



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE GH/IGF-1 ADMINISTRADOS POSTERIOR A UN DAÑO POR  
HIPÓXIA-ISQUEMIA EN CULTIVOS CEREBELARES DE POLLO

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
MARÍA DEL ROSARIO BALTAZAR LARA

**TUTOR:**

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ                      INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**MIEBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DRA. STÉPHANIE COLETTE                      INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
THÉBAULT

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ                      INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, CAMPUS JURQUILLA, QRO.; 1 DE AGOSTO DE 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México, Campus Juriquilla, teniendo como jefe de grupo al Dr. Carlos Aramburo de la Hoz, y bajo la dirección de la Dra. Maricela Luna Muñoz.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201817, IN206115 y IA200717. El autor contó con la beca del CONACYT no.696979, periodo 2015-2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por su apoyo, asesoría y paciencia en la realización de este trabajo. Así mismo, por ayudarme en mi formación académica y profesional. También gracias por el aprecio más allá del trato laboral.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por la oportunidad brindada de formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Stéphanie Colette Thébault y el Dr. Mauricio Díaz Muñoz que formaron parte de mi comité tutor, por la asesoría y los consejos dados para mejorar este proyecto, así como el apoyo brindado para mi formación profesional y académica.

A la Dra. Teresa Morales Guzmán, la Dra. María de la Luz Navarro Angulo y el Dr. Rogelio Arellano Ostoa por sus comentarios, los cuales favorecieron el contenido de esta tesis.

A la M. en C. Martha Carranza Salas por compartir todo su conocimiento, por ayudarme en mi formación profesional y personal, por resolver todas mis dudas, por su paciencia, tiempo y amistad.

A Gerardo Curtois por su apoyo técnico brindado y su dedicación por el laboratorio.

A la Ing. Nydia Hernández Ríos y la Dra. Olivia Vázquez Martínez por el apoyo técnico brindado.

A el Dr. Carlos Guillermo Martínez-Moreno y el Dr. José Ávila-Mendoza por el aporte de ideas, metodologías y técnicas para el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Leonor Casanova y Guadalupe Amador Uribe por resolverme todas mis dudas, la amabilidad y el apoyo brindado en todos los trámites administrativos.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Jaime y Lourdes.

A mis hermanos Jaz, Mimi, Oscar y Manin.

A mis sobrinos Hanni, Joshua y Kevin.

Quienes han sido una guía y el camino para poder llegar a este punto de mi formación académica. Que con su tenacidad, dedicación, confianza y lucha interminable han hecho de ellos un gran ejemplo a seguir. Con mucho cariño les dedico todo mi esfuerzo, un reconocimiento a todo este sacrificio puesto para que yo pueda estudiar.

Al Dr. José Luis Luna Acosta y Martha Carranza Salas por su enseñanza, paciencia y amistad.

A mis compañeros de laboratorios y amigos Vale, Pech, Ren, Isa, Lalo.

A mis compañeros de maestría Rogelio, Marisol, Anni.

A la compañía Pilgrim Pride, Querétaro, la cual donó los embriones necesarios para este proyecto.

## ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE TEMÁTICO.....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ANTECEDENTES .....	3
1    Encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).....	3
2    El eje somatotrópico: GH/IGF-1.....	6
2.1    Hormona del crecimiento.....	7
2.2    Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1).....	8
2.3    GH e IGF-1 en el SNC.....	9
JUSTIFICACIÓN .....	15
HIPÓTESIS .....	15
OBJETIVOS .....	16
OBJETIVO GENERAL: .....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
1    Materiales:.....	17
1.1    Materiales Biológicos:.....	17
2    Metodología:.....	17
2.1    Cultivo primario cerebelar.....	17
2.2    Establecimiento de las condiciones de hipoxia y baja glucosa (HBG). 17	
2.3    Evaluación de HIF-1 $\alpha$ como marcador de hipoxia.....	19

2.4	Determinación de la viabilidad celular .....	21
2.5	Evaluación de la apoptosis celular por la actividad de caspasa-3.....	22
2.6	Detección de necrosis por la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) .....	22
2.7	Silenciamiento de GH por ARN pequeño de interferencia.....	23
2.8	Caracterización de la población cerebelar en los cultivos primarios....	25
2.9	Análisis estadístico .....	27
RESULTADOS .....		28
1	Caracterización de la población celular de los cultivos primarios cerebelares .....	28
2	Efecto del daño por HBG sobre la supervivencia celular.....	29
3	Expresión de HIF-1 $\alpha$ .....	32
4	Estandarización del silenciamiento de la GH por ARN de interferencia .....	35
5	GH e IGF-1 ARNm incrementan ante un daño hipóxico-isquémico.....	36
6	Efecto protector de GH e IGF-1 ante un daño por HBG .....	38
6.1	Viabilidad celular .....	38
6.2	Actividad de LDH liberada .....	39
6.3	Actividad de caspasa-3 .....	41
DISCUSIÓN .....		42
CONCLUSIÓN .....		49
BIBLIOGRAFÍA .....		50



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de GH, GHR, IGF-1 e IGF1R a lo largo del SNC de diversas especies.....	11
Tabla 2 Secuencia de oligonucleótidos de GH, IGF-1 y 18S ribosomal de pollo ( <i>Gallus gallus</i> ).....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Hormonas hipotalámicas y mecanismos de retroalimentación que regulan el eje somatotrópico.....	7
Figura 2 Vías de señalización de la hormona del crecimiento (GH).....	8
Figura 3 Vías de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1).....	9
Figura 4 Imágenes representativas de inmunocitoquímica para DCX (rojo), NeuN (verde), GFAP (verde) y DAPI (azul) en cultivos primarios cerebelares.....	29
Figura 5 Morfología y distribución de cultivos primarios cerebelares tratados bajo 12 h de hipoxia-baja glucosa (HBG) y 24 h de re-oxigenación. ....	30
Figura 6 Viabilidad celular de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG).....	31
Figura 7 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	31
Figura 8 Actividad de caspasa-3 de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	32
Figura 9 Proporción relativa de HIF-1 $\alpha$ de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	33
Figura 10 Imágenes representativas de la inmunoreactividad para HIF-1 $\alpha$ .....	34
Figura 11 Proporción relativa de la inmunoreactividad de HIF-1 $\alpha$ .....	35
Figura 12 Silenciamiento de la GH en cultivos primarios cerebelares.....	36
Figura 13 Expresión del ARNm de GH en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	37
Figura 14 Análisis de la expresión de IGF-1 en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	38
Figura 15 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la viabilidad celular en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	39
Figura 16 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la liberación de la enzima LDH en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). ....	40

Figura 17 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la actividad caspasa-3 en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). ..... 41

## ABREVIATURAS

ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
Akt	Proteína serina-treonina cinasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblasto básico
CGE	Capa granular externa
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DCX	Doblecortina
DE	Desarrollo embrionario
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPO	Eritropoyetina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GH	Hormona del crecimiento
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
HBG	Hipoxia-baja glucosa
HI	Hipoxia-isquemia
HIE	Encefalopatía hipóxico-isquémica
HIF-1 $\alpha$	Factor de transcripción inducido por hipoxia 1 $\alpha$
HRP	Peroxidasa de rábano
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
JAK2	Janus cinasa 2
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogénos

mTOR	Blanco de rampamicina del mamífero
NCS	Célula madre neural
NeuN	Proteína Nuclear neuronal
NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NX	Normoxia
PI3K	Cinasa del fosfatidil-inositol trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rcGH	Hormona del crecimiento recombinante de pollo
rhIGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 recombinante de humano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
siRNA	RNAs pequeños de interferencia
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TBS	Solución amortiguadora Tris-salino
TTBS	Solución amortiguadora Tris-salino con tritón o tween
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZSG	Zona subgranular

## RESUMEN

La asfixia perinatal es una causa importante de mortalidad y discapacidad en recién nacidos. El rápido crecimiento del cerebelo en la última mitad del desarrollo fetal lo hace vulnerable a una lesión por hipoxia-isquemia (HI). En áreas de daño cerebral por HI, la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) son factores neurotróficos regulados positivamente. Los tratamientos con GH y/o IGF-1 son capaces de inducir neuroprotección y regeneración neural en el SNC. En este estudio se evaluaron los efectos del tratamiento con GH y/o IGF-1 (1 nM y 40 nM, respectivamente) sobre la supervivencia celular 24 h después de un daño agudo inducido por 12 h de hipoxia (0,5-5% de O<sub>2</sub>) y baja glucosa (1 g/L) (HBG) en cultivos primarios cerebelares de embriones de pollo. Además, se evaluó la expresión del ARN mensajero de GH y IGF-1 bajo condiciones de HBG. Se observó que la incubación de células en HBG causó una disminución significativa en la viabilidad celular ( $51.6 \pm 2.9 \%$ ), un aumento en la apoptosis ( $122.0 \pm 4.5 \%$ ) y necrosis ( $538.6 \pm 92.1 \%$ ), el tratamiento con GH incrementó la viabilidad celular ( $76.1 \pm 4.1 \%$ ), disminuyó la apoptosis ( $105.0 \pm 3.9 \%$ ) y necrosis ( $73.8 \pm 11.1 \%$ ), en tanto, el tratamiento con IGF-1 solo incrementó la viabilidad celular ( $70.1 \pm 4.2 \%$ ) sin tener efecto sobre la apoptosis y necrosis. Así mismo, ante un daño por HBG incrementó la expresión del ARNm de GH e IGF-1 (~3 veces, en ambos) en los cultivos cerebelares. El silenciamiento del gen GH por ARN interferente en el grupo HBG, disminuyó tanto la expresión de ARNm de GH (1.6 veces) como la expresión de ARNm de IGF-1 (0.5 veces), lo que sugiere que la GH regula la expresión de IGF-1 bajo condiciones de HBG. Estos resultados sugieren fuertemente que la GH local y exógena actúa como un factor neuroprotector y que ésta regula la expresión local de IGF-1 ante un daño inducido por HBG.

## ABSTRACT

Perinatal hypoxic–ischemic (HI) brain damage is a major cause of mortality and long-term neurological impairment in children. The rapid growth of the cerebellum in the last half of fetal development makes it more vulnerable to a HI injury. Several studies have shown that growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) are upregulated in different brain areas after damage by hypoxia. Moreover, there is increasing evidence suggesting that GH and IGF-1 treatments are able to induce neuroprotection and neural-regeneration in the CNS. In this study, we evaluated the effects of GH and IGF-1 treatment on cell survival after an acute HI injury in primary cell cultures of embryonic chicken cerebellum. In addition, we evaluated the cerebellar expression of GH and IGF-1 mRNA in normal and hypoxia-low glucose (HLG) conditions. To induce neural damage in primary embryonic cerebellar cultures, cells were maintained in hypoxic conditions (0.5-5% O<sub>2</sub>), and incubated in low glucose media (1 g/L) for 12 h, and subjected to a 24 h of reoxygenation. Cell cultures were treated with 1 nM recombinant chicken GH (rcGH) and/or 40 nM recombinant human IGF-1 (hIGF-1) to examine their neuroprotective effects. We observed that cell incubation of cells in HLG caused a significant decrease in cell viability ( $51.6 \pm 2.9$  %) increase in apoptosis ( $122.0 \pm 4.5$  %,) and necrosis ( $538.6 \pm 92.1$  %), while treatment with GH increased cell viability ( $76.1 \pm 4.1$  %), and decreased apoptosis ( $105.0 \pm 3.9$  %) and necrosis ( $73.8 \pm 11.1$  %), while IGF-1 treatment only increased cell viability ( $70.1 \pm 4.2$  %) without affecting apoptosis ( $105.0 \pm 3.9$  %) and necrosis ( $73.8 \pm 11.1$  %). After incubation in HLG conditions, cerebellar cell cultures increased GH and IGF-1 mRNA expression were increased by (~3 fold). GH gene silencing by small interfering RNA (siRNA) decreased both, GH mRNA expression (1.6-fold) and IGF-1 (0.5-fold) mRNA expression in the HLG group, suggesting that GH regulates IGF-1 expression under HLG conditions. Our results strongly suggest that both, local and exogenous GH act as a neuroprotective factor and they regulate IGF-1 expression under HLG conditions.

## ANTECEDENTES

### 1 Encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE)

La asfixia perinatal es una de las principales causas de mortalidad y alteraciones neuropsicológicas que ocurren durante el nacimiento. La lesión cerebral tras un evento hipóxico-isquémico afecta de 2-4 de por cada 1000 nacimientos y presenta una incidencia del 60% en nacimientos prematuros (Vannucci y Hagberg, 2004). Cerca del 20-50% de los recién nacidos afectados morirán en la etapa neonatal y, el 25% presentará discapacidades en el desarrollo tales como parálisis cerebral, retraso mental, trastornos del aprendizaje y déficit neurosensorial (Vannucci y Hagberg, 2004). En países subdesarrollados se han reportado incluso incidencias de 26 por cada 1,000 nacimientos (Dixon y Ho, 2015). En México en el 2003 se registraron 10,277 decesos por asfixia perinatal en base a 20,806 defunciones neonatales, lo que representa el 49.4% del total de las defunciones (Murguía-de Sierra y cols., 2005). Las etiologías conocidas incluyen múltiples eventos intraparto como el desprendimiento de la placenta, infección materna, prolapso del cordón umbilical o rotura de vasa previa (Rennie y cols., 2008), todo lo cual induce una insuficiencia en el suministro de oxígeno y nutrientes al SNC (Descloux y cols., 2015). La entidad cerebral clínica observada se denomina encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE, por sus siglas en inglés *hypoxic-ischemic encephalopathy*), con pérdida de tono y reflejos arcaicos, convulsiones epilépticas, disminución de los niveles de conciencia y dificultad respiratoria (Ferriero, 2004; Descloux y cols., 2015).

Una asfixia global severa puede afectar a numerosas regiones cerebrales, especialmente a la corteza prefrontal, los ganglios basales, el tálamo, el hipocampo, las protuberancias cerebrales y el cerebelo (Ferriero, 2004; Volpe 2009). El rápido crecimiento del cerebelo durante las semanas gestacionales 28 a 40 lo hace más vulnerable a un daño por HI (Volpe, 2009). A la semana 28 ocurre la segunda fase de proliferación neuronal que determina la organización de la corteza cerebelar (Volpe, 2009). En ratas neonatales de 2 días, que corresponde a



la semana gestacional 28 en humanos (Biran y cols., 2011), una hipoxia global disminuyó el número de células de Purkinje, interneuronas, así como el grosor de la capa molecular y granular cerebelar (Yoshioka y cols., 1986; Biran y cols., 2011). Deficiencias en el desarrollo a largo plazo relacionados con la lesión cerebelosa, incluyen: alteración de las funciones motoras como la hipotonía, falla en la coordinación de movimientos finos, la ataxia y la alteración de la secuencia motora, entre otras (Biran y cols., 2011; Hutton y cols., 2014).

El daño cerebral por un insulto hipóxico isquémico es una respuesta evolutiva que se compone de tres fases: aguda, subaguda y crónica. Los eventos involucrados en la fisiopatología son clasificados por su tiempo de acción (Yenari y Han, 2012). Durante la fase aguda (0-6 h) cambios negativos en la vasculatura conducen a la pérdida de la autorregulación y una disminución en la presión sanguínea arterial sistémica. Esto provoca una disminución en la concentración de oxígeno y glucosa sanguínea lo que conlleva al agotamiento del ATP y un cambio al metabolismo anaeróbico, el cuál produce pérdida de la homeostasis iónica, liberación de neurotransmisores excitotóxicos, alteración estructural y funcional de las proteínas, edema citotóxico, disfunción mitocondrial y necrosis. Una segunda fase o subaguda (6-48 h) ocurre cuando se restablece el flujo sanguíneo, en esta etapa el daño a la mitocondria puede establecer el escenario para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la muerte celular por apoptosis en la periferia del infarto. Además, los restos necróticos pueden estimular la respuesta inmune incrementando la producción de citocinas y quimiocinas por la microglía, neuronas y astrocitos exacerbando la generación de ROS y potenciando la lesión. Muchos de estos eventos podrían considerarse dañinos en sí mismo; sin embargo, algunos de los factores generados pueden ser importantes en el establecimiento de las bases para los procesos de recuperación y reparación. En la fase crónica, que comienza semanas o meses más tarde, se producen procesos diversos de restauración, tales como angiogénesis, neurogénesis, crecimiento axonal, sinaptógenesis y remodelación (Yenari y Han, 2012; Dixon y Ho, 2015).

El intervalo entre la fase aguda y la fase subaguda representa una fase latente que corresponde a una ventana terapéutica. La duración de esta ventana en el humano se estima que es aproximadamente de 6 h (Shankaran 2012).

