



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ANÁLISIS DE CITOCINAS ASOCIADAS AL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN LA RETINA.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Ing. Jerusa Elienai Balderas Márquez

TUTOR:

Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno

Instituto de Neurobiología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez-Labora

Instituto de Neurobiología

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Universidad Autónoma de Aguascalientes

Juriquilla, Qro. a 12 de noviembre de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Campus Juriquilla, Querétaro), bajo la dirección del Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno.

Investigación financiada por la UNAM y por los proyectos PAPIIT-DGAPA UNAM (IN227020, IN207018, IN208419). Este trabajo también fue apoyado con recursos del CONACYT (Fondo de Ciencia Básica, 285004). Se otorgó una beca de CONACyT de maestría a la alumna (921788).

DEDICATORIA

A Dios por la vida y la salud que me ha otorgado, por permitirme estar rodeada de personas que me impulsan y me enseñan cada día. Por darme la Fe y las fuerzas para seguir levantándome cada mañana.

A mi papá Mario Nevares y mi mamá Vilma Balderas, por el apoyo y las palabras de aliento cuando mis ánimos flaqueaban. Por ayudarme y amarme incondicionalmente aunque a veces llegue ser terca y despistada (¡Hey! Las risas no faltaron); por impulsarme y enseñarme que debo seguir luchando por mi propósito en esta vida y no olvidar lo que es importante.

A mi mamá Oralia Balderas y a mi hermanita Ana Belen (o ya no tan pequeña), por los ánimos y el cariño con el que me han apoyado. Por esas palabras que ayudaron a clarificar mi mente y los consejos que me dieron pauta para mejorar.

A mi gemeli Cesia Ismerai, por seguir conmigo en esta aventura. Por estar ahí apoyándome con paciencia y cariño, junto con regaños y sarcasmo. Por ayudarme a salir de mi zona de confort.

A Abraham, Mónica y Merari, por estar conmigo y apoyarme en cada paso, por emocionarse y aconsejarme cuando lo necesitaba.

A mi familia que directa o indirectamente me han apoyado con su cariño y sus palabras. Por ser uno de los pilares que me sostienen.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno por el impulso para acércame a la ciencia y permitirme estar en este equipo. Este es el resultado de todas las enseñanzas, revisiones, preguntas, retos y consejos. Gracias por escucharme, apoyarme y ayudarme incluso cuando no sabía que lo necesitaba.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por sus asesorías, comentarios y revisiones que me han ayudado a mejorar.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por su apoyo, sus comentarios y revisiones, agradezco su ayuda en momentos difíciles.

A la M. en C. Martha Carranza Salas por resolver mis dudas, por tu ayuda, enseñanzas, consejos y todas esas pláticas que me han ayudado a crecer profesional y personalmente.

Al Sr. Gerardo Courtois por su apoyo técnico y por ayudarnos a que todo ese tiempo en el laboratorio sea más llevadero.

A la Dra. Carmen Clapp y al Dr. José Luis Quintanar Stephano por todas sus preguntas, revisiones y comentarios en cada tutorial, por su comprensión y su asesoría.

A la Dra. Rebeca Corona, Dra. Edith Arnold y Dra. Luz Navarro por sus comentarios y revisiones de esta tesis.

A la Dra. Nuri Aranda por tu ayuda en ese largo papeleo, por tus enseñanzas y asesorías en probabilidad, por escucharme, aconsejarme y apoyarme.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara de la Unidad de Videoconferencia por su apoyo técnico.

A la M. en C. Adriana González Gallardo y la Unidad de Proteogenómica, por su apoyo técnico y su asesoramiento.

A Chayo, Vale, Pech, Fran, Marian, Ren y Juan, agradezco sus largas explicaciones y repeticiones que me han ayudado a aprender más de la ciencia. Por escucharme, ayudarme, apoyarme y brindarme de sus sabias palabras cuando era necesario. Aprecio su amistad, así como sus llamadas de atención, risas y el haberse sentado a mi lado cuando había tormenta.

Al Biol. David Epardo por tu apoyo, ayuda en los experimentos y con los animales. Gracias por tu paciencia, comprensión, por hacer que esas largas horas en los experimentos sean amenas y entretenidas.

A la compañía Pilgrim's Pride, Querétaro, la cual donó los embriones necesarios para la realización de esta tesis. A todos los pollitos que dieron su vida en pro de la ciencia.

RESUMEN

Las acciones neurotróficas de la hormona de crecimiento (GH) en el SNC incluyen a la neurogénesis, neuroprotección y neuroregeneración. En la retina, la GH promueve el crecimiento axonal, la sinaptogénesis y la sobrevivencia celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en las acciones de la GH durante la protección y la regeneración aún no han sido dilucidados. Además de las acciones neurotróficas, proponemos que la GH actúa modulando la respuesta inflamatoria y por ende limitando la progresión del daño causado por una inflamación exacerbada. En retinas de pollos neonatos (*in vivo*), evaluamos el efecto antiinflamatorio de la GH contra la inflamación inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS). Para inducir la inflamación, se inyectó intravitrealmente el LPS y se indujo respuesta local aguda y se evaluó después de 6 h. Se observó que el LPS incrementa la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, IL8, LITAF, iNOS e IFN γ . La GH fue capaz de reducir la expresión de IL1 β , IL6, IL8, iNOS e IFN γ en retinas tratadas con LPS. Además, la administración intravitreal de LPS decrementó la expresión del ARNm del TLR4, pero no tuvo efectos sobre el ARNm de GHR. La coadministración de GH+LPS restauró la expresión de TLR4 y no tuvo efectos sobre GHR. La acción de la GH en células microgliales se analizó en la línea celular microglial de ratón (SIM-A9), donde se demostró la expresión del receptor a GH (GHR) y se observó la reducción de la proteína fosfo-p65, la cual participa en la traslocación del factor NF- κ B al núcleo. En esta línea celular se analizaron los efectos antiinflamatorios de la GH inducidos por LPS mediante el análisis de la expresión de moduladores inflamatorios. Se observó el LPS incrementa la expresión de IL1 β , IL6, TNF α , e iNOS, y la coadministración de LPS+GH reduce únicamente la expresión de TNF α , pero incrementa a las citocinas antiinflamatorias TGF β e IL10. En conclusión, la GH en la retina tiene efectos sobre la compleja red de comunicación intercelular que involucra diversas citocinas pro- y antiinflamatorias.

SUMMARY

Growth hormone (GH) has neurotrophic actions in the CNS that include neurogenesis, neuroprotection and neuroregeneration. In the retina, GH promotes axonal growth, synaptogenesis, and cell survival. However, the molecular mechanisms underlying the protective and regenerative of GH are still largely unknown. In addition to its neurotrophic actions, we propose that GH could act by modulating the inflammatory response in order to decrease the progression of damage. In neonatal chicken retinas (*in vivo*), we evaluated the anti-inflammatory effect of GH against LPS-induced inflammation. To induce retinal inflammation, LPS (10 µg) was intravitreally injected to induce a local and acute response that was evaluated 6 h after treatment. LPS administration in the vitreous induced a strong increase on IL1β, IL6, IL8, LITAF, iNOS and IFNγ. We found that GH was able to reduce the expression of IL1β, IL6, IL8, iNOS and IFNγ in LPS+GH co-treated retinas. The intravitreal administration of LPS resulted in a significant decrease of TLR4 expression but no effect was observed in GHR mRNA levels. In cells incubated with both GH+LPS, the expression of TLR4 was similar to controls but there were no effects on GHR. The effect of GH in microglia was analyzed in a mouse cell line (SIM-A9) and we confirmed that GHR is expressed in this model. In addition, GH treatments decreased the LPS-phospho-p65 induced immunoreactivity, suggesting a decrease in the translocation of NF-κB into the nucleus. Anti-inflammatory actions of GH against LPS were evaluated through cytokine production in microglia. We observed that LPS induced an increase IL1 β, IL6, TNFα, and iNOS mRNAs in SIM-A9 cells. Co-treatments with LPS+GH reduced TNFα mRNA levels and increased anti-inflammatory cytokine mRNA levels (TGFβ and IL10). In conclusion, GH exert actions as a part of a complex intercellular network that includes pro- and anti-inflammatory cytokines.

ÍNDICE

RESUMEN	5
SUMMARY	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1 La hormona de crecimiento (GH) y su receptor (GHR)	13
2.2 Neuroprotección	14
2.2.1 Neuroprotección mediada por la GH en el sistema nervioso central y en la retina	14
2.3 Neuroinflamación	15
2.3.1 Neuroinflamación en la retina	16
2.3.2 Factor nuclear kappa B	16
2.4 Citocinas e Interleucinas	17
2.4.1 Interleucina 1 β	18
2.4.2 Interleucina 6	18
2.4.3 Interleucina 8	19
2.4.4 Interleucina 10	19
2.4.5 Factor de necrosis tumoral alfa (α)	20

2.4.6 Factor inductor de TNF α por LPS	21
2.4.7 Factor de crecimiento transformante beta	22
2.4.8 Interferón gamma	22
2.4.9 Sintetasa inducible de óxido nítrico	23
2.5 Factores de crecimiento, citocinas y GH en la retina	23
2.6 Microglía en la retina	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
4.1 Hipótesis particulares	26
5. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo General	27
5.2 Objetivos particulares	27
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
6.1 Análisis del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por una inyección intravitreal de LPS en la retina de pollos neonatos.....	28
6.2 Análisis del efecto de la GH sobre la vía de señalización de NF- κ B inducida por LPS en células microgliales de la línea celular SIM-A9 de ratón	29
6.3 Evaluación del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por LPS en células de la microglía de la línea celular SIM-A9 de ratón	29
7. METODOLOGÍA.....	30
7.1 Modelo experimental en pollos neonatos	30

7.2 Cultivo de células SIM-A9 (línea celular de microglía de ratón)	30
7.3 Cuantificación de proteínas	31
7.4 Western blot	31
7.5 Extracción de ARN total	32
7.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	33
7.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR).....	34
7.8 Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Efecto del daño con LPS en la expresión del ARN mensajero de IL6 y LITAF en retina de pollo a 6 y 24 h	37
8.2 Efecto de la GH en la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, LITAF, IL8, iNOS e IFN γ durante la inflamación retiniana inducida por LPS	38
8.3 Efecto de la GH ante un daño con LPS en la expresión del ARNm de GH-R y TLR4 en retina de pollo	39
8.4 Efecto del LPS y la GH en la fosforilación de la proteína p65 de la vía NF- κ B en la línea celular SIM-A9	40
8.5 Curva dosis-respuesta de la administración de LPS sobre la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , TGF β , iNOS e IL10 en la línea celular SIM-A9	42
8.6 Curva dosis-respuesta del efecto de GH sobre la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , TGF β , iNOS e IL10 en la línea celular SIM-A9.....	44
8.7 Efecto de la GH y el LPS en la expresión de ARNm de IL1 β , IL6, TNF α e iNOS en la línea celular SIM-A9	45

