



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS JURIQUILLA

**“EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE
LA APOPTOSIS EN CELULAS DE LA BOLSA DE
FABRICO DE POLLO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

BIOL. JOSE LUIS LUNA ACOSTA

T U T O R

DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

Juriquilla, Querétaro,



Universidad Nacional
Autónoma de México



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, Queretaro) durante el periodo 2005-2008. La tesis se realizó con apoyo de CONACYT (60296N y beca de maestría 200220), PAPIIT IN205406

Agradecimientos

A mis tutores: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz y Dra. Maricela Luna Muñoz

A mi comité tutorial y revisores:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco

Dra. Carmen Mejía Vázquez

Dr. Juan Riesgo Escovar

A mis compañeros de laboratorio

A mi madre: Celia Acosta Rodríguez

RESUMEN

Se ha determinado que la hormona de crecimiento (GH) tiene efectos sobre la proliferación y diferenciación de varios tejidos en el organismo. También, tiene efectos moduladores sobre el metabolismo, y efectos sobre la apoptosis, siendo capaz de inhibirla en varios modelos (cerebro de rata, células de la granulosa bovina, cardiomiocitos de rata, líneas celulares de células pancreáticas β , neutrófilos de humano, etc). Uno de los tipos celulares utilizados para estudiar el efecto antiapoptótico de la GH es el sistema inmune, en donde se ha observado que inhibe la apoptosis en la línea EL4 de linfoma, en linfocitos T de humano y en células pro B de la línea Ba/F3 de rata. En la bolsa de Fabricio de las aves, un tejido linfoide primario (sitio en donde los linfocitos B maduran), el cual está caracterizado por tener tres etapas de desarrollo posteclosión: Una fase de crecimiento, una fase estacionaria y una de involución, se ha propuesto que durante su regresión está involucrado el fenómeno de apoptosis. Para dilucidar si la hormona de crecimiento de pollo (cGH) está involucrada en la modulación de la apoptosis en la bolsa de Fabricio, cortes de bursa (1, 4 y 18 semanas de edad) fueron sometidos al ensayo de TUNEL. Los cortes de 18 semanas de edad mostraron un incremento significativo en la proporción de la apoptosis ($2.57 \pm 0.12\%$) en comparación con 1 semana ($0.64 \pm 0.057\%$) y 4 semanas ($0.04 \pm 0.002\%$). Para determinar si la GH puede actuar como un factor de supervivencia, células de bursa fueron tratadas con rcGH. Los datos muestran un incremento en la viabilidad con 0.1, 1, 10 y 100 nM ($15.7 \pm 2.6\%$, $17.8 \pm 5.1\%$, $22.07 \pm 4.6\%$ y $17.3 \pm 5.02\%$ respectivamente) en comparación con las células no tratadas con la hormona. Los mismos cultivos fueron sujetos al ensayo de caspasa 3, donde se encontró una disminución significativa de 19% en su actividad con los tratamientos de 1, 10, 100 nM en comparación con el control.

Nuestros resultados sugieren que la apoptosis está involucrada en la fase de involución de la bursa y que la hormona tiene un efecto antiapoptótico en las células de la bolsa de Fabricio.

INDICE

INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	6
HORMONA DE CRECIMIENTO	6
ESTRUCTURA DE LA HOMONA DE CRECIMIENTO.....	7
REGULACION DE LA SECRECION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO	10
SISTEMA INMUNE Y LA HORMONA DE CRECIMIENTO	11
HORMONA DE CRECIMIENTO Y APOPTOSIS	13
HORMONA DE CRECIMIENTO, SISTEMA INMUNE Y APOPTOSIS	16
BOLSA DE FABRICIO	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
MODELO EXPERIMENTAL	23
DETERMINACION DE LA PROPORCIÓN DE APOPTOSIS EN FOLÍCULOS EN LA BOLSA DE FABRICIO POR EL ENSAYO DE TUNEL	23
OBTENCIÓN, DISPERSIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS DE BURSA	25
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS	

CULTIVOS PRIMARIOS DE BOLSA DE FABRICIO.....	27
CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE LA BOLSA DE FABRICIO	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
RESULTADOS	29
PROPORCIÓN DE APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO EN LA BOLSA DE FABRICIO.....	29
ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE BOLSA DE FABRICIO	32
EFFECTO DE LA GH SOBRE LA VIABILIDAD DE CULTIVOS PRIMARIOS DE BOLSA DE FABRICIO.....	35
EFFECTO DE LA GH SOBRE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LA BOLSA DE FABRICIO.	37
DISCUSIÓN	39
PROPORCIÓN DE APOPTOSIS EN LOS FOLÍCULOS DE LA BOLSA DE FABRICIO	40
ESTANDARIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LA BOLSA DE FABRICIO.....	43
EFFECTOS DE LA GH SOBRE LA VIABILIDAD Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE LA BOLSA DE FABRICIO	45
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	46

INTRODUCCIÓN

La hormona del crecimiento (GH) es una proteína que posee alrededor de 191 aminoácidos en la mayoría de los vertebrados (3), y es sintetizada y secretada principalmente por los somatotropos del lóbulo anterior de la glándula hipófisis (4). Se ha determinado que la GH tiene efectos sobre la proliferación y diferenciación de varios tejidos en el organismo (41), además de que tiene efectos moduladores sobre el metabolismo y algunos efectos sobre la apoptosis, siendo capaz de inhibirla en varios modelos (cerebro de rata, células de la granulosa bovina, cardiomiocitos de rata, líneas celulares de células pancreáticas β , neutrófilos de humano, etc) (44, 45, 47, 48). Uno de los modelos utilizados para estudiar el efecto antiapoptótico de la GH es el sistema inmune, en donde se ha observado que inhibe la apoptosis en la línea EL4 de linfoma, en linfocitos T de humano y en células pro B de la línea Ba/F3 (65, 66). En las aves, la bolsa de Fabricio, un tejido linfoide primario, presenta durante su desarrollo varias fases: crecimiento, meseta e involución. Se ha descrito que en el proceso de involución de la bolsa de Fabricio está involucrado un proceso de apoptosis (25, 26, 27, 28, 29, 61). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la concentración y el contenido de GH en la bolsa de Fabricio tienen una correlación con el tamaño y el peso del tejido a lo largo de la ontogenia del pollo lo cual parece sugerir un papel modulador de la GH en el desarrollo de este órgano (29). En particular nos interesa analizar la fase de involución de la bolsa de Fabricio en donde se ha determinado que existe un proceso apoptótico, por lo que en este trabajo nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio.

ANTECEDENTES

HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento (GH) pertenece a una familia de proteínas con actividad hormonal que incluyen entre otras a la prolactina y al lactógeno placentario. Los genes que codifican para estas hormonas contienen 5 exones y cuatro intrones y se ha propuesto que evolucionaron por duplicación génica durante los últimos 350 millones de años a partir de un gen ancestral común. La GH es sintetizada y secretada principalmente por los somatotropos del lóbulo anterior de la glándula hipófisis (1). El clásico efecto somatotrópico que esta hormona despliega sobre sus órganos blanco, promoviendo con ello la diferenciación y proliferación celular (figura 1) (41) se lleva a cabo tanto de forma directa como indirecta, a través del papel mediador de péptidos conocidos como IGF-I e IGF II (factores de crecimiento insulinoide, del tipo I y II respectivamente) (2). Además de su efecto somatotrópico, la GH muestra otros tipos de bioactividad que regulan el metabolismo. Entre ellas se pueden mencionar las siguientes: lipolítica, diabetogénica, similar a insulina, y actividad lactogénica en humano. También inhibe la lipogénesis inducida por insulina y la lipólisis inducida por epinefrina. Se ha determinado que la amplia diversidad funcional de esta

hormona podría explicarse al menos parcialmente, por la heterogeneidad estructural asociada a esta molécula (2). En efecto, se conoce que la GH en realidad constituye una familia de proteínas similares, pero no idénticas, conocidas como variantes o isoformas de la hormona de crecimiento. Estas formas pueden generarse a partir de diversos mecanismos, por ejemplo: por la multiplicidad génica en algunos organismos (GH normal y GH variable); a través del procesamiento diferencial del ARNm de GH (que da origen a las formas 22, 20, 17.5 kDA); o bien por modificaciones postraduccionales (fosforilación, glicosilación, amidación, proteólisis limitada u oligomerización, entre otras). Se ha descrito que algunas de estas variantes pueden tener bioactividades discretas no compartidas por otros miembros de la familia (2).

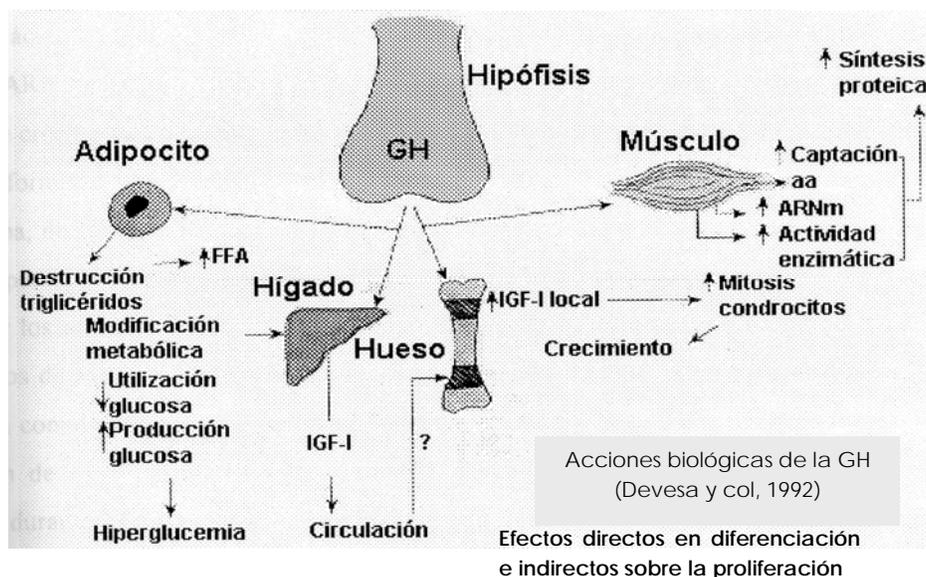


Figura 1. Esquema de algunos de los efectos de la GH sobre

ESTRUCTURA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La estructura primaria de la GH contiene alrededor de 191 aminoácidos (aunque existen variaciones en el número de residuos de especie a especie) y posee una masa molecular de aproximadamente 22 kDa. Contiene dos enlaces disulfuro y 4 α -hélices en su estructura primaria (figura 2) (3). A lo largo de la escala evolutiva de los vertebrados se observa que la GH exhibe grados significativos de identidad y similitud en la secuencia de aminoácidos, por ello, cuando la estructura cristalina de la hGH (Human Growth Hormone) fue resuelta mostró cualidades moleculares similares a las encontradas en la molécula de GH porcina que fue la primera en ser caracterizada por cristalografía de rayos X. Las hélices 1, 2, 3 y 4 están localizadas entre los residuos 9 – 34, 72 – 92, 106 – 128 y 155 – 184 en la hGH y se encuentran muy conservadas en la evolución. Generalmente los puentes disulfuro se encuentran entre los residuos de Cys₅₃ – Cys₁₆₅ y Cys₁₈₂ – Cys₁₈₉. La resolución de la estructura cristalina de la GH fue importante porque estableció la base para los

estudios estructurales de otros miembros de la familia de esta hormona. (3).

Es importante recalcar que la GH existe no solo como una proteína sino como una familia de proteínas (2). Estas variantes pueden originarse a través de multiplicidad génica como es el caso de la GH normal y GH variable donde en humanos la primera se expresa en la hipófisis y la segunda en la placenta; también existen variantes que se originan por procesamiento diferencial del ARNm, por ejemplo la GH de 20kDa la cual carece de los residuos correspondientes al segmento 32-46 (2). Por último, existen variantes que se pueden generar por modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación, rompimiento proteolítico u oligomerización entre otras. Se ha propuesto que las múltiples variantes de la hormona de crecimiento podrían explicar parcialmente los diferentes efectos y bioactividad de esta hormona (2). Un ejemplo claro de lo anterior se observa en el estudio hecho por Arámburo, Campbell y Scanes en el cual se determinó que existen diferencias en la bioactividad de dos variantes de carga de la GH ($R_f=0.22$ y $R_f=0.30$), donde la variante de 0.22 tuvo una actividad lipolítica mientras que la variante de 0.30 tuvo un efecto antilipolítico (71).

