



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus Juriquilla

**CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE
LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN
EL CEREBRO DE POLLO**

Tesis de Maestría

Presenta:

Q.F.B. Clara Alba Betancourt

Tutor:

Dra. Maricela Luna Muñoz

Juriquilla, Qro. Agosto 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM (campus Juriquilla, Querétaro) durante el periodo de 2004-2006. La tesis se realizó con apoyo de CONACYT (41218-Q y beca de maestría 184939), PAPIIT (IN205406).

INDICE.

RESUMEN.	
ÍNDICE GENERAL.	
ÍNDICE DE TABLAS.	
ÍNDICE DE FIGURAS.	
INTRODUCCIÓN.	1
Hormona de crecimiento.	3
Estructura de la Hormona de Crecimiento.	4
Sitios de unión al receptor de GH.	5
Efectos de la GH.	5
Variantes moleculares y su actividad biológica.	6
Regulación de síntesis y secreción de GH.	11
Hormona de crecimiento extrahipofisiaria.	12
GH en el cerebro.	13
JUSTIFICACIÓN.	16
HIPÓTESIS.	17
OBJETIVOS.	17
MATERIALES Y MÉTODOS.	17
Material biológico.	17
ELISA.	18
Análisis de las variantes de masa.	19
Análisis estadístico.	20
Inmunohistoquímica.	20
Histoquímica.	21
Separación de las áreas de cerebro de pollo.	24
RESULTADOS.	26
HIPOTÁLAMO.	26
Concentración tisular de cGH.	26
Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.	28
Distribución celular de cGH.	31
Evaluación de los tipos celulares.	33
HIPOCAMPO.	34
Concentración tisular de cGH.	34
Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.	35
Distribución celular de cGH.	38
Evaluación de los tipos celulares.	40
CORTEZA.	41
Concentración tisular de cGH.	41
Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.	42
Distribución celular de cGH.	45
Evaluación de los tipos celulares.	47
CEREBELO.	48
Concentración tisular de cGH.	48
Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.	49
Distribución celular de cGH.	53
Evaluación de los tipos celulares.	54
DISCUSIÓN.	56
CONCLUSIONES.	63
REFERENCIAS.	64

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Variantes determinadas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.	10
Tabla 2. Hormona de crecimiento inmunorreactiva determinada por RIA e inmunocitoquímica.	15

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura primaria de la Hormona de Crecimiento (GH).	3
Figura 2. Sitios de unión del receptor de GH.	4
Figura 3. Acciones biológicas de la GH.	6
Figura 4. Cerebros de pollo.	25
Figura 5. Curva patrón del ensayo de ELISA.	26
Figura 6. Gráfica del contenido de cGH total en el hipotálamo.	27
Figura 7. Luminograma. Resultados Western-Blot de hipotálamo.	28
Figura 8. Gráfica del análisis del Western-Blot de hipotálamo.	29
Figura 9. Localización e inmunohistoquímicas de hipotálamo.	32
Figura 10. Tinciones de cerebro de pollo de la zona del hipotálamo.	33
Figura 11. Gráfica del contenido de cGH total en el hipocampo.	34
Figura 12. Luminograma. Resultados Western-Blot de hipocampo.	35
Figura 13. Gráfica del análisis del Western-Blot de hipocampo.	36
Figura 14. Localización del hipocampo.	38
Figura 15. Inmunohistoquímicas del hipocampo.	39
Figura 16. Tinciones de cerebro de pollo de la zona del hipocampo.	40
Figura 17. Gráfica del contenido de cGH total en la corteza.	41
Figura 18. Luminograma. Resultados Western-Blot de corteza.	42
Figura 19. Gráfica del análisis del Western-Blot de corteza.	43
Figura 20. Localización de la corteza.	45
Figura 21. Inmunohistoquímicas de la corteza.	46
Figura 22. Tinciones de cerebro de pollo de la zona de la corteza.	47
Figura 23. Gráfica del contenido de cGH total en el cerebelo.	48
Figura 24. Luminograma. Resultados Western-Blot de cerebelo.	50
Figura 25. Gráfica del análisis del Western-Blot de cerebelo.	51
Figura 26. Vista panorámica del cerebelo.	53
Figura 27. Inmunohistoquímicas del cerebelo.	54
Figura 28. Tinciones de cerebro de pollo de la zona del cerebelo.	55

RESUMEN

La Hormona de Crecimiento (GH) hipofisiaria está constituida por una familia de proteínas homólogas pero no idénticas, su amplia diversidad funcional puede ser explicada por su heterogeneidad molecular, cuya existencia puede deberse en parte a modificaciones postraduccionales. La GH y su ARNm han ido detectados en tejidos extrahipofisarios de diferentes especies de vertebrados. En el caso del cerebro se han establecido varias acciones de la GH como neuroprotección, neurotransmisión, estado de ánimo, cognición. En este trabajo se determinó la concentración y la distribución de GH inmunorreactiva (IR) en diferentes áreas del cerebro (hipotálamo, hipocampo, corteza y cerebelo) y si esta cambia durante el desarrollo.

Los resultados mostraron diferencias significativas en la concentración total de GH en las diferentes áreas estudiadas a lo largo del desarrollo (días embrionarios 15 y 18, 1 día posteclosión; 4, 14, 25 y 34 semanas). Mediante Western Blot se determinó un patrón de heterogeneidad molecular en la GH de las diferentes áreas, observándose bandas IR de 15, 23, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 80 y 83kDa siendo la de 15kDa la más prominente (>30%). Por inmunohistoquímica se encontró GH-IR presente en células de Purkinje de cerebelo en todas las edades analizadas así como también en células de la corteza, hipocampo e hipotálamo. Estos datos mostraron una distribución diferencial de la GH en las áreas estudiadas y un patrón de heterogeneidad molecular que se modifica durante el desarrollo, lo cual podría sugerir la expresión local de la GH en el cerebro de pollo.

INTRODUCCIÓN.

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína hipofisiaria que tiene una gran funcionalidad biológica en todas las clases de vertebrados. Participa en el metabolismo de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Tiene efectos importantes sobre la diferenciación y proliferación celular, así como en la estimulación enzimática, el transporte de aminoácidos, la estimulación de la eritropoyesis y sobre la secreción de otros factores hormonales (Isaksson y cols., 1985).

En la mayoría de las clases de vertebrados se ha descrito un solo gen que expresa la GH. En humanos, sin embargo, se conocen 2 genes similares situados en el cromosoma 17 (hGH-N, hGH-V). El gen hGH-N se expresa en la hipófisis mientras que el gen hGH-V se expresa en la placenta (Rand-Weaver y cols., 1993). También existe evidencia de un segundo gen de GH en la hipófisis de trucha (rtGH-I, rtGH-II), salmón y esturión (Kawauchi y cols., 1986).

El descubrimiento de la presencia de la hormona de crecimiento en otros sitios diferentes a la hipófisis es reciente. Hay trabajos como el de Kyle y cols., 1981, en el cual identificaron moléculas con una inmunoreactividad semejante a la GH en varios tejidos extrahipofisarios, como hígado, riñón, pulmón, músculo estriado, colon, estómago y cerebro de humanos, a partir de ensayos de paralelismo por radioinmunoensayo e inmunohistoquímica. Estos hallazgos iniciales permitieron plantear la posibilidad de que la GH fuera sintetizada localmente en dichos tejidos, en donde pudiera ejercer otros efectos (vgr. autocrinos y/o paracrinos).

Específicamente en el caso del sistema nervioso central (SNC) se ha señalado que la GH participa en su desarrollo aumentando el peso del cerebro y de la médula espinal así como el tamaño de las motoneuronas (Chen y cols., 1997), en la mielinización y desarrollo de oligodendrocitos (Palacios y cols., 2001) y en la proliferación y diferenciación de células corticales (Ajo, 2001). Este último efecto parece estar mediado a través de una acción antiapoptótica de la hormona que promueve la supervivencia celular (Ajo y cols., 2001).

Diversos estudios también han comprobado que la GH tiene un efecto neuroprotector inhibiendo la apoptosis que sufre el tejido después de un daño de hipoxia-isquemia (Scheepens y cols., 2001). Por otra parte, en las terapias de reemplazo con GH se ha visto una mejora en la coordinación motora, la alimentación y sobre la regulación de los ciclos de sueño-vigilia (Harvey y cols., 1993).

Entre los sitios extrahipofisarios en los que se sintetiza la GH se ha señalado a las células endoteliales de vasos sanguíneos, fibroblastos, células epiteliales del timo, macrófagos y linfocitos de diferentes tipos (Wu y cols., 1996; Liu y cols., 1997), poblaciones neuronales hipotalámicas y extrahipotalámicas del sistema nervioso central en pollos (Render y cols., 1995) y en algunos tejidos embrionarios en pollos, en los cuales se evaluó la presencia de inmunorreactividad a la hormona a lo largo del desarrollo del embrión observándose de manera intensa en las divisiones mayores del tubo neural, a los 3 días de desarrollo, principalmente en el mesencéfalo; a los 6 y 7 días de desarrollo la marca se observó principalmente en la retina neural así como también en el diencefalo y a los 14 días la marca ya no estaba ampliamente distribuida sino que se limitaba a ciertas regiones como en los plexos coroides y la corteza cerebral (Harvey y cols., 2000).

La posible expresión local de GH en tejidos extrahipofisarios se ha fortalecido con la identificación del ARN mensajero de esta hormona en extractos de tejido y por hibridación *in situ*. Se ha sugerido que la producción local de GH podría estar regulada por mecanismos independientes a los que ocurren en la hipófisis y que responden a necesidades propias del tejido que la produce (Weigent y cols., 1991; Latinga-Van Leeuwen y cols., 1999). También se ha observado que la hipofisectomía no modifica los niveles de GH inmunorreactiva en algunos tejidos como el cerebro (Ramesh y cols., 2000). En este trabajo de tesis se estudió la distribución de la GH en el sistema nervioso de pollos en diferentes etapas de su desarrollo.

ANTECEDENTES.

Hormona del crecimiento (GH).

La hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria se sintetiza como una pre-hormona de 225 aminoácidos y la forma madura es una proteína monomérica que tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa y está constituida por 191 aminoácidos (dependiendo de la especie), presenta dos puentes disulfuro localizados entre las cisteínas 53-165 y 182-189 que forman respectivamente un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal, tiene un punto isoeléctrico (pI) que varía entre 5.1 - 8.4 dependiendo de la especie (Arámburo y cols., 1993; Scanes y cols., 1995).

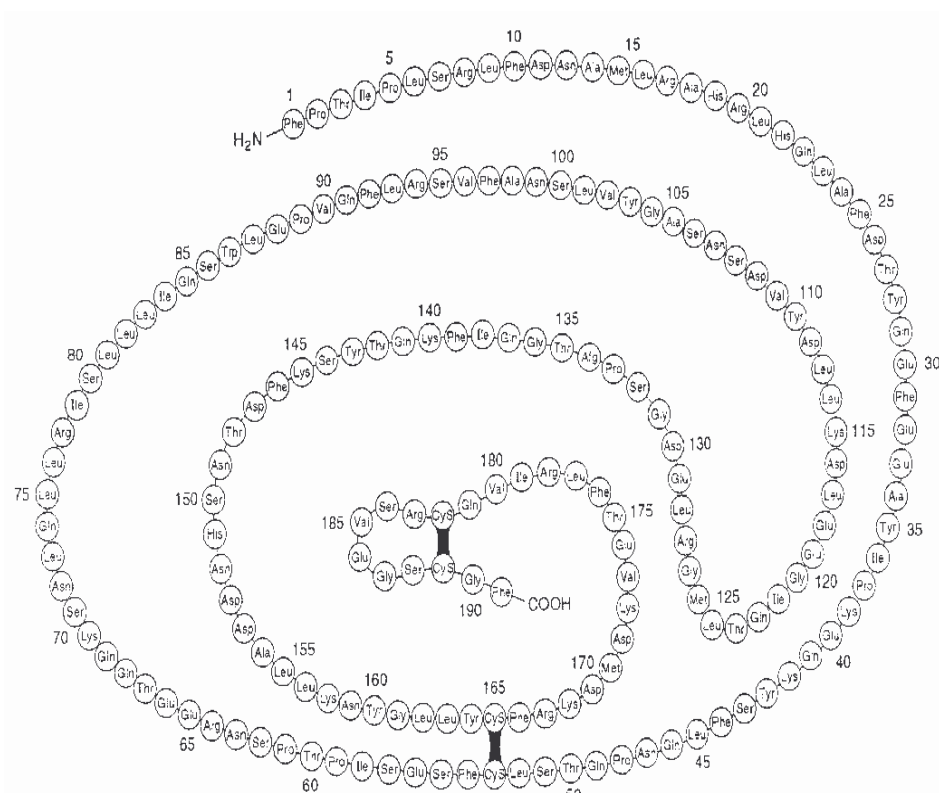


Figura 1. Estructura primaria de la Hormona de Crecimiento (GH).

Estructura de la GH.

Su estructura tridimensional se ha determinado por difracción de rayos X empleando como modelo a las GHs de porcino y de humano. El 50 % de la molécula presenta un contenido α -helicoidal constituido por 4 α -hélices antiparalelas que se encuentran en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183. Además, algunos estudios indican que estas hélices apuntan hacia el exterior de la molécula y son importantes para unirse al receptor (Cunningham y cols., 1991; Abdel-Meguid y cols., 1987).

En aves, se conoce la estructura primaria de la proteína, y del ARNm que la codifica, específicamente en el pollo, pavo y pato; estas son casi homólogas con una diferencia de sólo 3 aminoácidos sustituidos y una deleción en la secuencia en el caso de la del pato comparada con la del pollo (Chen y cols., 1988; Hull y cols., 1997).

En el pollo la GH representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisiaria total (Sturkie y cols., 1986), la prehormona esta constituida de 216 aminoácidos y la hormona madura tiene 191 aminoácidos. Los puentes disulfuro están formados por cisteínas localizadas en las posiciones 53-164 y 181-189. Su peso molecular aproximado es de 22 kDa y su punto isoeléctrico es de 8.2 (Arámburo y cols., 1993; Hull y cols., 1997).

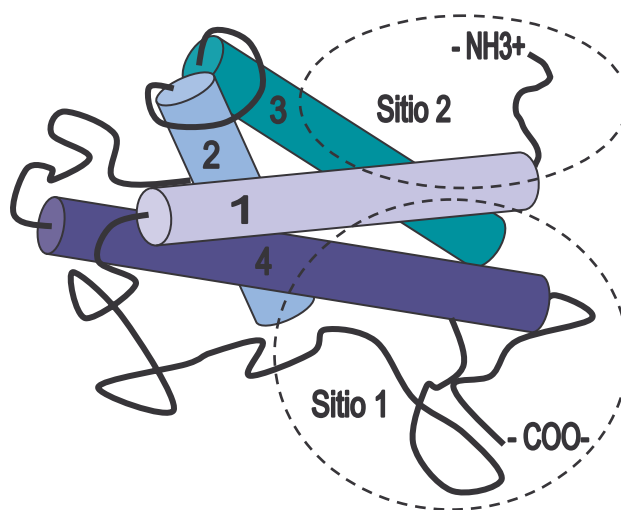


Figura 2. Sitios de unión con el receptor de GH.

Sitios de unión al receptor de GH.

Datos obtenidos con diferentes métodos (actividad por radioreceptor, anticuerpos monoclonales, mutagénesis dirigida, y cristalografía de rayos X) han mostrado que la molécula de GH presenta 2 sitios de unión a su receptor.

El sitio 1 incluye al extremo carboxilo de la hélice 4 y parte del asa 54 -74 de la hélice 1, con la participación de Lys-41, Gln-46, Pro-61, Arg-167, Lys-168, Asp-171, Thr-175 y Arg-178. El sitio 2, por su parte incluye al extremo amino de las hélices 1 y 3, y los residuos Asn-12, Arg-16 y Arg-19 (de Vos y cols., 1992, Cunningham y cols., 1991).

Así mismo, el sitio 1 de la GH se une a una molécula del receptor para GH constituido por la región que va del centro hacia el extremo carboxilo terminal de la hélice 4 subsecuentemente el sitio 2 de la GH se une a otra molécula del receptor con menor afinidad.

La dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la actividad de la transducción de la señal intracelular, y este mecanismo de unión sucede cuando la GH se une tanto a los receptores somatogénicos como a los lactogénicos (Cunningham y cols., 1991, Goffin y cols., 1996).

Efectos de la GH.

La diversidad funcional de la hormona de crecimiento es muy amplia y puede ser explicada en parte por la heterogeneidad molecular que ésta presenta. Entre sus múltiples funciones se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la conservación de glucosa, y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I), que ha sido propuesto como el principal mediador en varios órganos blanco (Rechler y cols., 1990; Baxter y cols., 1991).

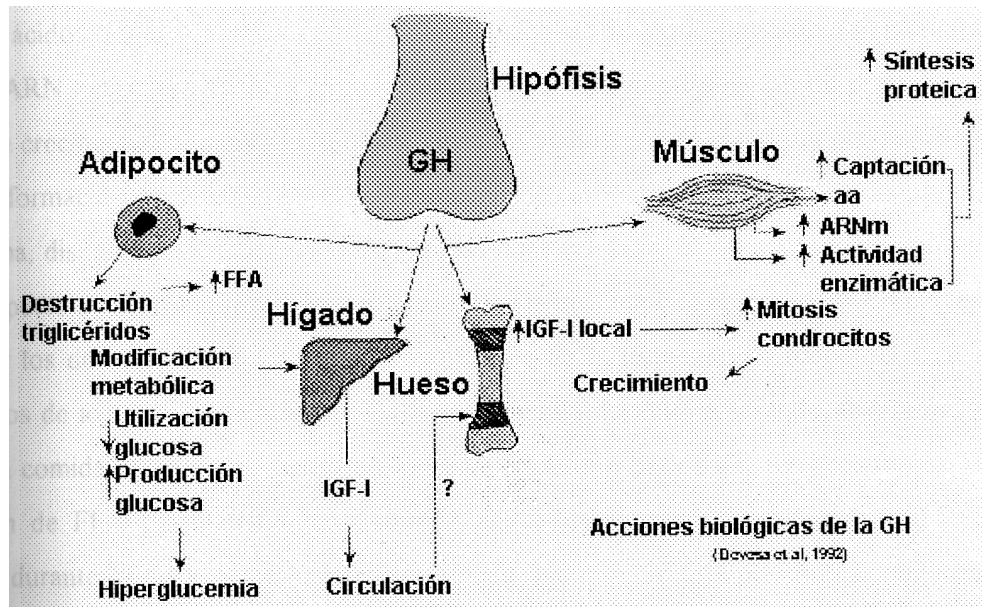


Figura 3. Acciones biológicas de la GH (Devesa y col, 1992).

Entre otros de los efectos directos se incluyen: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabetógeno) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones.

También promueve la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo y cols., 1993). Actualmente se ha establecido que la GH está involucrada de manera integral en el mantenimiento, control y modulación del sistema inmune en mamíferos (Hattori y cols., 2001, Scanes y cols., 1995).

Variantes moleculares y su actividad biológica.

Se sabe que la hormona de crecimiento producida en la hipófisis es en realidad una familia de proteínas similares pero no idénticas. Estas proteínas pueden ser productos de multiplicidad génica, así como de eventos de empalme alternativo en el ARNm o modificaciones pos-traduccionales o de post-secreción (Arámburo y cols., 2001). Aunque inicialmente se creía que eran artificios de la purificación, ahora ya está bien establecida

la existencia de variantes e isoformas, tanto en la hipófisis como en la circulación. (Arámburo y cols., 2001).

Se ha determinado que la fuente de la heterogeneidad molecular de la GH puede estar relacionada con:

-Multiplicidad génica. Durante mucho tiempo se pensó que solamente existía un gen que codificaba para GH en todos los vertebrados. Sin embargo, desde hace varios años se identificaron dos genes en los humanos que codifican para dos GH muy similares. Al primero se le denomina normal (hGH-N) y se expresa en la hipófisis; al segundo se le llama variable o hGH-V y se expresa en el sinciotrofoblasto de la placenta y en el testículo (Frankenne y cols., 1987; Liebhaber y cols., 1989; Untergasser y cols., 1998).

La proteína resultante de la expresión del hGH-V difiere de la hGH-N por 13 aminoácidos y presentan un 92% de homología. Está constituida por 191 aminoácidos, su peso molecular es de aproximadamente 22kDa, es más básica que la proteína codificada por hGH-N, se encuentra glicosilada y tiene un sitio único de glicosilación tipo N, se une a los receptores de PRL y a los de GH y se ha observado que es biológicamente activa (Hennen y cols., 1988; Ray y cols., 1990; Baumann y cols., 1991). Adicionalmente, también en la hipófisis de humanos se ha encontrado un péptido glicosilado de 12kDa relacionado con la GH y por su secuencia se piensa que es producto de un gen diferente al de la hGH-N y la hGH-V (Díaz y cols., 1993).

-Procesamiento del ARN mensajero (empalme alternativo). Se han identificado diferentes ARN mensajeros (ARNm) producto del gen de GH tanto en roedores como en humanos. El gen de la hGH-N produce tres ARNm y las proteínas resultantes son las hGH de 22kDa con 191 residuos de aminoácidos; una de 20kDa, que corresponde a un transcrito con 45 nucleótidos menos y codifica para una proteína a la que le faltan 15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 de la secuencia y representa del 5 al 10% del monómero sintetizado en la hipófisis y finalmente una variante de 17.5kDa (Lewis y cols., 1978, 1992, 2000; Masuda y cols., 1988; Palmetshofer y

cols., 1995). La forma de 20kDa también se ha identificado en roedores y una variante de 17.5kDa en la hipófisis (Sinha y cols., 1987; Lecomte y cols., 1987).

-Modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales de la GH que se han identificado incluyen: la agregación u oligomerización, desamidación, proteólisis con o sin reducción, glicosilación, fosforilación y acetilación. Hasta ahora todas las formas moleculares de la GH que se han descrito en aves parecen derivar de modificaciones postraduccionales y existe evidencia suficiente de que hay una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis (Arámburo y cols., 1990b; Houston y cols., 1988) como en el plasma (Montiel y cols., 1992). En la glándula hipófisis de todas las especies estudiadas, el análisis mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de la hormona (22kDa) (Arámburo y cols., 1990b; Baumann y cols., 2001). Sin embargo, las formas diméricas y oligoméricas pueden representar el 40% de la GH secretada al plasma en humanos. La depuración de los dímeros de la forma de 22kDa y 20kDa es más lenta (5 y 2 veces menor) que la de sus respectivos monómeros. Por esta razón es comprensible que la proporción de oligómeros sea mucho más elevada en el plasma que en la hipófisis (Baumann y cols., 1986). Se han encontrado variantes de masa que probablemente sean producto de un proceso proteolítico: una forma de 25kDa observada en condiciones no reductoras y un fragmento de 15kDa y otra de 7kDa observada en condiciones reductoras en pollo (Arámburo y cols., 1993). La GH glicosilada se ha identificado en la hipófisis y en el plasma de varias especies de mamíferos, en algunos peces óseos, en el tiburón y en el pollo (Sinha y cols., 1987; Berghman y cols., 1987; Arámburo y cols., 1991; Montiel y cols., 1992). Esta forma glicosilada en humanos, representa aproximadamente el 1% de la hGH-N total (Scanes y cols., 1995). Sin embargo existe evidencia -en humanos y ratas- de que la tasa de glicosilación de la GH hipofisiaria cambia en algunas situaciones fisiológicas relacionadas con la etapa reproductiva y el desarrollo fetal (Sinha y cols., 1987; 1990 a, 1990 b). En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) que tiene un peso molecular aparente de 29kDa en condiciones reductoras, cuando esta forma molecular se analizó con diferentes

criterios electroforéticos se mostró que presenta heterogeneidad molecular, encontrándose seis variantes glicosiladas con puntos isoeléctricos (PI) entre 6.52 y 7.17 en las tres formas predominantes y todas ellas con un PM de 29kDa. Esta variante se ha medido en el plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva (Arámburo y cols., 1991). Una purificación de la G-cGH hecha por cromatografía de afinidad, primeramente con Concanavalina A para separar glicoproteínas y posteriormente con un anticuerpo monoclonal que se une a la cGH, demostró que esta forma glicosilada tiene efectivamente un peso mayor a la forma no glicosilada, mediante SDS-PAGE y wetern blot. Por otro lado, un estudio de la concentración de la G-cGH durante la ontogenia mostró un aumento hacia la etapa post-eclosión alcanzando un máximo en la etapa previa a la madurez sexual. (Berumen y cols., 2004). Así también, se ha demostrado que secretagogos como GHRH, 8-Br-AMPC y un éster de forbol (PMA) estimulan de manera diferencial la liberación de la G-cGH *in vitro* con una magnitud de secreción mucho mayor que la cGH no glicosilada (Martínez-Coria y cols., 2002). Cuando se analizó la GH de pollo (cGH) por electroforesis no desnaturalizante, se identificaron tres variantes de carga (0.23, 0.3 y 0.35) (Arámburo y cols., 1989 a). Cuando se incrementa la resolución utilizando isoelectroenfoque y western blot es posible identificar de ocho a diez variantes de carga (Arámburo y cols., 1990; Houston y cols., 1988), algunas de la cuales parecen estar reguladas durante el desarrollo de estos animales (Arámburo y cols., 1989; Houston y cols., 1988). Existe otra modificación post-traduccional que contribuye a la heterogeneidad de carga en una proteína, que es la fosforilación, la cual le confiere características más ácidas a la molécula (Arámburo y cols., 1993). Existen evidencias sobre la existencia de formas fosforiladas de la GH en humanos, ratas, ovinos y pollos. Se ha observado que la GH humana puede ser fosforilada por tirosina cinasas en los residuos Tyr_{28 ó 35} y Tyr₄₂ (Baldwin y cols., 1983). En el pollo una proporción significativa de la hormona parece estar fosforilada (Arámburo y cols., 1989 a), y las células de la hipófisis del pollo en cultivos primarios pueden incorporar fosfato radioactivo a la banda inmunorreactiva a cGH cuya liberación es estimulada por la hormona liberadora de GH (GHRH) (Arámburo y cols., 1990 b). En el pollo, al menos dos variantes de carga (Rf= 0.23 y 0.3) presentan diferente

bioactividad en el metabolismo de lípidos: la 0.23 es esencialmente lipolítica mientras que la 0.3 manifiesta una actividad antilipolítica (Arámburo y cols., 1989a, 1993); sin embargo, ambas presentan actividad somatotrópica equivalente (Arámburo y cols., 1993).

Tipo de isoforma.	PM	Caracterización.	Referencia.
Fragmento de GH	15KDa	[↑] en embrión de pollo Baja actividad RRA Angiogénesis (+) Lipólisis (+) 5D III desyodasa(-).	Arámburo, 2000 “ Arámburo, 2001 “ “
GH monómero	22kDa	La mayoría de las actividades relacionadas a la GH	Houston, 1988
Variante de carga	Rf= 0.23	Más abundantes en la hipófisis	Arámburo, 2001 “ Luna, 2004
Variante de carga	Rf= 0.30	[↑] en pollos jóvenes Somatotrópica (+) Lipólisis (+) Somatotrópica (+) Lipólisis (-) Antilipólisis (+)	Arámburo et al.,1989, 1990 “ “
P-cGH	22kDa	Liberado por GHRH y PMA. Fosforilado por PKA.	Arámburo et al., 1990, 1992.
GH cortada	25kDa	Baja RRA	Arámburo et al.,2000
G-cGH	26KDa	5D desyodasa (+) 20% proporción más baja de depuración. Baja afinidad para GHR Liberación preferencial por GHRH.	Berghman et al.,1994 “ Berumen et al., 2004 Matínez-Coria et al., 2002.
GH dímero	44KDa	Actividad baja de RRA.	Arámburo et al., 2000

GH oligómeros	66,88,110KDa	Actividad baja de RRA [↑] en pollos viejos	Arámburo et al., 2000 “
----------------------	--------------	---	----------------------------

Tabla 1. Variantes moleculares de la cGH determinadas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o en PAGE nativas. Rf: movilidad relativa P-cGH: Hormona de crecimiento fosforilada de pollo; G-cGH: hormona de crecimiento glicosilada de pollo; RRA: Ensayo de Radioreceptor (en membranas de hígado de pollo); GHR: Receptor de la hormona de crecimiento; GHRH Hormona Liberadora de la Hormona de crecimiento; PMA: phorbol myristate acetate; PKA: proteincinasa A.

Regulación de la síntesis y secreción de GH.

Se sabe que la GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles circulantes se modifican ante situaciones fisiológicas como el crecimiento y desarrollo, la privación de alimento, la exposición al frío, el ejercicio, y durante el sueño de ondas lentas (Devesa y cols., 1992).

La regulación de la liberación de la GH es un proceso multifactorial y dinámico que difiere entre las distintas especies y se modifica en relación con el estado fisiológico del animal. Este complejo sistema que controla la síntesis y la secreción de la GH ha sido caracterizado a partir de estudios realizados principalmente en mamíferos, y se sabe que su patrón de liberación está influenciado por factores metabólicos, endócrinos, inmunes y nerviosos, que participan a diferentes niveles de esta red.

Los neuropéptidos hipotalámicos como la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SRIF) constituyen -en la mayoría de las especies estudiadas- las principales señales, estimulante e inhibitoria respectivamente, de la secreción de GH. La GHRH y SRIF controlan la liberación de la GH por una liberación rítmica y alternada de estos neuropéptidos producidos por el núcleo arqueado y periventricular del hipotálamo (Devesa y cols., 1992).

A diferencia de los mamíferos, en pollos las hormona tiroideas (HT) inhiben la síntesis y liberación de la GH inducida por TRH y GHRH, posiblemente a través de la disminución en la sensibilidad de los somatotropos a GHRH y por la reducción de los niveles de secretagogos de GH liberados (Radecki y cols., 1994).

Existen además hormonas que intervienen en el control de la transcripción del gen de GH y su secreción como son los glucocorticoides, los cuales tiene un efecto estimulador. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de GH es dependiente de HT. También afectan la expresión del gen del receptor de GHRH incrementando su ARNm, mientras se observa una disminución en los niveles de ARNm del receptor de SRIF. No obstante, una exposición prolongada a glucocorticoides produce el efecto contrario en la expresión de dichos receptores (Devesa y cols., 1992; Argente y cols., 1994; Blue-Pajot y cols., 1998).

Un mecanismo propuesto para la regulación por GH es el llamado de asa ultracorta, en el que se supone un efecto inhibitorio de la hormona sobre su propia secreción. También puede estar mediada por factores parácrinos extrasomatotrópicos, por ejemplo, a través de las IGF-I que se producen en la hipófisis en respuesta a GH y que inhiben la liberación de la hormona y la transcripción del gen de GH, tanto en condiciones basales como inducidas por GHRH. La GH sistémica disminuye su propia secreción basal o estimulada independientemente de cambios en otras hormonas o metabolitos inhibitorios, como la glucosa o los ácidos grasos libres (Harvey y cols., 1995; Blue-Pajot y cols., 1998).

Hormona de Crecimiento Extrahipofisaria

Como se mencionó anteriormente, es bien conocido que la GH se produce primordialmente en los somatotropos hipofisarios, sin embargo en años recientes se ha descrito su presencia y la de su ARN mensajero en muchos tejidos extrahipofisarios. Se ha determinado en: tejido neural (Yoshizato y cols., 1998; Harvey y cols., 2001a), en el sistema inmune (Hull y cols., 1997; Recher y cols., 2001), en el tejido intergumentario (Palmetshofer y cols., 1995; Slominski y cols., 2000), en el sistema esquelético (Harvey y

cols., 2001b), en el sistema respiratorio (Allen y cols., 2000), en el sistema digestivo (Tresguerres y cols., 1999), en el sistema cardiovascular (Costa y cols., 1993; Wu y cols., 1996; Recher y cols., 2001), y en tejidos ortodónticos de varias especies (Li y cols., 1998).

En el pollo se ha identificado el ARNm de GH en cerebro (Render y cols., 1995a), en el bazo, timo y bursa (Render y cols., 1995b; Luna y cols., 2005), y en ojo de embriones y adultos (Takeuchi y cols., 2001, Baudet y cols., 2003). Resultados recientes de nuestro laboratorio han mostrado la presencia de proteínas parecidas a GH y su ARNm en algunos tejidos del aparato reproductor de machos específicamente en el testículo (Luna y cols., 2004, Harvey y cols., 2004).

GH en el cerebro.

Recientemente se ha planteado que el eje somatotrópico juega un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento del SNC, sin embargo, aún no se sabe si este efecto es mediado directamente por GH o bien es a través del IGF-I o en algunos casos por el neuropéptido hipotalámico GHRH. En humanos se ha determinado la presencia de receptores a GH en diversas áreas del SNC, principalmente se han encontrado en altas concentraciones en los plexos coroides, pero también se ha encontrado en cantidades relevantes en el hipocampo, putamen, tálamo e hipotálamo.

En la vida fetal GH e IGF-I tienen un papel importante en el desarrollo y diferenciación del SNC (Creyghton y cols., 2004). En el sistema nervioso durante la etapa postnatal estos factores tienen una gran variedad de funciones tales como neuroprotección, incremento del apetito, algunas funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) y regulan el flujo sanguíneo (Harvey y cols., 2003). Por otra parte, se ha asociado una reducción en el número de receptores a GH en cerebro con respecto al incremento de la edad. Se ha planteado que la GH y el IGF-I pueden pasar la barrera hemato-encefálica (BHE) por un mecanismo que aún no está completamente dilucidado; de esta forma, se han planteado diferentes vías por las cuales la GH puede ejercer sus efectos en el cerebro.

1. Una posibilidad es que la hormona pueda liberar mediadores secundarios en tejidos periféricos, los cuales pueden cruzar la BHE y producir efectos en el SNC. Un ejemplo de esto es el IGF-1, el cual puede ser transportado activamente a través de la BHE para alcanzar sus sitios respectivos de unión en el SNC (Coculescu y cols., 1999).
2. Otra posibilidad es que la GH puede ser degradada enzimáticamente a fragmentos bioactivos, que pueden alcanzar el SNC y actuar en receptores peptidérgicos (Silberring y cols., 1989).
3. La propia hormona pudiera entrar en el cerebro y afectar directamente las áreas respectivas. La presencia de GH en el cerebro puede reflejar que esta hormona puede ser secuestrada de la circulación y se ha señalado que a nivel de los plexos coroides la BHE no es totalmente impermeable a la GH (Stern y cols., 1975, Van Houten y cols., 1980, Harvey y cols., 1993).
4. Otra propuesta es que la GH inmunorreactiva presente en el cerebro podría tener un origen hipofisario, utilizando un transporte retrógrado a través de los vasos sanguíneos portal-hipofisarios (Bergland y cols., 1979), en donde las concentraciones de GH son menores a las encontradas en el plasma periférico.
5. También se ha sugerido que la GH alcanza sus sitios respectivos en el cerebro mediante la internalización por su receptor en los endotelios vasculares (Nyberg y cols., 2000).
6. Sin embargo, otra posibilidad es que la GH pueda ser producida localmente en el cerebro y que actúe por un mecanismo parácrino y/o autócrino. Existen diversos estudios que apoyan esta posibilidad como los observados por Hojvat y col., (1982a) quienes mostraron la persistencia de la GH-IR en los cerebros de ratas hipofisectomizadas sugiriendo que la síntesis de GH ocurre en el SNC.

También se ha mostrado la presencia de ARNm de GH en el cerebro de rata por hibridación *in situ*, aunque no en el hipotálamo, en donde la GH-IR está concentrada principalmente (Gossard y cols., 1987).

GH-IR ha sido medida en extractos de cerebro fetal de ratas, en los cuales la concentración de GH alcanza un pico durante la gestación y declina hacia su final, contrario al incremento ontogénico en el contenido de GH de la hipófisis.

De hecho la aparición de la GH en el cerebro de rata ocurre primero, en el décimo día de gestación, que la aparición en la hipófisis en el duodécimo día (Hojvat y cols., 1982b).

Estudios *in vitro* realizados en cultivos de células de la amígdala de rata han mostrado la presencia de proteínas con características biológica e inmunológicamente idénticas a la GH hipofisiaria (Pacold y cols., 1978).

Asimismo, en la amígdala, el hipocampo y el tálamo de cerebros de ratas y de primates, se extrajo una proteína con inmunorreactividad parecida a la GH y la cantidad de ésta no disminuyó en animales hipofisectomizados.

El origen cerebral de la GH fue confirmado por estudios de hibridación *in situ* al detectar el ARNm de la GH en diferentes áreas del cerebro de rata (corteza basal, hipocampo, caudado y putamen) (Pacold y cols., 1978).

Otros estudios determinaron la distribución de GH en cerebros de diferentes especies como se muestra en la Tabla 2.

ÁREA	ESPECIE	AUTOR
Amígdala e hipotálamo	Rata y primate	<i>Lechan, 1981, 1983</i>
Cerebelo	Rata	“
Estriado	Rata	<i>Mustafa, 1995</i>
Glándula pineal	Rata, pollo y pavo	<i>Noteborn, 1993; Ramesh, 2000, Harvey, 2001.</i>
Hipocampo.	Rata, pavo y paloma	<i>Lechan, 1983 y Mustafa, 1994</i>

Hipotálamo	Rata, pollo y pavo	<i>Render, 1995, Ramhesh, 2000, Hovjat, 1995</i>
Cordón espinal	Embrión de pollo	<i>Harvey, 2001</i>
Eminencia media	Pollo	<i>Ramesh, 2000</i>
Plexo coroides	Pollo	<i>Ramesh, 2000</i>

Tabla 2. Hormona de crecimiento inmunorreactiva determinada por RIA e inmunohistoquímica

Estudios realizados en el cerebro de pavo mostraron en el hipocampo neuronas polidendríticas densamente teñidas que contenían GH y en algunos cuerpos celulares y fibras densas en áreas hipotalámicas como: el área septal lateral, infundibular e inferior, el núcleo supraóptico, el paraventricular, el paraventricular anterior y el medio supraquiasmático (Ramesh y cols., 2000). A nivel subcelular se encontraron gránulos de GH-IR en el citoplasma de cuerpos celulares de algunas de estas regiones. También han sido localizadas en células de Purkinje y granulares del cerebelo en pollo (Harvey and Hull, 1997).

La distribución celular de la GH en el cerebro durante el desarrollo aún no se ha determinado. Sin embargo, en embriones de tres días de desarrollo la GH-IR se encuentra ampliamente distribuida en el telencéfalo, mesencéfalo y diencéfalo (Harvey y cols., 2001b).

Además, se ha determinado que del día 14 al 21 de embriogénesis está presente en diferentes tipos celulares como neuronas, glia, oligodendrocitos, particularmente en cerebelo y corteza cerebral (Harvey y cols., 2003). Se ha planteado que la GH cerebral pudiera tener actividades autócrinas y/o parácrinas en el crecimiento de embriones en etapas tempranas del desarrollo (Harvey y cols., 1998), especialmente porque se encuentran ampliamente distribuidos receptores de GH (GHR) en la mayoría de los tejidos de embriones de pollo (Harvey y cols., 1998, 2001a,b).

En pollos adultos, proteínas inmunorreactivas parecidas a la GH fueron detectadas por radioinmunoensayo y Western blot en tejidos hipotalámicos y extrahipotalámicos, en los cuales la GH-IR fue similar en su antigenicidad y en su peso molecular a la GH hipofisiaria. Además, se encontró que la secuencia del cDNA de la GH obtenido a partir de tejidos hipotalámicos y extrahipotalámicos del cerebro de pollo mostró tener la misma secuencia a la previamente determinada en la hipófisis (Render y cols., 1995a).

JUSTIFICACIÓN

Dado que en los últimos años se ha determinado que la GH puede expresarse en otros tejidos y no sólo en hipófisis, es importante completar la información sobre la presencia y localización de la GH en el cerebro de pollos, como otro tejido extrahipofisiario. Debido a que se ha encontrado tanto al ARN mensajero de GH como a la proteína en diversas estructuras del SNC en algunas especies de mamíferos y en el caso de las aves se ha planteado la presencia de GH-IR, es importante determinar las concentraciones de esta proteína y discernir si también muestra heterogeneidad molecular en el SNC del pollo y en su caso cómo varía. Con base a lo anterior, se planteó llevar a cabo la identificación y caracterización bioquímica de la GH en áreas específicas del cerebro (hipotálamo, corteza cerebral, hipocampo, y cerebelo) y se determinó la distribución celular de GH en estas áreas a lo largo del desarrollo.

HIPOTESIS

El sistema nervioso del pollo es capaz de expresar localmente a la hormona de crecimiento con un patrón específico de isoformas moleculares, que pueden variar de acuerdo al desarrollo del organismo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar a la hormona de crecimiento en el sistema nervioso central de pollos de diferentes edades.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia y concentración de GH en diferentes áreas del cerebro de pollos (hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo) a lo largo del desarrollo.
- Caracterizar el patrón de heterogeneidad molecular de GH en las áreas específicas del SNC de pollos de diferentes edades.
- Estudiar la distribución celular de la GH a nivel del SNC.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se emplearon pollos de engorda (machos) de raza Broiler Ross obtenidos de las granjas de producción Grupo Abrego camino a Colon en el estado de Querétaro. Los pollos fueron mantenidos hasta alcanzar la edad requerida en las instalaciones del Instituto de Neurobiología con agua y alimento *ad libitum* antes de su sacrificio. Los pollos utilizados alcanzaron la edad de 4 y 14 semanas (juveniles) y de 25 y 34 semanas (adultos).

También se emplearon huevos axénicos fértiles provenientes de la compañía Aves Libres de Patógenos Específicos S.A. de C.V. de Tehuacan, Puebla, los cuales se metieron en una incubadora con humedad, a una temperatura controlada de 37°C y con movimiento para favorecer el crecimiento del embrión de pollo durante 15 y 18 días, tiempo en el que fueron sacados para ser sacrificados. Se dejó completar el desarrollo de algunos de los embriones y fueron sacrificados 1 día después de la eclosión.

Tanto los pollos como los embriones se sacrificaron por decapitación obteniéndose el cerebro lo más completo posible, para facilitar la obtención de las secciones seleccionadas.

Para los objetivos 1 y 2:

Al coleccionar los cerebros se congelaron inmediatamente en hielo seco y se guardaron a -70°C. Las áreas del cerebro de pollo fueron separadas basándose en el atlas de Kuenzel y cols, 2000. Los tejidos se homogeneizaron en un cóctel de inhibidores de proteasas (mini-Complete) adicionado de PMSF (0.1mM) en Tris-HCl 1mM ajustado a pH 9.0. Se extrajo la GH agitando los homogeneizados por 2 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12,000rpm a 4°C por 15 min. Se coleccionaron los sobrenadantes y se determinó el contenido de proteína por el micro método de Bradford (Bradford M., 1976; Spector T., 1978).

ELISA.

La cuantificación de la cGH total en las diferentes partes del cerebro se hizo mediante un ELISA indirecto por competencia (Martínez-Coria y cols., 2002). En breve, las placas de inmunoanálisis de 96 pozos fueron forradas con una solución de rcGH 12ng/100 µl/pozo. Simultáneamente las muestras y las diluciones del estándar para la curva patrón se incubaron con el anticuerpo policlonal contra cGH CAP1 (Arámburo y cols., 1989) (1:50,000) en TPBS + leche al 1 % durante 16 horas a 4 °C.

Las placas se lavaron con TPBS 5 veces y se bloquearon para evitar unión inespecífica con leche descremada al 3% en PBS. Se le agregó la mezcla incubada previamente con el primer anticuerpo a la placa, para establecer la competencia durante 2 horas.

Después de lavar se les adicionó la solución con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución de 1:3 000 (100µl por pozo), se incubó durante 2 horas y se revelaron con una solución de ABTS (buffer dilución 1:10; sustrato 2.1mg/ml) durante media hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se cuantificó el desarrollo de color en un lector de placas (Bio Rad, Microplate Reader modelo 3550-UV)) a una longitud de onda de 405 nm.

Este ensayo tiene una sensibilidad de 2ng/pozo (20ng/ml) y un coeficiente de variabilidad intra e interensayo menor al 5 % (Martínez-Coria y cols., 2002).

ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE MASA DE cGH POR ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT.

Para determinar el peso molecular aparente de las diferentes variantes moleculares de la hormona de crecimiento del pollo, las muestras se analizaron mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida (15 %) en presencia de dodecil sulfato de

sodio. Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras utilizando para ello el β -mercaptoetanol.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) empleando un amortiguador con 25mM Tris, 192mM Gly, 20 % metanol, pH 8.3 a 200mA por 60 min, posteriormente se bloquearon con leche descremada al 5% (Bio-Rad) en TBS por 2 horas a temperatura ambiente y se inmunotñieron con un primer anticuerpo anti-GH CAP-1 (1:10,000 en leche descremada al 1% y Tween-20 al 0.05% en TBS) y un segundo anticuerpo (cabra anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad), luego las membranas se revelaron con un sustrato quimioluminiscente (ECL Amersham/Pharmacia) (Towbin H. y cols., 1979).

Los luminogramas fueron escaneados y analizados por el programa Image Quant.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para analizar los resultados se realizaron ANOVAS de una vía y la prueba poshoc de Tuckey para la determinación de diferencias significativas.

INMUNOHISTOQUÍMICA.

Inmunorreactividad a GH

Para determinar la distribución de células inmunorreactivas al anticuerpo contra cGH se analizaron cortes de cerebros de embriones de 15 y 18 días, así como también cerebros de pollo en edades posteclosión de 4, 14, 25 y 34 semanas.

Dichos tejidos fueron fijados en solución de Carnoy (60% etanol absoluto, 30% cloroformo, 10% ácido acético) (Murphy et al., 2003) por 24 horas mínimo.

Posteriormente fueron deshidratados, incluidos en bloques de parafina, de donde se obtuvieron cortes de 7µm que, a su vez, fueron desparafinados con citrisolv y procesados en un tren de alcoholes (2 de etanol absoluto, 2 de etanol al 96%, 1 de etanol al 70%, 1 de etanol al 50%, 5 minutos en cada solvente) para ser rehidratados y poder procesarse.

Estas secciones se incubaron con un anticuerpo policlonal C1 (dilución 1:200 por 2 horas mínimo) dirigido contra la GH recombinante de pollo (rcGH) y luego con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:200 por 2 horas) y revelado con DAB (0.025g en 200ml de amortiguador) y H₂O₂ (75µl en 200ml de amortiguador) hasta observar una marca visible en el microscopio. Esta reacción de revelado se detiene lavando las preparaciones con el amortiguador usado a lo largo de la técnica.