8.8 Efecto de la GH y el LPS en la expresión de ARNm de TGF β e IL10 en la línea celular SIM-A9.....	47
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES.....	56
10.1 Conclusiones particulares	56
10.2 Conclusión General	56
11. BIBLIOGRAFÍA	57
12. ANEXOS	75
Figuras Suplementarias	75
Lista de abreviaturas	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La administración intravitreal de LPS aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias	37
Figura 2. La coadministración intravitreal LPS+GH disminuye la expresión de IL1 β , IL6, IL8, iNOS e IFN γ	38
Figura 3 La administración intravitreal de LPS disminuye la expresión del receptor TLR4.....	39
Figura 4. El tratamiento con GH disminuye la fosforilación de la proteína p65 en células microgliales tratadas con LPS	41
Figura 5. El tratamiento con LPS a células microgliales aumenta la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias	43
Figura 6. El tratamiento a células microgliales con GH aumenta la expresión de citocinas	44
Figura 7. La GH disminuye la expresión de IL6 y TNF α en células microgliales tratadas con LPS, y aumenta la expresión de iNOS	46
Figura 8. El co-tratamiento de GH y LPS aumenta la expresión de citocinas antiinflamatorias en células microgliales.....	47
Fig. suplementaria 1. Fragmentos de PCR correspondientes a la expresión de GHR.....	75

ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla 1. Lista de secuencias de oligonucleótidos iniciadores (primers) de pollo	31
Tabla 2. Lista de secuencias de oligonucleótidos iniciadores (primers) de ratón	32
Esquema 1. Hipótesis general ilustrada.....	22
Esquema 2. Método de análisis del efecto de la GH sobre ARNm de citocinas inducido por LPS en la neuroretina de pollos neonatos.....	24
Esquema 3. Método de análisis del efecto de la GH sobre la vía de señalización de NF- κ B.....	25
Esquema 4. Método de evaluación del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por LPS en la línea celular SIM-A9.....	25

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades degenerativas de la retina son padecimientos que generan un grave deterioro en la calidad de vida de los pacientes, las cuales incluyen componentes como la muerte neuronal, la neuroinflamación y la angiogénesis anormal (Resnikoff et al., 2004; Sapiha et al., 2010; Quingley 2011). La amplia diversidad de retinopatías y sus etiologías representan un reto para la investigación actual, ya que en muchas de estas afecciones se desconocen a detalle los procesos celulares que ocurren durante la progresión de las enfermedades. Sin embargo, existen elementos clave que pueden ser controlados tales como la excitotoxicidad y la neuroinflamación. Por lo anterior, el entendimiento de mecanismos moleculares y tisulares de la fisiopatología de las retinopatías neurodegenerativas es indispensable para fundamentar el diseño de nuevos tratamientos multifactoriales que permitan prevenir y revertir el daño en la retina. Aún es poco lo que se conoce sobre la participación de diferentes neurotrofinas, neuropéptidos y hormonas peptídicas que se sintetizan localmente en la retina, sobre la fisiología de la visión y el progreso de diferentes retinopatías. Por otra parte, las acciones protectoras y regeneradoras de estas proteínas en otros sitios del sistema nervioso sugieren que pueden tener una acción relevante en la fisiopatología retiniana y ejercer efectos benéficos. Algunos factores de crecimiento (*v.gr.* factor neurotrófico ciliar o CNTF) y neurotrofinas (*v.gr.* factor neurotrófico derivado de cerebro o BDNF) ya se utilizan como tratamiento para prevenir la neurodegeneración de la retina (Khalin et al., 2015; Ghasemi et al., 2017).

La hormona de crecimiento (GH), actualmente se administra en protocolos de investigación clínica a pacientes con trauma cerebral, daño en la espina dorsal y otras neuropatías en las cuales sus efectos positivos han sido claramente evidenciados (Bianchi et al., 2017; Devesa et al., 2015, 2016; Martínez-Moreno et al., 2018). Este proyecto busca entender a nivel molecular y celular cómo la GH ejerce efectos neuroprotectores, particularmente como un factor limitante de la progresión de daño retiniano por inflamación.

2. ANTECEDENTES

2.1 *La hormona de crecimiento (GH) y su receptor (GHR)*

La hormona de crecimiento (GH) es el elemento central del eje somatotrópico en los vertebrados, tiene una naturaleza peptídica (191 a.a. en la mayoría de las especies) y presenta una distintiva heterogeneidad molecular que le confiere una amplia diversidad de acciones (Arámburo et al., 1990) que no están restringidas a etapas de crecimiento corporal, ya que ahora se sabe que la GH tiene efectos múltiples a lo largo de la ontogenia de los organismos (Harvey, 2013). Inicialmente las acciones conocidas de la GH se limitaban a la hormona de aporte hipofisiario, la cual regula el crecimiento corporal durante el desarrollo; sin embargo, ahora se conoce que esta hormona se produce en casi todos los tejidos que originalmente se consideraban blanco de su actividad (Harvey, 2010, 2012; Harvey & Baudet, 2014). Actualmente, se reconoce que la GH participa como modulador de funciones locales en tejidos de los sistemas nervioso, inmune y reproductor, entre otros. Lo cual sugiere acciones discretas en los diferentes tipos celulares y tejidos que integran los diferentes sistemas (Alba-Betancourt et al., 2013; Ahumada-Solórzano et al., 2012; Arámburo et al., 2014; Harvey, 2010; Luna et al., 2013; Martínez-Moreno et al., 2018).

Las acciones de la GH se llevan a cabo por medio de la activación de su receptor (GHR), el cual se encuentra presente en casi todos los tipos celulares, ya sea de manera transitoria durante el desarrollo o permanente en tejidos adultos (Dehkhoda et al., 2018). Dicha activación del receptor se dispara a partir de un cambio tridimensional de su estructura homodimérica, lo cual genera la subsecuente activación de diversas vías de transducción de señales (JAK/STAT, MAPK/ERK, PI3k/Akt y Notch) así como la expresión de genes asociados a funciones específicas de cada tejido (Dehkhoda et al., 2018; Fleming et al., 2019). Las acciones tanto sistémicas como locales de la GH, pueden categorizarse en directas e indirectas, estas últimas a partir de la participación de su mediador clásico: el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Chia, 2014). A la fecha, se conoce que la GH es capaz de inducir la producción de múltiples factores de

crecimiento, citocinas, neuropéptidos, hormonas periféricas y neurotrofinas (Resmini et al., 2011; Martínez-Moreno et al., 2018b), que bien podrían ser categorizadas como nuevos elementos efectores del eje somatotrópico.

2.2 Neuroprotección

La neuroprotección es un término amplio que se utiliza para cubrir una variedad de estrategias terapéuticas relacionadas con la recuperación y prevención de una enfermedad neural (Vadja, 2002; Levin, 2018). La neuroprotección también es un término específico relacionado con la prevención de la pérdida de neuronas y/o sus conexiones cuando hay una enfermedad neurodegenerativa o que relaciona algún tipo de daño en el sistema nervioso (Levin, 2018).

2.2.1 Neuroprotección mediada por la GH en el sistema nervioso central y en la retina

Recientemente se han reportado importantes acciones neuroprotectoras de la GH en el sistema nervioso central (SNC) y en la retina (Frago et al., 2011; Bianchi et al., 2017; Martínez-Moreno et al., 2018). Se ha demostrado que el aumento en la sobrevivencia en neuronas retinianas inducido por la GH se lleva a cabo a través de acciones antiapoptóticas en las cuales participan las vías de transducción de señales como JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK y Notch. Lo anterior de manera semejante a lo que ocurre en otros tipos celulares del sistema inmune y reproductor (Alba-Betancourt et al., 2013; Luna-Acosta et al., 2015; Martínez-Moreno et al., 2016; Fleming et al., 2019). Estos descubrimientos se iniciaron a través de estudios en los cuales, se inhibían las acciones de la GH durante el desarrollo, lo que incrementaba la muerte celular (Sanders et al., 2009, 2011). En la retina, se han descrito efectos antiapoptóticos durante el desarrollo a través de técnicas de silenciamiento génico e inmunoneutralización de la GH, cabe mencionar que la capacidad para prevenir la muerte de células neuroretinianas se conserva en etapas posteriores, ya que gran parte de nuestros estudios los hemos realizado en pollos

neonatos y hemos comprobado que tanto en estadios embrionarios como en pollos neonatales con funcionalidad visual completa se mantienen sus propiedades protectoras y parcialmente regeneradoras (Fleming et al., 2019; Sanders et al., 2008; 2011). De estos hallazgos se desprendieron experimentos que demostraron el potencial de aplicar la GH para frenar muerte de células de la retina, y se complementaron con la creciente cantidad de literatura que muestra efectos neuroprotectores en diferentes modelos experimentales y en pacientes tratados con esta hormona (Devesa et al., 2014, 2016; Ávila-Mendoza et al., 2016; Martínez-Moreno et al., 2016, 2018b, 2019).

En la retina, la administración de la GH en modelos de daño neural, como es el caso de la excitotoxicidad experimental inducida por glutamato y agonistas de receptores a glutamato (NMDA [N-metil-D-aspartato] y KA [ácido kaínico]), ha aportado evidencias sólidas sobre su potencial terapéutico, ya que es capaz de proteger las conexiones neuronales tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Martínez-Moreno et al., 2016, 2018b, 2019; Fleming et al., 2016, 2018, 2019). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares, celulares y tisulares involucrados en la protección inducida por la GH en la retina. Es importante destacar que recientemente se ha demostrado que la GH en la retina es capaz de inducir la expresión de marcadores de crecimiento axonal, el establecimiento y protección de sinapsis, la síntesis de proteínas antiapoptóticas y de factores de crecimiento que revelan una compleja red de comunicación inter- e intracelular con un enorme potencial terapéutico (Martínez-Moreno et al., 2016; 2018b; Fleming et al., 2016; 2018).

2.3 Neuroinflamación

La neuroinflamación es un proceso inmunológico que ocurre en el SNC y el cual puede ser activado por diversas causas entre los que destacan el trauma, agentes infecciosos y otras patologías neurodegenerativas (Aguzzi et al., 2013; Gelders et al., 2018). La neuroinflamación prolongada y exacerbada puede contribuir a la progresión del daño neural afectando la interconexión de las neuronas

y que en algunos casos inducen muerte neuronal (Hirsch et al., 2012; Gelders et al., 2018). La neuroinflamación es un proceso mediado principalmente por células gliales (microglías, oligodendrocitos y astrocitos), las cuales en un estado homeostático se encargan de mantener el equilibrio entre la acción de factores pro- y antiinflamatorios, pero al existir un proceso degenerativo o lesión, este equilibrio se rompe promoviendo la producción y acción de las citocinas proinflamatorias (Chen et al., 2017; Schain et al., 2017; Shabab et al., 2017).

