



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“EFECTO PROTECTOR DE LA HORMONA DE  
CRECIMIENTO (GH) EN CULTIVOS NEURONALES DE  
POLLO”**

**GRADUACIÓN POR TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M en C CLARA ALBA BETANCOURT**

**TUTOR**

**DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. MA. DE LA LUZ NAVARRO ANGULO  
FACULTAD DE MEDICINA. UNAM**

**DRA. MA. TERESA MORALES GUZMÁN  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MÉXICO NOVIEMBRE 2013**



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.

## ÍNDICE

i. Resumen	1
ii. Abstract	3
<b>1. Antecedentes</b>	4
1.1. Muerte celular por hipoxia-isquemia	4
1.2. Mecanismo de acción de la GH	8
1.3. GH extrahipofisiaria	9
1.4. GH en el sistema nervioso central	10
1.5. Hormona de Crecimiento (GH) y apoptosis	11
<b>2. Justificación</b>	12
<b>3. Hipótesis</b>	13
<b>4. Objetivo General</b>	13
4.1. Objetivos Particulares	13
<b>5. Diseño Experimental</b>	14
5.1 Evaluación de la presencia de GH y su receptor (GHR).	14
5.2. Determinación del efecto neuroprotector de GH y del fragmento de 15kDa en cultivos primarios de células de cerebelo de embrión de pollo de 15 días	15
<b>6. Materiales y Métodos</b>	15
6.1. Modelo experimental	15
6.2. Obtención de tejidos	16
6.3 RT-PCR	16
6.4 Clonación y secuenciación del ADNc	17
6.5. Hibridación in situ (HIS)	18
6.5.1. Síntesis de la sonda	18
6.5.2. Protocolo de hibridación	18
6.6. Inmunohistoquímica de GH y GHR	19
6.7. Establecimiento de cultivos primarios	21
6.8. Establecimiento de las condiciones de hipoxia y baja glucosa (HBG)	21
6.8.1. Inducción del daño	21
6.8.2. Medición de la concentración de GH durante HBG	22
6.8.2.1. ELISA	22
6.9. Efecto de GH en cultivos sometidos HBG	23
6.10. Inmunocitoquímica de los cultivos celulares	23
6.11. Determinación de la viabilidad celular	24
6.11.1. Azul de tripano	24
6.11.2. MTT (reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)	25
6.12. Evaluación de la apoptosis.	26
6.12.1. Actividad de caspasa-3.	26

6.12.2. Evaluación de la condensación de material genético por TUNEL, fluorescencia	27
6.13. Efecto antiapoptótico de GH durante HBG	28
6.13.1. Análisis densitométrico	29
6.14. Análisis estadístico.	29
<b>7. Resultados</b>	<b>30</b>
7.1. Presencia del ARNm de GH	30
7.2. Secuenciación del ADNc de GH	31
7.3. Distribución de GH en el cerebelo de pollo	32
7.4. Presencia de GHR en el cerebelo.	34
7.5. Estandarización y caracterización de los cultivos primarios de cerebelo	36
7.6. Efectos de la hipoxia y baja glucosa (HBG)	38
7.7. Efectos de GH sobre la viabilidad celular	39
7.8. Efecto anti-apoptótico de GH durante HBG	41
7.8.1. Medición de actividad de caspasa-3	41
7.8.2. Medición de fragmentación de ADN por TUNEL	42
7.9. Efectos de la wortmanina sobre la viabilidad celular y la apoptosis	43
7.10. Efecto de la GH en la activación de la vía de PI3K/Akt	44
7.11. Activación de Bcl-2 por GH	46
7.12. Efecto del fragmento de 15 kDa de GH durante la HBG	47
<b>8. Discusión</b>	<b>48</b>
<b>9. Conclusión</b>	<b>55</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>57</b>

## **i. Resumen.**

La neuroprotección es un conjunto de mecanismos del sistema nervioso central (SNC) cuya finalidad es proteger a las neuronas que son sometidas a diferentes tipos de daño. Se sabe que la hormona de crecimiento (GH) está implicada en la supervivencia celular y puede inhibir la apoptosis en varios tipos de células, incluyendo las del SNC.

En este trabajo demostramos que el gen de GH y el de su receptor (GHR) se expresan en el cerebelo; dicha expresión se analizó por hibridación *in situ* y secuenciación del ADN complementario (ADNc), así como también, se determinó su distribución por inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Los resultados mostraron que el ARN mensajero (ARNm) de GH se expresa principalmente en las células de Purkinje y en las células de la capa granular del cerebelo y su secuencia de nucleótidos es homóloga al ADNc de GH de la hipófisis.

La inmunorreactividad a GH se observa ampliamente distribuida en el cerebelo y coincide con el mensajero siendo más abundante en las células de Purkinje y en la capa granular, identificadas mediante la utilización de marcadores neuronales específicos.

De igual manera, se detectó la presencia del ARNm del receptor a GH (GHR) y su expresión en células de Purkinje y granulares.

Estos datos sugieren que tanto la GH como su receptor se expresan de manera local en el cerebelo y que esta hormona puede actuar como un factor autócrino/parácrino en esta estructura cerebral.

Mediante ensayos *in vitro* en cultivos primarios de neuronas de cerebelo de embriones de pollo se investigó el posible papel neuroprotector de GH en este órgano bajo condiciones de hipoxia / isquemia.

Los niveles endógenos de GH aumentaron (1.16 veces) en los cultivos tratados durante 1 hora en condiciones de hipoxia (0.5% de O<sub>2</sub>) y baja glucosa (1 g / L) (HBG) comparados con el control.

Por otra parte, la adición de GH recombinante de pollo (rcGH) en concentración 1 nM durante HBG a los cultivos de neuronas, aumentó la viabilidad celular (1.7 veces) y la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (1.67 veces), en tanto que, disminuyó la actividad de caspasa-3 y la proporción de células apoptóticas (1.6 y 2.18 veces, respectivamente).

Estudios previos han mostrado la presencia de un fragmento de 15-kDa de GH en el cerebelo de pollos de diferentes edades, por lo que se agregó un fragmento de 15kDa

generado de la hidrólisis de la rcGH a los cultivos sometidos a HBG (1 y 10 nM), se observó que éste aumentó la viabilidad celular, mientras que disminuyó la actividad de caspasa-3.

Se exploró la vía por la cual la rcGH tiene su efecto antiapoptótico y se observó que la vía PI3K/Akt fue activada tanto en condiciones de normoxia como de HBG, aumentando la proporción de Akt fosforilado (1.7 y 1.4 veces, respectivamente).

Este efecto fue abolido por wortmanina y por inmunoneutralización, lo que indica que GH actúa a través de esta vía de señalización.

Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo apoyan el hecho de que la GH puede actuar como un factor neuroprotector de manera parácrina/autócrina, mediante el mantenimiento de la viabilidad celular y la inhibición de la muerte celular por apoptosis.

## **ii. Abstract.**

Neuroprotection is a mechanism within the central nervous system (CNS) that protects neurons from damage as a result of a severe insult. It is known that growth hormone (GH) is involved in cell survival and may inhibit apoptosis in several cell types, including those of the CNS. Both GH and GH-receptor (GHR) genes are expressed in the cerebellum. Cerebellar GH expression was analyzed by *in situ* hybridization and cDNA sequencing, as well as by confocal microscopy. We demonstrated that the GH gene was expressed in the chicken cerebellum and that its nucleotide sequence is closely homologous to pituitary GH cDNA. Within the cerebellum, GH mRNA is mainly expressed in Purkinje cells and in cells of the granular layer. GH-immunoreactivity (IR) is also widespread in the cerebellum and is similarly most abundant in the Purkinje and granular cells as identified by specific neuronal markers and histochemical techniques. GH receptor (GHR) mRNA and protein are also present in the cerebellum and are similarly mainly present in Purkinje and granular cells. Together, these data suggest that GH and GHR are locally expressed within the cerebellum and that this hormone may act as a local autocrine/paracrine factor during development of this neural tissue. Thus, we investigated the possible neuroprotective role of GH in this organ, which is very sensitive to hypoxic/ischemic conditions. Endogenous GH levels increased in primary embryonic cerebellar neuron cultures treated under hypoxia (0.5% O<sub>2</sub>) and low glucose (1g/L) conditions (HLG) for 1 h, GH levels increased 1.16-fold compared to the control. The addition of 1 nM recombinant chicken GH (rcGH) to cultures during HLG increased cell viability (1.7-fold) and the expression of Bcl-2 (1.67-fold); in contrast the caspase-3 activity and the proportion of apoptotic cells decreased (1.6- and 2.18-fold, respectively) compared to HLG. Furthermore, previous reports from our lab have determined the presence of a 15-kDa GH fragment, and this fragment was added to the cell cultures (1 and 10 nM) and an increase in cell viability was observed, while caspase-3 activity decreased during HLG condition. rcGH activated the PI3K/Akt pathway both under normoxic and HLG conditions, increasing the proportion of phosphorylated Akt (1.7- and 1.4-fold, respectively). This effect was abolished by wortmannin and by immunoneutralization, indicating that GH acts through this signaling pathway. Thus GH may act as a paracrine/autocrine neuroprotective factor that preserves cellular viability and inhibits apoptotic cell death.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Muerte celular por hipoxia-isquemia.

Durante las etapas tempranas del desarrollo, el sistema nervioso central (SNC) es extremadamente sensible a influencias dañinas como pueden ser la falta de nutrientes y oxígeno [69]. Principalmente las neuronas son consideradas como las células más sensibles a la falta de oxígeno. La administración deficiente de oxígeno y un pobre flujo sanguíneo en una zona particular del cerebro fetal o del recién nacido conlleva a un daño causado por la activación de varios agentes citotóxicos y vías de señalización que inducen a alteraciones severas o la muerte [81; 29; 13; 67]. En fetos a término (más de 36 semanas de gestación) las neuronas más afectadas son las de la corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales-tálamo; mientras que los fetos pre término desarrollan daño difuso de la materia blanca [11]. En particular, se ha reportado la muerte de las células de Purkinje así como la reducción de las capas del cerebelo en modelos fetales de hipoxia e isquemia (HI) tanto en humanos como en borregos [64].

La hipoxia es considerada como un factor de riesgo importante que puede resultar en problemas cerebrales como parálisis y convulsiones, así como la pérdida de habilidades de aprendizaje y problemas de comportamiento por una exposición larga a la disminución de oxígeno [84; 94].

Aunque aún existe controversia acerca del mecanismo exacto en el que ocurre la muerte celular después de un proceso de daño cerebral inducido por una baja afluencia de nutrientes y de oxígeno, como puede ser el caso de la isquemia cerebral (reducción del flujo sanguíneo), existe evidencia de que la muerte ocurre tanto por necrosis como por apoptosis [17].

Durante la hipoxia/isquemia *in vivo*, se rompe severamente el metabolismo energético, con una rápida caída en los fosfatos de alta energía [20]. Se han relacionado a las alteraciones en el metabolismo oxidativo así como la entrada masiva de calcio en el citoplasma con los componentes principales en las alteraciones celulares durante la asfixia, especialmente en regiones vulnerables [111].

Estudios de Sugawara y colaboradores [116] han demostrado que la vía de señalización de la muerte celular en la isquemia corresponde tanto a la vía intrínseca de la apoptosis (mitocondrial) como a la extrínseca (mediada por receptor). En el caso de modelos animales de isquemia cerebral, la vía intrínseca de la apoptosis se ha demostrado de manera reciente con la liberación del citocromo c mitocondrial, que es





Un estudio reciente demostró que el PARP interviene en la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF) de la mitocondria y su traslocación al núcleo para el daño del ADN y de la apoptosis [28]. Asimismo hay proteínas que pueden prevenir la activación de las caspasas en el citosol. La familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP por sus siglas en inglés) suprime a la apoptosis previniendo la activación de las procaspasas y también inhibiendo la actividad enzimática de las caspasas activas. El segundo activador de caspasas proveniente de la mitocondria (Smac) también es liberado ante un estímulo apoptótico y se une a los IAPs promoviendo la activación de la caspasa 3 [28].

Otro trabajo [115], señala que la liberación tanto de citocromo c como de Smac de la mitocondria precede la activación de las caspasas después de una isquemia global, lo que sugiere la importancia de la inhibición de las IAPs así como de la activación de las caspasas.

Por otro lado, es importante señalar que estos mecanismos celulares son regulados por las especies reactivas de oxígeno y del estado redox de la célula durante la isquemia cerebral y la reperfusión. La sobreexpresión de la superóxido dismutasa citosólica dependiente de cobre y zinc (SOD1) en el ratón o en las ratas, reduce de manera significativa los mecanismos de muerte celular que involucran la liberación del citocromo c y de Smac, la activación de las caspasas 9 y 3, la unión de Smac con IAP, la activación de PARP y la fragmentación de ADN. En contraste, la deficiencia tanto de SOD1 o de la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso exagera de manera significativa los mecanismos de muerte celular. Estos resultados sugieren que tanto el estrés oxidativo como el estado redox pueden funcionar como controladores moleculares ya sea para la supervivencia o muerte celular durante la isquemia y la reperfusión [114; 115; 116].

En el caso de la muerte celular por apoptosis mediada por receptor es iniciada por miembros de la familia de receptores de muerte, como pueden ser el receptor de Fas y del factor de necrosis tumoral. En el mecanismo del receptor de Fas, el ligando extracelular de Fas se une al receptor y a la molécula adaptadora, dominio proteico de muerte asociado a Fas, que activa a la procaspasa 8, la cual a su vez va a activar a la caspasa 3 que rompe PARP y activa CAD, conduciendo al daño de ADN y a la muerte celular [116].

Por otro lado, existen mecanismos de sobrevivencia para contrarrestar la maquinaria de muerte celular apoptótica. Las cinasas serina/treonina, tal como Akt/proteín cinasa B, son reguladores claves de la muerte neuronal y la supervivencia después de la isquemia cerebral [89]. Akt funciona como el principal blanco de la cinasa fosfatidil inositol 3 (PI3-K), y después de su fosforilación, procede a fosforilar algunos substratos en los residuos de serina o treonina, incluyendo Bad, el cual, al ser fosforilado se inactiva inhibiendo la liberación del citocromo c, ya que se evita la formación del poro con Bax en la membrana mitocondrial [89]

La familia de proteínas cinasas activadas por mitosis (MAPK) incluyen la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y de la respuesta celular a las citocinas y al estrés. En este mecanismo, Ras recluta al efector principal, Raf-1, para activar la cinasa MAPK/ERK que a su vez inactivará a Bad [88].

La fosforilación de ERK está involucrada en la muerte celular después de una oclusión media transitoria de la arteria cerebral [88]. La fosforilación del residuo de serina 155 en Bad es regulada por la proteín cinasa A (PKA) en estudios *in vitro*. En modelos de isquemia focal cerebral de roedores, la inyección intraventricular de un inhibidor de PKA llamado H89, suprime de manera efectiva la actividad de PKA y la dimerización de Bad/Bcl-XL con la subsecuente muerte celular por apoptosis [101]. Estas evidencias sugieren que las vías de Akt y PKA inhiben la función de Bad como un mecanismo de sobrevivencia celular después de la isquemia cerebral.

Un modelo para el estudio de los mecanismos que participan en el daño por hipoxia perinatal es el cerebro de pollo en sus etapas embrionarias. El cerebro de embrión de pollo provee un amplio espectro de niveles de desarrollo en periodos críticos relativamente cortos, haciéndolo un sistema ideal para su estudio. En particular, el cerebelo de las aves es comparable a su contraparte en los mamíferos tanto en su histología como en su grado de diferenciación [82]. Aunque las células neuronales en cultivo son un modelo *in vitro* y sólo sirven como un modelo simplificado, resultan ser muy útiles en elucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en varias patologías, incluyendo la hipoxia cerebral [91]. Dependiendo de la duración de la privación de oxígeno en un modelo de cultivo de neuronas de cerebro de rata en desarrollo, la hipoxia puede causar la muerte celular por apoptosis [19].

## 1.2. Mecanismo de acción de la GH

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocinas, en la que se encuentran también los receptores a PRL, citocinas interferón e interleucinas entre otros. Se caracteriza por contener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular [51; 26]. Los GHRs muestran heterogeneidad molecular que también puede contribuir con la diversidad funcional de la GH. El GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas como la glicosilación y ubiquitinación.

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando la dimerización del mismo además de cambios estructurales importantes [46]. Estos cambios generan la unión del GHR y una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación de ambos por la misma JAK2. Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, en la que participan las proteínas SHC, Grb2, posiblemente Sos, Ras, Raf y posteriormente las proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK) [106; 26].

La GH también induce la expresión de genes que codifican factores de transcripción involucrados en la proliferación celular, como por ejemplo c-myc. La regulación de eventos metabólicos por GH refleja la expresión de genes específicos para cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas a través de c-fos. Así mismo, interfiere en la expresión de algunos de los transportadores de glucosa (GLUT1) [117; 26] y, en el hígado, en la manifestación del gen que codifica para IGF-1 [26].

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiendo del tipo celular, en la que participa JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat, que son transductoras y activadoras de la transcripción. Éstas se unen a otras proteínas formando homo y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el ADN, activando la transcripción de genes blanco [26].

Una tercera vía de transducción de GH interviene en el efecto tipo insulina, es decir, en el aumento del transporte de glucosa por reclutamiento de GLUT1 y 4 en la membrana. En esta vía la GH y la insulina comparten moléculas señal como las llamadas “sustrato principal del receptor de insulina” (IRS). En respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2, y se piensa que esto se lleva al cabo a través de JAK2. En

consecuencia, se activa la cascada de fosfatidilinositol, que se sabe aumenta el transporte de glucosa, la síntesis de ADN y la actividad de una enzima implicada en el ciclo celular, p70, de 15kDa. También se conoce que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependientes de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina [26].

En la señalización de respuesta a GH, se ha reconocido una cuarta vía, aquella en la que se activa una proteína cinasa C (PKC) que se requiere en efectos como lipogénesis, expresión de c-fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y activación de otras cinasas. La activación de la PKC ocurre mediante la unión del GHR a una proteína G, que a su vez se une a la fosfolipasa C, y, en consecuencia, se produce diacilglicerol (DAG), que es un activador de PKC. El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular se produce por apertura en los canales tipo L activados por voltaje, y es importante en algunos efectos de la GH, como del tipo insulina. Otro efecto de GH que requiere el efecto permisivo de PKC es la expresión de enzimas como el citocromo p450 que está involucrado en el metabolismo de esteroides en ambos sexos e influido por las diferencias sexuales en la secreción de GH [51; 26].

### 1.3. GH extrahipofisaria

Como se mencionó anteriormente, la GH y su ARN mensajero se producen primordialmente en los somatotropos hipofisarios, sin embargo en años recientes se ha descrito su presencia en diversos tejidos extrahipofisarios. Se ha determinado en: tejido neural [125;53), en el sistema inmune [63; 97], en el tejido intergumentario [92; 113], en el sistema esquelético [54], en el sistema respiratorio [4], en el sistema digestivo [121], en el sistema cardiovascular [33; 122; 97], y en tejidos ortodónticos de varias especies [71].

En el pollo se ha identificado el ARNm de GH en cerebro [98, 3], en el bazo, timo y bursa [99; 76; 77; 100], y en ojo de embriones y adultos [118; 14]. 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 [75; 57] y en hembras [61; 1].

### 1.4. GH en el sistema nervioso central

En el sistema nervioso central, la GH promueve el crecimiento cerebral, la mielinización, arborización neuronal, diferenciación neuronal y las funciones

cognitivas. En varios tipos de células de tejido nervioso, tales como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y en la microglia del cerebro de ratas neonatas, se ha determinado la presencia del receptor de la GH (GHR) [74].

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 [90].

Diversos estudios han mostrado la presencia de inmunorreactividad a GH (GH-IR) en varias áreas del sistema nervioso del humano y la rata. En la rata se encontró que las áreas con mayor inmunorreactividad a GH fueron la médula espinal, eminencia media, cerebelo, hipocampo e hipotálamo [59]. También se ha mostrado la presencia de ARNm de GH en putamen, estriado, tálamo ventral, formación reticular, corteza basal; de manera discreta en hipocampo de rata por hibridación *in situ*, aunque no en el hipotálamo, en donde la GH-IR está concentrada principalmente [47].

Otros estudios determinaron la distribución de GH y su receptor en cerebros de diferentes especies como se muestra en la Tabla 1.

Especie	Presencia de GH	Estructura cerebral	Referencia
<b>Humano</b>	GHR GH-IR	Plexos Coroides Hipotálamo, hipocampo	Nyberg et al., 2000 [90]
<b>Rata</b>	GHR GH-IR ARNm	Amígdala, cerebelo, hipotálamo, hipocampo, bulbo olfatorio	Lobie et al., 1993 [74]
<b>Pavo y paloma</b>	GH-IR ARNm	Glándula pineal, hipotálamo, hipocampo	Ramesh et al., 2000 [96]
<b>Embrión de pollo</b>	GH-IR ARNm ARNm, GH-IR	Médula espinal, tejidos ópticos y óticos, corteza cerebral y cerebelo. Cerebelo	Harvey et al., 2003 [56] Alba 2011 [3]

Tabla 1. Presencia de GH-IR, su receptor y su ARNm en diversas estructuras cerebrales tanto de mamíferos (humano y rata) como de aves (pavo y paloma, embrión de pollo).

En el cerebro de pollo adulto se han encontrado GHRs en células gliales y neuronas (Harvey et al., 2003), así como también se han mostrado sitios de unión de la GH en el

hipotálamo, plexos coroides, cerebelo, lóbulos ópticos [10] en esta misma especie. En coincidencia con esto, se ha determinado la presencia de GH-IR en hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo, y se ha visto que la concentración de la misma cambia con el desarrollo [3]. En embriones de pollo se ha detectado inmunorreactividad a la GH en la médula espinal, vesículas ópticas y óticas y en la retina neural [53].

