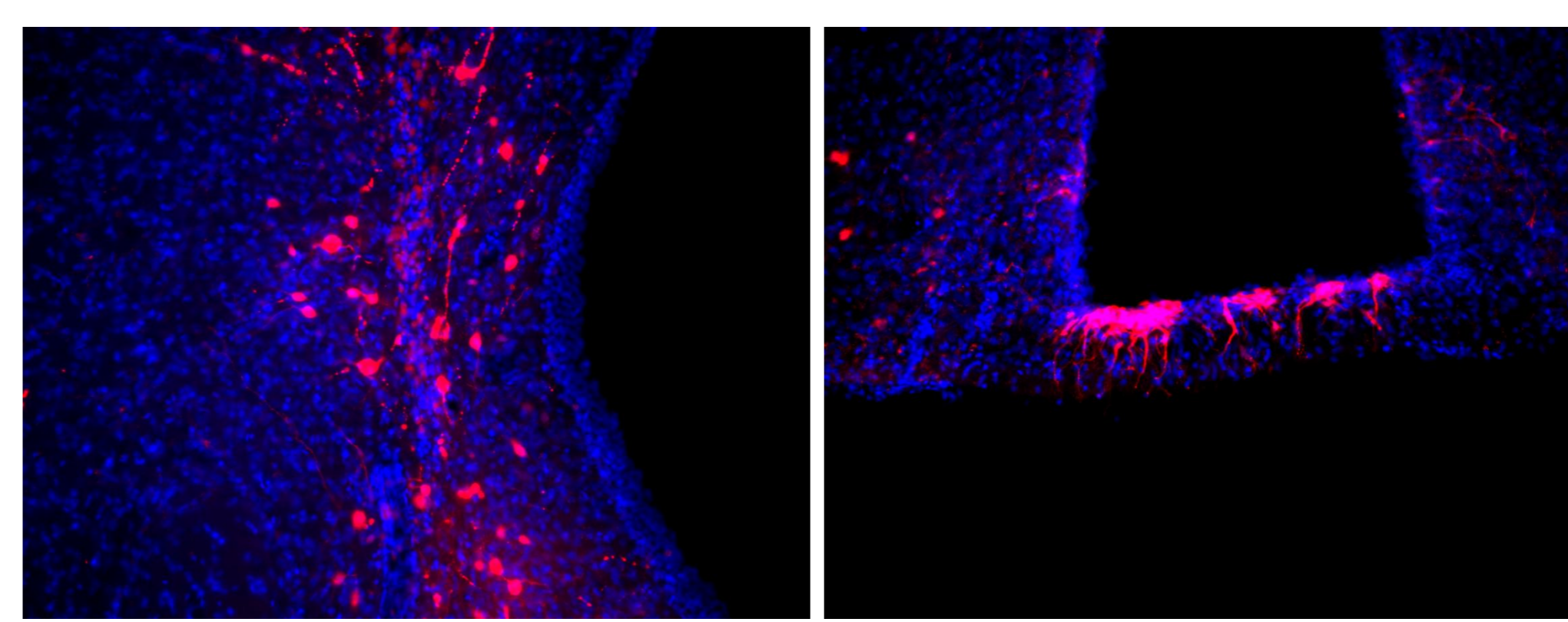
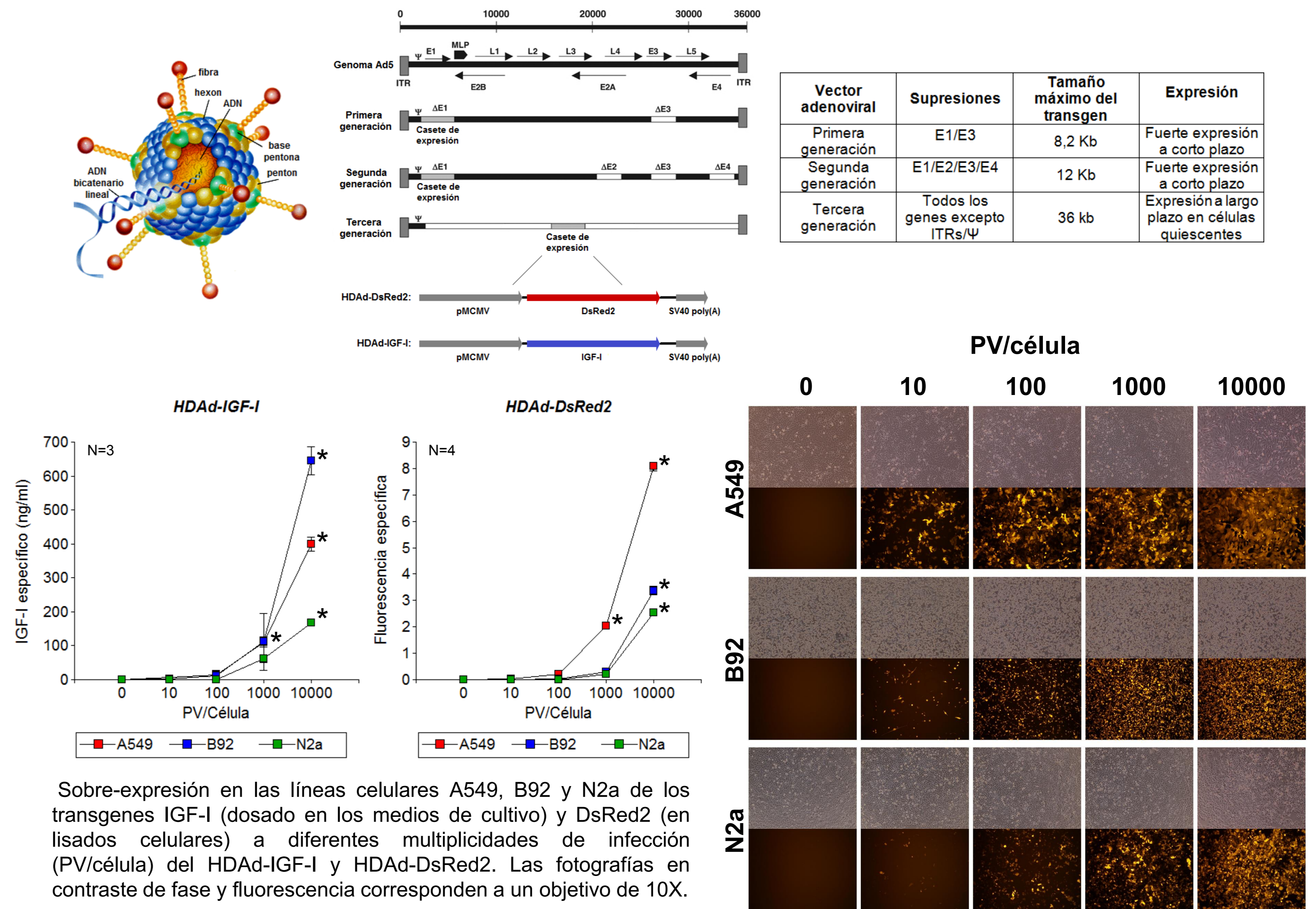
**Radioinmunoensayos:** para los dosajes de PRL sérica e IGF-I se emplearon materiales provistos por el Dr. A. F. Parlow, NHPP, NIH, USA.