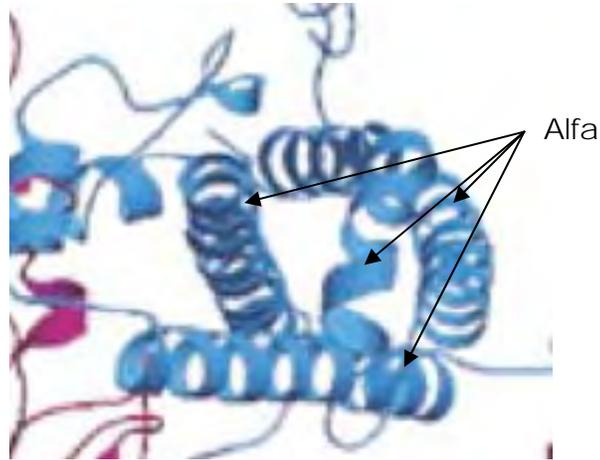


Figura 2. Estructura terciaria de la GH de humano (77)

La GH ejerce sus efectos a través de su receptor (GHR), el cual pertenece a la familia de las citocinas tipo I. El GHR consiste de dos dominios de fibronectinas tipo III β unidas por un conector flexible. Estos dominios están conectados también a un único dominio de hélice transmembranal a través de un conector flexible. El dominio intracelular está compuesto de los motivos estructurales denominados caja 1 y 2, a los cuales se une la tirosina cinasa JAK2 (Janus kinase 2), así como algunos residuos de tirosina que son sustratos para la fosforilación por JAK2. Una vez fosforilados se vuelven sitios de unión para proteínas con el dominio SH2 (figura 3) (77).

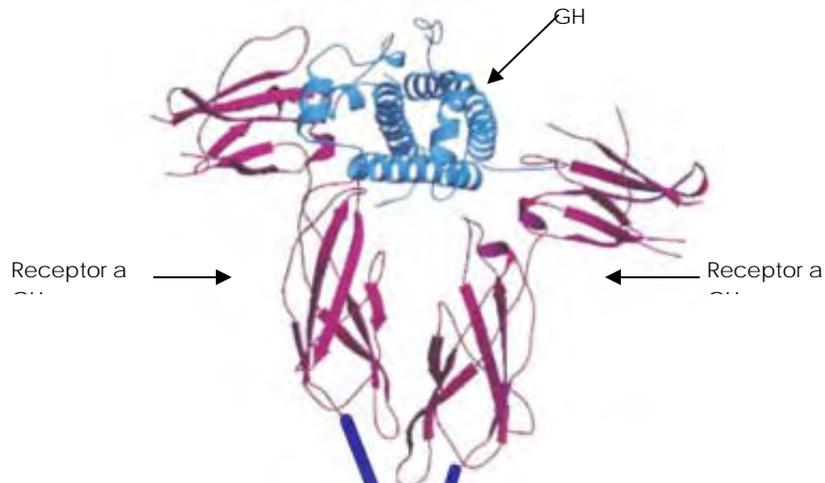


Figura 3. Estructura tridimensional de la unión de la GH a sus receptores (77)

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La secreción hipofisaria de la GH está regulada multifactorialmente por diversos mediadores y efectores, entre los que sobresalen los péptidos hipotalámicos: somatostatina (SRIF), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y en algunas especies la tiroliberina (TRH), quienes participan inhibiendo o estimulando la secreción de la hormona a partir de los somatotropos de la hipófisis anterior (4). La secreción también es regulada a través de asas que son sensibles a las concentraciones circulantes de otros compuestos importantes como las hormonas tiroideas, el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-1), la glucosa, los aminoácidos y las hormonas esteroideas entre otras (figura 4). La GH es

secretada en varios pulsos discretos a lo largo del día, siendo más abundantes durante la etapa 3 y 4 del sueño de ondas lentas (4). Durante el desarrollo de los organismos la producción mayor de GH ocurre durante la pubertad aunque la secreción persiste después de la completa maduración del sistema óseo y luego declina de manera sostenida con la edad. El patrón de secreción de GH en los adultos está caracterizado por pulsos que son cada vez menores y más pequeños en amplitud. Ello se acompaña concomitantemente con la disminución de los niveles circulantes de IGF-1. (4).

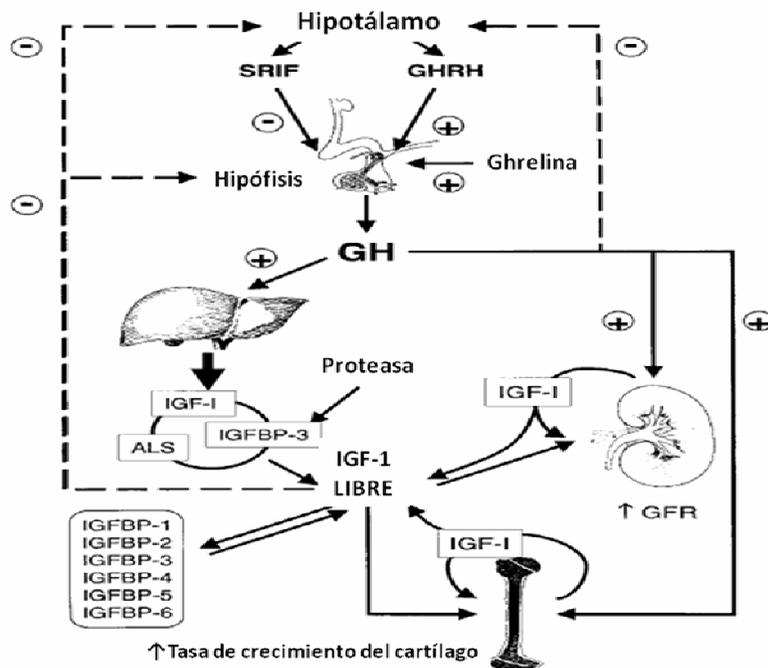


Figura 4. Principales factores que regulan la síntesis y la liberación de la GH (87)

SISTEMA INMUNE Y HORMONA DE CRECIMIENTO

Desde hace algún tiempo se conoce que la GH puede modular la actividad del sistema inmune y se ha demostrado que algunas células componentes de dicho sistema son capaces de producir GH (22). Estudios realizados 70 años atrás revelaron que la remoción quirúrgica de la glándula hipófisis resulta en atrofia tímica y aunque el papel del timo como una fuente de linfocitos T no fue apreciado en ese momento, este trabajo fue de los primeros en sugerir una asociación entre el sistema inmune y el endócrino (75). En años posteriores surgió más evidencia de la unión funcional entre el sistema inmune y el endócrino obtenida a partir de estudios que mostraban que el desarrollo y función de los linfocitos era deficiente en el modelo de ratón enano Snell. Esta línea de ratones tiene defectos en la producción de PRL (prolactina), GH, IGF-I y hormonas tiroideas debido a una mutación en el gen que codifica para pit-1, factor de transcripción que regula el desarrollo de la hipófisis y la síntesis de PRL, GH y TSH (hormona estimulante de la tiroides) en las células de la hipófisis anterior (76, 77, 78). En particular, se observó que la GH tiene diversos efectos sobre el sistema inmune. En experimentos *in vivo* en ratas y ratones, tanto infantiles como senescentes, a los cuales se les realizaron

tratamientos con GH, se obtuvo un incremento de la tasa de crecimiento y el número de células del timo, además de que revirtieron o previnieron la involución y estimularon la repoblación del tejido en animales a los que se les indujo daño tisular por radiación (75). Mas evidencia del papel de la GH como molécula inmunomoduladora viene de trabajos realizados en linfocitos B y T maduros usando modelos de roedores deficientes en GH. Por ejemplo: en ratas hipofisectomizadas y ratones enanos Snell se observó un incremento en el peso del bazo cuando se les administró GH, así como un aumento en el número de linfocitos B y T, además de un incremento en la actividad de las células NK (natural killers) al compararlas con los no tratados (75).

En experimentos *in vitro* se ha descrito la presencia de receptores a GH en tejidos hematopoyéticos de murinos, con un número más bajo de receptores en linfocitos T que en células B o macrófagos. También se ha determinado que la hormona de crecimiento estimula la proliferación de células T activadas en murinos y que dicho efecto es directo y no a través de IGF-1 (23). En timocitos humanos se comprobó que éstos son capaces de sintetizar y secretar GH e IGF-1 y que además la GH funciona como un factor de crecimiento autócrino/parácrino cuyo efecto puede ser mediado a través de la síntesis local del IGF-1 (20).

En células leucémicas humanas y en leucocitos de sujetos normales se observó la expresión de GH y de su receptor, aunque este último fue encontrado principalmente en células B y con variación significativa entre individuos (18). La GH exógena también regula directamente de manera positiva la secreción local de GH por células mononucleares de sangre periférica humana (19). Además, se demostró que GH se sintetiza independientemente de GHRH en este mismo modelo (18).

Se ha determinado que la GH tiene efectos antiapoptóticos y promueve la proliferación en células mononucleares de sangre periférica de humano cuando estas son sometidas a estrés por radiación y que los efectos antiapoptóticos son mediados por Bcl 2 (21). Estos antecedentes nos permiten destacar el papel de la GH en la modulación del sistema inmune, y en específico en los procesos de apoptosis que se llevan a cabo en este sistema.

HORMONA DE CRECIMIENTO Y APOPTOSIS

El control del desarrollo, crecimiento y eventual destrucción de los tejidos en los organismos vivos está finamente regulado por una variedad de procesos que interactúan de manera compleja a través de múltiples factores y mecanismos. Uno de ellos, que posee gran importancia es el que corresponde a la muerte celular programada. La muerte celular programada se compone de una secuencia de eventos basados en el

metabolismo que lleva finalmente a la destrucción celular (43). La apoptosis (un tipo de muerte celular programada) es el resultado de una serie de eventos que involucran varias familias de proteínas que están altamente conservadas a lo largo de la evolución. El inicio de este proceso biológico ocurre no solamente como consecuencia de daño celular o del material genético, sino que también es importante durante el desarrollo de los tejidos y para mantener la homeostasis del organismo. Algunos defectos en la regulación del programa apoptótico pueden causar la acumulación de células inmortales, mientras que su carencia puede llevar a anomalías en el desarrollo de las extremidades, enfermedades autoinmunes y neoplasia entre otras; por otro lado un exceso de células apoptóticas puede provocar por ejemplo: enfermedades neurodegenerativas, neuromusculares o de inmunodeficiencia (34).

Originalmente el término apoptosis fue definido puramente basado en aspectos morfológicos y por tanto este nombre fue aplicado a todo aquello que tuviera alguna característica estructural que indicara algún tipo de muerte celular programada. Sin embargo, conforme se han conocido mejor los mecanismos bioquímicos responsables de generar los cambios que ocurren en la morfología celular, el término apoptosis se asoció con una amplia variedad de significados. Para evitar

confusiones, de manera simplificada se ha propuesto que la apoptosis se defina como la muerte celular programada mediada por las enzimas llamadas caspasas y que muestre las siguientes características morfológicas: condensación nuclear y citoplasmática, rompimiento de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y mantenimiento de una membrana plasmática intacta (43). Específicamente, la definición molecular de la apoptosis puede estar basada sobre la actividad proteolítica de las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 en vertebrados. En cultivos de células de vertebrados, la apoptosis puede ser inducida por una gran variedad de señales proapoptóticas y estrés celular, incluyendo el retiro de factores de supervivencia [Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento epidermal (EGF), PRL, GH, IGF-1], y puede ser prevenida suplementando al medio con suero o algunos de los factores presentes en el mismo (IGF-I, GH, PRL, VEGF) (43). Las citocinas constituyen uno de los grupos de factores de supervivencia celular mejor caracterizados. Se ha planteado que la GH pueda actuar como una citosina (7). Existen evidencias de que la GH puede tener efectos sobre la supervivencia celular tanto *in vivo* como *in vitro*. En un trabajo realizado en cerebros de ratas macho adultas, en donde los animales fueron tratados con GH, GHRP-6 (péptido liberador de la hormona de crecimiento) o solución salina como control, a través de una cánula colocada en la vena yugular, se

determinaron los niveles de fosforilación de BAD mediante Western blot, los niveles de ARNm de IGF-1 mediante RT-PCR, y el nivel de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL en cortes histológicos. Se demostró que tanto el tratamiento con GH como GHRP-6 estimularon la expresión de IGF-1 local por una parte, e inhibieron la apoptosis en el tejido. Se propuso que uno de los mecanismos responsables de ese efecto fue a través de la vía de fosfatidil inositol 3'-OH cinasa/serina treonina cinasa (PI3K/Akt) y la inactivación de BAD de manera directa o indirecta, a través de IGF-I (44). Por otra parte también se determinó, en cultivos primarios de células de la granulosa de bovinos tratadas con GH (0-10µg/ml), en presencia o ausencia de inhibidores de PKA (proteína cinasa A), a través del ensayo de TUNEL que la GH es capaz de inhibir la apoptosis y que la vía que media este efecto es a través del sistema de PKA/AMPC, ya que en presencia del inhibidor el efecto de GH sobre la apoptosis fue anulado. (45).

