

RESUMEN

Roberto Rangel Orozco

Fecha de Graduación: Julio 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA PROGRAMADA, ESTUDIOS *IN VITRO*.

Número de páginas: Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Microbiología

Area de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del estudio: La migración celular es un proceso altamente regulado que se presenta tanto en etapas embrionarias como en estadios adultos. Nuestros estudios se enfocan sobre los mecanismos moleculares implicados en la migración celular asociada a la maduración y diferenciación. Los modelos biológicos donde estos mecanismos operan están representados principalmente por el sistema inmune y el reproductor. En este contexto, el descubrimiento de la molécula timotestin por nuestro laboratorio y la observación de que su expresión es casi exclusiva de los timocitos y de las células germinales, proporciona un modelo de estudio idóneo. En el presente trabajo, hemos determinado los dominios funcionales de timotestin, determinando su localización subcelular y confirmando su asociación fisicoquímica con moléculas relevantes en la actividad del citoesqueleto y analizado su función.

Contribuciones y Conclusiones: Nuestro modelo de estudio establece que la proteína timotestin representa un mecanismo común de maduración y diferenciación que opera tanto en el sistema inmune como en el aparato reproductor. Timotestin es una proteína de membrana que activa en forma polar la proteína tirosina cinasa pp60 c-src e induce su translocación hacia el citoesqueleto para activar los mecanismo de polimerización de actina y favorece la migración celular mediante la formación de filopodia y lamelopodia. En resumen, timotestin representa un nuevo vínculo entre el sistema inmune y reproductor mediante un mecanismo común: "migración asociada a maduración celular".


Dr. Hector Martínez-Valdez

Director externo

Dr. Juan Manuel Alcocer González

Director interno

1. INTRODUCCION

El sistema inmune y el reproductor comparten propiedades que incluyen parámetros histológicos y funcionales. Por ejemplo, la organización histológica del timo y el microambiente testicular exhibe estructuras que son análogas a ambos sistemas, en los que se pueden identificar una corteza y una médula, donde las células inmuno-competentes y germinales migran y maduran respectivamente. Mientras que en el timo existen células epiteliales especializadas y células dendríticas que nutren y mantienen la maduración, diferenciación y selección del repertorio de timocitos funcionales, de manera análoga, el tejido testicular cuenta con las células de Leydig y sertolli. Ambos sistemas dependen y responden a factores extracelulares de crecimiento y diferenciación celular en la forma de citocinas y hormonas. Mas aún, la diferenciación intra-tímica y testicular, así como la exportación del repertorio funcional, depende de la motilidad, polarización, y migración celular (Dynn, 1994; Prockop S., et al., 2000). Estas funciones dependen de señales extracelulares quimiotácticas que son transducidas vía ligando-receptor y ejecutadas por proteínas del citoesqueleto.

El estudio de estas funciones representa un paso importante para entender los mecanismos moleculares que regulan la migración celular durante la maduración intratímica y testicular. Con este fin es necesario analizar con detalle los factores que determinan la motilidad, la exportación y la fisiología de cada sistema por separado.

1.1. El timo.

El timo tiene como función generar linfocitos T maduros e inmunocompetentes mediante un proceso dependiente de la motilidad, polarización y migración celular. Además de los timocitos que se pueden identificar en varios estadios de diferenciación, el timo está constituido por distintos linajes celulares que incluyen fibroblastos, células epiteliales tímicas (TECs), células dendríticas, y macrófagos. La migración de los timocitos depende del estadio de diferenciación, y consecuentemente determina su distribución intra-tímica. Por ejemplo, en la región subcapsular se concentran las células progenitoras de los timocitos (pro-T: $CD4^-$, $CD8^-$, $CD3^-$) que provienen de médula ósea. Las células pro-T migrarán a la corteza del timo, donde maduran y se convierten en precursores doble positivos (Pre-T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$). Las células pre-T posteriormente se diferencian y se convierten en linfocitos T cooperadores ($CD4^+$, $CD8^-$) o citotóxicos ($CD4^-$, $CD8^+$). Finalmente el repertorio inmunocompetente $CD4^+$ y $CD8^+$ es seleccionado en función de su afinidad y avidéz por el antígeno asociado al complejo de histocompatibilidad clase II y I respectivamente, y subsecuentemente los timocitos son exportados a la periferia (Janeway C.A. et al., 1997, William P.E. 1999).

Dentro del microambiente histológico del timo existen gradientes de fibronectina y de quimiocinas que favorecen la migración de los linfocitos hacia los diferentes áreas y estadios de maduración (Anderson G., et al., 2000, Crisa L. et al., 1996), por lo que la motilidad celular dentro del timo, requiere de un control específico sobre la expresión y distribución de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas. Tal distribución está mediada por la polarización de los timocitos, que presentan una morfología con dos compartimientos celulares, la zona frontal y el uropodio. Esta estructura es resultado de la organización de los

filamentos de actina y de la activación de integrinas, que ocurre como consecuencia de la fosforilación dependiente de cinasas de adhesión focal (FAK). En la zona frontal, se concentran receptores responsables de la detección de gradientes de factores quimiotácticos presentes en el microambiente. El uropodio, es la zona en donde se acumulan las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) ICAM-1, -2, y -3, CD43, CD44, tubulina, miosina II, y las proteínas de unión a actina, que incluyen a la familia de la ezrina-radixina-moesina (ERM). Esta reorganización del citoesqueleto facilita la migración de los linfocitos a través de los órganos linfoides primarios y secundarios (Serrador J.M. et al.,1999, Arpin M., et al. 1994, Tsukita S., et al 1997, Del Pozo M.A. et al., 1999).

La compartimentalización de CD43, CD44, e ICAMs esta mediada por las proteínas ERM, las cuales poseen dos dominios funcionales: (a) La región amino-terminal que interacciona con motivos intracitoplasmáticos de receptores membranales y (b) El dominio carboxil-terminal que tiene estructuras hélices alfa espiral-espiral que favorecen la interacción con proteínas del citoesqueleto, y forma un puente de unión con los receptores membranales. Estas propiedades definen a la familia ERM como proteínas adaptadoras y acarreadoras que reorganizan la estructura celular. Estas moléculas se localizan en la membrana celular en un estado inactivo, pero al ser fosforiladas la conformación estructural de las hélices alfa espiral-espiral son expuestas y pueden unirse a proteínas del citoesqueleto o dimerizarse. Por tal razón, la regulación de estas proteínas a nivel de transcripcional, traduccional y post-traduccional es clave, ya que ello determina la efectividad de la migración de linfocitos a través de diferentes regiones histológicas en los órganos linfoides.

1.2. El tejido testicular.

En forma análoga a la diferenciación intra-tímica, la motilidad, polarización y migración celular juegan un papel clave en fisiología testicular. La maduración intra-testicular comparte con la función intra-tímica mecanismos moleculares que traen como consecuencia la generación de células germinales funcionales. La maduración y diferenciación de las células progenitoras y precursoras de espermatozoides se llevan a cabo en los túbulos seminíferos, los cuales están formados por una membrana basal (análoga a la corteza del timo) que se encuentra tapizada, por células germinales (progenitoras) totipotenciales llamadas espermatogonias que dan origen a los precursores de los espermatozoides o espermatocitos y finalmente a los espermatozoides, los cuales migran hacia el lumen (también un reflejo de la médula en el timo) del túbulo. La motilidad y migración celular asociada a la maduración intra-testicular está mediada por señales extracelulares provenientes de factores solubles secretados por las células de Sertoli, que funcionan como células nodrizas responsables de mantener la maduración y diferenciación de progenitores y precursores de células germinales. En el espacio intersticial de los túbulos se encuentran las células de Leyding, que son las encargadas de producir las hormonas necesarias para la maduración intra-testicular (Parker K.L., et al., 1999, Verhoeven G., 1999).

El espermatozoide es una célula haploide que posee proteínas compartimentalizadas en regiones como es la cabeza, zona intermedia y la cola. La cabeza del espermatozoide está constituida por el núcleo, que contiene la información genética, y el caliz que contiene enzimas acrosomales y proteínas del citoesqueleto como CLIP50 y calinina, que tienen la propiedad de unirse a actina-F para favorecer su estructura (Tarsounas M., et al., 2001,

Lecuyer C., et al., 2000). La cola del espermatozoide está constituida por estructuras de tubulina, y por una compleja red de proteínas del citoesqueleto formando el axonema, que esta constituido por fibras densas externas y por una capa fibrosa, que constituyen principalmente el motor del flagelo. Durante la espermatogénesis el ensamblaje del flagelo es un proceso complejo, que requiere la expresión secuencial de genes que codifiquen para proteínas del citoesqueleto, cuya expresión regulada induce al espermatozoide a migrar hacia el lumen del túbulo seminífero. Dentro de estas moléculas se encuentran los filamentos intermediarios como FS39, que tienen propiedades que favorecen las interacciones proteína-proteína, mediante sus dominios espiral-espiral y fungen como sitios de dimerización para formar estructuras sólidas en las capas fibrosas (Catalano R.D., et al., 2001). Estos mecanismos están regulados por procesos de fosforilación dependientes de proteínas cinasas, como la cinasa AKAP82 que tiene dominios zipper de leucina, y señales de anclaje a capas fibrosas (Johnson L.R. et al., 1997). Los dominios zipper de leucina, también se presentan en proteínas como Stap, Spag4 y Spag5, que se expresan selectivamente en la cola del espermatozoide y favorecen la rigidez de las fibras densas externas (Ohuchi J., et al. 2001, Shao X., et al 2001). Consistente con la fisiología del timo estas moléculas también estan involucradas en la función mecánica de la motilidad y migración celular asociada a la maduración y diferenciación intra-testicular, que ocurre como respuesta a señales extracelulares del microambiente. Además en ambos sistemas de maduración, los timocitos y las células germinales estan sujetas a adhesión, polarización y migración y tales mecanismos están regulados por la fosforilación de proteínas cinasas y proteínas del citoesqueleto.

1.3. Embriogénesis del sistema inmune y reproductor.

La migración celular es un proceso biológico altamente regulado que se presenta desde etapas embrionarias y perdura toda la vida. Durante la embriogénesis existe un alto grado de proliferación y migración celular asociado a la maduración, que permite a las células progenitoras transitar dentro de las diferentes estructuras anatómicas para establecerse y secretar factores que influyen en la formación del órgano. Durante estas etapas de la vida se lleva a cabo la formación del timo fetal, las gónadas y otros órganos en donde la migración de células hematopoyéticas y células germinales primordiales respectivamente, juega un papel importante en la formación y maduración de estos órganos.

1.3.a. Sistema inmune.

En el embrión murino, el timo se deriva del mesodermo y células crestales neurales del tercer y cuarto arco faríngeo formándose el timo rudimentario. Posteriormente entre el día 11-11.5 de gestación (días post-coitum: dpc), el timo es invadido por precursores linfoides que provienen de órganos hematopoyéticos fetales y a éste fenómeno se denomina la primera onda de colonización. En el día 12.5 se inicia la organogénesis del timo y aproximadamente en el día 15 empiezan a producirse los primeros timocitos en el timo fetal. Finalmente en el día 17 empiezan los timocitos a localizarse en la corteza y médula del timo (Ritter M.A. et al., 1992 y Manley N. R. et al., 2000). Los órganos hematopoyéticos fetales mas importantes son el saco vitelino y el hígado fetal, que producen las células responsables de colonizar los órganos linfoides. También durante la vida fetal, la médula ósea se desarrolla y se convierte en la principal productora de células de origen hematopoyético en etapas post-natales y adultas.

1.3.b. Organos reproductores.

Al mismo tiempo que ocurre la organogénesis del timo en el ratón, también se lleva a cabo la formación de las gónadas fetales indiferenciadas, éstas se derivan de los conductos urogenitales del mesodermo intermediario. Durante los días 10 y 11 se lleva a cabo la primera onda de colonización en los conductos genitales, por células germinales primordiales que provienen del epitelio endodérmico del saco vitelino y migran hacia los cordones sexuales primarios. La determinación sexual se puede distinguir en el día 13.5, en donde las células germinales primordiales se convierten en espermatogonias y las células de Sertoli que se originan de los cordones sexuales, y subsecuentemente forman parte del lumen en el túbulo seminífero. En la etapa post-natal y adulto, las células primordiales germinales maduran en los túbulos seminíferos iniciándose la producción de células germinales competentes para la fecundación del óvulo (McLaren A. 2000 y Parker K.L., et al. 1999).