En la vida fetal GH e IGF-I tienen un papel importante en el desarrollo y diferenciación del SNC [35]. 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 [56]. Por otra parte, se ha asociado una reducción en el número de receptores a GH en cerebro con respecto al incremento de la edad.

#### 1.5. Hormona de Crecimiento (GH) y apoptosis.

La GH se ha considerado que puede actuar como una citocina y que forma parte del grupo de factores que intervienen en la sobrevivencia celular [34].

Como ya se mencionó en la sección 1.2, para que pueda ejercer sus efectos, la GH interactúa con su receptor, e induce la activación de la vía de fosfatidil inositol cinasa 3 y la proteína cinasa B (PI3K/Akt), a través de la fosforilación de la proteína designada sustrato del receptor de insulina (IRS). Una vez activada Akt puede fosforilar a diversos sustratos, entre ellos moléculas involucradas con vías apoptóticas como son caspasa 9 y Bad [66].

Además de los efectos de la GH sobre el sistema nervioso que se mencionan previamente, se ha establecido que los efectos en la proliferación de neuronas cerebrocorticales está mediada por acciones antiapoptóticas de la GH, la cual promueve la supervivencia celular [2]. Otros estudios han señalado que GH tiene un efecto neuroprotector, ya que puede inhibir la muerte celular inducida por daños por hipoxia/isquemia [108]. Ante un daño de hipoxia-isquemia se observa un aumento en la inmunorreactividad a GH y cuando se administra intraventricularmente antes del daño es capaz de prevenir la muerte celular [108].

En un estudio realizado en ratas que fueron estimuladas con GH (100µg/d) o hexarelina (GHRP-6, 150µg/d) por medio de bombas Alzet (1µl/d) conectadas a la yugular, demostró un aumento en la fosforilación de Akt en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo, sugiriendo que la activación de los mecanismos intracelulares que involucran

a Akt pudieran ser activados por GH [40]. De la misma manera, una vía de señalización fue descrita en células leucémicas de humano (HL-60) y en células de ovario del hámster chino por medio de la cual la GH promueve la sobrevivencia celular a través de la inducción de Akt [34]. También se observó un aumento en la fosforilación de Bad con su consecuente inactivación tanto en el hipotálamo como en el cerebelo, que pudiera ser también otro mecanismo por el cual se previene la muerte celular [40].

Otra familia de proteínas que participan en los procesos de la muerte celular es la familia Bcl. Se ha identificado que un aumento en la expresión de Bcl-2 puede ser un evento crítico por medio del cual los factores de crecimiento promueven la sobrevivencia celular [119; 12]. Bcl-2 se expresa en las neuronas de muchas estructuras cerebrales participando en la prevención de la muerte neuronal natural e inducida. Promueve también el crecimiento y la regeneración de los axones sugiriendo su posible participación en la reparación cerebral y la plasticidad neuronal [28]. La GH es capaz de aumentar los niveles de Bcl-2 en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo [40].

También se sabe que muchas de las acciones de la GH son mediadas a través de la estimulación de la síntesis del IGF-1. Este factor de crecimiento promueve la sobrevivencia así como la proliferación celular en muchos tejidos. Con la estimulación por GH se induce la expresión del ARNm de IGF-1 en áreas específicas del cerebro como son el hipotálamo, hipocampo y cerebelo [40].

## **2. Justificación**

Cuando ocurre un daño en el SNC, se producen factores neurotróficos como una estrategia endógena de neuroprotección para reducir la muerte celular [85]. Existe evidencia de que la GH además de participar en el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso central, puede inhibir la muerte neuronal debida a un daño de hipoxia-isquemia cuando es administrada antes y después del daño, sugiriendo un efecto neuroprotector [107; 110]. Estudios previos de la presencia de la GH neural plantean la posibilidad de que también pueda participar en prevenir la muerte neuronal o la apoptosis ante el daño por hipoxia y baja glucosa así como el efecto de la adición de GH exógena. Aunque los cultivos primarios de neuronas sólo sirven como un modelo *in vitro*, resultan ser muy útiles en elucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en varias patologías, incluyendo la hipoxia cerebral perinatal. [91]



### **3. Hipótesis**

La hormona de crecimiento y su receptor se encuentran presentes en el cerebelo de pollo; esta hormona tiene efecto de inhibición en la apoptosis en células de cerebelo después de haber sufrido un daño por hipoxia y baja glucosa.

### **4. Objetivo General**

Determinar la presencia del ARNm de GH y su receptor (GHR) y localización de la proteína en las células de la corteza cerebelosa de pollos de 4 semanas de edad, así como evaluar el efecto protector de la GH exógena y su fragmento de 15kDa en cultivos neuronales de cerebelo de embrión de pollo después de un daño por hipoxia y baja glucosa.

#### 4.1 Objetivos Particulares.

*I. Evaluar la presencia de GH y de GHR en la corteza del cerebelo de pollos de 4 semanas de edad.*

- a) Determinar la presencia del ARNm de GH y de GHR en cerebelo de pollos de 4 semanas.
- b) Comparar la secuencia del ADNc de la GH cerebelar con la GH hipofisiaria.
- c) Analizar la distribución celular del ARNm de GH en la corteza cerebelosa de pollos de 4 semanas.
- d) Evaluar la presencia de GH y su colocalización con su receptor por medio de técnicas de inmunofluorescencia con marcadores neuronales específicos.

*II. Determinar el efecto neuroprotector de GH en cultivos primarios de células de cerebelo de embrión de pollo de 15 días.*

- a) Estandarizar los cultivos primarios de cerebelo de embriones de pollo de 15 días de incubación.
- b) Establecer las condiciones de daño por hipoxia y baja glucosa para inducir muerte celular por apoptosis.
- c) Determinar si el efecto neuroprotector de la GH es a través de la inhibición de la apoptosis.

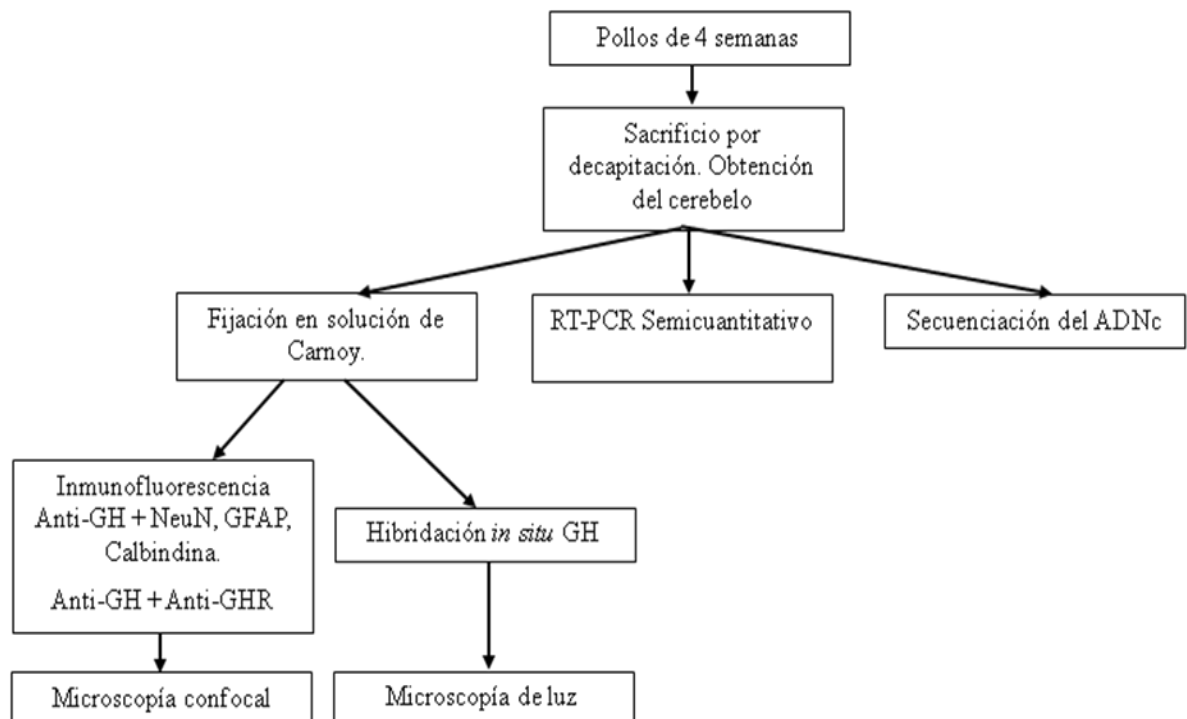
III. Caracterizar la posible vía por la cual la rcGH esté teniendo un efecto antiapoptótico después del daño de hipoxia y baja glucosa

- a) Medir la activación de la vía de PI3K/Akt por la adición de rcGH al medio de cultivo mediante la fosforilación de Akt.
- b) Medir la expresión de Bcl-2.
- c) Efecto de la adición del inhibidor de la vía de PI3K/Akt (wortmanina)

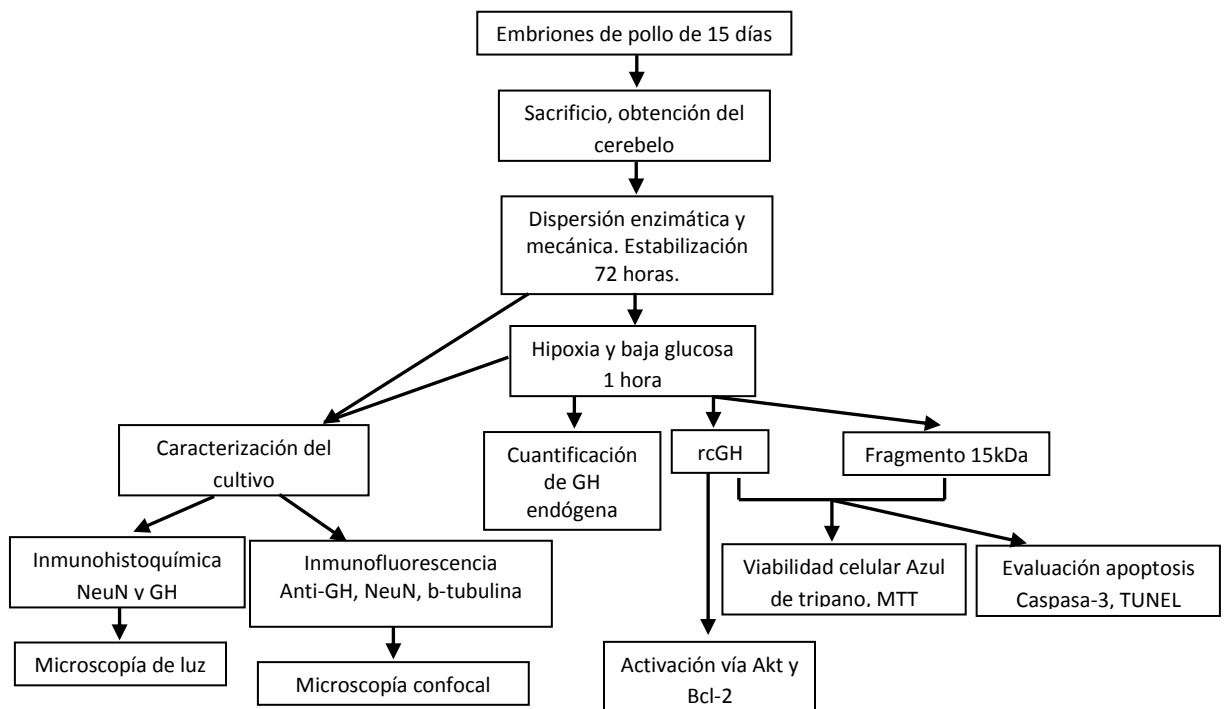
IV. Evaluar el posible efecto protector del fragmento de 15 kDa de la rcGH.

## 5. Diseño Experimental

### 5.1 Evaluación de la presencia de GH y su receptor (GHR).



## 5.2. Determinación del efecto neuroprotector de GH y del fragmento de 15kDa en cultivos primarios de células de cerebelo de embrión de pollo de 15 días.



## **6. Materiales y Métodos**

### 6.1. Modelo experimental.

Pollos de engorda raza Ros de 1 día post-eclosión fueron obtenidos de un distribuidor comercial (Grupo Abrego, Pollos de Querétaro) y se mantuvieron con agua y alimento especial para aves *at libitum* en periodo de luz oscuridad de 12:12 horas hasta que cumplieron 4 semanas de edad. Los pollos se sacrificaron por decapitación, con la aprobación del comité de Bioética del Instituto de Neurobiología.

Los huevos fértiles libres de patógenos (*Gallus gallus*, White Leghorn) se obtuvieron de Alpes (Tehuacán, México) y se incubaron a 38°C en una incubadora con humedad controlada. Los huevos rotaban un cuarto de revolución cada 50 minutos y fueron sacrificados por decapitación, anestesiándolos previamente colocando el huevo en hielo.

## 6.2. Obtención de tejidos.

El cerebelo obtenido de los pollos de 4 semanas fue fijado en solución recién preparada de Carnoy (60% etanol/30% cloroformo/10% ácido acético, v/v/v) para los estudios de inmunofluorescencia y de hibridación *in situ*, o fueron colectados en Trizol™ y puestos inmediatamente en hielo para los análisis de RT-PCR y de secuenciación. También se obtuvieron el hígado y la hipófisis de estos animales para utilizarlos como controles positivos.

## 6.3 RT-PCR.

La presencia del ARNm de GH y de GHR en el cerebelo se analizó por RT-PCR. El ARN celular total se extrajo utilizando reactivos comerciales (Trizol, Gibco-BRL, Burlington, Ont., Canadá) [30] y se analizó su pureza y su contenido, respectivamente, por espectrofotometría a 260nm y por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 1.2% (w/v).

El ADNc se obtuvo por transcripción reversa utilizando 1g de ARN total (de hipófisis como control positivo de GH, de hígado como control positivo de GHR, o de muestras de cerebelo), mezcla de dNTP (0.5 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 12 pmol de oligo-DT, 0.1% de agua estéril con dietilpírocarbonato (DEPC) en un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó en un termociclador Perkin–Elmer por 5 minutos a 65°C e inmediatamente se transfirió a hielo. Se añadieron RNase-OUT™ (Invitrogen, 40 U/µl), amortiguador 5X PCR, y 0.1 M DTT, y esta mezcla se incubó por 2 minutos a 42°C; después de este tiempo se añadió 1µl de Superscript™ III (Invitrogen, 200 U/µl) transcriptasa reversa a cada una de las muestras y se incubó a 42°C por 50 minutos. La reacción se detuvo al incubar a 70°C por 15 minutos.

La amplificación de 1µl de ADNc se realizó durante 30 ciclos en un termociclador Perkin–Elmer en una mezcla conteniendo 5µl de amortiguador 10X de PCR (200 mM Tris–HCl, pH 8.4; 500 mM KCl), 1 µl de mezcla 10 mM de dNTP, 0.5 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl, Invitrogen), y 12.5pmol de primers específicos de oligonucleótidos.

La amplificación se realizó con el siguiente protocolo:

Desnaturalización: 94°C por 3 minutos

Alineación: 50°C por 1 minuto

Extensión: 72°C por 1 minuto

Inactivación: 72°C por 10 minutos

A los controles negativos no se les agregó la Taq ADN polimerasa.

Los productos de PCR se analizaron por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (w/v) con un voltaje constante de 80V, utilizando TAE 1X (Invitrogen) como amortiguador de corrida. Las cámaras de electroforesis utilizadas son de Bio-Rad y los geles fueron visualizados con bromuro de etidio.

Las amplificaciones se realizaron en presencia de primers de oligo-nucleótidos:

GH1 (sentido: 50-GGCTCGTGGTTTTCTCCTC-30) [M. Luna, resultados sin publicar] y CLR2 (antisentido: 50- GCCTCAGATGGTGCAGTTGCTCTCTCCGAA-30) [99], diseñados para amplificar un fragmento de 645-pares de bases (pb) del ADNc de GH de la hipófisis; o en presencia de los primers Khu9 (sentido: 50-CCTCGATTTGGATACCATATTGTGTTAAGC-30) y Khu10 (antisentido: 50-CTGTTACGGCCAGCCCACACTCCGAAG-30) diseñados para amplificar un fragmento de 500-pb del ADNc que corresponde al dominio extracelular del receptor de GH de pollo.

#### 6.4 Clonación y secuenciación del ADNc.

Los productos de PCR se purificaron utilizando un kit de purificación de alta pureza para productos de PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) y posteriormente fue ligado a un vector de clonación (TOPO TA, Invitrogen, Life Technologies). El vector ligado se transformó en células TOP10F de *Escherichia coli* químicamente competentes (Invitrogen). Las células se cultivaron en placas conteniendo medio agar de Luria-Bertani (LB) con 50 µg/ml ampicilina and 40 µl X-gal (40 µg X-gal/µl dimetilformamida) para monitoreo azul/blanco e incubadas a 37C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron de 3 a 4 colonias blancas, se colocaron en 5ml de medio LB y se incubaron por 8 horas a 37°C en agitación vigorosa. Los cultivos celulares se centrifugaron y el precipitado de células se purificó con un sistema de purificación de ADN Wizard plus SV Miniprep DNA (Promega Co., Madison, WI, USA) para aislar el ADN plasmídico. Los insertos se secuenciaron utilizando primers SP6 y T7 y el método de terminación Big Dye (Applied Bio-systems), en el analizador genético ABI PRISM 310 (Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM). Las secuencias

se analizaron utilizando el software BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA). Se comparó la secuencia del ADNc de la GH del cerebelo de pollo con una secuencia consenso del ADNc de la GH de hipófisis de pollo [56; 120].

### 6.5. Hibridación *in situ* (HIS).

#### *6.5.1. Síntesis de la sonda.*

Se obtuvo un ADNc de 690-pb de GH por medio de PCR de ARN total extraído de hipófisis de pollos adultos White Leghorn, utilizando los primers de oligo-nucleótidos:

CLR1 (sentido: 50- CGTTCAAGCAACACCTGAGCAACTCTCCCG-30)

CLR2 (antisentido: 50-GCCTCAGATGGTGCAGTTGCTCTCTCCGAA-30)

[99].

El ADNc fue clonado en un vector PCR II-TOPO (Invitrogen). El vector fue linearizado con endonucleasas de restricción HindIII y Not1 para la producción de las sondas antisentido y sentido, respectivamente [57]. Las sondas se marcaron con Digoxigenina (DIG) por medio de transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 (sonda antisentido) y SP6 (sonda sentido) y mezcla de marcaje DIG ARN (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de las sondas se determinó por medio de análisis de dot blot contra un estándar de ARN marcado con DIG.

#### *6.5.2. Protocolo de hibridación.*

Los cerebelos de pollo de 4 semanas se fijaron con solución de Carnoy por 24 horas a 4°C, se deshidrataron con etanol al 95% y etanol absoluto y se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 7µm de espesor. Los cortes se desparafinaron en citrisolv (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), y se rehidrataron con alcohol al 95%, 70%, 50% disueltos en agua con 0.1% de DEPC y agua destilada con 0.1% de DEPC. Los cortes se incubaron con PBS-DEPC (2 x 15 minutos) para remover RNAasas, después fueron tratados con proteinasa K (10 µg/ml por 10 minutos a 37°C), post-fijados en paraformaldehído al 4% (10 minutos), e incubados con trietanolamina 0.1M (pH 8.0) conteniendo anhídrido acético al 0.25% por 10 minutos. Los cortes se prehibridizaron con formamida al 50% en solución salina de citrato de sodio 2X (SSC, 30 minutos a 60°C) e hibridizados en una cámara húmeda (toda la noche a 60°C) con solución de hibridación (50% formamida, 2X SSC, 250 µg/ml tRNA, 50 µg/ml de

heparina, 2% solución bloqueadora [Roche Diagnostics]), y con las ribosondas sentido o antisentido marcadas con DIG (2 µg/ml) previamente desnaturalizadas (5 min, 85°C).

Subsecuentemente, los cortes se lavaron con SSC 2X (10 min), 2X SSC/50% formamida (45 min, 45°C), 2x SSC (3 x 15 min a temperatura ambiente), 2x SSC (30 min, 37°C), y 0.1X SSC (60 min, 60°C). Después de esto, los cortes se lavaron con “amortiguador uno” (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 2 x 5 min) y la detección inmunohistoquímica de la sonda hibridizada se realizó con la incubación (2 horas) con un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) en solución bloqueadora al 1% (Roche Diagnostics). Los cortes se lavan con el “amortiguador uno” (2 x 5 min), se equilibran por 5 minutos en el “amortiguador dos” (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5), y se incuban con el “amortiguador dos” que ahora contiene un sustrato comercial para fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y cloruro de tetrazolio nitroazul, Roche Diagnostics) hasta la observación de color.

La reacción se detiene al lavar los cortes con amortiguador que contiene 0.01 M Tris, 0.001M EDTA (2 x 5 min). Los cortes se lavan con PBS (3 x 5 min) y se montan con un medio acuoso. Los cortes de hipófisis de pollo de 4 semanas se trataron de manera similar pero la concentración de la sonda fue de 200ng/ml y se utiliza como control positivo el marcaje de los somatotropos del lóbulo caudal [14; 77].

#### 6.6. Inmunohistoquímica de GH y GHR.

Para determinar la localización celular de GH en el cerebelo de pollo, se realizó mediante un doble marcaje y análisis por microscopía confocal con marcadores específicos: Proteína Nuclear Neuronal (NeuN, por sus siglas en inglés) para las neuronas de la capa granular de la corteza cerebelosa; Calbindina D-28K (CaBP) para las células de Purkinje; y la Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP, por sus siglas en inglés) para astrocitos.