Otro modelo usado para evaluar el efecto antiapoptótico de la GH corresponde a los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatal (células PC) y la línea celular de cardiomiocitos HL-1. En cultivos de células PC tratadas con 1µg/µl de GH en medio sin suero se determinó, a través de la tinción de Hoechst y analizadas en microscopio de fluorescencia que presentaron un número de células apoptóticas menor que los cultivos en el grupo control. Los mismos hallazgos se corroboraron usando el

análisis de fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa. Además, se observó por citometría de flujo a través del ensayo de TUNEL, que la GH también tuvo un efecto antiapoptótico sobre los cultivos de las células HL-1(47). En otro estudio, usando las líneas celulares del sistema inmune INS-1 e INS-1E de células β pancreáticas productoras de insulina, se describió un efecto antiapoptótico de GH que es mediado a través de la vía JAK/STAT. Para evaluar el efecto de la GH se realizaron cultivos de líneas celulares pancreáticas tratadas con diversas citocinas [Interleucina 1- β (IL-1- β), Interferon- γ (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)], para inducir apoptosis, e incubados en presencia o ausencia de GH (500 ng/ml). Para determinar si el efecto antiapoptótico de GH estaba mediado por la vía JAK/STAT las células fueron transfectadas con la mutante dominante negativa de STAT5, o solo con el vector como control. Los resultados obtenidos por citometría de flujo a través del ensayo de Anexina V y la incorporación de yoduro de propidio (PI) como un marcador determinante de apoptosis tardía, indican que la GH tiene mayor efecto antiapoptótico sobre las células que tenían el tratamiento combinado de las citocinas (48). Estos datos nos indican que la GH tiene efectos antiapoptóticos en diversos tipos celulares, incluyendo al sistema inmune, al cual nos avocaremos en el siguiente apartado.

HORMONA DE CRECIMIENTO, SISTEMA INMUNE Y APOPTOSIS

Además de los efectos ampliamente descritos de la GH sobre el sistema inmune como un factor de proliferación, de activación y diferenciación, esta hormona es capaz de ejercer efectos antiapoptóticos en dicho sistema y algunas evidencias que apoyan esta aseveración se mencionan a continuación.

Se evaluó el efecto antiapoptótico de la GH en cultivos celulares de neutrófilos, monocitos y linfocitos de sangre periférica de humano a través del análisis de fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa y citometría de flujo, y se observó que en los cultivos tratados por 12 horas con concentraciones de 100 ng/ml de GH se inhibió la apoptosis en neutrófilos (48). También, en la línea celular EL4 de linfoma de células T a las cuales se les hizo sobre-expresar GH, y tratadas con metilmetanosulfonato (MMS) para inducir apoptosis, se les evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa para determinar fragmentación de ADN, así como con micro-arreglos para determinar la expresión de bax, BAD y las caspasas 3, 8, y 9. Los resultados indicaron que las células que sobreproducían GH mostraron una importante reducción en la fragmentación del ADN, un indicativo del efecto inhibitorio sobre la apoptosis, y también se observó que la GH inhibió la expresión de BAD, Bax y caspasas 3, 8 y 9 (62). En otra línea celular de precursores de linfocitos B (Ba/F3) que normalmente no expresan el receptor a GH, se demostró a través del análisis del contenido de ADN por incorporación de yoduro de propidio cuantificado por

citometría de flujo, que las células transfectadas que expresaban el receptor funcional a GH en presencia o ausencia de tratamientos de hormona de crecimiento bovina (bGH) (1 µg/ml) presentaban una disminución en la proporción de células en apoptosis de hasta un 73%. Esto sugiere que el efecto de la GH no solo es endócrino sino también parácrino y/o autócrino (63). A fin de ahondar en el estudio del papel que tiene la GH sobre la inhibición de la apoptosis en el sistema inmune de los vertebrados, en este trabajo hemos decidido evaluar el efecto de la GH en la bolsa de Fabricio, un tejido linfoide primario exclusivo de las aves.

BOLSA DE FABRICIO

La bolsa de Fabricio es un órgano linfoide primario de las aves localizado en la parte terminal del tracto intestinal (Figura 5). Este órgano está constituido por 12 a 15 pliegues, y dentro de éstos existe tejido linfoide que se organiza en folículos (50, 51). Anatómicamente la bolsa de Fabricio se divide en cuatro capas: una capa delgada de tejido conjuntivo con un epitelio plano simple, una capa muscular de músculo liso, una capa submucosa y un epitelio superficial cilíndrico pseudoestratificado (51, 52, 53).



Figura 5. Localización de la bolsa de Fabricio y el timo en las aves (88)

Dentro de los pliegues se encuentran los folículos (figura 6). Estos están constituidos por una región medular y una región cortical, separadas por una membrana basal bien definida que tiene continuidad con la membrana basal del epitelio interfolicular. En la región medular del folículo se encuentran linfoblastos y linfocitos inmersos en un estroma constituido por las prolongaciones citoplasmáticas de células retículo epiteliales, las cuales se encuentran unidas por desmosomas. Además de las células linfoides, también se encuentran macrófagos y células dendríticas en la región medular del folículo. En la periferia, entre la región medular y cortical, existe una capa de células epiteliales que limitan estos dos compartimentos junto con la membrana basal, denominado región corticoepitelial (54, 55).

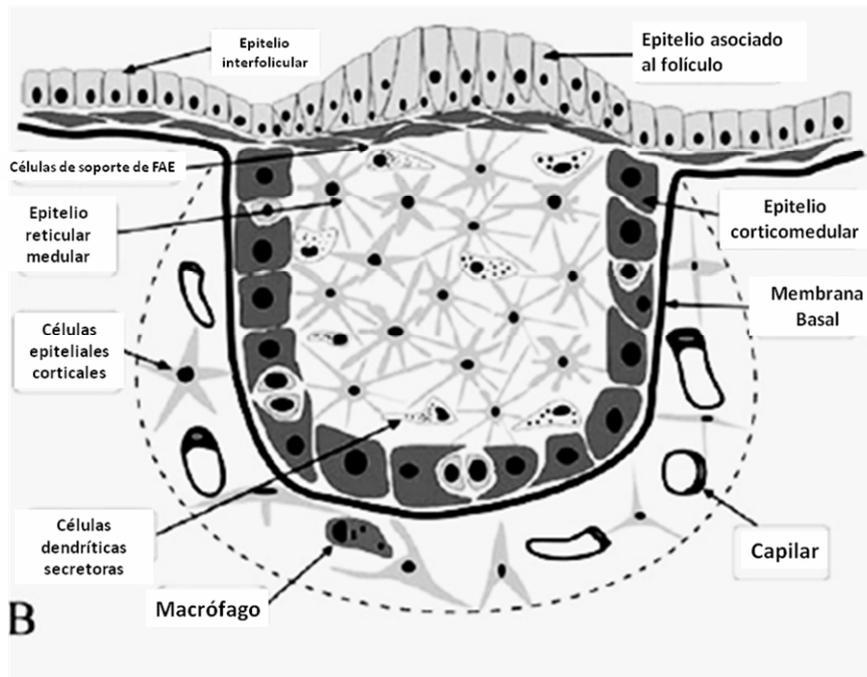


Figura 6. Representación esquemática de la bolsa de Fabricio (88)

La corteza está formada hasta por diez capas de linfocitos B, entre las que se disponen algunas células epiteliales y en menor número células mesenquimatosas de la lamina propia. No hay uniones entre los linfocitos, ni entre éstos y las células epiteliales. En la corteza, la red celular se continúa con el tejido conjuntivo que rodea al folículo (56, 57, 58).

Las células que constituyen al folículo linfoide son las: células epiteliales asociadas al folículo (FAE), células reticuloepiteliales (REP), células dendríticas secretoras (SDC), macrófagos, células plasmáticas, linfoblastos y linfocitos (59).

Los linfocitos medianos y grandes son los elementos predominantes en los folículos linfoides y se localizan principalmente en la periferia de la médula de la bursa. En el centro de la médula los linfocitos están organizados densamente y se encuentran situados entre las células reticulares y rodeados por epitelio córtico-medular (60).

La bolsa de Fabricio tiene un crecimiento marcado durante el desarrollo embrionario. Después del nacimiento se han identificado tres fases de crecimiento. Una fase rápida, desde el nacimiento hasta 3 ó 4 semanas de edad, una fase de meseta, período durante el cual incrementa su peso hasta alcanzar un máximo entre las 10 y 15 semanas y una fase de involución la cual termina alrededor de la semana 20 de edad (61).

El papel de la bolsa de Fabricio como tejido linfoide es llevar a cabo la maduración de las células B inmaduras. También sirve como un sitio para el procesamiento de antígenos y desarrollo de la respuesta inmune humoral, así como el sitio primario para la diferenciación de las células B y la diversificación de las inmunoglobulinas. En este último proceso, los mecanismos apoptóticos están involucrados en la selección de linfocitos B para generar un repertorio de células inmunocompetentes (26). Trabajos previos han demostrado que los linfocitos de la bolsa de Fabricio de pollo llevan a cabo una activación endógena de la apoptosis cuando se encuentran en cultivo (26, 27).

También se ha descrito que tanto GH como su receptor se expresan en la bolsa de Fabricio, lo cual sugiere un papel de GH en el desarrollo de este tejido (28, 29). Con base en esta información es factible considerar a la bolsa de Fabricio como un modelo adecuado para estudiar los efectos de la GH sobre la regulación de los mecanismos de la apoptosis en las aves.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito que la hormona de crecimiento ejerce diversos efectos moduladores sobre la actividad del sistema inmune. En particular se ha postulado que la GH podría estar involucrada en la regulación de algunos mecanismos apoptóticos en las células inmunocompetentes, actuando como un factor de supervivencia o antiapoptótico. A fin de ahondar en el papel que la GH tiene en la regulación de la apoptosis en el sistema inmune de los vertebrados, en este trabajo se analizó la capacidad de esta hormona para inhibir dicho proceso en cultivos primarios de células provenientes de bolsa de Fabricio de pollo.

HIPÓTESIS

La hormona de crecimiento tiene un efecto antiapoptótico en la bolsa de Fabricio.

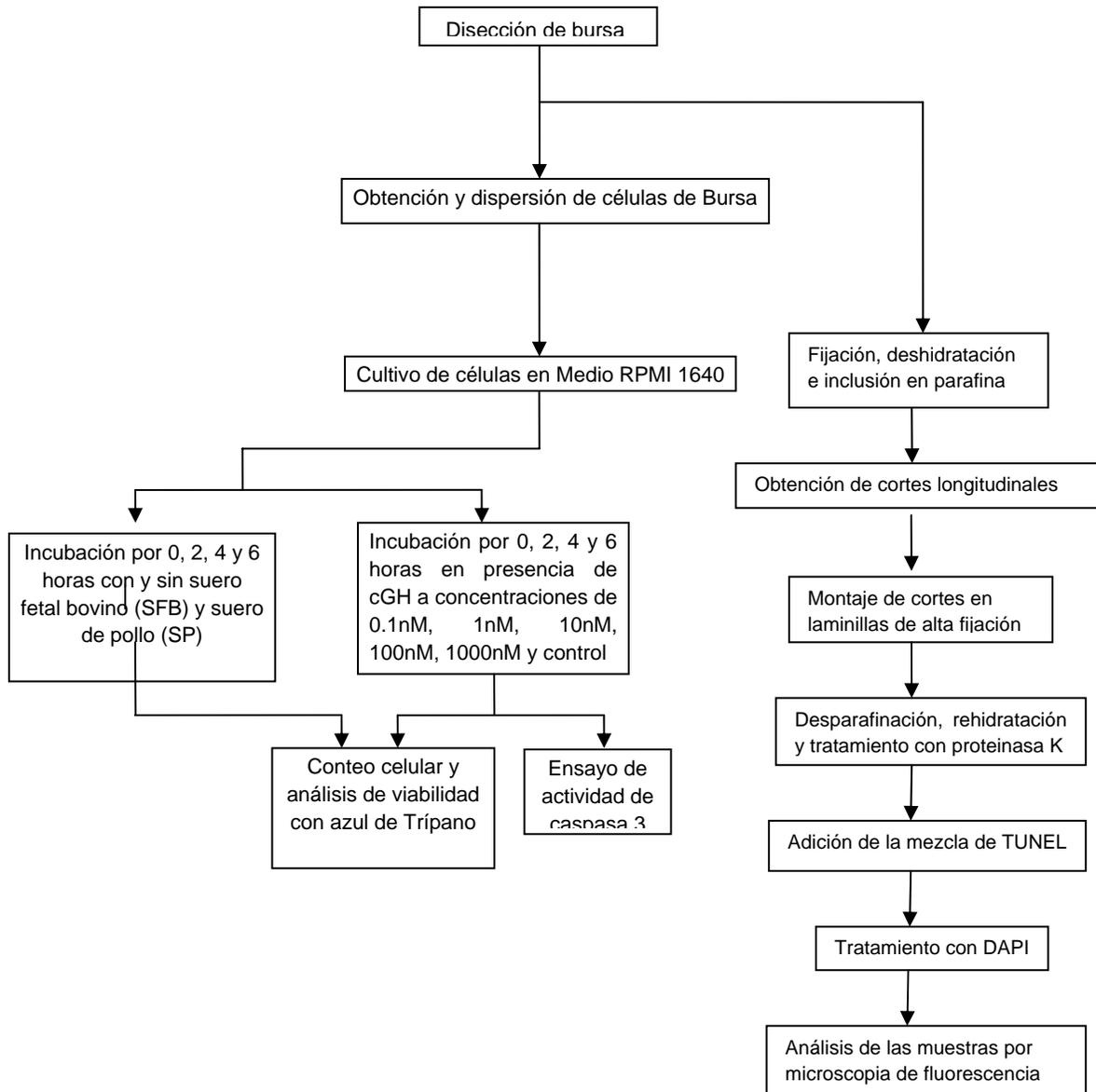
OBJETIVO GENERAL

Determinar si la hormona de crecimiento tiene un efecto sobre los mecanismos de apoptosis en cultivos primarios de células de bolsa de Fabricio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la proporción de apoptosis en los folículos de bolsa de Fabricio de pollos durante el desarrollo.
- Establecer las condiciones óptimas de un cultivo primario de células de la bolsa de Fabricio.
- Analizar si la GH tiene una actividad como factor de supervivencia en cultivo primarios de células de la bolsa de Fabricio, a través de un mecanismo antiapoptótico.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron pollos machos de la línea Ross obtenidos de las granjas Abrego en la ciudad de Querétaro, Querétaro de 1, 4 y 18 semanas de edad, los cuales fueron sacrificados por decapitación. Se les extrajo la bolsa de Fabricio y los tejidos fueron colocados en solución Bouin Holland (174mM Acido pícrico, 125mM acetato cúprico, 4% formol en H₂O desionizada) para ser fijados y posteriormente usados en el ensayo de TUNEL (muerte celular POD *in situ* de ROCHE). Además, para realizar los cultivos primarios de células de la bolsa de Fabricio, se usaron pollos de 4 semanas de edad, de la línea ya mencionada, los cuales también fueron sacrificados por decapitación y su bursa fue colectada de manera aséptica.

DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE APOPTOSIS EN FOLICULOS DE LA BOLSA DE FABRICIO POR EL ENSAYO DE TUNEL

Con el fin de determinar las diferencias en la proporción de folículos en apoptosis se utilizaron cortes histológicos de bolsa de

Fabricio de pollo y se analizaron mediante el ensayo de TUNEL. Se utilizaron cortes de bursa de pollos de 1, 4 y 18 semanas de edad. Para cada edad se usaron 4 pollos y de cada pollo se usaron 4 cortes, con el fin de evaluar diferencias en los patrones de muerte celular de los tejidos, para lo cual los mismos fueron tratados de la siguiente manera:

Los tejidos se fijaron en Bouin-Hollande por 24 horas y posteriormente se lavaron con agua corriente para eliminar el fijador. Luego se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol (50, 70, 96 y 100%) y después en xilol. Una vez deshidratados, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes longitudinales de 7-8 μm con el micrótopo, los cuales fueron montados en portaobjetos de cristal (Fisherbrand).

Los tejidos fueron desparafinados con solución de citrisolv y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (Absoluto, 95%, 70%, 50%) y agua destilada por periodos de 5 minutos en cada solución. Luego se continuó con lugol, tiosulfato de sodio al 5% y agua destilada (2 minutos en cada solución). Los tejidos ya rehidratados fueron lavados tres veces con PBS1X (solución PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8) e inmediatamente fueron incubados con proteinasa K (solución de trabajo 10 $\mu\text{g/ml}$ en 10mM de Tris/HCl pH 7.4) por 15 min a temperatura ambiente (de 21 a 37°C) en una cámara húmeda

para permeabilizarlos y después lavados tres veces con PBS 1X. Posteriormente se procedió con el ensayo de TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-dependent polymerization of labeled nucleotides to free 3'-OH DNA ends in a template-independent manner por sus siglas en ingles, que significa: Polimerización de extremos 3'-OH libres marcados por transferasa deoxinucleotídica terminal de manera independiente a un templado], el cual consiste en incorporar las bases análogas dUTPs (deoxynucleotidyl uracil triphosphate por sus siglas en ingles que significan deoxinucleotidil uracilo trifosfato) marcadas con fluoresceína a las partes terminales 3'-OH del ADN. Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó el estuche para detección de muerte celular POD *in situ* de ROCHE (No. de Cat. 11684795910) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de la manera siguiente: A cada corte se le agregaron 50µl de la mezcla de TUNEL (50µl de la solución con TdT en 450µl de la solución con los dUTPs) y se cubrieron con cuadros de parafilm de 1cm². Los portaobjetos (Fisher Superfrost, No. cat. 12-550-15) fueron incubadas por 1 hora a 37 °C en una cámara húmeda. Después de la incubación se realizaron tres lavados con PBS1X. Para realizar la tinción de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) se colocó 1 ml de la solución de DAPI (1 mg/ml DAPI en H₂O desionizada) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 30 minutos. Después de

este tiempo se montaron usando medio para montaje fluorescente DakoCytomation (No. cat. S3023)

Los cortes fueron observados en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y se calculó la proporción del área relativa de la señal de TUNEL a través de la herramienta de conteo y determinación de área del software Image Pro Plus en 6 campos. El programa detecta una intensidad de señal predeterminada, y en cada sitio de un campo en donde es identificada dentro del intervalo de intensidad como positiva se le cuantifica el área. Posteriormente las áreas se suman y se dividen entre el área total del campo para obtener una proporción.

OBTENCIÓN, DISPERSIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS DE BURSA

Se sacrificaron pollos de 4 semanas de edad. Se colectaron las bursas de manera aséptica con pinzas y tijeras estériles. El tejido fue colocado en 10 ml de medio Hanks (Invitrogen No. cat. 14170-120) para transportarlo y ya en condiciones estériles en la campana de flujo laminar se descartó el medio y se agregaron 10 ml de medio Hanks para lavar el tejido. Esto se repitió dos veces más. El tejido fue entonces colocado en una caja petri estéril en medio RPMI 1640 (Sigma R8758) suplementado con 5% SFB (suero fetal bovino Gibco No. Cat. 16000-036) y 5% SP (suero de pollo Gibco No. Cat. 16110-082) y fue fragmentado en pedazos de aproximadamente 1mm^3 con bisturí. Estos

fragmentos se pasaron a un homogenizador de vidrio (Wheaton) y se homogeneizaron con 15 a 20 golpes con el pistilo de vidrio. El homogeneizado fue filtrado con una malla con un poro de 40 μm (Biochem, No. cat. 2340) a otro tubo y centrifugado a 300 g por 5 minutos (centrífuga Beckman Coulter, rotor de 1.12 r a 1800 RPM). Posteriormente la pastilla fue resuspendida y filtrada de nuevo. Se centrifugó y resuspendió con 5 ml de medio RPMI 1640 y se realizó un conteo celular utilizando un hemocitómetro (Houser Scientific Horsham). Se contó el número de células de las cuatro áreas de la cuadrícula de la cámara y se obtuvo un promedio del número de células por área. El promedio fue multiplicado por la dilución (dilución 1:20) y por 10,000 para obtener el número de células por mililitro. Para realizar el ensayo de viabilidad con azul de tripano (Allied Chemical and Dye Corporation, No. cat 477), una alícuota de la suspensión celular se diluyó 1:10 v/v con medio y a 20 μl de esa dilución se le agregaron otros 20 μl de azul tripano. De esta mezcla se tomaron 10 μl y se colocaron en el hemocitómetro. Se realizó el conteo celular como ya se describió pero además se contaron las células teñidas con el colorante vital. Se sumó el número de células no teñidas y se dividió entre la suma de las células teñidas con azul de tripano y las células no teñidas para obtener el porcentaje de viabilidad.

En cultivos tratados con rcGH (recombinant chicken Growth Hormone) se preparó medio RPMI 1640 con concentraciones de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} mM de rcGH. Después del conteo celular y el análisis de viabilidad en el tiempo 0, se procedió a realizar una dilución de la suspensión original de células para tener aproximadamente 4×10^6 cel/ml por tubo de cultivo, en un volumen de 1 mililitro. Las células fueron

incubadas a 37 °C y una atmosfera con 5% CO₂ en una incubadora (Nuair, US autoflow) con tiempos de 0, 2, 4 y 6 horas. En cada tiempo se realizó el conteo celular y el análisis de viabilidad como ya se describió anteriormente. El resto de las células fue centrifugado, retirado el medio y congelado a -70 °C.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE BOLSA DE FABRICO

Las células obtenidas de los cultivos primarios fueron resuspendidas en 100 µl de amortiguador de lisis [HEPES/NaOH 10 mM pH 7.4, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, e inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free Roche, No. Cat. 1836170)]. Posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación (sonicador Fisher FSH9) por 5 minutos y luego fueron homogeneizadas con pistilo de plástico (Micro tissue grinder Wheaton) y centrifugadas a 12000 RPM (centrifuga SORVALL RMC 14 rotor FAMicro/1.5ml) a temperatura ambiente. El sobrenadante fue colectado para cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford (67).

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE LA BOLSA DE FABRICO

Para realizar la cuantificación de la actividad de caspasa 3 se utilizó el ensayo colorimétrico para caspasa 3 (Caspase-3 Colorimetric Assay Kit de Assay Designs, No. de cat. 907-013). En la placa de 96 pozos (incluida en el estuche) se colocaron 50 μ l de amortiguador activo de reacción de caspasa 3 (amortiguador de reacción de caspasa 3 y dethiothreitol) en los pozos blanco. En dos pozos de la placa se colocan 125 μ l de calibrador de p-nitroanilina [Solución de p-nitroanilina (pNA) 50 μ M en amortiguador de reacción de caspasa 3]. Para hacer los estándares se utilizan 4 tubos donde se colocan 125 μ l del amortiguador de reacción activo de caspasa 3. Se reconstituye el vial del estándar de caspasa 3 con el amortiguador de reacción activo de caspasa 3 (el vial se toma como tubo 1). Se toman 125 μ l del tubo 1 se pasan al tubo 2, se mezcla y 125 μ l del tubo 2 se pasa al tubo 3 y se repite lo mismo para el tubo 4 y el 5. Una vez hechos los estándares, se pipetea 50 μ l de cada tubo por duplicado en cada pozo de la placa. Después de colocar los estándares se colocan 50 μ l de las muestras y en todos los pozos se pipetea (excepto en los pozos con pNA) 75 μ l del substrato de caspasa (incluido en el estuche), se mezcla suavemente, se cubre la placa y se incuba por 3 horas a 37 °C. Para detener la reacción se colocan 10 μ l de la solución de bloqueo del estuche en cada pozo y se lee en el lector de ELISA (Biorad 3550-UV) a 405 nm de longitud de onda. Para realizar la

determinación de la actividad de caspasa 3 en las muestras se calcula el promedio neto de la densidad óptica (OD) para cada estándar y muestra, substrayendo el promedio de la densidad óptica de los blancos del promedio de densidad de cada estándar y muestra. La medición de la actividad puede ser cuantificada al comparar las densidades ópticas obtenidas con los estándares y el calibrador con pNA. La densidad óptica del calibrador es equivalente a la densidad óptica obtenida de 34.72 unidades de caspasa 3 activa cuando reacciona con su substrato. Los cálculos para determinar la actividad son los siguientes:

Factor de conversión (OD/unidades) = Promedio de la densidad óptica neta del pNA

34.72 unidades

Actividad (unidades/ml) = Promedio de la densidad óptica neta de los estándares
÷ 0.05ml

Factor de conversión

Para determinar los valores de las muestras se grafican los valores de los estándares y se interpolan en la recta.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey y Dunnet (GraphPad Prism 4).

RESULTADOS

Proporción de apoptosis durante el desarrollo en la bolsa de Fabricio

Con el fin de determinar las diferencias en la proporción de folículos en apoptosis se utilizaron cortes histológicos de bolsa de Fabricio de pollo y se analizaron mediante el ensayo de TUNEL. Los resultados mostraron que existen diferencias en el patrón de distribución de la señal fluorescente. En el caso de las muestras provenientes de los pollos de 1 semana de edad, se observó que la mayoría de los folículos no presentan señal fluorescente que refleje la presencia de cuerpos apoptóticos. Sin embargo, una pequeña proporción de folículos presenta una señal clara e intensa localizada principalmente en el área cortical (figura 7A). En cambio, a las 4 semanas, se observó un patrón de distribución de la señal más homogéneo pero menos intenso que estuvo presente en la mayoría de los folículos, ubicado principalmente en el área medular (figura 7B). En los pollos de 18 semanas de edad la señal presentó una distribución homogénea localizada en el área medular, en agrupaciones de "gránulos" fluorescentes de señal muy intensa y distribuida en casi todos los folículos (figura 7C). La tinción de DAPI tiñe núcleos celulares y de esta manera nos permite observar la citoarquitectura de los folículos y obtener una mejor perspectiva

de la ubicación de la señal fluorescente de TUNEL en cada corte histológico (figura 7 D, E, F).