2.3.1 Neuroinflamación en la retina

En la retina el proceso inflamatorio, presente en diferentes retinopatías, se asocia con la inducción de muerte celular por necrosis y apoptosis, así como de una modalidad de muerte que comparte características de ambas, la necroptosis (Massengill et al., 2018; Huang et al., 2018). En la necroptosis retiniana y en el proceso neuroinflamatorio asociado a este tipo de muerte celular se ha descrito la participación de interleucinas y factores proinflamatorios (Huang et al., 2018). Inicialmente, la retina fue descrita como un sitio inmunoprivilegiado, en el cual la activación de la respuesta inmune sistémica se veía limitada, dada la presencia de una barrera hematorretiniana (Pérez et al., 2013; Keino et al., 2018). Sin embargo, recientemente se ha reportado que la microglía asociada a la retina es capaz de ser un actor crítico durante una respuesta inmune local (Keino et al., 2018). El entendimiento de la inflamación de la retina durante el daño excitotóxico, así como el de la progresión de este daño por medio de la limitación de la liberación de factores proinflamatorios, permitirá explorar el potencial antiinflamatorio de la GH en diferentes retinopatías.

2.3.2 Factor nuclear kappa B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es una familia de factores de transcripción que coordinan la respuesta inflamatoria, así como la diferenciación, la proliferación y la sobrevivencia celular en casi todos los tejidos (Mitchell et al., 2016). El LPS es

capaz de activar los receptores tipo Toll 4 (TLR4, por sus siglas en inglés) esto desencadena una serie de señales que activan la ubiquitinación de IKK γ , lo cual permite que se active la IKK β , al activarse fosforila la proteína inhibidora unida a NF- κ B, el cual es un heterodímero formado por las proteínas P65/cREL y P50, cuando se separa la proteína inhibidora permite la fosforilación de la proteína P65, que hace que el factor NF- κ B se transloque al núcleo, es por eso que la fosforilación de la proteína p65 se utiliza como indicador de la activación de la vía de NF- κ B (Guzman-Soto et al., 2016). Cuando esta vía se activa, en la microglía se favorece la expresión del fenotipo proinflamatorio M1, el cual se caracteriza por una producción exacerbada de citocinas proinflamatorias (Yang et al., 2013). La administración de LPS *in vivo* e *in vitro* es un modelo experimental que permite generar respuestas inflamatorias agudas y rápidas favoreciendo el fenotipo M1, y en el caso de la administración intravitreal a concentraciones controladas induce un proceso inflamatorio retiniano mediado principalmente por células de la microglía (Jang et al., 2007; Catorce et al., 2016; Noailles et al., 2018). Se ha encontrado que una disminución de la actividad de NF- κ B, dada por la inhibición de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de TLR4 después de un insulto inducido con LPS, produce una disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL1 β), la interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Yang et al., 2013; Liu et al., 2017).

Asimismo, se encontró que la administración de la GH puede disminuir la actividad de NF- κ B en macrófagos de tejido adiposo, y cuando se quita la presencia de la GH se produce un aumento en la expresión de las citocinas como IL1 β , IL6 y TNF α (Kumar et al., 2014; Liu et al., 2017) por lo tanto es posible que la GH pudiera tener efectos neuroprotectores a través de disminuir la señalización de TLR4/NF- κ B.

2.4 Citocinas e interleucinas

Las citocinas son mensajeros moleculares que permiten comunicarse a las células del sistema inmune, son las mayores reguladoras de la inmunidad innata y

adaptativa (Holtmann et al., 1995; Conlon et al., 2019). Las citocinas son proteínas liberadas por las células inmunes y tienen efectos autocrinos, paracrinos y endócrinos, para la regulación del crecimiento, la diferenciación, la muerte celular, y la angiogénesis entre otros (Oppenheim, 2001; Ramani et al., 2015).

2.4.1 Interleucina 1 beta

La IL1 β es una citocina proinflamatoria que tiene un papel crucial en la regulación de la producción de quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión y proteínas inflamatorias en fase aguda (Chen et al., 2014). La IL1 es conocida como la citocina clave para la respuesta inmune innata y ha sido descrita como la “citocina inflamatoria por excelencia” (Ritvo et al., 2019), esto es debido a que es una citocina que casi siempre está involucrada en algún punto de la respuesta inmune e inflamatoria (Chen et al., 2014).

La IL1 β es inducible y no constitutiva, es mayormente producida por células hematopoyéticas como células dendríticas, monocitos en la sangre, macrófagos de tejidos (de Oliveira et al., 2011) y por estímulos externos, como la activación de los receptores TLR (Ritvo et al., 2019).

En la retina, se ha encontrado que un daño con NMDA produce la activación de la microglía, se induce la degeneración de células ganglionares y se aumenta la expresión de IL1 β y TNF α (Takeda et al., 2018).

2.4.2 Interleucina 6

La IL6 es una glucoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por diversos tipos de células, como macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos y de la glía, siendo TNF α e IL1 β potentes inductores de su secreción (de Oliveira et al., 2011; Naruishi et al., 2018). La IL6 es una citocina proinflamatoria que activa células inmunes como los astrocitos y la microglía, regulando la expresión de algunos neuropéptidos posterior a una lesión neuronal, y contribuyendo así a su regeneración (Lambertsen et al., 2012; Naruishi et al., 2018; Rose-John 2018). Pero también ejerce

propiedades antiinflamatorias durante la lesión, por liberar receptores solubles de TNF e IL1AR (de Oliveira et al., 2011).

La IL6 está involucrada en la inflamación ocular promoviendo actividad angiogénica y la inducción de la inflamación en la córnea, iris, retina y conjuntiva (Ghasemi, 2016). Ha sido de interés de estudio en retinopatías como la diabética, el edema macular diabético, la degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinitis pigmentosa (RP) y glaucoma (Berge et al., 2019; Jo et al., 2019; Mesquida et al., 2019; Mimura et al., 2019). Además de su participación en la respuesta inflamatoria de la retina, se ha descrito que el tratamiento con IL6, ante un daño excitotóxico, tiene acciones protectoras en la retina sobre las células amacrinias y bipolares (Fischer et al., 2015).

2.4.3 Interleucina 8

La interleucina 8 (IL8) es un miembro de la familia de quimiocinas y es producida por diversas células como monocitos, macrófagos y fibroblastos (Puthothu et al., 2006).

La IL8 es una citocina proinflamatoria que regula la respuesta inmune e inflamatoria al iniciar y amplificar los procesos inflamatorios (Bilusic et al., 2019; Hua et al., 2019). Asimismo, la IL8 promueve la angiogénesis y la fibrosis (Bruscolini et al., 2020). Debido a los efectos que tiene la IL8, se ha propuesto como blanco de tratamientos antiinflamatorios en traumatismo cerebral (Whalen et al., 2000).

La IL8 ha tomado de interés en el estudio de AMD, RP, glaucoma, y retinopatía diabética, lo anterior debido a la correlación que existe entre el aumento de esta interleucina en el humor acuoso y estas enfermedades de la retina (Han et al., 2018; Berge et al., 2019; Cheng et al., 2019; Mimura et al., 2019).

2.4.4 Interleucina 10

La interleucina 10 (IL10) es una potente citocina antiinflamatoria secretada por macrófagos (Saxena et al., 2015; Trifunovic et al., 2015). La actividad de IL10 está mediada por el receptor de IL10 (IL10-R) el cual pertenece a la familia de

receptores de citocina de clase II (de Oliveira et al., 2011; Trifunovic et al., 2015). La producción de IL10 se reduce por citocinas como la interleucina 4 (IL4), la interleucina 13 (IL13), el IFN γ , y también por su propia autoregulación (de Oliveira et al., 2011); por el contrario, la ausencia de IL10 puede resultar en una producción excesiva de citocinas proinflamatorias como IL1 β e IL6 (Rutz et al., 2016).

En la retina, la IL10 ha sido asociada a reacciones antiinflamatorias, pues disminuye la inflamación y favorece la sobrevivencia celular en diferentes modelos de ratón, favoreciendo el fenotipo M2 de macrófagos (Morita et al., 2018; Pulido et al., 2018).

2.4.5 Factor de necrosis tumoral alfa (α)

El TNF α es considerado canónicamente como una citocina proinflamatoria involucrada en la respuesta inmune innata y un potente inmunomediador (Tezel et al., 2001; Costa et al., 2012; Olmos et al., 2014). Es producido principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T, también está presente en las neuronas y células de la glía (de Oliveira et al., 2011).

El TNF α puede tener un rol proinflamatorio y proapoptótico cuando activa la vía de señalización mediante TNFR1, así como puede ser antiinflamatorio y pro-sobrevivencia cuando señala mediante el receptor TNFR2 (Costa et al., 2012; Becher et al., 2017).

En el sistema nervioso central sano, el TNF α tiene funciones reguladoras cruciales en procesos fisiológicos como la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, sueño y fortalecimiento sináptico inducido por astrocitos (Olmos et al., 2014). En condiciones patológicas, los astrocitos y principalmente la microglía libera grandes cantidades de TNF α ; esta producción *de novo* es un componente importante de la respuesta inflamatoria que ha sido asociada a diversos desordenes neuronales (Olmos et al., 2014).

En la retina, se ha reportado que en pacientes con AMD, RP, glaucoma y cataratas existe un aumento de la producción TNF α intraocular que tiene como consecuencia un incremento en la producción de citocinas (Berge et al., 2019). El TNF α incrementa la producción de moléculas inflamatorias en células endoteliales

vasculares de la retina (Han et al., 2018). Esta citocina ha adquirido interés en su estudio por su influencia en diferentes patologías en la retina como AMD, oclusión de vena retinal (RVO), y glaucoma (Cheng et al., 2019; Zeng et al., 2019). Así también, se ha encontrado que el TNF α contribuye a la degeneración axonal y a cambios gliales observados en nervios ópticos de pacientes con SIDA. Así mismo, se ha encontrado evidencia de que el TNF α tiene un rol en la neurodegeneración en el glaucoma (Tezel et al., 2001).

2.4.6 Factor inductor de TNF α por LPS

El factor inductor de TNF α por LPS (LITAF por sus siglas en inglés) es un mediador de la respuesta inflamatoria local y sistémica el cual actúa como activador transcripcional para el TNF α (Bushell et al., 2011; Moshal et al., 2019). El LITAF es expresado en tejidos linfoides incluyendo los leucocitos, los ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, como la placenta y el hígado, en humanos y ratones (Hong et al., 2006).

Se sabe que, la estimulación con LPS en macrófagos induce la producción de LITAF seguido por la unión LITAF al promotor del gen de TNF α , aumentando la transcripción, traducción y secreción de TNF α (Hong et al., 2006; Bushell et al., 2011).

En contraste con los mamíferos, es muy poco lo que se conoce acerca del TNF α en pollos. Este gen no se encuentra en el banco de genes del NIH, pero es importante destacar que sus receptores sí se encuentran en aves (Takimoto et al., 2008; Martínez-Moreno et al., 2019), por lo que es probable que el ligando tenga una divergencia importante que ha impedido hasta ahora su identificación. Por lo que se ha propuesto el uso de factores reguladores o asociados a el TNF α para el estudio de éste de manera indirecta, entre los cuales se encuentra el LITAF, ya que es un factor clave en la regulación transcripcional específica del TNF α (Hong et al., 2006; Sundaresan et al, 2007).