Los cerebelos de pollo de 4 semanas se fijaron con solución de Carnoy por 24 horas a 4°C, se deshidrataron con etanol al 95% y etanol absoluto y se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 7µm de espesor que se montaron en laminillas cargadas. Los cortes se desparafinaron en citrisolv (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), y se rehidrataron con soluciones de alcoholes al 95%, 70%, 50% y agua destilada. Las laminillas se equilibraron en TBS 1X (Tris 1.2g, NaCl 9g, pH 7.6,

volumen final 1 litro de agua; 3 x 10 min), después se incubaron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% y metanol al 50% por 30 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Las laminillas se lavan con TBS (3 x 10 min) y se incuban en leche al 5% (Bio-Rad) por 2 horas. Después de esta incubación, los cortes de tejido se lavan con TBS-Tritón al 0.1% (TTBS, 3 x 10 min).

Para la demostración simultánea de NeuN y GH, los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-NeuN (clona A60, Millipore, Co., Temecuala, CA, EUA) a una dilución de 1:200, y un anticuerpo policlonal anti-cGH (C1, producido como se reporta en: 5; 80) a dilución de 1:200 en leche al 1% en TTBS toda la noche en cámara húmeda.

Para la colocalización de CaBP y GH en las células de Purkinje, los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Calbindina D-28K (Sigma–Aldrich, Inc.) a una dilución de 1:50 y un anticuerpo policlonal anti-cGH (C1) a dilución de 1:200.

Para la colocalización de GFAP y GH en las células gliales, los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (Chemicon, Temecuala, CA, USA) a una dilución de 1:200 y un anticuerpo policlonal anti-cGH (C1) a dilución de 1:200.

Para la colocalización de GH y GHR en las células de cerebelo de pollo, los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente contra un fragmento sintético del receptor de GH de pollo (CH17, [16; 62]) a dilución 1:250 y un anticuerpo policlonal anti-cGH (C1) a dilución de 1:200.

Después de lavar las laminillas con TTBS (3 x 10 min), se incubaron con anticuerpos secundarios durante 2 horas: Cabra anti-conejo IgG-FITC (Zymed), 1:200, y cabra anti-ratón IgG-TRITC 1:200. De manera alternativa, se utilizó un anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG-Cy3 (Zymed) a una dilución 1:2500. Después de este tiempo de incubación, las laminillas se lavan con TBS 1X (3 x 10 min).

Para marcar los núcleos de las células, se contra tiñeron las laminillas con 300 nM 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen) en TBS por 45 minutos, se lavaron con TBS (3 X 10 min) y se montaron con un medio especial para fluorescencia.

Las laminillas se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 utilizando láseres con longitud de onda de excitación de 488nm (FITC), 514 nm (TRITC), y 561 nm (Cy3), respectivamente. Se utilizó un láser multifotónico Coherent-XR a 350nm para observar los núcleos contra teñidos con DAPI.



Como control para GH, el primer anticuerpo fue preabsorbido con un exceso de GH (200µg/ml). También se reemplazó el primer anticuerpo por suero normal de conejo o fue omitido, como controles negativos adicionales.

### 6.7. Establecimiento de cultivos primarios

Los embriones de 15 días de incubación (15DE) son sacrificados por decapitación previamente anestesiados en hielo. Las cabezas se lavan 3 veces con un amortiguador libre de calcio y magnesio (CMF por sus siglas en inglés, calcium-magnesium free) en medio de Hank (GIBCO BRL, Burlington, Ont., Canadá) al cual se le agrega albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) y el pH final es de 7.25. El cerebelo es separado y disectado en dicho medio.

La disgregación celular se lleva a cabo enzimáticamente, con solución de tripsina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH) por 10 minutos a 37°C, con agitación constante. La reacción de la tripsina se detiene con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10% en medio DMEM (GIBCO).

El tejido digerido se centrifuga a 1800 g por 5 minutos y el precipitado es resuspendido en 2ml de medio de cultivo (Neurobasal suplementado con 2% de B27, 0.5 mM L-glutamina, y 1% de penicilina-estreptomicina; todo de GIBCO). El tejido es triturado 10 veces con pipetas Pasteur siliconizadas de diferentes grosores.

Después de filtrar el tejido digerido utilizando un filtro de nylon con poros de 40µm, se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cajas de cultivo fluorodish de 10mm de diámetro (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, EUA) y  $3 \times 10^6$  células en cajas de 30mm, cubiertas con 50 µg/ml de poli-L-lisina y se dejan estabilizar en el medio Neurobasal suplementado (NB-B27, glucosa: 6 g/L) a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

### 6.8. Establecimiento de las condiciones de hipoxia y baja glucosa (HBG).

#### *6.8.1. Inducción del daño.*

Para inducir las condiciones de hipoxia y baja glucosa, se reemplaza el medio NB-B27 por medio DMEM-Bajo en glucosa (DMEM-Low Glucose 1X, LG, 1g/L, GIBCO-BRL), y los cultivos se incuban por 1 hora en una cámara de hipoxia a 37°C (Napco E Series, Modelo 302) a la que previamente se le ha inyectado una mezcla de gas que contiene 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de N<sub>2</sub> por 20 minutos resultando en un nivel de 0.5% de O<sub>2</sub>,

que se mantuvo a través del experimento y se estuvo monitoreando con un sensor de oxígeno ambiental [BW Technologies, Arlington, TX].

La condición de HBG se termina al reemplazar el medio LG por el medio NB-B27 y al incubar los cultivos por 24 horas adicionales en condiciones de normoxia (N, 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>) [31].

#### *6.8.2. Medición de la concentración de GH durante HBG.*

Después de las 24 horas de reoxigenación, las células de los cultivos primarios fueron cosechadas, congeladas inmediatamente en hielo seco y guardadas a -70°C hasta su utilización.

Las células congeladas se homogeneizaron en un coctel con inhibidores de proteasas y libre de EDTA (Mini-Complete, Roche) conteniendo 1 mM PMSF, pH 9.0, a 4° C. 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 (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

##### *6.8.2.1. ELISA.*

La presencia de GH-inmunorreactiva (GH-IR) se evaluó mediante la utilización de un ensayo indirecto inmunoabsorbente asociado a enzimas (ELISA, 80)

Brevemente, se cubrieron microplacas de 96 pozos (Immulon 2HB, Chantully, VA, EUA) con 12 ng de rcGH en 100µl de amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 10.3, a 4°C toda la noche (al menos 16 horas). Las placas se lavan 5 veces con TPBS (0.01 M fosfato de sodio, 0.15 mM NaCl, 0.05% w/v Tween 20, pH 7.0) utilizando un lavador de microplacas automático (Biotrak II, Washer 2, Amersham Biosciences, Niskayuna, NY, EUA). Este paso de lavado se realiza después de cada incubación. Los extractos de células o diluciones seriadas de rcGH (1024–0.5 ng/ml) en TPBS conteniendo 1% w/v de leche sin grasa, se incuban por 16 horas con 100 µl de anticuerpo primario CAP-1 (concentración final de 1:100 000) producido en conejos contra GH nativa de hipófisis [5]. Este anticuerpo es específico para GH y no muestra reactividad cruzada (<0.001%) con cualquier otra hormona hipofisiaria.

Las muestras y los estándares (100 µl) se añaden a los pozos cubiertos y se incuban por 2 horas más a temperatura ambiente. Posteriormente se añade un anticuerpo anti-conejo IgG-conjugado con peroxidasa [Horseradish peroxidase-anti-rabbit IgG

conjugate (Bio-Rad)] a una dilución de 1:3000 en leche al 1% en 0.1M de TPBS, pH 7.0) y se incubó 2 horas más. Los anticuerpos secundarios unidos se detectan por reacción con su sustrato, 2,2'-amino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfato) (Roche). Las placas se leen después de 30 minutos en un lector de microplacas de ELISA (Bio-Rad) a una longitud de onda de 405nm. El ensayo tiene una sensibilidad de 2 ng/pozo (20 ng/ml), y los coeficientes de variación inter e intra-ensayo son de < 4% [80].

#### 6.9. Efecto de GH en cultivos sometidos HBG

Las células de 15DE se cultivaron como se describió anteriormente y el medio de estabilización es reemplazado por medios definidos (NB-B27 o LG) conteniendo los siguientes tratamientos: GH recombinante de pollo (rcGH, Cyanamid AC 4797-100) a diferentes concentraciones (1, 10, y 100 nM); wortmanina (100 nM, Calbiochem, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA); IgGs purificadas dirigidas contra rcGH (dilución 1:20, obtenida en el laboratorio por cromatografía de inmutio-afinidad, reportado en 6), o un fragmento de 15-kDa obtenido del corte proteolítico de rcGH con trombina, como se describe en 9, a diferentes concentraciones (1 y 10 nM). Las células fueron incubadas tanto en normoxia como en HBG. Todos los tratamientos se añadieron una sola vez, al principio de la incubación de 1 hora, y fueron removidos durante la reoxigenación.

Se midieron los siguientes parámetros: la determinación de la viabilidad celular en los cultivos se realizó después de las 24 horas de reoxigenación; los ensayos de caspasa-3 y de Bcl-2 se realizaron en cultivos cosechados después de las 24 horas de reoxigenación; la técnica de TUNEL se realizó después de las 24 horas de reoxigenación en las células cultivadas en las cajas Fluorodish; la determinación de p-Akt se realizó en cultivos cosechados inmediatamente después de inducir la hipoxia por 1 hora de incubación. Los efectos de las condiciones de HBG medidos con los parámetros anteriores se compararon de manera inicial con las condiciones de normoxia. Después, los efectos de los diferentes tratamientos se evaluaron con los controles de normoxia o de HBG.

#### 6.10. Inmunocitoquímica de los cultivos celulares.

Los cultivos de células de cerebelo se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) por 30 minutos, después se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se incubaron con leche seca sin grasa (BioRad) al 5% en PBS por 2 horas. Las células volvieron a lavarse

con TPBS (PBS con Tritón al 0.1%, 3 x 10 min). Se realizó un doble marcaje y análisis confocal para determinar la colocalización de GH con marcadores neuronales (NeuN y  $\beta$ -tubulina III). Los cultivos se incubaron toda la noche con un anticuerpo policlonal dirigido contra rcGH (C1, dilución 1:200) y ya sea con NeuN (dilución 1:200, Millipore) o con anti-ratón  $\beta$ -tubulina III (dilución 1:200, Covance Inc., Princeton, NJ, EUA), todos los anticuerpos fueron diluidos en leche al 1% en PBS. Después de lavarse 3 veces con TPBS (3 x 10 min), las células se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios: Cabra anti-conejo IgG-FITC (diluido 1:100, Zymed); cabra anti-ratón IgG-TRITC (diluido 1:100, Zymed). Alternativamente, se utilizó un anticuerpo cabra anti-conejo IgG-Cy3 (diluido 1:2000, Zymed). Después de este tiempo de incubación, las laminillas se lavan con PBS 1X (3 x 10 min).

Para marcar los núcleos de las células, se contra tiñeron las preparaciones con 300 nM 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen) en PBS por 45 minutos, se lavaron con PBS (3 X 10 min). Una vez terminado, las cajas fluorodish están listas para ser observadas en el microscopio confocal.

Las células se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 utilizando láseres con longitud de onda de excitación de 488nm (FITC), 514 nm (TRITC), y 561 nm (Cy3), respectivamente. Se utilizó un láser multifotónico Coherent-XR a 350nm para observar los núcleos contra teñidos con DAPI.

Como control: para GH, el primer anticuerpo fue preabsorbido con un exceso de GH (200 $\mu$ g/ml); como controles negativos, se reemplazó el primer anticuerpo por suero normal de conejo o éste fue omitido.

## 6.11. Determinación de la viabilidad celular.

### *6.11.1. Azul de tripano.*

Las células ( $3 \times 10^6$  células por pozo) se cultivaron en placas de 6 pozos y se estabilizaron durante 72 horas a 37°C en una incubadora con humedad controlada y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo de estabilización, las células se sometieron a las condiciones de HBG por 1 hora o se mantuvieron en normoxia durante el mismo tiempo.

De igual manera, durante ambas condiciones se incubaron a las células con los siguientes tratamientos: GH recombinante de pollo (rcGH, Cyanamid AC 4797-100) a

diferentes concentraciones (1, 10, y 100 nM); wortmanina (100 nM, Calbiochem); IgGs purificadas dirigidas contra rcGH (dilución 1:20, 6).

Después de estos tratamientos, las células se reoxigenaron por 24 horas con medio NB-B27. Al terminar este periodo de reoxigenación, las células se cosecharon en 1ml de suspensión y se tomó una alícuota de 10µl que se mezcló con otra alícuota de 10µl de solución de azul de tripano al 0.05%, que a su vez fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz. Las células teñidas de azul son consideradas células muertas y las células no teñidas son cuantificadas como células vivas, se contaron al menos 100 células (por triplicado) para obtener los valores de viabilidad.

#### *6.11.2. MTT (reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)*

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Roche, Mannheim, Alemania) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo en cajas de 96 pozos (0.1ml/pozo) y se estabilizaron por 72 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora con humedad controlada. Después de este tiempo, las células fueron sometidas a condiciones de HBG o de normoxia durante 1 hora.

Durante ambas condiciones las células se incubaron con los siguientes tratamientos: GH recombinante de pollo (rcGH, Cyanamid AC 4797-100) a diferentes concentraciones (1, 10, y 100 nM); o el fragmento de 15-kDa [9], a 1 y 10 nM de concentración.

Después de estos tratamientos, las células se reoxigenaron por 24 horas y al término de este periodo, se añadieron 10 µl de la solución de MTT (5g/L) a cada pozo, y las placas se incubaron por 4 horas a 37°C en condiciones de normoxia (5% de CO<sub>2</sub>). Para disolver los cristales de formazán formados por las células vivas, se añadieron 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada uno de los pozos antes de medir la absorbencia a 540 nm (Lector de microplacas, Modelo 550, Bio-Rad, Hércules, CA, EUA). Cada placa contenía varios pozos con las condiciones experimentales y condiciones control. El procedimiento se repitió en 3 o 5 placas para cada condición.

## 6.12. Evaluación de la apoptosis.

### *6.12.1. Actividad de caspasa-3.*

Las células obtenidas de los cultivos primarios fueron resuspendidas en 100µl de amortiguador de lisis (HEPES/NaOH 10 mM pH 7.4, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, e inhibidores de proteasas). 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.

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, Ann Arbor, MI, EUA). En la placa de 96 pozos (incluida en el estuche) se colocaron 50 µl 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 µl de calibrador de p-nitroanilina (Solución de p-nitroanilina 50µM en amortiguador de reacción de caspasa 3). Para hacer los estándares se utilizan 4 tubos donde se colocan 125 µl 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 µl del tubo 1 se pasan al tubo 2, se mezcla y 125 µl 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 µl de cada tubo por duplicado en cada pozo de la placa. Después de colocar los estándares se colocan 50 µl de las muestras y en todos los pozos se pipetea (excepto en los pozos con pNA) 75 µl del sustrato 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 µl de la solución de bloqueo del estuche en cada pozo y se lee en el lector de ELISA (Biorad 3550-UV) con 405nm 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 sustrato. 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.

La actividad de caspasa-3 de las muestras fue calculada como unidades por microgramos de proteína, después fue normalizada y expresada como porcentaje de actividad en relación con el control de HBG (que fue considerado como el 100%) [100]

#### *6.12.2. Evaluación de la condensación de material genético por TUNEL, fluorescencia*

Las células son cultivadas en cajas fluorodish; después de los tratamientos las células son fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 minutos y lavadas con PBS 1X tres veces durante 10 minutos cada vez e inmediatamente después fueron incubados con proteinasa K (solución de trabajo 10µg/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 permeabilizar y después de la etapa de permeabilización fueron lavadas tres veces con PBS 1X.

Posteriormente se procedió con el ensayo de TUNEL [por sus siglas en inglés, transferasa de deoxinucleótidos terminales dependiente de la polimerización de nucleótidos marcados con el extremo 3'-OH libre de ADN, en un mecanismo libre de templado], el cual consiste en incorporar las bases análogas dUTPs (deoxinucleotidil uracil-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 (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de la manera siguiente: A cada caja con cada tratamiento 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 1cm<sup>2</sup>. Se realizó una incubación

de 1 hora a 37 °C en una cámara húmeda, después de la incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X.

Para poder tener una mejor observación de las posibles células con marcaje del TUNEL, se realizó de igual manera la tinción de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole). Para esto, se colocó 1ml de la solución de DAPI (1 mg/ml DAPI en H<sub>2</sub>O desionizada) y las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos, después de este tiempo se descarta la solución de DAPI. Las células se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 utilizando láseres con longitud de onda de excitación de 488nm (FITC) y un láser multifotónico Coherent-XR a 350nm para observar los núcleos contra teñidos con DAPI.

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 de al menos 10 campos. El programa detecta una intensidad de señal predeterminada, a cada sitio de un campo que es identificada dentro del intervalo de intensidad como positiva se le cuantifica su área, posteriormente las áreas son sumadas y se dividen entre el área total del campo para obtener una proporción.

#### 6.13. Efecto antiapoptótico de GH durante HBG.

Se evaluaron los cambios en la proporción relativa de fosforilación de Akt (p-Akt) o la expresión de Bcl2 en respuesta a los tratamientos por medio de SDS-PAGE y Western blott. Se prepararon los lisados celulares en un coctel con inhibidores de proteasas (mini-complete, Roche), pH 9.0. Se colectaron los sobrenadantes y se determinó el contenido de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad).

Las muestras (40 µg proteína) se analizaron con una electroforesis unidimensional con geles de poliacrilamida con dodecil sulfato (SDS PAGE) de 1mm de ancho, 6cm de largo, 12.5% de concentración utilizando el sistema amortiguador de Laemmli, en una placa mini-Protean II (Bio-Rad) bajo condiciones reductoras (en presencia de 5% de 2-mercaptoetanol, w/v). Después de la electroforesis, el gel se equilibró con amortiguador de transferencia (TRIS 25 mM, Gly 192 mM, Metanol 20 %, aprox. pH 8.3) por 30 min. Al mismo tiempo se equilibraron las membranas (nitrocelulosa), el papel filtro y las fibras en amortiguador de transferencia. Las proteínas se electrotransfieren a 200mA (corriente constante) durante 1 hora, en agitación constante a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas son bloqueadas con leche al 5% en TBS



1X durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación, se lavaron con TTBS 1X (TBS + Tween 20 %) 3 veces por 10 min e incubaron con anticuerpo monoclonal anti-p-Akt (Abcam, Cambridge, MA, EUA) o anti-Bcl-2 (Invitrogen), ambos diluidos 1:750 en leche al 1% en TTBS. Posteriormente, se lavaron las membranas con TTBS 3 veces por 10 minutos cada vez y se incubaron con el 2° Ab (anti IgG de ratón hecho en cabra y conjugado con peroxidasa) dilución 1:1000 durante dos horas en agitación constante. De nueva cuenta las membranas fueron lavadas 3 veces con TTBS y dos con TBS, por 10 minutos cada vez y se procedió a revelarlas utilizando un sustrato quimioluminiscente (ECL, Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) y se expusieron en placas fotográficas Kodak Biomax ML.

Todas las membranas en donde se evaluó p-Akt y Bcl-2 fueron re-probadas (stripping), para Akt o actina como control y control de carga respectivamente. El primer anticuerpo es eliminado de la membrana con solución de 2-mercapto-etanol (100mM), SDS al 10% y Tris-HCl (62.5mM) con un pH final de 6.7. Las membranas fueron incubadas por 40 minutos con dicha solución entre 70 y 80°C con agitación suave y constante. Posteriormente se lavaron con agua desionizada y con TBS 3 veces por 10 minutos. Nuevamente se realizó el bloqueo con leche en TBS al 5% por dos horas y se realizaron los 3 lavados (10 minutos cada uno) con TTBS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-Akt 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) a una dilución 1:2000 y con anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnologies) a una dilución 1:3000 toda la noche. La intensidad de la banda de p-Akt se normaliza con la banda de Akt, y la intensidad de la banda de Bcl-2 con la banda de actina.

#### *6.13.1. Análisis densitométrico.*

La proporción relativa de las bandas inmunorreactivas de p-Akt y Bcl-2 se determinaron por análisis densitométrico después de digitalizar los luminogramas utilizando un scanner Cannon y utilizando un software IP LabGel 2.2 (Scanalytics, Fairfax, VA, EUA).

#### 6.14. Análisis estadístico.

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM. Los análisis estadísticos entre los grupos se realizaron por medio de un ANOVA de una vía seguido de una prueba post

hoc de Tuckey (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Sólo los resultados con un valor de  $p < 0.05$  se consideraron como significativamente diferentes.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Presencia del ARNm de GH.

La expresión del ARNm de GH en el cerebelo de pollo se confirmó por RT-PCR y por hibridación *in situ* (Figura 1). La Fig. 1a, muestra la presencia de una banda de ADNc de 645-pb obtenido por RT-PCR del ARN extraído de cerebelo de pollos de 4 semanas (Cer), que fue similar al obtenido en la hipófisis (Pit). Este ADNc no se observó cuando el PCR se hizo con ARN en ausencia de la transcriptasa (datos no mostrados).

La expresión del ARNm de GH también se encontró por Hibridización *in situ* (HIS) en las células de Purkinje de cerebelos de pollos de 4 semanas de edad, aunque también se observaron algunos cuerpos celulares tanto en la capa granular como en la molecular (Fig. 1 b y c). Este marcaje fue específico ya que no se observó con la sonda sentido (control negativo, figura 1d). En las células de Purkinje la señal se expresó de manera más intensa en el citoplasma, como puede observarse a una mayor magnificación (Fig. 1 e y f).