1.4. Proteínas tirosina cinasas de la familia Src.

La familia de las proteínas tirosina cinasas Src, está constituida por las enzimas Fyn, Hck, Fgr, Lck, Lyn, Syc, Src, y Yes que se localizan asociadas a lípidos en la membrana celular. Algunas de estas cinasas se detectan desde la embriogénesis y se conservan en etapas adultas en células del sistema inmune y reproductor. La característica estructural conservada entre estos miembros son los dominios homólogos Src 2 (SH2) y 3 (SH3), estos dominios contienen residuos de tirosina que regulan la actividad biológica de la proteína. La fosforilación de la tirosina (527) en el dominio SH3, inactiva la función catalítica de la enzima, pero la defosforilación de este aminoácido (Y-527) y la fosforilación de la tirosina

(416) en el dominio SH2, induce un cambio conformacional en la proteína que favorece la actividad catalítica de la enzima para fosforilar los sustratos protéicos (Hubbard S.R. et al., 2000).

1.4.a. La Tirosina cinasa pp60 c-src.

En la familia cinasa src, uno de los miembros mas involucrados en los mecanismos de motilidad celular es la tirosina cinasa pp60 c-src. Esta cinasa se expresa desde la gastrulación y se conserva en etapas fetales y adultas. La función enzimática de la cinasa c-src esta regulada por fosforilación de tirosinas, inducida por la formación de complejos protéicos en la superficie celular (Zhu, D. et al.1998; Avizienyte E. et al., 2002; Sanjay A., et al., 2001; Brandt D., et al., 2002; Bernard O., et al., 2001; Mariner D.J. et al., 2001; Owens D.W. et al., 2000). La capacidad de esta cinasa para inducir el rearrreglo en la arquitectura celular, está regulada por su translocación hacia el citoesqueleto. En el citoesqueleto la pp60 c-src fosforila la proteína cortactina e induce la polimerización de filamentos de actina y facilita la formación de complejos proteicos conocidos como contactos focales de adhesión celular, constituídos por proteínas como paxilina, proteína 130 Cas, talina y proteínas relacionadas a actina (ARP 2/3). La adhesión y la polimerización de actina favorecen la formación de filopodia y lamelopodia estructuras claves en etapas tempranas de la migración celular (Weernink P.A. et al., 1995; Weed S.A., et al. 1998; McNieven M.A. et al., 2000; Kralisz U. et al., 2000; Weed S.A. et al, 2000).

1.5. Un mecanismo molecular común.

La influencia, intercomunicación y dependencia recíproca entre las gónadas y el timo no es ni novedoso ni sorprendente (Glucksman A. et al 1968, Pearce P., et al. 1981, Grossman C., 1984, Greenstein B., et al. 1986 y Wise T., et al 1991). Tanto la influencia de los esteroides derivados de las gónadas sobre la maduración intra-tímica, como el efecto de péptidos bioactivos del timo sobre la función gonadal, están ampliamente documentados (Yee J. B., et al 1985, Gorospe W.C., et al 1988, Uzumcu M., et al. 1994, Pedernera E., et al. 1986, Aguilera G., et al 1989, Reyes-Esparza J.A. et al. 1989, Martin D., et al. 1992 y Watson M.E., et al. 1994). En este contexto, los datos hasta ahora acumulados proponen que la maduración y diferenciación de los timocitos y de las células germinales, no solamente tienen paralelos funcionales y complementarios, sino que además sugieren que las señales extra e intra-celulares que determinan la generación y selección de células funcionales en ambos sistemas, es controlado por mecanismos moleculares comunes.

En completo acuerdo con ésta hipótesis, nuestro grupo identificó una nueva molécula, a la cual hemos designado el nombre de timotestin. Nuestra hipótesis de trabajo postula que timotestin representa el vínculo molecular común en los mecanismos responsables de motilidad, polarización, y migración celular asociados a la maduración, diferenciación y selección intra-tímica y testicular. El objetivo principal de la presente propuesta de tesis doctoral es determinar *in vitro* la relevancia fisiológica de timotestin.

2. ANTECEDENTES

Nuestro grupo estudia los mecanismos que regulan la migración celular asociada a la maduración y diferenciación de los linfocitos. Con este fin, diseñamos una estrategia experimental para detectar la expresión diferencial (differential display) de moléculas durante estadios distintos de la diferenciación de linfocitos. En forma resumida el método consiste en aislar por citometría fluorescente (FACS) multi-paramétrica (determinada por marcadores de fenotipo) de subpoblaciones celulares, de las cuales se extrae el ARNm que subsecuentemente se somete al análisis de expresión diferencial por RT-PCR, utilizando oligonucleótidos degenerados (primers) diseñados a partir de secuencias de genes, pertenecientes a familias de receptores/ligandos y factores de transcripción (gene family motif differential display). Esta estrategia experimental condujo al descubrimiento nuevos genes humanos (Guzman-Rojas L. et.al 2000, Siddiqi A. et.al 2001), cuya caracterización funcional se lleva a cabo en el momento actual.

La identificación de timotestín ocurrió como consecuencia natural de la aplicación de experimentos similares, llevados a cabo durante el tamizaje de bancos de ADNc murinos. Timotestín se expresa selectivamente en timo, bazo, ganglios linfáticos y testículos (de donde se origina su nombre). El ADNc de timotestín presenta un marco de lectura (ORF) de 2724 pares de bases, que codifican para una proteína de 908 aminoácidos, con un peso molecular de 102 KDa. Análisis de su estructura mediante una búsqueda BLAST-P del banco de datos (National Center for Biotechnology Information [NCBI]), indican que timotestín posee en su región carboxil-terminal, identidad significativa con tropomiosina, filamentos intermediarios, miosina y con la familia Ezrin-Radixin-Moesin (ERM). A nivel de estructuras secundarias,

timotestin contiene dominios hélices alfa espiral-espiral, los cuales son comunes a moléculas involucradas en la motilidad y migración celular. Análisis adicionales indican que timotestin posee dos sitios transmembranales en la región amino terminal, lo que sugiere que es una proteína que se expresa en la superficie celular. Además se identificó un dominio zipper de leucina en la región carboxil-terminal, que conjuntamente con estructuras hélices-alfa espiral-espiral, indica que timotestin interacciona con otras proteínas.

3.HIPOTESIS DE TRABAJO

En conjunto estos datos sugieren que timotestin, es una proteína asociada a la membrana celular, que potencialmente puede jugar el papel de receptor, ligando o transductor intermediario de señales intracelulares (segundos mensajeros) mediante la interacción con otras proteínas y cuya función puede ser clave para la motilidad, polarización y migración celular asociada a la maduración y diferenciación celular.

4. IMPORTANCIA, ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

El descubrimiento de timotestín y su restringida distribución tisular, representa una confirmación experimental de los paralelos fisiológicos, que existen entre los programas de maduración del timo y el tejido testicular. La importancia y la relevancia biológica se derivará de los estudios enfocados en determinar su función, primeramente *in vitro* y subsecuentemente *in vivo*. Los estudios propuestos permitirán determinar, si los mecanismos moleculares que operan en maduración de células inmunocompetentes son comunes, a aquellos responsables de la generación de células germinales funcionales. El entendimiento de estos mecanismos representa un paso importante para evaluar los programas biológicos, que regulan la migración y maduración de células asociados a la función inmune por un lado, y la reproductora por el otro.

El descubrimiento de timotestín, *per se*, representa un fenómeno original, no solamente por que se trata de la identificación de una nueva molécula, sino porque su estudio y la determinación de su función ofrece una oportunidad biológica clave, que nos permitirá entender y establecer un vínculo molecular sobre la influencia, la dependencia y la intercomunicación que existe entre el timo y las gónadas. En apoyo a nuestra hipótesis de trabajo, los datos experimentales hasta ahora generados están en completo acuerdo con la literatura y sugieren que lejos de ser un paradigma biológico, timotestín representa un mecanismo común programado por la naturaleza para garantizar la efectividad de dos funciones críticas: inmunidad y reproducción.

Por tal motivo consideramos que existe el raciocinio y la justificación necesarios para caracterizar y determinar la función de timotestin, como se propone en el presente anteproyecto. Esta investigación tiene como objetivo ulterior, aportar nuevos conceptos dentro del contexto de la maduración, diferenciación y selección celular, los cuales pueden ser útiles para sentar la bases y estimular el estudio de moléculas, que se expresan en tejidos histológicamente distintos, pero cuya fisiología converge en mecanismos comunes.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL :

Determinar el mecanismo molecular y funcional de timotestín en el sistema inmune y reproductor

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

5.2.1. Establecer la relevancia de la expresión de timotestín dentro del sistema inmune y el reproductor.

5.2.1.1. Analizaremos el significado de la expresión de timotestín en el sistema inmune y reproductor, durante los estadios embrionario, fetal, post-natal y adulto.

5.2.1.2. Determinaremos cuales son las células responsables de la expresión de timotestín tanto en el tejido linfoide como el testicular, mediante el análisis de los niveles de ARN mensajero (mRNA) en subpoblaciones de células y/o preparaciones histológicas.

5.2.1.3. Compararemos la expresión de timotestín en el tejido reproductor femenino y masculino.

5.2.1.4. Determinaremos: (a) la influencia del antígeno en la expresión timotestín por linfocitos maduros dentro de los órganos linfoides secundarios; y (b) la influencia del eje hipotálamo-hipofisiario-testicular en la expresión de timotestín por las células germinales.

5.2.2. Estudiar las propiedades moleculares de la proteína timotestín y evaluar las secuencias críticas que pueden determinar su estructura, expresión sub-celular y función.

5.2.2.1 Analizaremos la estructura proteica de timotestín contra los modelos existentes en los bancos de datos, con el fin de identificar motivos claves de la secuencia de timotestín que potencialmente la asocien a grupos o familias de proteínas cuya función es conocida.

5.2.2.2 Fusionaremos a timotestín con marcadores moleculares como Flag y/o la proteína verde fluorescente (GFP), e investigaremos su expresión funcional y localización sub-celular en células transfectadas (transiente o estable), mediante inmunohistoquímica, FACS, microscopía fluorescente y western blots.

5.2.3. Establecer *in vitro* la relevancia fisiológica de la expresión de timotestin.

5.2.3.1. Determinaremos la función de timotestin utilizando células transfectadas y mediante tamizajes de fosforilación, los resultados serán confirmados por análisis convencionales: western blots, inmunoprecipitación de complejos-cinasas, microscopía de fluorescencia y fraccionamiento subcelular.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados para subclonar el marco de lectura de timotestín fueron el pEGFP-N3 (Clontech, Palo Alto CA., USA), β -actin-CMV/Tag4a, pBK-CMV (Stratagene, La Jolla CA., USA), pCR-TOPOII, pcDNA3.1 Myc-HistA (Invitrogen, Carlsbad CA. USA), pCITE 2A (Novagen, Madison, WI., USA), y pME18S-Neo (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA). Cada uno de estos plásmidos fué transformado en bacterias competentes (TOP10, DH5 α) mediante choque térmico a 42°C. Posteriormente se realizaron preparaciones de plásmido a gran escala mediante el uso de columnas de afinidad comerciales (QIAGEN, Valencia CA., USA), y gradientes de cloruro de cesio (Sambrook, et.al. 1989).

6.2 Reactivos moleculares

Para llevar a cabo las técnicas de biología molecular y obtener los plásmidos recombinantes se utilizaron diversos reactivos moleculares. Las enzimas de restricción utilizadas fueron AseI, BamHI, ClaI, DraIII, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, MluI, NotI, Sac I, Sal I, SnaBI, XbaI, y XhoI (Roche Molecular Biochemicals, Indiana IN., USA). La enzima Gelasa se utilizó para la purificación de fragmentos de ADN (Epicentre Technologies, Madison WI., USA). La ligasa ADN T4, Transcriptasa reversa (Superscript II RnasaH-), Oligo dT₁₂₋₁₈, 0.1 M DTT, inhibidor de RNasa se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA., USA. Para la subclonación de productos de PCR, se utilizó el sistema PCR-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA). El sistema comercial para

radiomarcas fragmentos de ADN fue Multiprime (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Northern blot comercial (MTN- Mouse embryo, número de catálogo 7763-1) de la casa comercial Clontech. Estuche de revelado de quimioluminiscencia (Supersignal) de la compañía PIERCE, Rockford Illinois, USA.

6.3 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para las transfecciones fueron las siguientes: K562 (Línea celular humana de origen eritroide CD43+, CD7+) se cultivó en medio Dulbecco's CRPMI con 10% de suero bovino fetal (GIBCO BRL-Invitrogen Inc.). La línea celular Jurkat (linfoma de células T Humana, CD3+) se mantuvo en RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal a una densidad de 5×10^5 células por ml en su fase exponencial. Todas las líneas celulares se les cambió el medio de cultivo cada 2-3 días y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂.