2.4.7 Factor de crecimiento transformante beta

El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) es una citocina multifuncional y esencial para la sobrevivencia, el desarrollo y la inflamación (Clark et al., 1998). La señalización de TGF β está involucrada en múltiples procesos celulares, incluyendo la proliferación, la apoptosis, la migración, la adhesión y la angiogénesis (Li et al., 2019; Chen et al., 2020). El TGF β juega un rol esencial en la homeostasis de las células inmunes, presenta propiedades inmunorreguladoras que le dan propiedades antiinflamatorias a esta citocina (Zhou et al., 2003; Schmidt-Weber et al., 2006; Hanna et al., 2019). Se ha reportado que los astrocitos producen TGF β para la modulación de la neuroinflamación potenciando la producción de citocinas (Hamby et al., 2006; Huh et al., 2017). En la retina TGF β regula la proliferación de las células de Müller y la regeneración en la retina del pez cebra (Lee et al., 2020).

2.4.8 Interferón gamma

Los interferones son una familia de citocinas que tienen actividad biológica, incluyendo efectos antivirales, la regulación del crecimiento y diferenciación celular, y la modulación de la respuesta inmune (Mahalingam et al., 2001). Existen dos tipos de interferones, en el tipo 1 están el IFN α y el IFN β , estos se caracterizan por sus propiedades antivirales. En el tipo 2 está el interferón gamma, el cual se caracteriza por ser activado por un estímulo inmune e inflamatorio (Mahalingam et al., 2001; Ikeda et al., 2002).

El interferón gamma (IFN γ) es una citocina que tiene un papel crítico en la promoción de la respuesta inmune y procesos inmunopatológicos (Ikeda et al., 2002; Sitalaksmi et al., 2019). El IFN γ es un potente activador de macrófagos para la defensa antiviral y antibacterial en el cuerpo teniendo efectos proinflamatorios (Cantell et al., 1996; Khoury et al., 2020).

En el SNC el IFN γ tiene efectos en la neurodegeneración y neuroregeneración. Sin embargo, hay muy pocos estudios del IFN γ y enfermedades

oculares, aunque se tiene un gran interés puesto que se presenta en el vítreo con RVO (Ehlken et al., 2015; Zeng et al., 2019).

2.4.9 Sintetasa inducible de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un efector del sistema inmune innato, se sintetiza por la enzima óxido nítrico sintetasa (Lowenstein et al., 2004). Una de las isoformas del óxido nítrico sintetasa es la óxido nítrico sintetasa inducible o inflamatoria (iNOS) (Minhas et al., 2019). La iNOS es expresada en respuesta a un estímulo proinflamatorio/bacterial, como puede ser a una serie de citocinas proinflamatorias como IL1 β , TNF α , IFN γ y el LPS (Won et al., 2004; Minhas et al., 2019). Esta respuesta inmune es dada por el mecanismo de defensa de los macrófagos (Minhas et al., 2019). La iNOS es expresada en varios tipos celulares incluyendo las células del músculo liso, los macrófagos, los keratinocitos, los hepatocitos y la microglía (Won et al., 2004). En la retina, iNOS induce la respuesta de la microglía a mediadores de inflamación (Sierra et al., 2014).

2.5 Factores de crecimiento, citocinas y GH en la retina

La retina es un sitio de expresión de factores de crecimiento que han sido asociados con efectos neurotróficos, entre estos se encuentran la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y algunos resultados preliminares indican que la GH puede inducir cambios en la expresión de algunos de estos péptidos (Balderas-Márquez, 2018). Se ha descrito que algunos de estos factores y algunas neurotrofinas, como BDNF y neurotrofina-3 (NT3) pueden reducir la neuroinflamación mediante la regulación de la expresión de citocinas, interleucinas y factores proinflamatorios (Linker et al., 2002; Tzeng et al., 2005; Zhang et al., 2014; Li et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Asimismo, se ha encontrado un efecto de la GH en la expresión de citocinas. La GH puede disminuir la activación de la vía NF- κ B produciendo una disminución

en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL1 β y TNF α , en macrófagos aislados de tejido adiposo de ratón estimulados con LPS (Kumar et al, 2014).

Existen datos que sugieren acciones del eje somatotrópico en diferentes tejidos, efectuadas por factores de crecimiento (*v. gr.* proteínas morfogénicas óseas) (Resmini et al., 2011). La expresión local de esos péptidos apunta a la existencia de una red de comunicación celular que involucra acciones endócrinas, paracrinas y autocrinas, aunque la información que se tiene acerca de las interacciones es muy limitada (Fleming et al., 2016). Recientemente se determinó que la GH es capaz de aumentar la expresión de IGF-1, su mediador clásico, y también los niveles de expresión de NT3 y BDNF (neurotrofinas clásicas) en la retina (Martínez-Moreno et al., 2014, 2018, 2018b).

2.6 Microglía en la retina

La microglía es el macrófago residente del SNC y está asociada con la regulación de la respuesta inmune (Ginhoux et al., 2010). En la retina existen diversas células gliales, entre las cuales se encuentra la microglía, las células de Müller, los astrocitos, entre otros dependiendo la especie (Karlstetter et al., 2015).

Una de las funciones de la microglía es que tiene una participación en la comunicación con las células de Müller para mantener la homeostasis a través de regular la producción de diferentes factores neurotróficos como NT3 y BDNF, pero además otras proteínas que tejen una red comunicación intercelular altamente compleja (Karlstetter et al., 2010, 2015).

La microglía es denominada como “jardinera o colectora de basura” en el SNC (Wang et al., 2016; Garden et al., 2006). Entre las propiedades de la microglía se encuentra su potencial de liberar diversos factores que directa y/o indirectamente promueven la regeneración del sistema nervioso lesionado (Wang et al., 2016). La activación de la microglía es un marcador para diversas retinopatías y es una rápida alerta para varios disparadores asociados a la apoptosis y degeneración de células retinales (Karlstetter et al., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

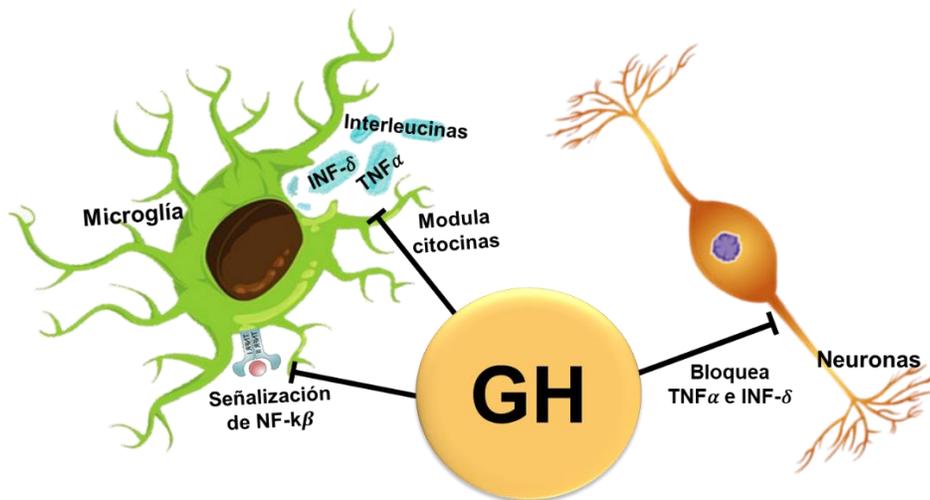
El daño y la muerte de neuronas retinianas por enfermedades degenerativas, trauma o infecciones conlleva un deterioro en la visión afectando drásticamente la calidad de vida. La prevención y protección terapéutica de células retinianas a través de la administración de factores neurotróficos es una estrategia que ha demostrado resultados prometedores (Guymer et al., 2019). Sin embargo, muchos de los mecanismos moleculares y celulares que ocurren para llevar a cabo los efectos benéficos durante el tratamiento con agentes neurotróficos son aún desconocidos. La identificación de factores con potencial terapéutico, antiinflamatorios y el entendimiento de las cascadas e interacciones moleculares que disparan estos agentes neurotróficos es fundamental para desarrollar tratamientos integrales que permitan prevenir y tratar retinopatías degenerativas (Haritoglu et al., 2020; Mansour et al., 2020). El incremento de literatura sobre la aplicación de la GH en pacientes con daño neural y de información básica respecto a sus acciones benéficas en modelos experimentales (Hatton et al., 2006; Nylander et al., 2010; McGinley et al., 2016; Bianchi et al., 2017; Cuatrecasas et al., 2018), permite plantear preguntas sobre los mecanismos implicados en dichos efectos positivos.

Se busca estudiar los mecanismos moleculares asociados a la inflamación de la retina para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Este trabajo utiliza el modelo de inducción de inflamación en tejido nervioso por medio de la administración del LPS tanto en retina de pollo neonato, así como en la línea celular SIM-A9 de ratón como modelo experimental para el estudio de la fisiología de la microglía. Los pollos son animales precociales, por lo tanto, al nacer su SNC está completamente desarrollado, incluidas la retina, aunque crecen de tamaño durante el desarrollo su fisiología se mantiene estable. Esto hace que los experimentos puedan ser realizados en pollos de un día puesto que son fáciles de trabajar, y es un modelo que se tiene plenamente establecido y caracterizado.

Es importante hacer notar, que, en la inflamación de la retina, la microglía se ha descrito como el tipo celular modulador de este proceso, de ahí el interés de los efectos de la GH sobre esta estirpe celular.

4. HIPÓTESIS

La acción antiinflamatoria de la GH disminuye citocinas proinflamatorias e inhibe a la vía de señalización de NF- κ B inducida por LPS en células de la retina.



Esquema 1. Hipótesis general ilustrada.