**Análisis estadístico:** los datos se analizaron mediante ANOVA seguido por un test de Tukey-Kramer. Se consideraron diferencias significativas a valores de  $p < 0,05$  (\*). En los gráficos se representan las medias con sus respectivos errores estándar.

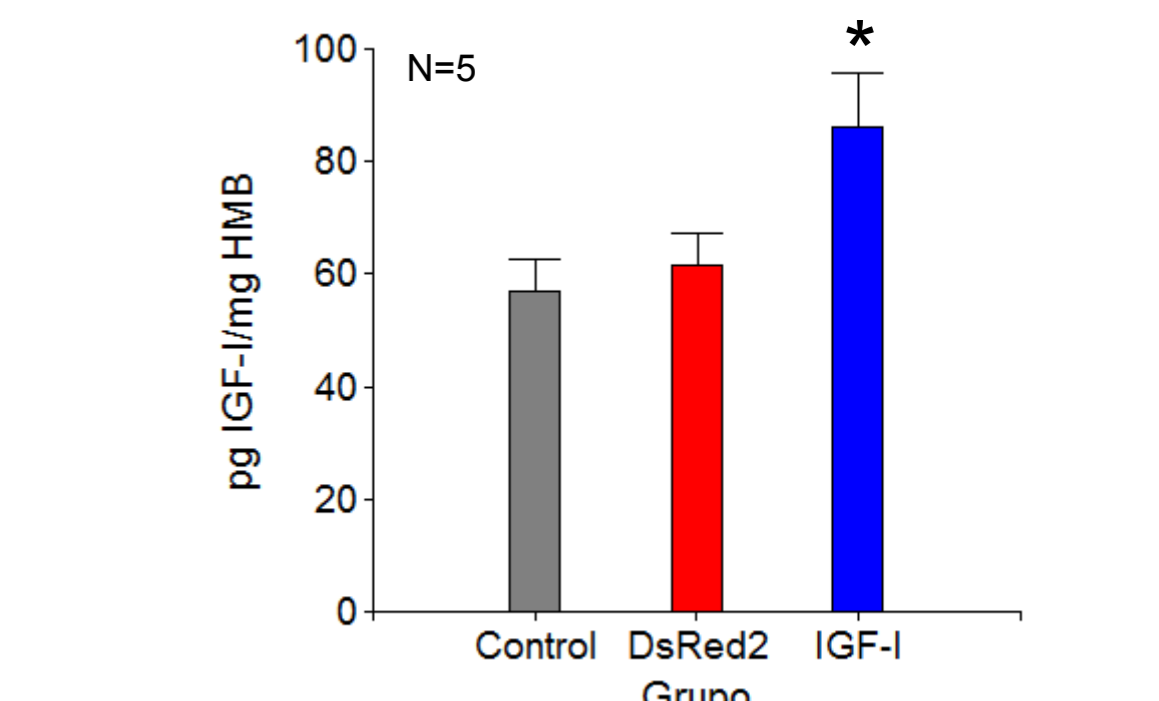
## Resultados

### 1. Construcción de adenovectores de tercera generación (HDAd's).

El vector debe ser capaz de transducir con eficiencia las células blanco *in vivo*, y de producir una expresión elevada y prolongada del transgén con una toxicidad mínima. Los vectores adenovirales de primera generación retienen muchos de los genes virales presentes en el genoma, y producen *in vivo* una respuesta inmune sobre las células transducidas que reduce la duración de expresión del transgén. Los HDAd's no contienen genes virales, sólo conservan los elementos *cis* necesarios para la replicación y encapsidación del genoma (secuencias ITRs y  $\Psi$ ). Estos vectores tienen menor toxicidad y mayor duración de expresión del transgén, por lo que pueden ser utilizados en una terapia génica de largo plazo.