6.3.1. Transfecciones

Las células fueron transfectadas mediante electroporación (Electroporador, BIO-RAD, Hercules CA., USA) y liposomas (DOTAP, Roche Molecular Biochemicals). Para la electroporación se utilizaron 5×10^6 células en un volumen de 0.8 ml de PBS pH 7.4 y se adicionaron 20 µg de plásmido linealizado, la mezcla se colocó en una cuveta de electroporación y se incubó por 10 minutos en hielo. El shock eléctrico fue de 0.250V, 0.950 µF (K562) y 0.350 V, 0.950µF (Jurkat). Las células se incubaron en hielo y después se cultivaron en una placa de 6 pozos con 5 ml de medio de cultivo, 48 horas después de la

transfección se inició la selección con G418. En el sistema de transfección liposomal (DOTAP) se mezclan los liposomas con 5 µg plásmido circular y se incuban por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla de liposomas-ADN se agrega a 5×10^6 células y se incuban a 37°C toda la noche. Al día siguiente las células son seleccionadas con neomicina (G418, GIBCO, BRL-Invitrogen Inc.) a una concentración de 1 hasta 4 mg/ml dependiendo de la línea celular, por un período de 12-24 días hasta obtener células resistentes a la droga.

6.4 Anticuerpos

Para los análisis de western blot se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Flag M2 (Stratagene, La Jolla CA., USA), anti-Flag conjugado a la peroxidasa de hidrogeno (SIGMA, St. Louis MO, USA), anti-IgG de conejo y ratón conjugado a la peroxidasa (Pharmlngen, San Diego, CA. USA). Para determinar la localización subcelular se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Flag M2cy3 (SIGMA, St. Louis MO.,USA). Anti-CD43 humano (BD Pharmlngen, San Diego CA., USA), anticuerpo anti-Src clona GD11 (Upstate, Lake Placid NY. USA), anticuerpo anti-IgG murino conjugado con Alexa Flour (488 y 588), anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Flour (488 y 588) (Molecular Probes, Eugene OR., USA). Para realizar la purificación de células mediante citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de rata: Anti-CD3 murino conjugado con ficoeritrina-R (R-PE), anti-CD8a murino conjugado con Cy-Chrome, anti-CD4 murino conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC: BD Pharmlngen San Diego, CA., USA).

6.5. Animales.

Se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 adultos de ambos sexos, estos se mantuvieron en el bioterio del Smith Research Building, M.D. Anderson Cancer Center, de acuerdo a regulaciones de cuidado del departamento de salud y servicios humanos de los Estado Unidos Americanos.

6.5.1. Ratones hipofectomizados

Ratones BALB/c fueron hipofisectomizados mediante cirugía, y se mantuvieron bajo observación por una semana para su recuperación. Se determinó el nivel de cortiesteroides en sangre mediante radioinmunoensayo, que fué <20 ng/ml en suero. Las hormonas utilizadas para inducir la expresión de timotestin fueron: la hormona luteinizante de rata (LH), hormona foliculo-estimulante ovina (FSH), y testosterona de rata (T). Estas se administraron vía subcutánea en la región dorsal del cuello del ratón. Se utilizaron 4 ratones por ensayo y el experimento fue repetido 3 veces. Los animales fueron sacrificados por intoxicación de CO₂, y los testículos fueron procesados para aislar el ARN total mediante el reactivo trizol.

6.5.2. Protocolo de Inmunización y purificación celular.

Ratones C57BL/6 libres de patógenos, fueron inmunizados con *Candida albicans* (10⁷ células/ tratadas con formalina) via intraperitoneal, a los 9 días fueron nuevamente inmunizados con antígeno de *Candida albicans*. Después de dos inmunizaciones los ratones inmunizados y los ratones control (C57BL/6) fueron sacrificados.

Para la purificación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) se aislaron timos y bazos de ratones inmunizados y no inmunizados C57BL/6. Los órganos fueron macerados hasta obtener una suspensión celular libre de debris. Las células mononucleares fueron aisladas mediante un gradiente de ficoll y se ajustó la concentración celular a 5×10^7 /ml, a esta suspensión se le agregó suero de rata a una concentración final del 5% y se incubó por 15 min. En seguida se adicionaron 10 μ l de un pool de anticuerpos contra antígenos de células hematopoiéticas (CD11b, CD45R, Gr-1, TER 119) y fueron incubados a 4°C por 15 min. Las células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 y agregando 100 μ l de anticuerpo anti-biotina tetramérico que se incubó por 15 min a 4°C. Finalmente se adicionó 60 μ l de coloide magnético a la suspensión celular y se pasaron por una columna colocada dentro de un campo magnético. La columna se lavo 3 veces con PBS y las células recuperadas se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Las células eluídas mostraron un 98% de pureza al ser analizadas mediante citometría de flujo. El estuche comercial para la purificación de los linfocitos T, se obtuvo de la compañía STEMCELL Technologies (Vancouver, British Columbia, Canada).

6.6. Aislamiento de ARN total de diferentes tejidos murinos.

Para el aislamiento de túbulos seminíferos, los testículos fueron removidos y lavados con PBS, posteriormente se removieron las capas externas sin dañar la red de túbulos, estos se colocaron en un tubo de 50 ml y se añadió una solución de colagenasa en medio Dulbecco's modificado Eagle's Ham' F-12 (DMEM-F-12) e incubando a 37°C por 25 min en un tamiz de nylon (60 μ M, Nytex, Spectrum, Inc.). Los túbulos retenidos se lavaron 3

veces con 10 ml de DMEM-F-12 (37°C) y se procedió a homogenizar los túbulos seminíferos para el aislamiento del ARN total.

Para la obtención de ovario, útero se sacrificaron ratones hembras adultas y el aislamiento de placenta se obtuvo de ratones hembras preñadas entre 9.5 – 15.5 dpc. Los órganos y embriones fueron procesados inmediatamente utilizando material libre de RNasas. Los embriones fueron extraídos a los 13.5 – 18.5 dpc para el aislamiento de saco vitelino, timo fetal, gónadas, hígado fetal; y posteriormente se procedió a la purificación del ARN total. También se obtuvieron órganos de ratones adultos como timo, bazo, ganglios linfáticos, hígado, riñón, estómago, intestino, pulmón, médula ósea, testículo, ovario, cerebro y músculo, para el aislamiento de RNA total.

Para el aislamiento del ARN total, se utilizaron los siguientes procedimientos:

Tejidos. Los tejidos fueron homogenizados (Polytron) e incubados con el trizol por 10 min a temperatura ambiente (Por cada 50 – 100 mg de tejido se adicionó 1 ml de trizol).

Suspensión celular. Por cada 5 - 10 millones de células se agregó 1 ml de trizol, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Por cada ml de trizol utilizado, se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se centrifugó a 12,000 g por 15 min., la fase acuosa fue recuperada y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol por 10 min en hielo y se centrifugó a 12,000g por 15 min. El ARN precipitado se lavó con etanol al 75% y se resuspendió con agua libre de RNasas.

6.7. Purificación celular mediante citometría de flujo.

Para la purificación de timocitos mediante citometría de flujo (FACS), se obtuvieron timos de ratones C57BL/6, los órganos fueron macerados y la suspensión celular se ajustó a una concentración de 20×10^6 células, y se incubaron con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 por un período de 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se resuspendieron con PBS pH 7.4 a un volumen final de 2 ml. Las subpoblaciones de linfocitos T ($CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) fueron recuperadas en 5 ml de medio RPMI. El número de células aisladas de cada subpoblación de células T ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^-CD8^-$ y $CD4^+CD8^-$), fue entre 10,000 y 30,000.

6.8. Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas

El tamizaje de bibliotecas de ADNc, caracterización de clonas, subclonación de fragmentos de timotestin, reacciones de enzimas de restricción, ligación, transformación, purificación de fragmentos de ADNc y análisis de restricción se realizaron de acuerdo al manual de Sambrook, et.al. 1989. La secuenciación se realizó en el laboratorio de Secuenciación y Análisis de ADN del MD.Anderson Cancer Center, Houston Texas, USA.

6.9. Northern blot y Radiomarcaje de sondas

Para los northern blots se utilizaron entre 5 y 10 μ g de ARN precipitados con acetato de sodio 2M, glicógeno (10 mg/ml) y etanol absoluto a -20°C por 30 min, estos fueron recuperados por centrifugación a 14,000 rpm/ 15 min. Los ARN precipitados fueron lavados con etanol al 75% y se dejaron secar. El ARN total se resuspendió en 5 μ l de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC), y se mezcló con 13.1 μ l de solución de carga (Formamida

50%, Formaldehído 0.66M y MOPS 1X), las muestras se calentaron a 55°C por 5 min y enseguida se colocaron en hielo. Las muestras fueron aplicadas en geles de agarosa al 1% con formaldehído y transferidas mediante capilaridad a una membrana de nylon (Sambrook et.al. 1989). Las membranas se lavan con una solución 2X SSC por 15 min y se pre-hibridan con una solución de hibridación comercial (ExpressHyb, Clontech, Palo Alto CA.) a 65° C por 4 horas.

Radiomarcaje. Para la reacción de radiomarcaje se utilizaron 30 ng de sonda de timotestin en un volumen final de 28 µl en agua, se desnaturalizó mediante ebullición (100°C/5min) y enfriamiento brusco en hielo por 3 min. Enseguida se añadieron los siguientes reactivos:

Amortiguador de marcaje 5X	10 µl
Iniciadores	5 µl
Enzima Klenow	2 µl (1 U/µl)
dCTP (α - ³² P)	5 µl (50 µCi)

La reacción se incubó a 37°C por 40 min, y se prepararon columnas de filtración en gel (BIO-RAD, Hercules CA., USA) para purificar la sonda. La sonda marcada con ³²P se desnaturalizó y se colocó dentro del saco de hibridación de la membrana, incubándose toda la noche a 65°C. Las membranas se lavaron con las siguientes soluciones: 2 lavados fríos (2X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄), 2 lavados a 65°C (0.2X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄) y 2 lavados a 68°C (0.1X SSC, 0.1% SDS, 25mM Na₂HPO₄). Las membranas se expusieron a films de rayos-X durante toda la noche a -70°C.

6.10. Reacción de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Para este ensayo se aisló y se normalizó la cantidad de ARN total, en base a 10,000 células de cada subpoblación de timocitos aisladas mediante FACS. También ésta técnica se utilizó para generar ADNc de timo, bazo, ganglios linfáticos y testículo. En la reacción de transcriptasa reversa se utilizó 1 μ l de oligo dT₁₂₋₁₈ y agua libre de RNasas en un volumen 11.5 μ l, las muestras se incubaron a 70°C por 10 min, y enseguida se sometió a enfriamiento en hielo. Después se agregaron los siguientes reactivos:

Inhibidor de RNasas (10U/ μ l)	0.5 μ l
Buffer 5X	4.0 μ l
Ditiotreitol 0.1 M	2.0 μ l
dNTP's 10 μ M	1.0 μ l
Transcriptasa Reversa (200U/ μ l)	1.0 μ l

La reacción se incubó 42°C por 50 min. La reacción fue neutralizada mediante calentamiento a 70°C por 10 min. Como control de la concentración de los niveles de ADNc, se analizó la amplificación de la gliceraldehido-3- fosfodeshidrogenasa (G3PDH), un gene de expresión constitutiva. Las condiciones del PCR fueron de acuerdo con el método de la casa comercial Clontech (No. Cat. 5408-3, Palo Alto CA. USA). La técnica de PCR también fue empleada para amplificar el marco de lectura de timotestin y para detectar la expresión en diferentes subpoblaciones celulares.

a) Para la detectar la expresión de timotestin en las diferentes subpoblaciones celulares se utilizaron los oligonucleótidos:

U-182 LT 5'- TTCTGGACAAAAGCTCACACGA-3' (22 nt), Tm: 55°C

L-1616 LT 5'-GGCTGCTGGATCAAGAAAACACTACT-3' (24nt), Tm: 55°C

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización 94°C/ 30 sec, apareamiento 60°C/ 1 min y extensión 68°C/ 3 min, por 35 ciclos. La enzima DNA polimerasa Taq utilizad  fue de alta fidelidad asi como su buffer (Roche Molecular Biochemicals, Indiana IN., USA).

b) Para amplificar y clonar el marco de lectura (ORF) de timotestin, se utilizó ADNc de timo, bazo, nódulos linfáticos y testículo. Los oligonucleótidos 5' y 3' de timotestin fueron sintetizados por la compa a SIGMA-GENOSYS (Woodlands Tx. USA):

U-LT 5'-GGATCCGAATTCGTCGGCATGGATTCCACCGCCTG-3'

L-LT 5'-CACAGTCGACTATACTAAGGTTTCACAGTTTCTGGGC-3'

El oligonucleótido iniciador U-LT (35 nt) contiene un sitio de restricción para la enzima Eco RI (Subrayado) y el codón de iniciación (ATG) del marco de lectura de timotestin. El iniciador L-LT (36 nt) contiene un sitio de restricción para la enzima Sal I y no contiene codón de terminación, para poder fusinarlo con péptidos (Flag-Hist) o proteínas recombinantes (GFP). Las condiciones de PCR son semejantes a las anteriormente descritas.