4.1 Hipótesis particulares

- I. La GH disminuye el ARNm de citocinas proinflamatorias como IL1 β , IL6, LITAF (TNF α), IL8, iNOS e IFN γ inducidas por LPS en la retina.
- II. La GH inhibe la fosforilación de la proteína p65 en la vía de señalización de NF- κ B inducida por LPS en la línea celular SIM-A9 (microglía de ratón).
- III. La GH reduce los niveles de ARNm de citocinas inflamatorias como IL1 β , IL6, TNF α , iNOS y aumenta a IL10 y TGF β en células SIM-A9 tratadas con LPS.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

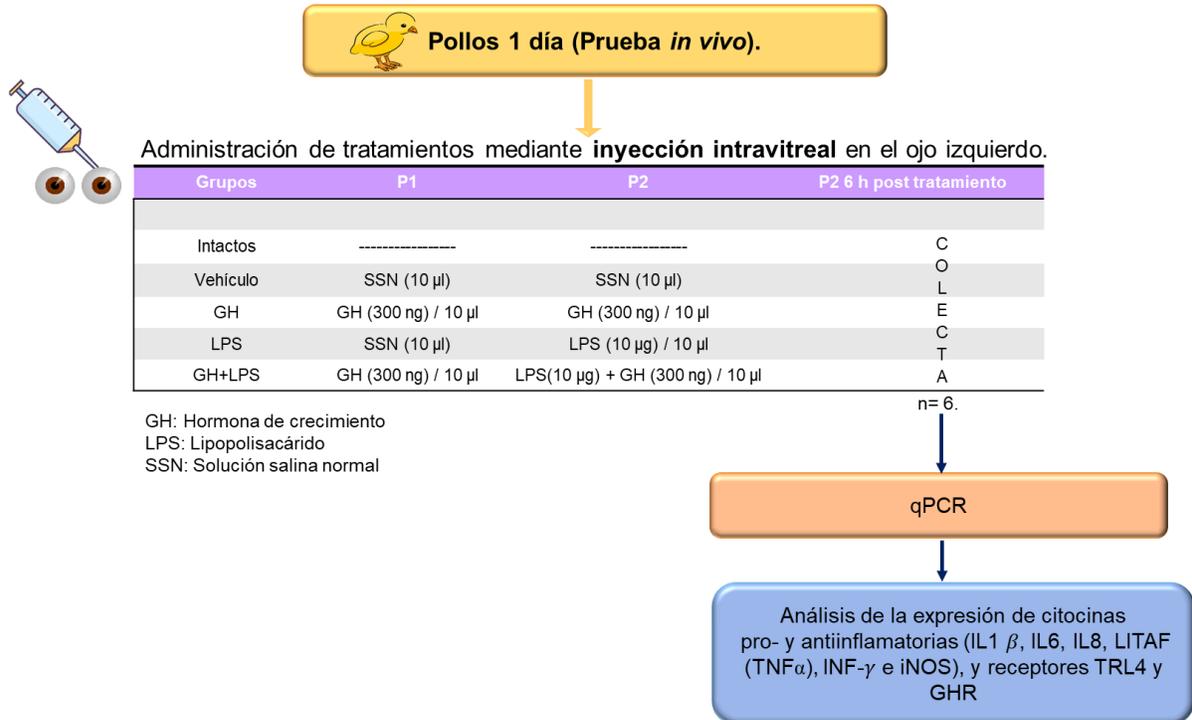
Evaluar el efecto de la administración intravitreal de la GH sobre el ARNm de citocinas pro- y antiinflamatorias, y la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B inducida por LPS en células de la retina.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la GH sobre el ARNm de IL1 β , IL6, IL8, LITAF (TNF α), iNOS, IFN γ y de los receptores TLR4 y GHR inducido por LPS en la retina de pollos neonatos.
- Determinar si la GH inhibe la presencia de la proteína fosforilada p65 la cual participa en la vía de señalización NF- κ B y la cual es activada por la administración de LPS en la línea celular microglial SIM-A9.
- Evaluar el efecto de la GH sobre el ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , iNOS, IL10 y TGF β inducido por LPS en la línea celular SIM-A9.

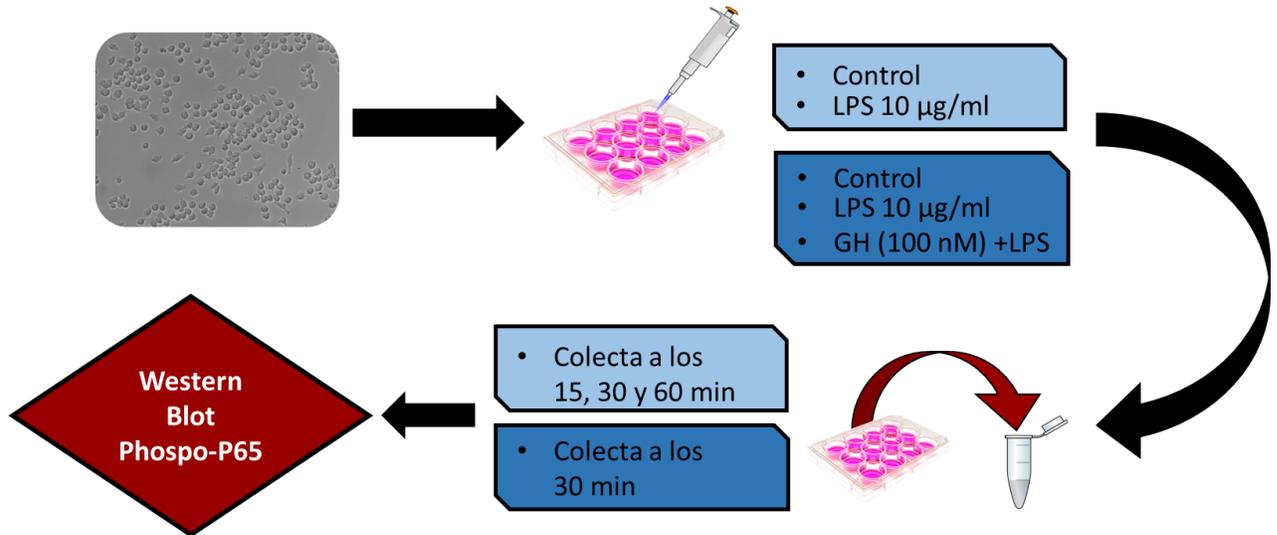
6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Análisis del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por una inyección intravitreal de LPS en la retina de pollos neonatos



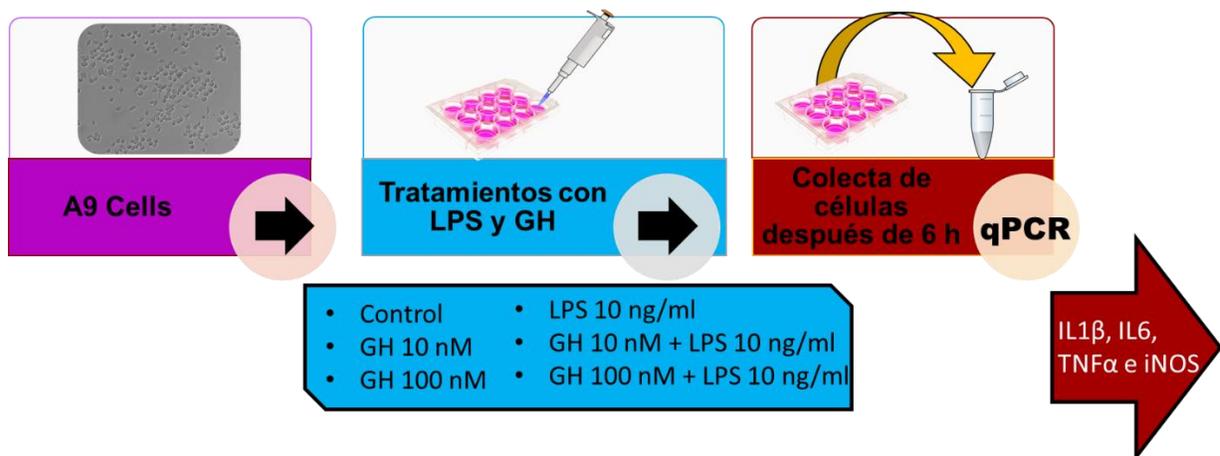
Esquema 2. Método de análisis del efecto de la GH sobre ARNm de citocinas inducido por LPS en la retina de pollos neonatos.

6.2 Análisis del efecto de la GH sobre la vía de señalización de NF-κB inducida por LPS en células microgliales de la línea celular SIM-A9 de ratón



Esquema 3. Método de análisis del efecto de la GH sobre la vía de señalización de NF-κB.

6.3 Evaluación del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por LPS en células de la microglía de la línea celular SIM-A9 de ratón



Esquema 4. Método de evaluación del efecto de la GH sobre el ARNm de citocinas inducido por LPS en la línea celular SIM-A9.

7. METODOLOGÍA

7.1 Modelo experimental en pollos neonatos

En pollos neonatos (de 1 día post eclosión) se administraron los tratamientos de 300 ng de GH de pollo y/o 10 µg de LPS en 10µl de solución salina por vía intravítrea bajo anestesia (2.2 mg/kg de ketamina y 1 mg/kg de xilacina) y se sacrificaron por decapitación, lo anterior acorde al procedimiento previamente aprobado por el comité de bioética de Instituto de Neurobiología con el número de aprobación 122A (Martínez-Moreno et al., 2018) y siguiendo los lineamientos de la Asociación de Investigación de la Visión y Oftalmología (ARVO, por sus siglas en inglés).

7.2 Cultivo de células SIM-A9 (línea celular de microglía de ratón)

Algunas células de la línea celular de microglía de ratón inmortalizadas espontáneamente (SIM-A9, *Spontaneously Immortalized Microglia*) (Nagamoto-Combs et al., 2014), fueron cultivadas en DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) con *D*-glucosa (4.5 g/l), *L*-glutamina y piruvato de sodio (100 mg/l), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco, Grand Island, NY, USA), bajo una atmósfera de 5% *CO*₂/ 95% *O*₂ a 39 °C en una incubadora con camisa de agua (UNAIRE US Auto Flow) (Zhang et al., 2018). Las células fueron subcultivadas desde un matraz de 4 ml en 2 matraces de 4 ml cada uno, cada 2-3 días (hasta obtener 80-95% de confluencia). Los tratamientos fueron administrados en células cultivadas en platos de 6 pozos (Corning, New York, USA). Las células SIM-A9 utilizadas para experimentos fueron aquellas obtenidas únicamente entre el pasaje 8 y el 20, a fin de asegurar la preservación de su fenotipo. Los exámenes morfológicos se realizaron diariamente observando células con forma redonda sin procesos, descartando los cultivos con crecimiento anormal, esta línea celular ha sido caracterizada y conserva las características de la microglía, por ejemplo, la expresión de *iba1*, *CD68* y la producción de citocinas (Nagamoto-Combs et al., 2014; Dave et al., 2020).

7.3 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford para cuantificar la concentración de proteínas totales en las muestras obtenidas de los cultivos de células SIM-A9. Se hicieron los extractos de proteínas por homogenización y sonicación en presencia de un coctel inhibidor de proteasas (Mini-complete, Roche, Mannheim, Germany). Se hizo una curva patrón por duplicado, utilizando BSA como proteína de referencia (albúmina de suero bovino). Los intervalos de las concentraciones utilizadas fueron de 0 a 20 µg/ml. El volumen final de las muestras con agua desionizada fue de 800 µl, y se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad, Laboratories, Inc., Hercules, CA). Una vez hecha la mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después se cuantificó en el espectrofotómetro de luz UV/Vis con una longitud de onda de 595 nm (Beckman Coulter DU 730) (Bradford 1976).

7.4 Western blot

Se hizo un análisis electroforético unidimensional en geles de acrilamida (10%) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), utilizando condiciones reductoras (en presencia de β-mercaptoetanol [Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA]), solubilizando 30 µg de proteína de las muestras en un volumen total de 30 µl. Se hizo la electroforesis con un amortiguador de corrida con TRIS-base 25 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), glicina 192 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), SDS 5 g/L (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), a pH 8.3.

Una vez terminada la electroforesis, se equilibraron los geles y las membranas de nitrocelulosa en amortiguador de transferencia compuesto de TRIS 25 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), glicina 192 mM (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), metanol 20% (Baker), a pH 8.3. Se realizó la electrotransferencia a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) durante una hora, aplicando 200 mA en amortiguador de transferencia. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Cat. No. 170-6404)

en TBS (TRIS 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5), durante una hora y se hicieron 3 lavados subsiguientes con TTBS (Tween 20 [Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA] al 0.05% en TBS).