La extensión y gravedad del daño depende de muchos factores, entre ellos la edad gestacional, el nivel de maduración, el estado metabólico, la temperatura, la severidad del daño y la duración (Inder y Volpe, 2000). Se sabe que la proporción de necrosis y apoptosis varía según la severidad del daño. La necrosis predomina en HI severas, mientras que la apoptosis se presenta en HI leves (Ming-Chi y San-Nan, 2010, Perlman 2006).

Con respecto al nivel de maduración del cerebro existen ciertas características diferenciales, entre el cerebro inmaduro y maduro, con respecto a la resistencia y vulnerabilidad contra un daño por HI. A este respecto se sabe que en cerebro inmaduro:

La demanda energética es menor dependiendo del nivel de diferenciación neuronal y la actividad sináptica, lo que le proporciona cierta resistencia (Nyakas y cols., 1996; Vannucci y Hagberg, 2004).

El consumo de glucosa es solo el 10% del consumo de animales adultos (Nyakas y cols., 1996). El cerebro inmaduro puede utilizar otras fuentes de energía como el lactato y los cuerpos cetónicos y éstos parcialmente son suficientes para mantener el metabolismo cerebral, lo que favorece la supervivencia neuronal (Nyakas y cols., 1996; Vannucci y Hagberg, 2004).

Hay una alta concentración de ácidos grasos insaturados, disponibilidad de hierro libre y pobre capacidad antioxidante, lo que favorece el daño oxidativo (Kleman y cols., 2010).

En los cerebros inmaduros existen grupos neuronales más vulnerables debido a una mayor expresión de receptores a glutamato tipo NMDA que potencian disfunción en la dinámica de calcio y por lo tanto ataque por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En el modelo de la rata un daño hipóxico-isquémico, por oclusión unilateral de la arteria carótida, induce un deterioro principalmente en

áreas como: la corteza cerebral, materia blanca subcortical y periventricular, tálamo, ganglios basales, hipocampo y cerebelo (Goñi de Cerio y cols., 2013; Vannucci y Haberg, 2004; Inage y cols., 1998).

La caspasa-3 se encuentra en mayores niveles en el cerebro inmaduro, lo que lleva a pensar que la apoptosis tiene un papel más importante en la muerte celular en esas circunstancias (Goñi de Cerio y cols., 2013).

Por otra parte, un mecanismo endógeno de protección frente a diferentes tipos de daño en el SNC es la producción de factores neurotróficos con el fin de limitar la cantidad de muerte celular y promover la plasticidad, neurogénesis y recuperación subsecuente. Particularmente, el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), la eritropoyetina (EPO), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y la hormona del crecimiento (GH) (Scheepens y cols., 2003; Aberg y cols., 2006; Wu y cols., 2015).

## **2 El eje somatotrópico: GH/IGF-1**

La hormona del crecimiento (GH) es un polipéptido cuya isoforma principal contiene 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa siendo la principal isoforma y es liberado por los somatotropos de la adenohipófisis (Harvey y cols., 1994). Su secreción es controlada por el hipotálamo mediante la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y la grelina como estimuladores y la somatostatina como inhibidor (Kopchick y cols., 2015). Una vez liberada a la circulación, la GH se distribuye en sus tejidos blanco; en el hígado, la GH promueve la liberación del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), un polipéptido constituido por 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.5 kDa que media muchas de las acciones de GH, Fig. 1 (Kopchick y cols., 2015). Ambos péptidos conforman el eje GH/IGF-1, que como componente del sistema endócrino, participan en el control del crecimiento y metabolismo (Nyber y Hallberg, 2013; Kopchick y cols., 2015; Costales y Kolevzon, 2016; Yakar y Isaksson, 2016).

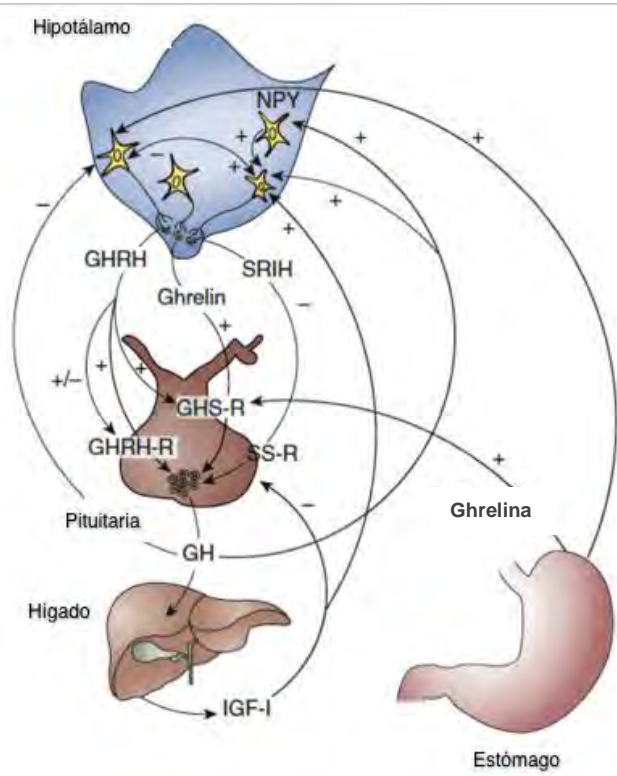


Figura 1 Hormonas hipotalámicas y mecanismos de retroalimentación que regulan el eje somatotrópico. Modificado de Kopchick y cols, 2015.

**2.1 Hormona del crecimiento**

**2.1.1 Mecanismo de acción**

El receptor de la hormona del crecimiento GHR pertenece a la superfamilia de receptores de citosinas clase I, en la que se encuentran también los receptores a eritropoyetina, prolactina, leptina e interleucinas entre otros (Waters, 2016). El GHR no tiene actividad tirosina cinasa intrínseca pero el cambio conformacional inducido por la unión del ligando conduce la activación del receptor asociado a la tirosina Janus cinasa 2 (JAK2). JAK2 se asocia constitutivamente con el GHR, la interacción receptor-ligando facilita la yuxtaposición y la fosforilación cruzada de los bucles de activación cinasa (Brooks y Waters, 2010). Después de la fosforilación del receptor por JAK2, varias moléculas de señalización con dominios SH2 son reclutadas al receptor activado (Figura 2). Las vías de señalización resultantes son de tipo celular específico, e incluyen la reorganización del citoesqueleto, la migración celular, la quimiotaxis, la mitogénesis y/o la prevención de la apoptosis y la transcripción de genes. La GH activa diversas cascadas de

señalización entre las cuales se encuentran: la vía de transductores de señal y activadores de transcripción (STAT), a saber, STAT1, STAT3 y dos isoformas de STAT5; la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos/cinasas reguladas por señales extracelulares (MAPK/ERK); además de la vía de la cinasa de fosfatidil-inositol trifosfato (IP3K) y la activación de la proteína cinasa C (PKC), ver Figura 2 (Pilecka y cols., 2006; Brooks y Waters, 2010; Waters, 2016).

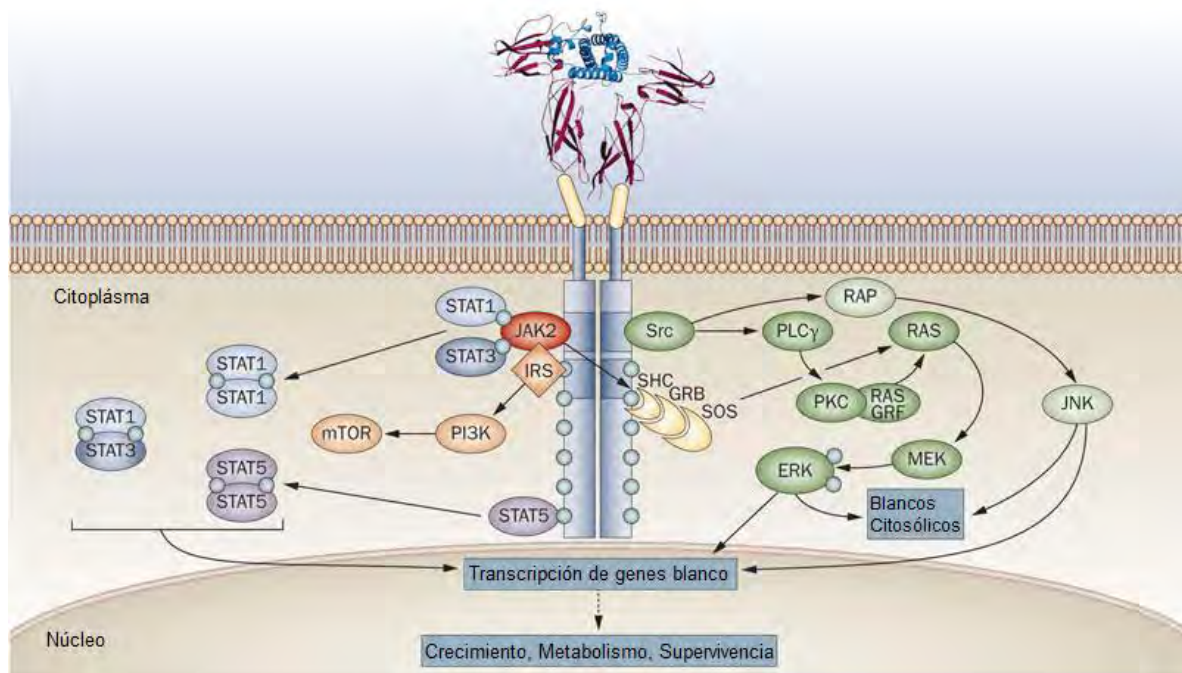


Figura 2 Vías de señalización de la hormona del crecimiento (GH). Se observa una molécula de GH se une a dos moléculas de su receptor y activa varias vías de señalización como: MAPK, IP-3K, STAT y PKC; la activación de cada vía es dependiente del tipo celular y la expresión relativa de cada componente. Modificado de Brooks y Waters, 2010.

## 2.2 Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1)

### 2.2.1 Mecanismo de acción

IGF-1 ejerce sus acciones mediante la unión a su receptor membranar de la familia tirosina cinasa (IGF1R), constituido por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  (Clemmons,

2015). Una vez que el IGF-1 se une a IGF1R, los dominios de tirosina cinasa en las subunidades  $\beta$  activan la vía PI3K/mTOR/Akt1 (fosfatidil-inositol trifosfato cinasa/ blanco de rapamicina de mamifero/ proteína serina-treonina cinasa Akt-PKB), y la vía MAPK/ERK para inducir sus efectos. Las interacciones entre estas vías y sus circuitos de retroalimentación son amplios, sin embargo, el efecto general de IGF-1 es la regulación del ciclo celular, diferenciación, supervivencia, expresión génica y remodelación del citoesqueleto, Figura 3 (Clemmons, 2015; Costales y Kolevzon, 2016; Dyer y Vahdatpour, 2016).

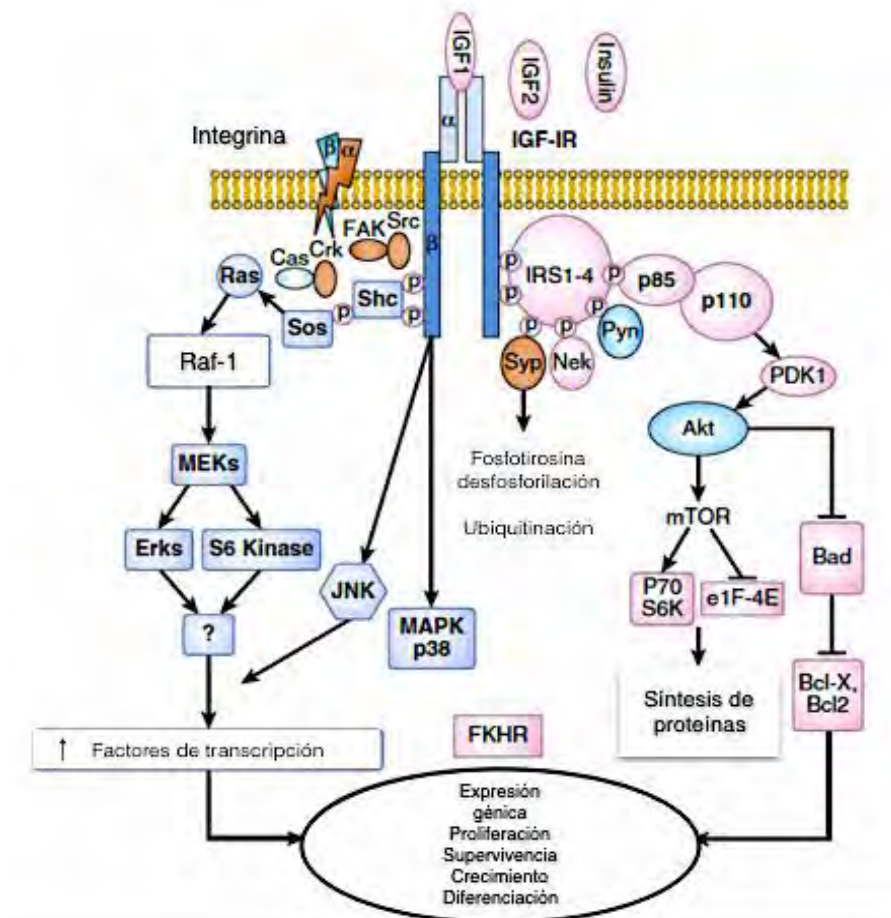


Figura 3 Vías de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Se observa la unión de una molécula de IGF-1 a la subunidad  $\alpha$  activando la subunidad cinasa  $\beta$  que promueve la activación de varias vías de señalización como: MAPK, IP-3K, STAT y PKC; la activación de cada vía es dependiente del tipo celular y la expresión relativa de cada componente. Modificado de Clemmons, 2015.

### 2.3 GH e IGF-1 en el SNC

El eje somatotrópico juega un papel central en el desarrollo y crecimiento del SNC.

A pesar de que la hipófisis e hígado se consideran las principales fuentes de GH e IGF-1, respectivamente, estudios recientes han sugerido que los tejidos neurales no son sólo sitios de acción, sino también sitios de producción, por lo que el SNC puede responder de forma intracrino/autócrino/parácrinamente (Aberg y cols., 2006).

La GH y el IGF-1 son hormonas críticas para el desarrollo neural y ambas regulan el tamaño, morfología y función de las células del SNC (Lobie y cols., 2000).

La ontogenia de la expresión de GHR parece ser similar a la de IGF-1R en el desarrollo del SNC, produciéndose principalmente durante la vida fetal, alcanzando su pico máximo de expresión durante las primeras 2 semanas de vida postnatal y continuando con una disminución a lo largo de la vida adulta (Dyer y Vahdatpour, 2016; Scheepens y cols., 2000). El papel central de GH e IGF-1 en el desarrollo neural se deduce de estudios *in vitro* e *in vivo* en animales transgénicos; deficiencias tanto de la señalización GH como de la concentración de IGF-1 (han mostrado diferentes) se ha asociado a alteraciones durante el desarrollo, incluyendo, hipomielinización, microcefalia y sinaptogénesis pobre (Noguchi, 1996; Powell-Braxton y cols., 1993; Mödersheim, 2007; D'Ecole y Ye, 2008; Arce y cols., 2013), indicando un papel tanto de GH como IGF-1 en el crecimiento, desarrollo y mielinización del cerebro.

La GH y el IGF-1 actúan promoviendo la proliferación, supervivencia, diferenciación y migración tanto de células progenitoras neurales (NSC, *neural stem cells* por sus siglas en inglés) como de nuevas neuronas formadas; a través de la interacción con su receptor (Aberg 2010). La naturaleza de sus acciones, sin embargo, parece depender de la distribución y densidad de los receptores en las diferentes estructuras del SNC, la especificidad del tipo celular, el microambiente, y la etapa de desarrollo (Kusky y Ye, 2012).

Durante el desarrollo y etapa adulta del SNC, la GH, el IGF-1 y sus respectivos receptores se expresan ampliamente pero de manera regulada. La Tabla 1

resume la expresión de estas hormonas en la mayoría de las áreas del cerebro durante el desarrollo perinatal y adulto en diferentes especies.

Tabla 1 Distribución de GH, GHR, IGF-1 e IGF1R a lo largo del SNC de diversas especies.

Región	GH	GHR	IGF-1	IGF1R
Cerebro				
Corteza cerebral	+		+	+
VZ/SVZ			+	+
Cuerpo caloso				+
Hipocampo	+	+		
CA			+	+
DG			+	+
Bulbo olfatorio	+	+		
Lamina celular mitral			+	+
Lamina celular empenachada			+	+
Hipotálamo	+	+	+	+
Núcleo periventricular	+			+
Núcleo supraóptico	+			+
Tálamo	+	+	+	+
Ganglios Basales	+			+
Mesencéfalo			+	+
Tronco cerebral		+	+	+
Cerebelo	+	+	+	
Capa granular extracelular	+	+		+
Capa granular interna	+	+	+	+
Células de Purkinje	+	+	+	+
Núcleos profundos	+	+	+	
Otros				
Meninges			+	+
Plexos coroideos		+	+	+
Vasos sanguíneos				+
Retina	+	+		
Amígdala	+	+		
Médula espinal	+	+		
Colículo superior e inferior		+		

Los datos encontrados en la Tabla 1 son derivan principalmente de estudios por hibridación *in situ* de roedores a edades de E18 a etapas adultas, y es adaptado de referencias. Modificado de Kusky y cols, 2012. Estructuras del SNC de rata y pollo, donde se encontró inmunoreactividad para GH o su receptor. Modificado de Lobie y cols. 1993; Hojvat y cols, 1982; Alba-Betancourt y cols, 2011; Harvey y cols, 2003).