6.11. Southern Blot

Para el Southern blot se utilizaron geles de agarosa al 0.8 y 1.0 % para la resolución de los fragmentos de ADNc, al finalizar el corrimiento de la muestra, el gel se incubó con HCl 0.25 M por 8 minutos, después el gel se lavó con agua y se añadió la solución desnaturalizante (NaOH 0.5M; NaCl 1M) y finalmente la solución neutralizante (Tris-HCl 0.5M; NaCl 1.5M). Después se montó la tranferencia de acuerdo a Sambrook et.al. 1989. Los

ácidos nucleicos transferidos en la membrana se fijaron mediante luz ultravioleta (UV Crosslinker). Las condiciones de hibridación y lavado se realizaron como se mencionó anteriormente.

6.12. Hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ*, primero se realizaron cortes histológicos de timo y testículo. Los tejidos se incubaron toda la noche a 4°C en una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente los tejidos se lavaron con PBS pH 7.4 y deshidratados con un gradiente de concentración de alcoholes en PBS (30, 50, 70, 80, 95 y 100%), con cada solución se lavaron 2 veces por 30 min y los tejidos se almacenaron a 4°C.

Antes de realizar los cortes histológicos, los tejidos se lavaron 2 veces con las siguientes soluciones:

Etol al 100% por 30 min.

Etol:Histoclear 50:50 por 15 min.

Histoclear 100% por 10 min.

Los siguientes tratamientos se llevaron a 60°C

Histoclear/Parafina 50:50 por 20 min

Parafina 100% por 15min

Una vez solidificada la parafina, el molde se removió y se montó en un microtomo para realizar los cortes histológicos (6 microns), cada sección se fue colocando en una bañõ de agua a 45°C y finalmente se montaron en portaobjetos cargados positivamente (Fisher, Cat. No. 12-550-15) dejandose secar toda la noche a 37°C. Todos los siguientes tratamientos se realizaron con reactivos libres de RNAsas.

- Histoclear por 10 min
- Etanol al 100% por 2 min
- Etanol al 95 y 85% (2 min), 70% (5 min), 50 y 30% (2 min)
- Cloruro de sodio 0.9% (5 min)
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Paraformaldehído al 4% (20 min)
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Incubación con proteinasa K (20µg/ml) por 7 min
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Paraformaldehído al 4% (20 min)
- Trietanolamina-HCl pH 8.0 por 10 min
- PBS pH 7.4 (5 min)
- Cloruro de sodio al 0.9% (5 min)
- Deshidratación con etanol 30, 50, 70, 85 y 95% (5 min)
- Etanol 100% (2 min)

Las laminillas histológicas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Preparación de la sonda. Para generar las sondas sentido y antisentido se subclonó un fragmento de 400 pb del ADNc de timotestin, en los sitios de restricción EcoRV y XhoI del vector pBluescript KS II, este vector fue linearizado con la enzima de restricción XhoI para producir la sonda sentido, y EcoRV para la sonda antisentido, después de la digestión enzimática, cada plásmido linearizado se purificó mediante extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. Para producir la ribosonda se utilizaron los siguientes reactivos:

1µg de plásmido linearizado (1 µl)

5.5 µl de Agua DEPC

6 µl de buffer de transcripción 5X (Promega)

1 µl de rATP, rCTP, rGTP (10 mM)

1.5 µl de Ditioneitol 0.1 M

1 µl de Inhibidor de RNasas (10 U/µl)

10 µl de ³⁵S tio-rUTP (Perkin-Elmer, NEN)

1 µl de ARN polimerasa (T3 o T7) (Promega Co. Madison WI, USA.)

La reacción se incubó a 37°C por 3 horas. La reacción se neutralizó adicionando 2µl de DNasa I e incubando por 15 min a 37°C. Posteriormente se procedió a precipitar la sonda con 200µl de ARNt (0.5 mg/ml), 250 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol al 100% por 5 min en hielo, la cual se recuperó por centrifugación a 14000 rpm/7 min. La sonda se resuspendió en agua DEPC y se volvió a precipitar como se mencionó previamente. Para la hibridación se utilizaron 4 millones de cuentas por minuto (cpm), en un volumen de 100µl por cada laminilla y se incubaron a 65°C en una cámara húmeda durante 18 horas. Para eliminar el exceso de sonda los cortes histológicos fueron lavados con las siguientes soluciones:

- Solución removedora de portaobjetos (SSC 5X, 2-mercaptoetanol 15 mM) a 60°C por 1 hora.
- Solución I (Formamida 50%, SSC 2X, 2ME 40 mM) a 65°C por 30 min.
- Solución NTE 1X (Cloruro de sodio 0.5M, Tris-HCl 0.25M pH8.0 y EDTA 0.1M) a 37°C por 1º min (3 veces)
- Solución I a 65°C por 1 hora.

- SSC 2X y SSC 1X a temperatura ambiente por 15 min cada uno.

Las laminillas se deshidrataron con diferentes soluciones de etanol al 30, 60, 80, 95% que contenían acetato de amonio al 0.3 M, y un último lavado con etanol al 100%. La intensidad de la señal radioactiva en los tejidos hibridados se detectó mediante la exposición con un film de rayos-X. Con base en los resultados anteriores, los cortes histológicos fueron sujetos a una emulsión fotográfica Kodak NTB-2 a 45 °C, y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los cortes histológicos se colocaron en una caja a prueba de luz y se expusieron por 5 días. Las laminillas se revelaron en el cuarto oscuro utilizando la solución reveladora KODAK D-19 por 2 min y se lavaron con agua destilada. Después se realizó una tinción nuclear utilizando una solución Hoechst (2 µg/ml) por 2 min. Subsecuentemente las laminillas fueron cubiertas con una solución de balsamo canadiense y se dejaron secar por 7 días (Albrecht U., et.al. 1997). El análisis de la expresión *in situ* de timotestin se realizó mediante un microscopio Olympus BX60, equipado con una cámara digital SPOT (Diagnostics instruments, Sterling Heights, MI. USA).

6.13. Transcripción/traducción *in vitro* y SDS-PAGE

Para realizar la transcripción y traducción en un sistema de reticulocitos de conejo, se subclonó direccionalmente el marco de lectura (ADNc) que codifica para la proteína timotestin mediante condiciones previamente mencionadas. El vector pCITE 2A (Novagen Madison WI., USA) contiene el promotor para la polimerasa T7 y además provee una señal CAP durante la transcripción del ARNm de timotestin. Para la transcripción se utilizaron 0.5 µg del vector y se incubó con una mezcla de transcripción a 30°C por 15 min. Posteriormente

se añadieron 30 μ l de una mezcla de reticulocitos de conejo (Novagen Madison WI., USA), 4 μ l de 35 S-metionina (40 μ Ci) (Perkin-Elmer NEN,) por un período de 1 hora a 30°C. Para neutralizar la reacción se añade Rnasa A y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.

Para analizar la producción de la proteína timotestin *in vitro*, se utilizó la electroforésis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para este fin se prepararon SDS-PAGE al 7.5% T con pH 8.8, y con un gel de empaquetamiento al 4% T; 2.66 C, a pH 6.8 . Las cantidades empleadas para elaborar los geles fueron las siguientes: Gel separador al 7.5 % T, pH 8.8 (geles de 16 x 14 cm x 1.5 mm).

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Solución patrón de acrilamida 40 %T,	9.1 ml
Solución patrón de bis-acrilamida 2% C.	5.0 ml
Amortiguador Tris-HCl, 3.02 M, pH 8.8	6.25 ml
Agua bidestilada	29.14 ml
Dodecil sulfato de sodio al 20%	0.25 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.25 ml
TEMED	0.025 ml

Gel de Empaquetamiento al 4% T, pH 6.8

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Solución patrón de acrilamida 40% T	2.4 ml

Solución patrón de bis-acrilamida 2%C	1.3 ml
Amortiguador Tris-HCl, 1.25 M, pH 6.8	6.4 ml
Agua bidestilada	14.5 ml
Dodecil sulfato de sodio al 10%	0.125 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.125 ml
TEMED	0.025 ml

Para el corrimiento electroforético se utilizó un amortiguador trizma base 50 mM, glicina 384 mM, SDS 0.01% con un pH de 8.3. Para la preparación de la muestra se añadió amortiguador Laemli y 2-mercaptoetanol (BIO-RAD, Hercules CA.,USA) y se sometió a ebullición por 5 minutos. También se utilizaron marcadores de peso molecular con un rango de 14.3 hasta 250 Kda (Rango completo rainbow, Amersham Life Science Piscataway, NJ. USA). El gel radioactivo fue secado al vacío y a una temperatura de 65°C por 1 hora. El gel se expuso con un film de rayos-X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ. USA) por un periodo de 18 hrs a temperatura ambiente.

6.14. Western blot

Para analizar proteínas mediante western blot, se utilizaron geles SDS-PAGE al 7.5 %T. Las muestras se obtuvieron de lisados celulares mediante sonicación y añadiendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Aprotonina, Leupeptina, y Pepstatina; Roche Molecular Biochemicals Indianapolis IN., USA). El tratamiento térmico y los agentes reductores utilizados fueron semejantes al los previamente descritos. Una vez separadas las proteínas electroforéticamente por SDS-PAGE, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con una solución bloqueadora (leche descremada

al 5 % en solución salina de fosfatos [PBS]), durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el primer anticuerpo a una dilución de 1:2000 o 1:5000 en la solución bloqueadora y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se adicionó el segundo anticuerpo policlonal anti-gammaglobulina conjugados con peroxidasa (Dilución 1:5000), y se dejaron reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló mediante la solución substrato-cromógeno de quimioluminiscencia (Super signal west pico, PIERCE Co., Rockford IL., USA), inmediatamente se procedió a exponer la membrana con un film de rayos-X, por un periodo de 5 minutos hasta 1 hora.

6.15. Programas Analíticos.

Para el análisis del ADNc de timotestin, se utilizaron los siguientes programas de computación: DNASTar (Lasergene file, Madison WI.,USA) que contiene los programas editseq, seqman, primer select, align, protean, y mapdraw. Para determinar la estructura protéica de timotestin se utilizaron los programas Blast-P, DART, CD-search (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para determinar los dominios espiral-espiral se utilizó el programa MacStripe 2.0 (www.york.ac.uk). Para analizar la localización subcelular se empleo el programa PSORT (www.psort.nihb.ac.jp) mientras que BLOCKS (www.blocks.fhcrc.org), ProDom (www.prodes.toulouse.inra.fr), MOTIF (www.motif.genome.ad.jp) fueron utilizados para identificar familias de proteínas. Finalmente, los programas del centro de análisis de secuencias biológicas (CBS, www.cbs.dtu.dk), fueron utilizados para analizar péptido señal, sitios de fosforilación y dominios transmembranales.

7.16. Citocentrifugación celular y Microscopía de fluorescencia.

Para analizar la localización subcelular de proteínas se utilizaron las células K562, y Jurkat. Las células fueron incubadas con el fluorocromo específico para ADN (Hoechst 33342 (10 µg/ml) a 37°C por 30 min, para identificar el núcleo. Las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se colocaron diferentes concentraciones de células (50,000, 100,000 y 250,000), mediante un cito-embudo (Cytofunnel, Thermoshadon Inc.) ajustado a un portaobjetos y centrifugando a 1000 rpm/ 5 min. Posteriormente se adicionó:

- Formaldehído al 2% por 10 minutos o acetona (-20°C)
- 3 lavados con la solución Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4
- Solución bloqueadora universal (Novagen, Madison WI., USA) por 30 minutos
- Primer anticuerpo diluido 1:1000 (PBS, Suero fetal bovino al 1%) , toda la noche a 4°C.
- 3 lavados con la solución Tween 20 al 0.1% en PBS pH 7.4
- Segundo anticuerpo, diluido a 1:2500.
- 3 lavados con PBS pH 7.4
- Solución de montaje (Research Genetics, Huntsville, AL., USA) y se dejan secar toda la noche a temperatura ambiente.

Para analizar la reactividad del anticuerpo se utilizó el microscopio de fluorescencia Olympus LX70. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa Adobe-Photoshop versión 5.5.