Se llevó a cabo la inmunotinción de la proteína de interés, incubando con el correspondiente anticuerpo diluido con leche descremada al 1% durante toda la noche a 4 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-p65 (Phospho-NF- κ B p65, Cell signalling Massachusetts, USA, 1:3000); anti- β -Actina (β -Actina, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, SC-47778, 1:3000). Posteriormente se lavaron las membranas con TTBS, 3 veces, en intervalos de 10 min.

Luego se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo [1:5000] conjugado con peroxidasa de rábano; o el anti-IgG de ratón [1:5000] conjugado con peroxidasa de rábano, diluido con leche descremada al 1% en TTBS, a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron tres veces las membranas con TTBS, en intervalos de 10 min. Finalmente, las proteínas inmunorreactivas fueron reveladas utilizando un sustrato ECL quimioluminiscente (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK), colocando las membranas en un cassette para revelado (Kodak) y exponiéndolas a una película fotográfica (BioMax de Kodak ML) en la oscuridad (Towbin et al., 1979). Se llevó a cabo el análisis densitométrico de los luminogramas empleando el programa Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

7.5 Extracción de ARN total

El ARN total se aisló siguiendo las instrucciones del kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA).

Para la extracción de ARN de tejido, primero se cortaron los ojos a la mitad, y a estos se les adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Life technologies, CA, USA), se procedió a la homogeneización del tejido utilizando un homogeneizador (Polytron, PCU11), se centrifugaron las muestras a 10,000 r.p.m. en una centrifuga a 20 °C (Sorvall RMC) por 5 min y se recogió el sobrenadante en un microtubo de 1.5 ml,

se adicionó 500 µl del extracto de tejido y 500 µl de TRIZOL (Invitrogen, Life technologies, CA, USA), y 200 µl de cloroformo (Sigma, SL, Missouri, USA), se agitó durante 1 min, y se centrifugó a máxima velocidad a 14,000 r.p.m. en una centrifuga a 20 °C (Sorvall RMC). Se obtuvo el sobrenadante y se continuó con el protocolo del kit de extracción de ARN.

Para la extracción del ARN de las células, a 3 pozos se le añadió 400 µl de TRIzol (Invitrogen, Life technologies, CA, USA) y con este volumen se continuó con el protocolo del kit de extracción de ARN.

Para continuar con el protocolo, se adicionó un volumen igual de etanol (95-100%; Baker, México), y la mezcla se transfirió a una columna en un tubo colector y se centrifugó a 10,000 r.p.m. en una centrifuga (Sorvall RMC) a 20 °C. Se hizo un tratamiento con DNasa en la columna, se agregaron 400 µl de amortiguador de lavado para ARN, en la columna y se centrifugó a 10,000 r.p.m. en una centrifuga a 20 °C (Sorvall RMC). Posteriormente se añadió 400 µl de la solución de pre-lavado Direct-zol ARN a la columna y se centrifugó a 10,000 r.p.m. a 20 °C, este paso se repitió dos veces. Se añadió 700 µl de amortiguador de lavado ARN a la columna y se centrifugó durante 2 min para remover completamente el amortiguador; una vez que se descartó el líquido se volvió a centrifugar a máxima velocidad a 14,000 r.p.m. en una centrifuga a 20 °C (Sorvall RMC) para remover todo el amortiguador de la columna. Posteriormente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, libre de RNasa. Para eluir el ARNm pegado a la columna se añadieron 50 µl de agua libre de ADNasa y ARNasa directamente a la resina y se centrifugó, obteniendo así el ARN total de las células (Zymo Research, Manual Direct-zol RNA MiniPrep"). Finalmente se cuantificó la concentración de ARNm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, ND-2000).

7.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc (ADN Complementario) se generó a partir del ARN total obtenido de las retinas y las células SIM-A9, incubándolo en presencia de 1 µl de oligos DT (10 mM), 1 µl de hexámeros (Thermo Scientific), 1 µl de dNTP's (Thermo Scientific,

Lithuania) y 8 µl de amortiguador de reacción 5x (TRIS-HCl [50 Mm, pH 8.3], KCl [75 mM], MgCl₂ [3 mM] y DTT [10 mM]; Promega, Madison, WI, USA), luego esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min, se sacaron los tubos, se puso en hielo y se agregó 0.25 µl de RNAsa Out, 4 µl DTT (0.1 M; Invitrogen) y 1 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl; Promega, Madison, WI, USA) y se incubó a 42 °C por 60 min, posteriormente a 70 °C por 10 min y finalmente a 4 °C.

7.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR)

La expresión de ARNm en las retinas y las células SIM-A9 se analizó mediante la técnica PCR en tiempo real (qPCR) en el termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems Foster, CA, USA), utilizando 5 µl de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Maxima, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), con un volumen final de 10 µl, conteniendo también los oligonucleótidos (5'-3' y 3'-5') 0.5 µl de cada uno (Tabla 1), y 3 µl ADNc (diluido según las condiciones óptimas estandarizadas, 1:3 para los genes blanco; 1:10 el gen constitutivo 18S de ratón; 1:20 el gen constitutivo 18S de pollo: 1:10 el gen de la superóxido dismutasa (SOD)).

La reacción fue realizada bajo las siguientes condiciones, 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 30 segundos a 72 °C; y finalizando con una curva de fusión. Después se analizaron los resultados utilizando el programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), y se obtuvo una cuantificación del producto de qPCR a partir de la determinación de doble delta Ct, usando como referencia al gen de expresión constitutivo 18S o SOD (Kozera et al., 2013).

Nombre del primer	Tamaño (bp)	Secuencia	Ciclos	#Acceso/ Referencia
c18Sq F R	100	CTCTTTCTCGATTCCGTGGGT	40	XR_00307 8044.1
		TTAGCATGCCAGAGTCTCGT		
cSODq F R	146	TTACAGCTCAGGTGTCGCTTC	40	NM_20421 1.1
		ACCAAAGTCACGTTTGATGGC		
cIL1 β F R	660	ACAGAGATGGCGTTCGTTCC	40	NM_20452 4.1
		CAGGCGGTAGAAGATGAAGC		
cIL6q F R	106	AAATCCCTCCTCGCCAATCT	40	NM_20462 8.1
		CCCTCACGGTCTTCTCCATAAA		
cLITAF F R	149	GAGCAGGGCTGACACGGAT	40	NM_20426 7.1
		GCACAAAAGAGCTGATGGCAG		
cIL8q F R	301	ATTCAAGATGTGAAGCTGAC	40	NM_20549 8.1
		AGGATCTGCAATTAACATGAGG		
ciNOSq F R	195	CCAGCTGATTGGGTGTGGAT	40	NM_20496 1.1
		TACAGCCTTGGCCAAAATGC		
cIFN γ q F R	71	GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA	40	NM_20514 9.1
		GCTTTGCGCTGGATTCTCA		
cTRL4q F R	190	AGTCTGAAATTGCTGAGCTCAAAT	40	NM_00103 0693.1
		GCGACGTTAAGCCATGGAAG		
cGHRq F R	181	ACTTCACCATGGACAATGCCTA	40	NM_00100 1293.1
		GGGGTTTCTGCCATTGAAGCTC		

Tabla 1. Lista de secuencias de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) de pollo.

Nombre del primer	Tamaño (bp)	Secuencia	Ciclos	#Acceso/ Referencia
h18Srq F R	159	ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA	40	XR_87712 0.2
		GCCTCACTAAACCATCCAATCGG		
mIL1 β q F R	89	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	40	NM_00836 1.4
		ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT		
mIL6q F R	101	CCAGTTGCCTTCTTGGGACT	40	NM_00131 4054.1
		GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC		
mTNF α F R	67	CTCCAGGCGGTGCCTATGT	40	NM_00127 8601.1
		GAAGAGCGTGGTGGCCC		
mTGF β F R	67	CCCGAAGCGGACTACTATGC	40	NM_01157 7.2
		ATAGATGGCGTTGTTGCGGT		
miNOSqF R	51	CGAAACGCTTCACTTCCAA	40	NM_00131 3922.1
		TGAGCCTATATTGCTGTGGCT		
mIL10q F R	104	AGAAAAGAGAGCTCCATCATGC	40	NM_01054 8.2
		TTATTGTCTTCCCGGCTGTACT		
mGHRqF R	264	CCACCCAATGCAGATGTTCT	40	NM_00128 6370.1
		CTGGATATCTTCTTCACATGCTTCC		

Tabla 2. Lista de secuencias de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) de ratón.

7.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se graficaron como la media \pm error estándar. Se realizó la prueba de D'Agostino & Pearson para verificar que los datos de los grupos fuesen normales. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA seguido de una prueba *post hoc* de Fischer's LSD para la comparación de entre 3 o más grupos contra el control, así como para las comparaciones múltiples. Esto se realizó con ayuda del software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EUA) y las gráficas resultantes se muestran en el siguiente apartado.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto del daño con LPS en la expresión del ARN mensajero de IL6 y LITAF en retina de pollo a 6 y 24 h

Con la intención de establecer el tiempo óptimo para el estudio de citocinas proinflamatorias en respuesta a LPS, se seleccionaron 2 marcadores de inflamación (de alta y baja expresión) y se analizaron 2 tiempos (6 y 24 h) acorde a lo reportado en la literatura (Tang et al., 2018; Yuan et al., 2019). La figura 1 muestra el efecto a 6 y 24 h después de la inyección intravitreal de LPS en el día P1 sobre la expresión de IL6 y LITAF (marcador de la acción de $TNF\alpha$ y LPS). En la figura 1A se puede observar un aumento significativo ($P < 0.01$) de la expresión del ARNm de IL6 a las 6 h después del tratamiento. De manera similar, en la figura 1B se puede ver un aumento significativo ($P < 0.0001$) de LITAF (gen responsivo a TNF inducido por LPS) con respecto a su control a las 6 h después del daño. Se encontró que a 6 h post tratamiento los cambios en la expresión de estas citocinas proinflamatorias en la retina de pollos neonatos administrados con LPS tienen su nivel máximo.