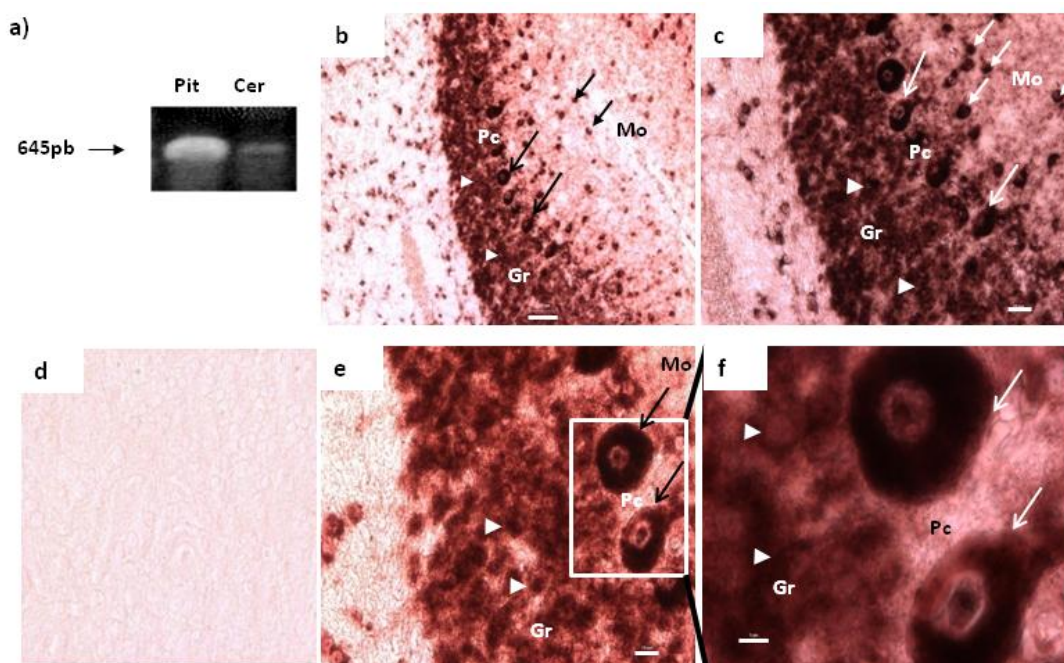


Fig. 1. (a) Productos de PCR observado después de un PCR con dos primers: GH1 (sentido) que corresponde a una zona interna y CLR2, antisentido, que corresponde a una zona externa del marco de lectura de la GH, diseñados para amplificar un fragmento del ADNc de 645-pb obtenidos tanto de hipófisis (Pit) como de cerebelo (Cer) de pollos de 4 semanas de edad. (b) Detección del ARN mensajero (ARNm) de GH por medio de HIS. La señal se detectó en las

células de Purkinje (Pc) y en células de la capa granular (Gr) así como también en algunas células de la capa molecular (Mo) 10x. La barra (blanca) corresponde a 50µm. (c), (e) y (f) muestran magnificaciones de 20x, 40x y 100x, respectivamente. La barra corresponde a 20µm en (c), 10µm en (e) y 5µm en (f). (d) Control negativo para la HIS utilizando la sonda sentido; no se detectó señal alguna, magnificación de 40x. Las flechas señalan células de Purkinje (Pc) y las cabezas de flechas señalan células de la capa granular (Gr) y de la capa molecular (Mo).

## 7.2. Secuenciación del ADNc de GH.

La secuenciación del ADNc de 645-pb de la GH de cerebelo de pollo mostró un 99.5% de identidad con la secuencia consenso para el ADNc de la GH hipofisiaria [57] (Fig. 2). La secuencia traducida de este fragmento corresponde a una proteína que comienza en el tercer aminoácido del péptido señal (subrayado), un residuo de cisteína, indicado con la posición 1. Esta secuencia de nucleótidos sólo difiere del ADNc consenso de la GH por 3 pares de bases (codones subrayados con línea gruesa en la Figura 2) en las posiciones: 327 (G por C), 330 (T por A) y 579 (A por G) de este ADNc (flechas), respectivamente. Estas substituciones corresponden a mutaciones silenciosas ya que no se produce un cambio en los aminoácidos producidos.

	1	<u>G S W F S P L L I A V V T L G L P Q E A</u>	
CBcGH		<u>GGCTGGGGGPPPCCTCCCTCCCTCATCGCTGTCGCTCACCGCTGGGACTGCGCGCAGGAAGCT</u>	60
PitcGH		GGCTCGTGTCTTTCTCCTCTCCATCGCTGTCGTCACCGCTGGGACTGCGCGCAGGAAGCT	
	21	<u>A A T F P A M P L S N L F A N A V L R A</u>	
CBcGH		<u>GCTGCCACCTTCCCTGCCATGCCCTTCTCCAACCCTGTGTGCCAACGCTGTGCTGAGGGCT</u>	120
PitcGH		GCTGCCACCTTCCCTGCCATGCCCTTCTCCAACCCTGTGTGCCAACGCTGTGCTGAGGGCT	
	41	<u>Q H L H L L A A E T Y K E F E R T Y I P</u>	
CBcGH		<u>CAGCACCTCCACCTTCCCTGGCTGCCGAGACATATAAAGAGTTCGAACGCACCTATATTCGG</u>	180
PitcGH		CAGCACCTCCACCTTCCCTGGCTGCCGAGACATATAAAGAGTTCGAACGCACCTATATTCGG	
	61	<u>E D Q R Y T N K N S Q A A F C Y S E T I</u>	
CBcGH		<u>GAGGACCAGAGCTACACCAACAAAACCTCCCAGGCTGCGTTTTCTTACTCAGAAAACCATC</u>	240
PitcGH		GAGGACCAGAGCTACACCAACAAAACCTCCCAGGCTGCGTTTTCTTACTCAGAAAACCATC	
	81	<u>P A P T G K D D A Q Q K S D M E L L R F</u>	
CBcGH		<u>CCAGCTCCACGGGGAAGGATGACGCCCAGCAGAGTTCAGACATGGAGCTGCTTTCGCTTT</u>	300
PitcGH		CCAGCTCCACGGGGAAGGATGACGCCCAGCAGAGTTCAGACATGGAGCTGCTTTCGCTTT	
	101	<u>S L V L I Q S W L T P V Q Y L S K V F T</u>	
CBcGH		<u>TCACTGGTTCTCATCCAGTCTCGCTGACTCCCGTGC AATACCTAAGCAAGGTTCTTCACG</u>	360
PitcGH		TCACTGGTTCTCATCCAGTCTCGCTGACTCCCGTGC AATACCTAAGCAAGGTTCTTCACG	
	121	<u>N N L V F G T S D R V F E K L K D L E E</u>	
CBcGH		<u>AACAACCTTGGTTTTTGGCACCTCAGACAGACTGTTTGGAGAACTAAAGCACCTGGAAGAA</u>	420
PitcGH		AACAACCTTGGTTTTTGGCACCTCAGACAGACTGTTTGGAGAACTAAAGCACCTGGAAGAA	
	141	<u>G I Q A L M R E L E D R S P R C P Q L L</u>	
CBcGH		<u>GGGATCCAAACCCCTGATGAGGACGCTGGAGGACCCGACGCCCGCGGGCCCGCAGCTCCCTC</u>	480
PitcGH		GGGATCCAAACCCCTGATGAGGACGCTGGAGGACCCGACGCCCGCGGGCCCGCAGCTCCCTC	
	161	<u>R P T Y D K F D I H L R N E D A L L K N</u>	
CBcGH		<u>AGACCCACCTACGACAAGTTCGACATCCACCCTGCCAACGAGGACGCCCCTGCTGGAAGAAC</u>	540
PitcGH		AGACCCACCTACGACAAGTTCGACATCCACCCTGCCAACGAGGACGCCCCTGCTGGAAGAAC	
	181	<u>Y G L L S C F K K D L H K V E T Y L K V</u>	
CBcGH		<u>TACGGCCCTGCTGCTCCTGCTTCAAGAAGGATCTGCACAAAGTGGAGACCTACCTGAAGGCTG</u>	600
PitcGH		TACGGCCCTGCTGCTCCTGCTTCAAGAAGGATCTGCACAAAGTGGAGACCTACCTGAAGGCTG	
	201	<u>M K C R R F G E S N C T I</u>	
CBcGH		<u>ATGAAGTCCCGCCGCTTGGGAGAGCAACTGGCAACCATCTGA</u>	642
PitcGH		ATGAAGTCCCGCCGCTTGGGAGAGCAACTGGCAACCATCTGA	

Fig. 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del ADNc de GH de cerebelo de pollo (CBcGH), alineados con la secuencia consenso de la GH hipofisiaria (PitcGH, 57). La secuencia corresponde a la proteína madura y comienza en el tercer aminoácido (G) del péptido señal (subrayado) y se ha designado como la posición 1. Esta secuencia sólo difiere de la secuencia de PitcGH en 3 pares de bases (codones subrayados con línea gruesa): una sustitución de base en la posición 327 del ADNc reportado aquí (una G por una C), en la posición 330 (una T por una C) y en la 579 (una A por una G); las posiciones de estas sustituciones ocurren en las posiciones 336, 339 y 588, respectivamente, en la secuencia completa que codifica para el péptido señal completo. A pesar de estos cambios en los nucleótidos, no hubo cambios en los aminoácidos. La secuencia se determinó de 3 cerebelos diferentes de pollos de 4 semanas, y en cada caso resultó lo mismo.

### 7.3. Distribución de GH en el cerebelo de pollo.

La Fig. 3, muestra la localización celular de GH-IR en el cerebelo de pollos de 4 semanas de edad, se realizó un análisis con doble tinción utilizando marcadores celulares específicos (NeuN, CaBP, GFAP). La GH-IR se observó claramente en la capa de las células de Purkinje así como también en la capa de las células granulares cuando se analizó por microscopía confocal en cortes horizontales (Fig. 3a-c) y sagitales (Fig. 3d-f). En la Fig. 3(a) y (d) se muestra GH-IR intensa tanto en las células de Purkinje como en las de la capa granular, y con menor intensidad en la capa molecular. En la Fig. 3b y e se observa CaBP-IR intensa en las células de Purkinje así como en algunos de sus procesos que penetran en la capa molecular, pero no se observó señal en la capa granular (Fig. 3b). La microscopía confocal muestra de manera certera una colocalización intensa de GH en las células de Purkinje y en sus procesos dendríticos, como puede observarse mejor en los cortes sagitales (Fig. 3f). Además, algunas células y procesos de la capa molecular también muestran colocalización de ambos marcadores (Fig. 3c y f).

En cortes horizontales, se observa colocalización de GH (Fig. 4g) con NeuN (Fig. 4h) en las células de la capa granular (Fig. 4i). Se observó colocalización (Fig. 4l) en algunas células de GH (Figura 4j) y GFAP (Fig. 4k), lo que puede indicar que sean astrocitos en la capa granular.

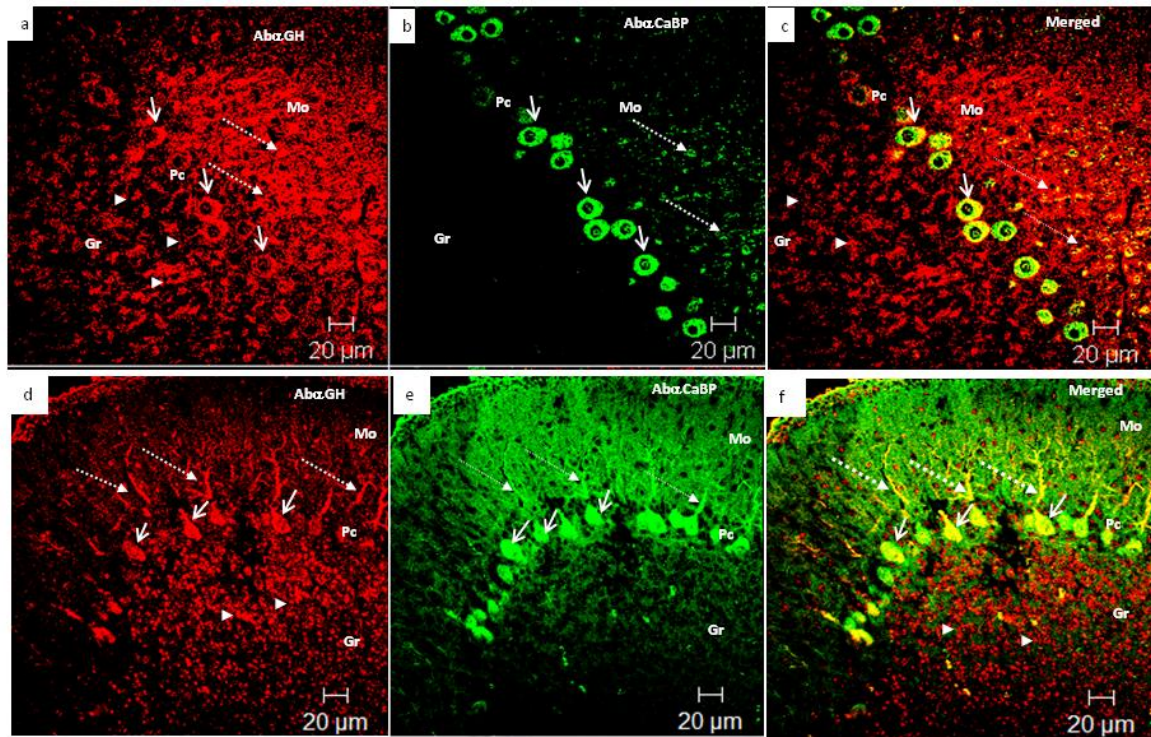


Fig. 3. Micrografías confocales representativas de cortes horizontales (a)-(c) y sagitales (d)-(f) con doble marcaje de cerebelo de pollos de 4 semanas de edad. (a) y (d): Inmunotinción (rojo) con anti-GH (C1), [2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-Cy3, 1:2500]; GH-IR se observó en células de Purkinje (Pc, flechas) y en las células granulares (Gr, cabezas de flechas). (b) y (e) Inmunotinción (verde) con anti-calbindina (CaBP), [1er anticuerpo: mAc anti CaBP, 1:50; 2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-FITC 1:200] para marcar el cuerpo celular (flechas) y procesos (flechas punteadas) de las células de Purkinje. (c) y (f) Imágenes combinadas que muestran la colocalización (amarillo) de CaBP y GH en las células de Purkinje.



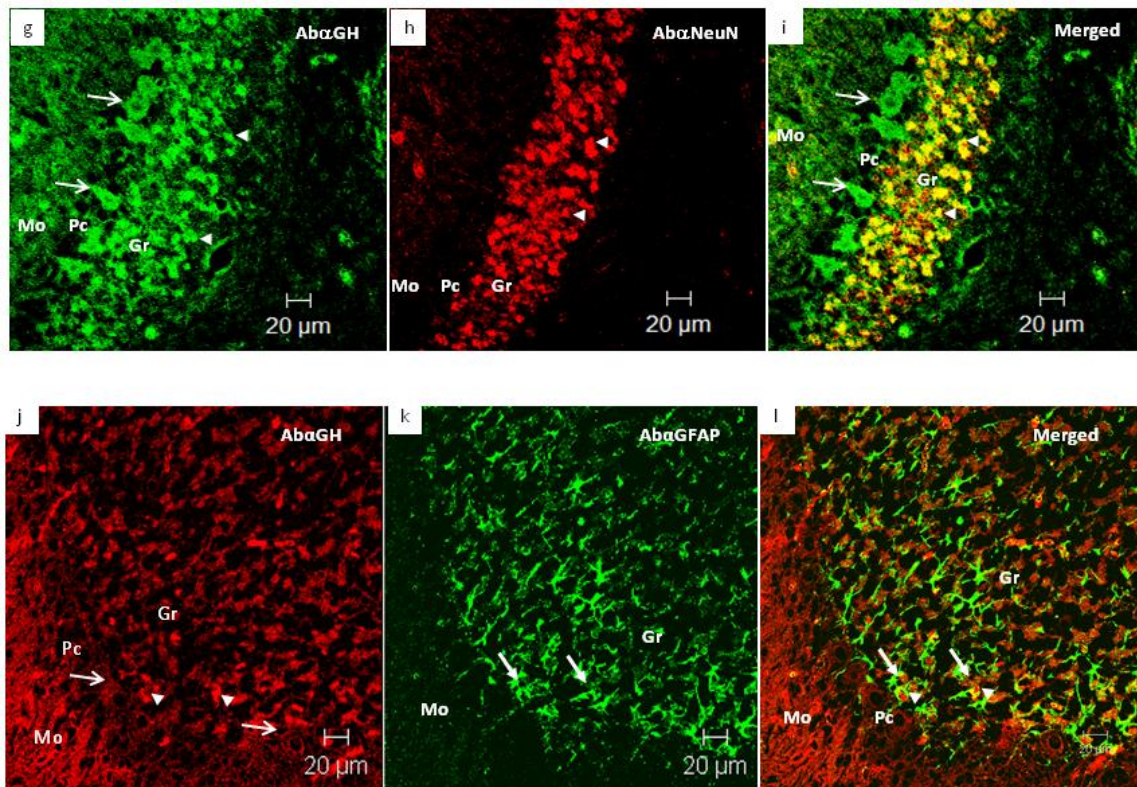


Fig. 4. Micrografías confocales representativas de cortes horizontales de cerebelo de pollos de 4 semanas de edad, con doble marcaje. (g) Inmunotinción (verde) con un anticuerpo policlonal C1 (1er anticuerpo: conejo anti-GH, 1:200; 2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-FITC, 1:200), muestra GH-IR en la capa molecular (Mo), capa granular (Gr, cabezas de flecha) y células de Purkinje (Pc, flechas). (h) Inmunotinción (rojo) con anti-NeuN (1er anticuerpo: mAc anti-NeuN 1:200; 2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-TRITC 1:200) para marcar neuronas granulares. (i) Imágenes combinadas que muestran colocación (amarillo) de NeuN con GH en la capa granular (Gr, cabezas de flecha). (j) Inmunotinción (rojo) con anti-GH (C1) [2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-Cy3, 1:2500] muestra GH-IR en las células de Purkinje (Pc, flechas) y en las células granulares (Gr, cabezas de flechas). (k) Inmunotinción (verde) con anti-proteína fibrilar ácida glial (GFAP) [1er anticuerpo: mAc anti-GFAP, 1:200; 2do anticuerpo: cabra anti-ratón IgG-FITC 1:200] para marcar astrocitos. (l) Imágenes combinadas que muestran algunas células dispersas con colocación (amarillo) de GH y GFAP. La barra corresponde a 20µm en todas las micrografías.

#### 7.4. Presencia de GHR en el cerebelo.

Se confirmó la expresión del ARNm de GHR en el cerebelo de pollos de 4 semanas de edad por medio de RT-PCR. Se observó la expresión de una banda de 500-pb que corresponde al dominio extracelular de GHR y es de tamaño similar al observado en el

hígado (Fig. 5a). Se determinó la localización celular de GHR por inmunofluorescencia en cortes de cerebelo de pollos de 4 semanas y se comparó con la localización de GH (Fig. 5b y f). Se observó una clara presencia de GH en las células granulares y de Purkinje, así como en algunos procesos de la capa molecular (Fig. 5b). De igual manera, se observa una señal intensa de GHR-IR con una distribución similar a GH. La combinación de ambas imágenes muestra colocalización de los dos marcadores en las células de Purkinje y en algunos cuerpos celulares de la capa granular, así como en algunos procesos que se extienden hacia la capa molecular (Fig. 5e y f).

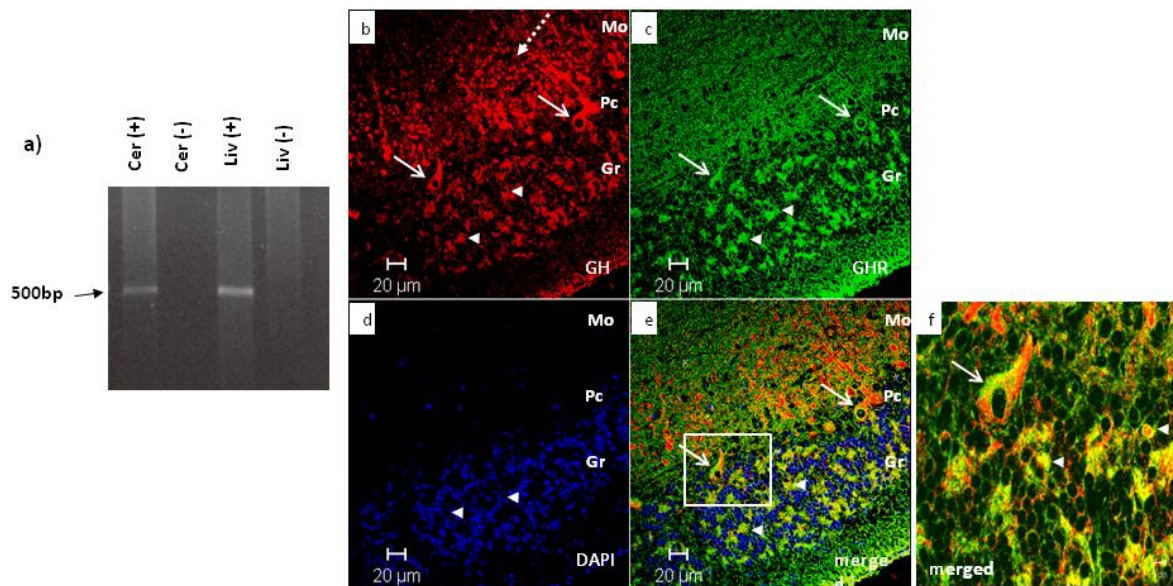


Figura 5. Expresión del receptor a la hormona de crecimiento (GHR) y colocalización de la inmunorreactividad a GHR (GHR-IR) con inmunorreactividad a GH (GH-IR) en cerebelo de pollos de 4 semanas de edad. (a) Detección de GHR por RT-PCR. Se retrotranscribieron los ARN totales de cerebelo (Cer) e hígado (Liv, control positivo) y se amplificaron en presencia de los oligonucleótidos Khu9 (sentido) y Khu10 (antisentido), que corresponden al dominio extracelular de GHR; se generó una sola banda de 500-pb en ambos tejidos. (b) Imágenes de microscopía confocal de cortes de cerebelo con doble marcaje para identificar las células que expresan GH (rojo, 1er anticuerpo: conejo anti-GH, 1:200; 2do anticuerpo: cabra anti-conejo IgG-Cy3, 1:2500), o (c) GHR (verde, 1er anticuerpo: mAc anti-GHR CH17, 1:250; 2do anticuerpo: cabra anti-ratón IgG-FITC, 1:200). (d) Para marcar los núcleos celulares, los cortes se contrañeron con DAPI. (e) Imágenes combinadas que muestran colocalización de GH y GHR (amarillo) en las células granulares y de Purkinje. (f) Mayor magnificación que muestra la colocalización de GH y GHR en las mismas células (amarillo); Pc (flechas) y Gr (cabezas de flechas). La barra corresponde a 20μm. Mo, capa molecular. Pc, células de Purkinje. Gr, capa granular.