6.17. Tamizaje de fosforilación (phosphospot).

Este ensayo consiste en determinar el estado de fosforilación de proteínas cinasas en extractos protéicos. El sistema Phosphospot (JERINI, No. Cat. JE-258-1, Berlin, Alemania),

consiste en una transferencia de fósforo radioactivo hacia un sustrato enzimático específico fijado en una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa Phosphospot contienen 20 sustratos específicos para 16 proteínas cinasas, solamente las enzimas en estado activo son capaces de transferir γ ^{32}P hacia el sustrato y su detección se realiza mediante autoradiografía de rayos X. A continuación se presenta el protocolo recomendado por la casa comercial.

Las membranas se incuban en etanol por 5 min y se lavan 3 veces con el buffer de fosforilación (MOPS 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, MgCl_2 30 mM, DTT 4 mM, β -glicerofosfato 12.5 mM, EGTA 2 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, ácido okadaico y [γ - ^{32}P] ATP 100 M), 10 minutos cada lavado. Para este ensayo se utilizó un buffer de lisis que se prepara adicionando al buffer de fosforilación, triton X-100 (1%) y leupeptin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por cada 2×10^6 células se utilizó 1 ml de buffer de lisis y se incubó por 10 min en hielo, posteriormente el extracto proteico se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, y el sobrenadante se incubó con las membranas previamente equilibradas con etanol. La reacción de fosforilación se llevó acabo por 30 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con las siguientes soluciones:

- 1) NaCl 1M
- 2) TBS 50 mM, pH 7.2 (Tween 20 1%, SDS 1%)
- 3) Agua
- 4) Etanol

Las membranas se dejan húmedas y se exponen a un film de rayos X, por 18 horas. La autoradiografía se analiza utilizando una plantilla que orienta la posición de cada sustrato fijado en la membrana de nitrocelulosa.

6.18. Ensayo de inmunocomplejos cinasas.

Este ensayo se basa en el mismo principio que en el phosphospot, la diferencia es que la proteína cinasa se inmunoprecipita y se hace reaccionar con el sustrato (enolasa) en un buffer de fosforilación y la reacción se analiza mediante SDS-PAGE. Para este estudio se utilizaron 1.5 mg de extracto proteico de las líneas celulares Jurkat-Flag y Jurkat-timotestín, las células se incubaron con buffer de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 1%) y se incubaron en hielo por 15 minutos. El extracto proteico se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorff en donde se agregaron 6 µg de anticuerpo anti-src, la inmunoprecipitación se llevo a cabo toda la noche a 4° C. Posteriormente se añadió 6 µg de anti-inmunoglobulina de conejo Ig G y se incubó por 1 hora a 4°C en agitación, enseguida se añadió proteína A (30 min) y se incubó bajo las mismas condiciones y se lavó 3 veces con buffer de lisis (10 min cada uno). Al final el precipitado se resuspendió con 10 µl de enolasa (la enolasa se inactiva con ácido acético 46 mM a 37°C por 10 minutos) y se agrega el fósforo-γ radioactivo en un buffer de Hepes-vanadato, después de 10 min se agregó un buffer de carga 3X y las muestras se sujetaron a ebullición por 5 minutos. El inmunocomplejo cinasa se analiza mediante 7.5 % SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida se incuba en una solución de agua:metanol:ácido acético 5:5:1 por 1 hora, posteriormente el gel se somete a ebullición por 1 hora en una solución de KOH 1M. Nuevamente el gel es colocado en la

solución fijadora por 45 min y se seca al vacío a 65°C. La señal radioactiva de la transferencia de fósforo gamma se detecta mediante autoradiografía de rayos X.

6.19 Aislamiento de la fracción del citoesqueleto y citosol.

Para aislar las diferentes fracciones celulares principalmente citosol y citoesqueleto, utilizamos las siguientes soluciones:

Solución de lisis 1: NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 0.5%, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 10 µg/ml.

Solución de extracción 2: NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 6.8; Triton X-100 1%, SDS 1%, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Leupeptin 10 µg/ml.

Para el fraccionamiento celular se utilizaron 20×10^6 células provenientes de la línea celular Jurkat-vector y Jurkat Timotestin, las células se lavaron con PBS, y la pastilla celular se resuspendió con 500 µl de solución de lisis 1. El lisado celular se incubó por 30 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se denominó fracción proteica citosólica y el precipitado contiene la fracción de citoesqueleto, a la cual se le adicionó 200 µl de solución de extracción 2. El extracto se mezcló mediante pipeteo, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó como anteriormente se mencionó para obtener la fracción proteica del citoesqueleto. La concentración de proteínas se determinó mediante el método BCA (Pierce, Rockford, IL, USA).

7. RESULTADOS

7.1. RELEVANCIA DE TIMOTESTIN DURANTE LOS ESTADIOS EMBRIONARIO, FETAL, POST-NATAL Y ADULTOS DEL SISTEMA INMUNE Y REPRODUCTOR.

7.1.1.a. Timotestin se expresa durante etapas embrionarias

La migración celular es un proceso altamente regulado que es importante durante las primeras etapas embrionarias. Por lo tanto, la expresión de moléculas involucradas en los mecanismos de motilidad celular deben de expresarse en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Congruente con esta predicción, análisis de northern blot, revelaron que timotestin se expresa en células embrionarias totipotenciales (Fig. 1A), las cuales se localizan dentro de la red celular que forman los blastocistos y sugiere que la expresión de timotestin es importante durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario. Para determinar la relevancia de timotestin en diferentes etapas embrionarias, realizamos una cinética de expresión de timotestin mediante northern blot. El análisis reveló que timotestin se expresa desde el día 7 hasta el 17 dpc (Fig 1B), aunque se observó un incremento de expresión de timotestin durante la etapa de organogénesis (11-15 dpc). También identificamos la expresión de dos ARN mensajeros de timotestin con un peso molecular de 3.6 y 4.4 Kb.

7.1.1.b. Timotestín se expresa en tejidos hematopoyéticos y linfoides durante etapas fetales y adultas.

La detección de timotestín en etapas tempranas del desarrollo embrionario y la abundante expresión durante la organogénesis, condujo a examinar la presencia del ARN mensajero de timotestín en tejidos hematopoyéticos fetales y determinar la distribución en tejidos adultos. Análisis mediante northern blot revelaron que timotestín se expresa en saco vitelino desde el día 6 de gestación hasta el día 15, como se puede apreciar en la figura 2 (carriles 2, 4, 6). El saco vitelino es un tejido hematopoyético embrionario que contiene los precursores celulares que migran hacia gónadas y tejidos hematopoyéticos (Ullman S.L. et al., 1997; Rich I.N., 1995; Ogawa M., et al., 2001). Con base en su abundante y estable expresión en diferentes estadios se confirmó que la expresión de timotestín es relevante en las diferentes etapas de gestación del ratón. En apoyo a su relevancia en el desarrollo intratímico detectamos que timotestín se expresa en timo fetal (Fig. 2). Consistente con la selectiva compartimentalización dentro del timo, la expresión de timotestín no fue detectada en otros órganos hematopoyéticos como el hígado fetal, el cual apoya fundamentalmente el desarrollo de linfocitos B, de precursores mieloides y eritroides (Wolber F. et al., 2002; Traver D., et al., 2001).

En etapas adultas la distribución tisular del ARNm de timotestín es también predominante en órganos linfoides primarios como médula ósea y timo, además en tejido testicular (Fig 2). Estos resultados en conjunto indican que la expresión de timotestín es importante durante el desarrollo y maduración de los timocitos y en células germinales tanto en etapas embrionarias como en adultas.

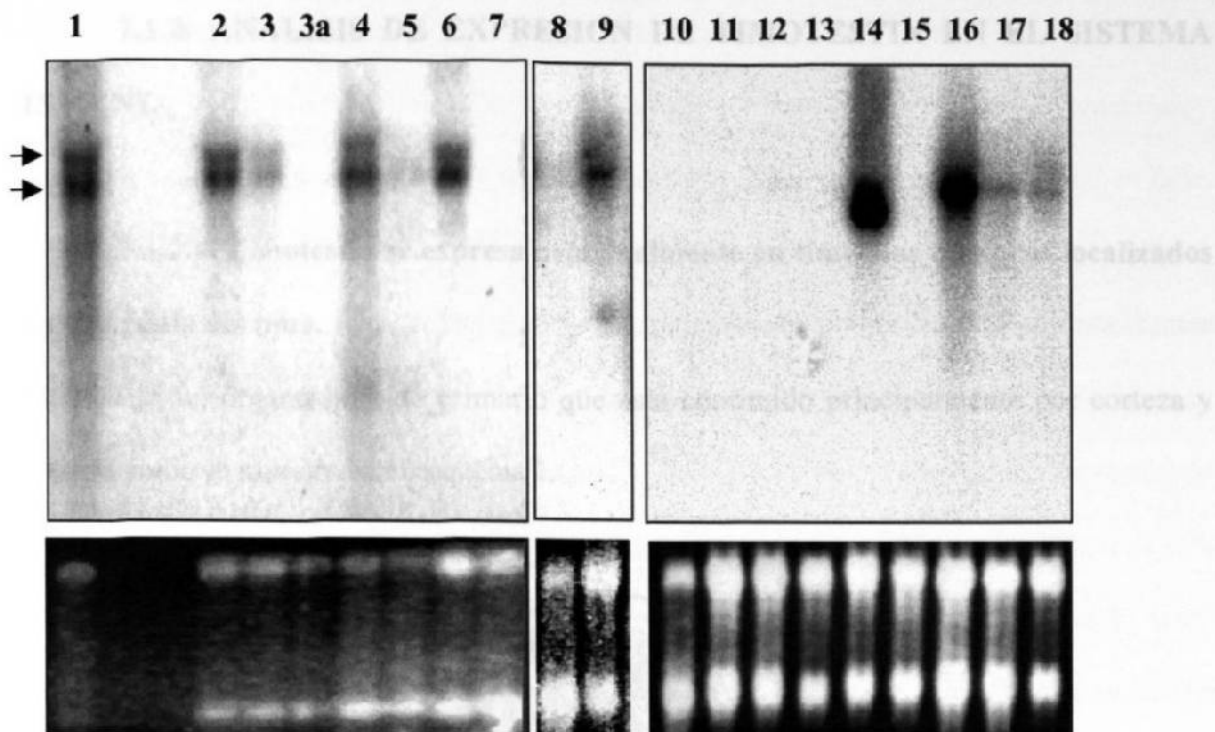


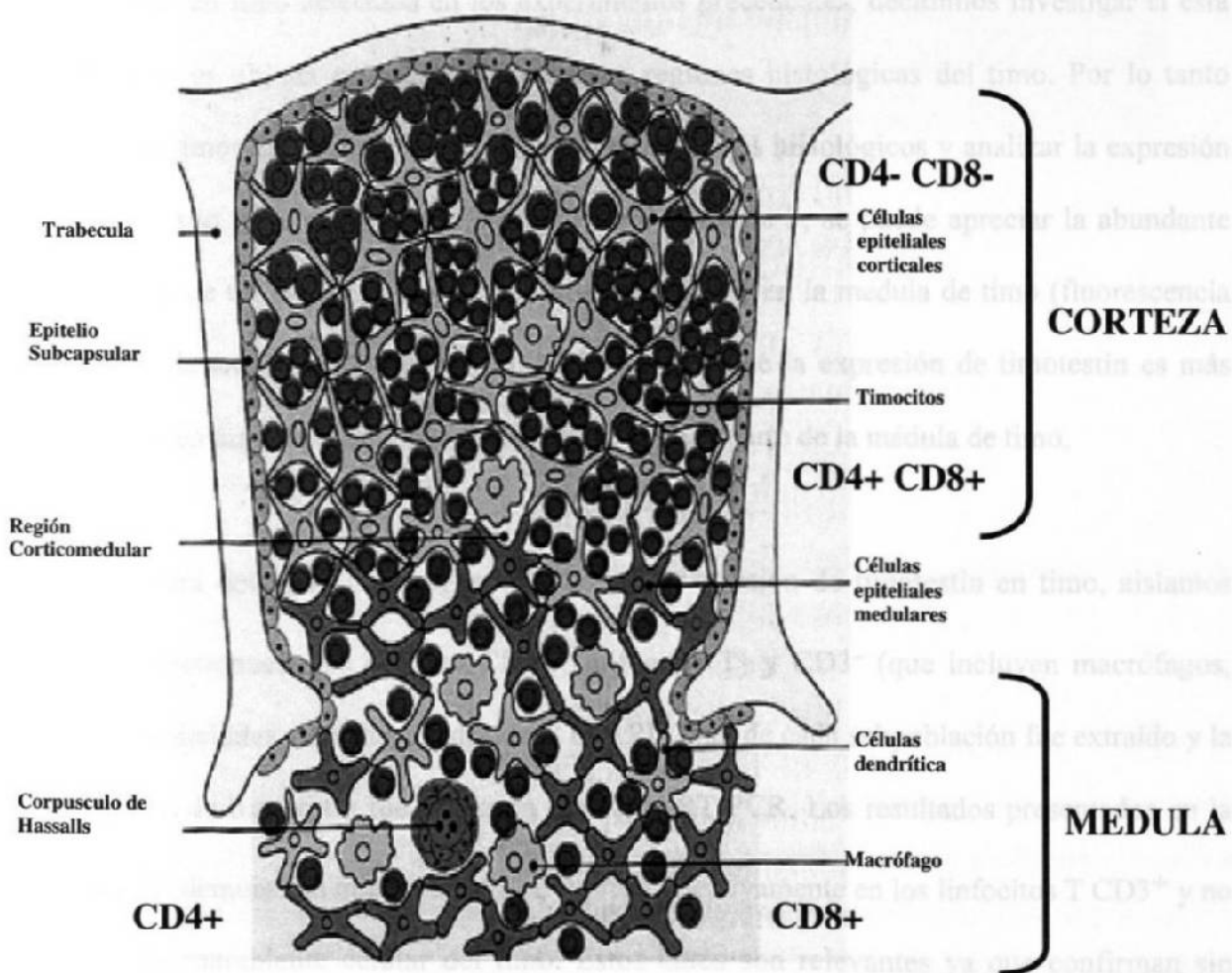
Figura 2. Distribución tisular de timotestín en tejidos embrionarios y adultos.