Los resultados de la cuantificación de la proporción del área relativa de la señal de TUNEL mostraron una proporción de área relativa de marca fluorescente de $0.645 \pm 0.561\%$ para 1 semana, $0.04 \pm 0.025\%$ para 4 semanas y $2.57 \pm 1.22\%$ para 18 semanas de edad (Figura 8). Existen diferencias significativas entre estos datos, lo que nos indica que durante la fase de involución hay una mayor proporción de células apoptóticas. Esto es consistente con la propuesta de un papel relevante de la apoptosis en la regresión de la bolsa de Fabricio. Los patrones de distribución observados son consistentes con las proporciones de área relativa obtenidas; sin embargo, las diferencias entre ellas nos indican distintos procesos fisiológicos propios de cada fase de desarrollo.

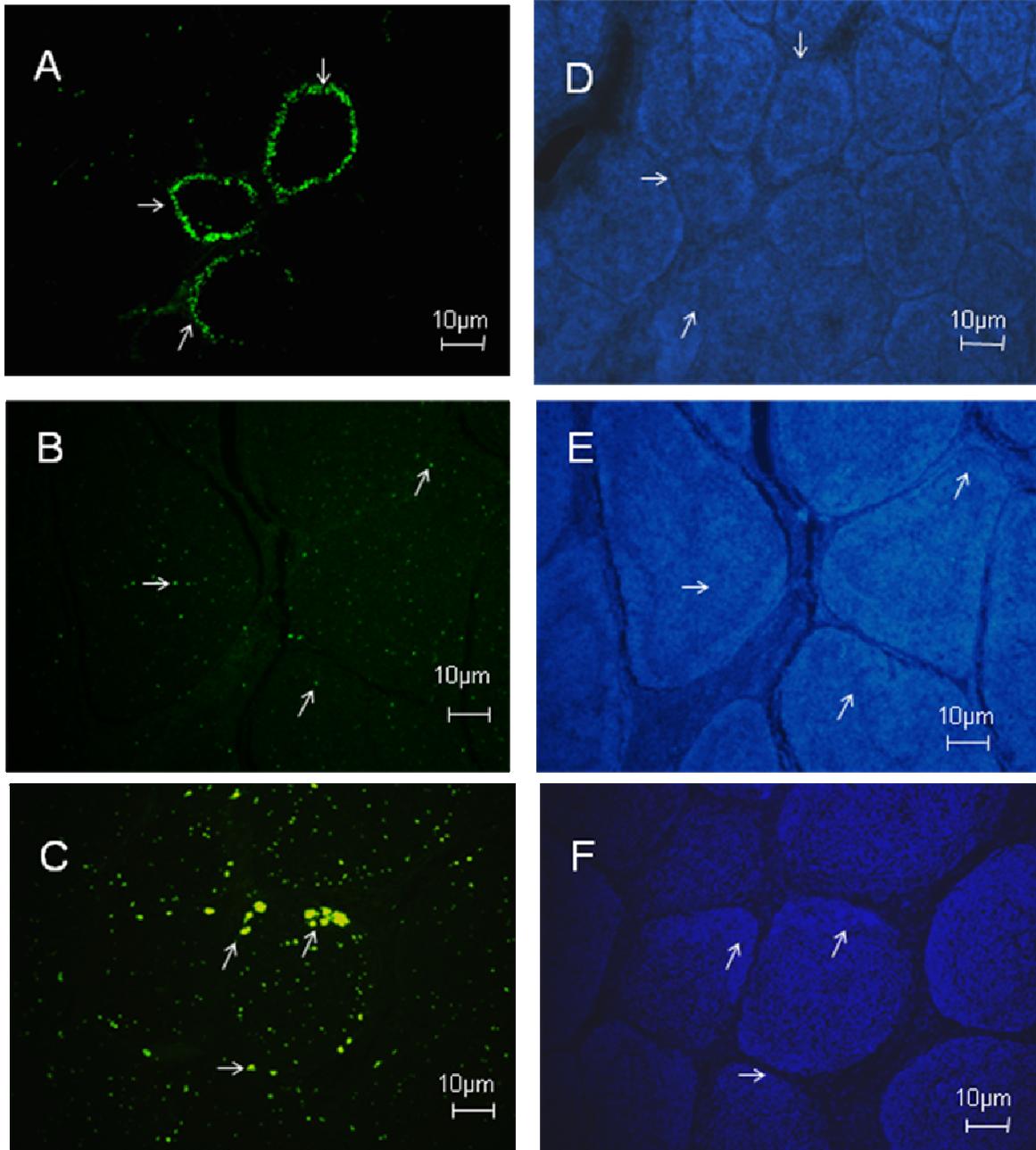


Figura 7. Micrografías de cortes histológicos de bolsa de Fabricio correspondientes a pollos de edades de 1, 4 y 18 semanas de edad, analizados por medio del ensayo de TUNEL para determinar la apoptosis, evaluados en microscopio de fluorescencia por cuantificación de porcentaje de área con el programa image pro plus. A) Pollo de 1 semana de edad (10X), D) mismo campo observado con tinción de DAPI (10X), B) pollo de 4 semanas de edad (10X), E) mismo campo observado con tinción de DAPI (10X), C) pollo de 18 semanas de edad (10X), F) mismo campo observado con tinción de DAPI (10X).

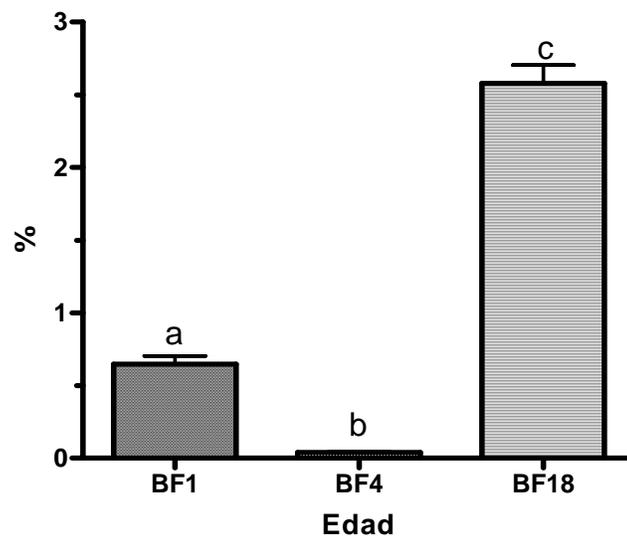


Figura 8. Determinación de la Proporción del área relativa de la señal de TUNEL en cortes histológicos de bolsa de Fabricio analizados en microscopio de fluorescencia por medio del ensayo de TUNEL de edades de 1, 4 y 18 semanas. Cada barra representa la media y el error estandar (n = 4, P < 0.05)

Establecimiento de las condiciones óptimas de los cultivos primarios de bolsa de Fabricio

Con el fin de poner a punto la metodología de cultivos primarios de bolsa de Fabricio se determinó el número de células y el porcentaje de viabilidad en cultivos primarios. Inicialmente se homogeneizó gentilmente el tejido para dispersar las células linfoides de la bolsa de Fabricio. Por otra parte, para determinar el efecto del tiempo sobre los cultivos primarios, se incubaron las células de la bursa por 0, 2, 4 y 6 horas y se determinó la

viabilidad. Todos los cultivos de este grupo fueron incubados suplementando suero fetal bovino y suero de pollo (30). Al tiempo cero se obtuvo un promedio de 70.28×10^6 cel/ml con una viabilidad promedio de un $95.0 \pm 1.06\%$. De esta suspensión celular inicial se realizaron alícuotas de 4×10^6 cel/ml. Se observó una disminución en el número de células y viabilidad al incrementar el tiempo de incubación. A las 2 horas (3.4×10^6 cel/ml) no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad al compararlas con el tiempo 0, obteniéndose una viabilidad de $92 \pm 2.69\%$; sin embargo, a las 4 y 6 horas de incubación

(3.2×10^6 cel/ml y 2.4×10^6 cel/ml respectivamente), hubo una

Horas de incubación	Células/ml	Viabilidad %
---------------------	------------	--------------

disminución significativa de la viabilidad de $78.3 \pm 4.71\%$ y $55.8 \pm 3.96\%$, respectivamente, al comparar estos tiempos con las 0 horas de incubación (Figura 9, 10).

0	4 x10 ⁶	95.0±1.06
2	3.4 x10 ⁶	92.0±2.69
4	3.2 x10 ⁶	78.3±4.71
6	2.4 x10 ⁶	55.8±3.96

Figura 9. Promedio de células por mililitro y porcentaje de viabilidad a diferentes tiempos de incubación de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio (n=10, P < 0.05)

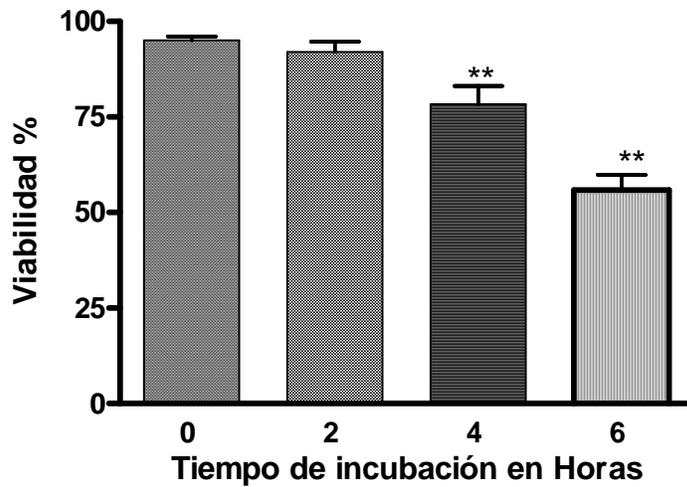


Figura 10. Porcentaje de viabilidad de cultivos primarios de células de bolsa de Fabricio en condiciones optimas [RPMI 1640 suplementado con 8% SFB (suero fetal bovino) y 10% SP

(suero de pollo)] incubados a 37°C y 5% de CO₂ a distintos periodos de tiempo. Cada barra representa la media y el error estándar (n = 10, **, P < 0.001).

Con el fin de determinar la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio en condiciones de estrés para inducir apoptosis, así como para eliminar la posible interferencia de los sueros en los tratamientos de la GH, se decidió realizar los cultivos primarios sin suplementar con suero fetal bovino y suero de pollo. Los resultados obtenidos para estos cultivos mostraron una viabilidad de 95.25%±0.49 en el tiempo 0 de incubación y de 94.32%±3.29 a las dos horas. A las 4 horas se obtuvo una viabilidad de 64.6±13.4% (gráfica 3). Debido a que las células en el cultivo se encontraban en un medio sin suplementos, se puede observar que a las 4 horas de incubación la viabilidad disminuye a niveles inferiores a aquellos a los que se observan a las 4 horas de incubación en el grupo con medio suplementado con sueros (78.3±4.71%) (figura 11).

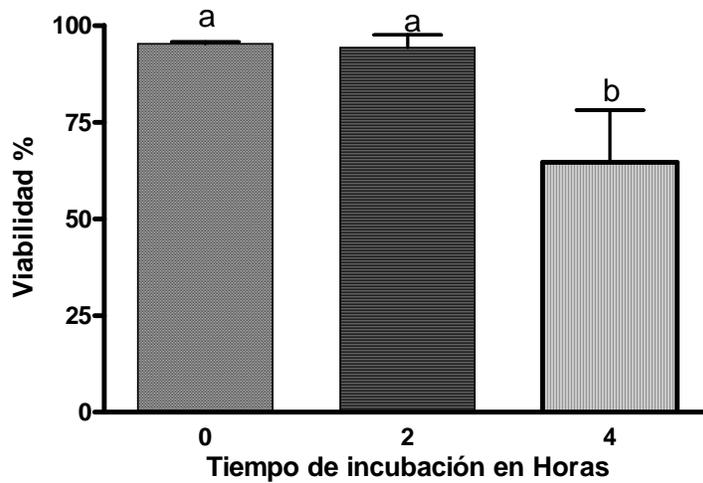


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de cultivos primarios de células de bolsa de Fabricio en medio empobrecido (RPMI 1640) incubados a 37°C y 5% de CO₂ a distintos periodos de tiempo. Cada barra representa la media y el error estándar de la viabilidad (n = 10, **, P < 0.001).