Las preparaciones deben ser nuevamente deshidratadas utilizando el mismo tren de alcoholes pero ahora de la concentración menor a la mayor y después del etanol absoluto

siguen 2 de xilol para poder ser montadas posteriormente usando una resina (Enthellan, MERCK) cubriendo la preparación con un cubreobjetos que queda pegado a la misma gracias a la resina.

HISTOQUÍMICA.

En paralelo, también se realizaron las tinciones de Nissl, Klüver-Barrera y la técnica de Golgi para hacer un análisis morfológico comparativo con las células inmunorreactivas observadas. Se utilizaron cortes de 7 μ m de cerebro de pollo de 4 semanas de edad posteclosión fijado con solución de Carnoy, deshidratado y embebido en parafina.

Tinción de Nissl

Para la tinción de Nissl, las secciones de tejido son desparafinadas en citrisolv e hidratadas en el tren de alcoholes mencionado en el apartado anterior de la inmunohistoquímica. Posteriormente, son hidratadas con PBS o solución salina y se pasan a etanol al 80% acidulado durante 1 minuto con la finalidad de hacerlas más mordentes.

Se lavan las secciones con agua destilada y se meten al colorante (violeta de cresilo: 1g en 1000ml de agua) por 5 minutos. Se vuelven a lavar con agua destilada pero esta vez el lavado debe ser más rápido, y se procede a hacer la deshidratación con la siguiente serie de etanoles: 70% 1min; 80% 1min; 96% hasta cambio de coloración; Absoluto 1min. Una vez terminado, se meten en xilol y se montan las preparaciones con resina.

Tinción de Klüver-Barrera.

Para la tinción de Klüver-Barrera (o método del azul luxol-resistente) las secciones deben ser desparafinadas y rehidratadas hasta llegar al etanol al 96% para dejarse en la solución de azul luxol-resistente (0.1g en 100ml de etanol al 95%) en un horno a 56°C hasta la mañana siguiente.

Se enjuagaron con agua destilada y deben diferenciarse una por una por 30 segundos en una solución de carbonato de litio (0.05g en 100ml de agua) y se continuó con la diferenciación en alcohol al 70% hasta que la sustancia gris esté clara y la sustancia blanca estuvo bien definida examinando microscópicamente la preparación.

Tan pronto como la diferenciación se haya completado, se colocaron en agua destilada y se repite el lavado con agua destilada fresca.

Deben ser ahora contrastadas en la solución violeta “Echt” de cresilo (0.1g en 100ml de agua) por 6 minutos. Se enjuagaron por 2 veces en etanol al 95% y se continuó la deshidratación a través de 2 cambios de etanol absoluto y xileno, 2 cambios cada uno, de 2 minutos cada uno. De igual manera se montaron usando un medio resinoso (Klüver H. and Barrera E., 1953).

Tinción de Golgi.

Para la técnica de Golgi, se procesaron cerebros de 4 semanas de edad posteclosión con la técnica de Golgi rápido modificada por Díaz-Cintra y cols., 1981. Primeramente, el tejido fue fijado por medio de infiltración intracardiaca de una solución fijadora (Paraformaldehído al 4%:) *in vivo*. Para esto, el animal fue anestesiado con pentobarbital sódico, multiplicando su peso por el factor indicado en la etiqueta del anestésico y se inyectó vía intravenosa.

En una campana de extracción, se montó una rejilla de metal encima de un recipiente de plástico que sirvió para recoger la sangre que se obtuvo de los lavados y del fijador desechado.

Se fijó al pollo anestesiado pegando las patas y la cabeza a la rejilla con cinta adhesiva. Se le quitaron las plumas y se le cortó la piel teniendo mucho cuidado de no desangrarlo ya que este tejido es muy vascularizado.

Posteriormente, se cortó el músculo pectoral (pechuga) con mucho cuidado para no perforar el hígado. Al levantar este músculo se observó el corazón el cual seguía latiendo. Se cortaron las membranas que cubren al corazón para dejarlo totalmente descubierto y acto seguido se bloqueó la circulación poniendo una pinza en la arteria que está justo debajo del corazón haciendo un circuito para perfundir sólo el encéfalo.

Antes de hacer pasar el fijador, se hizo primero un lavado con solución de PBS 0.1M por medio de un sistema de venoclisis o con bomba peristáltica, inyectando la aguja en el pico que se forma en el corazón.

Después del lavado se procedió a introducir con el mismo sistema la solución fijadora (Paraformaldehído al 4%: Disolver previamente en agua a 50-60°C de 45 minutos a 1 hora con agitación constante. Pasado este tiempo, se sigue con agitación constante y se deja disminuir la temperatura a aprox. 40°C y se le agregan una o 2 gotas de NaOH concentrado para aclarar la solución) sin sacar la aguja del corazón.

El pollo estuvo bien perfundido en el momento en que la cabeza se puso dura y los ojos empezaron a blanquearse. Una vez que esto ocurrió, se sacó la aguja del corazón, y se decapitó al pollo para la obtención del encéfalo. Los encéfalos fueron envueltos en papel aluminio y puestos en la campana de extracción manteniéndolos así hasta el día siguiente.

De cada uno de estos cerebros se tomaron bloques de tejido de 4mm aproximadamente haciendo cortes coronales y separando los hemisferios de los lóbulos ópticos y del cerebelo. Estos bloques fueron colocados en una solución de dicromato de potasio al 4.5% con ácido ósmico al 1% en una proporción de 8:2 y se dejaron en esta solución por 12 días.

Terminado este tiempo, los bloques fueron sacados de esta solución y se les quitó el exceso de cristales precipitados en los mismos y posteriormente fueron diferenciados en una solución de nitrato de plata al 0.75% durante 24 horas.

A continuación, se procedió a la deshidratación del tejido en alcoholes graduales desde 50% hasta etanol absoluto y éter (proporción 1:1) permaneciendo 30 minutos en cada uno de los cambios. Una vez concluida esta deshidratación, los bloques se colocaron en nitrocelulosa de baja viscosidad la cual se preparó a diferentes concentraciones empezando con 2% y aumentando al 5, 10, 15 y 30% cada 24 horas.

Finalmente los bloques se incluyeron en nitrocelulosa al 30% en moldes de plástico de 8mm x 8mm durante doce horas en un desecador que contenía vapores de cloroformo el cual se conectó al vacío.

Ya endurecidos, los bloques se fijaron en una platina de metal y se colocaron dentro del desecador por espacio de 15 minutos, pasado este tiempo se adaptó la platina en un microtomo de deslizamiento (Leitz Wetzlar 47160) y se obtuvieron secciones frontales de 120µm de grosor, cada una de las cuales se deshidrató por separado en alcoholes graduales, aclarándose en terpineol y dos cambios de xileno para después ser montadas en portaobjetos con resina sintética en una estricta seriación.

SEPARACIÓN DE LAS ÁREAS DEL CEREBRO DEL POLLO.

** Basándose en estudios anteriores de la Hormona de Crecimiento en el cerebro, decidimos trabajar con 4 áreas principalmente: corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y cerebelo.

** Para la separación de dichas áreas nos basamos en el atlas del cerebro de pollo publicado por Kuenzel y col. Se tomó al tercer ventrículo como referencia para la separación del hipotálamo, y haciendo un corte coronal de la parte frontal del cerebro para la separación del hipocampo y de la corteza. El cerebelo es una estructura fácilmente distinguible y separable.

** A continuación se muestran fotografías de un cerebro de pollo de 14 semanas de edad post eclosión y una figura del atlas del cerebro de pollo de Kuenzel y col.

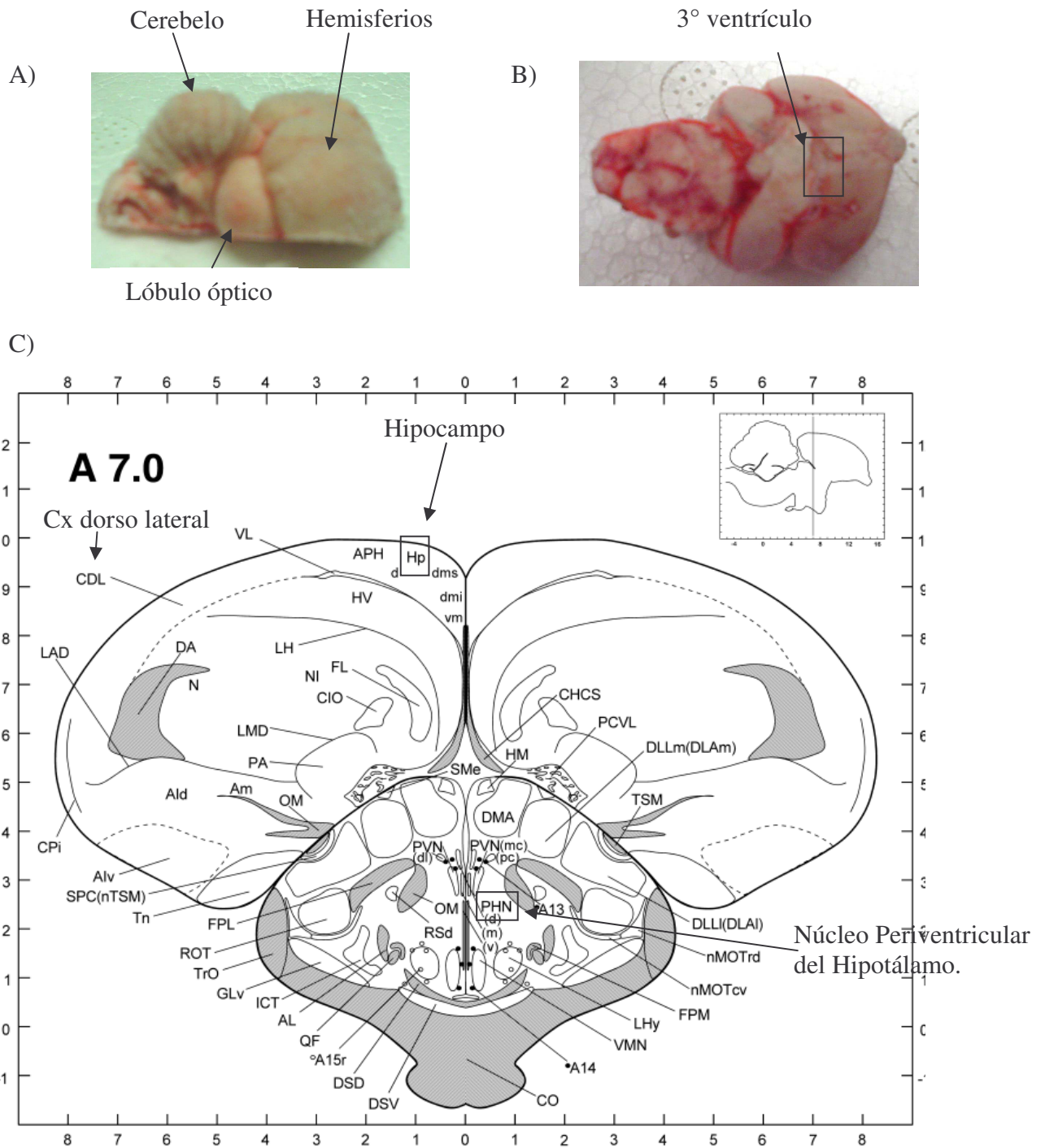


Figura 4. Fotografías de cerebro de pollo de 14 semanas de edad post eclosión. A) Vista de lado en donde se aprecian el cerebelo, los lóbulos ópticos y los hemisferios cerebrales. B) Vista de la parte inferior del cerebro en donde se puede apreciar la zona del tercer ventrículo. C) Imagen del atlas del cerebro de pollo de Kuenzel y col. corte coronal hecho a 7mm de la parte frontal hacia la posterior.

RESULTADOS.

Determinación de la presencia y concentración de GH en diferentes áreas del cerebro de pollos a lo largo del desarrollo.

Para poder cuantificar la concentración de GH en las diferentes áreas del cerebro se utilizó un ELISA indirecto por competencia que se optimizó obteniendo una coeficiente de correlación $r = 0.98$, un coeficiente de variación intra e interensayo de 3.5 y 3.91 como se muestra en la curva patrón (Figura 5).

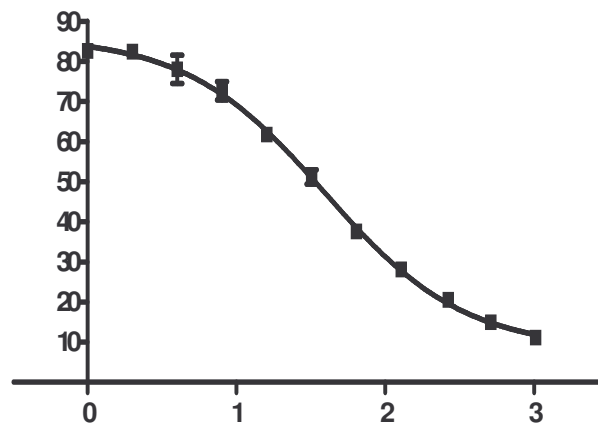


Figura 5. Curva patrón para el ensayo de ELISA. 12ng de rcGH para el forro de las placas, anticuerpo policlonal CAP1 1:100,000, segundo anticuerpo-peroxidasa 1:3000, revelado con ABTS. Promedio +/- desviación estándar $n=9$. Se utilizaron concentraciones de diluciones dobles seriadas de rcGH.

HIPOTÁLAMO.

Concentración tisular de cGH.

Para determinar la presencia de cGH en el hipotálamo del cerebro de pollo se evaluaron los cambios en la concentración de cGH total en homogeneizados de esta estructura en pollos de diferentes edades utilizando la técnica de ELISA. Las edades

analizadas fueron: embriones de 15 y 18 días de incubación (15E y 18E, respectivamente), pollos de 1 día post-eclosión (1D), y de 4, 14, 25 y 34 semanas de edad (4S, 14S, 25S y 34S, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 6.

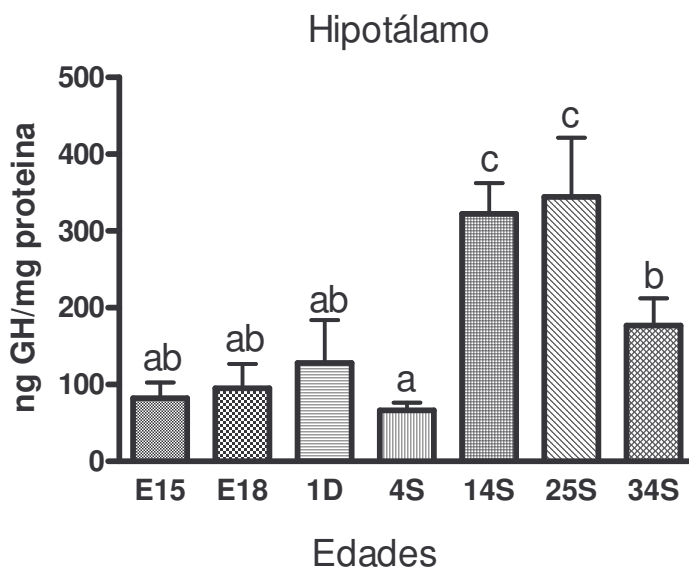


Figura 6. Contenido de cGH total cunatificado por ELISA indirecto en alícuota de 60 μ g de proteínas de extractos de hipotálamo de diferentes edades. Cada barra representa a la media \pm error estándar con $n=3$. Letras diferentes representan diferencias significativas con $P<0.05$ obtenidas por la prueba de Tuckey.

Como se observa en la Figura 6, durante las primeras etapas de desarrollo no se observaron diferencias significativas en la concentración tisular de cGH y aparentemente existe un aumento hacia la etapa de la eclosión, más no es significativo. La concentración de GH disminuyó hacia las 4S, etapa en la que el animal presenta un pico en la concentración sanguínea de dicha hormona y se correlaciona con una fase de crecimiento y desarrollo crítica del organismo, pero esta disminución observada en la concentración no es significativa en comparación con las primeras etapas del desarrollo analizadas.

Por otro lado, la concentración de GH aumentó 4.8 veces a las 14S (que se considera el inicio de la pubertad) en comparación con las 4S, y no hay cambios significativos a las 25S, edad que corresponde con el inicio de la madurez sexual y se considera al animal como un

adulto joven, y en estas edades se observó el pico máximo en la concentración de GH en esta estructura cerebral.

En contraste a las 34S se observó una disminución significativa de la GH con respecto a las 14 y las 25S pero no fue significativamente diferente a las edades anteriores, en esta etapa se considera que el pollo ha alcanzado por completo su madurez sexual así como su desarrollo.

Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.

Para determinar un posible patrón de heterogeneidad molecular en el hipotálamo de cerebro de pollos de diferentes edades se colocaron 20µg de proteína total de los homogeneizados de dicha estructura en cada carril en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y se identificaron mediante un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal α cGH, como puede observarse en el luminograma de la figura 7.

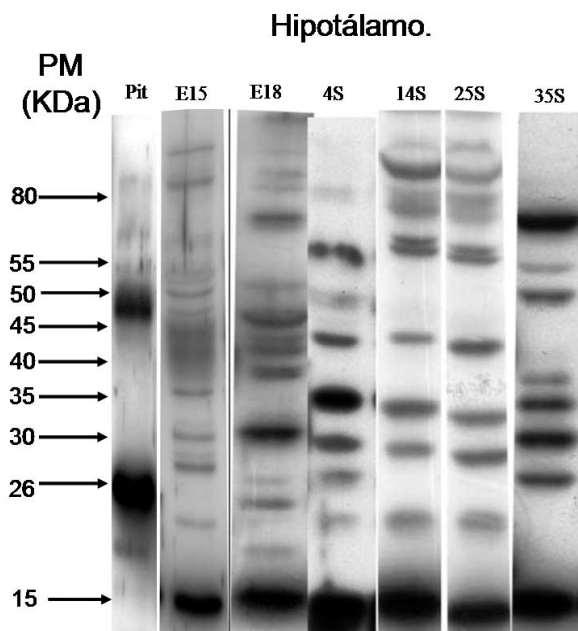


Figura 7. Luminograma de la separación por peso molecular aparente de las variantes moleculares de la hormona de crecimiento de pollo presentes en el hipotálamo de cerebro de pollos de diferentes edades obtenidas por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida bajo

condiciones reductoras. PM= pesos moleculares en kiloDaltons (kDa); Pit= Extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad post eclosión; E15= embrión de 15 días; E18= embrión de 18 días; 4S= 4 semanas de edad post eclosión; 14S= 14 semanas de edad post eclosión; 25S= 25 semanas de edad post eclosión; 35S= 35 semanas de edad post eclosión.

Cuando este luminograma se analizó por densitometría y se procesó la imagen mediante el programa Image Quant, se puede determinar la proporción relativa de cada variante molecular o isoforma de GH presente en esta área. Con estos datos se construyó la siguiente gráfica donde se compara la proporción relativa de cada banda con respecto a la edad (Figura 8).

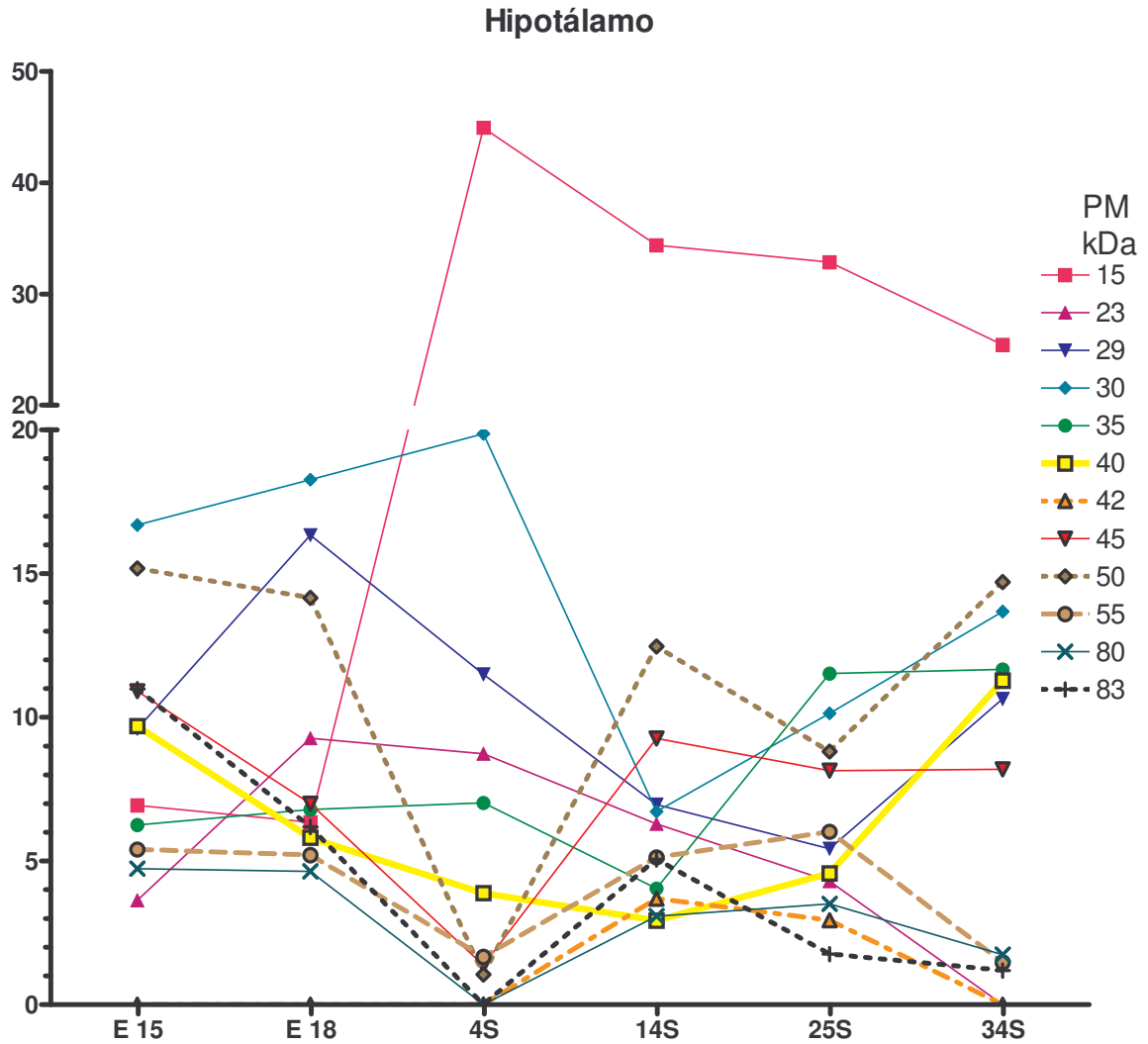


Figura 8. Análisis de la proporción relativa de las variantes moleculares obtenidas de las inmunotransferencias de hipotálamo de cerebro de pollo de diferentes edades.

Estos resultados mostraron la presencia de un patrón de bandas inmunorreactivas diferente al comparar las edades entre sí. Entre las principales bandas observadas están las de 15, 23, 29, 30, 35, 40, 42, 45, 50, 55, 80 y 83 kDa.

Se observó que la banda inmunorreactiva (IR) de peso molecular aparente (PM) de 15kDa fue la más abundante en etapas post eclosión, aunque estuvo presente desde las etapas embrionarias analizadas con una proporción relativa de aproximadamente 6.5%.

Hacia las 4S esta proporción aumentó hasta 6.5 veces alcanzando un 45% aprox. de proporción relativa, y se observó que después de esta edad disminuyó conforme aumenta la edad del animal, ya que a las 14S disminuyó un 1.3 veces a las 25S 1.4 veces y en las 34S disminuyó hasta 1.7 veces que corresponde a una proporción relativa del 25%.