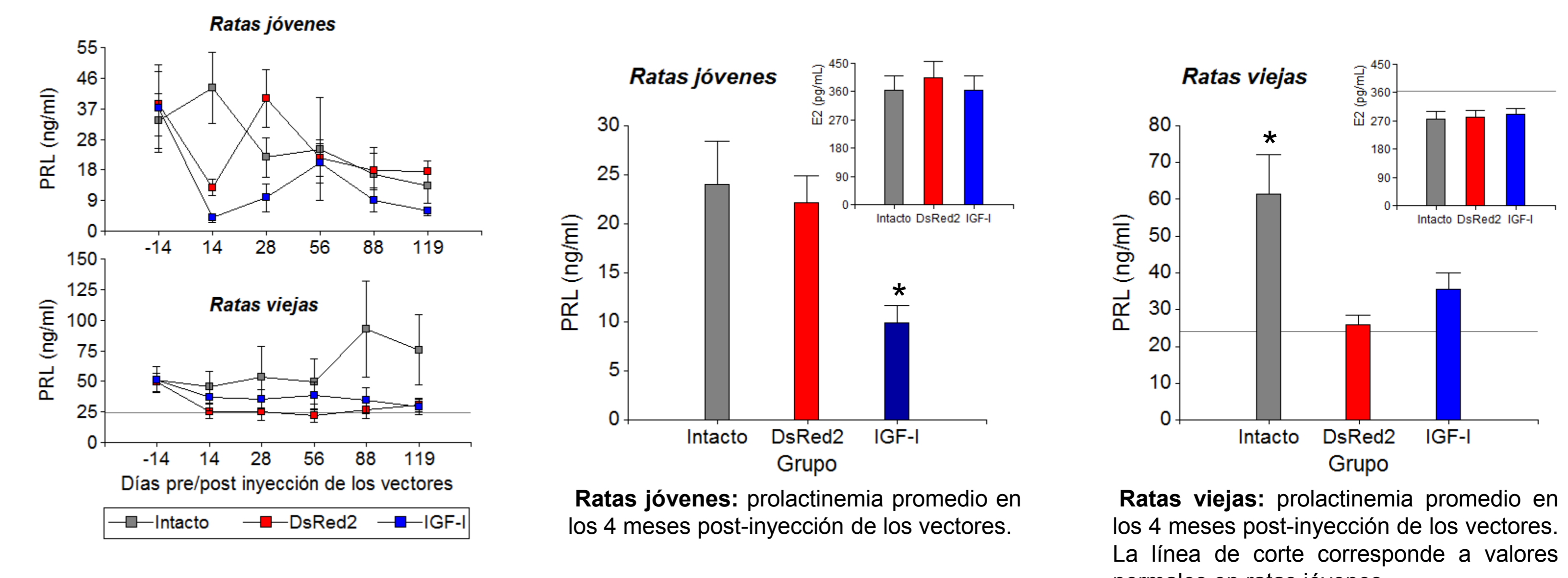
Expresión de DsRed2 (fluorescencia roja) en el hipotálamo medio basal a los 120 días post-inyección del vector HDAd-DsRed2. En azul: núcleos marcados con DAPI. Objetivo 20X.



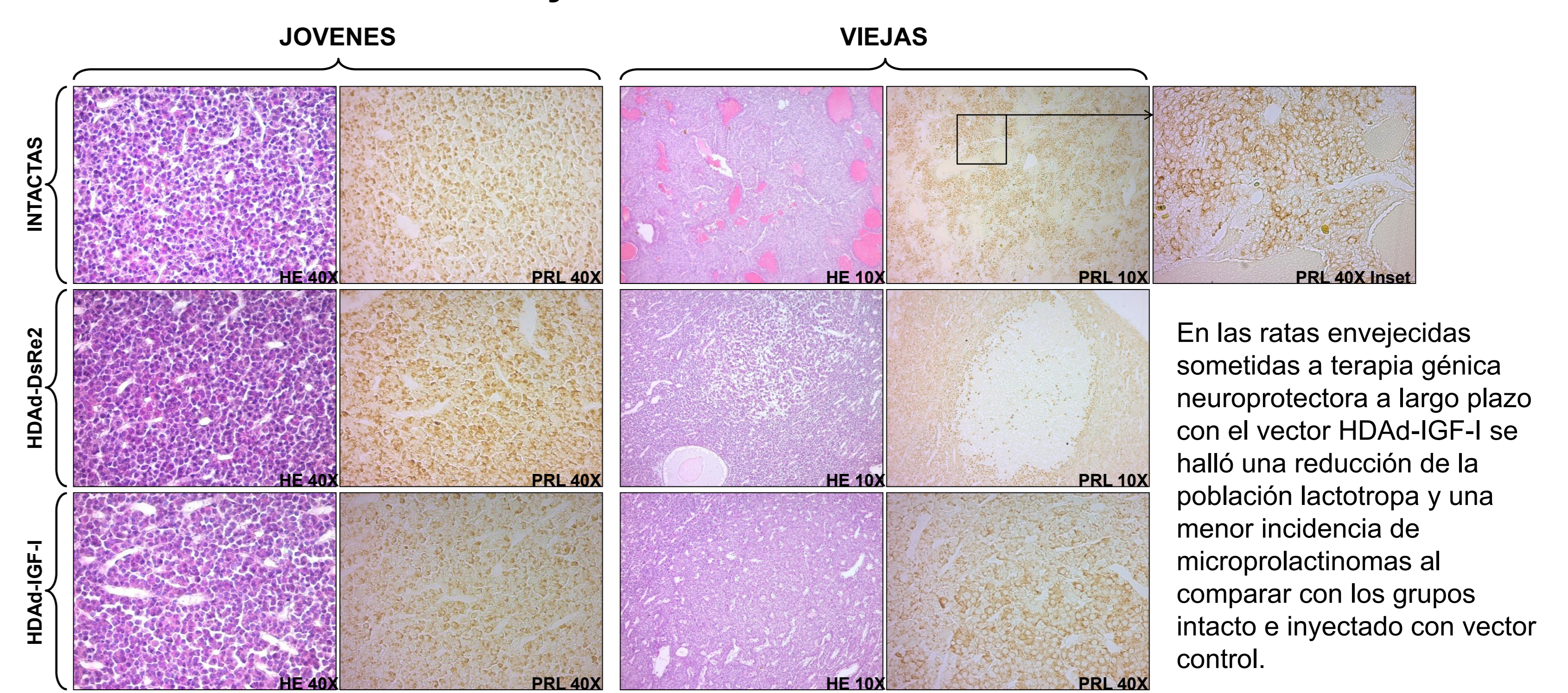
Sobre-expresión de IGF-I en homogenatos de hipotálamo medio basal a las 48 hs post-inyección del HDAd-IGF-I.