### **2.3.1 GH y neuroprotección**

Varios estudios han mostrado que la administración de GH seguido de un daño confiere neuroprotección y acelera la recuperación de algunas funciones neurales como el aprendizaje, la memoria, el movimiento (Gustafson y cols., 1999; Scheepens y cols., 2001; Frago y cols., 2002; Shin y cols., 2004; Han y cols., 2007; Christophidis y cols., 2009; Li y cols., 2011; Devesa y cols., 2013). El receptor de GH es regulado a la alta después de un daño y en respuesta a la administración de GH en el hipocampo de rata (Devesa y cols., 2008; Christophidis y cols., 2009; Li y cols., 2011). Así mismo, la secreción de GH incrementa después de un daño en sangre, sugiriendo la participación local del eje somatotrópico en los mecanismos de neuroprotección (Scheepens y cols., 1999).

Scheepens y cols. (2001) estudiaron el daño cerebral en ratas por hipoxia, especialmente en áreas de gran pérdida neuronal (corteza frontoparietal, tálamo, estriado e hipocampo) y encontraron una fuerte inmunoreactividad para GH. Por otra parte, la administración intracerebroventricular de GH redujo la pérdida neuronal en la corteza frontoparieta, hipocampo y tálamo dorso-lateral, no así en el estriado. La distribución espacial de esta neuroprotección llevada a cabo por la GH se correlaciona con la distribución espacial de su receptor (GHR) (Scheepens y cols., 2001).

En tanto, Christophidis y cols. (2009) observaron un incremento en la inmunoreactividad del GHR en la zona subventricular, sitio de origen de células madre neurales (NSC), al día 5 posterior al daño por hipoxia-isquemia unilateral, coincidiendo tanto espacialmente como temporalmente con la neurogénesis inducida por el daño hipóxico-isquémico. La población de células GHR positivas incluyen células en proliferación (positivas a Ki67), progenitores neurales (positivas a nestina) y neuroblastos (positivas a DCX) (Christophidis y cols., 2009). Así mismo, se demostró que la administración inmediata de GH promueve la proliferación de precursores neurales hipocampales después de un daño cerebral inducido por la administración de kainato en ratas (Devesa y cols., 2011). Además este grupo demostró que la administración de GH, junto con rehabilitación

específica, después de un daño severo en la corteza motora frontal, es capaz de recuperar las habilidades motoras e incrementar la neurogénesis para la reparación del área periférica lesionada y una mayor plasticidad cerebral en el área motora contralateral (Heredia y cols., 2013).

Los mecanismos por los cuales la GH tiene efecto neuroprotector ante un daño por HI no han sido explicados completamente. Se ha propuesto que actúa (ejerce sus efectos protectores) a través de mejorar la viabilidad e inhibir la apoptosis neuronal (Shin y cols., 2004; Li y cols., 2011; Alba-Betancourt y cols., 2013).

Experimentos en cultivos primarios y organotípicos de cerebelo sometidos a HI mostraron un aumento en la concentración de GH de 17% y 91%, respectivamente (Alba-Betancourt y cols., 2013; Codoba y cols., 2011). Así mismo, se mostró que la administración de GH (1nM) tiene un efecto preventivo al daño por hipoxia-isquemia, ya que mantuvo la viabilidad, e incrementó en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la fosforilación de la cinasa Akt, y una reducción de la actividad caspasa-3 24 h después del daño (Alba-Betancourt y cols., 2013).

### **2.3.2 IGF-1 y neuroprotección**

En el SNC, el IGF-1 ha mostrado ser un potente factor anti-apoptótico (Guan y cols, 2003). Gluckman y cols. (1992) observaron en ratas de 21 días de edad sometidas a HI una marcada inducción en la expresión del ARNm de IGF-1 entre los días 3-5 después del daño en las áreas dañadas como el hipocampo, corteza, estriado y tálamo, concluyendo que la inducción de IGF-1 en el cerebro está relacionado causalmente con la segunda fase del daño por HI.

Por otra parte, se encontró que la administración de IGF-1 después de 2 h del insulto HI en ratas adultas inhibe marcadamente la pérdida neuronal, de 87 % a 26 %. En contraste, se demostró que la administración de IGF-1 previo al daño no es eficiente para prevenirlo, por lo que tales observaciones sugieren que IGF-1 actúa como protector durante la muerte celular en la etapa tardía, pero no como mecanismo primario (Guan y cols., 1993; 1996; 2003). Estos trabajos sugieren que la expresión endógena de IGF-1 le permite actuar como una neurotrófica, y que, la administración de IGF-1 posterior al daño podría tener un potencial terapéutico

ante un daño por HI (Gluckman y cols., 1992). En este sentido, Johnston y cols. (1996) evaluaron el potencial terapéutico de IGF-1 utilizando ovejas en la etapa final de la gestación después de inducir isquemia total por 30 min. Los resultados mostraron que una sola dosis de IGF-1 intracerebroventricular reduce la pérdida neuronal en todas las áreas del cerebro. Así mismo, se encontró una reducción concomitante en el índice de convulsiones post-asfixia y de citotoxicidad secundaria por edema (Johnston y cols., 1996). En el modelo de oclusión unilateral de la arteria carótida en ratas neonatales de 7 días, al igual que en ovejas, la administración intracerebroventricular de IGF-1 redujo el daño por HI en un 40% comparado con el control y sus efectos neuroprotectores fueron acompañados por un incremento en la fosforilación de Akt y ERK, así como con una inactivación de la cinasa pro-apoptótica glucógeno sintasa cinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), con una reducción en la actividad caspasa-3 y caspasa-9 (Brywe y cols., 2005; Aberg y cols., 2006).

En cultivos primarios de cerebelo de embriones de pollo se mostró que la concentración de IGF-1 incrementó en respuesta al daño producido por hipoxia-baja glucosa. Así mismo se observó que la administración de IGF-1 previa a un daño por HI disminuye la apoptosis evaluada por la inhibición de la actividad de la caspasa-3 (Armenta ME. 2015).

Estos datos apoyan el hecho de que el tanto la GH como el IGF-1 son factores neuroprotectores críticos en el daño HI. Sin embargo, dado que GH puede ejercer sus acciones a través del incremento en la concentración de IGF-1 (Hynes y cols., 1987; Scheepens y cols., 1999), o por acciones directas (Chen y cols., 1997; Scheepens y cols., 1999), se requieren realizar estudios más específicos para definir esta alternativa.

## **JUSTIFICACIÓN**

La encefalopatía hipóxica-isquémica (HI) es una de las causas principales de muerte y discapacidad en recién nacidos, que resulta frecuentemente en parálisis cerebral, retraso mental, problemas de aprendizaje y epilepsia. El rápido crecimiento del cerebelo durante la última mitad del desarrollo fetal lo hace más vulnerable a un daño por HI. Ante este tipo de daños se produce un incremento en la expresión de diferentes factores neurotróficos, entre ellos GH e IGF-1, que pueden funcionar como agentes neuroprotectores endógenos. A pesar de esto existe un daño importante por lo que se requiere la adición de GH exógena para mejorar la sobrevivencia neuronal. Estudios previos del laboratorio realizados *in vitro* han mostrado que la adición de GH exógena en cultivos primarios de neuronas de cerebelo y/o cultivos organotípicos de embriones de pollo, durante un daño producido por hipoxia-baja glucosa aumenta la supervivencia neuronal e inhibe la apoptosis. Dado que el daño neonatal por HI no se puede predecir es importante determinar si la administración de GH y/o IGF-1 posterior al daño tiene también un efecto neuroprotector.

## **HIPÓTESIS**

La administración de GH posterior a un daño inducido por privación de oxígeno y glucosa tiene un efecto neuroprotector en cultivos primarios cerebelares de embriones de pollo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si la administración de GH posterior a un daño inducido por privación de oxígeno y glucosa tiene un efecto neuroprotector en cultivos primarios cerebelares de pollo de 15 días embrionarios.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

En los cultivos primarios cerebelares:

1. Estandarizar el modelo de daño por privación de oxígeno y glucosa.
2. Estandarizar el silenciamiento de la GH por ARN de interferencia.
3. Evaluar el efecto del daño por privación de oxígeno y glucosa sobre la expresión del ARNm de la GH y el IGF-1.
4. Evaluar si la expresión del ARNm de IGF-1 es regulada por GH durante la privación de oxígeno y glucosa.
5. Determinar si la administración de la GH y/o el IGF-1 después de la privación de oxígeno y glucosa tiene un efecto neuroprotector.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1 Materiales:**

#### **1.1 Materiales Biológicos:**

Se utilizaron embriones de pollo de 15 días de desarrollo embrionario (DE) incubados a 38°C en una cámara de aire humidificado (IAMEX, México). Los huevos fueron donados por Pilgrims, Granja Avícola, Col. Balvaneras en Querétaro, Qro.

### **2 Metodología:**

#### **2.1 Cultivo primario cerebelar**

Cerebelos de embriones de pollos de 15 DE fueron extraídos y tratados con una solución de 0.5% de tripsina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) a 37°C por 10 min para dispersar las células. Posteriormente fueron centrifugadas a 1,800 rpm durante 5 min, y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de medio Neurobasal suplementado con 2% B27, 0.25% GlutaMAX, y 2% penicilina-estreptomicina. Las células fueron disgregadas mecánicamente utilizando pipetas Pasteur siliconizadas con diámetro diferentes. Las células se filtraron a través de una malla de nylon de 40  $\mu\text{m}$ . Las células fueron contadas mediante la técnica de azul de tripano y alícuotas de  $3 \times 10^6$  células fueron sembradas en placas de 12 pozos cubiertas previamente con poli-L-lisina (PLL, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y se dejó estabilizar el cultivo por 48 h en una incubadora (NUAIRE-AUTOFLOW) con atmósfera húmeda, 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C (Alba-Betancourt y cols., 2013).

#### **2.2 Establecimiento de las condiciones de hipoxia y baja glucosa (HBG)**

Los cultivos primarios fueron sometidos a hipoxia (0.5%  $\text{O}_2$ ) y baja glucosa (1 g/L) por 12 h (cámara de hipoxia (Napco E Series, Modelo 302): temperatura controlada a 37°C y mezcla de gases con 95 %  $\text{N}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , en medio DMEM bajo en glucosa 1X (1g/L) (DMEM-LG, GIBCO-BRL) con penicilina/estreptomicina como antibióticos al 2%.

Los grupos sometidos a condiciones fisiológicas de oxígeno y glucosa (Normoxia (NX), Neurobasal suplementado con 2% B27, 0.25% GlutaMAX, y 2% penicilina-estreptomicina (GIBCO) y los grupos sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG, medio DMEM bajo en glucosa 1X (DMEM-LG) fueron tratados de la siguiente manera después del daño:

1. Curva dosis respuesta de rcGH (GH recombinante de pollo (rcGH, Cyanamid AC 4797-100) sobre la viabilidad.

<b>NX</b>	<b>HBG</b>	<b>HBG + GH(1nM)</b>	<b>HBG + GH(10nM)</b>	<b>HBG + GH(100nM)</b>
-----------	------------	----------------------	-----------------------	------------------------

2. Curva dosis respuesta de IGF-1 (BioVision 4119-B9059) sobre la viabilidad.

<b>NX</b>	<b>HBG</b>	<b>HBG + GH(1nM)</b>	<b>HBG + GH(10nM)</b>	<b>HBG + GH(40nM)</b>
-----------	------------	----------------------	-----------------------	-----------------------

3. Evaluación del efecto de rcGH e IGF-1 sobre la viabilidad, apoptosis y necrosis.

<b>NX</b>	<b>HBG</b>	<b>HBG + GH(1nM)</b>	<b>HBG + IGF-1 (40nM)</b>	<b>HBG + GH(10nM) IGF-1(40nM)</b>
-----------	------------	----------------------	---------------------------	-----------------------------------

4. Evaluación de la expresión del ARNm de IGF-1 es dependiente de GH

<b>NX</b>	<b>HBG</b>	<b>HBG+ siGH</b>
-----------	------------	------------------

siGH: ARN de interferencia dirigido en contra de GH

Con base a curvas dosis respuesta de la GH (1, 10, 100 nM) y el IGF-1 (1, 40, 100 nM) así como, de trabajos previos realizados en el laboratorio (Alba-Betancourt y cols., 2013; Armenta M.E. 2015) se utilizarán las concentraciones de GH (10 nM) e IGF-1 (40 nM).

Los cultivos fueron sometidos a 24 h de re-oxigenación y posteriormente se evaluó la viabilidad, apoptosis y necrosis.

## **2.3 Evaluación de HIF-1 $\alpha$ como marcador de hipoxia**

### **2.3.1 Inmunohistoquímica para HIF-1 $\alpha$**

Para la cuantificación de HIF-1 $\alpha$  los cultivos cerebelares, fueron fijados inmediatamente después de la hipoxia sin periodo de re-oxigenación con paraformaldehído al 4% en TBS 1X (TRIS 10 mM, NaCl 234 mM, pH 7.6) por 30 min. Después se lavaron con TTBS 1X (Tritón X-100 0.1% en TBS 1X) por 30 min. Posteriormente se desactivo la peroxidasa endógena, incubando las células con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% en metanol al 50% durante 30 h. Posteriormente se lavaron con TBS 1X por 30 min. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se incubaron con leche descremada (BioRad) al 5% en TBS 1X por 2 h. Terminando este periodo se lavaron las células con TTBS 1X por 30 min y se incubaron toda la noche en a temperatura ambiente con una combinación de dos anticuerpos: Anti-HIF-1 $\alpha$  (policlonal, hecho en conejo, 3716S de Cell Signaling, EUA) dilución 1:1000, y  $\beta$ -Tubulina III (monoclonal, hecho en ratón, Covance Inc.) dilución 1:200 en TTBS 1X con leche al 1%. Posteriormente se lavaron con TTBS 1X por 30 min, se incubaron 2 h con el segundo anticuerpo anti-ratón hecho en conejo marcado con FITC (81-6711 Invitrogen, EUA) a una dilución 1:200, y otro anticuerpo un anti-conejo hecho en cabra marcado con CY3 (Zymed) a una dilución 1:5000 en TTBS 1X con leche al 1 %. Al finalizar se lavaron por 30 min y se contra-tiñeron los núcleos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilidole, 300 nM, Invitrogen). Las muestras se observaron al microscopio confocal Carl Zeiss LSM-510 y se analizaron con el software Imagen J.

### **2.3.2 Inmunotransferencia para HIF-1 $\alpha$**

Para la cuantificación de HIF-1 $\alpha$  mediante SDS-Western-blot los cultivos cerebelares en condiciones fisiológicas de oxígeno-glucosa y sometidos a hipoxia-baja glucosa por 12 h fueron homogenizados inmediatamente sin periodo de re-oxigenación en amortiguador (50 mM TRIS, inhibidor de proteasas, Complete Mini, pH 7.4). Posteriormente las células se lisaron por sonicación (sonicador, Fisher



FSH9) durante 15 min, se homogenizaron con ayuda de un pistilo de plástico, y se cuantifico la proteína por el método de Bradford (500-0006 de Bio-Rad, EUA).

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 10% con una carga de 60 µg de proteína total por pozo. Concluida la electroforesis el gel se equilibró con amortiguador de transferencia (TRIS 25mM, Gly 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) 15 min, al igual que las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EUA). Se transfirieron los geles de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa a 200 mA durante 1 h con agitación constante. Posteriormente se lavaron con TBS 1X (Tris 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5) por 30 min y se bloquearon las membranas con leche al 5 % en TBS 1X por 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavaron con TTBS 1X (Tween 20 al 0.05% en TBS) por 30 min e incubaron con el anticuerpo Anti-HIF-1 $\alpha$  (policlonal, hecho en conejo, 3716S de Cell Signaling, EUA) dilución 1:1000 toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con TTBS 1X por 30 min, se incubaron 2 h con el segundo anticuerpo anti-conejo hecho en cabra (656120, Invitrogen, EUA) conjugado con HRP, en TTBS 1X con leche al 1% diluido 1:3000 por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TTBS 1X por 30 min y TBS 1X por 20 min, y se revelaron con ECL (Amersham GE healthcare) en películas Kodak Biomax ML.