En el caso de la banda con PM de 23kDa se observó que también estuvo presente en las edades analizadas aunque en una proporción relativa menor que la de 15kDa. Al los DE15 se encontró en una proporción relativa del 3.6% y aumentó 2.6 veces hacia el DE 18 quedando de 9.3%; a las 4S disminuyó ligeramente (8.7%) y siguió disminuyendo hasta desaparecer hacia las 34S.

La banda de PM de 29kDa se encontró también presente en todas las edades analizadas. Y mostró un patrón similar a el de 26 kDa ya que la mayor proporción fue en edades embrionarias (E15 al E18 aumentó 1.7 veces, 9.6% y 16.3% respectivamente) y luego disminuyó con respecto a la edad (a las 4S disminuyó 1.4 veces (11.5%) y siguió disminuyendo hasta 2.1 veces hacia las 25S (5.4%) con respecto a las 4S) Sin embargo, aumentó hasta 10.64% de proporción relativa a las 34S.

En lo que se refiere a la banda de PM de 30kDa, estuvo presente en una proporción relativa muy semejante tanto en E15, E18 y 4S (16.7%, 18.3%, 19.9% respectivamente) y bajó hasta casi 3 veces a las 14S (6.7%) con respecto a las 4S y volvió a aumentar a las 25 y 34S (10.1% y 13.7% respectivamente).

Para el caso de la banda de PM de 35kDa se encontró en una muy baja proporción relativa tanto en las etapas embrionarias (E15, 6.3%; E18, 6.8%) como en las 4 y 14S de edad post eclosión (7 y 4% respectivamente), aumentó hasta 2.9 veces hacia las 25S con respecto a las 14S y se mantuvo muy similar hacia las 34S (11.7%).

La variante de 40kDa se encontró presente en el E15 con una proporción relativa de 9.7% y disminuyó 1.1 veces hacia el E18 (5.8%), 2.5 veces hacia las 4S (3.9%) y 3.3 veces

hacia las 14S (2.9%). A las 25S aumentó a 4.6% de proporción relativa y a las 34S alcanzó un 11.3%.

Para el caso de la variante de 42kDa sólo se encontró presente a las 14 y 25S con proporciones relativas de 3.7 y 2.9% respectivamente.

Las bandas inmunorreactivas con altos PM se encontraron presentes tanto en las etapas embrionarias como en las etapas adultas del pollo pero no se observaron durante las 4S. Como en el caso de los embriones de 15 días se encontraron presentes las bandas IR de 45, 50, 55, 80, y 87 kDa con una proporción relativa de 10.9%, 15.2%, 5.4%, 4.9% y 11% respectivamente. En el día E18 se encontraron presentes estas mismas bandas IR y su proporción relativa no varió significativamente (7%, 14.2%, 5.2%, 4.6% y 7% respectivamente).

A las 4S sólo se encontraron presentes las bandas IR de 45, 50 y 55kDa pero a una proporción muy baja de 1.4%, 1% y 1.7% respectivamente.

A las 14S se encontraron presentes las siguientes bandas IR: 45kDa con 9.2%, 50kDa con 12.5%, 55kDa con 5.1%, 80kDa con 3.1% y 83kDa con 5.1%.

A las 25S y 35S se detectaron las mismas variante pero se observó una disminución en las bandas de alto PM, principalmente las de 80 y 83 kDa a (3.5%, 1.8%. y 1.7 % , 1.2 % respectivamente).

Distribución celular de la GH en el hipotálamo.

Para determinar la presencia de la GH en células del hipotálamo de cerebro de pollos de diferentes edades se procesaron preparaciones histológicas con cortes horizontales de dicho tejido, en los cuales se ubicó el tercer ventrículo para la localización de esta estructura en la base del cerebro.

En la Figura 9 se observa una vista panorámica de una imagen representativa de embrión de 18 días para mostrar la localización del hipotálamo. Además también se muestran las imágenes de células inmunorreactivas de esta estructura cerebral observadas al incubar con un anticuerpo dirigido contra la cGH a diferentes magnificaciones.

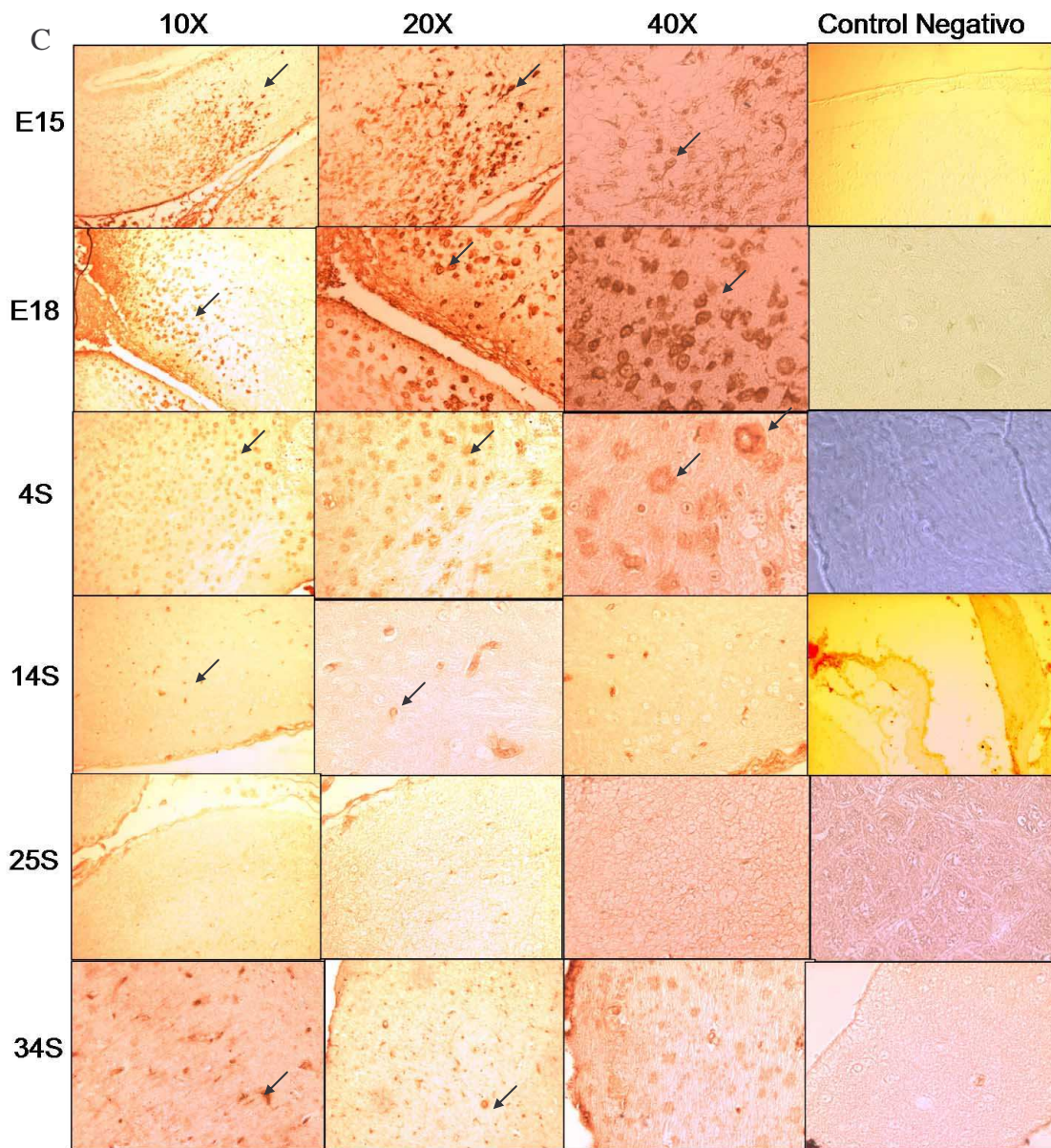
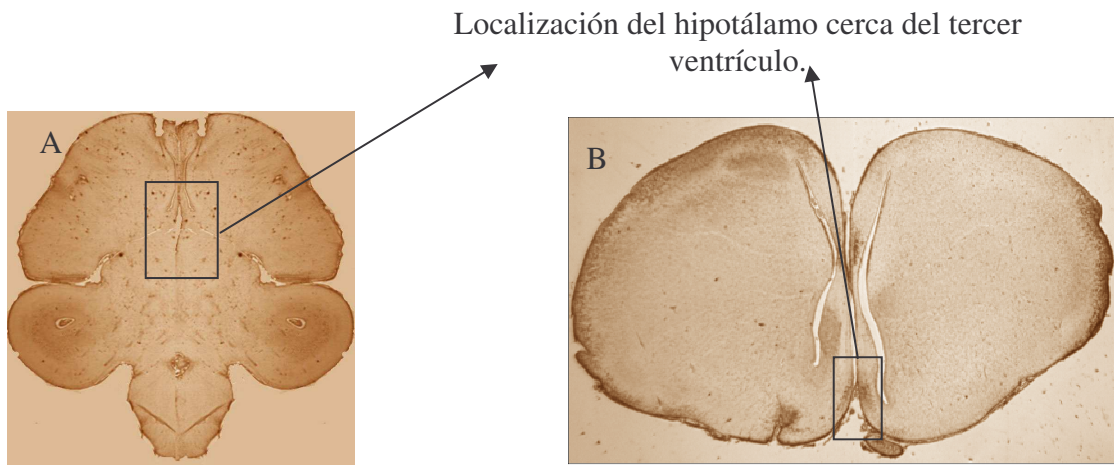


Figura 9. Localización del hipotálamo en la base del cerebro cerca del tercer ventrículo en corte horizontal (A) y coronal (B). Imágenes de células inmunorreactivas a GH de la zona del

hipotálamo que se observaron al incubar con un anticuerpo dirigido contra la hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH) a diferentes magnificaciones (C).

Como se observa en la Figura 9, se utilizaron dos tipos de orientación del tejido cerebral de pollo para realizar la ubicación de hipotálamo tanto en cortes horizontales como en cortes coronales. La marca inmunorreactiva se observa desde la etapa embrionaria (E15 y E18) y se mantiene hasta la etapa adulta, siendo mucho más intensa en la primera etapa del desarrollo (4S) en comparación con las últimas estudiadas (14S y 25 S). De la misma manera, en las primeras etapas del desarrollo del animal, esta marca inmunorreactiva a GH está mejor asociada a un tipo celular en donde es muy clara su distribución citoplasmática, a diferencia de las etapas más adultas en donde la marca se observa difusa y sin estar específicamente en alguno de los tipos celulares.

Evaluación de los tipos celulares del hipotálamo.

Con el objeto determinar alguno de los tipos celulares presentes en el hipotálamo del cerebro de pollo, se procesaron cerebros de pollos de 4 semanas de edad posteclosión con tres diferentes técnicas de tinción: Nissl, Klüver-Barrera y Golgi rápido.

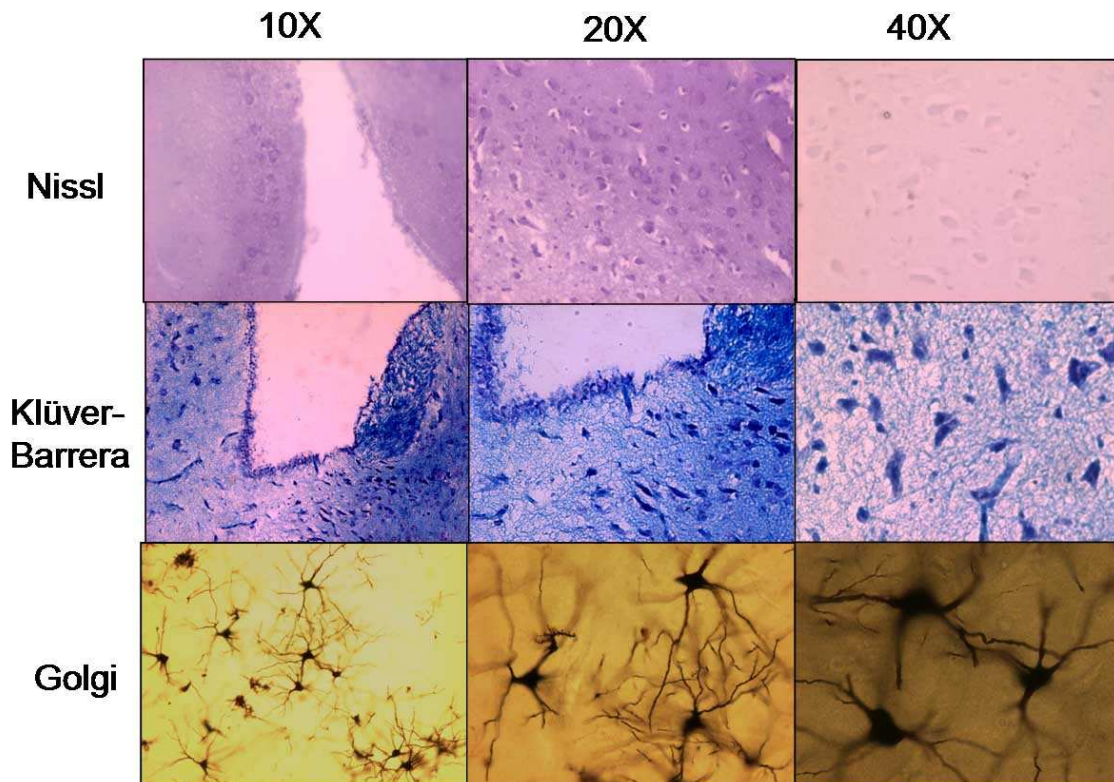


Figura 10. Tinciones de cerebro de pollo de 4 semanas de edad correspondientes a la zona del hipotálamo a diferentes magnificaciones con diferentes tinciones.

Tanto la tinción de Nissl como la de Klüver-Barrera permiten identificar cuerpos celulares y mielina por lo que solamente se identificaron algunos cuerpos celulares de neuronas que llegan a corresponder con los cuerpos celulares inmunorreactivos a GH observados en las diferentes edades analizadas para esta estructura.

Con la técnica de Golgi, los tipos de neuronas observados fueron más específicos tratándose de neuronas piramidales y células en cesta principalmente, más no fue posible hacer algún tipo de correlación con las células inmunorreactivas observadas en algunas de las edades analizadas.

HIPOCAMPO.

Concentración de cGH total.

En el caso del hipocampo, la concentración de cGH se determinó de igual manera midiendo la concentración de cGH total en homogeneizados de esta estructura en pollos de diferentes edades utilizando la técnica de ELISA (Figura 11). Las edades analizadas fueron las ya mencionadas para el hipotálamo.

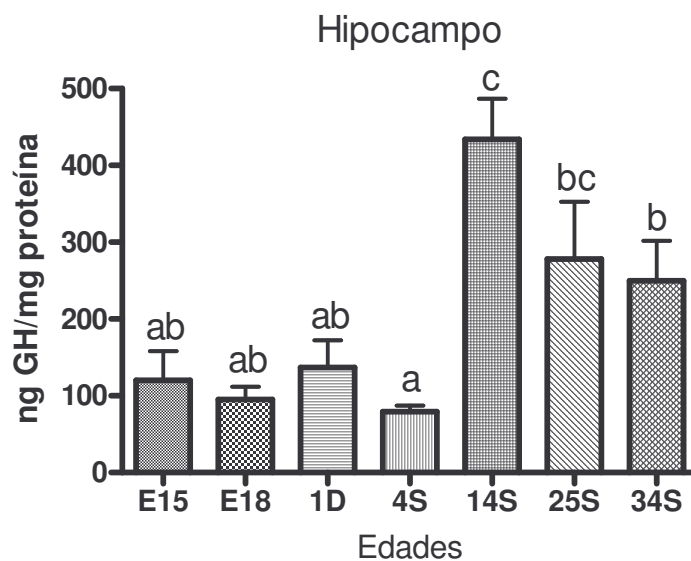


Figura 11. Contenido tisular de cGH medido por ELISA indirecto en alícuota de 60 μ g de proteínas de extractos de hipocampo de cerebro de pollos de diferentes edades. Cada barra

representa a la media \pm error estándar con $n=3$. Letras diferentes representan diferencias significativas con $P<0.05$ obtenidas por la prueba de Tuckey.

Como se observa en la Figura 11, no se encontraron diferencias significativas en la concentración medida durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y al primer día posteclosión comparadas entre ellas y con respecto a la de 4S.

A esta edad se observó una disminución aparente que tampoco fue significativamente diferente de estas etapas tempranas de desarrollo. Sin embargo, al compararla con la concentración de la GH a las 14S se observó un aumento significativo de hasta 5.5 veces, siendo, en el caso de esta estructura cerebral, la edad con una mayor concentración de ésta hormona.

Posteriormente, conforme aumenta la edad del animal se observó una disminución de la concentración de GH, no habiendo diferencias significativas entre las 14 y las 25S, pero sí con las 34S.

Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.

Para determinar un posible patrón de heterogeneidad molecular en el hipocampo de cerebro de pollos de diferentes edades se colocaron 20 μ g de proteína total de los extractos de dicha estructura en cada carril en geles de SDS-PAGE en condiciones reductoras (CR) y se identificaron mediante un Western blot utilizando como primer anticuerpo uno policlonal α cGH (C1), como puede observarse en el luminograma de la Figura 12.

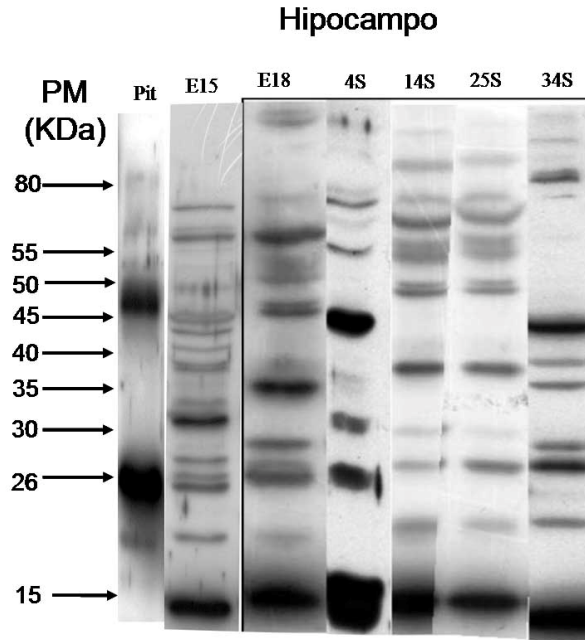


Figura 12. Luminograma de la separación de las variantes moleculares de la hormona de crecimiento de pollo presentes en el hipocampo de cerebro de pollos de diferentes edades obtenidas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. PM= pesos moleculares en kiloDaltons (kDa); Pit= Extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad post eclosión; E15= embrión de 15 días; E18= embrión de 18 días; 4S= 4 semanas de edad post eclosión; 14S= 14 semanas de edad post eclosión; 25S= 25 semanas de edad post eclosión; 34S= 34 semanas de edad post eclosión.

De igual manera, este luminograma se analizó mediante densitometría y se procesó la imagen mediante el programa Image Quant para poder determinar la proporción relativa de cada variante molecular o isoforma de GH presente en esta área. Con estos datos se construyó la siguiente gráfica donde se compara la proporción relativa de cada banda por área y con respecto a cada edad (Figura 13).

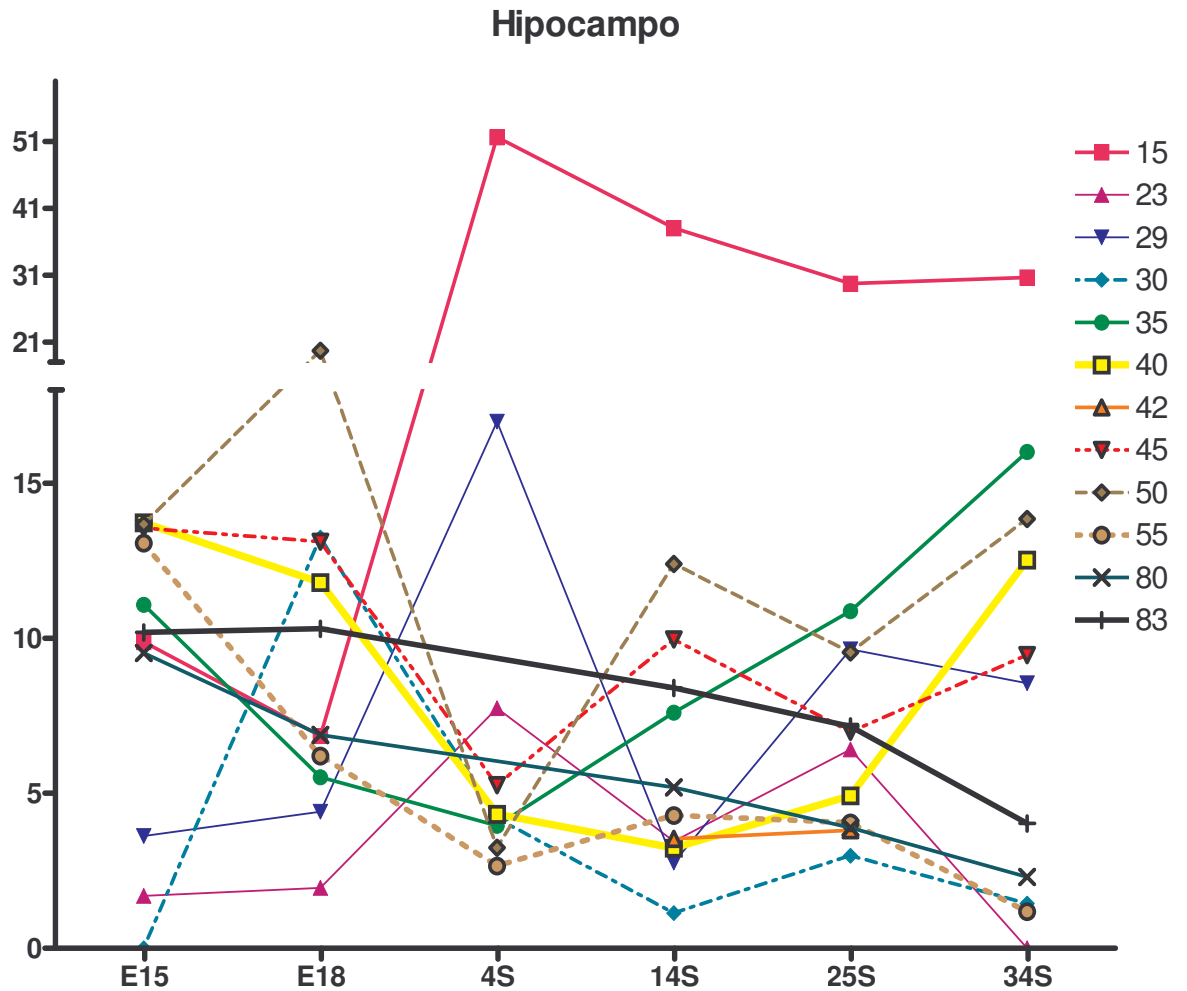


Figura 13. Análisis de la proporción relativa de las variantes moleculares obtenidas de las inmunotransferencias de hipocampo de cerebro de pollo de diferentes edades.

En el caso del hipocampo también estuvieron presentes 12 bandas inmunorreactivas de peso molecular de 15, 23, 29, 30, 35, 40, 42, 45, 50, 55, 80 y 83kDa y se observó un patrón similar al hipotálamo en edades tempranas en cuanto a las bandas de alto PM aunque en esta estructura permanecieron dichas bandas en la etapa adulta.