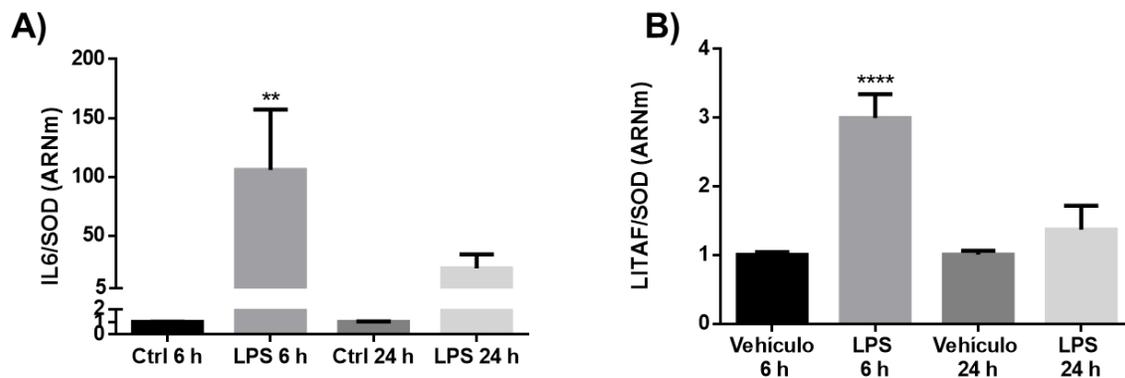


Figura 1. Efecto inflamatorio de la administración de LPS intravitreal a las 6 y 24 h. Expresión de **A:** IL6 y **B:** LITAF, con respecto a SOD en retinas de pollo tratadas con LPS (10 μ g) mediante una inyección intravitreal. Ctrl: control. Unidades en horas (h) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, $n=3$ animales, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.2 Efecto de la GH en la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, LITAF, IL8, iNOS e IFN γ durante la inflamación retiniana inducida por LPS

En la figura 2, se muestra el efecto de la GH en retinas de pollo tratadas con LPS de manera intravitreal sobre la expresión de ARNm de IL1 β , IL6, LITAF, IL8, iNOS e IFN γ . Se puede observar en las figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F un aumento significativo ($P < 0.001$) en la expresión de todos nuestros marcadores proinflamatorios (IL1 β , IL6, LITAF, IL8, iNOS e IFN γ) en el grupo tratado con LPS con respecto a las retinas intactas (INT). Las figuras 2B y 2C muestran un aumento significativo ($P < 0.001$) en el grupo tratado con LPS+GH, sin embargo, el grupo tratado con GH solo muestra un aumento significativo ($P < 0.001$) en la expresión de LITAF. La GH fue capaz de disminuir significativamente la expresión de IL1 β ($P < 0.001$), IL6 ($P < 0.001$), IL8 ($P < 0.05$), iNOS ($P < 0.01$) e IFN γ ($P < 0.01$) (Fig. 2A, 2B, 2D, 2E y 2F) inducida por LPS. La expresión de LITAF no tuvo cambios cuando se administró la combinación de GH con LPS. Se incluyeron un control intacto y un control inyectado con vehículo, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

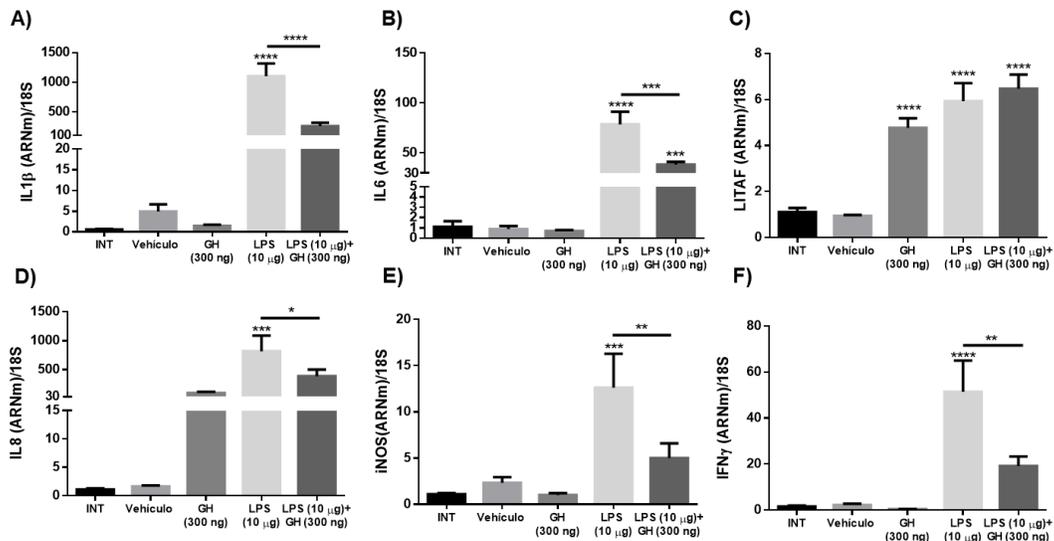


Figura 2. Efecto de la GH sobre la expresión de factores inflamatorios en retinas tratadas con LPS. Expresión de **A:** IL1 β , **B:** IL6, **C:** LITAF, **D:** IL8, **E:** iNOS y **F:** IFN γ , con respecto a 18S en retinas de pollo tratadas con GH y LPS mediante una inyección intravitreal. INT: control intacto; Vehículo: control con solución salina. Unidades en microgramos (μg) y nanogramos (ng) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, $n=6$ animales, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.3 Efecto de la GH ante un daño con LPS en la expresión del ARNm de GHR y TLR4 en retina de pollo

En la figura 3 se muestra la proporción relativa de la expresión del ARNm del receptor de GH (GHR) y de TLR4 en la retina de pollo tratada con GH, LPS y LPS+GH. Se incluyeron un control intacto (INT) y un control inyectado con vehículo (C), los controles no presentaron diferencias significativas entre sí. La figura 3A muestra una disminución significativa de TLR4 ($P < 0.01$) en el grupo tratado con LPS con respecto al control, dado que el LPS activa TLR4, se sugiere una retroalimentación negativa inducida por el ligando. En la figura 3B no se observa ninguna diferencia significativa de la expresión del GHR, solo se puede ver una tendencia a disminuir en el grupo tratado con GH sin llegar a ser diferente.

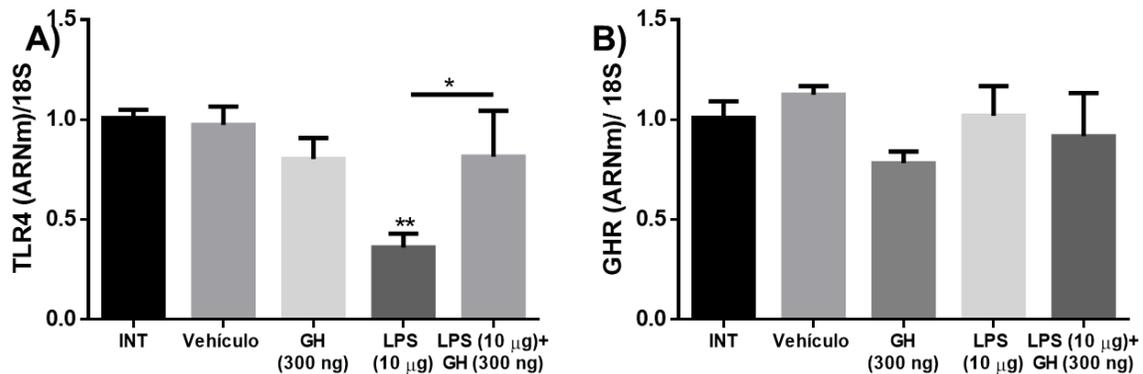


Figura 3. Efecto de la GH sobre la expresión de TLR4 y GHR en retinas tratadas con LPS. Expresión de **A:** GH-R y **B:** TLR4, con respecto a 18S en retinas tratadas con GH y LPS. INT: control intacto; Vehículo: control con solución salina. Unidades en microgramos (μg), nanogramos (ng) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, $n=6$ animales, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Prueba ANOVA. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.4 Efecto del LPS y la GH en la fosforilación de la proteína p65 de la vía NF- κ B en la línea celular SIM-A9

En la retina se encuentran una gran diversidad de tipos celulares, entre los cuales está la microglía. La microglía es el mayor regulador de la inflamación, debido a esto se propuso utilizar una línea celular para analizar el efecto de la GH específicamente sobre estas células. Lo primero que se evaluó en estas células es la presencia de la expresión del receptor de la GH mediante un PCR semi cuantitativo (Fig. 9; anexos), para después continuar con el análisis del efecto de la GH sobre esta línea celular.

En la figura 4 se evaluó la activación de la vía de señalización de NF- κ B por medio de la semicuantificación de la inmunoreactividad de la proteína fosforilada p65 corregida por actina mediante Western blot en extractos de la línea celular SIM-A9. Se aplicaron tratamientos con LPS (10 μ g/ml) y se analizó el efecto sobre la inmunoreactividad de la proteína fosforilada p65 a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min) y en la figura 4A se observó una mayor inmunoreactividad a los 30 min. Se utilizó como control de carga actina y los valores fueron corregidos contra su respectivo control en cada tiempo.

Después se analizó la inmunoreactividad a fosfo-p65 (activación de la vía de señalización de NF- κ B) en células tratadas con GH+LPS a 30 min (Fig. 4B), en la figura 4C se observó un aumento significativo de la activación de la vía con el tratamiento de LPS ($P < 0.001$), y con el tratamiento de GH+LPS ($P < 0.05$). Cabe destacar que se observó una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre el grupo tratado con LPS y el tratado con LPS+GH, lo cual muestra que el tratamiento con la hormona es capaz de reducir la inmunoreactividad a fosfo-p65 y por ende la activación de la vía de señalización de NF- κ B.

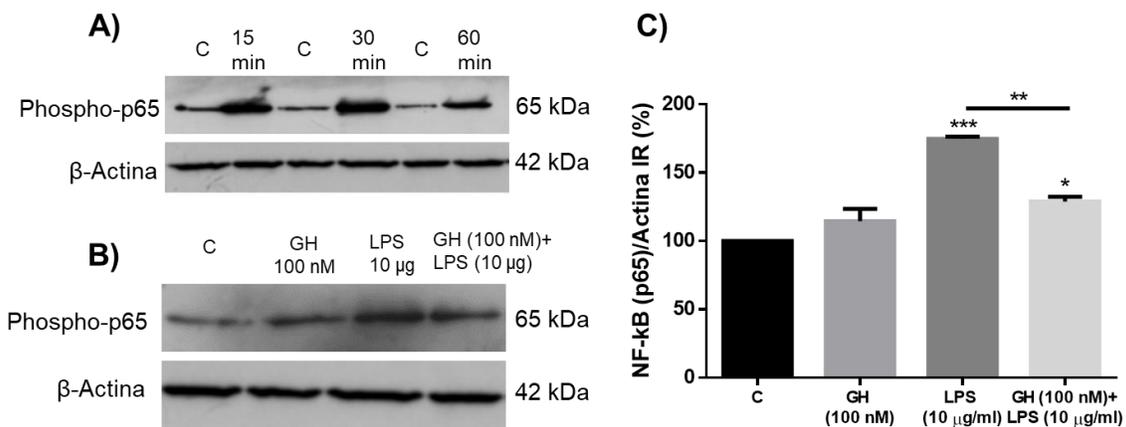


Figura 4. Efecto de la GH sobre la fosforilación de p65 en células SIM-A9 tratadas con LPS. **A** Luminograma representativo de las bandas inmunoreactivas de fosfo-p65 (65 kDa) y actina (42 kDa) en de la proteína obtenida de células SIM-A9 tratadas con LPS a 15, 30 y 60 min, **B**: Luminograma representativo de las bandas inmunoreactivas de fosfo-p65 y actina de la proteína obtenida de células SIM-A9 tratadas con LPS y GH a 30 min, **C**: Densitometría de las bandas inmunoreactivas de fosfo-p65. Actina se usó como control de carga. C: control. Unidades en microgramos (μ g), nanomolar (nM), mililitros (ml) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, n=3 experimentos independientes (18 pozos por grupo experimental), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.5 Curva dosis-respuesta de la administración de LPS sobre la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , TGF β , iNOS e IL10 en la línea celular SIM-A9