Se realizó stripping a las membranas para determinar actina como control de carga. Se lavaron con TBS1X 30 min e incubaron con amortiguador para stripping (TRIS-HCL/SDS/Mercaptoetanol) 40 min entre 70°C y 80°C en baño maría con agitación constante. Se lavaron con TBS 1X hasta eliminar el mercaptoetanol. Posteriormente se bloquearon con leche al 5%, se lavaron con TTBS 1X por 30 min e incubaron con el anticuerpo anti-actina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, EUA) en TTBS 1X con leche al 1%, dilución 1:3000 toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con TTBS 1X por 30 min, se incubaron 2 h con el anticuerpo anti-conejo hecho en cabra (656120, Invitrogen, EUA) conjugado con HRP, en TTBS 1X con leche al 1% diluido 1:3000 por 2 h a

temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TTBS 1X por 30 min y TBS 1X por 20 min, y se revelaron con ECL (Amersham GE healthcare) en películas Kodak Biomax ML. Se determinó la densidad de pixeles con ayuda del software Image Lab 3.0 de Bio-Rad. Se hizo la relación con respecto a la actina.

## **2.4 Determinación de la viabilidad celular**

### **2.4.1 Azul de tripano**

Alícuotas celulares de  $1.5 \times 10^6$  fueron sembradas en placas de 12 pozos, después de los tratamientos tanto en Normóxia (NX) como en hipoxia-baja glucosa (HBG), las células se cosecharon en 1 mL. Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L y se mezcló con 10  $\mu$ l de azul de tripano al 0.05%, dilución 1:1. La cuantificación se realizó por cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz invertido (Olympus IX50). Las células teñidas de azul se consideran células muertas y las células no teñidas se cuantificaron como células vivas.

### **2.4.2 Ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)**

El ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto de color azul (cristales de formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Placas de 12 pozos fueron sembradas con  $1.5 \times 10^6$  células, una placa para NX y otra para HBG. Después de los tratamientos por 24 h de re-oxigenación, se retiró el medio y se añadieron 500  $\mu$ L del reactivo MTT (concentración final de 0.5 mg/mL, Roche, EUA) en cada pozo y se incubaron durante 4 h con atmosfera húmeda, 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Para disolver los cristales de formazán formados por las células vivas, se añadieron 500  $\mu$ l de la solución de paro, isopropanol y HCl (0.1N), y se midió la absorbancia a 570 nm.

## 2.5 Evaluación de la apoptosis celular por la actividad de caspasa-3

Alícuotas de  $1.5 \times 10^6$  células por pozo fueron sembradas en cajas de 12 pozos. Para realizar la cuantificación de la actividad de caspasa-3 se utilizó el paquete de reactivos Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI, EUA). La caspasa es una cisteína-proteasa intracelular que existe como pro-enzima y que se activa durante la secuencia de eventos relacionados con la apoptosis. El principio del ensayo involucra la conversión de un sustrato cromogénico específico para caspasa-3, seguido por su detección por colorimetría a 405 nm.

## 2.6 Detección de necrosis por la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad enzimática de LDH se mide a 30 °C como la cantidad de piruvato consumido por disminución de la absorbancia debida a la oxidación del NADH a 340nm. La reacción procede hacia la formación de lactato y el NAD<sup>+</sup>.

Alícuotas de  $1.5 \times 10^6$  células por pozo fueron sembradas en cajas de 12 pozos, se retiró el medio de cultivo tras 12 h de hipoxia-baja glucosa (HBG) y a las 24 h de re-oxigenación. Para realizar la cuantificación de la actividad enzimática se utilizó el método descrito por Vassault (1983). En 2.3 ml de solución (solución Tris 81.3 mM; NaCl 203.3 mM; NADH 0.244 mM; pH 7.2) se suspendieron 0.2 mL de medio de cultivo y/o 20 µg de proteína, se mezcló y leyó a 340 nm agregando el piruvato (solución Tris 81.3 mM; NaCl 203.3 mM; piruvato 9.8 mM; pH 7.2). La absorbancia fue registrada al tiempo 0 y cada minuto por 5 min. La actividad se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\text{LDH en suero} = \frac{\Delta \text{ Densidad Óptica/ minuto}}{0.00207 * 20 * 1000} \quad \mu\text{molas/min/mL}$$

$$\text{LDH en tejido} = \frac{\Delta \text{ Densidad Óptica/ minuto}}{0.00207 * \text{proteína} * 1000} \quad \mu\text{molas/min/mg proteína}$$

## **2.7 Silenciamiento de GH por ARN pequeño de interferencia**

La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 3000/Medio Opti-MEM. Células ( $1.5 \times 10^6$ ) fueron transfectadas con el siRNA-GH (Sanders y cols, 2010), como control negativo se utilizó la una secuencia aleatoria de ARN de GH, denominado SCRM. La eficiencia del siRNA-GH sobre la expresión del ARNm de GH fue evaluada después de 48 h a través de la disminución de la expresión por PCR cuantitativa (qPCR) y ELISA.

### **2.7.1 Extracción de ARN**

A partir de  $4.5 \times 10^6$  células se realizó la extracción de ARN total mediante el método de Trizol (Invitrogen) y el kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo research, R2050). Se homogenizaron las células en 450  $\mu$ L de Trizol y se le añadió 450  $\mu$ L de etanol (95-100%), se homogeneizó con vortex. Posteriormente se transfirió en la columna Zymo-Spin IIC dentro de un tubo colector, se centrifugó a 16,000 x g por 30 s (centrífuga Sorvall). El sobrenadante se descartó y se adicionaron 400  $\mu$ L del RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 16,000 x g por 30 s. Posteriormente se realizó un tratamiento con DNasa, 5  $\mu$ L de DNasa I en 75  $\mu$ L de Digestion Buffer fueron adicionados directamente a la columna e incubados por 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar se adicionaron 400  $\mu$ L de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 16,000 x g por 30 s. Se adicionaron 700  $\mu$ L de RNA Wash Buffer a columna y se centrifugó a 16,000 x g por 2 min para asegurar la eliminación completa de RNA Wash Buffer. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo libre de RNasa y se resuspendió el RNA adicionando 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa directamente a la columna por centrifugación a 16,000 x g por 30 s. La concentración se cuantificó leyendo 2  $\mu$ L del ARN eluido a 260 y 280 nm en un Nanodrop (Thermo scientific).

### 2.7.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para sintetizar el ADNc se utilizó 1 µg del ARN total en un volumen final de 23 µL. Se siguió una serie de 2 reacciones: en la primera se añadieron 1 µL de hexámeros, 1 µL de oligo d(T) (100 pM), 1 µL dNTPs (10 mM) y 8 µL de buffer. En la segunda reacción se añadieron 4 µL de DTT, 0.25 µL de RNasa out, 1 µL de transcriptasa reversa Superscript II. La reacción para transcripción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min. Una vez terminada la retrotranscripción, las muestras se guardaron a - 4 °C.

### 2.7.3 PCR cuantitativa (qPCR)

Para cuantificar la expresión de los mensajeros de GH e IGF-1 se utilizó el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific), el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, 12 239 264 001) y oligonucleótidos para GH e IGF-1 y para la fracción 18S ribosomal como gen control (Tabla 2). La mezcla de reacción contenía 1 µL del Mix1 (dNTP, buffer, SYBR Green I), 1 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada uno de los oligos (5´-3´y 3´-5´), 3 µL de ADNc y 3 µL de H<sub>2</sub>O. Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 s, 65 °C por 10 s y 72 °C por 20 s en cada ciclo. Se obtuvo la cuantificación del producto de qPCR a partir de la determinación de CT comparativo, usando como gen de referencia la fracción 18S ribosomal.

Tabla 2 Secuencia de oligonucleótidos de GH, IGF-1 y 18S ribosomal de pollo (*Gallus gallus*).

Nombre	Número de acceso	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tamaño del amplicon (pb)
cGH	NM_204359.2.1	CGCACCTATATTCCGGA GGAC	GGCAGCTCCATGTCTGA CT	126
cIGF1	NM_001004384.2.1	TACCTTGGCCTGTGTTT GCT	CCCTTGTGGTGTAAAGCG TCT	169
cr18S	AF173612.1	CTCTTTCTCGATTCCGT GGGT	TTAGCATGCCAGAGTCT CGT	99

#### **2.7.4 Cuantificación de GH por ELISA**

La presencia de GH-inmunoreactiva (GH-IR) se realizó utilizando el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA) (Martínez-Coria y cols., 2002). Placas de 96 pozos se recubrieron durante la noche a 4 °C con 12 ng de rcGH en 100 µL de amortiguador de carbonato (0.1 M, pH 10.3). La placa se lavó 5 veces con TPBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 M, NaCl 0.15 mM, 0.05% w/v Tween 20, pH 7.0) utilizando un lavador de microplacas automático (Biotrak II, Washer 2, Amersham Biosciences, Niskayuna, NY, EUA). Las muestras y diluciones seriadas de rcGH (1024-0.5 ng/mL) en TPBS conteniendo 1% w/v sin grasa, se incubaron por 16 h con 100 µL de anticuerpo primario CAP-1 (1:100 000) producido en conejos contra GH nativa de hipófisis (Arámburo y cols., 1989). Este anticuerpo es específico para GH y no muestra reactividad cruzada (<0.001%) con cualquier otra hormona hipofisiaria. Las placas fueron bloqueadas por 1 h en PBS 1X con leche al 5%. La placa se lavó 5 veces con TPBS. Las muestras y los estándares 100 µL se añadieron a los pozos y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con TPBS. Posteriormente se añadió el anticuerpo anti-conejo IgG-conjugado con peroxidasa (dilución 1:3000, Horseradish peroxidase-anti-rabbit IgG conjugate (Bio-Rad) en leche al 1% en TPBS, el cual se incubó por 2 h. La placa se lavó cinco veces con TPBS. El anticuerpo secundario se detectó por reacción con el sustrato 2,2'-amino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfato) (Roche). Las placas se leyeron después de 30 min en un lector de microplacas de ELISA (Bio-Rad) a una longitud de onda de 405 nm. El ensayo tiene una sensibilidad de 2 ng/pozo (20 ng/mL), y los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fue de <4% (Martínez-Coria y cols., 2002).

### **2.8 Caracterización de la población cerebelar en los cultivos primarios**

#### **2.8.1 Inmunohistoquímica para DCX, NeuN y GFAP**

La caracterización la población celular se realizó a través de inmunocitoquímica utilizando los marcadores: Proteína Nuclear neuronal (Neuronal Nuclei, NeuN), Doblecortina (Doublecortin, DCX), Proteína Ácida Fibrilar Glial (Glial Fibrillary

Acidic Protein, GFAP), para determinar las poblaciones células: neuronas maduras, neuronas inmaduras y células gliales.

NeuN (Núcleo neuronal) es una proteína de unión a ARN presente en la mayoría de las neuronas maduras. La distribución de NeuN aparentemente se restringe al núcleo, soma y procesos neuronales cercanos en el cerebro durante la etapa fetal y adulta, sin embargo, algunas neuronas no son reconocidas por NeuN en todas las etapas de desarrollo: células de la capa nuclear interna, células Cajal-Retzius, células de Purkinje, oliva inferior y neuronas del núcleo dentado del cerebelo, y células ganglionares simpáticas son ejemplos (Dennie y cols., 2016). Inmunohistoquímicamente la proteína NeuN es detectable por primera vez durante el desarrollo que corresponde con la salida de las neuronas del ciclo celular y/o con la iniciación de la diferenciación (Dennie y cols., 2016).

La proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) es un filamento intermedio manomérico que se encuentra en el citoesqueleto astrogial. GFAP es expresado en astrocitos maduros en el cerebro adulto (Dennie y cols., 2016).

Doblecortina (DCX) es un marcador de neuronas inmaduras. DCX induce la polimerización de microtúbulos. Así mismo, marca neuronas mitóticas tardías y neuronas postmitóticas tempranas (Dennie y cols., 2016).

Para la cuantificación de DCX, NeuN y GFAP en los cultivos cerebelares, fueron fijados después de los tratamientos por 24 h de re-oxigenación con paraformaldehído al 4% en TBS 1X (TRIS 10 mM, NaCl 234 Mm, pH 7.6) por 30 min. Se siguió la metodología anteriormente descrita en la inmunohistoquímica de HIF-1 $\alpha$ . Los anticuerpos utilizados fueron:

- Combinación de anti-DXC (policlonal, hecho en cobayo, Millipore AB2253) dilución 1:250 y anti-GFAP (monoclonal, hecho en ratón, Millipore MAB360) dilución 1:250.
- Combinación de anti-DXC (monoclonal, hecho en cobayo, Millipore) dilución 1:250 y anti-NeuN (monoclonal, hecho en ratón, Millipore MAB377) dilución 1:250.

## **2.9 Análisis estadístico**

Los datos se graficaron como media  $\pm$  error estándar de cada grupo. Se evaluó la distribución normal de los datos por medio de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. El análisis estadístico utilizado fue una t de Student para la comparación entre 2 grupos, ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Bonferroni para la comparación entre 3 o más grupos y ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett para la comparación entre 3 grupos contra el control.  $P < 0.05$  para definir la significancia estadística. Esto se realizó con ayuda del software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).



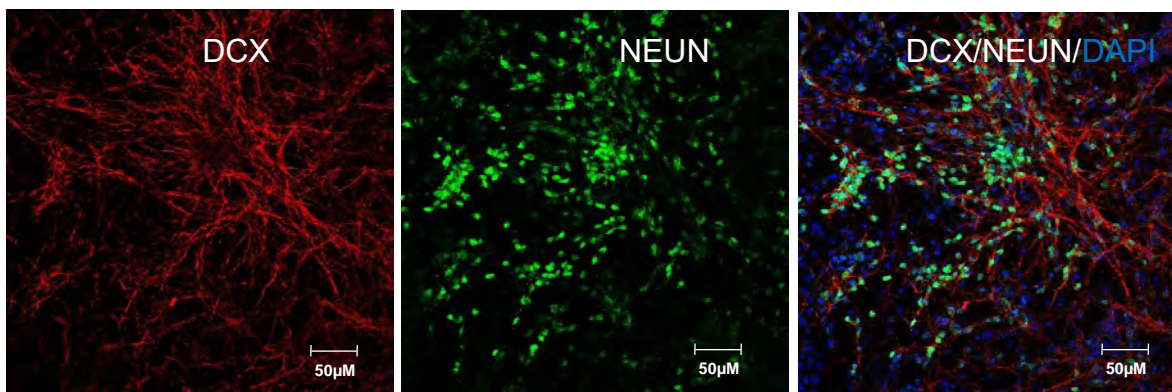
## RESULTADOS

### 1 Caracterización de la población celular de los cultivos primarios cerebelares

Inicialmente se caracterizó la población celular por inmunocitoquímica utilizando los marcadores: Proteína Nuclear neurona (NeuN), Doblecortina (DCX) y Proteína ácida fibrilar glial (GFAP); los cuales permitieron identificar tres tipos de poblaciones celulares: neuronas maduras (NeuN), progenitores neurales (DCX) y células gliales (GFAP). Para observar la distribución entre las tres poblaciones celulares, se realizaron dobles inmunomarcajes correspondientes a: DCX-NeuN y DCX-GFAP.

Con respecto al inmunomarcaje contra NeuN se observó una amplia y homogénea distribución, localizada en forma de agregados dentro del inmunomarcaje a DCX (Fig. 4A). En relación al inmunomarcaje contra GFAP se observan células con alta inmunoreactividad a GFAP y de morfología estrellada, su distribución dentro del inmunomarcaje a DCX es amplia y, a diferencia del marcaje NeuN, más dispersa, localizada alrededor de los agregados celulares positivos a DAPI (Fig. 4B). En tanto, el inmunomarcaje a DCX muestra una alta inmunoreactividad a lo largo de los procesos neuronales. En particular, se puede observar que la inmunoreactividad tiene se origina alrededor de los agregados celulares positivos a DAPI (Fig. 4A, Fig. 4B).

## A) PROGENITORES NEURALES Y NEURONAS MADURAS



## B) PROGENITORES NEURALES Y GLIALES

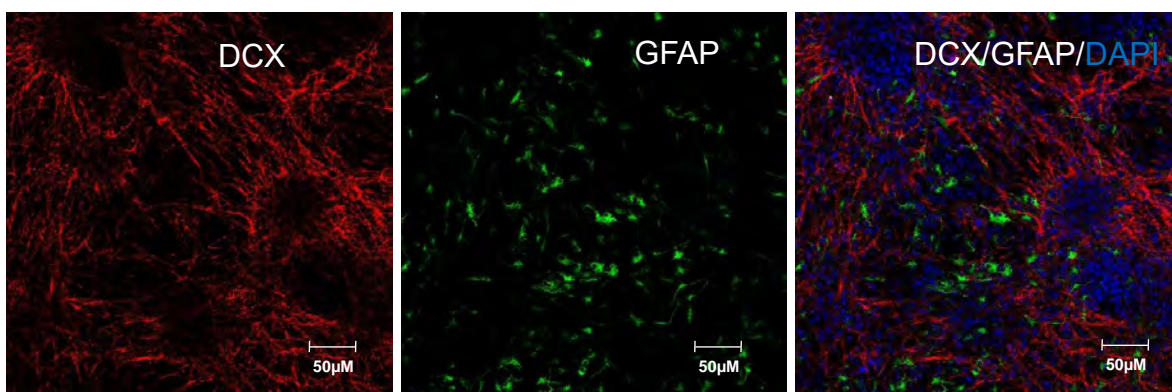


Figura 4 Imágenes representativas de inmunocitoquímica para DCX (rojo), NeuN (verde), GFAP (verde) y DAPI (azul) en cultivos primarios cerebelares. Condiciones: 95% aire, 5% CO<sub>2</sub> y 37° C. Las imágenes corresponden a: A) Doble inmunomarcaje a DCX-NeuN; B) Doble inmunomarcaje a DCX-GFAP. Microscopia confocal objetivo 20X- LSM 510.