El fragmento de 15kDa fue la banda con una proporción relativa mayor en edades posteclosión. A las 4S se encontró el mayor pico en la proporción relativa de esta banda y fue de hasta 51.6%, y esta proporción disminuyó conforme aumenta la edad del animal, observándose un 38%, 29.7% y 30.7% a las 14S, las 25S y las 34S respectivamente. En las

edades embrionarias esta proporción fue baja en comparación con las edades post eclosión y se observó mayor al E15 (9.9%) y ligeramente menor al día E18 (6.8%).

En esta área la banda de PM de 23kDa estuvo presente en todas las edades aunque en una proporción muy baja, sobre todo en las etapas embrionarias en donde esta proporción fue menor al 2%. En etapas post-eclosión subió siendo mayor a las 4S (7.7%), y tendió a desaparecer por completo para las 34S. A las 14S se encontró en un 3.5% y a las 25S en un 6.4%.

En el caso de la banda de PM de 29 kDa también estuvo presente en todas las edades analizadas, siendo su proporción relativa muy baja en etapas embrionarias (3.6% y 4.4% en E15 y E18 respectivamente) y se observó un aumento en edades post eclosión. A las 4S se observó la mayor proporción relativa alcanzando un 17%, que bajó a las 14S (2.8%) y tuvo un ligero aumento a las 25S (9.6%) que no cambio a las 34S (8.6%).

Con respecto a la banda de 30kDa no se encontró presente al los 15 días embrionarios y aparece a los E18 con una proporción relativa de 13.2%. La presencia de esta variante en las edades post eclosión fue muy baja, siendo mayor a las 4S (4.2%) y disminuyó hasta menos del 2% en las otras edades posteclosión.

Tanto la banda de PM de 35 como la de 40kDa estuvieron presentes en todas las edades analizadas en una proporción relativamente baja. Al E15 su proporción relativa fue muy similar, siendo de 11.1% para la de 35kDa y de 13.7% para la de 40kDa. En el E18 la proporción de la banda de 35kDa correspondió aproximadamente a la mitad de la de 40kDa (5.5% y 11.8% respectivamente). Ambas variantes aumentaron con la edad, ya que a las 4S esta proporción fue alrededor del 4% para ambas isoformas y aumentaron a las 14 y 25S observando que su mayor proporción fue a las 34S de edad (16% para la de 35kDa y 12.5% para la de 40kDa).

Similar a lo que ocurrió en el hipotálamo, la banda de PM de 42kDa sólo estuvo presente a las 14 y a las 25S, con una proporción relativa baja correspondiente a 3.5% y 3.8% respectivamente.

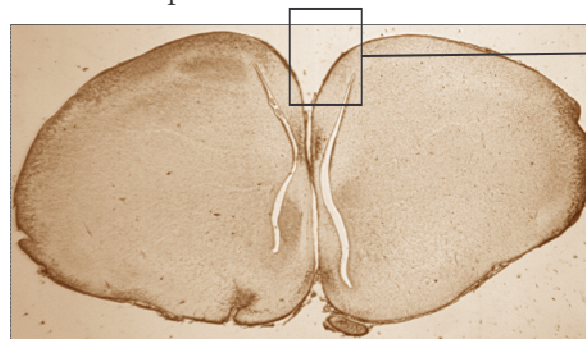
Las bandas de 45 y 50kDa estuvieron presentes en todas las edades analizadas y sus proporciones relativas fueron similares, siendo para el E15 de 13.7% para ambas variantes, y para el E18 de 11.8% y 19.7% respectivamente. En las edades post eclosión se observó un aumento con respecto a la edad, siendo la proporción relativa de ambas variantes muy

baja a las 4S (5.3% y 3.2% respectivamente) y aumentó a las 14S 1.8 veces para la de 45kDa (9.95%) y 3.9 veces para la de 50kDa (12.4%). A las 25S la proporción relativa bajó a un 7% para la de 45kDa y 9.5% para la de 50kDa y volvió a subir hacia las 34S de 9.5 y 13.8% respectivamente.

Las bandas de alto PM de 55, 80 y 83 estuvieron presentes en las etapas embrionarias, siendo un poco más alta en el E15 (13.1, 9.5 y 10.2% respectivamente) que en el E18 (6.2, 6.9 y 10.3% respectivamente). Hacia las 4S de edad post eclosión estas variantes desaparecieron, a excepción de la de 55kDa que se encontró todavía aunque en una proporción relativa muy baja (2.7%).

Distribución celular de la GH en el hipocampo.

Para determinar la presencia de la GH en células del hipocampo de cerebro de pollos de diferentes edades se utilizaron preparaciones histológicas con cortes coronales de dicho tejido, en los cuales se ubicó el segundo ventrículo para la localización de esta estructura en la base del cerebro. En la Figura 14 se observa una vista panorámica de una imagen representativa de embrión de 18 días para mostrar la localización del hipoc



Localización del hipocampo en cortes coronales, parte superior del cerebro.

Figura 14. Corte coronal del cerebro de embrión de 18 días en donde puede localizarse el hipocampo.

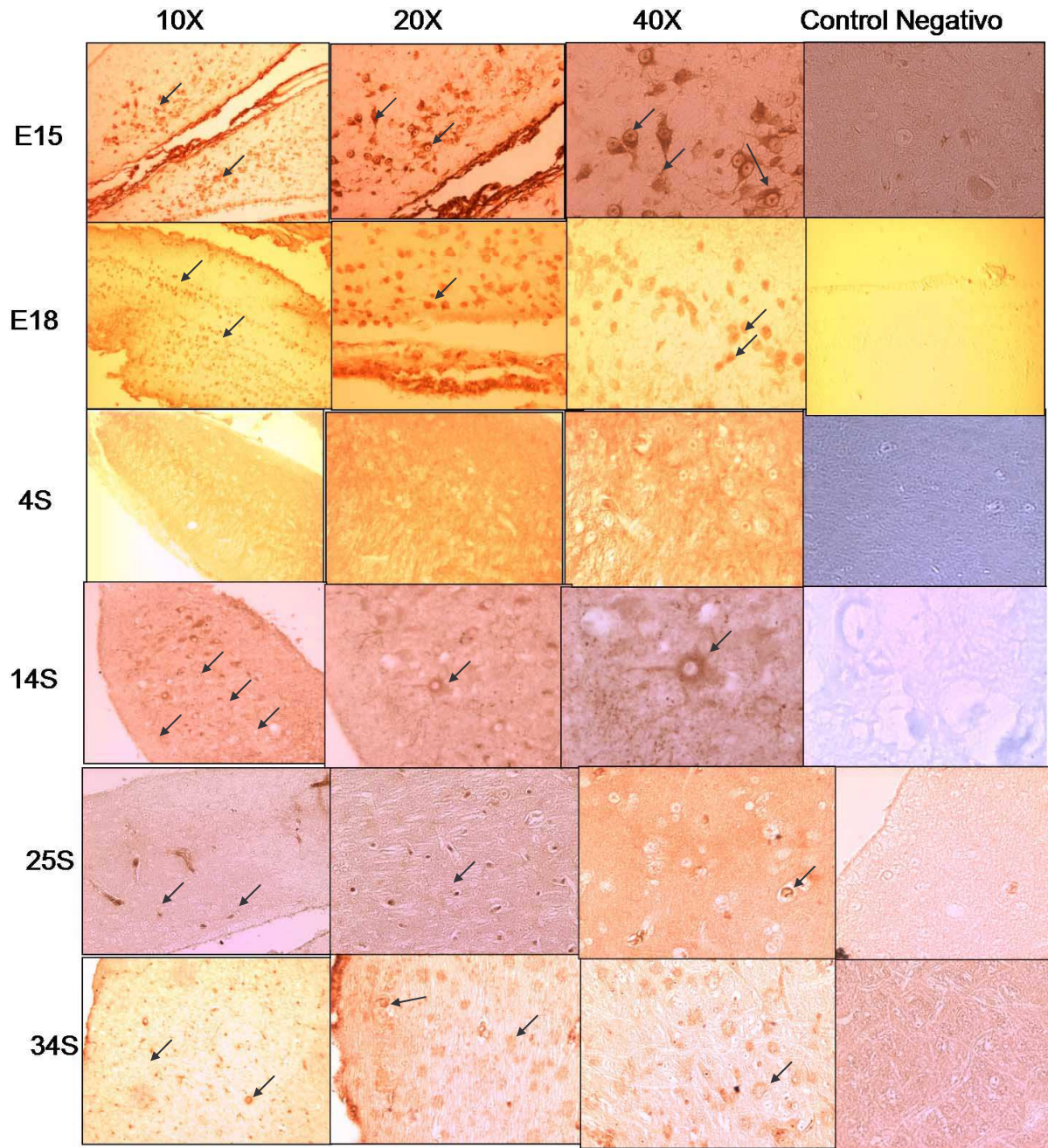


Figura 15. Imágenes de células inmunorreactivas correspondientes a la zona del hipocampo observadas después de incubar las secciones de tejido con un anticuerpo policlonal dirigido contra la hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH) a diferentes magnificaciones.

Como puede observarse en la figura 15, la marca inmunorreactiva es mucho más intensa en las etapas tempranas del desarrollo, correspondiente a los días de incubación embrionaria, y esta marca se mantiene hasta la etapa adulta del animal, más no es igual de

intensa. Esta marca puede observarse en tipos específicos de células y va haciéndose un poco más inespecífica conforme se avanza a las edades adultas del pollo. Los controles negativos no muestran algún tipo de marca, lo cual nos garantiza en parte la especificidad del anticuerpo utilizado, pues este control fue realizado preabsorbiendo el anticuerpo policlonal usado contra la rcGH con un exceso de rcGH, en una proporción de 50µg de hormona por 500µl de anticuerpo.

Evaluación de los tipos celulares del hipocampo.

Debido a que la marca inmunorreactiva estuvo presente en diversos tipos celulares (Figura 15), se procesaron cortes histológicos correspondientes a la misma zona del hipocampo con las tres técnicas de tinción utilizadas para el hipotálamo: Nissl, Klüver-Barrera y técnica de Golgi rápido como puede observarse en la figura 16.

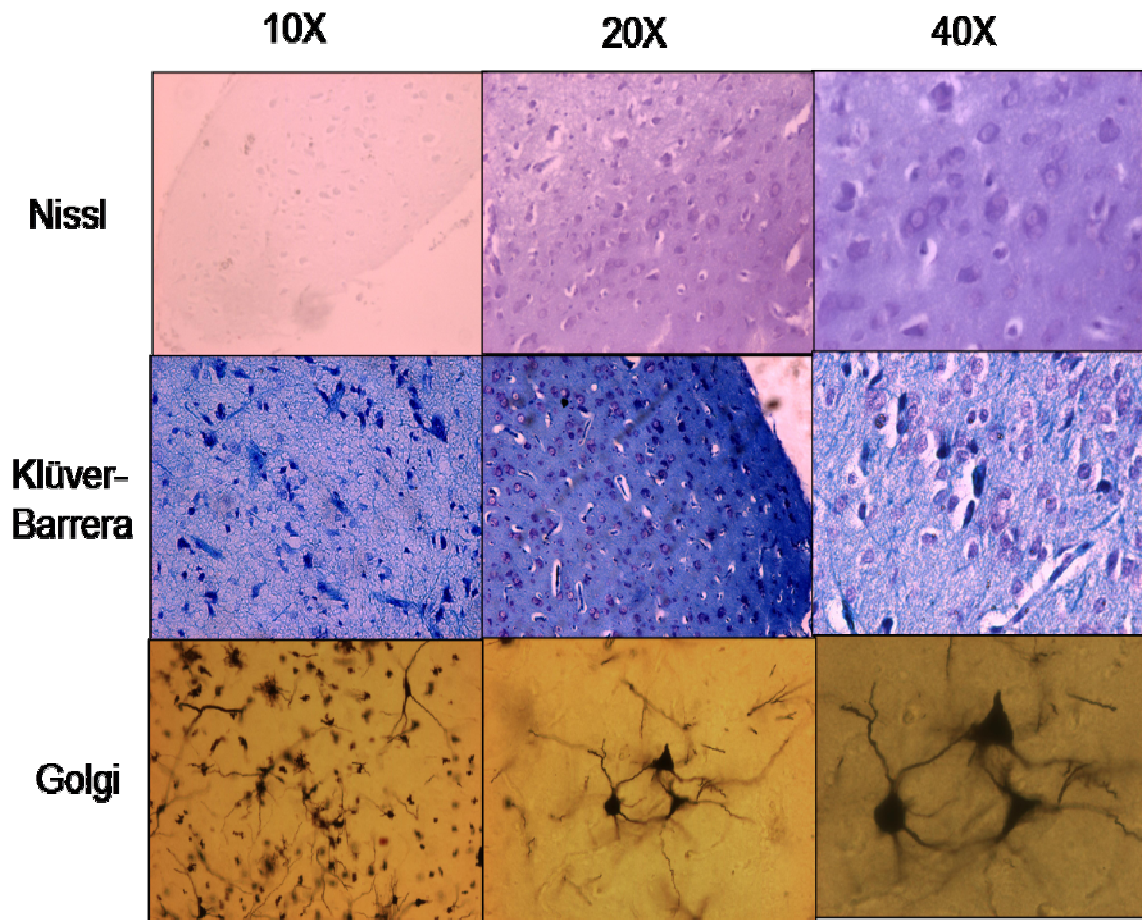


Figura 16. Imágenes de tinciones correspondientes a la zona del hipocampo de pollos de 4 semanas de edad post eclosión a diferentes magnificaciones.

De manera similar al hipotálamo, con las tinciones de Nissl y Klüver-Barrera nos permitió observar cuerpos celulares de neuronas que son comparables con los cuerpos celulares inmunorreactivos a GH observados en todas las edades analizadas para esta estructura.

La técnica de Golgi permitió conocer tipos específicos de células neuronales junto con sus prolongaciones y espinas dendríticas, observándose principalmente neuronas piramidales y células en cesta características de esta región .

CORTEZA CEREBRAL .

Concentración tisular de cGH

Una tercer estructura analizada fue la corteza cerebral de pollos de diferentes edades con el objetivo de determinar la concentración tisular de cGH en homogeneizados de esta estructura mediante la técnica de ELISA (Figura 17).

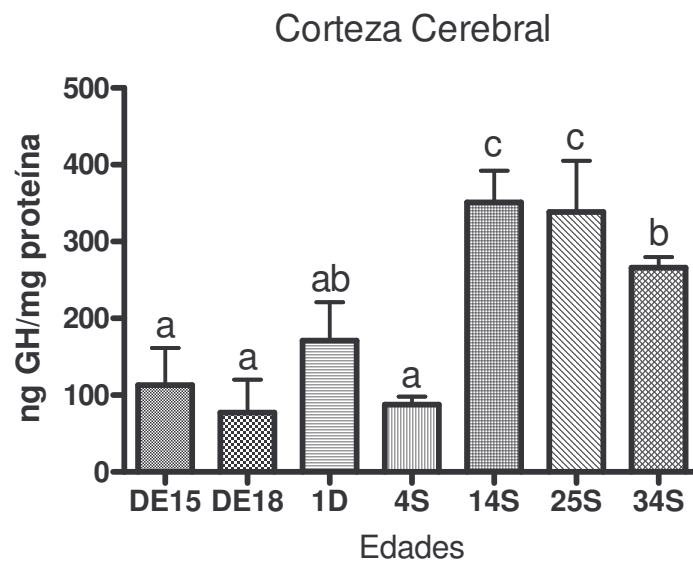


Figura 17. El contenido tisular de cGH medido por ELISA indirecto en alícuota de 60 μ g de proteínas de extractos de corteza de diferentes edades. Cada barra representa a la media \pm error

estándar con n=3. Letras diferentes representan diferencias significativas con $P<0.05$ obtenidas por la prueba de Tuckey.

Como se muestra en la figura 17, en lo que respecta a la concentración de GH en la corteza cerebral, no se encontraron diferencias significativas en las primeras etapas del desarrollo, pero vuelve a observarse una disminución aparente tanto a los 18E como a las 4S.

A las 14S ocurre un aumento de hasta 4 veces en comparación a las 4S y este aumento se mantiene hacia las 25S, siendo ambas edades las de mayor concentración en el caso de esta estructura cerebral. La concentración de cGH disminuye de manera significativa hacia las 34S, aproximadamente hasta 3 veces en comparación a las 4S y presenta diferencias significativas con la primera etapa de desarrollo a excepción de 1D posteclosión, probablemente por la desviación estándar que presentan los datos.

Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.

Para determinar un posible patrón de heterogeneidad molecular en la corteza de cerebro de pollos de diferentes edades se colocaron 20 μ g de proteína total de los homogeneizados de dicha estructura en cada carril en geles de SDS-PAGE y se identificaron mediante un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal α cGH, como puede observarse en el luminograma de la Figura 18.

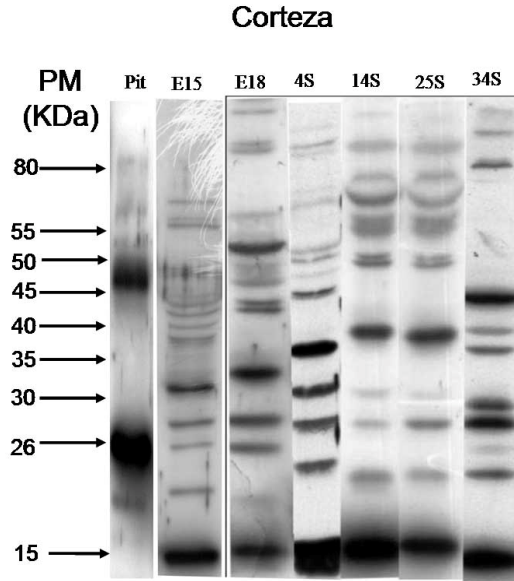


Figura 18. Luminograma de la separación por PM de las variantes moleculares de GH de pollo presente en la corteza cerebral de pollos de diferentes edades obtenidas con una SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. PM= pesos moleculares en kiloDaltons (kDa); Pit= Extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad post eclosión; E15= embrión de 15 días; E18= embrión de 18 días; 4S= 4 semanas de edad post eclosión; 14S= 14 semanas de edad post eclosión; 25S= 25 semanas de edad post eclosión; 34S= 34 semanas de edad post eclosión.

Una vez obtenido este luminograma se analizó mediante densitometría y se procesó la imagen mediante el programa Image Quant, para posteriormente determinar la proporción relativa de cada variante molecular o isoforma de GH presente en esta área. Con estos datos se construyó la siguiente gráfica donde se compara la proporción relativa de cada banda por área y con respecto a cada edad (Figura 19).

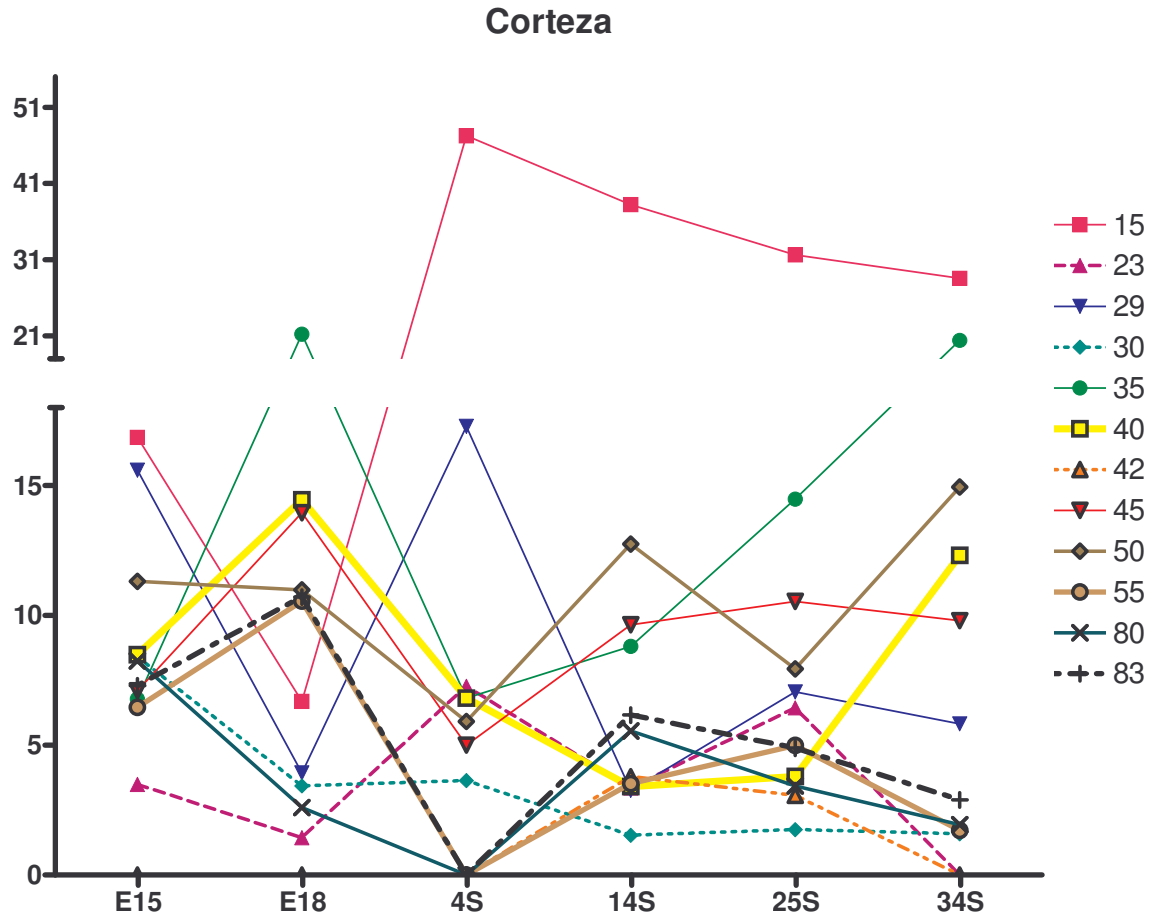


Figura 19. Análisis de la proporción relativa de las variantes moleculares obtenidas de las inmunotransferencias de homogeneizados de corteza cerebral de pollo de diferentes edades.

En el caso de la corteza cerebral la banda inmunorreactiva de PM de 15kDa fue la más abundante en las etapas post eclosión pero también estuvo presente en las edades embrionarias analizadas en las que se encontró en una proporción relativa baja (16.9% en el E15 y 6.7% en el E18). La proporción relativa en las edades post eclosión fue muy alta a las 4 S (47.3%), y disminuyó conforme aumentó la edad del animal por ejemplo a las 14S fue de 38.2%, a las 25S de 31.3% y a las 34S fue de 28.6%.

La banda de PM de 23kDa estuvo presente en todas las edades analizadas a excepción de la edad adulta del pollo (34S) y se encontró en una proporción relativa baja. En las etapas embrionarias estuvo presente sólo en un 3.5% y 1.4% en el E15 y E18

respectivamente. A las 4S estuvo presente en un 7.3%, a las 14S bajó a 3.3%, y a las 25S aumentó casi el doble (6.2%).

La banda de PM de 29kDa se observó en todas las edades analizadas, en las etapas embrionarias los niveles fueron bajos (E15 de 15.6% y a los E18 de 3.9%); mientras que a las 4S subió la proporción relativa a 17.3% y disminuyó marcadamente hacia las 14S (3.3%).

En el caso de la banda IR de 30kDa estuvo presente en todas las edades analizadas aunque con una proporción relativa muy baja desde la etapa embrionaria con una proporción del 8.4% en el E15 y conforme aumenta la edad del animal disminuye hasta el 1.6% (34S).