### 7.5. Estandarización y caracterización de los cultivos primarios de cerebelo.

Se establecieron las condiciones óptimas para los cultivos primarios de células de cerebelo de embrión de pollo de 15 días de incubación utilizando medio Neurobasal suplementado con B27 (NB-B27) y dejando estabilizar el cultivo por 72 horas en incubadora bajo condiciones controladas de humedad, a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizó un estudio de la viabilidad del cultivo por medio de exclusión por azul de tripano a las 24, 48 y 72 horas de estabilización, obteniéndose un porcentaje significativo de sobrevivencia hasta a las 72 horas de cultivo (Tabla 2).

Tiempo <i>in vitro</i> del cultivo.	% viabilidad
24 horas	98,85 +/- 0,4
48 horas	98,2 +/- 0,3
72 horas	98,1 +/- 0,4

Tabla 2. Viabilidad de las células en cultivo a 24, 48 y 72 horas de días *in Vitro*.

Estos resultados coinciden con las observaciones reportadas previamente, en donde células granulares de cerebelo de pollo sobrevivieron en condiciones de cultivo sin suplemento de suero y en ausencia de concentraciones despolarizantes de potasio [65]. Para verificar que las células cultivadas eran neuronas, se marcaron con NeuN, un antígeno neuronal específico [82]. De igual manera, las células fueron marcadas con GH para su caracterización. Las células cultivadas formaron una monocapa confluyente (Fig. 6) y alrededor del 85% de las células analizadas mostraron una señal positiva tanto para GH (Fig. 6a) como para NeuN (Fig. 6b). Cuando las imágenes se combinan, se observa la colocalización de estos dos marcadores (Fig. 6c). A una mayor magnificación, GH-IR se observa tanto en el núcleo como en algunos procesos (Fig. 6d), mientras que la señal de NeuN, se observa principalmente en el núcleo de las células (Fig. 6e); al combinar las imágenes, estos dos marcadores colocalizan en el núcleo (Fig. 6f). Una caracterización posterior de los cultivos neuronales mostró inmunorreactividad a  $\beta$ -tubulina III, un marcador específico el citoesqueleto en el citoplasma y procesos neuronales (Fig. 6h); la señal de GH fue más intensa en el núcleo, aunque también se encontró en algunos procesos (Fig. 6g). Una fracción significativa de estos marcadores



colocalizó al combinar las imágenes, principalmente en la región citoplásmica y alrededor del núcleo (Fig. 6i).

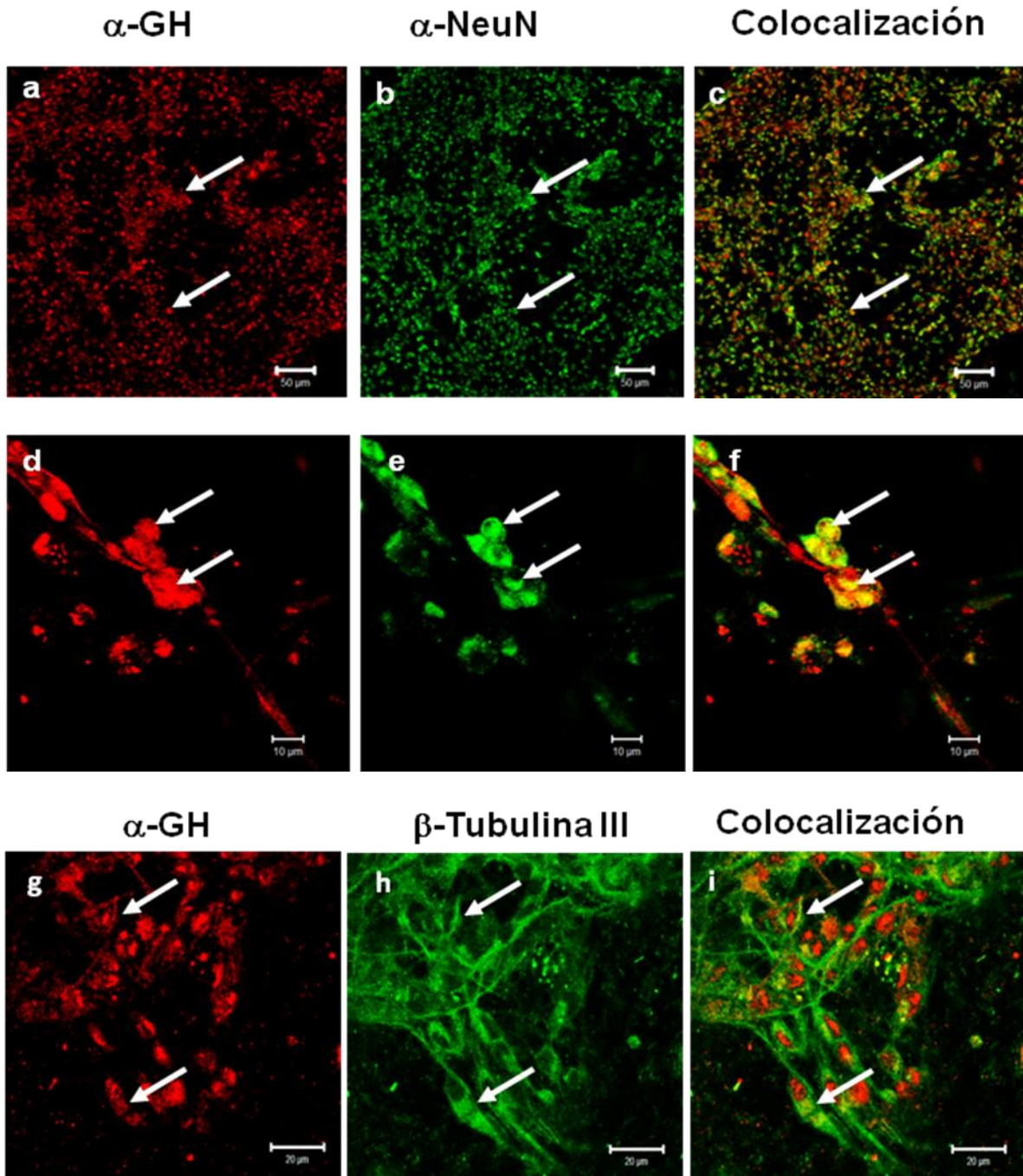


Figura 6. GH-IR y NeuN-IR están presentes en los cultivos de células de cerebelo de embriones de pollo después de 72 horas de incubación con medio Neurobasal suplementado con B27. (b) Se analizaron imágenes de microscopía confocal con una magnificación 40x de los cultivos celulares de cerebelo de pollo de 15DE para identificar neuronas con NeuN (verde, 1er anticuerpo: mAc anti-NeuN, 1:200; 2do anticuerpo: cabra anti-ratón IgG-FITC, 1:200). (c) La combinación de las imágenes muestra una colocalización de las inmunorreactividades de GH y NeuN (amarillo, flechas). La barra indica 10 $\mu$ m. (d) A una mayor magnificación (63x) se muestra inmunorreactividad de GH y (e) de NeuN. (f) Combinación de las imágenes para

observar colocalización. La señal inmunorreactiva de NeuN se observa principalmente en el núcleo (flechas) y colocaliza con la señal de GH. (g) La inmunorreactividad a GH se observa también en el cuerpo celular y en algunos de los procesos. (h) Se observan los procesos marcados con  $\beta$ -tubulina III. (i) La combinación de ambas imágenes muestra una colocalización de  $\beta$ -tubulina III con GH. La barra corresponde a 50 $\mu$ m en (a) – (c), 10 $\mu$ m (d) – (f) y (g) – (h).

### 7.6. Efectos de la hipoxia y baja glucosa (HBG).

La exposición de los cultivos cerebelares a hipoxia (0.5% de O<sub>2</sub>) y baja glucosa (1 g/L) por 1 hora (HBG), seguida de 24 horas de reoxigenación indujo una disminución significativa del número de células (Figura 7 A (f) – (j)) comparado con las condiciones de normoxia (Figura 7 A (a) – (e)). Aunque sobrevivieron menos de la mitad de las células a las condiciones de la HBG (Figura 6 A (i)), la mayoría de las células que sobrevivieron aún expresaron inmunorreactividad a GH, principalmente en el núcleo y en el soma (Figura 7 A (f), flechas); y NeuN también se observó la señal en el núcleo de las células sometidas a HBG (Figura 7 A (g)). Estas señales colocalizaron al combinar las imágenes obtenidas por microscopía confocal (Figura 7 A (h)).

Por otro lado, se midió la concentración de GH presente en los cultivos celulares de cerebelo de pollo de 15DE tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia (Fig. 7 B). La concentración de GH aumentó de manera significativa (un 17%, de  $361.26 \pm 39.5$  a  $421.26 \pm 33.4$  ng GH/mg proteína) cuando se midió después de las 24 horas de reoxigenación ( $p < 0.05$ ).

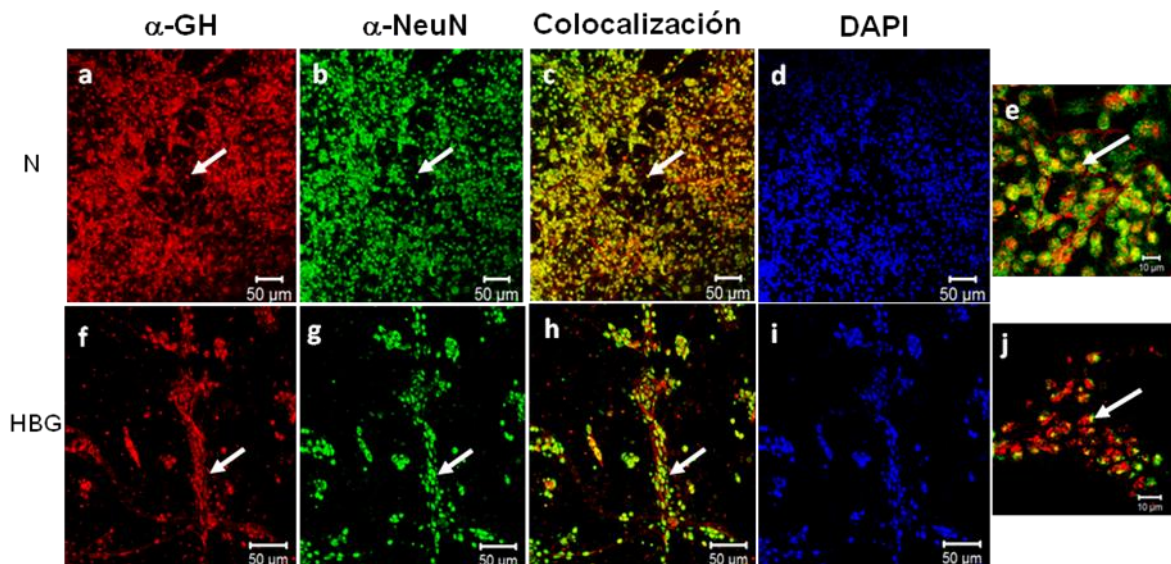


Fig. 7 A. Mediante microscopía confocal se observaron células inmunorreactivas a GH tanto en normoxia (a) como en HBG (f), las células mostraron la marca principalmente en el núcleo y en el cuerpo celular, así como en algunos de los procesos (flechas). De igual manera, se observó inmunorreactividad a NeuN en el núcleo de las células tanto en condiciones de normoxia (b) como de HBG (g). Las dos señales

colocalizaron cuando se combinaron las dos imágenes ((c) para normoxia, (h) para HBG). Los núcleos de las células presentes se contra tiñeron con DAPI para poder cuantificar las células presentes en el cultivo ((d) para normoxia, (i) para HBG). La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . Una mayor magnificación (63x) mostró diferencias en la integridad celular entre las dos condiciones ((e) para normoxia, (j) para HBG). La barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

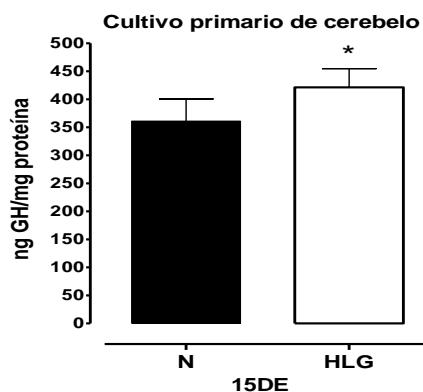


Fig. 7 B. Concentración de GH medida por ELISA y expresada en ng de GH por mg de proteína. Los cultivos primarios de células de cerebelo de embrión de pollo de 15DE se sometieron a condiciones de HBG y se reoxigenaron 24 horas después del tratamiento. Las células se cosecharon y se mantuvieron en un coctel con inhibidores de proteasas y libre de EDTA (Mini-Complete, Roche) conteniendo 1 mM de PMSF, pH 9.0. Cada barra representa la media  $\pm$  ES. n = 5.

### 7.7. Efectos de GH sobre la viabilidad celular.

Se determinó la viabilidad de las células cultivadas de cerebelo de pollo de 15DE en condiciones fisiológicas de O<sub>2</sub> y glucosa (normoxia,  $91.3 \pm 11\%$ ) y se comparó con las células sometidas a HBG durante 24 h y reoxigenadas por 24 horas adicionales, y tratadas con diferentes concentraciones de GH (1, 10 and 100 nM) durante la HBG. Como se muestra en la Fig. 8 A, la viabilidad celular, medida por el método de exclusión con azul de tripano, disminuyó a  $41 \pm 8.04\%$  en las condiciones de HBG. La adición de rcGH 1nM durante la HBG (H+GH1) promovió de manera significativa un aumento en la viabilidad celular (a  $70.3 \pm 14.3\%$ , 1.7-veces comparado con HBG), aunque no hubo cambios significativos con las concentraciones de 10 (H+GH10) y 100nM (H+GH100) de rcGH ( $63.6 \pm 12.4\%$  y  $61 \pm 10.6\%$  de viabilidad, respectivamente). Bajo condiciones de normoxia, el tratamiento con GH no tuvo un efecto significativo en la viabilidad celular ( $91.3 \pm 11\%$  versus  $94.5 \pm 8.9\%$  con rcGH 1 nM;  $90.4 \pm 10.4\%$  con 10 nM;  $88.3 \pm 13.4$  con 100 nM).

Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT (Fig. 8 B) mostraron que después de la HBG seguida por 24 horas de reoxigenación, sólo el  $38.4 \pm 7.22$  % de las células permanecieron viables, comparado con el  $97.8 \pm 11.9\%$  de viabilidad bajo condiciones de normoxia; mientras que la proporción de células vivas aumentó de manera significativa cuando los cultivos se trataron con rcGH 1nM ( $66.03 \pm 12.8\%$ ) o 10 nM ( $59.34 \pm 11.8\%$ ), pero no hubo diferencias significativas con 100 nM ( $54.77 \pm 7.0\%$ ). El tratamiento con rcGH 1nM aumentó la viabilidad celular 1.7 veces comparado con los resultados obtenidos con HBG.

Como ya se mencionó, las condiciones de HBG provocaron una disminución en el número de células presentes en los cultivos celulares de cerebelo de pollo de 15DE. Para cuantificar estos datos, se contaron el número de células teñidas con DAPI por unidad de área (Fig. 8C, panel de la izquierda). Comparado con las condiciones de normoxia (100%, correspondiente a  $211.6 \pm 8.5$  células por campo), el número total de células disminuyó significativamente después de la HBG a  $47 \pm 2\%$  (correspondiente a  $99.4 \pm 5.9$  células por campo). Sin embargo, al añadir 1nM de GH durante la HBG (HBG+GH) se promovió la supervivencia celular a  $71 \pm 3\%$  (correspondiente a  $151.4 \pm 8.4$  células por campo) (Figura 8C, panel derecho). La GH promovió la supervivencia celular 1.5-veces comparado con las condiciones de HBG.

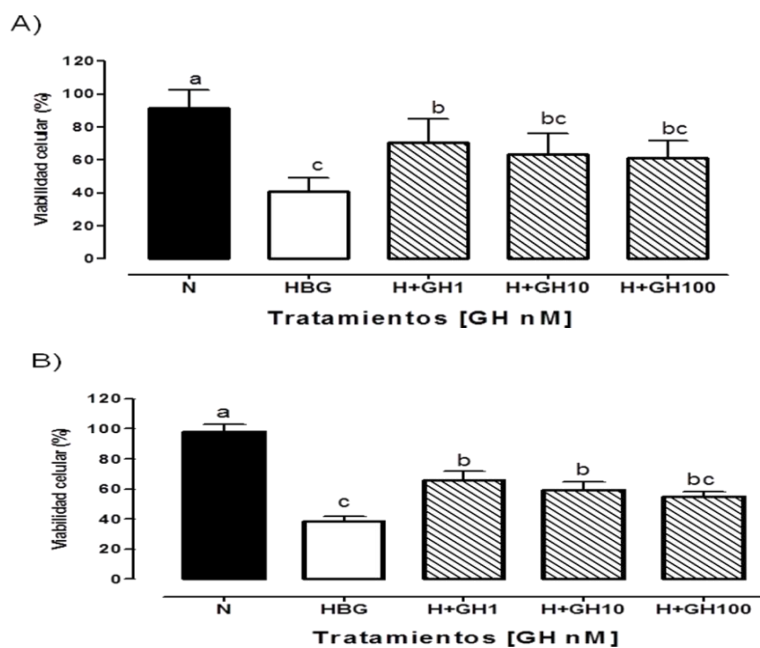


Fig. 8A. Efecto de rcGH sobre la viabilidad celular dependiendo de la dosis en los cultivos primarios de cerebelo de pollo de 15DE en condiciones de normoxia (N, p neles A, C) y de HBG (p neles B, D) seguida de 24 horas adicionales de reoxigenaci3n. La viabilidad celular se evalu3 por el m3todo de



exclusión con azul de tripano (A) y por MTT (B). Las gráficas muestran células vivas expresadas como porcentaje de células totales. Las células se sometieron a HBG y en presencia de rcGH 1nM (H+GH1), 10 nM GH (H+GH10), y 100 nM GH (H+GH100). Los controles (N) se mantuvieron bajo condiciones de normoxia (37°C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>). Cada barra representa la media  $\pm$  ES, n = 5 experimentos independientes con 3 replicados para cada muestra. Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes entre ellos, evaluados por ANOVA de una vía, p < 0.05.

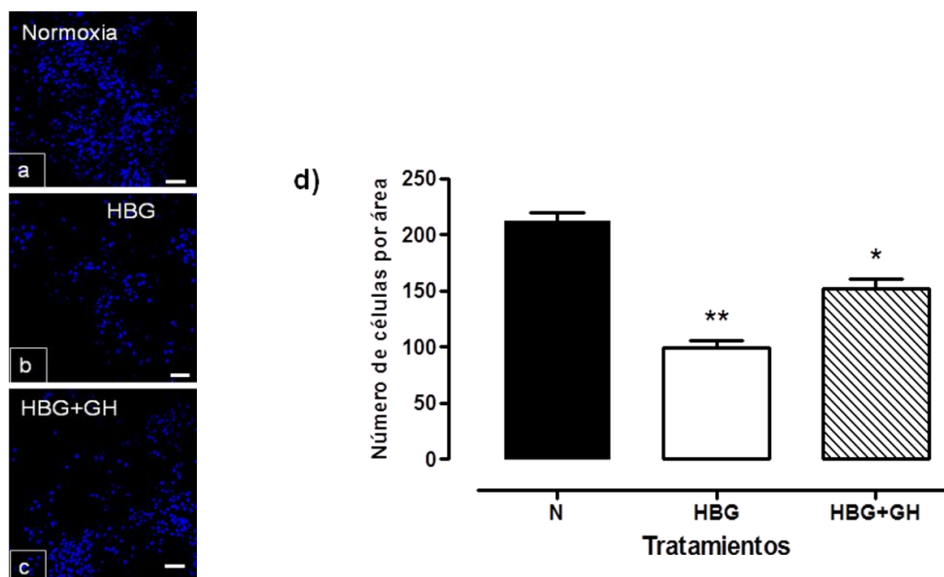


Fig. 8B. Número total de núcleos celulares marcados con DAPI (en una superficie de 19,400  $\mu\text{m}^2$ ) bajo condiciones de normoxia (a), hipoxia y baja glucosa (HBG, b) y HBG con rcGH 1nM (HBG+GH, c). Se cuantificaron los núcleos celulares (d) en 8 – 10 campos por placa de cultivo y las células fluorescentes marcadas con DAPI se reportan como un porcentaje del total de células presentes en cada campo; se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. La condición de normoxia tuvo el número más alto de células y durante la HBG el número de células disminuyó de manera dramática. Con el tratamiento de rcGH 1nM se observó un aumento significativo en el número de células. Cada barra representa la media  $\pm$  ES, n = 5, \* p<0.05; \*\* p<0.01.