## 2 Efecto del daño por HBG sobre la supervivencia celular

Los cultivos primarios cerebelares sometidos a condiciones de hipoxia-baja glucosa por 12 h seguido de 24 h de re-oxigenación mostraron una morfología y distribución diferenciada. Se observó una menor proporción de células, reducción en las conexiones celulares y mayor cantidad de detritus bajo condiciones de HBG (Fig. 5B) en comparación con los controles de normoxia donde se muestra una mayor proporción de interconexiones y formación de redes, así como, agregados celulares (Fig. 5A). Respecto a la morfología en condiciones de normoxia se observan células alargadas formando neuroesferas y con prolongaciones que

cuando son sometidas a la hipoxia se pierden y solo quedan muy pocas células triangulares con más de un proceso.

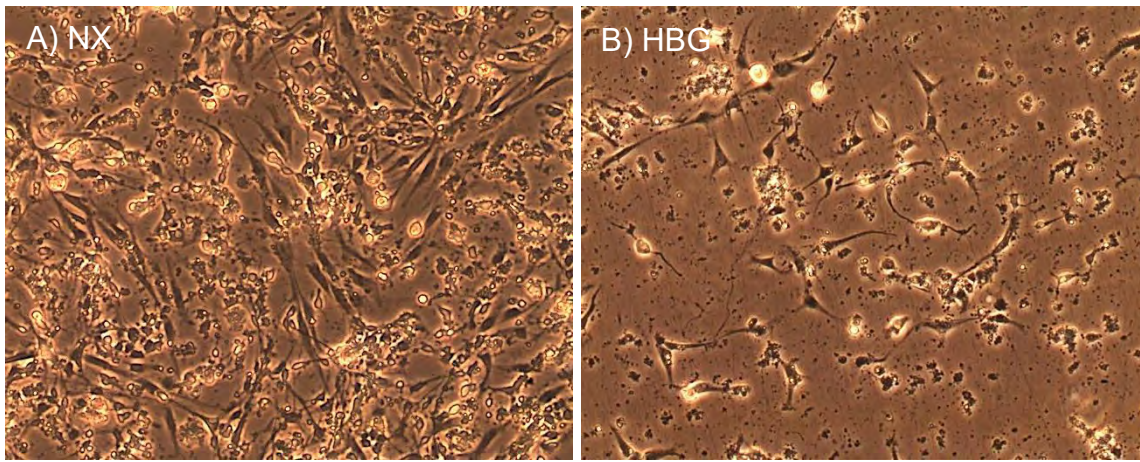


Figura 5 Morfología y distribución de cultivos primarios cerebelares tratados bajo 12 h de hipoxia-baja glucosa (HBG) y 24 h de re-oxigenación. Cultivos de  $1.5 \times 10^6$  células. (A) Normoxia (NX); (B) HBG. Olympus IX50, objetivo 20X.

La exposición de los cultivos primarios cerebelares a condiciones de HBG indujo una disminución significativa en la viabilidad celular evaluada mediante el ensayo de MTT siendo del  $52.9 \pm 2.8$  %, en comparación con  $100.0 \pm 3.9$  % en el control en condiciones de normoxia (Fig. 6).

Así mismo, se evaluó la muerte celular por necrosis y apoptosis mediante de la actividad enzimática extracelular de lactato deshidrogenasa (LDH) y caspasa-3, respectivamente. Bajo condiciones de HBG se observó un incremento significativo en la actividad LDH liberada en el medio de cultivo de  $223.8 \pm 21.7$  % en comparación con las condiciones de normoxia ( $100.0 \pm 7.4$  %), Fig. 7. En tanto, la actividad de caspasa-3 bajo condiciones HBG incremento significativamente a  $120.7 \pm 5.8$  % en comparación con las condiciones control ( $100.0 \pm 1.5$  %), Fig. 8.

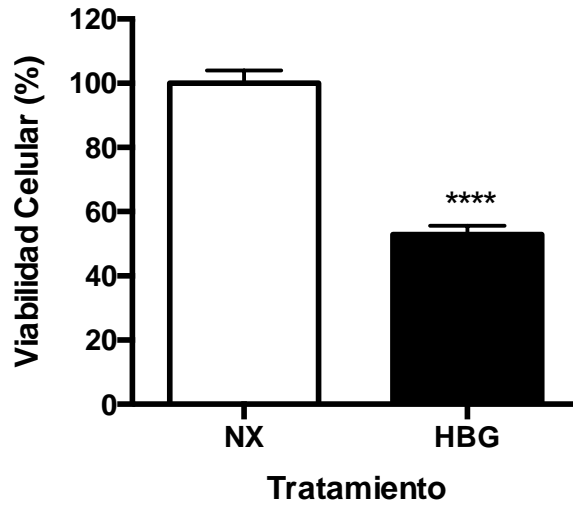


Figura 6 Viabilidad celular de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). La viabilidad celular fue evaluada con el ensayo de MTT. Las células fueron tratadas bajo 12 h de HBG y 24 h de re-oxigenación. Los controles se mantuvieron bajo condiciones de normoxia (NX). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  experimentos independientes con dos replicas para cada muestra. Prueba t de Student, \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

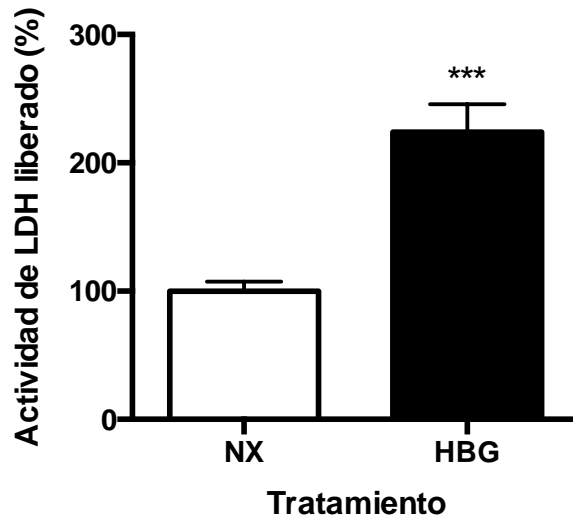


Figura 7 Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). Las células fueron tratadas bajo 12 h de HBG y 24 h de re-oxigenación. Los controles se mantuvieron bajo condiciones de normoxia (NX). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=6$  experimentos independientes con dos replicas para cada muestra. Prueba t de Student, \*\*\* $p < 0.001$ .

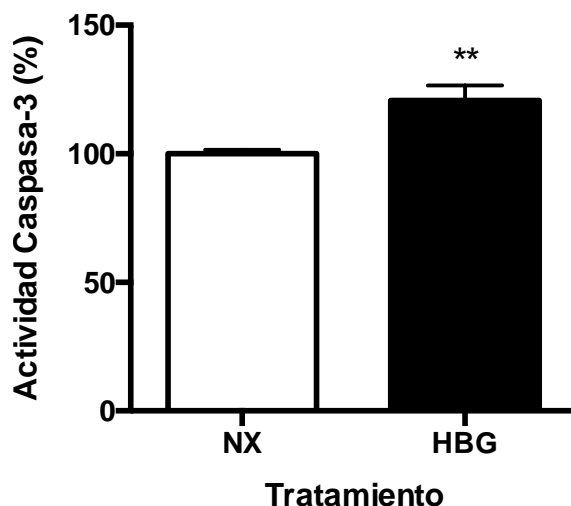


Figura 8 Actividad de caspasa-3 de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). Las células fueron tratadas bajo 12 h de HBG y 24 h de re-oxigenación. Los controles se mantuvieron bajo condiciones de normoxia (NX) (37° C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar, n=4 experimentos independientes con dos replicas para cada muestra. Prueba t de Student, \*\*p<0.01.

### 3 Expresión de HIF-1 $\alpha$

Se evaluó la expresión del factor de transcripción inducido por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) por medio de SDS-Western-blot e inmunocitoquímica. Este factor se tomó como marcador del modelo de hipoxia dado que su estabilidad depende de la concentración de O<sub>2</sub>, degradándose continuamente en presencia de éste por la hidroxilación de la prolin-4-hidroxilasa; sin embargo, a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> se estabiliza y se dimeriza con la subunidad HIF-1 $\beta$  interaccionando posteriormente con los co-activadores p300/CBP e induce la transcripción de diversos genes (VEGF, EPO, LDH, Hexoquinasa 1 y 2, entre otros) que ayudan al organismo a adaptarse a la hipoxia, promoviendo el metabolismo anaerobio y el transporte de oxígeno, entre otras funciones (Sharp y Bernaudin, 2004).

En la Fig. 9B se muestra la inmunotransferencia obtenida en muestras de cultivos primarios sometidos a 12 h de HBG. Se observan las bandas correspondientes de HIF-1 $\alpha$  (120 kDa) y actina (46 kDa). Después del análisis densitométrico y la relación HIF-1 $\alpha$ /actina se observó un incremento significativo en la proporción de

HIF-1 $\alpha$  a 12 h de HBG ( $154.3 \pm 22.0$  %) en comparación con el control normoxia ( $100 \pm 2.5$  %), Fig. 9A.

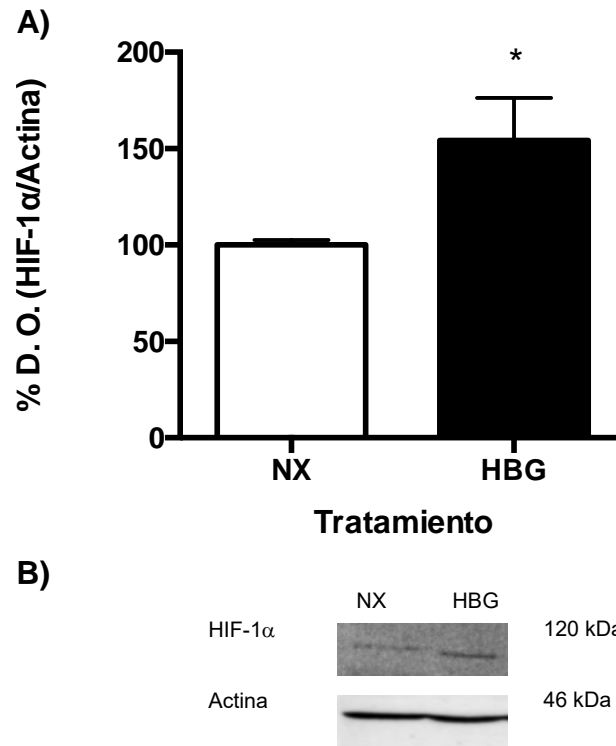
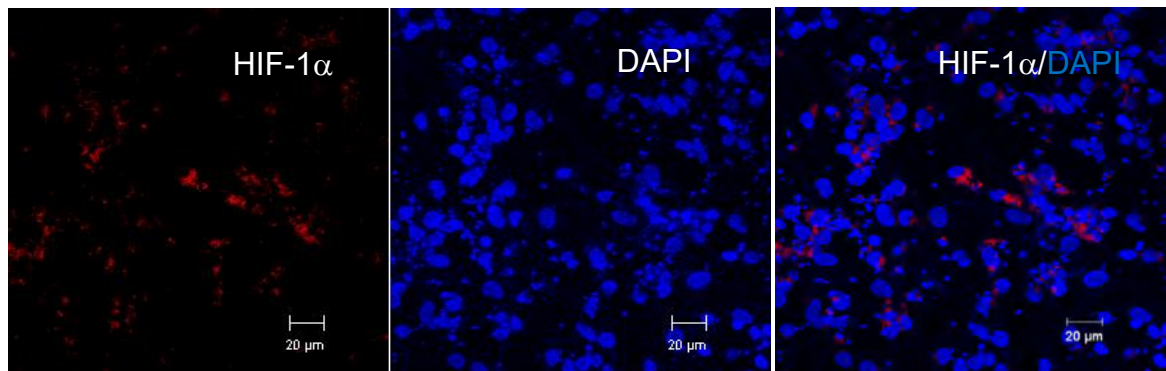


Figura 9 Proporción relativa de HIF-1 $\alpha$  de cultivos primarios cerebelares sometidos a hipoxia-baja glucosa (HBG). A) Los cultivos primarios cerebelares fueron sometidos a 12 h de HBG. B) Inmunoblot de HIF-1 $\alpha$  y actina. Se obtuvieron bandas cercanas a los 120 kDa para HIF-1 $\alpha$  y 46 kDa para actina. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=3$  experimentos independientes. Prueba  $t$  de Student,  $*p<0.05$ .

Para corroborar la expresión de HIF-1 $\alpha$  se realizó una inmunocitoquímica para este factor en los cultivos primarios cerebelares en condiciones de normoxia y HBG. En la Fig. 9B se observar que la distribución del factor HIF-1 $\alpha$  es principalmente citoplasmática, rodeando el núcleo; de igual modo, se presentó una inmunoreactividad nuclear bajo condiciones de HBG sugiriendo una activación funcional. Así mismo, la semi-cuantificación de la inmunoreactividad a HIF-1 $\alpha$  en proporción con los núcleos celulares positivos a DAPI, muestra una alta proporción de células inmunoreactivas para HIF-1 $\alpha$  ( $57.1 \pm 4.5\%$ ) bajo las condiciones HBG siendo significativo (Fig. 10B y Fig. 11), en comparación con el control normoxia ( $17.2 \pm 3.0\%$ ), Fig. 10A y Fig. 11.



### A) NORMOXIA (NX)



### B) HIPOXIA-BAJA GLUCOSA (HBG)

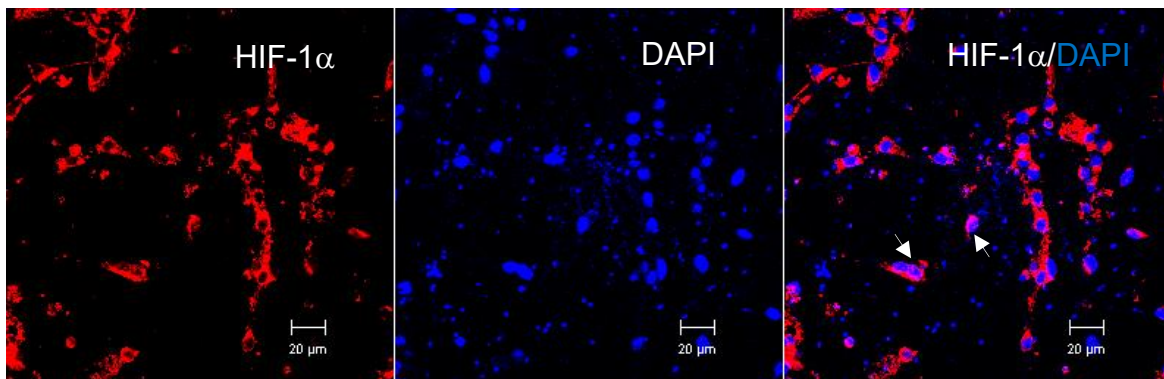


Figura 10 Imágenes representativas de la inmunoreactividad para HIF-1 $\alpha$ . Cultivos primarios cerebelares sometidos a: A) Normoxia (NX) y B) Hipoxia-baja glucosa (HBG). HIF-1 $\alpha$  (rojo) y DAPI (azul). Microscopia confocal objetivo 40X- LSM 510.

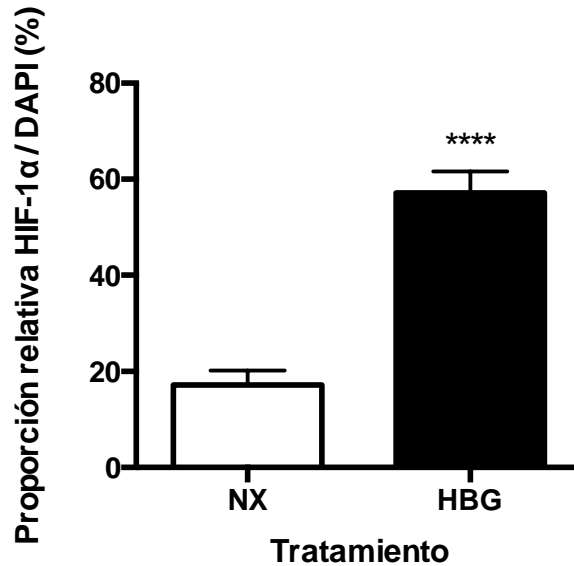


Figura 11 Proporción relativa de la inmunoreactividad de HIF-1 $\alpha$ . Proporción relativa de la inmunoreactividad de HIF-1 $\alpha$  con respecto a DAPI en cultivos primarios cerebelares en condiciones de normoxia (NX) y sometidos a 12 h de HBG. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar, n=2 experimentos independientes. Prueba t de Student, \*\*\*\*p<0.0001.