Northern blot. Tejidos embrionarios (5 μ g) carriles 1 – 8 y tejidos adultos murinos (10 μ g) carriles 9 – 16. 1. Timo fetal, 2. Saco vitelino (6 dpc), 3-3a. Saco vitelino (8 dpc), 4. Saco vitelino (11 dpc), 5. Placenta (11 dpc), 6. Saco vitelino (15 dpc), 7. Placenta (16 dpc), 8. Hígado fetal (16 dpc), 9. Médula ósea, 10. Estómago, 11. Cerebro, 12. Músculo, 13. Corazón, 14. Testículos, 15. Hígado, 16. Timo, 17. Bazo, 18. Nódulos linfáticos. Exposición por 72 horas en film de rayos X. Sonda ADNc de timotestín radiomarcada con 32 P. Las flechas indican los transcritos de 3.8 y 4.4 kb de timotestín.

7.1.2. ANALISIS DE EXPRESION DE TIMOTESTIN EN EL SISTEMA INMUNE.

7.1.2.a. Timotestin se expresa principalmente en timocitos maduros localizados en la médula del timo.

El timo es un órgano linfoide primario que esta contituido principalmente por corteza y médula como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Organización celular del timo.

La región subcapsular esta principalmente constituida por células epiteliales corticales y por timocitos (CD4-CD8-), mientras que los timocitos en la corteza maduran y expresan los receptores CD4+CD8+ (dobles positivos). En la región corticomedular se lleva a cabo la selección de timocitos a través de su afinidad por el antígeno presentado por células dendríticas (Sebzda E., et al., 1999). Las células seleccionadas positivamente pasan a formar los repertorios de timocitos CD4+ (cooperadores) y CD8+ (citotóxicos), los cuales se concentran en la médula del timo (Esquema 1). En acuerdo con la abundante expresión de timotestin en timo detectada en los experimentos precedentes, decidimos investigar si esta expresión es ubiqa en todas las diferentes regiones histológicas del timo. Por lo tanto aislamos timos de ratones C57BL/6 para realizar cortes histológicos y analizar la expresión de timotestin mediante hibridación *in situ*. En la figura 3, se puede apreciar la abundante expresión de timotestin en la región cortico-medular y en la medula de timo (fluorescencia roja, sonda antisentido). Estos resultados sugieren que la expresión de timotestin es más relevante en las subpoblaciones celulares que forman parte de la médula de timo.

Para determinar el origen celular de la expresión de timotestin en timo, aislamos células mononucleares de timo CD3⁺ (linfocitos T) y CD3⁻ (que incluyen macrófagos, células epiteliales y células dendríticas). El ARN total de cada subpoblación fue extraído y la expresión de timotestin fue analizada mediante RT-PCR. Los resultados presentados en la figura 3B demuestran que timotestin se expresa selectivamente en los linfocitos T CD3⁺ y no en el microambiente celular del timo. Estos datos son relevantes ya que confirman sin ambigüedad que timotestin se expresa exclusivamente en en timocitos. Las cantidades de

ADNc utilizadas en este análisis fueron equivalentes para cada PCR, lo cual se comprobó mediante la amplificación de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

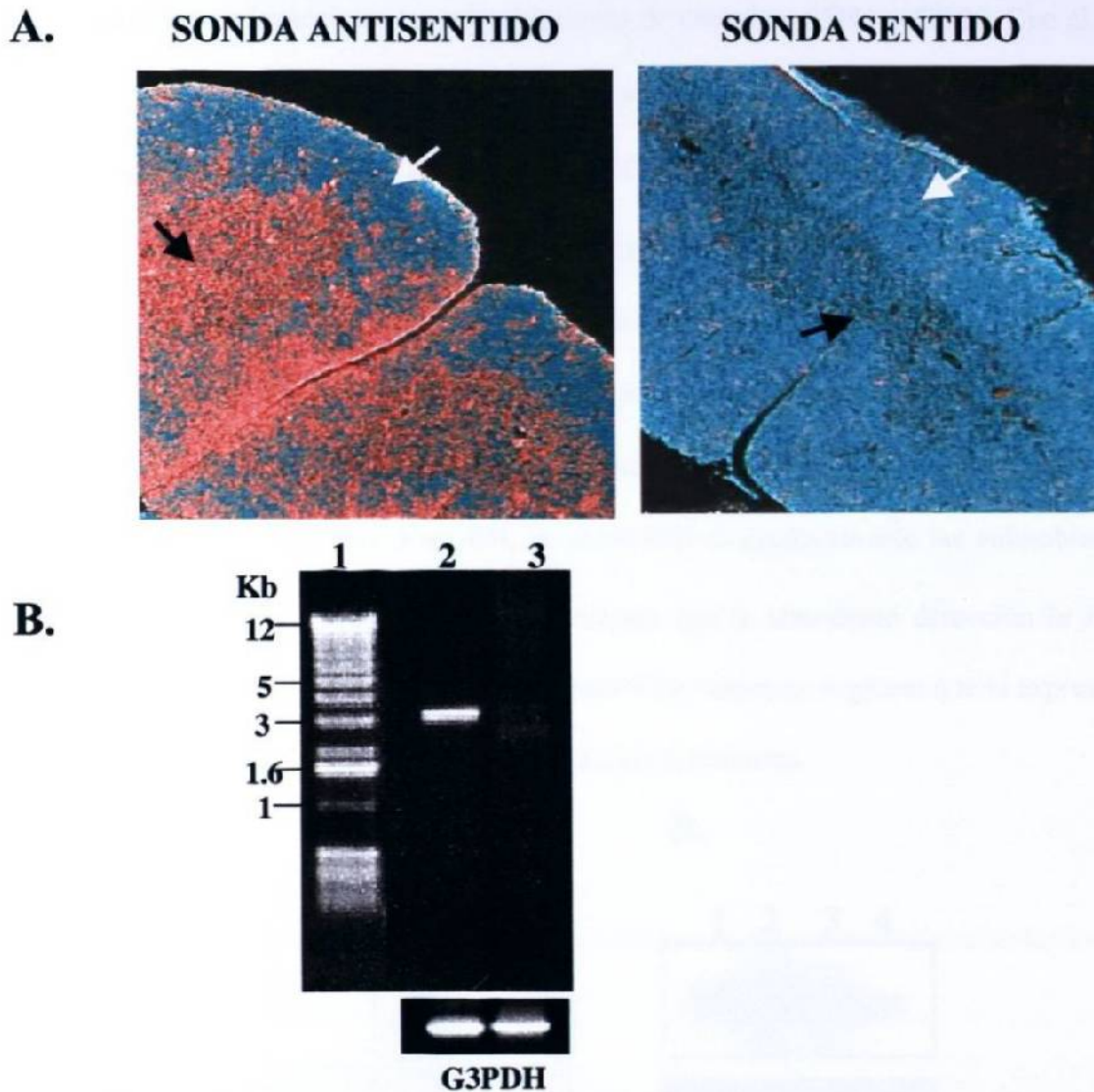


Figura 3. Timotestin se expresa en linfocitos CD3⁺ de timo. **A.** Análisis de hibridación *in situ* de timo: (A) La fluorescencia roja (sonda antisentido) indica la expresión de timotestin, y la fluorescencia azul (sonda control: sentido) donde predomina la tinción nuclear con Hoechst 33342. Flecha de color negro y balnca muestran la médula y la corteza del timo respectivamente. **B.** RT-PCR. Carril 1, marcadores de ADN. 2. RT-PCR de timocitos (CD3⁺) y 3. Células mononucleares (CD3⁻). El producto de amplificación de timotestin fue de 3.1 Kb y el control de carga G3PDH de 900 pb.

Con base en la selectiva expresión de timotestin en timocitos CD3⁺ y la abundante expresión de timotestin en médula de timo, nos hizo postular que la expresión de timotestin puede ser mayor relevancia en las subpoblaciones de timocitos CD4⁺ y CD8⁺. Con el fin de analizar esta hipótesis, analizamos la expresión de timotestin en las cuatro subpoblaciones diferentes de timocitos (CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁻CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁻CD8⁻). Como puede corroborarse en la figura 4, la citometría de flujo (FACS) permitió aislar las subpoblaciones de timocitos con una pureza del 98%. Después de extraer el ARN de cada una de las subpoblaciones, la expresión de timotestin se detectó mediante RT-PCR y Southern blots. Los análisis revelaron que aunque timotestin puede detectarse en las cuatro subpoblaciones de timocitos (Fig. 4B), su expresión es predominante las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺. Estos resultados son congruentes con la abundante detección *in situ* de timotestin en la médula de timo (Fig 3). Estos datos en conjunto, sugieren que la expresión de timotestin es relevante en la maduración y selección intratímica.

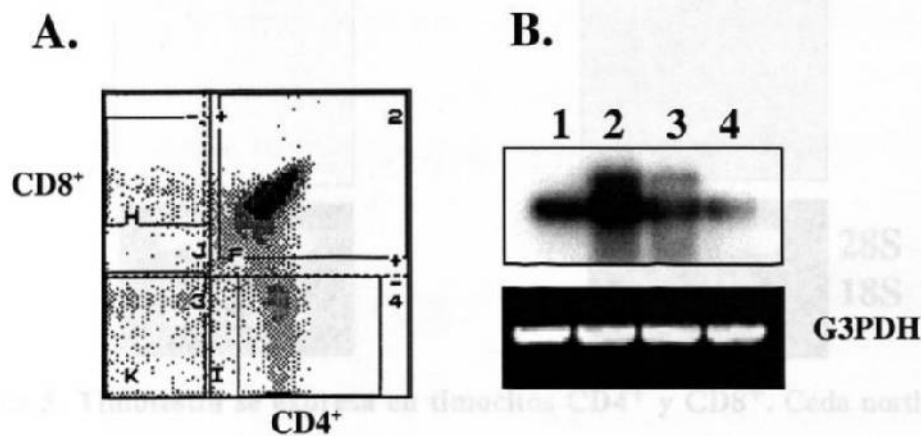


Figura 4. Expresión de timotestin por distintas subpoblaciones de timocitos maduros. A) Esquema del FACS para purificación celular. B) Análisis de expresión mediante RT-PCR y Southern blot. Timocitos CD3⁺: 1. CD4⁺CD8⁻, 2. CD4⁻CD8⁺, 3. CD4⁺CD8⁺, 4. CD4⁻CD8⁻. RT-PCR de la G3PDH se utilizó como control de carga.

El timo produce y exporta continuamente linfocitos T inmunocompetentes con un fenotipo CD4⁺ (cooperadores) y CD8⁺ (citotóxicos) a órganos linfoides secundarios (Anderson G., et al. 2001). Basados en estos hechos decidimos comparar las subpoblaciones responsables de la expresión de timotestin tanto en timo como en bazo. El northern blot reveló que timotestin no se expresa en linfocitos T periféricos del bazo, sino exclusivamente en las células CD4⁺ y CD8⁺ del timo (Fig. 4). Estos resultados indican que la expresión de timotestin juega un papel central y exclusivo en los procesos de diferenciación intratímica.