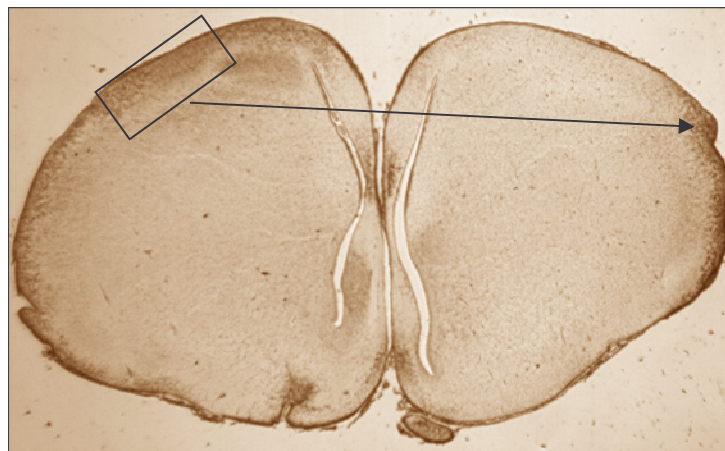
Las variantes de 35 y 40kDa vuelven a tener proporciones relativas similares a lo largo de la ontogenia. En el E15 se encontraron en una proporción relativa baja de 8.4 y 6.8% respectivamente, mientras que para el E18 aumentaron 3.1 veces (21.2% para 35kDa) y 1.7 veces (14.5% para 40kDa). A las 4S disminuyó la proporción relativa a 6.8% para ambas bandas inmunorreactivas y a las 14 y 25S la banda de 35kDa aumentó su proporción relativa a 8.8 y 14.5% mientras que para la de 40kDa disminuyó a 3.4 y 3.8% respectivamente. Ambas bandas inmunorreactivas aumentaron con la edad post eclosión del pollo quedando finalmente a las 34S en 20.4% para 35kDa y 12.3% para 40kDa.

En esta estructura cerebral se observan las bandas de alto PM de 55, 80, 83kDa con las proporciones menores en comparación con las otras variantes, se encontraron presentes en las etapas embrionarias en un porcentaje menor al 10%. A las 4S no se observó ninguna de estas bandas inmunorreactivas y reaparecieron a las 14S con proporciones relativas bajas de 3.5% para 55kDa, 5.6% para 80kDa y 6.2% para 83kDa. A las 25S se observaron las proporciones relativas de 5% para 55kDa, 3.4% para 80kDa y 4.9% para 83kDa, y estas proporciones disminuyeron hacia las 34S hasta casi desaparecer (1.7, 1.9 y 2.9% respectivamente).

Distribución celular de la GH a nivel de la corteza cerebral

Para determinar la presencia de la GH en células de la corteza cerebral de pollos de diferentes edades se procesaron preparaciones histológicas con cortes coronales de dicho tejido.

En la Figura 20 se observa una vista panorámica de una imagen representativa de embrión de 18 días para mostrar la localización de la corteza cerebral.



Localización de la corteza cerebral en cortes coronales de cerebro de pollo.

Figura 20. Corte coronal del cerebro de embrión de 18 días en donde puede localizarse la corteza cerebral.

En la figura 21 se muestran imágenes de células inmunorreactivas obtenidas después de procesar cortes histológicos con un anticuerpo policlonal (C1) dirigido contra la hormona de crecimiento recombinante de pollo rcGH.

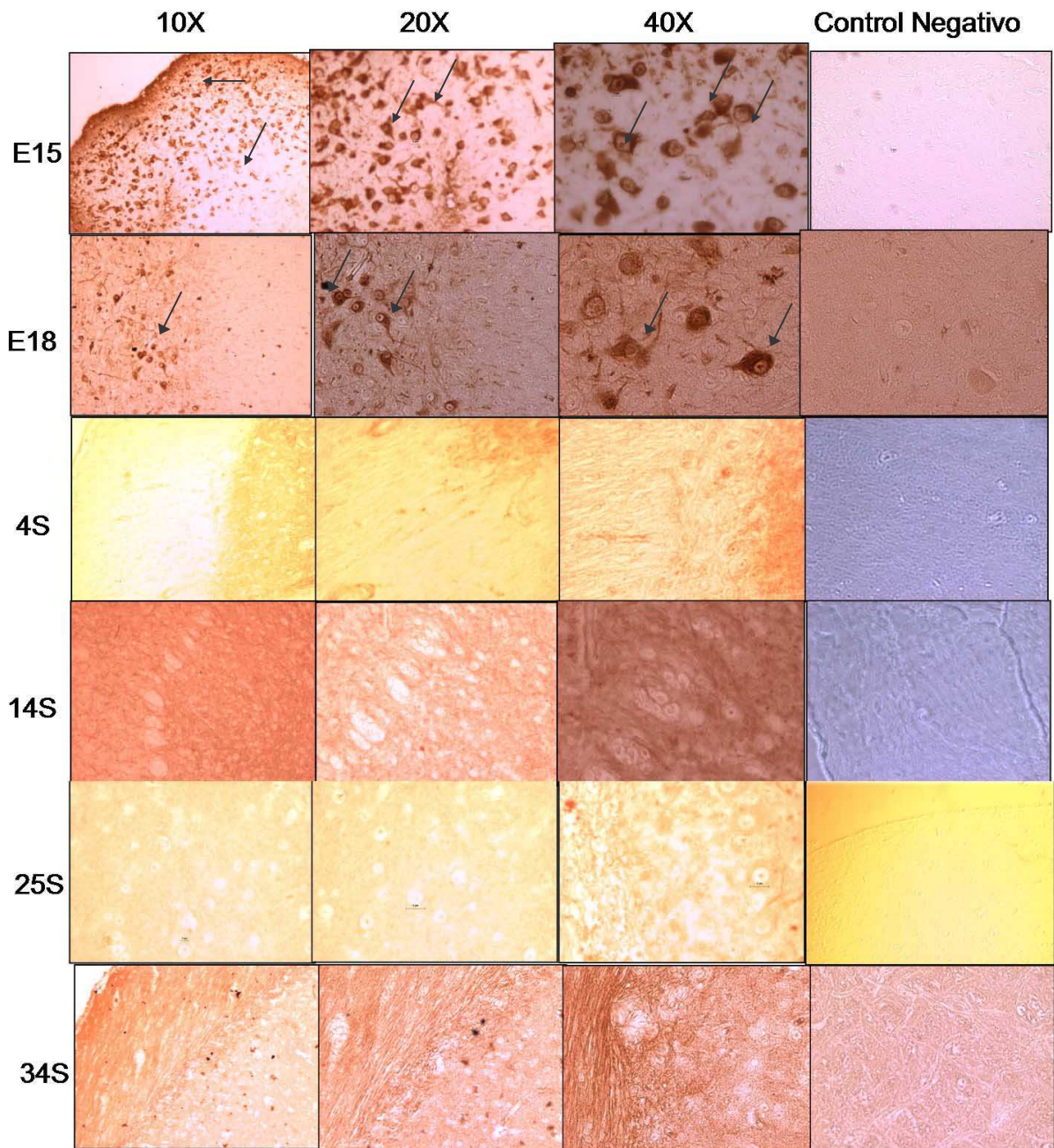


Figura 21. Imágenes de células inmunorreactivas observadas al incubar preparaciones histológicas de cortes coronales de cerebro correspondientes a la corteza con un anticuerpo policlonal dirigido contra la rcGH.

Se observan células inmunorreactivas fuertemente marcadas en las primeras etapas de desarrollo y esta marca persiste hasta las etapas adultas del pollo pero se presenta de una manera un tanto dispersa y no circunscrita a un tipo de células.

Evaluación de los tipos celulares de la corteza.

Como se observa en la figura 21, la marca inmunorreactiva estuvo presente en diversos tipos celulares, se procesaron cortes histológicos correspondientes a la zona de la corteza cerebral con las tres técnicas de tinción utilizadas para el hipotálamo: Nissl, Klüver-Barrera y técnica de Golgi rápido como puede observarse en la figura 22.

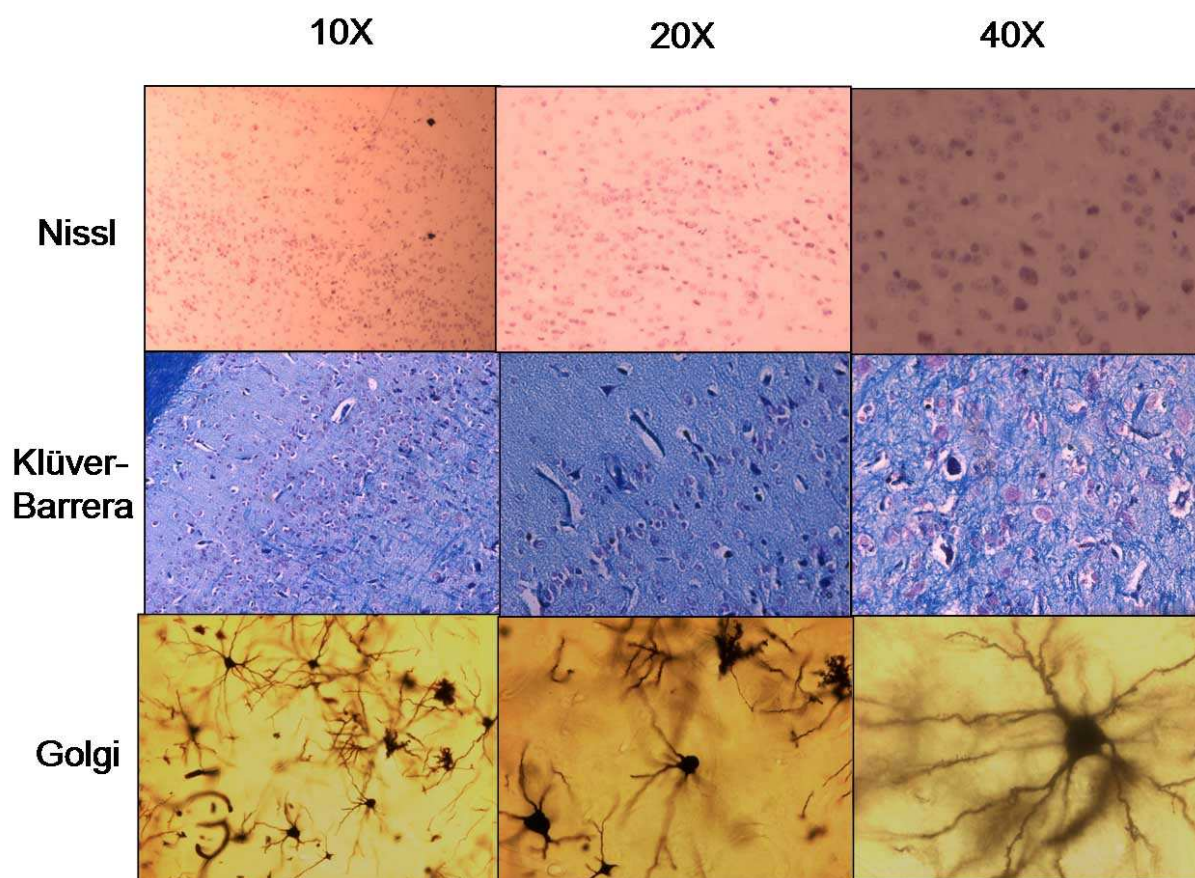


Figura 22. Imágenes de células teñidas por diferentes técnicas histológicas correspondientes a la zona de la corteza cerebral a diferentes magnificaciones de pollos de 4 semanas de edad post eclosión.

Estas técnicas permitieron observar que las características de la organización celular en pollos son muy diferentes ya que en esta especie la corteza cerebral es muy discreta.

Sin embargo, se detectaron cuerpos celulares que pueden compararse con las células inmunorreactivas observadas en esta misma estructura con el anticuerpo policlonal dirigido contra la cGH con lo que podría afirmarse que la marca se observa en cuerpos neuronales. La técnica de Golgi en específico permitió identificar neuronas con sus respectivas prolongaciones dendríticas de neuronas piramidales y células en cesta.

CEREBELO.

Contenido tisular de cGH.

El cerebelo es la estructura que fue más fácilmente separada o identificada del cerebro de pollo y en homogeneizados de la misma se cuantificó la presencia de cGH con la finalidad de determinar los cambios que ocurren con respecto a la edad utilizando la técnica de ELISA.

En la figura 23 se observa la gráfica de barras que muestra los cambios en la concentración de la GH en esta estructura cerebral.

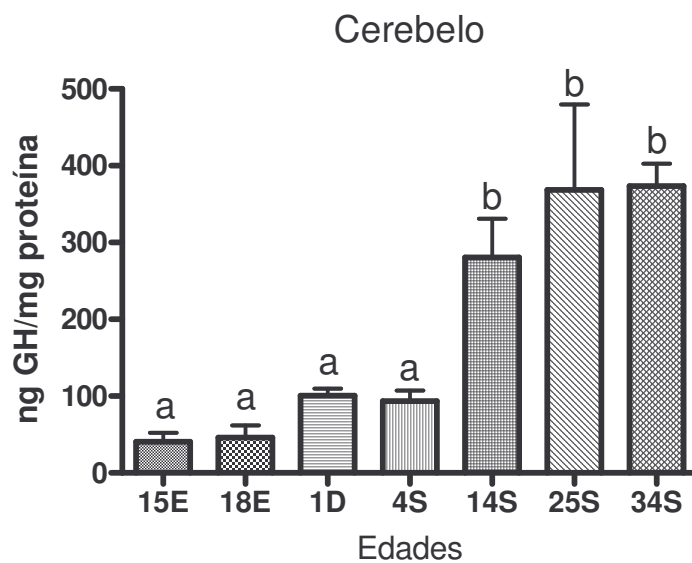


Figura 23. *Contenido tisular de cGH medido por ELISA indirecto en alícuota de 60 µg de proteínas de extractos de cerebelo de diferentes edades. Cada barra representa a la media ± error estándar con n=3. Letras diferentes representan diferencias significativas con P<0.05 obtenidas por la prueba de Tuckey.*

En este caso se observó que las concentraciones de GH fueron más bajas en las edades embrionarias y las primeras edades posteclosión y fue también menor comparada con otras áreas durante las etapas más tempranas de desarrollo. No hubo diferencias significativas entre 15E y 18E, 1D y en las 4S de edad.

La concentración de GH aumentó de manera significativa hacia las 14S aproximadamente 3 veces en comparación con las 4S y siguió aumentando hacia las 25S y 34S de edad con una proporción de hasta 4 veces al compararse con las 4S.

En edades más avanzadas del pollo, se observó un pico en la concentración de GH a las 14S en el hipocampo y en la corteza cerebral. En el caso del cerebelo y el hipotálamo el pico fue más marcado a las 25S, con respecto a las 14S y 34S.

En las cuatro regiones estudiadas se observó una distribución bimodal en la concentración de GH, siendo significativamente menor en las etapas embrionarias y durante las primeras semanas del desarrollo y mayor a partir de la pubertad.

Presencia de heterogeneidad molecular de cGH.

Para determinar un posible patrón de heterogeneidad molecular en el cerebelo de cerebro de pollos de diferentes edades se colocaron 20µg de proteína total de los homogeneizados de dicha estructura en cada carril en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y se identificaron mediante un Western blot utilizando un anticuerpo policlonal α cGH, como puede observarse en el luminograma de la figura 24.

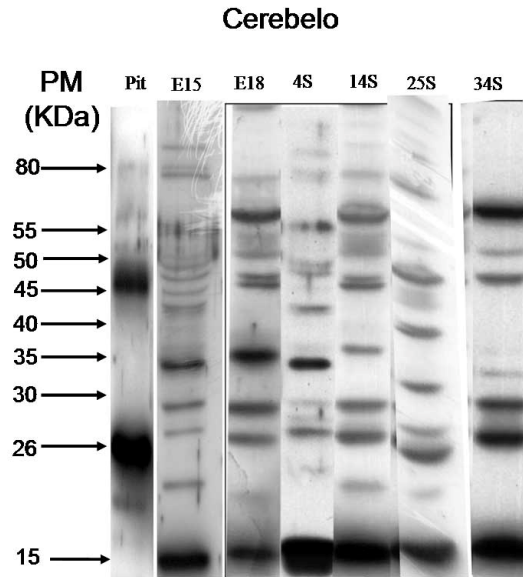


Figura 24. Luminograma de la separación por peso molecular aparente de las variantes moleculares de la hormona de crecimiento de pollo presentes en el cerebelo de cerebro de pollos de diferentes edades obtenidas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. PM= pesos moleculares en kiloDaltons (kDa); Pit= Extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad post eclosión; E15= embrión de 15 días; E18= embrión de 18 días; 4S= 4 semanas de edad post eclosión; 14S= 14 semanas de edad post eclosión; 25S= 25 semanas de edad post eclosión; 34S= 34 semanas de edad post eclosión.

Cuando este luminograma se analizó mediante densitometría y se procesó la imagen mediante el programa Image Quant, se puede determinar la proporción relativa de cada variante molecular o isoforma de GH presente en esta área. Con estos datos se construyó la siguiente gráfica donde se compara la proporción relativa de cada banda por área y con respecto a cada edad (Figura 25).

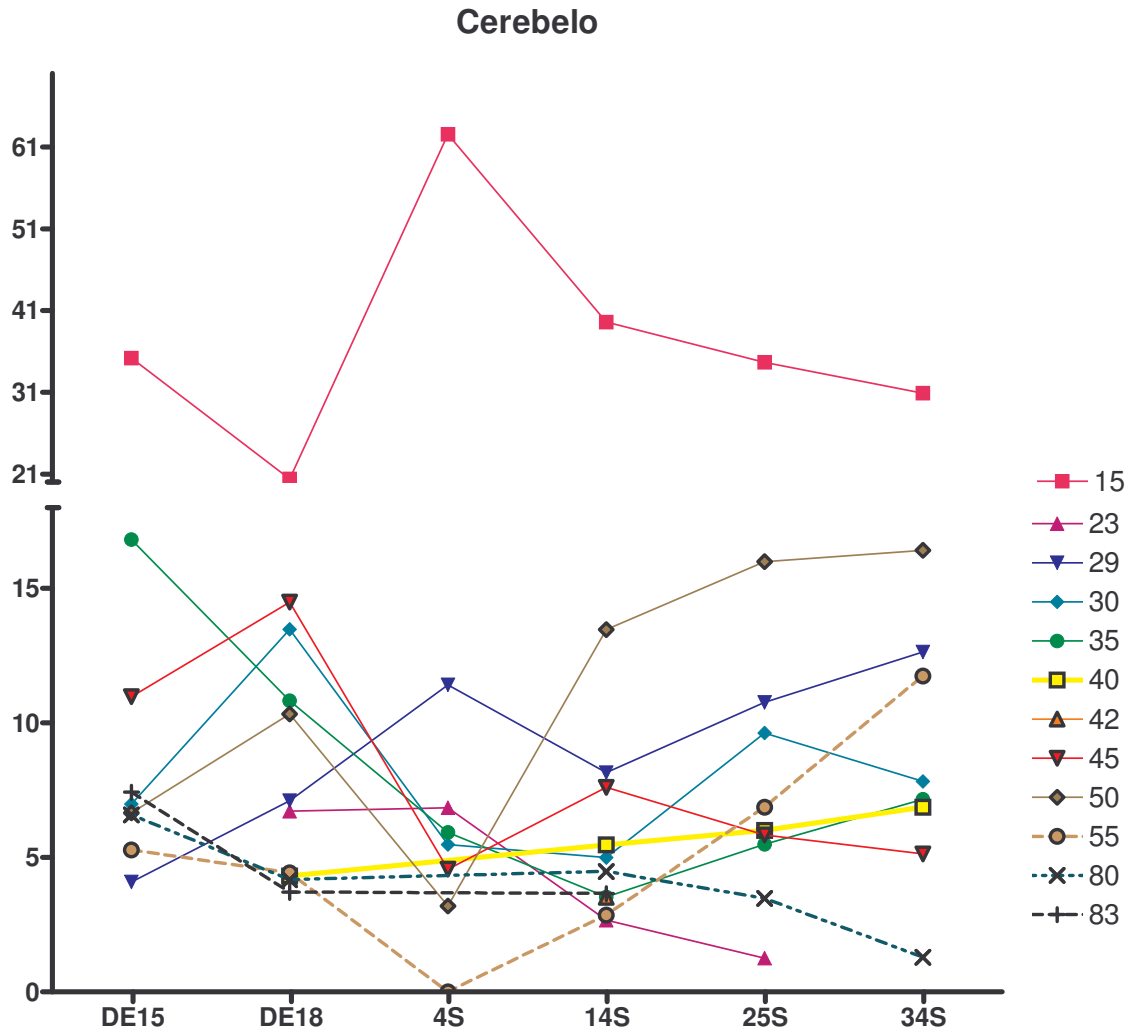


Figura 25. Análisis de la proporción relativa de las variantes moleculares obtenidas de las inmunotransferencias de hipotálamo de cerebro de pollo de diferentes edades.

Al hacer el análisis de esta estructura cerebral se observó que la banda inmunorreactiva de PM de 15kDa fue la banda mayoritaria en todas las edades analizadas, inclusive en las etapas embrionarias en las cuales fue de 35.2% y 20.4% para el E15 y de E18 respectivamente. A las 4S se observó una proporción relativa de hasta 62.6% y disminuyó conforme aumentó la edad del animal en una proporción de 1.5 hasta 2 veces a lo largo del desarrollo.

En el caso de la banda de PM de 23kDa sólo se observó en E18 y a las 25S de edad post eclosión y disminuyó conforme aumentó la edad del animal siendo indetectable a las 34S.

La variante de 29kDa estuvo presente en todas las edades analizadas, desde las etapas embrionarias en donde se observó con una proporción relativa de 4.1% para el E15 y de 7.1% para el E18. La proporción relativa aumentó 1.6 veces hacia las 4S quedando de 11.4% y disminuyó 1.4 veces hacia las 14S quedando de 8.2%. Se observó que la proporción relativa aumentó con la edad del organismo pues a las 25S fue de 10.8% y a las 3S de 12.6%.

En lo que respecta a la banda de PM de 30kDa también se encontró presente en todas las edades analizadas. En las etapas embrionarias se observó una proporción relativa de 7% en el E15 y aumentó 1.9 veces hacia el E18. A las 4S la proporción relativa disminuyó 2.5 veces y a las 14S disminuyó a un 5%. A las 25S se observó un aumento (9.6%) y se mantuvo casi constante a las 34S .

Las bandas PM de 35 y 40kDa sólo presentaron similitudes en su proporción relativa en las edades adultas del pollo, debido a que la banda de 40kDa no estuvo presente en el E15 ni a las 4S; y la proporción relativa de la banda de 35kDa en el E15 fue considerable con un valor de 16.8% y disminuyó 1.6 veces hacia el E18 quedando de 10.8%. La proporción relativa de esta banda disminuyó hacia las 4S hasta 5.9%; a las 14S las proporciones relativas fueron similares de 3.5% para 35kDa y 5.5% para 40kDa. De igual manera se observaron similitudes a las 25S (5.5% para 35kDa y 6% para 40kDa) y a las 34S (7.2% para 35kDa y 6.9% para 40kDa).

En esta estructura cerebral, la variante de 42kDa sólo estuvo presente a las 14S con una proporción relativa de 3.5%.