### 2. Niveles séricos de PRL y E2 en ratas jóvenes y viejas: intactas, inyectadas con vector HDAd-DsRed2 e inyectadas con vector HDAd-IGF-I.

En los animales jóvenes el vector HDAd-IGF-I redujo los valores séricos de PRL ( $p < 0,05$ ) con respecto a los grupos intacto e inyectado con vector control. Las ratas viejas de los grupos inyectados con vector control e IGF-I mostraron reducción ( $p < 0,05$ ) de la PRL en relación al grupo intacto. Respecto a la PRL sérica se observó un efecto inespecífico a determinar en el grupo de ratas viejas inyectado con vector control. No se hallaron diferencias significativas en los valores séricos de E2 entre grupos intactos e inyectados con vectores.



### 3. Población lactotropa en ratas jóvenes y viejas: intactas, inyectadas con vector HDAd-DsRed2 e inyectadas con vector HDAd-IGF-I.



En las ratas envejecidas sometidas a terapia génica neuroprotectora a largo plazo con el vector HDAd-IGF-I se halló una reducción de la población lactotropa y una menor incidencia de microprolactinomas al compararse con los grupos intacto e inyectado con vector control.

## Conclusiones preliminares

Estos resultados parciales sugieren que en ratas jóvenes la sobre-expresión prolongada (4 meses) de IGF-I estimula la actividad dopaminérgica TIDA con descenso de la PRL sérica. En las ratas viejas hay un efecto favorable del IGF-I en la prevención y reversión de la hiperprolactinemia crónica probablemente relacionado a una menor incidencia de microprolactinomas a nivel pituitario, con la observación en el grupo control de un efecto inespecífico de origen desconocido que resta esclarecer.

## Referencias.

- Franceschi M, Camerlingo M, Perego L, Bottacchi E, Mamoli A. Tubero-infundibular dopaminergic function in Parkinson's disease. Eur Neurol 28: 117-119 (1988).
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. Science 218: 684-686 (1982).
- Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: A morphometric study. J. of Comparative Neurology; 458: 319-325 (2003)
- Sonntag WE, Lynch CD, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso-Bechtold JK. Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. Neuroscience 88: 269-279 (1999).
- Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL, Goya RG. Restorative effect of Insulin-like Growth Factor-1 gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction; Gene Therapy; 14: 237-245 (2007)
- Manual for construction of helper dependent adenovirus vectors. Document: MBX-01-02. Microbix Biosystems Inc.
- Oka K, Chan L. Helper-dependent adenoviral vectors. Current Protocols in Molecular Biology. 16.24.1-16.24.23 (2005).