Efecto de la GH sobre la viabilidad de cultivos primarios de bolsa de Fabricio

Un primer análisis de los efectos de la GH fue determinar el efecto de la hormona sobre la viabilidad celular. Con este fin, los cultivos primarios de bolsa de Fabricio fueron incubados en presencia de las siguientes concentraciones de rcGH: 1x10⁻¹⁰, 1x10⁻⁹, 1x10⁻⁸, 1x10⁻⁷, 1x10⁻⁶, 1x10⁻⁵, 1x10⁻⁴, 1x10⁻³ mM (figura 12). Se realizó el conteo celular y el análisis de viabilidad a las 0, 2 y 4 horas de incubación. A las cero horas la viabilidad del control y los cultivos tratados fue de 95.26±1.07. A las 2 horas tanto el control como los cultivos tratados no mostraron diferencias

significativas en la viabilidad ($96.58 \pm 2.25\%$) con respecto al tiempo 0. A las 4 horas de incubación se observó un patrón de incremento de la viabilidad hasta los 10 nM de GH con una viabilidad de $94.3 \pm 14.9\%$ al comparar con el control que tiene una viabilidad de $64.6 \pm 13.4\%$; sin embargo, a los 100nM la viabilidad disminuye a $89.6 \pm 15.4\%$ y con 1000 nM de GH a

Tiempo de incubación	0	2	4
----------------------	---	---	---

$78 \pm 4.2\%$. No hay diferencias significativas entre los tratamientos y el control (gráfica 5). Estos datos indican que existe una tendencia de la GH a rescatar la viabilidad de los cultivos primario (figura 13).

[rcGH] nM	Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar
Control	95.26±	1.07	92±	2.70	64.6±	13.4
0.0001	92.14±	6.23	-----	-----	80.33±	3.67
0.001	92.14±	6.23	-----	-----	82.14±	3.67
0.01	95.95±	0.41	97.86±	1.12	87.04±	3.49
0.1	95.95±	0.41	98.95±	0.47	87.99±	3.43
1	95.84±	0.34	97.53±	1.05	90.05±	3.46
10	96.00±	1.13	95.84±	0.95	94.33±	3.43
100	96.00±	1.37	96.45±	0.75	89.64±	3.53
1000	97.00±	1.24	97.46±	0.07	78.4±	4.22

Figura 12. Porcentaje de viabilidad de cultivos primarios de células de bolsa de Fabricio tratados con rcGH (0.0001nM, 0.001nM, 0.01nM, 0.1, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM) incubados por 0, 2, 4 y 6 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó la media y el error estándar de la viabilidad (n = 19).

Cuando se calculó la diferencia de la viabilidad de cada tratamiento con el control (δ), este análisis nos permitió observar el aumento de la viabilidad con respecto al control. Se observó que no hay diferencias significativas de la delta de la viabilidad entre el control y los tratamientos de 0.0001nM ($\delta=3.1\%$), 0.001($\delta=3.1$) y 1000nM ($\delta=13.37\%$) de GH. Sin embargo, los tratamientos de 0.01nM ($\delta=19.5\%$), 0.1nM ($\delta=21\%$), 1nM

($\delta=25.2\%$), 10nM ($\delta=28.1\%$), 100nM ($\delta=25.4\%$) si mostraron diferencias significativas con respecto al control. A través del cálculo de la delta de la viabilidad se pudo observar un patrón más claro del efecto dosis respuesta de la GH sobre la viabilidad de los cultivos primarios (Figura 13).

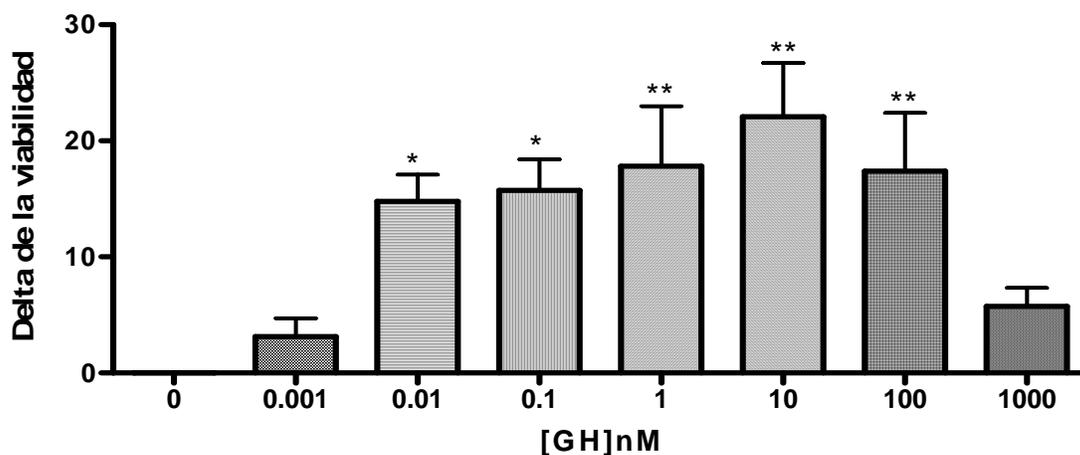


Figura 13. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con rcGH (0.0001nM, 0.001nM, 0.01nM, 0.1, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM) incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Cada barra representa la media y el error estándar de la delta de la viabilidad (n = 21, *, P < 0.05, **, P<0.01).

Efecto de la GH sobre la actividad de CASPASA 3 en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio.

Para determinar el efecto de la rcGH sobre la apoptosis en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio se cuantificó la actividad de caspasa 3, en ausencia o presencia de rcGH con concentraciones desde 0.0001 hasta 100 nM. Los resultados mostraron que la actividad de caspasa 3 para los tratamientos de 0.0001, 0.001, 0.01 y 0.1nM de rcGH (53.6 ± 3.62 , 44.18 ± 2.42 , y 43.97 ± 2.87 U/ml respectivamente) no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (49.2 ± 3.37). Por otro lado los tratamientos de 1, 10 y 100 nM de rcGH (29.2 ± 3.2 , 31.6 ± 2.2 y 30.5 ± 3.5 U/ml, respectivamente) muestran una actividad significativamente menor con respecto al control. Estos resultados nos indican que a concentraciones mayores de 1nM la actividad de la enzima caspasa 3 disminuye significativamente (Figura 14).

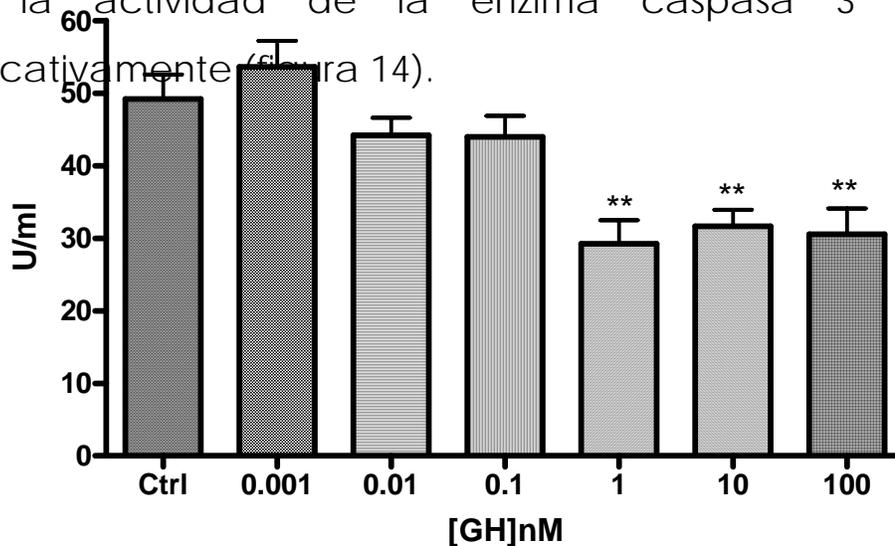


Figura 14. Actividad de caspasa 3 (U/ml) en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con rcGH con concentraciones de 0.0001 a 100 nM. Cada barra representa la media y el error estándar de la actividad de caspasa 3 (n = 4, **, P < 0.01)

DISCUSIÓN

La primera evidencia del papel de la GH como factor modulador del sistema inmune surge de estudios *in vivo* en los cuales se utilizaron modelos de roedores hipofisectomizados y de la línea de ratones enanos Snell. El modelo de ratas hipofisectomizadas produjo una deficiencia de todas las hormonas hipofisarias [TSH, GH, PRL, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), entre otras] y la administración de GH a estos animales llevó a una recuperación del desarrollo de los diferentes órganos que integran el sistema inmune (bazo, timo, nodos linfáticos), así como de la respuesta humoral y celular. Por otra parte los estudios realizados con los ratones enanos Snell-Bagg, los cuales son deficientes en PRL, GH y TSH debido a una mutación en el gen del factor de transcripción Pit-1, mostraron que la administración de GH exógena es capaz de incrementar la población de las células T en el timo (78).

Las evidencias posteriores que apoyaron el papel de la GH como molécula inmunomoduladora se originaron de estudios *in vitro* que mostraron la presencia del receptor en linfocitos T y B de modelos tanto animales (rata y ratón) como humanos, así como efectos sobre la proliferación, la supervivencia y producción de inmunoglobulinas en células B, de cultivos primarios que fueron tratados con GH. Todos estos resultados

sugieren un papel relevante de la GH en el sistema inmune de mamíferos (78). Con respecto a las aves, trabajos con modelos de animales hipofisectomizados demostraron que la administración de GH exógena revierte la atrofia del timo, el bazo y la bolsa de Fabricio. En pollos enanos la GH provoca una mejoría de la respuesta humoral. En adición a lo anterior, también se ha determinado la presencia del receptor a GH en estos tejidos inmunes. Toda esta evidencia apoya la idea de que, así como en mamíferos, la GH tiene una participación en la modulación del sistema inmune de las aves y de manera particular en la bolsa de Fabricio (86).

Proporción de apoptosis en los folículos de la bolsa de Fabricio

Como ya se mencionó, la bolsa de Fabricio tiene distintas fases de desarrollo y se ha propuesto que en la fase de involución la apoptosis es la responsable de la regresión del tejido; por tanto, consideramos relevante determinar si la proporción de apoptosis cambia durante las fases de desarrollo de la bursa y si los cambios en la concentración de GH a través de la ontogenia del pollo reportada previamente corresponden con la proporción de apoptosis (65). Los resultados mostraron que durante la fase de involución se incrementa significativamente la proporción de apoptosis (2.5%) con respecto a las fases de crecimiento (0.6%) y estacionaria (0.04%), lo cual nos sugiere un

papel de la apoptosis en la regresión del tejido. Es importante señalar que los porcentajes que se obtuvieron a través del análisis de proporción del área relativa, no reflejan la proporción sobre el total de células presentes en el corte, sino que son un índice que se obtiene al calcular el área que ocupa la señal fluorescente solo en el plano bidimensional visible, discriminando las señales de menor intensidad a la preestablecida en el programa, y dividiendo la sumatoria de estas áreas entre el área total del campo. Este análisis permite obtener datos comparables que permiten observar las diferencias en proporción de apoptosis entre las diferentes edades.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando la técnica de inmunocitoquímica, mostraron que la distribución de la GH en la bolsa de Fabricio de pollos de edades de 2 y 10 semanas de edad estaba localizada principalmente en la región medular, aunque a las 10 semanas de edad la señal inmunoreactiva parece ser más tenue. Para las 20 semanas casi no se observan células inmunoreactivas. Algo muy similar se observa en la distribución del ARNm de la GH, en donde también a las 20 semanas hay muy poca señal (Rodríguez MA, datos no publicados). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el ensayo de TUNEL, pues a las 18 semanas la proporción de apoptosis en el tejido se incrementa significativamente. En adición a lo anterior, Luna y col. (65) determinaron que los niveles de GH en la bolsa de Fabricio

presentan un aumento de la concentración desde el primer día post eclosión hasta las 4 semanas y posteriormente, a las 9 semanas, inicia una disminución en la concentración que continua hasta la involución del tejido. Este comportamiento se correlaciona con el patrón de proporción de apoptosis observado en nuestro estudio, esto es, mientras que en la fase de crecimiento la proporción de apoptosis se mantiene relativamente baja (1y 4 semanas de edad) y los niveles de GH a esta edad se incrementan (22 μ g por órgano). Cuando los niveles de GH disminuyen (7.6 μ g por órgano), la proporción de apoptosis aumenta significativamente. Esto señala una correlación negativa entre los niveles de GH y la proporción de apoptosis de la bursa, así como, un posible papel de la GH en proteger al tejido de la apoptosis durante su regresión.

En trabajos realizados en bolsa de Fabricio se ha observado que durante el desarrollo una gran mayoría (95%) de los linfocitos que se encuentran en la médula de los folículos, no llegan a la corteza y sufren de apoptosis *in situ* (69). Se ha propuesto que aquellos linfocitos que se seleccionan para llevar a cabo apoptosis poseen defectos en la producción de inmunoglobulinas que pueden identificar antígenos propios (respuesta autoinmune), lo cual puede explicar la proporción de apoptosis observada en nuestros resultados, en cortes de bolsa de Fabricio.