La banda de PM de 45kDa estuvo presente en las etapas embrionarias en una proporción relativa similar (11% y 14.5% en el E15 y E18 respectivamente), y esta proporción disminuyó 3.1 veces hacia las 4S (4.6%). A las 14S aumentó 1.6 veces quedando de 7.6%, y la proporción se mantuvo sin cambios a las otras edades.

En el caso de la banda de PM de 50kDa se observó presente en las edades embrionarias en las cuales aumentó 1.5 veces del día E15 (6.7%) al día E18 (10.3%). A las 4S disminuyó 3.2 veces (3.2%) en comparación con el E18. La proporción relativa de esta banda de 50kDa aumentó con la edad del pollo siendo de 13.5% a las 14S, 16% a las 25S y de 16.4% a las 34S.

Las bandas alto PM (55, 80 y 83kDa) ya no estuvieron presentes a las 4S, pero sí se observaron en las etapas embrionarias con proporciones relativas muy similares, siendo para en el E15 de 5.3 a 7.4%, mientras que en el E18 fueron alrededor de 4.0%.

La proporción relativa de estas tres bandas de alto PM también fue muy similar a las 14S en donde se observaron de 2.9, 4.5 y 3.7% para 55, 80 y 83kDa respectivamente. Para el caso de las 25 y 34S ya no se observó la banda de 83kDa, y la banda de 55kDa aumentó su proporción relativa con estas edades (8.9 y 11.7% respectivamente), mientras que la de 80kDa disminuyó hasta ser casi indetectable (1.3%) a las 34S.

En conjunto estos datos mostraron claramente la presencia de un patrón de heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento presente en las diferentes áreas analizadas, que éste se modifica con respecto a la edad y además que este patrón es diferente al previamente descrito en nuestro laboratorio para la hipófisis de pollo.

Evaluación la distribución celular de la GH a nivel del cerebelo.

Para determinar la presencia de la GH en células del cerebelo de pollos de diferentes edades se procesaron preparaciones histológicas con cortes transversales de dicha estructura. En la Figura 26 se observa una vista panorámica de una imagen representativa de cerebelo de pollo de 4S en una sección transversal de la estructura.



Figura 26. Corte transversal del cerebelo de pollo de 4 semanas de edad post eclosión.

Al procesar las preparaciones histológicas con los cortes de cerebelo con un anticuerpo policlonal dirigido contra la rcGH se observó la marca inmunorreactiva en todas las edades analizadas principalmente en la zona de las células de Purkinje, siendo menor en la edad embrionaria de 18 días y manteniéndose con la misma intensidad en las edades posteclosión.

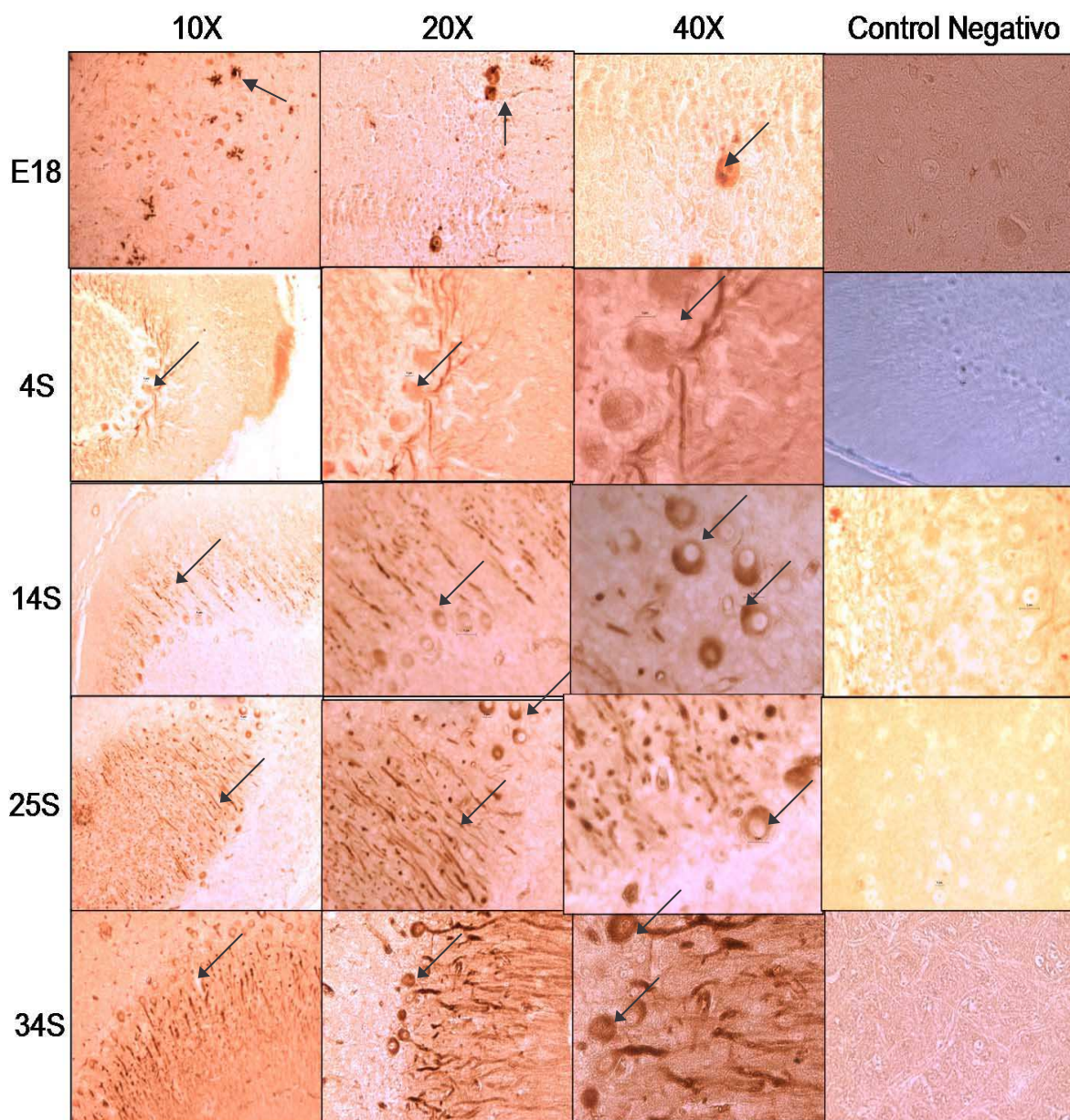


Figura 27. Imágenes de células inmunorreactivas correspondientes a la zona del cerebelo de pollos de diferentes edades observadas a diferentes magnificaciones.

Evaluación de los tipos celulares del cerebelo.

Como puede observarse en la figura 27, la marca inmunorreactiva se observa de manera específica en la zona de las células de Purkinje así como en sus prolongaciones dendríticas, lo cual pudo ser corroborado con las tres técnicas de tinción utilizadas y que se muestran en la figura 28.

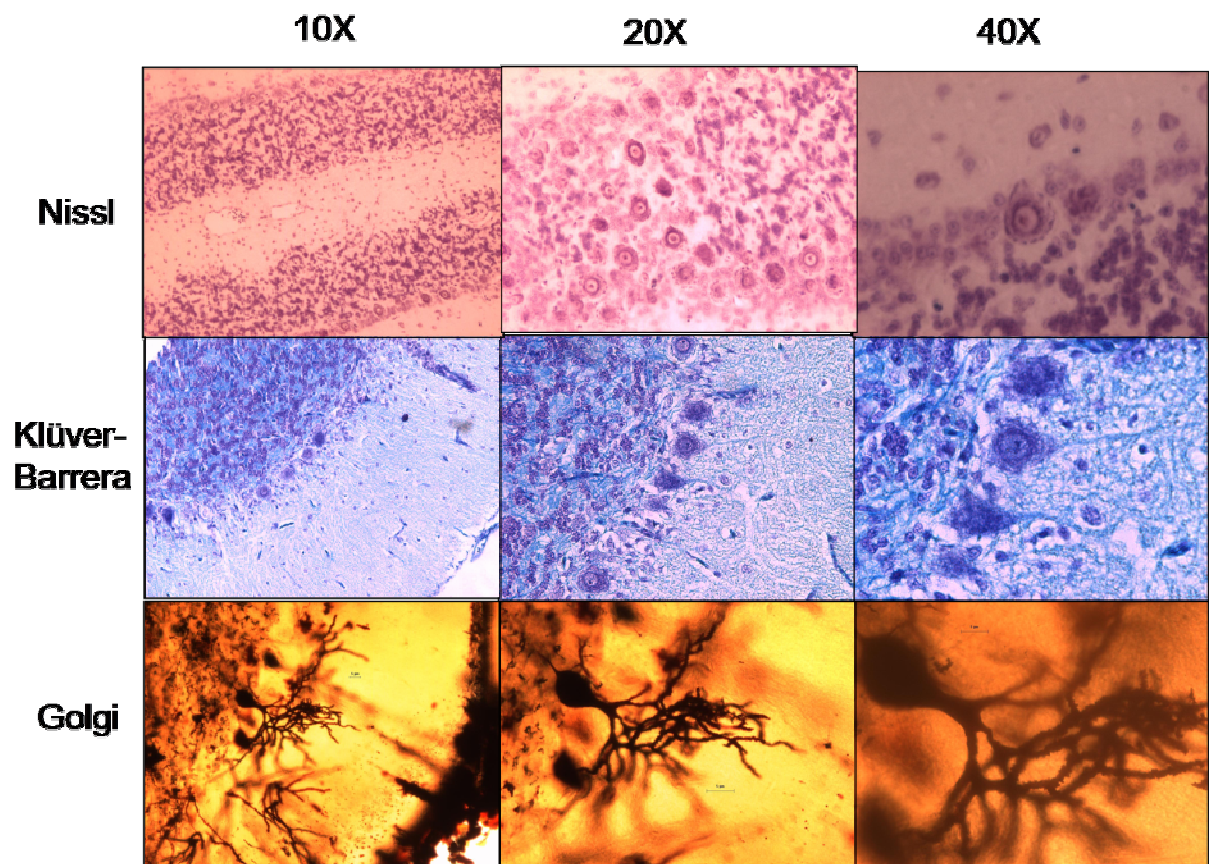


Figura 28. Imágenes representativas de tinciones de cerebelo de pollo por medio de tres diferentes técnicas que permiten diferenciar a las células de Purkinje (CP) así como las capas que conforman esta estructura cerebral (capa molecular (CM), células de Purkinje, capa granular (CG)). Se muestra la misma zona de tejido a diferentes magnificaciones.

Las tres técnicas de tinción utilizadas permitieron la identificación de las células de Purkinje así como de las tres capas que componen al cerebelo y del mismo modo

proporcionan una clara correlación con las células inmunorreactivas observadas en esta estructura.

En el caso de las 4S la correlación es tan específica que puede decirse que la marca inmunorreactiva se encuentra presente en el cuerpo celular de la célula de Purkinje así como de sus prolongaciones dendríticas, lo que puede extenderse a las demás edades ya que se observa la marca en las mismas regiones del tejido.

DISCUSIÓN.

Aunque la hipófisis es el órgano principal en donde ocurre la síntesis de GH, el sistema nervioso central es un sitio de expresión del gen de la GH tanto en ratas (Gossard y cols., 1987; Yoshizato y cols., 1998) como en pollos (Render y cols., 1995) y el cDNA de la GH que se ha analizado proveniente del tejido nervioso es idéntico al que se obtiene de la hipófisis.

La GH neural está presente a una concentración 1000 veces más baja que en la hipófisis, y se ha planteado que la hormona expresada ahí podría estar actuando a nivel autócrino y/o parácrino más que endocrino, ya que se ha determinado la presencia del ARN mensajero para el receptor de la GH en este tejido principalmente a nivel del hipotálamo y en otras áreas extrahipotalámicas (Fraser y cols., 1990; Harvey and Hull, 1997).

En este trabajo se estudiaron 4 estructuras cerebrales por separado (hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo) para evaluar la presencia de la cGH en las mismas y determinar si su concentración cambia durante el desarrollo, tomando en cuenta la previa identificación de GH en dichas estructuras por otros autores tanto en ratas (Mustafa y cols. 1995, Noteborn y cols., 1993) y primates (Lechan y cols., 1981, 1983) como en pavo y paloma (Ramesh y cols., 2000).

El hipotálamo (hpt) es una estructura cerebral que al igual que en los mamíferos, en el caso del pollo está localizada cerca del tercer ventrículo, en la base del cerebro, y se conecta con la hipófisis por medio del sistema porta hipotálamo-hipófisis y de neuronas hacia la neurohipófisis, siendo un área muy importante en la regulación neuroendócrina.

Estos animales también presentan hipocampo (hpc) y corteza cerebral (cort), en cuyo análisis celular se observaron células piramidales y en cesta principalmente, aunque no propiamente en un arreglo laminar como en el caso de los mamíferos; sólo el hipocampo presenta una citoarquitectura ordenada a diferencia de la corteza, por lo cual a esta estructura se le da ahora el nombre de pallium, por tener funciones similares a la corteza de mamíferos más no así su citoarquitectura.

El cerebelo (cer) es una estructura ampliamente conservada en estos animales y presenta las tres capas principales por las que está conformada, a saber: capa molecular, capa de células de Purkinje, y capa granular. Junto con los lóbulos ópticos, es la estructura más voluminosa de estos animales.

La diferenciación de los somatotropos ocurre a los 16 días de incubación embrionaria (Porter y cols., 1995). Esto se determinó con base en resultados sobre la secreción de GH en células secretoras en cultivos de embriones de 10, 12 y 14 días de incubación donde fue casi indetectable, mientras que a los 16 aumentó dramáticamente hasta un 7% del total de células hipofisiarias (Porter y cols., 1995). Estos resultados demuestran que los somatotropos se diferencian en gran medida alrededor de ese día.

Tomando en consideración estos antecedentes, en el desarrollo de este trabajo utilizamos embriones de 15 días para tomar un estadio correspondiente a la etapa previa de la diferenciación de los somatotropos así como de la presencia de GH circulante (día 17 embrionario, Harvey y cols., 1979). Por lo tanto, el hecho de encontrar la presencia de GH en las diferentes áreas del cerebro evaluadas en esta etapa puede ser un indicador de la expresión local de la misma en este tejido.

A grandes rasgos, en el desarrollo embrionario del cerebro del pollo para los 15 días de embrión ya se ha completado la neurogénesis y en esta etapa se observa una alta actividad sinaptogénica. Para los 18 días embrionarios la proporción de la arborización dendrítica es muy alta y después de este día las células cerebrales crecen en tamaño (Rogers L., 1995). La formación de sinapsis es completada en gran medida antes de la eclosión del pollo, más no empiezan a tomar su forma madura hasta tres semanas después de la eclosión y el proceso continúa hasta que el animal tiene 10 semanas de edad (Rogers L., 1995).

La concentración de GH se mantuvo sin diferencias significativas entre los 15 y 18 días embrionarios, así como también a un día y a las 4 semanas de edad posteclosión en todas las áreas estudiadas, siendo aproximadamente de 100ng/mg de proteína. Esto puede indicar que la GH generada en el cerebro es independiente a la producción hipofisiaria de la misma, ya que se sabe que además del aumento en el contenido de GH hipofisiaria (30µg por glándula), los niveles séricos se incrementan con respecto a la edad alcanzando su máximo a las 4 semanas (110ng/ml) (McCann-Levorse y cols., 1993; Harvey y cols., 1997).

Los resultados obtenidos en este trabajo de la concentración total de cGH en todas las áreas analizadas en edades más avanzadas del pollo muestran un pico (aprox. 350ng/mg de proteína) en la etapa prepúber y al inicio de la madurez sexual (14 y 25 semanas respectivamente) en contraste con los cambios en el contenido hipofisiario y plasmático de GH entre las 12 y 25 semanas donde los niveles disminuyen drásticamente (<20ng/ml) y continúa este efecto hacia la etapa adulta del pollo (McCann-Levorse y cols., 1993).

El aumento de la concentración de cGH total observado a las 14 y 25 semanas de edad posteclosión en las 4 estructuras cerebrales estudiadas, no muestra diferencias significativas entre estas edades. El hpt, la cort y el cer presentan concentraciones de cGH total muy similares en ambas edades, y el hpc presenta una disminución más acentuada, aunque no significativa a las 25 semanas en comparación con las 14. Estos resultados pudieran asociarse a una función de la GH neural del hpt en estas edades en las que el proceso de maduración sexual está altamente activo, y en el hpc y la cort el aumento es significativo

pudiendo relacionarse más hacia la adquisición de nuevas conductas en dicha etapa reforzando el aprendizaje y la memoria (Donahue y cols., 2006). En el cerebelo puede destacarse la participación de la hormona en la coordinación motora del organismo.

En los pollos de 34 semanas se observó en 3 (hipotálamo, hipocampo, corteza) de las 4 áreas analizadas una tendencia a disminuir (1.4 veces) en la concentración de cGH total. En cambio, en el cerebelo, dicha concentración mostró una tendencia a aumentar 1.35 veces con respecto a la edad.

Durante el desarrollo embrionario del cerebro se requieren diversos factores de crecimiento y se sabe que la GH puede ser uno de los que participe en este periodo crítico (Scheepens y cols., 2005); sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo del contenido de GH muestran niveles bajos en comparación con la concentración de cGH en edades posteriores, por lo que otra posibilidad es que estos niveles de cGH estén siendo compensados por los niveles circulantes y por la elevada producción de GH hipofisaria durante estas etapas, y que el tejido esté produciendo lo mínimo necesario para su desarrollo (McCann-Levorse y cols., 1993; Harvey y cols., 1997) ya que se ha propuesto una alta concentración de receptores a GH a nivel de los plexos coroides los cuales pudieran estar atrapando e internalizando a la hormona de la circulación para que entre directamente a las áreas cerebrales (Stern y cols., 1975, Van Houten y cols., 1980, Harvey y cols., 1993).

Nuestros datos muestran que existen diferencias en la concentración de GH con respecto a la edad, sin embargo, no es posible asociarlo aún a algún evento fisiológico específico o del desarrollo cerebral, ya que se requeriría realizar la determinación *in vivo* o *in vitro* en donde se interfiera con la expresión local de la hormona y poder determinar con mayor especificidad y control sus efectos.

En el caso de patrón de isoformas de la GH encontradas en estas estructuras cerebrales del pollo, la edad también es un factor que repercute en las proporciones relativas de las bandas inmunorreactivas. Estudios previos del laboratorio han mostrado una

heterogeneidad molecular de la GH hipofisiaria y que ésta se modifica a lo largo del desarrollo (Arámburo y cols., 2000). La proporción del fragmento de 15kDa fue mayor en etapas embrionarias y éste disminuye con la edad, caso contrario a los resultados de este trabajo en donde esta banda es la mayoritaria en las etapas posteclosión. En el caso del monómero, en estas estructuras cerebrales analizadas no se encontró la banda inmunorreactiva de 26kDa que correspondería a dicho monómero en condiciones reductoras.

En estas condiciones, el tratamiento del β -mercaptoetanol rompe la mayoría de los puentes disulfuro que conforman a la molécula de la cGH, que se sabe que contiene dos en su estructura primaria, dando lugar a la apertura o rompimiento de la molécula. En los resultados obtenidos se observó que se obtuvo una proporción relativa considerable de variantes de peso molecular elevado, que podrían corresponder a algunas formas oligoméricas o agregados de la hormona que estén unidos por enlaces covalentes diferentes a los puentes disulfuro (Aramburo y cols., 1990b). Este efecto se observó sobre todo en las etapas embrionarias y en las edades adultas del pollo, más no así a las 4 semanas de edad post eclosión.

El patrón de variantes moleculares identificadas en las etapas embrionarias del hpt, hpc y cort está dado por la presencia de proporciones relativas similares en las diferentes isoformas de GH, y a las 4 semanas se observó una banda inmunorreactiva correspondiente a 15kDa como la mayoritaria; en el cer esta banda de 15kDa es la mayoritaria desde las etapas embrionarias (35% en DE15 y 20% en DE18) y a las 4 semanas esta proporción relativa alta alcanza su máximo (62%).

Así mismo, estas estructuras (hpt, hpc, cort) presentan proporciones relativas pequeñas y similares en las variantes de alto peso molecular a las 14 y 25 semanas, la banda inmunorreactiva de 15kDa sigue siendo la mayoritaria y disminuye hacia las 25 semanas en comparación con las 4 y las 14.

A las 34 semanas, las variantes moleculares de alto peso molecular tienen una proporción relativa pequeña e incluso llegan a desaparecer, y la banda inmunorreactiva de 15kDa sigue siendo la mayoritaria aunque su proporción relativa es menor en comparación con las edades más jóvenes analizadas del pollo.

En lo que respecta al cerebelo, la principal variante molecular de GH fue la banda inmunorreactiva de 15kDa y su proporción relativa no disminuye de manera considerable (31%).

Estos resultados mostraron que la variante mayoritaria en el cerebro fue la de 15kDa, mientras que en otros tejidos extrahipofisarios (sistema inmune y aparato reproductor) la isoforma más abundante es la banda inmunorreactiva de 17kDa, lo cual sugiere diferencias en el procesamiento posttraduccional de esta hormona (Luna y cols. 2004 y 2005).

En el caso de la distribución de inmunorreactividad a la cGH en algunos tipos celulares del cerebro de pollo, se observaron diferencias dependiendo del fijador utilizado. Se probaron tres diferentes tipos de fijadores (Bouin-Hollande, solución de Carnoy y paraformaldehído al 4%) siendo la solución de Carnoy el que mejor preservó el tejido así como las variantes de GH presentes en el mismo (Murphy y cols., 2003). Sin embargo, tiene la limitante de ser un fijador precipitante que puede estar fijando sólo a algunas de las variantes moleculares de la cGH, en especial aquellas de tamaño molecular grande (Murphy y cols., 2003).

Tanto el hpt, como el hpc se observaron células inmunorreactivas altamente teñidas en las etapas embrionarias. En las edades posteclosión la marca inmunorreactiva fue mucho menos evidente conforme aumentó la edad del animal. En el caso del hipotálamo, las células fueron localizadas en la zona del hipotálamo anterior, lo cual correlaciona con datos previos publicados por Ramesh y cols. 2000 en donde ellos encontraron células inmunorreactivas a GH en hipotálamo e hipocampo del cerebro de pavo adulto. El análisis de histoquímica realizado sólo pudo confirmar el hecho de que la localización de la marca

inmunorreactiva está presente en neuronas, al observarse en cuerpos celulares que pudieron ser comparados con la tinción de Nissl y Klüver-Barrera.

En el caso del pollo se sabe que la citoarquitectura de la corteza es diferente a la de los mamíferos, sin embargo, la marca inmunorreactiva fue observada en los cuerpos celulares de neuronas en los embriones de 15 y 18 días, pudiendo ser comparadas con las tinciones arriba mencionadas. En contraste, a partir de las 4 semanas la señal inmunorreactiva fue menos evidente.

Caso contrario es el del cerebelo, en donde la señal inmunorreactiva no fue muy evidente en las edades embrionarias y a partir de las 4 semanas se observó intensa y claramente en las células de Purkinje y se mantiene hacia las 14, 25 y 34 semanas de edad. El marcaje en estas células pudo ser corroborado mediante las técnicas de histoquímica realizadas, principalmente la técnica de Golgi rápido, permitió identificar morfológicamente la presencia de la marca inmunorreactiva de las inmunohistoquímicas en las prolongaciones dendríticas y en el cuerpo celular de estas células de Purkinje. Así mismo, las tinciones de Nissl y Klüver-Barrera reafirmaron la distribución y morfología de estas células.