A partir de estos resultados se determinó que éstas condiciones son adecuadas para realizar los siguientes experimentos.

#### 4 Estandarización del silenciamiento de la GH por ARN de interferencia

Dado que la GH puede ejercer sus efectos directamente y/o por medio de la liberación de mediadores secundarios como es el caso de IGF-1, a través de la tecnología de ARN de interferencia (siRNA), se silenció el gen de GH para determinar si la expresión de ARN mensajero (ARNm) de IGF-1 es dependiente de la expresión de GH ante un daño hipóxico-isquémico.

En la Fig. 12A se observa la disminución de la expresión del ARNm de GH 48 h posterior a la transfección del siRNA contra GH ( $0.43 \pm 0.05$  veces las unidades de expresión) con respecto al control. Así mismo, la concentración proteica de la GH disminuyó significativamente ( $23.7 \pm 7.8$  ng/ $\mu$ g de proteína) con respecto a la secuencia aleatoria (scramble) ( $53.1 \pm 5.8$  ng/ $\mu$ g de proteína), Fig. 12B.



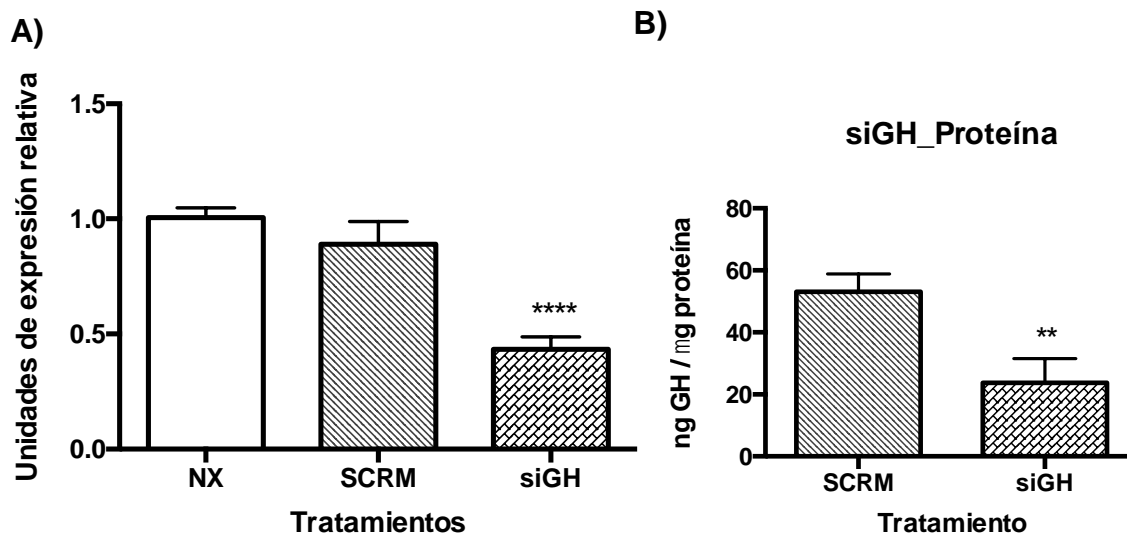


Figura 12 Silenciamiento de la GH en cultivos primarios cerebelares. A) Expresión del ARNm de GH medido por qPCR. B) Concentración proteica de GH medido por ELISA. Condiciones: normoxia (NX); secuencia aleatoria (SCRM), GH ARN de interferencia (siGH). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=4$  experimentos independientes. A) ANOVA de una vía post hoc Dunnett. B) Prueba t de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 5 Los niveles de ARNm de la GH y el IGF-1 incrementan ante un daño hipóxico-isquémico

Para determinar si a nivel transcripcional la GH e IGF-1 responden ante un daño por hipoxia-isquemia, como mecanismo endógeno, evaluamos la expresión de sus ARNm respectivos en los cultivos primarios cerebelares.

La expresión del ARNm de GH en los cultivos primarios cerebelares aumentó significativamente ante un daño por HBG ( $3.2 \pm 0.5$  veces las unidades de expresión) con respecto al control normoxia ( $1.0 \pm 0.03$  veces las unidades de expresión). La interferencia del ARNm de GH bajo condiciones de HBG mostró una disminución significativa ( $1.6 \pm 0.1$  veces las unidades de expresión) en comparación con el daño por HBG, no así contra las condiciones control, Fig. 13.

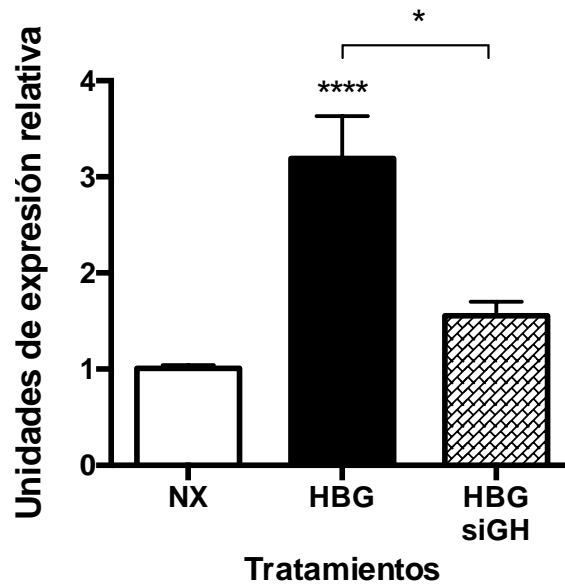


Figura 13 Expresión del ARNm de GH en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). Expresión del ARNm de GH medido por qPCR. Condiciones: normoxia (NX), HBG y HBG + GH ARN de interferencia (HBG+siGH). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=4$  experimentos independientes. ANOVA de una vía post hoc Bonferroni, \* $p<0.05$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

La expresión del ARNm de IGF-1 incrementó significativamente ( $3.1 \pm 0.8$  veces las unidades de expresión) con respecto al control normoxia ( $1.0 \pm 0.1$  veces las unidades de expresión). Interfiriendo la expresión de GH (siGH) ante un daño por HBG disminuyó significativamente la expresión de IGF-1 ( $0.5 \pm 0.1$  veces las unidades de expresión), indicando que la expresión de IGF-1 ante un daño hipóxico-isquémico es regulada por GH, Fig. 14.

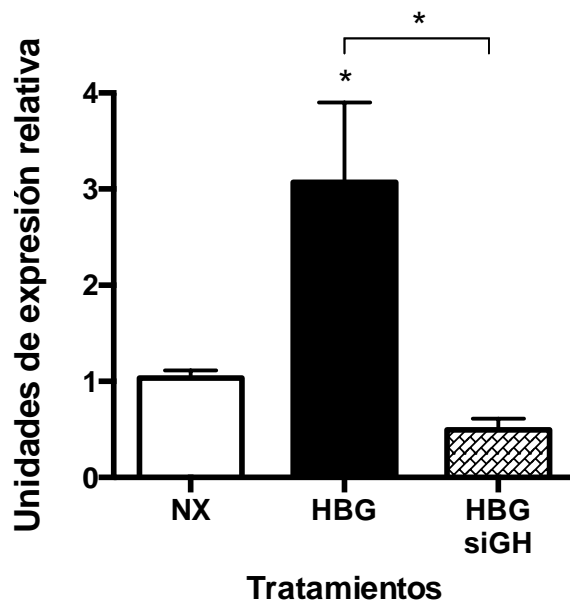


Figura 14 Análisis de la expresión de IGF-1 en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). Expresión del ARNm de IGF-1 medido por qPCR. Condiciones: normoxia (NX), HBG y HBG + GH ARN de interferencia (HBG+siGH). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=4$  experimentos independientes. ANOVA de una vía post hoc Bonferroni,  $*p<0.05$ .

## 6 Efecto protector de GH e IGF-1 ante un daño por HBG

Debido a que la GH y el IGF-1 son hormonas que ejercen efectos neuroprotector en el SNC y que, algunas acciones de la GH son mediadas por IGF-1; surgió el interés de evaluar su efecto sobre la supervivencia celular administradas posterior a un daño por HBG en cultivos cerebelares. Para evaluar si la administración de GH posterior al daño puede tener un efecto protector se evaluó: la supervivencia celular (ensayo MTT), muerte celular por necrosis (actividad LDH liberada) y apoptosis (actividad de caspasa-3).

### 6.1 Viabilidad celular

Una vez determinadas las condiciones de hipoxia se realizaron los experimentos para evaluar el efecto de la GH e IGF-1 sobre la viabilidad celular. En base las curvas dosis respuesta de la GH (1, 10, 100 nM) y el IGF-1 (1, 40, 100 nM), así como, de trabajos previos realizados en el laboratorio (Alba-Betancourt y cols, 2013; Armenta M.E. 2015) se determinó el efecto de la GH (1 nM), IGF-1 (40 nM)

y su combinación (GH+IGF1) sobre la viabilidad celular (ensayo MTT). en los cultivos primarios cerebelares posterior a 12 h de HBG y 24 h.

La adición de GH posterior a un daño por HBG tiene un efecto positivo significativo sobre la viabilidad ( $77.3 \pm 4.2$  %, Fig. 15), así como IGF-1 ( $72.3 \pm 3.9$  %, Fig. 15) en comparación con el daño por HBG ( $52.9 \pm 2.9$  %). Por otra parte, la co-administración de GH e IGF-1 no mostró un sinergismo sobre la viabilidad ( $59.2 \pm 3.8$  %, Fig. 15) lo que sugiere que ambas hormonas tienen acciones similares que neutralizan sus efectos protectores.

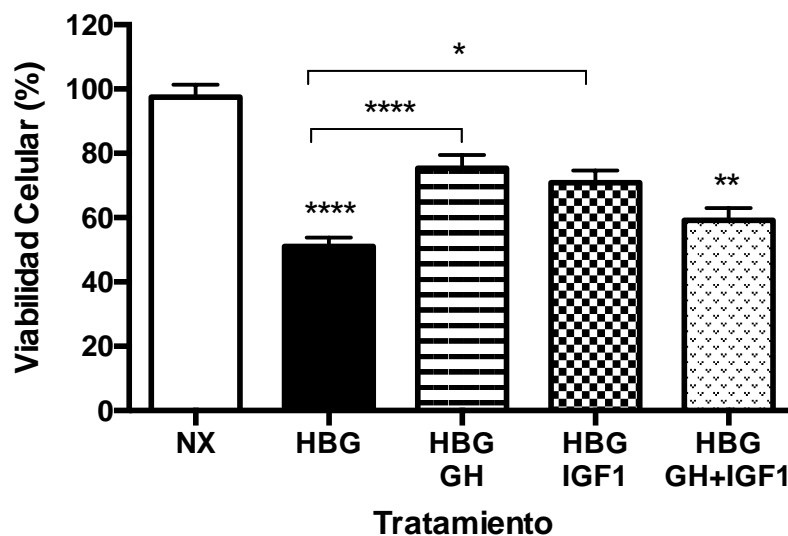


Figura 15 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la viabilidad celular en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). Las células fueron tratadas posterior a 12 h de HBG en presencia de GH 1 nM (HBG+GH), IGF-1 40 nM (HBG+IGF-1) y la combinación de GH e IGF-1 (HBG GH+IGF-1. La viabilidad celular fue evaluada con el ensayo MTT 24 h posterior al tratamiento. Los controles (NX) se mantuvieron bajo condiciones de 37° C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar, n=9 experimentos independientes con dos replicas para cada muestra. ANOVA de una vía. Post hoc Bonferroni, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

## 6.2 Actividad de LDH liberada

Para evaluar si la GH y/o IGF-1 pueden tener un efecto sobre muerte celular por necrosis ante un daño por HBG, GH e IGF-1 fueron administrados posterior a 12 h de HBG y, 24 h después se evaluó la actividad LDH liberada en el medio de los cultivos primarios cerebelares como marcador de necrosis ya que este tipo de muerte celular se caracteriza morfológicamente por la hinchazón y ruptura de los

organelos intracelulares, conduciendo eventualmente a la ruptura de la membrana plasmática (Moquin y Chan 2010) y la pérdida de la membrana plasmática causa la liberación del contenido intracelular al medio extracelular, incluyendo la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) (Chan y cols, 2013).

El daño por HBG indujo un incremento significativo en la liberación de LDH de  $538.6 \pm 92.1$  % en comparación con las condiciones control normoxia ( $100.0 \pm 10.5$  %), Fig. 16, el cual disminuyó significativamente en presencia de GH ( $73.8 \pm 11.1$  %, Fig. 16), no así la administración de IGF-1 ( $288.0 \pm 40.5$  %, Fig. 16) que mostró una disminución parcial. En tanto, la co-administración de GH e IGF-1 no disminuyó la liberación de LDH inducida por HBG ( $545.2 \pm 163.1$  % versus  $538.6 \pm 92.2$  %), Fig. 16, indicando que se neutralizan los efectos protectores de ambas hormonas, Fig. 16.

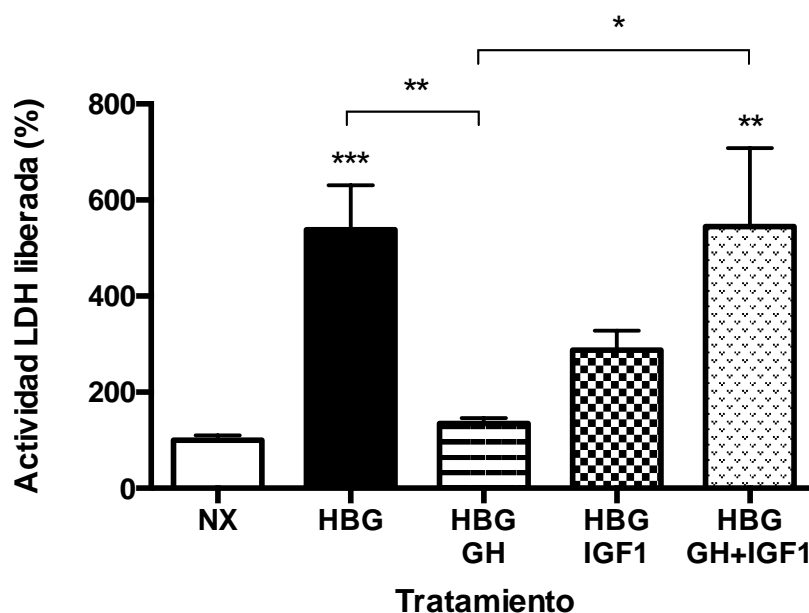


Figura16 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la liberación de la enzima LDH en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). Las células fueron tratadas posterior a 12 h de HBG en presencia de GH 1 nM (HBG+GH), IGF-1 40 nM (HBG+IGF-1) y la combinación de GH e IGF-1 (HBG GH+IGF-1). La actividad LDH fue evaluada 24 h posterior al tratamiento. Los controles (NX) se mantuvieron bajo condiciones de 37° C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar, n=8 experimentos independientes. ANOVA de una vía. Post hoc Bonferroni, \* p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### 6.3 Actividad de caspasa-3

Para evaluar si la GH y/o IGF-1 pueden tener un efecto sobre muerte celular por apoptosis ante un daño por HBG; GH e IGF-1 fueron administrados posterior a 12 h de HBG y, 24 h después se evaluó la actividad caspasa-3 en los cultivos primarios cerebelares como marcador de apoptosis ya que este tipo de muerte celular es un mecanismo de muerte programada y tardía que se caracteriza por condensación nuclear y de cromatina, contracción citoplasmática y presencia de cuerpos apoptóticos (Descloux y cols, 2015). La actividad de caspasa-3 se evaluó como marcador de muerte celular por apoptosis, dado que es una técnica sensible y específica.

El daño por HBG incrementó significativamente en la actividad caspasa-3 de  $120.0 \pm 5.8 \%$ , en comparación con las condiciones control ( $100.0 \pm 1.5 \%$ ), Fig. 17. La administración de GH redujo significativamente la actividad caspasa-3 ( $105.0 \pm 3.9 \%$ , Fig. 17). En tanto, la administración de IGF-1 ( $111.4 \pm 5.2 \%$ , Fig. 17) y la co-administración de GH e IGF-1 ( $107.2 \pm 3.9 \%$ , Fig. 17) no presentaron un efecto protector significativo sobre la actividad caspasa-3.