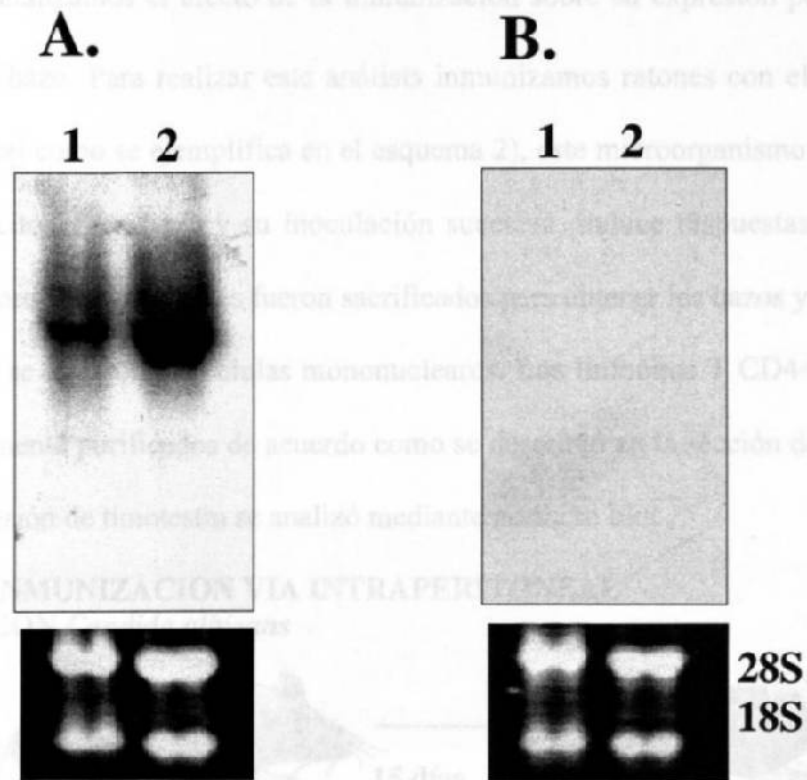
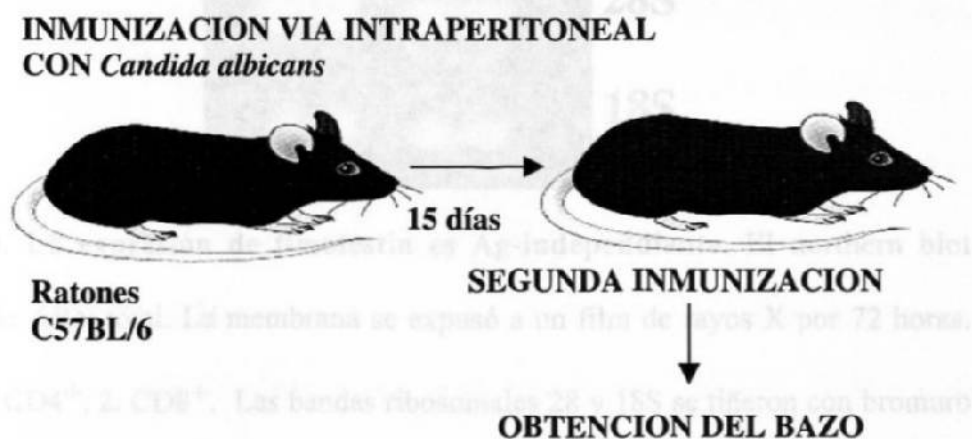


Figura 5. Timotestin se expresa en timocitos CD4⁺ y CD8⁺. Cada northern blot contiene 6 µg de ARN total de: A) Timocitos y B) Linfocitos T (bazo) con el siguiente fenotipo: Carril 1. CD4⁺ y carril 2. CD8⁺. Las bandas ribosomales 18 y 28S fueron teñidas con bromuro de etidio como control de carga.

7.1.2.b. La expresión de timotestin es antígeno (Ag) -independiente y exclusiva de la maduración intratímica.

Análisis precedentes demostraron que timotestin no se expresa en linfocitos T vírgenes del bazo (Fig.5). Sin embargo no sabemos si la migración hacia órganos linfoides secundarios como el bazo depende de la estimulación antigénica, y si la expresión de timotestin es por tanto Ag-dependiente. Con el fin de determinar si la expresión de timotestin es crítica para la localización de los linfocitos T en órganos linfoides secundarios durante la respuesta inmune, analizamos el efecto de la inmunización sobre su expresión por células $CD4^+$ y $CD8^+$ del bazo. Para realizar este análisis inmunizamos ratones con el antígeno *Candida albicans* (tal como se ejemplifica en el esquema 2), este microorganismo induce la activación de linfocitos T en bazo y su inoculación sucesiva, induce respuestas inmunes secundarias. Posteriormente los ratones fueron sacrificados para obtener los bazos y mediante gradientes de ficoll se aislaron las células mononucleares. Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ fueron subsecuentemente purificados de acuerdo como se describió en la sección de material y métodos. La expresión de timotestin se analizó mediante northern blot.



Esquema 2. Protocolo de inmunización.

Tal como se puede comprobar en la figura 6, la expresión de timotestin es independiente del reto antigénico y ajena al microambiente del bazo. Estos resultados apoyan nuestra conclusión previa y confirman la relevancia de timotestin durante la diferenciación intratímica.

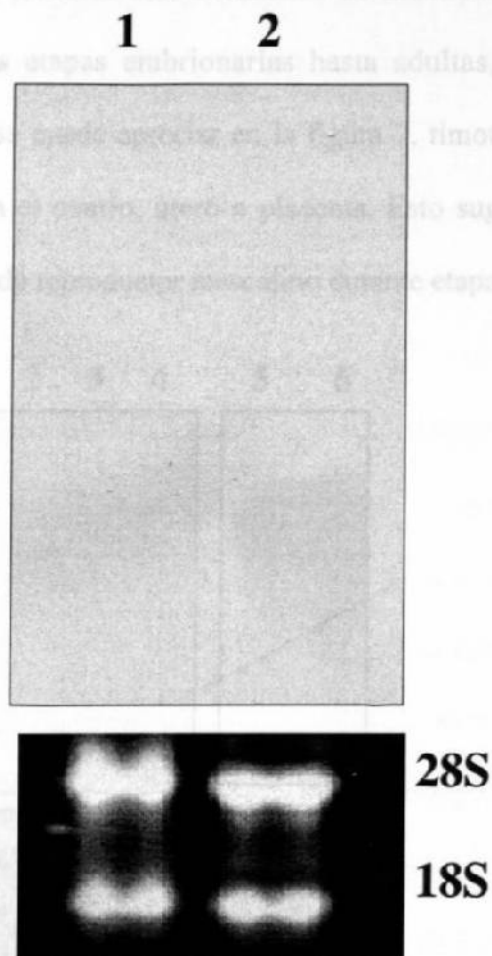


Figura 6. La expresión de timotestin es Ag-independiente. El northern blot contiene 10 μ g de ARN total. La membrana se expusó a un film de rayos X por 72 horas. ARN total de: **1.** CD4⁺, **2.** CD8⁺. Las bandas ribosomales 28 y 18S se tiñeron con bromuro de etidio como control de carga.

7.1.3. EXPRESION DE TIMOTESTIN EN TEJIDO REPRODUCTOR

7.1.3.a. Timotestin se expresa selectivamente en tejido testicular.

Análisis preliminares de distribución tisular indicaron que timotestin se expresa predominantemente en el timo y en el tejido testicular (fig 2). En virtud de estos importantes hallazgos, decidimos realizar estudios mas detallados de distribución tisular en diversos órganos reproductores desde etapas embrionarias hasta adultas, incluyendo el tejido reproductor femenino. Como se puede apreciar en la figura 7, timotestin no se expresa en gónadas fetales ni tampoco en el ovario, útero o placenta. Esto sugiere que timotestin se expresa predominante en el tejido reproductor masculino durante etapas adultas.

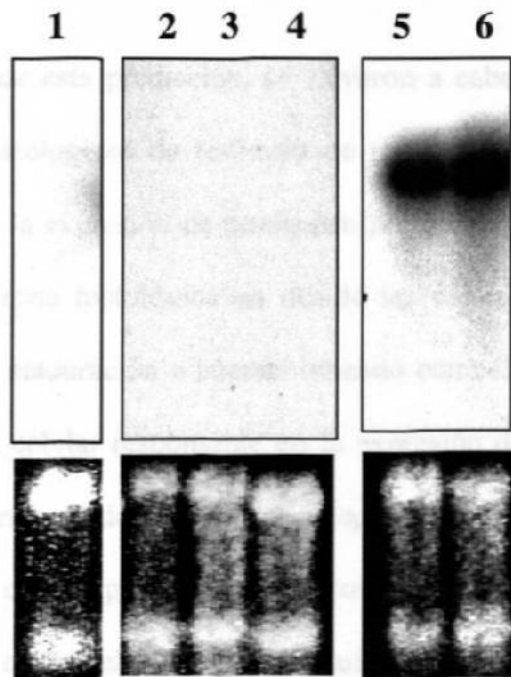


Figura 7. Expresión selectiva de timotestin por el tejido testicular. El northern blot contiene 10 μ g ARN total de cada tejido. 1.Gónadas fetales, 2.Ovario, 3. Utero, 4. Placenta, 5. Testículo, 6. Túbulos seminíferos. Las bandas ribosomales se emplearon como un control de carga.

7.1.3.b. Timotestin se expresa en células germinales.

En etapas adultas, los espermatozoides maduran en la zona basal-apical de los túbulos seminíferos, y finalmente son exportados hacia el epidídimo. Durante esta etapa de maduración las células germinales sufren drásticas alteraciones morfológicas mediadas por proteínas del citoesqueleto que favorecen la formación del flagelo. Todos estos mecanismos se presentan en etapas adultas (Tsutsui K., 1991; Hitzeman J.W., 1971; Johnson I., 1995, Mandal A., et al., 1999, Tanii I., et al., 1999, Robaire B., et al., 2002). Consistente con esta noción, la expresión abundante de timotestin en el tejido testicular en el ratón adulto sugiere un papel relevante y específico durante la maduración de los espermatozoides.

Para confirmar esta predicción, se llevaron a cabo análisis de hibridación *in situ* utilizando cortes histológicos de testículo de ratón. Como se muestra en la Figura 8a (fluorescencia roja), la expresión de timotestin fue detectada en la región basal-apical del túbulo seminífero, zona histológica en donde las células germinales se encuentran en diferentes etapas de maduración e interaccionando con células de Sertoli. Para determinar cual es la población celular responsable en la expresión de timotestin, comparamos ARN total de testículo de ratones deficientes del receptor de andrógeno (Adr^{-/-}), quienes carecen de la producción de células germinales pero contienen células de Sertoli normales (Gaspar M.L. et al., 1991), contra el ARN de testículo de ratones normales. Análisis mediante northern blot (Figura 8B) demostraron que el transcrito de timotestin se encuentra totalmente ausente en tejido testicular Adr^{-/-}, indicando que timotestin es expresado selectivamente por células germinales.