Las concentraciones de cGH total cuantificadas por ELISA no correlacionan con la proporción relativa de las diferentes variantes de peso molecular encontradas por SDS-PAGE-Western Blot, ya que la intensidad de las bandas inmunorreactivas es mucho mayor en comparación con las concentraciones de cGH obtenidas en las etapas embrionarias y a las 4 semanas de edad posteclosión.

Esto puede ser debido a los diferentes epítopes de la molécula que pueden ser reconocidos por los anticuerpos policlonales utilizados, y que varían de acuerdo con el estado en que se encuentre la hormona. En el caso de la determinación de cGH total en extractos de las estructuras cerebrales, la hormona se encuentra en solución y sin haber sufrido un procesamiento de reducción lo cual modifica su corrimiento en los geles, en los

que se usó el anticuerpo CAP1 el cual reconoce a las cGHs purificadas de la hipófisis de pollo (Arámburo y cols. 1990).

Por otra parte, esta característica del anticuerpo puede darnos una idea de que se están reconociendo diferentes epítopes de la hormona presentes dependiendo de su conformación estructural, lo que se refleja en que las concentraciones de cGH total son menores cuando la presencia de isoformas de alto peso molecular es alta, como sucede en las etapas embrionarias y a las 4 semanas de edad.

En el caso de las inmunohistoquímicas, se utilizó el anticuerpo C1 que fue generado contra la cGH recombinante (22kDa), por lo cual se puede suponer que la dificultad de detección de la señal inmunorreactiva en las células se debe a la baja afinidad de este anticuerpo a otras variantes moleculares de la cGH como el fragmento de 15kDa y las variantes de alto peso molecular.

A pesar de estas discrepancias nosotros observamos tanto la presencia como la distribución de la cGH en las estructuras estudiadas así como las diferencias que mostraron con respecto a la edad del organismo ya que los anticuerpos utilizados tienen una alta afinidad y especificidad, lo que se comprobó mediante la utilización de controles negativos consistentes en preabsorber los anticuerpos con un exceso de rcGH y las diluciones de los anticuerpos utilizadas en los ensayos (CAP1 1:10000; C1 1:250).

En conjunto estos resultados señalan claramente la expresión local de GH en el cerebro y una distribución diferencial de la misma en las áreas estudiadas; sin embargo, es necesario corroborar esta expresión local mediante estudios de hibridación *in situ* así como también el uso de marcadores específicos para caracterizar el tipo neuronal que localiza con la inmunoreactividad a esta hormona.

CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos podemos señalar que la cGH está presente en el hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo del cerebro de pollo y se observa que su concentración cambia con la edad disminuyendo hacia la edad adulta, a excepción del cerebelo en donde no disminuye.

La GH-IR determinada presenta un patrón de isoformas característico observándose como banda mayoritaria a una variante de masa molecular de 15kDa y este patrón también cambia con la edad, disminuyendo la concentración relativa de cada variante en edades más avanzadas, así como también aumenta la presencia de formas oligoméricas en edades adultas y en etapas embrionarias.

Mediante inmunohistoquímica pudimos determinar la presencia de células inmunopositivas. En el caso de embriones de 15 y 18 días de incubación se observaron en la zona del hipotálamo, del hipocampo y de la corteza.

En pollos de edades post eclosión las zonas inmunorreactivas a GH fueron principalmente las células presentes en el cerebelo, observándose la marca específica en células de Purkinje tanto en los somas a nivel de citoplasma como en las prolongaciones dendríticas.

Estos datos confirman tanto la presencia como una distribución diferencial de GH-IR en las diferentes áreas del cerebro analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Meguid SS., Shieh HS., Smith WW., Dayringer HE., Violand BN., Bentle LA. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**; 6434-6437.
- Ajo R., Cacicedo L., Gonzalez B., Sanchez-Franco F. (2001). Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of embryonic brain cells via MAP/ERK signaling pathways. *Program and Abstracts 83rd Annual Meeting at the Endocrine Society*. Denver, Colorado, pp 1-128.
- Allen JT., Bloor CA., Kedia RK., Knight RA., Spiteri MA. (2000). Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung. *Neuropeptides*. **34** (2); 98-107.
- Aramburo C., Sanchez R., Fenton B., Perera G., Valverde C. (1989). Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Vet Mex*. **20**; 397-405.
- Arámburo C., Carranza M., Sánchez R., Perera G. (1989). Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cgh is phosphorylated. *General and Comparative Endocrinology*. **76**; 330-339.
- Arámburo C., Donoghue D., Montiel JL., Berghman LR., Scanes CG. (1990a). Phosphorylation of growth hormone. *Life Sci.* **47**; 945-952.
- Arámburo C., Montiel JL., Perera G., Navarrete S., Sánchez R. (1990b). Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bio-activities of cGH charge variants. *Gen Comp. Endocrinol.* **80**; 59-67.
- Arámburo C., Navarrete S., Montiel JL., Sánchez R., Berghman LR. (1991). Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**; 135-146.
- Aramburo C., Montiel JL., Proudman JA., Berghman LR., Scanes CG. (1992). Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J. Mol. Endocrinol.* **8**; 183-191.
- Arámburo C., Montiel JL., Sánchez R., Perera G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J., Fenton B. (1993). La hormona del crecimiento de pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso conmemorativo de jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*, t I. México, UNAM, pp. 483-499.
- Arámburo C., Carranza M., Martínez-Coria H., Reyes M., Berúmen L., López J. Pascacio H., Huerta L., Luna M. (2000). Molecular and functional heterogeneity of growth hormone. In: *Avian endocrinology*. A. Dawson & CM Chaturvedi Eds., Delhi, India. 273-286.
- Aramburo C., Carranza M., Reyes M., Luna M., Martínez-Coria H., Berumen L., Scanes GC. (2001) Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine*. **15**; 231-240.
- Argente J., Chowen JA. (1994). Neuroendocrinology of growth hormone secretion. *Growth, Genetics and Hormones*. **10**; 1-5.

- Baldwin GS., Grego B., Heran MT., Knesel JA., Morgan FJ., Simpson RJ. (1983). Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **80**; 5276-5280.
- Baudet ML., Sanders EJ., Harvey S. (2003). Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology*. **144** (12); 5459-5468.
- Baumann G., Stolar MW., Buchanan TA. (1986). The metabolic clearance, distribution and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms. *Endocrinology*. **119**; 1497-1501.
- Baumann G. (1991). Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocr. Rev.* **12**; 424-447.
- Baumann G. (2001). Growth hormone binding protein 2001. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **14** (4); 355-75.
- Baxter JB., Clalock JE., Weigent DA. (1991) Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor-1 from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology*. **129**; 1727-1734.
- Berghman LR., Lens P., Decuyper E., Kühn ER., Vandesande F. (1987). Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**; 408-414.
- Berghman LR., Buyse J., Huybrechts LM., Darras VM., Vandesande F., Kuhn ER., Decuyper E., Scanes CG. (1994). Disappearance rate of glycosylated and non-glycosylated chicken growth hormone: influence on biological activity. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **108**; 161-169.
- Bergland RM., Page RB. (1979). Pituitary-brain vascular relations: a new paradigm. *Science*. **204** (4388); 18-24.
- Berumen LC., Aguilar M., Cárabez A., Carranza M., Luna M., Martínez Coria H., Arámburo C. (2002). Partial Characterization of glycosylated chicken growth hormone (GcGH). In: Proceedings of the 21st conference of European comparative endocrinologists. Editors Keller R., Dirksen H., Sedlmeier D. and Vaudry H. Monduzzi Editore. Bonn (Germany) August, 26-30. 2002.
- Berumen LC., Luna M., Carranza M., Martinez-Coria H., Reyes M., Carabez A., Aramburo C. (2004). Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol.* **139** (2); 113-23.
- Bewley TA., Li CH. (1970). Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. *Science*. **168**; 1361-1362.
- Bluet-Pajot MT., Epelbaum J., Gourdji D., Hammond C., Kordon C. (1998). Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18** (1); 101-123.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**; 248-254.
- Burman P., Broman JE., Hetta J., Wiklund I., Erfurth EM., Hagg E., Karlsson FA. (1995). Quality-of-life in adults with growth hormone (GH) deficiency-response to treatment with recombinant human GH in a placebo controlled 21-month trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**; 3585-3590.
- Chen HT., Pan FK., Chang WC. (1988). Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **949**; 247-251.

- Chen L., Lund PK., Burgess SB., Rudisch BE., McIlwain DL. (1997). Growth hormone, insulin-like growth factor 1 and motoneuron size. *J. Neurobiol.* **32**; 202-212.
- Coculescu M. (1999). Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **12 (2)**; 113-124. Review.
- Costa A., Zoppetti G., Benedetto C., Bertino E., Marozio L., Fabris C., Arisio R., Giraudi GF., Testori O., Ariano M. (1993). Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *J Endocrinol Invest.* **16 (8)**; 625-633.
- Creighton WM., van Dam PS., Koppeschaar HP. (2004). The role of the somatotropic system in cognition and other cerebral functions. *Semin Vasc Med.* **4 (2)**; 167-172.
- Cunningham BC., Ultsch M., De Vos AM., Mulkerrin MG., Clauser KP., Wells JA. (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule. *Science.* **254**; 821-825.
- De Vos AA., Ultsch M., Kossiakoff AA. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science.* **255**; 306-312.
- Devesa J., Lima L., Tresguerres JAF. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**; 175-183.
- Diaz MJ., Dominguez F., Haro LS., Ling N., Devesa J. (1993). A 12-Kilodalton N-Glycosylated Growth Hormone-Related Peptide Is Present in Human Pituitary Extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77 (1)**; 134-138.
- Diaz-Cintra S., Cintra L., Kemper T., Resnick O., Morgane PJ. (1981). Nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* **207 (1)**; 1-16.
- Donahue CP., Kosik KS., Shors TJ. (2006). Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. *Proc Natl Acad Sci.* **103(15)**; 6031-6036.
- Frankenne F., Rentier-Delrue F., Scippo ML., Martial J., Hennen G. (1987). Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**; 635-637.
- Goffin V., Shiverick KT., Kelly P., Martial JA. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrinology Rev.* **4**; 385-409.
- Gossard F., Dihl F., Pelletier G., Dubois PM., Morel G. (1987). *In situ* hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. *Neurosci. Lett.* **79**; 251-256.
- Gould J., Arámburo C., Capdevielle M., Scanes CG. (1995). Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci.* **8**; 587-594.
- Guyton C. Arthur. Tratado de Fisiología Medica. Octava edición, *Edit. Interamericana McGraw-Hill* (1992); pp 855-866.
- Harvey S., Davidson TF., Chadwick A. (1979). Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.* **39**; 270-273.

- Harvey S., Hull KL., Frasser RA. (1993). Growth hormone: Neurocrine and neuroendocrine perspectives. *Growth Regul.* **3**; 161-171.
- Harvey S., Johnson CD., Sanders EJ. (1995). Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J. Endocrinol.* **166**; 489-502.
- Harvey, S. & Hull, K. L. (1997). Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine*, **7(3)**: 267-279.
- Harvey S., Johnson CDM., Sharma P., Sanders JE., Hull KL. (1998). Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development?. *Comp Biochem Physiol.* **119C**; 305-315.
- Harvey S., Johnson CDM., Sanders EJ. (2001a). Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *Journal of Endocrinology.* **169**; 487-498.
- Harvey S., Lavelin L., Pines M. (2001b). Growth Hormone (GH) action in early embryogenesis: expression of a GH-response gene in sites of GH production and action. *Anat Embryol.* **204**; 503-510.
- Harvey S., Lavelin I., Pines M. (2002). Growth Hormone (GH) Action in the Brain. Neural Expression of a GH-Response Gene. *Journal of Molecular Neuroscience.* **18(1-2)**; 89-96.
- Harvey S., Hull K (2003). Neural Growth Hormone. *Journal of Molecular Neuroscience.* **20(1)**; 1-14.
- Harvey S., Baudet ML., Murphy A., Luna M., Hull KL., Aramburo C. (2004). Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* **139(2)**; 158-167.
- Hattori N., Saito T., Yagyu T., Jiang BH., Kitagawa K., Inagaki C. (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* **86(9)**; 4284-91.
- Hennen G., Frankenne F., Scippo M-L., Igout A., Closset J., Pirens G., Gomez F. (1988). Placental growth hormone. Significance relative to growth hormone and lactogen hormone. *Reprod. Nutr. Dev.* **28**; 1699-1706.
- Houston B., Goddard C. (1988). Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocrinol.* **116**; 35-41.
- Hojvat S., Baker G., Kirsteins L., Lawrence AM. (1982a). Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain Res.* **239(2)**; 543-557.
- Hojvat S., Emanuele N., Baker G., Connick E., Kirsteins L., Lawrence AM. (1982b). Growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH)-like peptides in the rodent brain: non-parallel ontogenetic development with pituitary counterparts. *Brain Res.* **256(4)**; 427-434.
- Hull KL., Harvey S. (1997). Growth hormone: an immune regulator in vertebrates. *Advances in comparative endocrinology.* Kawashima S. and Kikuyama S. Eds. Moduzzi Editore Bologna Italy. **1**; 565-572.
- Isaksson OG., Eden S., Jansson JO. (1985). Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* **47**; 483-499.
- Kansaku N., Shimada K., Saito N. (1995). Regionalized gene expression of prolactin and growth hormone in the chicken anterior pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology.* **99**; 60-68.

- Kawauchi H., Maruyama S., Yasuda A., Yamaguchi K., Shirabata K., Kubota J., Hirano T. (1986). Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**; 542-552.
- Klüver H, Barrera E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* **12**; 400.
- Latinga-Van Leeuwen IS., Oudshoorn M., Mol JA. (1999). Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific site in the absence of Pit-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **150**; 121-128.
- Lechan RM., Nestler JL., Molitch ME. (1981). Immunohistochemical identification of a novel substance with human growth hormone-like immunoreactivity in rat brain. *Endocrinology.* **109**; 1950-1962.
- Lechan RM., Molitch ME., Jackson IM. (1983). Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology.* **112 (3)**; 877-884.
- Lecomte CM., Renard A., Martial JA. (1987). A new natural hGH variant (17.5kDa) produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acids Research.* **16 (15)**; 6331-6348.
- Lewis UJ., Dunn JT., Bonewald LF., Seavey BK., Vanderlaan WP. (1978). A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *The Journal of biological chemistry.* **253**; 2679-2687.
- Lewis UJ. (1992). Growth hormone: what is it what does it do? *Trends Endocrinol. and Metab.* **3**; 117-121.
- Lewis UJ., Sinha YN., Lewis GP. (2000). Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocrine J.* **47**; 1-8.
- Li H., Bartold PM., Zhang CZ., Clarkson RW., Young WG., Waters MJ. (1998). Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation?. *Endocrinology.* **139 (9)**; 3855-3862.
- Liebhaber SA., Urbanek M., Ray J., Tuan RS., Cooke EN. (1989). Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. *J. Clin. Invest.* **83**; 1985-1991.
- Lincoln DT., El-Hifnawi E., Sinowatz F., Waters MJ. (1994). Immunohistochemical localization of growth hormone receptor binding protein in the mammalian cerebellum. *Ann. Anat.* **176**; 419-427.
- Liu J., Zheng D., Deng J., Xiao S., Liu S., Shi Y. (1997). Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. *Chin Med J (Engl).* **110 (5)**; 362-365.
- Lobie PE., Garcia-Aragon J., Lincoln DT., Barnard R., Wilcox JN., Waters MJ. (1993). Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **2**; 225-233.
- Luna M., Huerta L., Berumen L., Martinez-Coria H., Harvey S., Aramburo C. (2004). Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen Comp Endocrinol.* **137 (1)**; 37-49.

- Luna M., Barraza N., Berumen L., Carranza M., Pedernera E., Harvey S., Aramburo C. (2005). Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol.* **144** (1); 28-37.
- Masuda N., Watahiki M., Tanaka M., Yamayawa M., Shimizu K., Nagai J., Nakashima K. (1988). Molecular cloning of cDNA encoding 20kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochimica et biophysica acta.* **949**; 125-131.
- Martinez-Coria H., Lopez-Rosales LJ., Carranza M., Berumen L., Luna M., Aramburo C. (2002). Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine.* **17**(2); 91-102.
- McCann-Levorsse LM., Radecki SV., Donoghue DJ., Malamed S., Foster DN., Scanes CG. (1993). Ontogeny of pituitary growth hormone and growth hormone mRNA in the chicken. *Proc Soc Exp Biol Med.* **202**; 109-113.
- McIlwan dl., Hoke VB., Kopchick JJ., Fuler CR., Lund PK. (2004). Differential inhibition of postnatal brain, spinal cord and body growth hormone antagonist. *BMC Neuroscience.*
- Montiel JL., Berghman LR., Arámburo C. (1992). Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**; 298-306.
- Murphy AE, Peek H, Baudet ML, Harvey S. (2003). Extrapituitary GH in the chicken: underestimation of immunohistochemical staining by Carnoy's fixation. *Journal of Endocrinology.* **177**; 223-234.
- Mustafa A., Sharma HF., Olsson Y., Gordth T., Thorén P., Sjöquist P-O. (1995). Vascular permeability to growth hormone in the rat central nervous system after focal spinal cord injury. Influence of a new anti-oxidant H 290/51 and age. *Neurosci. Res.* **23**; 185-194.
- Niall HD., Hogan ML., Saber P., Rosenblum IY., Greenwood FC. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**; 866-870.
- Noteborn HP., van Balen PP., van der Gugten AA., Hart IC., Ebels I., Salemink CA. (1993). Presence of immunoreactive growth hormone and prolactin in the ovine pineal gland. *J Pineal Res.* **14** (1); 11-22.
- Nyberg F. (2000). Growth Hormone in the Brain: Characteristics of Specific Brain Targets for the Hormone and Their Functional Significance. *Frontiers in Neuroendocrinology.* **21**; 330-348.
- Pacold ST., Kirsteins L., Hojvat S., Lawrence AM. (1978). Biologically active pituitary hormones in the rat brain amygdaloid nucleus. *Science.* **199** (4330); 804-806.
- Palacios N, Sanchez-Franco F, Navaro C, Fernandez M, Cacicedo L. (2001). Growth hormone promotes oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system during development. "Program and Abstracts 83rd Annual Meeting at the Endocrine Society. Denver, Colorado, pp. 2-232.
- Palmetshofer A., Zechner D., Luger TA., Barta A. (1995). Splicing variants of the human growth hormone mRNA : detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblast. *Mol. and Cel. Endocrinol.* **113**; 225-234.

- Porter T, Couger G, Dean C, Hargis B. (1995). Ontogeny of Growth Hormone (GH)-Secreting Cells during Chicken Embryonic Development: Initial Somatotrophs Are Responsive to GH-Releasing Hormone. *Endocrinology*. **136**(5); 1850-1856.
- Radecki SV., Deaver DR., Scanes CG. (1994). Triiodothyronine reduce growth hormone secretion and pituitary growth hormone mRNA in the chicken, *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **205**; 340-346.
- Ramesh R, Kuenzel WJ, Buntin JD, Proudman JA. (2000). Identification of growth hormone and prolactin containing neurons within the avian brain. *Cell Tissue Res.* **299**; 371-383.
- Ran-Weaver M., Kawauchi H., Ono M. (1993). Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family. *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates. (MP Schreibman, CG Scanes, PK Pang, Eds), San Diego, Academic Press, Inc.,* pp 13-35.
- Ray J., Okamura H., Kelly PA., Cooke NE., Liebhaver SA. (1990). Human growth hormone-variant demonstrates a receptor binding profile distinct from that of normal pituitary growth hormone. *J. Biol. Chem.* **265**; 7939-7944.
- Rechler MM., Nissley SP. (1990). Insulin like growth factors. *Peptide Growth Factors and their receptors. Sporn MB and Roberts AB ed. Heidelberg, Springer-Verlag.* 263-367.
- Recher S., Raccurt M., Lambert A., Lobie PE., Mertani HC., Morel G. (2001). Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem.* **49** (3); 347-354.
- Render CL., Hull KL., Harvey S. (1995a). Neural expression of the pituitary GH gen. *Journal of Endocrinology.* **147**; 413-422.
- Render CL., Hull KL., Havey S. (1995b). Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine.* **3**; 729-735.
- Rogers L. (1995). The development of brain and behaviour in the chicken. *CAB International.*
- Scanes CG., Arámburo C., Campbell RM. (1990). Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I. In: *Endocrinology of Birds*, pp93-110 Eds M Wada et al. Berlin: Springer-Verlag.
- Scanes CG. and Campbell, RM. (1995). Growth hormone: Chemistry. In: growth hormone (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds). Florida, *CRC Press Inc.*, pp. 1-20.
- Scheepens A., Sirimanne ES., Breier BH., Clark RG., Gluckman PD., Williams CE. (2001). Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*, **104**; 677-687.
- Scheepens A., Modersheim TA., Gluckman PD. (2005). The role of growth hormone in neuronal development. *Hormone Research.* **64** (3); 66-72.
- Sinha YN. and Jacobsen BP. (1987). Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **145**; 1368-1375.
- Sinha YN., Klemcke HG., Maurer RR., Jacobsen BP. (1990a). Changes in the glycosilated and nonglycosilated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology.* **127** (1); 410-418.

- Sinha YN., Klemcke HG., Maurer RR., Jacobsen BP. (1990b). Ontogeny of glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in porcine pituitary during fetal life. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **194** (4); 293-300.
- Shin DH., Lee E., Kim JW., Kwon BS., Jung MK., Jee YH., Kim J., Bae S., Chang YP. (2003). Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters.* **354**; 64-68.
- Silberring J., Lyrenas S., Nyberg F. (1989). Application of high performance liquid chromatography combined with diode-array detection for analysis of proteins and peptides in human cerebrospinal fluid. *Biomed Chromatogr.* **3** (5); 203-208.
- Slominski A., Malarkey WB., Wortsman J., Asa SL., Carlson A. (2000). Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. *J. Lab. Clin. Med.* **136** (6); 476-481.
- Stern WC., Miller M., Resnick O., Morgane PJ. (1975). Distribution of 125I-labeled rat growth hormone in regional brain areas and peripheral tissue of the rat. *Am. J. Anat.* **144** (4); 503-507.
- Sturkie PD. (1986). *Avian Physiology. 4a ed. USA, Springer-Verlag.*
- Takeuchi S., Haneda M., Teshigawara K., Takahashi S. (2001). Identification of a novel GH isoform: a possible link between GH and melanocortin systems in the developing chicken eye. *Endocrinology.* **142** (12); 5158-5166.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon I. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *Proceedings of National Academic of Science USA.* **76**; 4350-4354.
- Tresguerres JAF. (1999). *Fisiología humana.* Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de Madrid, España.
- Untergasser G., Hermann M., Rumpold H., Berger P. (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *Eur. J. Endocrinol.* **139**; 424-427.
- van Houten M., Posner BI., Walsh RJ. (1980). Radioautographic identification of lactogen binding sites in rat median eminence using 125I-human growth hormone: evidence for a prolactin "short-loop" feedback site. *Exp Brain Res.* **38** (4); 455-461.
- Weigent DA., Riley JE., Galin S., Leboeuf RD, Blalock JE. (1991). Detection of GH and GHRH related mRNA in rat leukocytes by the polimerase chain reaction. *PSEBM.* **198**; 643-648.
- Wu H., Devi R., Malarkey WB. (1996). Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system a clinical Research center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* **81**;1278-1282.
- Yoshizato H., Fujikawa T., Soya H., Tanaka M., and Nakashima K. (1998). The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* **139**; 2545-2551.