Nuestros resultados han demostrado que efectivamente de manera fisiológica, la apoptosis se incrementa significativamente poco antes de iniciar la pubertad en el pollo (18 semanas de edad), lo cual sugiere una correlación entre la esteroidogénesis y la involución de la bursa. La bolsa de Fabricio involuciona al iniciar la pubertad por lo que se ha propuesto que los esteroides (estrógenos, andrógenos, glucocorticoides), pueden tener un papel relevante en la inducción de su regresión (68). Experimentos hechos por el grupo de Compton (68) encontraron que al administrar dexametazona (un glucocorticoide sintético) sistémicamente, con dosis de 0.02 a 1 mg en pollos de 4 semanas de edad, se induce tanto una marcada regresión de la bursa como un incremento en la apoptosis, por lo que la posibilidad de un efecto directo de los esteroides sobre la involución y la apoptosis en la bolsa de Fabricio es probable. Sin embargo, estudios realizados en pollos de 1 día de edad, tratados tanto con dexametazona y con 19-nortestosterona (1mg/kg), y evaluados a través del ensayo de TUNEL realizado en cortes histológicos de bolsa de Fabricio, no mostraron ningún efecto sobre la apoptosis al compararlos con los pollos control. Estas diferencias entre los trabajos del grupo de Compton y de Higgins (68,69) se deben a las diferencias en las edades usadas en cada estudio (4 semanas *versus* 1 día de edad) las cuales corresponden a dos fases de desarrollo de la bursa muy diferentes. En este último estudio se discute que

aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control, si se observa un patrón de distribución muy particular, en donde la mayoría de los folículos están constituidos por células no apoptóticas. Sin embargo, hay folículos que presentan señal de TUNEL predominantemente en las zonas corticales, lo cual es consistente con lo observado en los cortes de 1 semana de nuestro estudio. Una manera de explicar este patrón de señal es que probablemente una fracción de la población de linfocitos de los folículos que presentan señal fluorescente, derivan de un primer linfocito que colonizó el folículo. Si este linfocito presentaba defectos en la producción de inmunoglobulinas, cuando proliferó, todas las células resultantes presentaron el defecto, por lo que entonces estos linfocitos maduraron y migraron a la zona cortical, seleccionados para llevar a cabo apoptosis (69).

Estandarización de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio

Con el fin de establecer un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de la GH sobre la apoptosis, se estandarizó un cultivo primario de células de la bolsa de Fabricio. En trabajos previos, para evaluar la eficiencia del cultivo se utilizó la tinción de azul de tripano para determinar la viabilidad. Compton y Waldrip (26) realizaron el ensayo de viabilidad incubando las células en medio DMEM suplementado con 4.5 mg/ml de glucosa, 5% de

suero fetal bovino por calor, 5% de suero de pollo inactivado por calor, 50 unidades/ml penicillina G, 50 mg/ml de sulfato de estreptomicina, y 25 mM de 2-mercaptoetanol, incubados a 37°C y 5% CO₂. Las condiciones en las cuales nuestros cultivos fueron mantenidos poseen algunas variaciones. Se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 4.5 mg/ml glucosa, 5% de suero fetal bovino inactivado por calor, 5% de suero de pollo inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina. La principal diferencia entre las dos condiciones es el uso de distintos medios en donde la composición de los medios difiere tanto en el contenido de aminoácidos (RPMI contiene: L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteina, L-ácido glutámico, L-alanina, glicina, L-histidina, L-hidroxiprolina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina y DMEM contiene: L-arginina HCl, L-cisteina 2HCl, L-glutamina, glicina, L-histidina HCl H₂O, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina HCl, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina 2Na 2H₂O, L-valina) y de sales (RPMI 1640 contiene: Ca(NO₃)₂ 4H₂O, KCl, MgSO₄ 7H₂O, NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄ 7H₂O y DMEM contiene: CaCl₂, Fe(NO₃)₃ 9H₂O, MgSO₄, KCl, NaHCO₃, NaCl, NaH₂PO₄H₂O) Nuestros resultados mostraron una viabilidad inicial similar a la obtenida por Compton y Waldrip (26), que fue de aproximadamente 97%; sin embargo, a las 4 y 6 horas de incubación la viabilidad disminuye un 18 y 29%,

mientras que en el estudio de Compton y Waldrip la viabilidad sólo disminuye un 7% a las 6 horas de incubación; esto podría deberse a la composición de los medios, aunque no hay evidencia experimental que apoye esta hipótesis. Sin embargo, cuando Compton et al. realizó la evaluación de la proporción de apoptosis a través del ensayo de TUNEL y la determinación del contenido de DNA por incorporación de yoduro de propidio, se determinó que la apoptosis se incrementaba hasta un 42% a las 6 horas de incubación. Las diferencias entre la viabilidad y la proporción de apoptosis en los cultivos primarios en el estudio realizado por Compton (26), sugiere que durante la apoptosis la membranas celulares permanecen intactas. Puesto que la tinción de azul de tripano es un colorante que requiere que las membranas celulares sean permeables, es factible que existan estas diferencias entre la proporción de células viables (azul de tripano) y apoptóticas. En el caso de nuestro estudio es posible adjudicar las diferencias en nuestros resultados a las diferencias en las condiciones en que se mantuvieron las células en los cultivos al compararlo con los resultados obtenidos por Compton.

Una de las características de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio es su corta duración. Una de las explicaciones que se han propuesto para justificar esto es el hecho de que la disgregación rompe las interacciones de las células del folículo, y genera la activación de un mecanismo endógeno de

apoptosis. Lo anterior ha sido fortalecido por el trabajo de Neiman y col. (27) en donde se realizaron cultivos primarios de bolsa de Fabricio y cultivos de explantes. Estos se incubaron por 2 y 4 horas, y posteriormente se realizó un ensayo de escalera de DNA para determinar la proporción de apoptosis y se observó que existe una proporción de degradación de DNA mucho menor en los explantes que en los cultivos primarios. Estos resultados se han tomado como evidencia de la importancia del microambiente en la bolsa de Fabricio.

Efectos de la GH sobre la viabilidad y la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio

La apoptosis es un proceso finamente regulado por diversos factores. Una forma en la que las células pueden comunicarse para prevenir o promover la muerte celular es a través de mensajeros químicos. Durante las últimas décadas han surgido estudios que evalúan el papel de estos mensajeros químicos en la regulación del proceso apoptótico. En este estudio nos hemos centrado en la GH; sin embargo, es importante mencionar que existen muchas otras moléculas que también pueden ejercer efectos sobre la apoptosis y que además utilizan mecanismos similares a la GH para ejercer tales efectos. La PRL, VEGF, EGF y angiopoietina-1 son algunos ejemplos de mensajeros químicos que pueden inhibir la apoptosis. La PRL es una hormona que

está relacionada directamente con la GH pues derivan de un gen ancestral, además de que ambas actúan como citocinas, y son sintetizadas y secretadas en la hipófisis anterior por células especializadas llamadas lactótrofos y somatotrofos, respectivamente (77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85). La PRL, al igual que la GH, inhiben la apoptosis en diversos tipos celulares como: células de la granulosa de humano, condrocitos de rata o células T de ratones, entre otros. Sin embargo, estos estudios señalan que los mecanismos que median el efecto antiapoptótico de la PRL aún faltan por ser dilucidados (79, 80, 81, 82). Por otra parte, VEGF, EGF y angiopoietina-1 son factores de crecimiento que también se unen a receptores de la familia de las citocinas y pueden activar vías de señalización comunes. En VEGF y EGF median su efecto antiapoptótico principalmente sobre células endoteliales por la vía de PI3K/Akt. En el caso de EGF también se ha comprobado que en células vasculares de musculo liso la vía involucrada en inhibir la apoptosis es ERK1/2 (83, 84,85). GH, al igual que estas hormonas y factores de crecimiento, puede actuar como un factor inhibidor de la apoptosis ya que, como se mencionó en los antecedentes, la GH ha demostrado inhibir la apoptosis en diversos modelos, (células del sistema nervioso y cardiomiocitos de ratas, células de la granulosa de bovinos, líneas inmortalizadas de células pancreáticas β de humano, así como líneas celulares de precursores de linfocitos B como Ba/F3 entre otros). Los

mecanismos que median los efectos antiapoptóticos fueron igual de diversos; en el caso de los experimentos realizados en cerebros de rata se encontró que la vía de señalización involucrada en mediar el efecto de la GH era PI3K/Akt (44), mientras que en los experimentos realizados con las células de granulosa de bovinos el efecto de GH fue a través de la vía de PKA/cAMP (45) y finalmente en las células pancreáticas β la vía involucrada fue JAK/STAT (47). Estos resultados muestran que la GH puede modular la apoptosis por diversas vías de transducción de señales dependiendo del tipo celular.

Ya que existen estudios que señalan que la GH puede tener un papel en la inhibición de la apoptosis en células del sistema inmune, y que en la bolsa de Fabricio existe el receptor, la proteína y el mensajero de GH y que la concentración de la GH disminuye durante la fase de involución en este tejido, se ha propuesto que la GH puede tener un efecto antiapoptótico en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio. Los resultados de esta tesis muestran que los efectos de la GH sobre la viabilidad y la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio pueden estar mediados por la inhibición de la actividad de caspasa 3, La actividad de la caspasa 3 se determinó a través del ensayo colorimétrico para caspasa 3 (Caspase-3 Colorimetric Assay Kit de Assay Designs) y muestran que la actividad disminuyó de manera significativa al tratar las células de bursa con concentraciones de GH de 1, 10 y 100 nM en comparación con

el control. La caspasa 3 pertenece a la familia de caspasas efectoras o ejecutoras y su activación o inhibición depende de vías tanto intrínsecas como extrínsecas de la apoptosis, por lo que no es de sorprender que la GH pueda incidir sobre su activación. Y una gran mayoría de las vías apoptóticas convergen en las caspasas efectoras y cualquier factor que inhiba la apoptosis es probable que bloquee las moléculas que median la activación de la caspasa 3. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la inhibición de la apoptosis es mediada se desconocen en este modelo.

En estudios previos se ha demostrado que la GH inhibe la apoptosis en diferentes tipos celulares (células T de humano, cerebro de rata, células de la granulosa bovinas, cardiomiocitos de rata, células pancreáticas INS-1, linfocitos de ratón, etc.), incluyendo a células del sistema inmune. Se ha demostrado que la GH tras unirse a sus receptores activa la proteína Janus cinasa (JAK2) la cual a su vez puede fosforilar y activar a otras proteínas como cinasa focal de adhesión (FAK), Ras y Raf, fosfatidilinositol-3 (PI-3) cinasa, Akt/proteína cinasa B, proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK), c-Jun cinasa (JNK), fosfolipasa C (PLC) y proteína cinasa C (PKC), todas estas proteínas median los efectos de la GH en las células blanco. De manera específica se ha determinado que en la línea celular Ba/F3 (precursoras de linfocitos B), los cuales normalmente no expresan el receptor a GH, se les hace expresar el receptor y al

evaluar el efecto de la GH sobre la apoptosis se encontró que inhibía la apoptosis y que este efecto estaba mediado a través de la vía de PI3K/Akt (70), lo cual es una clara evidencia de que esta vía podría estar involucrada en mediar el efecto antiapoptótico de la GH en células del sistema inmune, y para efectos de este trabajo los linfocitos de la bolsa de Fabricio (los cuales expresan de manera normal el receptor a GH). Sin embargo esto no descarta que alguna otra de las vías que pueden ser activadas por la GH sea responsable de este proceso. Por tanto queda abierta la pregunta sobre cuál es la vía de señalización que está mediando los efectos de la GH en la bolsa de Fabricio.

Este es el primer trabajo que señala la relación entre la GH y su papel en la apoptosis en la bolsa de Fabricio, los datos obtenidos nos permiten señalar que la GH inhibe la apoptosis en las células de la bolsa de Fabricio y que, en verdad la apoptosis en este órgano se incrementa durante la fase de involución, lo cual puede correlacionarse con los estudios previos realizados en nuestro laboratorio, los cuales señalaron un decremento en la concentración de la proteína y el mensajero de la GH durante la fase de involución. La posibilidad de un efecto indirecto de la GH a través de IGF-I no se descarta por lo que estudios posteriores deberán contestar a esta pregunta y ya sea que el efecto de la GH sea directo o indirecto, los estudios que

se realicen en el futuro deberán centrarse en los mecanismos moleculares específicos que median el efecto de la GH.

CONCLUSIONES

Hay un incremento significativo de la apoptosis en la bolsa de Fabricio de pollo con respecto a la edad. A las 18 semanas de edad la proporción de apoptosis fue mayor ($2.5 \pm 1.22\%$) con respecto a 1 y 4 ($0.04 \pm 0.002\%$, $0.06 \pm 0.025\%$ respectivamente).

Se determinó el efecto del tiempo de incubación sobre la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio en condiciones con suero y sin suero, en donde el primer grupo tuvo una viabilidad al tiempo 0 de $95.0 \pm 1.06\%$, a las 2 horas de $92.0 \pm 2.69\%$, a las 4 de $78.38 \pm 4.71\%$ y a las 6 de $55.88 \pm 3.96\%$, mientras que los cultivos primarios incubados sin suero mostraron una viabilidad al tiempo 0 de $95.25 \pm 0.49\%$, a las 2 horas de $94.32 \pm 3.29\%$, y a las 4 horas de $64.6 \pm 13.46\%$.

Se determinó que la viabilidad fue significativamente mayor a las 2 y 4 horas al comparar los cultivos en ausencia o presencia de suero.