## 7.8. Efecto anti-apoptótico de GH durante HBG.

### *7.8.1. Medición de actividad de caspasa-3*

La adición de GH redujo la muerte celular por apoptosis en los cultivos primarios de cerebelo de pollo de 15DE, lo que se determinó por medio de la actividad enzimática de caspasa-3 (Fig. 9 A). La actividad basal de esta enzima en las condiciones control de normoxia (N) fue de  $21.8 \pm 7.7\%$  en comparación con los valores normalizados observados durante la HBG ( $100 \pm 17.7\%$ ). Cuando los cultivos se expusieron a HBG con la presencia simultánea de rcGH 1nM (HLG+GH), la actividad de caspasa-3 disminuyó de manera significativa a  $63 \pm 12.4\%$ .

### 7.8.2. Medición de fragmentación de ADN por TUNEL.

De manera similar, la fragmentación de ADN producida por la muerte celular por apoptosis, se observó por medio de la técnica de TUNEL en células expuestas a HBG y tratadas con rcGH (Fig. 9 B). El porcentaje de células apoptóticas aumentó dramáticamente (23.1-veces) en los cultivos sometidos a HBG ( $78.6 \pm 13\%$ , Fig. 9 C) comparado con los cultivos mantenidos bajo condiciones de normoxia ( $3.4 \pm 1.6\%$ , Fig. 9 C). La presencia de rcGH 1nM durante la HBG disminuyó de manera significativa (aproximadamente a la mitad) el número de células apoptóticas ( $36 \pm 8\%$ , Fig. 9 C). La cuantificación de células (Fig. 9 C) se realizó en 8 – 10 campos por placa de cultivo; las células con núcleos positivos a TUNEL (células apoptóticas, Figura 9 Bii, Bv, Bviii) están representados como un porcentaje del total de células presentes en cada campo cuantificadas por DAPI (Figura 9 Bi, Biv, Bvii, e imágenes combinadas en Figura 9 Biii, Bvi, Bix) utilizando imágenes obtenidas por microscopía confocal.

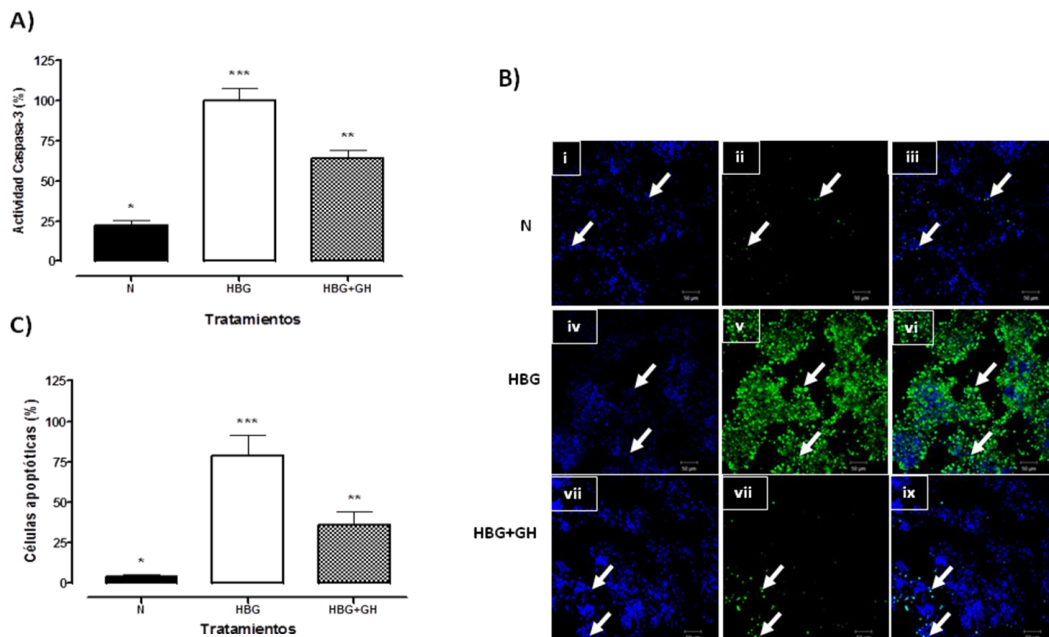


Fig. 9. Efecto de la rcGH en cultivos primarios de cerebelo de pollo de 15DE sobre la apoptosis después de un daño por HBG y 24 horas adicionales de reoxigenación. (A) La actividad de caspasa-3 se midió con un kit colorimétrico, y la actividad se reporta como porcentaje de actividad después de normalizar la actividad obtenida en las condiciones de HBG como el 100%. La adición de rcGH 1nM durante la HBG disminuyó la actividad de caspasa-3. (B) Los cuerpos apoptóticos (flechas) se revelaron con la técnica de TUNEL. Las células control, mantenidas bajo condiciones de normoxia (N) mostraron muy baja reactividad a TUNEL (i - iii); la células sometidas a HBG mostraron la señal más alta de TUNEL (iv-vi), y la señal de TUNEL disminuyó significativamente en las células tratadas con rcGH 1nM durante HBG (HBG + GH) (vii-ix). (C) La cuantificación se realizó en 8 – 10 campos por placa de cultivo; las células marcadas con TUNEL (verde, ii, v, vii) se reportan como porcentaje de células totales presentes en cada campo, observadas con DAPI, utilizando un microscopio confocal (i, iv, vii). Cada

barra representa la media  $\pm$  ES, n = 5. Los grupos con asteriscos diferentes son significativamente diferentes de acuerdo al análisis obtenido por medio de ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$ .

### 7.9. Efectos de la wortmanina sobre la viabilidad celular y la apoptosis.

Para explorar de manera preliminar qué mecanismos pueden estar involucrados con el efecto de la GH sobre la apoptosis durante la HBG, los cultivos de células de cerebelo de pollo de 15DE se trataron con un inhibidor específico de la vía de PI3K/Akt, wortmanina, y el efecto se examinó midiendo la viabilidad celular y la presencia de cuerpos apoptóticos (Fig. 10). Como se describió previamente, las condiciones de HBG disminuyeron de manera significativa la viabilidad a  $52.9 \pm 0.6\%$  en comparación a las condiciones de normoxia ( $79.7 \pm 2.2\%$ ), y la adición de rcGH 1 nM recuperó la viabilidad celular de manera significativa a  $69.1 \pm 2.6\%$ . Cuando los cultivos mantenidos en normoxia se trataron con 100 nM de wortmanina la viabilidad celular disminuyó significativamente a  $50.2 \pm 1.0\%$ . En presencia de wortmanina la GH no fue capaz de rescatar la viabilidad ni en condiciones de normoxia (N+W+GH,  $51.8 \pm 0.6\%$ ) ni de hipoxia (HBG+W+GH,  $49.4 \pm 3.9\%$ ) (Figura 10 A). Por otro lado, la HBG provocó un aumento dramático y significativo del número de células apoptóticas ( $80.3 \pm 1.4\%$ ) comparado con normoxia ( $8.2 \pm 0.8\%$ ), el tratamiento con rcGH 1 nM promovió una recuperación significativa al reducir el número de células apoptóticas ( $40.0 \pm 2.9\%$ ) en los cultivos sometidos a HBG. La adición de 100 nM de wortmanina aumentó de manera significativa la apoptosis en los cultivos celulares mantenidos en normoxia (N+W,  $81.6 \pm 2.2\%$ ). De igual manera en presencia de wortmanina la GH no pudo prevenir la apoptosis en ninguna de las condiciones ya que en normoxia fue de  $78.2 \pm 2.7\%$  (N+W+GH,) y en hipoxia de  $80.6 \pm 2.6\%$  (HBG+W+GH,) (Fig. 10 B).

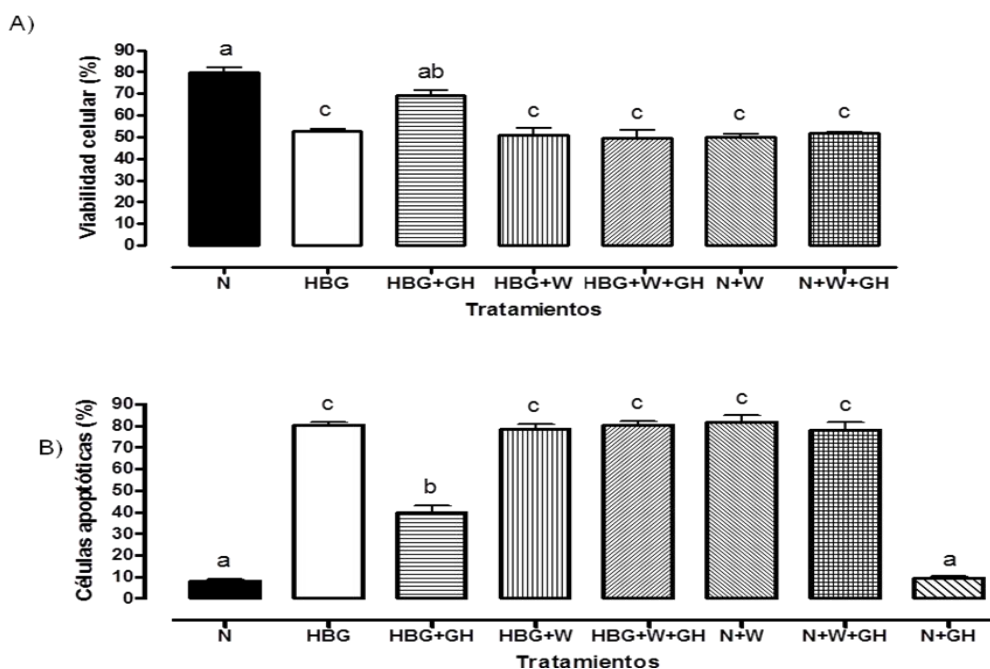


Fig. 10. Efecto de rcGH y wortmanina sobre la viabilidad celular y la apoptosis en cultivos primarios de cerebelo de pollo de 15DE durante HBG y seguido de 24 horas de reoxigenación. (A) La viabilidad celular se evaluó por el método de exclusión de azul de tripano en condiciones de normoxia (N), hipoxia y baja glucosa (HBG), o en presencia de rcGH 1 nM (HBG+GH). Los grupos también se incubaron en presencia de la wortmanina (100 nM), N+W o HBG+W y la combinación de N+W+GH o HBG+W+GH. (B) La proporción de células apoptóticas se evaluó por medio de la técnica de TUNEL. Los grupos fueron similares a los mencionados previamente, con la inclusión de un control adicional (N+GH). Cada barra representa la media  $\pm$  ES,  $n=3$  experimentos independientes con 5 replicados cada uno. Los grupos con letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo al análisis de ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.001$ .

### 7.10. Efecto de la GH en la activación de la vía de PI3K/Akt.

La cinasa serina-treonina, Akt, está involucrada en vías de señalización de supervivencia en diversos sistemas celulares. En este trabajo, examinamos la fosforilación de Akt en la serina 473 (p-Akt) inmediatamente después de las condiciones de HBG. La observación de bandas de 60kDa en homogenados de células de cultivos de cerebelo hizo evidente la presencia tanto de p-Akt como de Akt en condiciones de normoxia (Figura 11 A, línea N) y de HBG (Fig. 11 B, línea H). Para cuantificar estos resultados p-Akt se reporta como porcentaje del total de Akt (Fig. 11 C y D). p-Akt se expresa de manera constitutiva en las condiciones de normoxia ( $32.3 \pm 12.7\%$ ) y muestra un incremento prominente (1.63-veces) después de las condiciones de HBG ( $52.8 \pm 4.9\%$ ). El tratamiento con rcGH 1 nM aumentó la proporción de p-Akt (1.7-veces) en normoxia ( $55.5 \pm 12.7\%$ , Fig. 11 C), y también en HBG (1.4-veces,  $74.6 \pm 15.1\%$ , Figura 10D). Las células cultivadas se trataron con IgGs purificadas contra



rcGH (Inmunoneutralización) y se observó una disminución importante en los niveles de p-Akt, de  $11.3 \pm 5.1\%$  para normoxia y (Fig. 11 A y C, línea A) y de  $19.6 \pm 3\%$  para HBG (Fig. 11 B y D, línea A). El efecto estimulador del tratamiento de rcGH sobre los niveles de p-Akt fue eliminado cuando se incubó junto con las IgGs (Fig. 11, línea A+GH), disminuyendo a  $10.8 \pm 4.7\%$  para normoxia (Fig. 11 A y C) y a  $24.4 \pm 6.4\%$  para HBG (Fig. 11 B y D). Estos datos indican que los anticuerpos fueron capaces de neutralizar el efecto de la GH local y de la añadida exógenamente. Cuando las células se trataron con wortmanina 100 nM, se detectó muy poco p-Akt en ambas condiciones o con la adición simultánea de GH (Fig. 11, línea W, W+GH;  $11.5 \pm 4.9\%$  y  $3.8 \pm 1.1\%$ , respectivamente para normoxia, y correspondientemente  $7.4 \pm 3.7\%$  y  $5.0 \pm 2.0\%$  para HBG), indicando que este inhibidor específico abolió el efecto de GH.

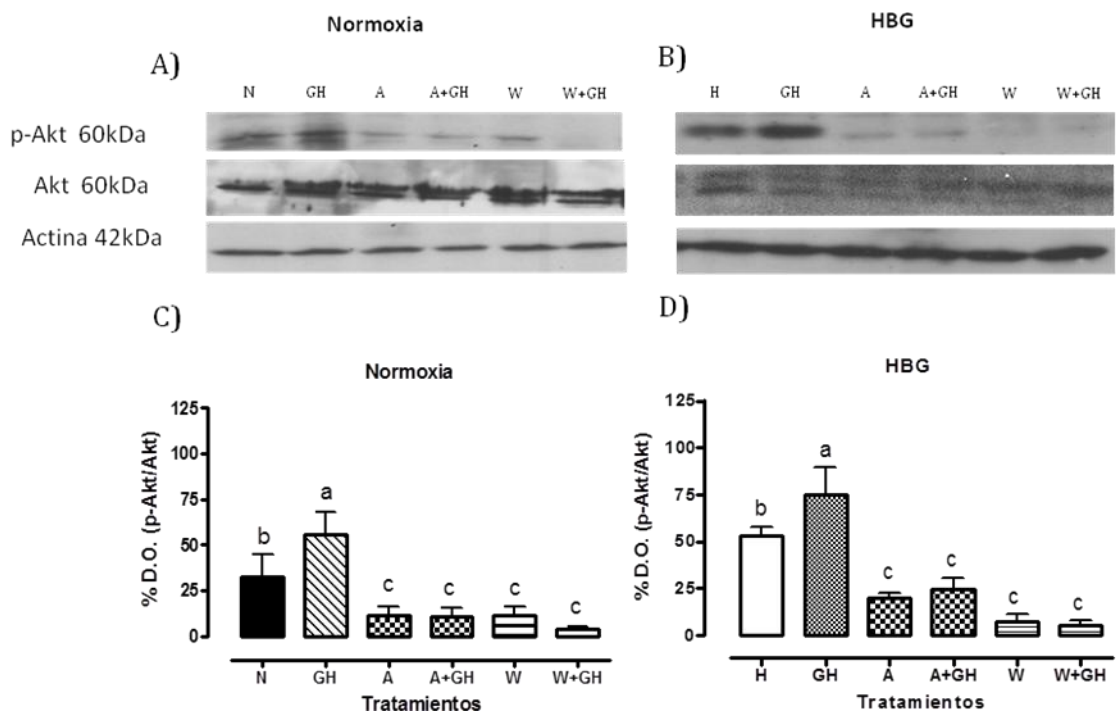


Fig. 11. GH activa la vía de PI3K/Akt. (A) y (B) Los cultivos celulares se mantuvieron tanto en normoxia como en HBG, y se expusieron a los siguientes tratamientos: sin (N y H, respectivamente) o con la adición de rcGH 1nM (línea GH); IgGs purificadas contra rcGH (línea A); IgGs purificadas contra rcGH + rcGH 1nM (línea A +GH); wortmanina 100 nM (línea W); wortmanina 100 nM + rcGH 1nM (línea W+GH). Después de los tratamientos, se prepararon los homogenados celulares y se analizaron por medio de Western blot para Akt, p-Akt y actina. La activación de la vía de PI3K/Akt se observó mediante la fosforilación de Akt (60kDa). (C) y (D) Análisis densitométrico: cada barra representa la media de la proporción p-Akt/Akt  $\pm$  ES, expresado en porcentaje; n=5 experimentos independientes con 3 replicados por muestra. Los grupos con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al análisis de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$ .

### 7.11. Activación de Bcl-2 por GH.

Otra vía importante involucrada en el control de la supervivencia celular depende de los miembros de la familia de Bcl-2. Para evaluar si la GH puede promover la supervivencia celular regulando los niveles de Bcl-2, determinamos el efecto del tratamiento de GH en el contenido de Bcl-2 en los cultivos de cerebelo en condiciones de normoxia (Fig. 12 A, línea N) o de HBG (Fig. 12 B, línea H). Para cuantificar estos resultados, Bcl-2 se reporta como porcentaje de la relación Bcl-2/actina (Fig- 12 C y D). La expresión basal de Bcl-2 ( $49.6 \pm 13.4\%$ ) estuvo presente en las condiciones de normoxia (Fig. 12 C) y mostró un aumento prominente (1.4-veces) después de HBG ( $71.4 \pm 16.9\%$ , Fig. 12 D). El tratamiento con rcGH aumentó significativamente (1.6-veces) la proporción de Bcl-2 en normoxia a  $80.7 \pm 24.1\%$  (Fig. 12 C, línea GH). Un efecto similar se encontró en condiciones de HBG (Fig. 12 D, línea GH) en donde los niveles de Bcl-2 aumentaron a  $119 \pm 26.4\%$ , comparado con su control. Las células se inmunoneutralizaron (IgGs) y se observó una disminución importante en los niveles de Bcl-2, de  $22.7 \pm 5.7\%$  para normoxia y de  $13.8 \pm 4.4\%$  para HBG (línea A). También el efecto observado con el tratamiento de GH sobre los niveles de Bcl-2 fue abolido cuando se incubó simultáneamente con las IgGs, disminuyendo a  $15.1 \pm 5.6\%$  para normoxia y  $14.8 \pm 5\%$  para HBG (línea A+GH). Por otro lado las células tratadas con wortmanina mostraron una disminución en los niveles de Bcl-2, de  $33.4 \pm 5.1\%$  para normoxia y de  $20.3 \pm 4.9\%$  para HBG (línea W). Cuando este inhibidor se administró junto con GH, los niveles de Bcl-2 disminuyeron a  $34.2 \pm 7.3\%$  para normoxia y a  $8.8 \pm 4.1\%$  para HBG (línea W+GH).

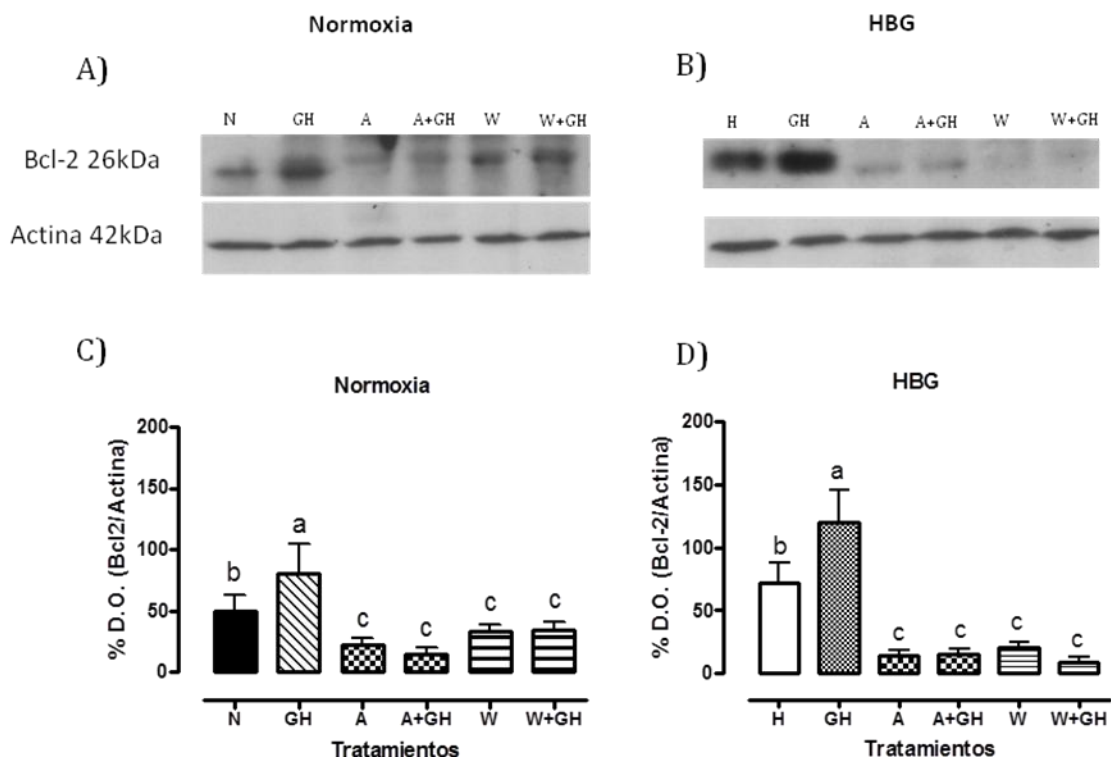


Fig. 12. Efecto de GH sobre los niveles de Bcl-2. (A) y (B) Los cultivos celulares se mantuvieron tanto en condiciones de normoxia (N) como de HBG (H), y se expusieron a los siguientes tratamientos: sin (N y H, respectivamente) o con la adición de rcGH 1nM (línea GH); IgGs purificadas contra rcGH (línea A); IgGs purificadas contra rcGH + rcGH 1nM (línea A +GH); wortmanina 100 nM (línea W); wortmanina 100 nM + rcGH 1nM (línea W+GH). Después de los tratamientos, las células se reoxigenaron por 24 horas, después de lo cual, se prepararon los homogenados celulares y se analizaron por medio de Western blot para Bcl-2 y actina. La detección de una banda de 26kDa indica la activación de Bcl-2. (C) y (D) Análisis densitométrico: cada barra representa la media de la proporción Bcl-2/Actina  $\pm$  ES, n= 5 experimentos independientes con tres replicados para cada uno. Los grupos con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al análisis de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$ .