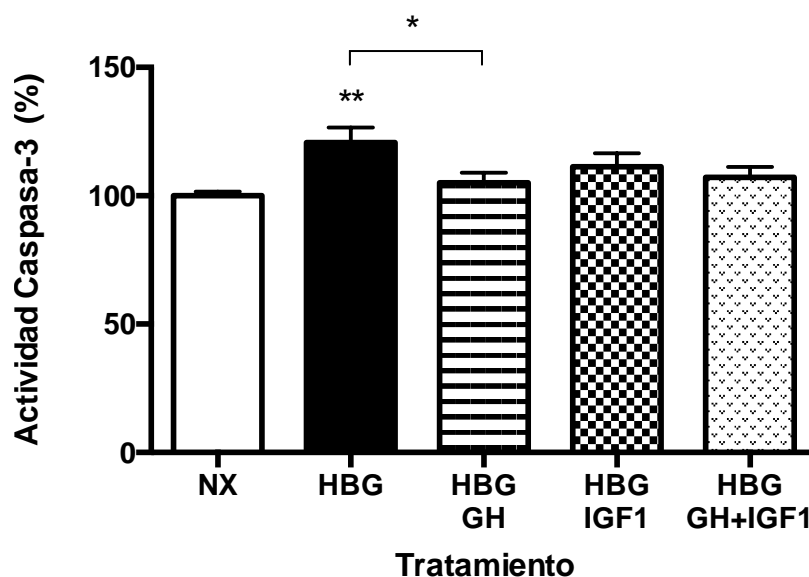


Figura 17 Efecto de la GH y el IGF-1 sobre la actividad caspasa-3 en cultivos primarios cerebelares ante un daño por hipoxia-baja glucosa (HBG). Las células fueron tratadas posterior a 12 h de HBG en presencia de GH 1 nM (HBG+GH), IGF-1 40 nM (HBG+IGF-1) y la combinación de GH e IGF-1 (HBG GH+IGF-1). La actividad caspasa-3 fue evaluada 24 h posterior al tratamiento. Los controles (NX) se mantuvieron bajo condiciones de 37° C, 95% aire, 5% CO<sub>2</sub>. Cada barra representa la media + error estándar, n=5 experimentos independientes. ANOVA de una vía. Post hoc Bonferroni, \* p < 0.05, \*\*p<0.01.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que la GH ejerce efectos neuroprotectores en cultivos cerebelares embrionarios cuando es administrada posterior a un daño por hipoxia-baja glucosa. Así mismo, se encontró que la GH ejerce su acción protectora mediante efectos directos e indirectos a través de regular la expresión de IGF-1.

En el SNC, el daño perinatal por hipoxia-isquemia es causante de la pérdida neuronal en regiones cerebrales importantes asociadas con funciones neuropsicológicas y motoras (Vannucci y Hagberg, 2004). Ante este tipo de daños el SNC responde a través de la expresión endógena de factores neurotróficos, como GH y el IGF-1, con el fin de limitar la cantidad de muerte celular y promover su recuperación. En el modelo de HI por oclusión unilateral de la arteria carótida se ha mostrado un incremento en la inmunoreactividad a GHR en el hipocampo de rata, correlacionándose con el incremento en la proliferación y neurogénesis de la zona subventricular (Cristophidis y cols., 2009). En cerebelo, el daño por HI está asociado con un incremento en la síntesis de GH, lo que sugiere que tanto la GH endógena como la exógena están participando en la protección (Alba-Betancourt y cols., 2013). Así mismo, el incremento en la expresión progresiva del ARNm de IGF-1 se correlaciona con una disminución al daño en regiones cerebrales como la corteza parietal lateral, estriado, giro dentado y tálamo (Guan y cols., 1993) en ratas neonatales sometidas a un daño por HI (Gluckman y cols., 1992).

Se ha demostrado que la administración de la GH y del IGF-1 ejercen efectos anti-apoptóticos a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en el modelo de daño perinatal por HI (Guan y cols., 2003; Alba-Betancourt y cols., 2013) y que, además a nivel endócrino existe una regulación periférica entre la GH y la expresión de IGF-1, se plantea que ambas hormonas pueden tener efectos neuroprotectores en el SNC ante un daño por HI.

En el presente trabajo se validó el modelo de HI en cultivos cerebelares embrionarios de pollo mediante la exposición a 0.5-5% O<sub>2</sub> durante 12 h y sometiendo después a 24 h de re-oxigenación lo cual induce una disminución de la viabilidad y un incremento de la actividad de las enzimas caspasa-3 y LDH, como marcadores de apoptosis y necrosis, respectivamente. Estos mecanismos de muerte celular, apoptosis y necrosis, así como, autofagia, han sido también observados en el modelo de HI neonatal en rata (Carloni y Balduini, 2008; Descloux y cols., 2015).

Así mismo, en trabajos previos del laboratorio, utilizando el modelo de cultivos primarios cerebelares embrionarios de pollo, se observó una disminución en la viabilidad celular e incremento en la actividad caspasa-3 bajo condiciones de HI, correlacionándose con los presentes resultados (Córdoba, 2011; Alba-Betancourt y cols., 2013). Además los cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis y necrosis tales como: la pérdida de conexión por la reducción en la arborización dendrítica y axónica, formación de detritus relacionados con restos celulares y una reducción en el volumen citoplasmático fueron similares a los observados previamente por Ankarcona y cols, en 1995 en cultivos de células granulares cerebelares bajo un daño excitotóxico inducido por glutamato.

Además nuestros resultados demuestran que bajo condiciones de hipoxia se incrementa la inmunoreactividad del factor HIF-1 $\alpha$  principalmente a nivel nuclear en los cultivos cerebelares, lo cual es un indicador del ambiente hipóxico (Sharp y Bernaudin, 2014). El incremento del factor HIF-1 ante un daño por HI se ha estudiado en cultivos primarios de neuronas corticales por su participación como factor protector (Ramamoorthy y Shi, 2014). En el modelo de embriones de pollo sometidos a hipoxia se demostró el papel neuroprotector del factor HIF-1 $\alpha$  dependiente de su acumulación en los lóbulos ópticos (Giusti y Fiszler de Plazas, 2012), por lo tanto, es posible que HIF-1 $\alpha$  incremente en el cerebelo como factor protector y pueda estar implicado en la expresión de GH.



Estudios previos, han mostrado que la administración de GH confiere neuroprotección ante un daño por HI (Scheepens y cols., 2001; Christophidis y cols., 2009; Devesa y cols., 2013; Alba-Betancourt y cols., 2013). Sin embargo, solamente se han estudiado ciertas estructuras cerebrales, como la sustancia blanca periventricular, corteza, ganglios basales, tálamo e hipocampo por ser las más sensibles (Hutton y cols., 2014; Descloux y cols., 2015), y existen pocos estudios realizados en el cerebelo. Biran y cols. (2012) determinaron que después de un daño por HI disminuyó el número de células de Purkinje, interneuronas, así como el grosor de la capa molecular y granular en ratas de 2 días de edad induciendo deficiencias en el desarrollo a largo plazo que incluyen: alteración de las funciones motoras como la hipotonía, falla en la coordinación de movimientos finos, la ataxia y la alteración de la secuenciación motora, entre otras (Biran y cols., 2011; Hutton y cols., 2014).

Por lo tanto, en este trabajo fue de gran interés probar el efecto protector de GH administrada posterior a un daño por HI en el cerebelo de embriones de pollo de 15 días. El hecho de que la GH administrada durante el daño por HI fuera capaz de prevenir de la muerte celular por apoptosis y necrosis a estas células (Córdoba, 2011; Alba-Betancourt y cols., 2013), ahora se complementa con nuestros resultados que muestran que la administración de GH posterior al daño, incrementa su viabilidad después del daño en un 25% con respecto a HBG y también pueden rescatar a las células de la muerte por apoptosis y necrosis ya que estas disminuyen significativamente cuando se evalúan por la actividad de caspasa 3 y la liberación de LDH. En conclusión, se puede señalar que la hormona de crecimiento puede tener efectos protectores antes y después del daño por HBG en la etapa aguda.

Estos datos coinciden con resultados obtenidos en otro modelo experimental donde observaron que los mecanismos de muerte celular por apoptosis y necrosis están presentes en el cerebelo de lechones sometidos a HI global, sugiriendo que las neuronas inmaduras son más susceptibles a la muerte por apoptosis, mientras que las neuronas diferenciadas mueren por necrosis (Yue y cols., 1995).

En ensayos *in vitro* en células ganglionares de la retina (línea celular QNR/D) también se observaron acciones antiapoptóticas de la GH, sobre la muerte celular por apoptosis y necrosis, ante un daño por excitotoxicidad inducido por glutamato (Martínez-Moreno y cols., 2016). Por lo tanto se puede señalar que la GH ejerce sus efectos protectores también sobre estos tipos de muerte celular en el cerebelo.

Por otra parte, en el caso del IGF-1 es considerado un mediador de las acciones de la GH en el crecimiento y diferenciación. Por lo tanto, fue muy importante definir cuáles son las acciones directas versus las indirectas de la GH y esto aún no se han establecido con claridad. Aunque existen estudios sobre una de sus acciones clásicas como es el caso del crecimiento donde esta bien establecido que los efectos están mediados por ambas hormonas (IGF-1 y GH) para un crecimiento apropiado (Lincoln y cols., 1994; Yakar e Isaksson, 2016). En el caso del cerebelo se conoce la presencia y distribución del GHR en la rata y conejo durante etapa postnatal señalando un papel de la GH en el desarrollo neural, aunado a esto se ha determinado la expresión del IGF-1 en el cerebelo (Lincoln y cols., 1994; Croci y cols., 2011). Así mismo, se ha establecido que el IGF-1 es esencial para la supervivencia de las células de Purkinje durante la etapa postnatal en ratas (Croci y cols., 2011) y esto ha permitido proponer que un efecto neuroprotector del IGF-1 endógeno. Esto ha sido apoyado por evidencia obtenida por Guan y cols. (2003) quienes observan que hay una disminución del daño HI con el tratamiento de IGF-1 en la etapa aguda ya que el IGF-1 y otros factores de crecimiento se incrementan en etapas posteriores al daño.

Por lo tanto, en este trabajo evaluamos el efecto protector de GH e IGF-1 administrado posterior a un daño por HI y 24 h después de la re-oxigenación en cultivos cerebelares de embriones de pollo y los resultados mostraron un incremento de la viabilidad celular, sin embargo, los resultados fueron diferentes ya que con GH sí fueron significativos y con IGF-1 no alcanzaron significancia sobre la prevención de la muerte celular por apoptosis y necrosis. Esto puede

explicarse como se señaló previamente, a la temporalidad del tratamiento, a las condiciones de incubación y la concentración del péptido.

Este resultado no concuerda con el efecto de IGF-1 en otro modelo, cultivos primarios de células ganglionares de la retina de ratas neonatales, que fueron sometidos por 12 h de bajo condiciones de hipoxia (5 % O<sub>2</sub>), y tratadas con IGF-1 durante el daño a una concentración de 200 ng/ml (26.7 nM), mostró una disminución en el número de cuerpos apoptóticos, así mismo, reportan una disminución en la actividad caspasa-3 en comparación con las condiciones de hipoxia esto seguramente por la temporalidad del tratamiento (Yang y cols., 2013). Por otra parte, en cultivos primarios de neuronas granulares cerebelares de ratas neonatales el tratamiento con 25 ng/ml (3.3 nM) de IGF-1 reduce la pérdida neuronal en un 50% cuando es administrado 6 h posterior a la privación de KCl (Galli y cols., 1995). Es importante señalar que aunque el daño cerebelar bajo el modelo de daño por HI de rata postnatales ha sido validado en embriones de pollo (Lee y cols., 2001), quizá las diferencias observadas se deban a las etapas de desarrollo del cerebelo entre estas especies y a la vulnerabilidad que esto conlleva, dado que el pollo es precocial y la rata es altricial (Biran y cols., 2012; Dzialowski 2007).

Por otra parte, con respecto a la concentración de IGF-1 y presencia de su receptor, podrían ser algunas de las razones por las cuales en nuestras condiciones este péptido no inhibió la apoptosis y necrosis en forma significativa. Esto lo apoyan los hallazgos de Guan y cols. (2003) que señalan que las acciones neuroprotectoras de IGF-1, están mediadas por el bloqueo de eventos apoptóticos tempranos y eso explica por qué sus efectos son altamente dependientes del momento de administración de los factores neuroprotectores, con una ventana de oportunidad relativamente estrecha después del daño por HI.

Por otra parte, bajo nuestras condiciones la apoptosis la actividad caspasa-3 se incremento solo 1.2 veces, y este incremento fue menor al reportado previamente para esta actividad (4.5 veces y 2.5 veces) bajo condiciones de HI (Alba-Betancourt y cols., 2013, Yang y cols., 2013), por lo que sugerimos que la

evaluación de la apoptosis no se realizó en un periodo de tiempo apropiado. Esto se señala porque se ha reportado que esta depende de varios factores como: el tipo de célula o tejido, el agente inductor de la apoptosis, la concentración del fármaco, la intensidad del estímulo, y el tiempo de exposición al daño (Soundquist y cols., 2006).

Dado que ambas hormonas ejercen un efecto neuroprotector, nos interesa evaluar si la co-administración de estos (la GH e el IGF-1) podrían tener un efecto protector sinérgico o aditivo. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en conjunto estas hormonas no incrementaron sus efectos con respecto a los datos cuando fueron administradas solas. Esto puede explicarse por que las hormonas podrían tener similares vías de activación y por tal motivo no se refleje el efecto de las dos. A nivel endocrino está bien descrito que el IGF-1, en pacientes con acromegalia con resistentes a la insulina, bloquea las acciones de la GH (Clemmons y cols., 2002). Aunado a esto la presencia de estos factores exógenos y al bien definido incremento de estos factores a nivel local, podrían estar llevando a cabo sus efectos a través de mecanismos autócrino/parácrino en la señalización de ambas hormonas.

Por otra parte en este trabajo se determinó que en los cultivos cerebelares embrionarios se incrementó la expresión del ARN mensajero de la GH y el IGF-1 ante un daño por HI como mecanismo protector endógeno. Estos son los primeros datos en los que se evalúa cuantitativamente la expresión del ARNm, y complementan los datos con respecto a la proteína, la cual ha sido evaluada también por otros autores, en donde han observado igual que nosotros una correlación entre el daño HBG y el aumento en la concentración proteica de estos factores sugiriendo que estas hormonas pudieran actuar como neurotrofinas protectoras (Gluckman y cols., 1992; Guan y cols., 2003; Scheepens y cols., 2001; Alba-Betancourt y cols., 2013).

Así mismo, con el fin de determinar si la GH regula el aumento en la expresión de IGF-1 ante un daño por HI, a través de la tecnología del ARNm de interferencia se silenció la expresión de GH. Los resultados mostraron que, ante el daño por HI, se requiere primero el incremento en la expresión de GH para poder inducir la expresión de IGF-1 después del daño ya que en aquellos cultivos transfectados con el ARNm interferencia disminuyó significativamente la expresión de IGF-1. Ensayos posteriores en estos cultivos permitirán determinar la relevancia funcional de la GH e IGF-1 ante el daño por HI y definir si los efectos en viabilidad o apoptosis son mediados por las mismas vías de señalización o es una combinación de éstas (PI3K/Akt, MAPK/Erk ). En trabajos previos el silenciamiento de la GH en CGR por ARNm de interferencia incremento el número de cuerpos apoptóticos y disminuyó la longitud axonal en un 40% (Sanders y cols., 2010; Baudet y cols., 2009). Estos resultados apoyan la función y/o regulación de GH y la participación de esta en la regulación de la expresión de IGF-1 donde las dos hormonas pueden actuar como factores neurotróficos en el cerebelo.

## **CONCLUSIÓN**

Este trabajo presenta evidencia clara de que la administración de GH posterior a un daño por HI ejerce un efecto protector sobre los cultivos primarios de células del cerebelo de embriones de pollo, a través de inhibir su muerte celular por apoptosis y necrosis lo cual se ve reflejada en un incremento significativo en la viabilidad celular. Así mismo, en este estudio se determinó que el tratamiento con el IGF-I mejora viabilidad significativamente, sin embargo no disminuye la proporción de apoptosis y necrosis bajo las condiciones de tratamiento utilizadas. Además se observó que el incremento en la expresión de ARNm de IGF-1 inducido durante la hipoxia es regulado por un aumento en la expresión del ARNm de GH y ambos juegan un papel importante en los mecanismos endógenos de neuroprotección actuando como factores neurotróficos. Por otra parte el incremento de estos factores durante el daño por HI permite proponer que los efectos protectores estén mediando a través de mecanismos autócrina y/o parácrina .