Los cultivos primarios de bolsa de Fabricio mostraron un incremento significativo en la $\Delta\%$ de la viabilidad directamente

proporcional con la concentración de rcGH adicionada [0.01nM ($14.78 \pm 2.3\%$), 0.1nM ($15.73 \pm 2.68\%$), 1nM ($17.8 \pm 5.18\%$), 10nM ($22.07 \pm 4.64\%$) y 100nM ($17.38 \pm 5.02\%$)].

La proporción de apoptosis disminuye significativamente con respecto al control (49.20 ± 3.37 U/ml) con concentraciones de 1, 10 y 100nM de rcGH (29.23 ± 3.24 , 31.64 ± 2.26 , 30.55 ± 3.52 U/ml respectivamente)

REFERENCIAS

1. Millar WL, Eberhardt NL (1983). Structure and evolution of growth hormone gene family. *Endocr Rev.*, 4:97-130.
2. Arámburo C, Carranza M, Martínez - Coria H, Reyes M, Berumen L, López J, Pascacio H, Huerta L and Luna M. (2001). Molecular and functional heterogeneity of growth hormone. *Avian Endocrinology*. A Dawson and C M Chaturvedi Ed., New Delhi, India, 273-286.
3. Kopchick JJ. (2003). History and future of growth hormone research. *Horm. Res.*, 60:103-112.
4. Inzucchi SE and Robbins RJ. (1993). Clinical review 61: Effects of growth hormone on human bone biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:691-694.
5. Gevers EF, Loveridge N, Robinson IC. (2002). Bone marrow adipocytes: A neglected target tissue for growth hormone. *Endocrinol.* 143:4065-4073.
6. Jeay S, Gail ES, Paul AK, Postel-Vinay MC and Baixeras E. (2001). Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor- $\kappa\beta$ and phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinol.* 142:147-156.
7. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Señaris R, Devesa J and Arce VM. (1999). Activation of growth hormone

receptor delivers an antiapoptotic signal: Evidence for a role of AKT in this pathway. *Endocrinol.* 140:5937-5943.

8. Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. (1999). Review: Cellular survival: a play of three Akts. *Genes Dev.* 13:2905-2927.
9. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H and Komuro I. (2004). Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *The EMBO Journal* 23:212–220.
10. Kopchick JJ, Bellush LL, Coschigano KT. (1999). Transgenic models for growth hormone action. *Annu. Rev. Nutr.* 68:232-236.
11. Kopchick JJ, Okada S. (2001). Growth hormone receptor antagonist: discovery and potential uses. *Growth Horm. IGF Res.* 11:S103-S109.
12. Ji S, Frank SJ, and Messina JL. (2002). Growth hormone-induced differential desensitization of STAT5, ERK, and Akt phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 227:28384–28393.
13. Kenyon C. (2001). A conserved regulatory system for aging. *Cell.* 105: 165–168.
14. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 366:461–464.
15. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. (1996). A phosphatidylinositol- 3-OH kinase family member regulating

longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 382:536–539.

16. Paradis S, Ruvkun G. (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*. 12:2488–2498.
17. Hayflick L. (1975). Current theories of biological aging. *Fed. Proc*. 34:9–13.
18. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, and Inagaki C. (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86:4284–4291.
19. Hattori N, Shinomura K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Ikekubo K, and Kurahachi H. (1993). Growth Hormone (GH) secretion from human lymphocytes is up-regulated by GH, but not affected by insulin-like growth factor-I. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 76: 937-939.
20. Sabharwal P and Varma S. (1996). Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 81:2663-2669.
21. Lempereur L, Brambilla D, Scoto GM, D'Alcamo M, Goffin V, Crosta L, Palmucci T, Rampello L, Bernardini R, Cantarella G. (2003). Growth hormone protects human lymphocytes from irradiation-induced cell death. *Br. J. Pharmacol*. 138:1411-1416.

22. Kelly PA, Djiane J., Postel Vinay MC, Edery M. (1991) The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr. Rev.* 12:235-251.
23. Postel-Vinay MC, Coelho VM, Gagnerault MC and Dardenne M. (1997). Growth hormone stimulates proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinol.* 138:1816-1820.
24. Gavrieli, Y., Sherman Y, Ben-Sasson S.A. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
25. Schmitz GG, Seibl WR and Kessler. (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192: 222-231.
26. Compton M and Waldrip HM. (1998). Endogenous activation of apoptosis in bursal lymphocytes: inhibition by phorbol esters and protein synthesis inhibitors. *Cell. Immunol.* 184:143-152.
27. Neiman PE, Thomas SJ, Loring G. (1991). Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 88: 5857-5861.
28. Hull KL, Thiagarajah, Harvey S. (1996). Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res.* 286:69-80.

29. Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C. (2005). Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144:28–37.
30. Compton MM, Wickliffe JK. (1999). Multiparametric assessment of bursal lymphocyte apoptosis. *Dev. Comp. Immunol.* 23:487-500.
31. Holzenberger M (2004) The GH/IGF-I axis and longevity. *Eur. J. Endocrinol.* 151:S23–S27.
32. Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T, and Yamaza H. (2003). Lifespan extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *J. FASEB.* 17:1108-1109.
33. Ji S, Frank SJ, and Messina JL. (2002). Growth hormone-induced differential desensitization of STAT5, ERK, and Akt phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277:28384-28393.
34. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M and Diederich M. (2003). An introduction to the molecular mechanism of apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010:1-8.
35. Itahana K, Dimri G and Campisi J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* 268:2784-2791.
36. Herbig U, Sedivy JM. (2006). Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the store. *Mech. Ageing Dev.* 127:16-24.

37. Gartel AL and Radhakrishnan SK. (2005). Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences. *Cancer Res.* 65:3980-3985.
38. Meng F, Liu L, Chin PC, and D'Mello SR. (2002). Akt Is a Downstream Target of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 277:29674-29680.
39. Shiojima I, Walsh K. (2002). Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. *Circ Res.* 90:1243-125.
40. Lieberthal W, Triaca V, Koh JS, Pagano PJ and Levine JS. (1998). Role of superoxide in apoptosis induced by growth factor withdrawal. *The Am. J. Physiol.* 98:0363-6127.
41. Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E and Kovacs K. (1998). The anterior pituitary. In: *Willians textbook of Endocrinology*. 9th ed. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen Eds. 9: 249-250.
42. Devesa J., Lima L., and Tresguerres AF. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3: 175-183.
43. Susan LF and Brad TC. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73:1907-1916.
44. Frago L M, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente JS, and Chowen JA (2002) Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinol.* 143:4113-4122.

45. Sirotkin AV and Makarevich AV. (1999). GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of cAMP/protein kinase A system. *J. Endocrinol.* 163:317-327.
46. González-Juanatey J R, Piñeiro R, Iglesias M J, Gualillo O, Kelly P A, Diéguez C and Lago F. (2004). GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured *in vitro* through a calcineurin-dependent mechanism. *J. Endocrinol.* 180: 325–335.
47. Jensen J, Galsgaard ED, Karlsen AE, Lee YC and Nielsen JH. (2005). STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1 β , interferon- γ and tumour necrosis factor α induced apoptosis independent of nitric oxide production. *J. of Endocrinol.* 187: 25–36.
48. Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Furukawa V, Ikeda S, and Muto T. (1998). Growth hormone inhibits apoptosis and up-regulates reactive oxygen intermediates production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 22:368-374.
49. Faner DS and King JR. (1973). *Avian Biology*. Academic press. New York. 3:260-262.
50. Zapata AG and Cooper EL. (1990). *The bursa of Fabricius in the immune system comparative histophysiology*. John Wileyand Sons. Great Britain Eds. 335.

51. Ackerman GA. (1962). Electron microscopy of the bursa of Fabricius of the embryonic chick with particular reference to the lympho-epithelial nodules. *J. cell Biol.* 13:127-146.
52. Hodges RD. (1974). *The histology of the fowl*. Academic Press. Great Britain. 1:648.
53. Frasier AJ. (1974). The ultra structure of the lymphoid follicles of the chick bursa of Fabricius. *Acta Anat.* 88:385-397.
54. Paniagua R y Nistal M. (1983). *Introducción a la histología animal comparada*. Labor Eds. Madrid, España. 1:438.
55. Romppanem T. (1982). Postembrionyc development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. *Puoultry Sci.* 61:2261-2270.
56. Betti F, Ulmer Worsmann T, DeFaria FP and Sesso A. (1991). Development of the cloacal bursain the domestic fowl. II A quantitative and fine structural analisys of the follicular cortex and medulla. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23:613-628.
57. DeAzevedo RB and Betti F. (1993). Increase of the bursal follicular medullary compartment in chicks introcloacally inoculated with *Bordetella pertussis*. *Tissue and Cell* 25:517-525.
58. Oláh I and Glick B. (1992). Follicle associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments. *Anat. Rec.* 223:577-587.
59. Naukkarinen A and Sorvari TE. (1984). Involution of the chicken bursa of Fabricius. A light microscopic study with

- special reference to transport of colloidal carbon in the involving bursa. *J. Leukocyte Biol.* 35:281-290.
60. Glick B. (1984). Interrelation of the avian immune and neuroendocrine system. *J. Exp. Zool.* 232:671-682.
61. Hull KL, Thiagarajah A, Harvey S. (1996). Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res.* 286:69-80.
62. Arnold RE and Weigent DA. (2004). The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmun.* 11:149-59.
63. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, and Baixeras E. (2000). Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear Factor-kB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. *Mol. Endocrinol.* 14: 650-661.
64. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7:248-254.
65. Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C (2005) Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144:28-37.
66. Glick, B. (1988). Bursa of Fabricius: development, growth, modulation and endocrine function. *CRC Crit. Rev. Poult. Biol.* 1:107-132.

67. Paramithiotis E. and M. J. H. Ratcliffe. (1994). Survivors of bursal B cell production and emigration. *Poult. Sci.* 73:991–997.
68. Compton MM, Gibbs PS, and Johnson LR. (1990). Glucocorticoid activation of deoxyribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. *Poult. Sci.* 69:1292–1298.
69. Higgins SE, Berghman LR, Moore RW, Caldwell DJ, Caldwell DY, Tizard I, and Hargis BM. (2002). *In situ* detection and quantification of bursa of Fabricius cellular proliferation or apoptosis in normal or steroid-treated neonatal chicks. *Poult. Sci.* 81:1136–1141.
70. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay M, Kelly PA, and Baixeras E. (2002). Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 1-7.
71. Arámburo C, Campbell RM and Scanes CG. (1989). Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life sci.* 45:2201-2207.
72. Smith P. (1930). The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anat. Rec.* 47:119–143.
73. Baroni C. (1967). Mouse thymus in hereditary pituitary dwarfism. *Acta Anat.* 68:361–373.

74. Baroni C. (1967). Thymus, peripheral lymphoid tissues and immunological responsiveness of the pituitary dwarf mouse. *Experien.* 23:282–283.
75. Baroni CD, Fabris N, and Bertoli G. 1967 Age dependency of the primary immune response in the hereditary pituitary dwarf and normal Snell/Bagg mouse. *Experientia.* 23:1059–1060
76. Buul-Offersa SC, and Kooijmanb R. (1998). The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1083–1094.
77. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA and Waters MJ. (2007). Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Article in press.
78. Keith WK, Douglas AW and Ron K. (2007). Protein hormones and immunity. *Brain Behav. Immun.* 21:384-392
79. Zermeño C, Guzmán-Morales J, Macotella Y, Nava G, López-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, Martínez de la Escalera G and Clapp C. (2006). Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J. Endocrinol.* 189:1-8
80. Forsyth IA. (1984). Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: The roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *Dairy Sci.* 69:886--903

81. Perks CM, Newcomb PV, Grohmann M, Wright RJ, Mason HD and Holly JMP. (2003). Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* 18:2672-2677
82. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND and Buckley AR. (2003). Prolactin Suppresses Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis *in Vivo*. *Endocrinol.* 144:2102–2110
83. Dimmeler S and Zeiher AM. (2000). Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ. Res.* 87:434-439
84. Ying W, Zhang H and Sanders PW. (2007). EGF receptor activity modulates apoptosis induced by inhibition of the proteasome of vascular smooth muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 131–142
85. Kwak H J, Lee S J, Lee Y, Ryu CH, Koh KN, Choi HY and Koh GY. (2000). Angiotensin-1 inhibits irradiation- and mannitol induced apoptosis in endothelial cells. *Circul.* 101:2317-2324
86. Hull KL, Luna M, Harvey S and Arámburo C (2005) Growth hormone: a pituitary and extrapituitary chameleon during development. *Functional Avian Endocrinology* A Dawson and C M Chaturvedi Ed., New Delhi, India, 273-286.
87. Devesa J, Lima L, and Tresguerres A F (1992) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3:175-183.
88. Ciriaco E, Piñera P P, Díaz-Esnal B and Laura R (2003) Aged-Related changes in the avian primary lymphoid organ

(thymus and bursa of Fabricius). *Microscopy Research and technique* 62:482-487.