### 7.12. Efecto del fragmento de 15 kDa de GH durante la HBG.

Resultados previos han mostrado que la principal isoforma de GH que se expresa en el cerebelo durante el desarrollo de pollos corresponde a la variante de 15 kDa de GH. En este trabajo se evaluó el efecto del fragmento de 15 kDa obtenido por corte proteolítico (con trombina de la rcGH) al ser adicionado al medio sobre la viabilidad celular y la actividad de caspasa 3 (Fig. 13). Las células fueron sometidas a HBG o mantenidas en condiciones de normoxia, en presencia o ausencia del fragmento de 15 kDa en concentración de 1 nM o 10 nM, después de lo cual se reoxigenaron 24 horas. La viabilidad celular medida por MTT ( $95.4 \pm 21.94\%$  para normoxia) disminuyó significativamente a  $30.7 \pm 5.4\%$  (3.1-veces) durante HBG; la incubación simultánea de los cultivos sometidos a HBG con el fragmento de 15 kDa aumentó la viabilidad celular

a  $36.08 \pm 14.14\%$  para la concentración de 1 nM y a  $51.19 \pm 10.7\%$  para la concentración de 10 nM. Por otro lado, la actividad de caspasa 3 disminuyó de  $100 \pm 5.9\%$  para HBG a  $85.7 \pm 6,6\%$  con la concentración de 1 nM y de manera significativa disminuyó a  $74.5 \pm 5.0\%$  con la concentración de 10 nM (Fig. 13 B). En comparación, la actividad basal de caspasa 3 en condiciones de normoxia correspondió a  $6.7 \pm 1.38\%$ .

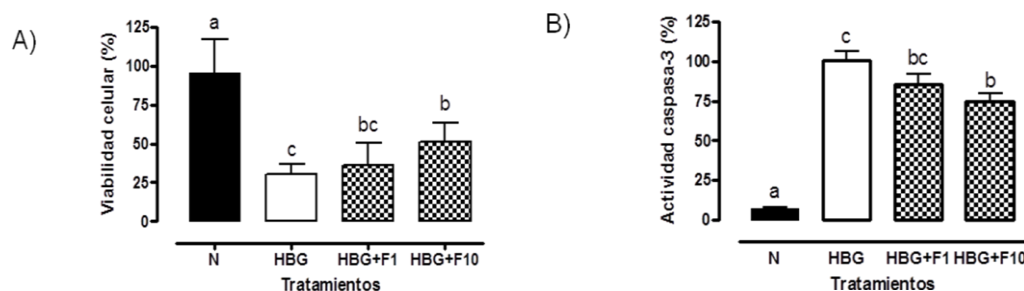


Fig. 13. Efecto del fragmento de 15 kDa de rcGH producido por corte proteolítico por trombina sobre la viabilidad celular medida por MTT (A), y sobre la actividad de caspasa 3 (B). Las células fueron sometidas a HBG o mantenidas en condiciones de normoxia (N), sin y con la adición del fragmento de 15 kDa en concentración de 1 nM (HBG+F1) o de 10 nM (HBG+F10), después de lo cual fueron reoxigenadas por 24 horas. Cada barra representa la media  $\pm$  ES, n=5. Los grupos con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al análisis de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$ .

## 8. Discusión.

En este trabajo determinamos la presencia y expresión del ARNm tanto de GH como de su receptor (GHR) en la corteza cerebelosa de pollos de 4 semanas de edad, los resultados mostraron diferencias en la distribución a lo largo del desarrollo así como diferencias en su expresión al comparar diferentes condiciones fisiológicas, esto permite sugerir que esta estructura cerebral es un sitio de producción local de GH y que esta hormona puede tener un efecto autócrino/parácrino. Por otra parte, la expresión diferencial en condiciones de daño, nos sugirieron un papel importante como parte de los mecanismos de neuroprotección que son activados después de la hipoxia como se ha observado en otras especies. Estudios previos han demostrado la presencia de inmunorreactividad a GH (GH-IR) en extractos de cerebelo de ratas adultas [59; 83] y su localización en las células de Purkinje y en la materia gris de cerebelos de pollos de 19DE [53]. En el caso del pollo estudios previos muestran que además del ARNm, la GH se encuentra localizada en diferentes áreas del cerebro (hipotálamo, hipocampo, pallium y cerebelo) a lo largo del desarrollo. En el caso de la corteza cerebelar se localiza en el citoplasma de las células positivas a Calbindina que pueden ser

consideradas como células de Purkinje. La GH-IR también se observó, aunque con menos intensidad, en células granulares marcadas con NeuN, así como en algunas células de la capa molecular, que pudieran ser células estrelladas, basado en su localización [3]. En contraste, se observó muy poca colocación de GH-IR con GFAP, principalmente en la capa granular del cerebelo. Los hallazgos de la presencia de GH-IR en el cerebelo pueden reflejar la síntesis local de GH ya que la barrera hematoencefálica excluye la entrada de esta hormona a través de la circulación [93]. En apoyo a esta propuesta, se demostró la expresión del gen de GH por RT-PCR y secuenciación del ADNc en el cerebelo. Se determinó que el ADNc de la GH de cerebelo de pollo presentó un 99.8% de homología con la secuencia del ADNc de la retina neural [14], ya que solamente difirió por dos pares de bases (G por C en la posición 336, y T por C en la posición 339). El ADNc de la GH del cerebelo fue también muy similar al ADNc del testículo (99.4%, [57]), la bursa (98.6 %, [99]) y el pulmón (99.5%, [16]). Las ligeras diferencias entre las secuencias pueden reflejar los polimorfismos que ocurren en el gen de GH. Dentro del cerebelo de pollos de 4 semanas, la expresión del gen de GH se confinó principalmente en las células de Purkinje, mediante la hibridación *in situ* y en menor proporción se detectó la presencia del ARNm de GH en células de la capa granular y en algunos procesos de la capa molecular. Respecto a la inmunorreactividad, la señal fue presente en estas áreas pero en menor proporción. Por otra parte, para explorar si al igual que en otras áreas nerviosas, como las células ganglionares de la retina, se identificaba un ARNm pequeño (sRNA) y una variante de menor peso molecular (15kDa), se realizaron estudios de 5'RACE y un PCR de doble round con lo que se trató de identificar ARNm alternativos de GH que pudieran dar lugar a un ARNm pequeño de GH, descrito previamente en el ojo [15; 118], sin embargo en las áreas analizadas nosotros no pudimos detectar el sARNm o ARN mensajero corto (datos no mostrados).

Además de la GH, también se observó la expresión de su receptor en el cerebelo de pollos de 4 semanas de edad. La presencia de inmunorreactividad al receptor de GH (GHR-IR) ha sido reportada previamente en las células de Purkinje de cerebro de rata [74] y en las células de Purkinje, células gliales y granulares de cerebro de conejos [72]. De igual manera, se han localizado sitios de unión a GH marcados radiactivamente en el cerebelo de salmón [95]. Por lo anterior se puede proponer que el cerebelo es un sitio de acción de la GH y nuestros datos apoyan esta propuesta ya que se detectó la

colocalización de GH-IR y de GHR-IR en el cerebelo de pollos de 4 semanas sugiriendo una acción autócrina/parácrina de GH en esta estructura cerebral. Esta posibilidad se apoyó con resultados que muestran la localización del gen responsivo a GH (GHRG)-1 en las células de Purkinje de cerebelo de pollo [55], ya que el GHRG-1 es un marcador específico de la acción de GH en pollos [53]. El cerebelo es una estructura altamente conservada del SNC de los vertebrados y es muy conocido por su función en la coordinación motora [73]. Se cree que la GH puede estar involucrada en el proceso de crecimiento del cerebelo, ya que los ratones deficientes de GH tienen un cerebelo un 20% más pequeño que los ratones control [86]. De igual manera, estudios previos han demostrado que la GH puede tener un papel como factor neuroprotector después de un daño, actuando a través de mecanismos autócrinos/parácrinos [58; 103; 105]. En este trabajo se observó un aumento en la expresión de GH en el cerebro completo, en cerebelo y en células del cerebelo en cultivo después de ser sometidos a daño por HBG. En experimentos *in vitro* en los cuales se ha agregado GH exógena, se mejoró la sobrevivencia celular y puede revertir en parte el daño como observó previamente el grupo de Scheepens y cols. [107] quienes han mostrado un aumento en la expresión del ARNm de GH y de su proteína en el cerebro de rata, después de un daño de hipoxia [48; 108]. Varios estudios han demostrado también que el tratamiento con GH no sólo provee un grado de neuroprotección sino que también mejora las funciones cognitivas después de un daño de hipoxia-isquemia en el cerebro [128] y atenúa la muerte celular por apoptosis.

Además, la GH aumenta la expresión de IGF-1 en el cerebelo de rata [40] sugiriendo que el IGF-1 juega un papel en la mediación de los efectos protectores de GH/GHR en el daño cerebral por hipoxia/isquemia [71]. Los resultados obtenidos en los cultivos celulares mostraron un incremento en la concentración de GH después de la HBG, lo que puede indicar un mecanismo de neuroprotección y reafirma el hecho de utilizarlos como modelo de estudio para evaluar el papel de GH como factor de supervivencia celular en respuesta a las condiciones de hipoxia-isquemia. Se ha reportado que el daño que resulta de la privación de oxígeno y glucosa seguido de 24 horas de reoxigenación en cultivos primarios de células de hipotálamo, puede mimetizar las condiciones patológicas de una isquemia *in vitro* [31]. En este trabajo además de mostrar evidencia de que la GH tiene un efecto antiapoptótico en cultivos de cerebelo de pollos de 15DE expuestos a HBG, mediado por mejorar la viabilidad celular. También utilizamos este

modelo *in vitro* para iniciar estudios que pudieran indicar los mecanismos moleculares involucrados en estos efectos de la GH.

Los cultivos primarios de cerebelo permiten crecer las células *in vitro* bajo condiciones controladas [21] con bajo potasio (5 nM). El crecimiento de neuronas en condiciones libres de suero facilita el control de las condiciones experimentales para poder estudiar a las neuronas individuales [21]. De igual manera, el medio libre de suero evita el uso de inhibidores mitóticos citotóxicos que se utilizan para inhibir la proliferación de células gliales. Las células de cerebelo presentes en el cultivo mostraron una alta proporción de viabilidad (más de  $98.1 \pm 0.04\%$ ) debido a la baja tasa de muerte celular en condiciones de normoxia (control). Después de 72 horas de estabilización, una gran proporción de las células (85%) expresaron el marcador específico de neuronas, NeuN, similar a lo reportado por otros autores [82]. La inmunocitoquímica con  $\beta$ -tubulina III confirmó la característica típica de las neuronas en cultivo: células con procesos de citoesqueleto positivos a tubulina. Estos dos marcadores neuronales colocalizaron con GH-IR como se mostraron en la sección de resultados. La señal para GH se observó claramente en el cuerpo celular, principalmente alrededor y dentro del núcleo, como se observó en las células de Purkinje y de la capa granular [3]. Cuando las células de cultivo de cerebelo se sometieron a HBG, se observó una disminución significativa tanto en la viabilidad como en la densidad celular, indicando que la HBG también afecta el anclaje y la sobrevivencia. Sin embargo, la adición simultánea de rcGH durante la HBG aumentó significativamente la viabilidad celular (a  $70.3 \pm 14.3\%$ ), lo que sugiere un efecto protector de la GH. Este resultado es consistente con evidencia previa de que la GH tiene actividad antiapoptótica en otro tipo de células, como cultivos primarios de monocitos en donde la apoptosis inducida por el ligando de Fas fue inhibida por la inducción de Bcl-2 [49]; en cultivos primarios de células de bursa de pollo en donde la apoptosis disminuyó por la inhibición de la actividad de caspasa-3 [100]; en células de la granulosa de bovinos vía AMPc/proteína cinasa A [Sirotkin et al., 1999]; en la línea celular C2C12 de mioblastos de ratón a través de la vía PI3K/Akt [109]; en cultivos de cardiomiocitos a través de la disminución de la fosforilación de p38 en células ganglionares de la retina de pollos vía PI3K/Akt e inhibición de caspasa-3 [103; 104]. El aumentar la concentración de GH (10 y 100nM) no aumentó de manera significativa el efecto protector durante HBG medido por viabilidad celular. Estos resultados son similares a los previamente reportados con

células neuronales híbridas (médula espinal ventral 4.1) en donde las células tratadas con GH (6 – 600 nM) proliferaron un 20% comparado con el control, pero el número de células vivas comenzó a disminuir en una manera dependiente de la dosis a concentraciones de 600nM o más altas [78]. Por otro lado, se ha reportado que las acciones de GH en procesos cognitivos están mediados por una curva de U invertida de dosis-respuesta. Esto significa que mientras dosis intermedias mejoran los procesos cognitivos, bajas dosis de GH no tienen efecto y dosis más altas pueden no tener efecto o alterar la función cognitiva [37] incluso disminuirlas. Estos resultados pueden explicarse por el número finito de receptores y el efecto debe ser proporcional a la fracción de receptores ocupados por la hormona; cuando el efecto es máximo todos los receptores se encuentran ocupados, sin embargo, con dosis muy altas del ligando se puede producir un fenómeno de sobresaturación que resultará en un efecto de menor intensidad que al utilizar dosis más bajas o incluso de inhibición con respecto al control [37]. Esto puede ser explicado por la inhibición de la dimerización del GHR a través de interacciones con el sitio 1 con concentraciones altas de GH, provocando una saturación del receptor [42].

Los mecanismos de señalización que regulan la expresión y activación de vías apoptóticas que alteran la funcionalidad y promueven la muerte celular, no se han estudiado a fondo. La hipoxia/isquemia induce la traslocación de Bax de citosol a la mitocondria provocando la liberación del citocromo C de la región intermembrana de la mitocondria, lo que activa a caspasa 9 [87]. Encontramos que la inhibición de la apoptosis inducida por HBG es llevada a cabo por la GH a través de la disminución de la actividad de caspasa 3 comparada con el control de HBG; estos resultados apoyan la hipótesis de que esta caspasa es parte de la red de vías involucradas en la muerte neuronal. Además, la GH redujo aproximadamente a la mitad el número de células apoptóticas detectadas por la técnica de TUNEL, mostrando un papel de la hormona como un factor antiapoptótico. Estos resultados son consistentes con reportes previos de explantes de retina de embriones de pollo (6 DE y 8 DE) o células ganglionares de retina de pollo incubadas con  $10^{-6}$  M de GH, en donde la GH aumento la sobrevivencia celular e inhibió la apoptosis al regular la transcripción y la expresión proteica de caspasa 3 y 9 la presencia de núcleos positivos al TUNEL [103; 104; 105].



Los mecanismos por los cuales la GH puede prevenir la muerte celular no han sido totalmente definidos, pero se ha sugerido que la vía del fosfatidil inositol cinasa (PI3K) así como la activación de NfkB están implicados [66].

El Akt funciona a través de una vía sensible a la wortmanina e involucra al PI3K y es activado por varios factores de crecimiento y sobrevivencia [24; 41]. Nosotros estudiamos los efectos de bloquear la vía de PI3K/Akt con wortmanina en condiciones de normoxia y HBG así como en presencia de GH. La viabilidad celular en condiciones de normoxia disminuyó a un tercio cuando se trató con wortmanina, simulando el efecto observado cuando los cultivos se someten a HBG. En contraste con el resultado obtenido de que la GH aumenta la viabilidad celular durante HBG, cuando se incubaba simultáneamente con wortmanina, no es capaz de ejercer su efecto protector en ninguna de las condiciones. De igual manera, el número de células apoptóticas aumento considerablemente cuando los cultivos en normoxia se trataron con wortmanina comparados con el control, y fue muy similar a lo que ocurre con HBG. En este caso la GH tampoco pudo ejercer su efecto antiapoptótico cuando se agrega simultáneamente con wortmanina. Estos resultados pueden indicar que la vía de PI3K/Akt está involucrada en las acciones neuroprotectoras de GH en este modelo de estudio.

Se ha reportado que la GH y el péptido liberador de GH-6 (GHRP-6) aumentan la fosforilación de Akt en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de rata [40], y también que el tratamiento con GH reduce los niveles de Akt mientras que aumenta los de p-Akt en la retina neural de embriones de pollo [107]; por lo tanto, nosotros examinamos si los mecanismos de señalización intracelular que involucran a Akt pueden ser activados por GH en los cultivos de cerebelo durante HBG. Observamos que la HBG induce la activación de Akt comparado con el control (normoxia) y que el tratamiento con GH aumenta esta activación en ambas condiciones; sugiriendo que la GH puede ejercer sus efectos neuroprotectores y antiapoptóticos a través de esta vía de señalización. Akt previene la apoptosis al inactivar varias moléculas, tales como BAD [36; 38], caspasa 9 y caspasa 3 [25]. La activación de Akt también disminuyó cuando las células se inmunoneutralizaron contra GH, indicando que la GH endógena presente en las células puede tener un papel en la activación de Akt. Como Akt está relacionado con la vía de PI3K, la inhibición con wortmanina resultó en un bloqueo de la fosforilación de Akt como se observó en los resultados. Nuestros datos sugieren que la acción de GH se da a través de la activación de la vía de PI3K/Akt y la expresión de Bcl-2, lo que resulta en

una disminución de la apoptosis. Estos resultados concuerdan con lo reportado para las células ganglionares de la retina, en donde el tratamiento con GH estimuló los niveles de p-Akt y la adición de wortmanina de manera simultánea con GH redujo sus acciones antiapoptóticas [104; 105; 107].

Otra vía importante de la apoptosis involucra la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma, en donde activa caspasas al interactuar con factores citosólicos, incluyendo Apaf-1 y caspasa 9 [129]. Bcl-2 inhibe la traslocación del citocromo c bloqueando la activación de caspasas y la apoptosis [70; 123]. La regulación de la expresión de Bcl-2 se ha identificado como un paso crítico por el cual los factores de crecimiento promueven la sobrevivencia celular [12; 119] y las neuronas que expresan a Bcl-2 rara vez exhiben apoptosis [32]. Se ha sugerido que la activación de Akt atenúa la supresión de Bcl-2 por BAD después de un daño ya que Bcl-2 es regulado negativamente por BAD [124; 127]. Observamos un aumento significativo en la expresión de Bcl-2 durante HBG comparado con normoxia; la adición de GH aumentó esta activación, lo que sugiere que de Bcl-2 puede tener un papel importante en la regulación de los mecanismos de protección en respuesta a HBG. Estos resultados son consistentes con aquellos observados en ratas a las que se les infundió GH (100 µg/d) y GHRP-6 (150 µg/d), lo que aumenta los niveles de IGF-1 en el hipotálamo (300%), hipocampo (200%) y cerebelo (150%) comparado con el vehículo. Estos resultados coinciden con el aumento de la activación de Akt y de los niveles de Bcl-2 en las mismas áreas en donde el IGF-1 estuvo aumentado y mostró que la GH y el GHRP-6 pueden estimular vías intracelulares involucradas en la sobrevivencia celular en respuesta a factores de crecimiento [40]. Además cuando la GH local fue inmunoneutralizada, la expresión de Bcl-2 disminuyó, lo que sugiere que la GH puede tener un papel en la activación de Bcl-2. Similarmente en las células ganglionares de la retina, la inmunoneutralización de GH indujo la inhibición de la fosforilación de Akt e inició la apoptosis a través de la activación de caspasa3 y el rompimiento de PARP-1 [104].

La GH está constituida por una variedad de isoformas moleculares o variantes [8], y nosotros demostramos un patrón de heterogeneidad de GH en el cerebelo de pollo que es diferente al observado en la hipófisis [3]. Se ha demostrado que una variante submonomérica de 15kDa es la isoforma más abundante de GH en el cerebelo de pollo

de acuerdo con resultados previos que muestran que el fragmento de 15 kDa se produce en la hipófisis y en diversos tejidos extrahipofisarios como el SNC y el ojo del embrión de pollo [3; 8; 15].

En el laboratorio el fragmento de 15kDa se obtiene por proteólisis controlada y ha mostrado tener bioactividades como la estimulación de la incorporación de timidina tritiada a células endoteliales de cerebro de bovinos en una manera dependiente de la dosis, en un bioensayo angiogénico; una fuerte inhibición de la 5'-monodeshidrogenasa en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo; y la estimulación de la proliferación de células endoteliales de bovinos *in vitro* [9]. Nosotros probamos este fragmento de 15kDa en los cultivos de cerebelo de pollo durante las condiciones de HBG; tuvo un efecto sobre la viabilidad celular análogo al observado con la GH completa, aunque requirió de una concentración más alta (10nM) para mostrar un mejor efecto. Este resultado correlaciona con el efecto dependiente de la dosis de este fragmento en la proliferación de células endoteliales [9]. Además, como este fragmento aumento la viabilidad celular también probamos su efecto sobre la actividad de caspasa 3 durante HBG para determinar sus efectos antiapoptóticos, de igual manera sólo la concentración de 10 nM tuvo un efecto significativo. Existen reportes que sugieren que este fragmento puede ejercer sus efectos biológicos a través de un receptor diferentes [9]. Se requiere de otros estudios para determinar si la variante de 15kDa presente en el cerebelo [3] es estructuralmente similar a la utilizada en este trabajo. Debido a que la variante de 15kDa es la más abundante en el cerebelo se requiere de una caracterización bioquímica y estructural así como definir si es a través del mismo receptor a GH como puede estar actuando.