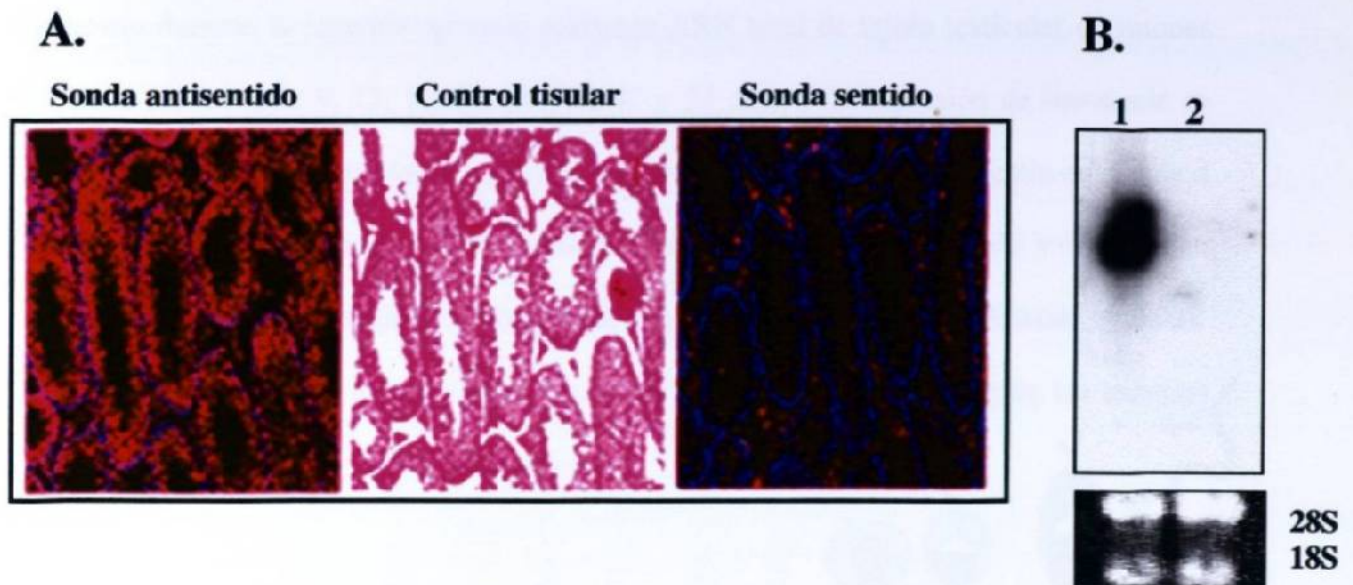
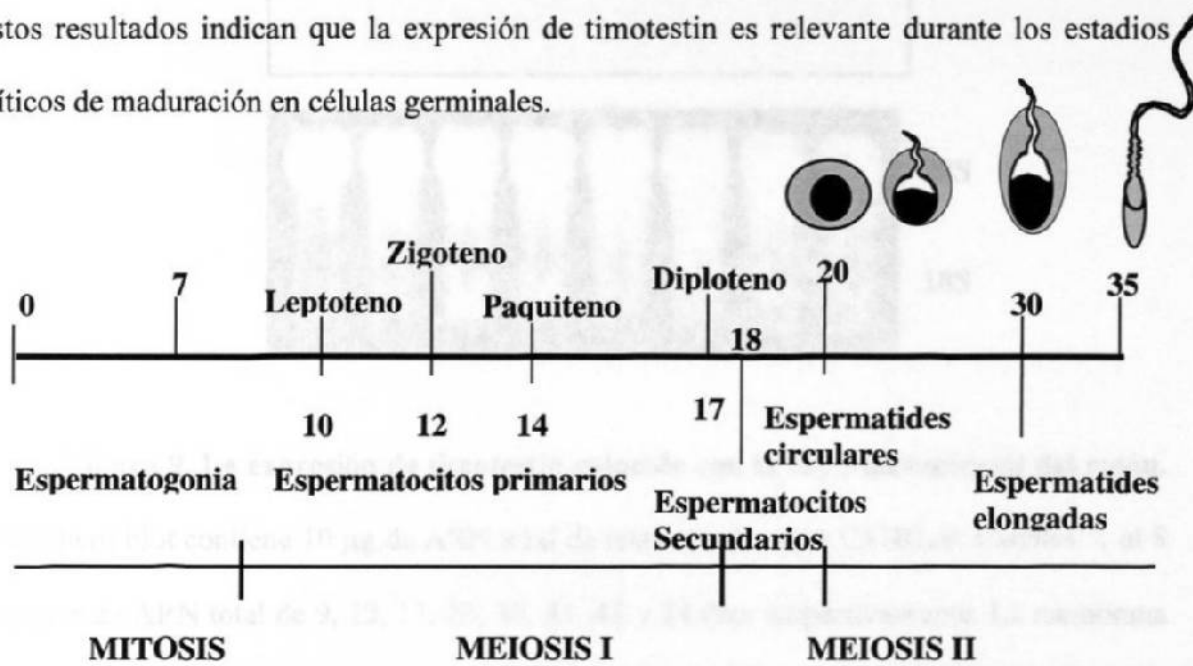


Figura 8. Timotestin se expresa selectivamente por espermatozoides. **A.** Corte sagital de túbulos seminíferos de ratón adulto C57BL/6, hibridado con la sonda anti-sentido de timotestin (fluorescencia roja en el panel izquierdo), o la sonda control sentido (fluorescencia azul del cromógeno azul Hoechst 33342, en el panel derecho). La tinción eosina-hematoxilina del panel central (microscopía de luz visible) se utilizó como control de integridad tisular. **B.** Northern blot, con 10 µg de ARN total. 1. Ratón normal C57BL/6, 2. Ratón deficiente en el receptor del andrógeno (AR^{-/-}). Las bandas ribosomales 18 y 28S fueron teñidas con bromuro de etidio, como control de carga.

7.1.3.c. Timotestin se expresa en estadios críticos de la espermatogénesis.

La espermatogénesis en el ratón se inicia alrededor de los días 20-21 post-natales (Esquema 3). En esta etapa se detecta una gran expresión de proteínas involucradas en la

maduración de las células germinales (Deng W., 2002). Para determinar la relevancia de timotestin durante la espermatogénesis aislamos ARN total de tejido testicular de ratones C57BL/6 a edades de 9, 12, 17, 23, 30, 35, 45 y 54 días, y la expresión de timotestin se analizó mediante northern blot. El análisis reveló una expresión de timotestin relevante a partir del día 23 (Fig.9), etapa cuando se inicia la espermatogénesis en el ratón, y con un pico máximo de expresión en el día 35. Mas aún, tal expresión se mantiene estable hasta el día 54. Estos resultados indican que la expresión de timotestin es relevante durante los estadios críticos de maduración en células germinales.



Esquema 3. Cronología de la maduración de células germinales masculinas murinas. La línea con los números indica la secuencia de eventos en los primeros 35 días post-parto (dpp). Los intervalos de la mitosis, meiosis I, meiosis II y espermatogénesis están descritos en la línea inferior. Las espermatogonias colonizan los túbulos seminíferos después del nacimiento, para madurar a espermatocitos, espermatidas y espermatozoides, como se indica en el esquema (Russell L. et al., 1992). Los números indican los dpp.

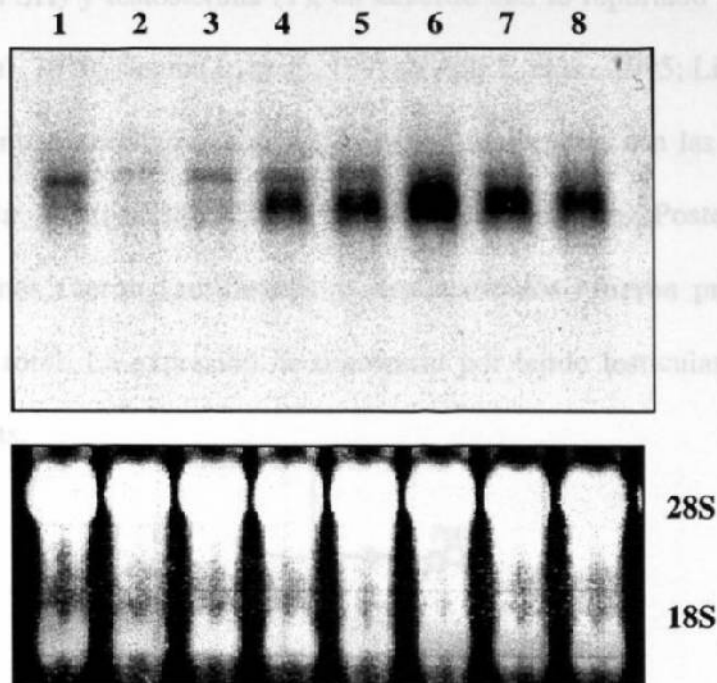


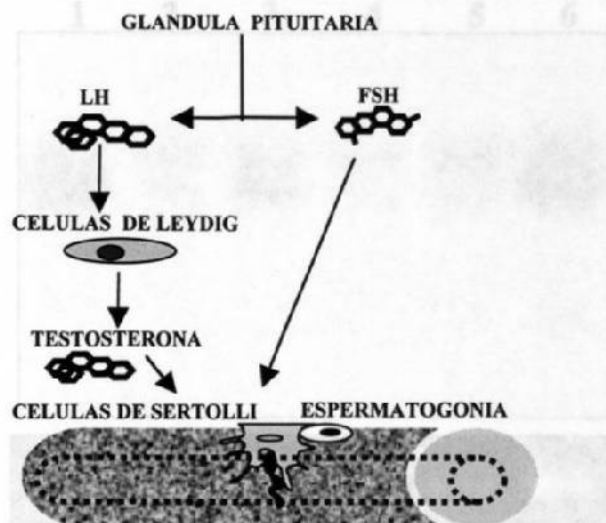
Figura 9. La expresión de timotestin coincide con la espermatogénesis del ratón.

El northern blot contiene 10 µg de ARN total de testículo de ratón C57BL/6. Carriles: 1 al 8 muestras de ARN total de 9, 12, 17, 23, 30, 35, 45 y 54 días respectivamente. La membrana se expuso a un film de rayos X por 72 horas. Las bandas ribosomales 18 y 28S se tiñeron con bromuro de etidio y se utilizaron como control de carga.

7.1.3.d. Regulación hormonal sobre la expresión de timotestin.

Timotestin es una molécula que se expresa abundantemente durante la espermatogénesis, lo cual sugiere que su expresión puede estar regulada por hormonas del eje hipofisario (Esquema 4). Para investigar esta posibilidad, utilizamos ratones hipofisectomizados (que carecen de la expresión de timotestin en testículo) y administramos

por vía subcutánea en la región dorsal del cuello del ratón, las hormonas luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH) y testosterona (T), en acuerdo con lo reportado en la literatura (Blackshaw A.W., et al. 1970; Neuma I., et al., 1991; Singh J., et al., 1995; Lidsey J.S., et al. 1996). Este experimento se realizó con el fin de determinar cuales son las hormonas que tienen una influencia positiva sobre la expresión de timotestin. Posteriormente al tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los testículos fueron procesados para aislamiento de ARN total. La expresión de timotestin por tejido testicular fue detectada mediante northern blots.



Esquema 4. Control de la espermatogénesis por hormonas del eje hipofisario-testicular. La glándula pituitaria secreta la LH, que actúa en las células de Leydig para promover la producción y secreción de testosterona (T). La T actúa en las células de Sertoli y favorece la maduración de los espermatozoides. La FSH es producida y secretada por la hipófisis y actúa directamente sobre células de Sertoli. Los ratones hipofisectomizados carecen de la producción de las hormonas folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y testosterona (T).

En la figura 10, se puede apreciar que las hormonas FSH y testosterona no tuvieron ningun efecto en la expresión de timotestin en ratones hipofisectomizados (carriles 2 y 4 respectivamente, sin embargo la hormona luteinizante (LH) fue la unica hormona que indujo parcialmente la expresión de timotestin en los testículos de ratones hipofectomizados, comparada con el ratón hipofisectomizado sin tratamiento (carril 5). Estos datos sugieren que ademas de la LH, se requieren otros factores (incluyendo citosinas) para iniciar la expresión de timotestin en testículo.

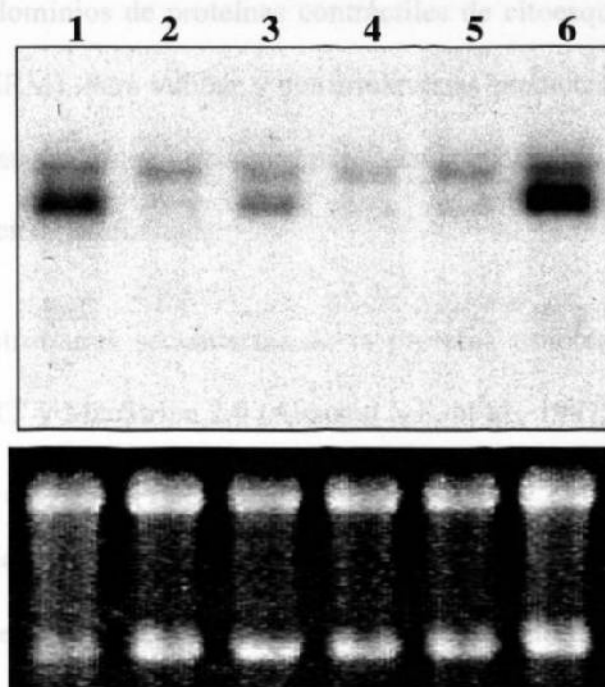


Figura 10. La hormona luteinizante favorece la expresión de timotestin en testículo. Northern blot con 10 μ g de ARN total de testículo. 1. Ratón C57BL/6 de 54 días (control normal). Las muestras de ARN de los siguientes carriles corresponden a ratones hipofisectomizados con administración de las siguientes hormonas: 2. Hormona folículo-estimulante, 3. Hormona luteinizante, 4. Testosterona; 5. Ratón hipofectomizado (control negativo) y 6. Ratón pseudo-hipofisectomizado (cirugía de cráneo sin remover la hipófisis). Bandas de ARN ribosomal utilizadas como control de carga.