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aberg D. (2010). Role of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurogenesis. *Endocr Dev.* 17:63-76.
2. Aberg D., Gustafson K., Isgaard J. (2006). Aspects of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Related to Neuroprotection, Regeneration, and Functional Plasticity in the Adult Brain. *The Scientific World Journal.* 6:53-80.
3. Abuzzahab M. J., Schneider A., Goddard A., Grigorescu F., Lautier C., Keller E., Kiess W., Klammt J., Kratzsch J., Osgood D., Pfaffle R., Raile K., Seidel B., Smith R. J., Chernausek S. D. (2003). IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *New Engl J Med.* 349:2211-2222.
4. Alba-Betancourt C., Luna-Acosta J.L., Ramirez-Martinez C.E., Avila-Gonzalez D., Granados-Avalos E., Carranza M., Martinez-Coria H., Arámburo C., Luna M. (2013). Neuroprotective effects of growth hormone (GH) after hypoxia–ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *Gen Comp Endocrinol.* 183:17-31.
5. Ankarcrona M., Dypbukt J., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S., Nicotera P. (1995). Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function. *Neuron* 15:961-973.
6. Arámburo C., Sánchez-García R., Fenton-Navarro B., Perera-Martín J. G., Valverde-Rodríguez C. (1989). Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de la hormona del crecimiento de pollo (cGH), *Veterinaria México.* 10:397-405.
7. Arámburo, Carlos, Clara Alba-Betancourt, Maricela Luna, and Steve Harvey. (2014). Expression and Function of Growth Hormone in the Nervous System: A Brief Review. *Gen Comp Endocrinol.* 203:35–42.
8. Arce V. M, Devesa P. Devesa J. (2013). Role of growth hormone (GH) in the tretment on neuronal diseases: From neuroprotection to neural repair. *Neurosci Res.* 76(4):179-186.

9. Armenta M.E. (2015). Evaluacion del efecto neuroprotector del factor de crecimiento insulonoide tipo 1 (IGF-1) en cultivos primarios de cerebelo de embriones de pollo. Tesis de licenciatura. Instituto de neurobiología de la UNAM, México.
10. Baranova O., Miranda L., Pichiule P., Dragatsis I., Johnson R., Chavez J. (2007). Neuron-Specific Inactivation of the Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  Increases Brain Injury in a Mouse Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience*. 27-23.
11. Baudet M., Rattray D., Martin B., Harvey S. (2009). Growth hormone promotes axon growth in the developing nervous system. 150(6):2758-2766.
12. Baumann G. P. (2009). Growth hormone isoforms. *Growth Hormone and IGF Research*. 19:333-340.
13. Bidlingmaier M. y Strasburger C. J. (2009). Growth Hormone. Chapter Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis. 195:187-200.
14. Biran V., Heine V., Verney C., Sheldon R., Spadafora R., Vexler Z., Rowitch D. Ferriero D. (2011). Cerebellar abnormalities following hypoxia alone compared to hypoxic-ischemic forebrain injury in the developing rat brain. *Neurobiology of disease*. 41(1);138-46.
15. Brooks A. J. y Waters M. J. (2010). The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol*. 6: 515-525.
16. Brywe K.G., Mallard C., Gustavsson M., Hedtjärn M., Leverin A.-L., Wang X., Blomgren K., Isgaard J., Hagberg H. (2005). IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3 $\beta$ . *Eur. J. Neurosci*. 21:1489–1502.
17. Butler A. A., Yakar S., Gewolb I. H., Karas M., Okubo Y., LeRoith D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 121:19-26.



18. Carloni S Balduini W (2008). Experimental Models of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat. *Current Protocols in Toxicology*. 11.15.1-11.15.11.
19. Cerio, Felipe, Idoia Lara-Celador, Antonia Alvarez, and Enrique Hilario. (2013). Neuroprotective Therapies after Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Brain Sciences* 3(1):191–214.
20. Chan F., Moriwaki K., De Rosa M. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology*. 979; 65-70.
21. Chen L., Lund P. K., Burgess S. B., Rudisch B. E., Mcilwain D. L. (1997). Growth hormone, insulin-like growth factor I, and motoneuron size *Journal of Neurobiology*, 32:202–212.
22. Chen W. Y., Chen N. Y., Yun J., Wight D. C., Wang X. Z., Wagner T. E., Kopchick J. J. (1995). Aminoacid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *J Biol Chem*. 9:292-302.
23. Christophidis L. J., Gorba T., Gustavsson M., Williams C. E., Werther G. A., Russo, V. C., Scheepens A. (2009). Growth hormone receptor immunoreactivity is increased in the subventricular zone of juvenile rat brain after focal ischemia: a potential role for growth hormone in injury-induced neurogenesis. *Growth Horm. IGF Res*. 19:497–506.
24. Clemmons D. R. (2002). Roles of insulin-like growth factor-I and growth hormone in mediating insulin resistance in acromegaly. *Pituitary*. 5(3):181-3.
25. Clemmons R. D. (2015). Insulin-like growth factor-1 and its binding proteins. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. 2:325-456.
26. Costales J. y Kolevzon A. (2016). The Therapeutic Potential of Insulin-like Growth Factor-1 in Central Nervous System Disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 63:207–22.
27. Croci L., Barili V., Chia D., Massimino L., van Vugt R., Masserdotti G., Longhi R., Rotwein P., Consalez G. G. (2011). Local insulin-like growth factor I expression is essential for Purkinje neuron survival at birth. *Death and Differentiation*. 18(1):48-59.

28. D'Ercole A. J., Ye P. (2008). Minireview: expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology* 149:5958-5962.
29. D'Ercole A. J., Ye P., Calikoglu A. S., Gutierrez-Ospina G. (1996). The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol.* 3:227-55.
30. Dennie D., Louboutin J., Strayer D. (2016). Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits. *World Journal of Stem Cells.* 8(4):136.
31. Descloux C., Ginet V., Clarke P., Puyal J., Truttmann A. (2015). Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy—mediated cell death. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 45:75-85.
32. Devesa P., Agasse F., Xapelli S., Almengló C., Devesa J., Malva J.O., Arce V.M. (2014). Growth hormone pathways signaling for cell proliferation and survival in hippocampal neural precursors from postnatal mice. *BMC Neuroscience.* 15(1):100-115.
33. Devesa P., Reimunde P., Gallego R., Devesa J., Arce V. (2011). Growth hormone (GH) treatment may cooperate with locally-produced GH in increasing the proliferative response of hippocampal progenitors to kainate-induced injury. *Brain Injury.* 25(5):503-510.
34. Dixon B., Reis C., Ho W., Tang J., Zhang J. (2015). Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *International journal of molecular sciences.* 16(9):22368-401.
35. Dyer, Adam H, and Cyrus Vahdatpour. 2016. Review the role of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience.* 325:89–99.
36. Dzialowski, E. M. (2007). Understanding the Development of the Respiratory and Cardiovascular Systems Using Avian Models. *The Eagle Feather* 4 (2007). doi:10.12794/tef.2007.219.
37. Ferriero, D.M. (2004). Neonatal brain injury. *N Engl J Med.* 351:1985–1995.

38. Frago L. M., Pañeda C., Dickson S. 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*. 143:4113-22.
39. Giusti S y Fiszer de Plazas S. (2012). Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 in a prenatal model of acute hypoxia. *J Neurosci Res*. 90(2):468-78.
40. Gluckman, P. D., Klempt, N. D., Guan, J., Mallard, E. C., Sirimanne, E., Dragunow, M., Klempt, M., Singh, K, Williams, C. E., Nikolics, K. (1992). A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 182:593–599.
41. Goño de Cerio, F., Lara-Celador I., Alvarez, A., y Hilario E. (2013). Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci*. 3(1):191-214.
42. Guan J., Bennet L., Gluckman P., Gunn A. (2003). Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Progress in Neurobiology*. 70(6):443-462
43. Guan, J., Williams, C. E., Gunning, M., Mallard, E. C., Gluckman, P. D. (1993). The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 13:609–616.
44. Guan, J., Williams, C. E., Skinner, S. J. M., Mallard, E. C., Gluckman, P. D. (1996). The effects of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2 and des-IGF-1 on neuronal loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology* 137:893–898.
45. Gustafson K., Hagberg H., Bengtsson B. A., Brantsing C., Isgaard J. (1999). Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr. Res*. 45:318–323.
46. Han T. R., Chun M. H., Jang D. H., Kim K. S., Lim K. H., Cho H. J. (2007). Neuroprotective effects of growth hormone against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: 1H magnetic resonance spectroscopic study. *J. Korean Med. Sci*. 22:122–126.

47. Harvey S., Scanes C. G., Daughaday W. H. (1994). Growth hormone. Estados Unidos de America: CRC Press; 523.
48. Hutton L., Yan E., Yawno T., Castillo-Melendez M., Hirst J., Walker D.W. (2014). Injury of the Developing Cerebellum: A Brief Review of the Effects of Endotoxin and Asphyxial Challenges in the Late Gestation Sheep Fetus. *The Cerebellum*. 13(6):777-786.
49. Hynes M. A., van Wyk J. J., Brooks P. J., D'Ercole A. J., Jansen M., Lund P. K. (1987). Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol*. 1:233–242.
50. Inage Y. W., Itoh M., Wada K. y 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 Exo Neurol*. 57(6):554-562.
51. Inder T. E. y Volpe J. J. (2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*. 5(1):3-16.
52. Johnston, B. M., Mallard, E. C., Williams, C. E., Gluckman, P. D. (1996). Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent following hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J. Clin. Invest*. 97:300–308.
53. Johnston, M.V., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Hagberg, H. (2005). Models of Cerebral Palsy: Which Ones Are Best. *J. Child Neurol*. 20:984–987.
54. Kleman N. W., Sun D. y Cengiz P. (2010). Mechanism underlying neonatal hypoxia ischemia. *The open Drug Discovery Journal*. 2:129-137.
55. Kopchick J. J., List E. O. And Frohman L. A. (2015). Growth hormone: structure, function, and regulation of secretion. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. 2:325-456.
56. Kusky, John O, and Ping Ye. (2012). Neurodevelopmental Effects of Insulin-like Growth Factor Signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology* 33(3):230–51.
57. Lanfranconi S., Locatelli F., Corti S., Candelise L., Comi G. P., Baron P. L., Strazzer S., Bresolin N., y Bersano A. (2011). Growth factors in ischemic stroke. *J Cell Mol Med*. 15(8):1645–1687.

58. Larphaveesarp A., Ferriero M., Gonzalez F. (2015). Growth Factors for the Treatment of Ischemic Brain Injury (Growth Factor Treatment). *Brain Sci.* 5(2):165–177.
59. Li R. C., Guo S. Z., Raccurt M., Moudilou E., Morel G., Brittan K. R., Gozal D., (2011). Exogenous growth hormone attenuates cognitive deficits induced by intermittent hypoxia in rats. *Neuroscience.* 196:237–250.
60. Lincoln D El-Hifnawi E Sinowatz F Waters M. (1994). Immunohistochemical localization of growth hormone receptor binding protein in the mammalian cerebellum. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 176(5):419-427.
61. Liu J. P., Baker J., Perkins A. S., Robertson E. J., Efstratiadis A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (igf1r). *Cell.* 75:59–72.
62. Lobie P. E., Zhu T., Graichen T., Goh E.L. (2000). Growth hormone, insulin-like growth factor 1 and the CNS: localization, function and mechanism of action. *Growth Horm. IGF Res.* 10:551-556.
63. 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.
64. Martínez-Moreno C.G., Ávila-Mendoza J., Wu Y., Arellanes-Licea Edel C., Louie M., Luna M., Arámburo C., Harvey S. (2016). Neuroprotection by GH against excitotoxic-induced cell death in retinal ganglion cells. *Gen Comp Endocrinol.* 234:68-80.
65. Ming-Chi L. y San-Nan Y. (2010). Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Biomedecine and Biotechnology.* 1-6.
66. Mödersheim T. A., Christophidis L. J., Williams C. E., Scheepens A. (2007). Distinct neuronal growth hormone receptor ligand specificity in the rat brain. *Brain Res.* 1137:29–34.
67. Moquin D., Chan F. K. (2010). The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci.* 35:434-41.

68. Murguía-de Sierra M. T., Lozano R., y Santos J. I. (2005). Mortalidad perinatal por asfixia en México: problema prioritario de salud pública por resolver. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 62(5):375-383.
69. Noguchi T. (1996). Effects of growth hormone on cerebral development: morphological studies. *Horm. Res.* 45:5–17.
70. Nyakas C., Buwalda B. y Luiten P. G. M. (1996). Hypoxia and brain development. *Progress in Neurobiology.* 49:1-51.
71. Pekny M. y Pekna M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* (3):483-491.
72. Perlman, Jeffrey M. (2006). Intervention Strategies for Neonatal Hypoxic-Ischemic Cerebral Injury. *Clinic Therapeutics* 28(9):1353-1365.
73. Pilecka I, Whatmore A, Van Huijsduijnen HR, Destenaves B, Clayton P. (2006). Growth hormone signalling: sprouting links between pathways, human genetics and therapeutic options. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 18:12-18.
74. Powell-Braxton L., Hollingshead P., Warburton C., Dowd M., Pitts-Meek S., Dalton D., Gillett N., Stewart T. A. (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7:2609–2617.
75. Quik, Elisabetta Hendrika. (2012). The Somatotropic Axis: Effects on Brain and Cognitive Functions. *Experimental Psychology and Psychopharmacology.* 7:20.
76. Ramamoorthy P. y Shi H. (2014). Ischemia induces different levels of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  protein expression in interneurons and pyramidal neurons. *Acta Neuropathol Commun.* 5(2):51.
77. Renaville R., Hammadi M., Portetelle D. (2002). Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology.* 23:351-360.
78. Rennie, J.M., Hagmann, C., Robertson, N.J. (2008). The Baby Who Was Depressed at Birth in Neonatal Cerebral Investigation. In: Cambridge University Press., Chapter 8:130–138.

79. Sanders E Lin W Parker E Harvey S. (2010). Growth hormone expression and neuroprotective activity in a quail neural retina cell line. *General and Comparative Endocrinology*. 165(1):111-119.
80. 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*. 104:677–687.
81. 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.
82. Schneider, H. J., Uberto P., Günter K. S. (2003). Central Effects of the Somatotrophic System. *European Journal of Endocrinology* 149:377–92.
83. Shankaran, Seetha. 2012. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Novel Strategies for Neuroprotection. *Clinics in Perinatology* 39(4):919–29.
84. Sharp F., Bernaudin M. (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(6):437-448.
85. 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. *Neurosci. Lett*. 354:64–68.
86. Sotelo C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in Neurobiology*. 72(5):295-339.
87. Sproul A., Zhou X., Ping Yu S. (2009). Critical roles of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in apoptosis and CNS diseases. Chapter 4. *Brain Hypoxia and Ischemia*. Humana Press. 53-78.
88. Sundquist, T. E. R. R. I., Moravec, R., Niles, A. N. D. R. E. W., O'Brien, M. A. R. T. H. A., & Riss, T. (2006). Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*, 16:18-21.
89. Tamm I., Kikuchi T. (1990). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), insulin, and epidermal growth factor (EGF) are survival factors for density-inhibited, quiescent Balb/c-3T3 murine fibroblasts. *J. Cell. Physiol*. 143:494–500.

90. Uchida T., Rossignol F., Matthay M., Mounier R., Couette S., Clotters E., Clerici C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 279(15):14871-8.
91. Vannucci S. J. y Hagberg H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *Journal of experimental Biology*. 207:3149-3154.
92. Volpe J. J. (2009). Cerebellum of the Premature Infant: Rapidly Developing, Vulnerable, Clinically Important. *J Child Neurol*. 24(9):1085–1104.
93. Walter H. J., Berry M., Hill D. J., Cwyfan-Hughes S., Holly J. M. P, Logan A. (1999) Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: possible roles of IGF binding proteins (IGFBPs) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology*. 140:520– 532.
94. Waters M. J. (2016). The growth hormone receptor. *The 2015-USFQ Biennial Meeting on Growth Hormone Research*. 28:6-10.
95. Woods K. A., Camacho-Hubner C., Barter D., Clark A. J. L., Savage M. O. (1997). Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. *Acta Paediatr*. 86:39–45.
96. Yakar S. And Isaksson O. (2016). Regulation of skeletal growth and mineral acquisition by the GH/IGF-1 axis: Lessons from mouse models. *Growth hormone and IGF Research*. 29:26-42.
97. Yenari M. y Han H. (2012). Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia *Nature Reviews Neuroscience*. 13(4):267.
98. Yoshioka H., Yoshida A., Ochi M., Lino S., Fujiwara K., Ishimura K., Kusunoki T. (1986). Granule Cell Deficit in the Mouse Cerebellum after Total Asphyxia. *Ann Neurol* 19:356-359.
99. Yue X., Mehmet H., Squier M. V., Hope P. L., Azzopardi D., Edwards A. D. (1995). Apoptosis and necrosis in the brains of infants dying after birth asphyxia. *Pediatr Res*. 37:387.