## **9. Conclusión.**

El cerebelo es un buen modelo de estudio para evaluar los mecanismos citotóxicos y los procesos de protección de moléculas que anteriormente no se consideraba que pudieran tener efectos diferentes a los clásicos (endócrinos) ya establecidos y no otros como los parácrinos y/o autócrinos

Así mismo, al ser tanto la GH como el cerebelo muy conservados filogenéticamente, los estudios realizados pueden extrapolarse de nuestro organismo de estudio, el pollo, a organismos superiores como mamíferos.

Corroboramos que el cerebelo es un sitio de síntesis y acción de GH, debido a la expresión del gen de la hormona y de su receptor en los 3 estratos celulares de la corteza cerebelosa. La colocación de ambas marcas inmunorreactivas (GH y GHR) permite sugerir el efecto autócrino-parácrino.

La GH puede tener efectos de protección en esta estructura ya que al someter las células a HBG, la concentración de GH presente en los cultivos de cerebelo aumentó, lo que puede indicar un mecanismo para contrarrestar el daño causado por estas condiciones.

De la misma manera, las células tratadas con GH durante HBG aumentaron su viabilidad celular y la muerte celular por apoptosis disminuyó, corroborando los efectos protectores de esta hormona.

La posible vía por la cual GH lleva a cabo su efecto neuroprotector es la de PI3K/Akt a través de la fosforilación de Akt y el incremento en la expresión de Bcl-2.

Al haber caracterizado al fragmento de 15 kDa como la isoforma de GH más abundante en el cerebelo, se observó que mostró un efecto análogo a la GH completa sobre la viabilidad celular y la muerte celular por apoptosis.

Sin embargo, se requiere continuar con estudios para determinar y caracterizar tanto al fragmento de 15kDa como determinar si estos efectos pueden ser mediados por mecanismos autócrinos y/o parácrinos.

## 10. Bibliografía

1. Ahumada-Solórzano S.M., Carranza M.E., Pedernera E., Rodríguez-Méndez A.J., Luna M., Arámburo C. (2012). Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol.* 175 (2); 297-310.
2. Ajo R., Cacedo L., Navarro C., Sánchez-Franco F. (2003). Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology.* 144 (3); 1086-1097.
3. Alba-Betancourt C., Arámburo C., Ávila-Mendoza J., Ahumada-Solórzano S.M., Rodríguez-Méndez A.J., Carranza M., Harvey S., M. Luna. (2011). Expression, cellular distribution, and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development, *Gen Comp Endocrinol.* 170; 528-540.
4. Allen J.T., Bloor C.A., Kedia R.K., Knight R.A., Spiteri M.A. (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.
5. Arámburo C., Sánchez-García R., Fenton-Navarro B., Perera-Marín J.G., Valverde-Rodríguez C. (1989). Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona del crecimiento de pollo (cGH), *Veterinaria México.* 20; 397-405.
6. Arámburo C., Navarrete S., Montiel J.L., Sánchez R., Berghman L.R. (1991). Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): evidence of G-cGH isoforms, *Gen. Comp. Endocrinol.* 84; 135-146.
7. Arámburo C., Montiel J.L., Sánchez R., Perera G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J., Fenton B. (1993). La hormona de crecimiento del pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, t. I. México, UNAM.* pp- 483-499.
8. Arámburo C., Luna M., Carranza M., Reyes M., Martínez-Coria H., Scanes C.G. (2000). Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223; 67-74.
9. Arámburo C., Carranza M., Reyes M., Luna M., Martínez-Coria H., Berúmen L. and Scanes C.G. (2001). Characterization of a bioactive 15kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone, *Endocrine.* 15; 231-240
10. Attardo D. and Harvey S. (1990). Growth hormone-binding sites in chicken hypothalamus. *J. Mol. Endocrinol.* 4; 23-29.
11. Back S.A. (2006). Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12:129–140

12. Baker N.I.L., Carlo Russo V., Bernard O., D'Ercole A.J., Werther G.A. (1999). Interactions between bcl-2 and the IGF-1 system control of apoptosis in the developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 118; 109-118.
13. Barks, J.D., Silverstein, F.S. (1992). Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol.* 2, 235–243.
14. Baudet M.L., Sanders E.J., Harvey S. (2003). Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology.* 144 (12); 5459-5468.
15. Baudet M.L., Harvey S. (2007). Small chicken growth hormone (scGH) variant in the neural retina, *J. Mol. Neurosci.* 31; 261–271.
16. Beyea J.A., Olson D.M., Vandergriend R.A., Harvey S. (2005). Expression of growth hormone and its receptor in the lungs of embryonic chicks, *Cell. Tissue. Res.* 322; 379–392.
17. Bonfoco E., Krainc D., Ankarchona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively, by mild and intense insults with N-methyl-d-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92 (7); 162–7166.
18. Borasio G.D., John J., Wittinghofer A., Barde Y.A., Sendtner M., Heumann R. (1989). ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron.* 2; 1087-1096.
19. Bossenmeyer C., Chihab R., Muller S., Schroeder H., Daval J.L. (1998). Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in central neurons. *Brain Res.* 787; 107-116.
20. Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group. (1986). Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. *New Engl J Med.* 314; 397–401.
21. Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J. (1994). Neurobasal1% Medium/B27 supplement: a new serum-free medium combination for survival of neurons. *Focus.* 16; 6-9.
22. Brooks A.J., Wooh J.W., Tunny K.A., Waters M.J. (2007). Growth hormone receptor; mechanism of action. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 10.1016/j.biocel.2007.07.008, article in press.
23. Brown R.J., Adams J.J., Pelekanos R.A., Wan Y., McKinstry W.J., Palethorpe K. (2005). Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(9); 814–821.
24. Burgering B.M., Coffey P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction, *Nature*; 599–602.
25. Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282; 1318-1321.
26. Carter S., Schwartz J., Smith L.S. (1996). Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology.* 58; 180-207.

27. Chen C., Tonegawa S. (1997). Molecular genetic analysis of synaptic plasticity activity-dependent neural development, learning and memory on the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci.* 20; 157-184.
28. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler R.A, Zhu R.L, Graham S.H, Simon R.P. (1998). Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 18; 4914–4928.
29. Choi D.W., Rothman S.W. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* 13; 171–182.
30. Chomczynsky P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162; 156–159.
31. Chung H., Kim E., Lee D.H., Seo S., Ju S., Lee D., Kim H., Park S. (2007). Ghrelin Inhibits Apoptosis in Hypothalamic Neuronal Cells during Oxygen-Glucose Deprivation. *Endocrinology.* 148 (1); 148-159.
32. Clark R.S., Chen J., Watkins S.C., Kochanek P.M., Chen M., Stetler R.A., Loeffert J.E., Graham S.H. (1997). Apoptosis suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats, *J. Neurosci.* 17; 9172–9182.
33. Costa A., Zoppetti G., Benedetto C., Bertino E., Marozio L., Fabris C., Arisio R., Giraudi G.F., Testori O., Ariano M. (1993). Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *J Endocrinol Invest.* 16 (8); 625-633.
34. Costoya J.A, Finidori J, Moutoussamy S., Señaris R., Devesa J. and Arce V.M. (1999) Activation of Growth Hormone Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal: Evidence for a Role of AKT in this Pathway. *Endocrinology.* 140(12); 5937-5943.
35. Creyghton W.M., van Dam P.S., Koppeschaar H.P. (2004). The role of the somatotrophic system in cognition and other cerebral functions. *Semin Vasc Med.* 4 (2); 167-172.
36. Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell* 91; 231–241.
37. Deijen J.B., Arwert L.I. Cognitive status of adult growth hormone (GH)-deficient patients and GH-induced neuropsychological changes, in: F. Nyberg (Ed), *The somatotrophic axis in brain function*, Elsevier Academic Press, San Diego, California, U.S.A., 2006, pp. 287-300.
38. del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Núñez G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt, *Science* 278; 687–689.
39. Devesa J., Lima L., Tresguerres J.A.F. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3; 175-183.
40. Frago L.M., Pañeda C., Dickson A.L., Hewson A.K., Argente J., Chowen J.A. (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, *Endocrinology* 143; 4113-4122.
41. Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., Tsichlis P.N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase, *Cell* 81; 727-736.
  42. Fuh G., Cunningham B.C., Fukunaga R., Nagata S., Goeddel D.V., Wells J.A. (1992). Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor, *Science* 256; 1677-1680.
  43. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Murakami K., Kawase M., Chan P.H. (1998). Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18; 1239 –1247.
  44. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Noshita N., Sugawara T., Kawase M., Chan P.H. (2000). The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* 20; 2817–2824.
  45. Gent J., van Kerkhof P., Roza M., Bu G., and Strous G. J. (2002). Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(15); 9858–9863.
  46. Goffin V., Schiverick K.T., Kelly P., Martial J.A. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrinology Reviews.* 4; 335-409.
  47. Gossard F., Dihl F., Pelletier G., Dubois P.M., Morel G. (1987). In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. *Neurosci. Lett...* 79; 251-256.
  48. Gustafson K., Hagberg H., Bengtsson B., Brantsing C., Isgaard J. (1999). Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats, *Pediatric Res.* 43; 318-323.
  49. Haeffner A., Déas O., Mollereau B., Estaquier J., Mignon A., Haeffner-Cavaillon N., Charpentier B., Senik A., Hirsch F. (1999). Growth hormone prevents human monocytic cells from Fas-mediated apoptosis by up-regulating Bcl-2 expression, *Eur. J. Immunol.* 29; 334-344.
  50. Hancy N., Kудay C., Oguzoglu S.A. (1994). The effects of synthetic growth hormone on spinal cord injury. *J. Neurosurg Sci.* 38; 43-49.
  51. Harvey S., Johnson C.D.M., Sanders E.J. (1995). Extrapituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Journal of Endocrinology.* 166; 489-502.
  52. Harvey S. and Hull K.L. (1997). Growth Hormone: A paracrine growth factor? *Endocrine.* 7; 267-279.
  53. Harvey S., Johnson C., Sanders E. (2001a). Growth Hormone in neural tissues of the chick embryo. *Journal of Endocrinology.* 169; 487-498.



54. 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.
55. Harvey S., Lavelin I., Pines M. (2002). Growth hormone (GH) action in the brain: neural expression of a GH-response gene, *J. Mol. Neurosci.* 18; 89–95.
56. Harvey S. and Hull K. (2003). Neural Growth Hormone. An Update. *J. Mol. Neuroscience.* 20; 1-13.
57. Harvey S., Baudet M.L., Murphy A., Luna M., Hull K.L., Arámburo C. (2004). Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 139 (2); 158-167.
58. Harvey S., Baudet M.L., Sanders E.J. (2006). Growth hormone and cell survival in the neural retina: caspase dependence and independence, *NeuroReport.* 17; 1715–1718.
59. Hojvat S., Baker G., Kirsteins L., Lawrence A.M. (1982a). Growth Hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain Research.* 239; 543-557.
60. Hojvat S., Emanuele N., Baker G., Connick E., Kirsteins L., Lawrence A.M. (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.
61. Hrabia A., Sechman A., Gertler A., Rząsa J. (2011). Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell Tissue Res.* 345 (1); 191-202.
62. Hull K.L., Janssens W.C., Baumbach W.R., Harvey S. (1996). Growth hormone (GH)-binding proteins in GH-resistant guinea pigs, *Growth Regul.* 6; 165–175.
63. Hull K.L., 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.
64. Inage Y.W., Itoh M., Wada K., Takashima S. (1998). Expression of two glutamate transporters, GLAST and EAAT4, in the human cerebellum: their correlation in development and neonatal hypoxic– ischemic damage, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57; 554–562.
65. Jacobs C.M., Aden P., Mathisen G.H., Khoung E., Gaarder M., Loberg E.M., Lomo J., Maehlen J., Paulsen R.E. (2006). Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture. *Journal of Neuroscience Methods.* 156 (1-2); 129-35.
66. Jeay S., Gail E.S., Paul A.K., Postel-Vinay M.C. and Baixeras E. (2001). Growth Hormone Exerts Antiapoptotic and Proliferative Effects through Two Different Pathways Involving Nuclear Factor-B and Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Endocrinology.* 142 (1); 147-156.

67. Johnston M.V., Trescher W.H., Ishida A., Nakajima W. (2001). Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr. Res.* 49, 735–741
68. Kang T.H., Oh H.R., Jung S.M., Ryu J.H., Park M.W., Park Y.K., Kim S.Y. (2006). Enhancement of Neuroprotection of Mullberry Leaves (*Morus alba* L.) Prepared by the Anaerobic Treatment against Ischemic Damage. *Biol Pharm Bull.* 29 (2); 270-274.
69. Kato H., Kogure K., Araki T., Itoyama Y. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. (1994). *Brain Res.* 664 69–76.
70. Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* 275; 1132–1136.
71. Li R.C., Guo S.Z., Raccurt M., Moudilou E., Morel G., Brittian K.R., Gozal D. (2011). Exogenous growth hormone attenuates cognitive deficits induced by intermittent hypoxia in rats, *Neuroscience.* 196;) 237-250.
72. Lincoln D.T., el-Hifnawi E., Sinowatz F., Waters M.J. (1994). Immunohistochemical localization of growth hormone receptor binding protein in the mammalian cerebellum, *Ann. Anat.* 176; 419–427.
73. Llinas R., Bloedel J.R., Hillman D.E. (1969). Functional characterization of neuronal circuitry of frog cerebellar cortex, *J. Neurophysiol.* 32; 847–870.
74. Lobie P.E., Garcia-Aragon J., Lincoln D.T., Barnard R., Wilcox J.N., Walters M.J. (1993). Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74: 225-233.
75. 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.
76. 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 (1); 28-37.
77. Luna M., Rodríguez-Méndez AJ., Berumen L., Carranza M., Riesgo-Escovar J., Baudet ML., Harvey S., Arámburo C. (2008). Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius, *Dev. Comp. Immunol.* 32; 1313-1325.
78. Lyuh E., Kim H.J., Kim M., Lee J.K., Park K.S., Yoo K.Y., Lee K.W., Ahn Y.O. (2007). Dose-specific or dose-dependent effect of growth hormone treatment on the proliferation and differentiation of cultured neuronal cells, *Growth Hormone & IGF Res.* 17; 315-322.
79. Mattson M.P, Culmsee C., Yu Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 301(1):173-87. Review.

80. Martínez-Coria H., López-Rosales L.J., Carranza M., Berumen L., Luna M., Arámburo C. (2002). Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro, *Endocrine*. 17; 91–102.
81. McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V. (1988). Neurotoxicity of Nmethyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459, 200–203.
82. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116; 201-211.
83. Mustafa A., Adem A., Roos P., Nyberg F. (1994). Sex differences in binding of human growth hormone to rat brain, *Neurosci. Res.* 19; 93–99.
84. Mutch, L., Alberman, E., Hagberg, B., Kodoma, K., Perat, M.V. (1992). Cerebral palsy epidemiology: where are we and where are we going? *Dev. Med. Child Neurol.* 34, 547-551.
85. Nieto-Sampedro M., Lewis ER., Cotman CW., Manthorpe M., Skaper SD., Barbin G., Longo FM., Varon S. (1982). Brain injury causes a time-dependent increase in neurotrophic activity at the lesion site. *Science*. 217; 860-861.
86. Noguchi T., Sugiasaki T., Tsukada Y. (1985). Microcephalic cerebrum with hypomyelination in the growth hormone-deficient mouse (lit), *Neurochem. Res.* 10; 1097–1106.
87. Northington F.J., Ferriero D.M., Flock D.L., Martin L.J. (2001). Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia–ischemia is apoptosis, *J Neurosci.* 21; 1931-1938.
88. Noshita N., Sugawara T., Hayashi T., Lewe´n A., Omar G., Chan P.H. (2002) Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* 22; 7923–7930.
89. Noshita N., Sugawara T., Lewe´n A., Hayashi T., Chan P.H. (2003). Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 34; 1513–1518.
90. Nyberg F. (2000). Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front Neuroendocrinol.* 21 (4); 330-348.
91. Oillet J., Koziel V., Vert P., Daval J.L. (1996). Influence of post-hypoxia reoxygenation conditions on energy metabolism and superoxide production in cultured neurons from the rat forebrain, *Pediatr. Res.* 39; 598–603
92. Palmetshofer A., Zechner D., Luger T.A., 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.
93. Pan W., Yu Y., Cain C.M., Nyberg F., Couraud P.O., Kastin A.J. (2005). Permeation of growth hormone across the blood–brain barrier, *Endocrinology* 146; 4898–4904.

94. Patel J., Edwards A.D. (1997). Prediction of outcome after perinatal asphyxia. *Curr. Opin. Pediatr.* 9, 128-132.
95. Perez-Sanchez J., Smal J., Le Bail P.Y. (1991). Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*), *Growth Regul.* 1; 145–152.
96. Ramesh R., Kuenzel W.J., Buntin J.D., Proudman J.A. (2000). Identification of growth-hormone- and prolactin-containing neurons within the avian brain. *Cell Tissue Res.* 299 (3); 371-383.
97. Recher S., Raccurt M., Lambert A., Lobie P.E., Mertani H.C., Morel G. (2001). Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem.* 49 (3); 347-354.
98. Render C.L., Hull K.L., Harvey S. (1995a). Neural expression of the pituitary GH gen. *Journal of Endocrinology.* 147; 413-422.
99. Render C.L., Hull K.L., Harvey S. (1995b). Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine.* 3; 729-735.
100. Rodríguez-Méndez A.J., Luna-Acosta J.L, Carranza M., Harvey S., Arámburo C., Luna M. (2010). Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships?, *Gen. Comp. Endocrinol.* 167; 297-307.
101. Saito A., Hayashi T., Okuno S., Ferrand-Drake M., Chan P.H. (2003). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci.* 23; 1710–1718.
102. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (2001). Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from Eukaryotic cells. *Molecular cloning.* (Nolan C., Ford N., and Ferguson M., Editores). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 7.10-7.11.
103. Sanders E.J., Parker E., Arámburo C., Harvey S. (2005). Retinal growth hormone is an antiapoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation, *Exp. Eye Res.* 81; 551-560.
104. Sanders E.J., Parker E., Harvey S. (2006). Retinal ganglion cell survival in development: mechanisms of retinal growth hormone action, *Exp. Eye Res.* 83; 1205-1214.
105. Sanders E.J., Parker E., Harvey S. (2008). Growth hormone-mediated survival of embryonic retinal ganglion cells: Signaling mechanisms, *Gen. Comp. Endocrinol.* 156; 613-621.
106. Scanes C.G., Daughaday W.H. (1995). Growth hormone action: “Growth” en: Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H. *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press.
107. Scheepens A., Sirimanne E., Beilharz E., Breier B.H., Waters M.J., Gluckman P.D., Williams C.E. (1999). Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic–ischemic brain injury, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 68; 88-100

108. Scheepens A., Sirimanne E.S., Breier B.H., Clark R.G., Gluckman P.D., Williams C.E. (2001). Growth Hormone As A Neuronal Rescue Factor During Recovery From CNS Injury. *Neuroscience*. 104 (3); 677-687.
109. Segard H.B., Moulin S., Boumard S., Augier de Crémiers C., Kelly P.A., Finidori J. (2003). Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts, *Cell Signal*. 15; 615-23.
110. Shin D.H., Lee E., Kim J.W., Kwon B.S., Jung M.K., Jee Y.H., Kim J., Bae S.R., Chang Y.P. (2004). Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters*. 354; 64-68.
111. Siesjö B.K. (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: II. Mechanisms of damage and treatment. *J. Neurosurg*. 77; 337-354.
112. Sirotkin A.V., Makarevich A.V. (1999). GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system, *J. Endocrinol*. 163; 317-27.
113. Slominski A., Malarkey W.B., Wortsman J., Asa S.L., Carlson A. (2000). Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. *J. Lab. Clin. Med*. 136 (6); 476-481.
114. Sugawara T., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Kawase M., Chan P.H. (1999). Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*. 19; 1- 6.
115. Sugawara T., Noshita N., Lewen A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Chan P.H. (2002). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci*. 22; 209 -217.
116. Sugawara T., Fujimura M., Noshita N., Kim G.W., Saito A., Hayashi T., Narasimhan P., Maier C.M., Chan P.H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 1; 17-25.
117. Tai P.K., Liao J.F., Chen E.H., Dietz J., Schwartz J., Carter S. (1990). Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 21828-21834.
118. 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.
119. Tamatani M., Ogawa S., Nuñez G., Tokyama M. (1998). Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ*. 5, 911-919.
120. Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M., Nakashima K. (1992). Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene*. 112; 235-239

121. Tresguerres J.A.F. (1999). *Fisiología humana*. Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de Madrid, España.
122. Wu H., Devi R., Malarkey W.B. (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.
123. Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). BAD, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell* 80; 285-291.
124. Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275; 1129-1132.
125. 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.
126. Yu S.W, Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. (2002). Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 297; 259 –263.
127. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell* 87; 619-628.
128. Zhong J., Zhao L., Du Y., Wei G., Yao W.G., Lee W.H. (2009). Delayed IGF-1 treatment reduced long-term hypoxia-ischemia-induced brain damage and improved behavior recovery of immature rats. *Neurol Res*. 31; 483-9.
129. Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell* 90; 405-413.