En la figura 5 se muestran los cambios en la expresión de citocinas (IL1 β , IL6, TNF α , TGF β , iNOS e IL10) en células SIM-A9 tratadas con LPS (1, 10 y 100 ng/ml). En la figura 5A el LPS produjo un aumento significativo ($P < 0.001$) en los niveles del ARNm de IL1 β con las 3 dosis de LPS (1, 10 y 100 ng/ml); los máximos niveles de expresión se obtuvieron con LPS a 10 ng/ml y fueron de 1500 veces con respecto al control. En la figura 5B se observó un aumento significativo ($P < 0.001$) en los niveles de ARNm de IL6 en las células tratadas con LPS en las 3 concentraciones (1, 10, 100 ng/ml); siendo 10 ng/ml el más alto con respecto al control. En la figura 5C se observa un aumento significativo ($P < 0.001$) en la expresión de TNF α en los tres tratamientos con LPS (1, 10, 100 ng/ml) siendo mayor la diferencia de la concentración de 1 ng/ml con respecto al control. En la figura 5D no se observan diferencias significativas de TGF β en ninguno de los tratamientos con LPS en relación con las células no tratadas. En la figura 5E se muestra un aumento significativo ($P < 0.01$) de la expresión de iNOS en las células tratadas con LPS (1 ng/ml) ($P < 0.01$) y LPS (100 ng/ml) ($P < 0.01$), siendo más significativo el de la concentración de LPS (10 ng/ml) ($P < 0.001$). Mientras que en la figura 5F se observa aumento significativo de la expresión de IL10 en el grupo tratados con LPS (1 ng/ml) ($P < 0.05$) comparado con el control, sin embargo, es mayor el grupo tratado con LPS (10 ng/ml) ($P < 0.001$).

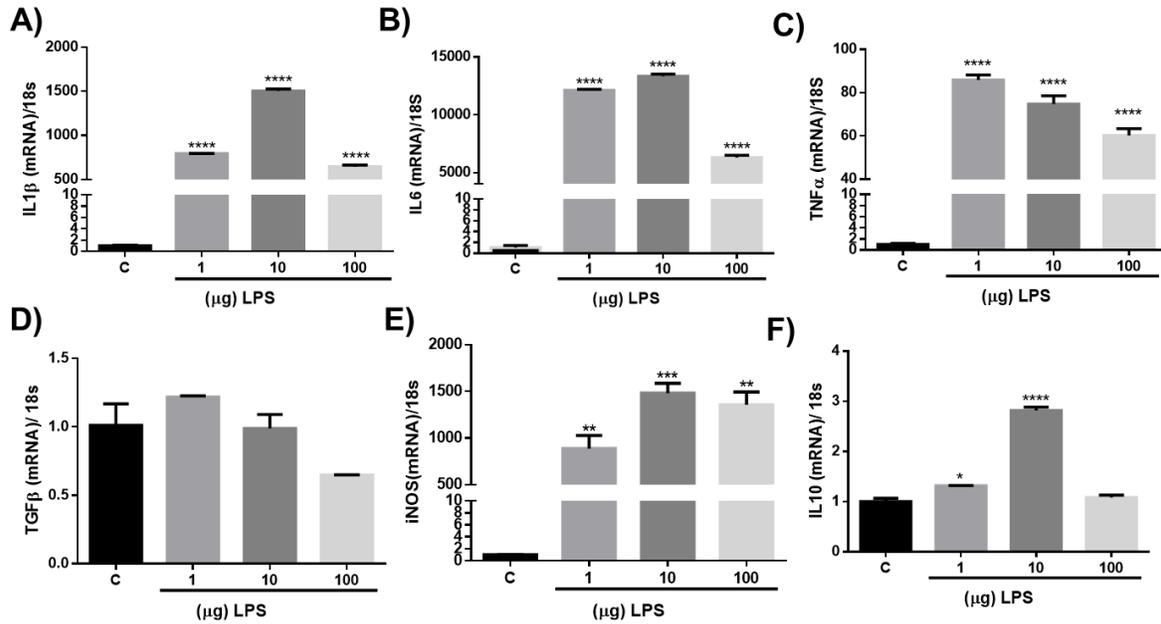


Figura 5. Efecto del LPS sobre la expresión de mediadores inflamatorios en células SIM-A9. Se determinó por qPCR cambios en los niveles de **A:** IL1 β , **B:** IL6, **C:** TNF α , **D:** TGF β , **E:** iNOS y **F:**IL10, con respecto a 18S en células microgliales de la línea celular SIM-A9. Unidades en microgramos (μ g) y fold (expresión relativa del ARNm). C: control. Cada barra representa la media \pm error estándar, n=4 experimentos independientes (24 pozos por grupo experimental; 96 pozos totales), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.001. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.6 Curva dosis-respuesta del efecto de GH sobre la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , TGF β , iNOS e IL10 en la línea celular SIM-A9

En la figura 6 se muestra el efecto de diferentes dosis de GH (10 y 100 nM) sobre la expresión de ARNm de citocinas pro- y antiinflamatorias en línea celular SIM-A9. En las figuras 6A y 6C se muestran aumentos significativos en la expresión de IL1 β y TNF α , respectivamente, en las concentraciones de GH de 10 nM y 100 nM ($P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente) en comparación con el control. En las figuras 7B, 7D y 7E se muestran aumentos significativos de IL6 ($P < 0.01$), iNOS ($P < 0.001$) y TGF β ($P < 0.01$) respectivamente, con el tratamiento de GH a 100 nM en comparación con las células no tratadas. El efecto de la GH sobre la expresión de las citocinas analizadas se observó principalmente en la concentración de 100 nM de GH con un tiempo de incubación de 6 h.

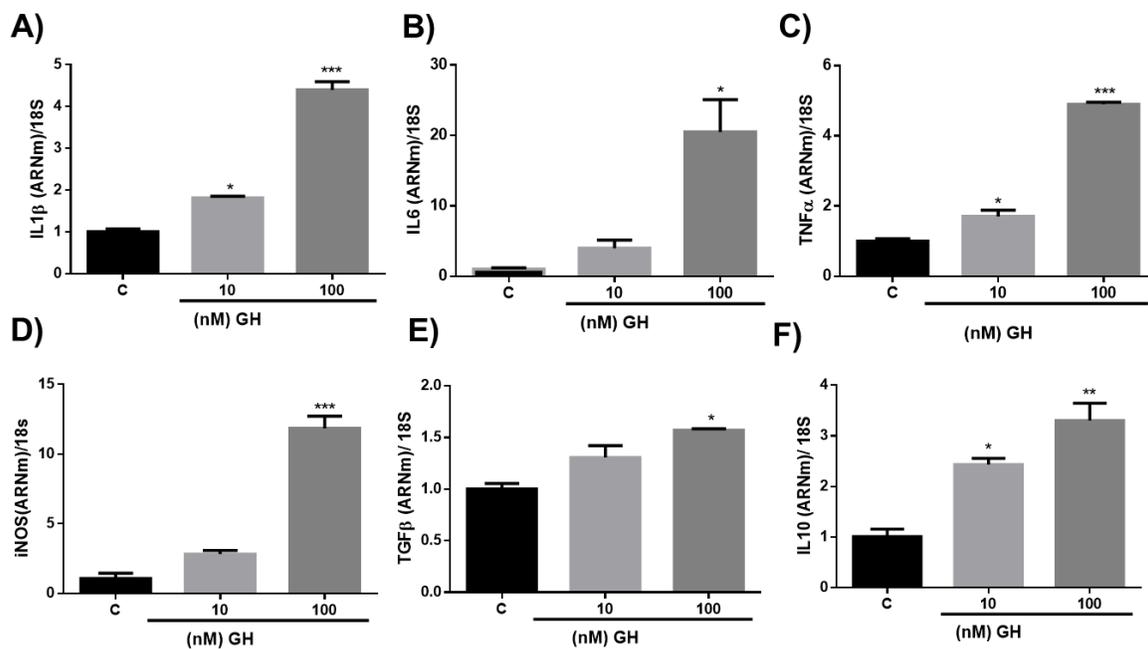


Figura 6. Efecto de la incubación con GH (6 h) sobre la expresión de mediadores inflamatorios en la línea celular SIM-A9. Se cuantificaron cambios relativos en la expresión del ARNm de **A:** IL1 β , **B:** IL6, **C:** TNF α , **D:** TGF β , **E:** iNOS y **F:** IL10, por qPCR. Se usó el 18S como gen de referencia. Unidades en nanomolar (nM) y fold (expresión relativa de ARNm). C: control. Cada barra representa la media \pm error estándar, $n=4$ experimentos independientes (24 pozos por grupo experimental; 72 pozos totales), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.001$. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.7 Efecto de la GH y el LPS en la expresión de ARNm de IL1 β , IL6, TNF α e iNOS en la línea celular SIM-A9

En la figura 7 se muestra el efecto de la GH sobre la expresión de ARNm de IL1 β , IL6, TNF α , e iNOS durante un tratamiento con LPS en la línea celular SIM-A9. En la figura 7A se muestra la expresión de IL1 β , en donde se puede observar un aumento significativo ($P < 0.001$) en los grupos tratados con LPS 10 ng/ml, GH (10 nM) + LPS (10 ng/ml) y GH (100 nM) + LPS (10 ng/ml), en la cual la GH no disminuye la expresión inducida por LPS. En la figura 7B se muestra la expresión de IL6, donde el grupo tratado con LPS 10 ng/ml no muestra un aumento significativo con respecto al control, sin embargo, el grupo tratado con GH (100 nM) + LPS (10 ng/ml) ($P < 0.001$) tiene un aumento significativo con respecto al control y también al compararlo con el grupo tratado solo con LPS (10 ng/ml). En la figura 7C se muestran los cambios en la expresión de TNF α , donde se observa un aumento significativo ($P < 0.001$) de los grupos LPS (10 ng/ml), GH (10 nM) + LPS (10 ng/ml), y GH (100 nM) + LPS (10 ng/ml) al compararlos con el control, sin embargo la GH (100 nM) disminuyó los niveles de expresión de TNF α cuando se co-administró con LPS (10 ng/ml) ($P < 0.01$) en comparación con el grupo que recibió únicamente LPS. En la figura 7D se observa un aumento significativo de la expresión de iNOS con respecto al control ($P < 0.01$) en las células tratadas con GH a 100 nM + LPS (10 ng/ml). Además, al compararse con el grupo con LPS (10 ng/ml) se determinó un aumento significativo ($P < 0.05$), al analizar los datos por ANOVA no encontramos diferencias entre el grupo experimental tratado únicamente con LPS con respecto al control.

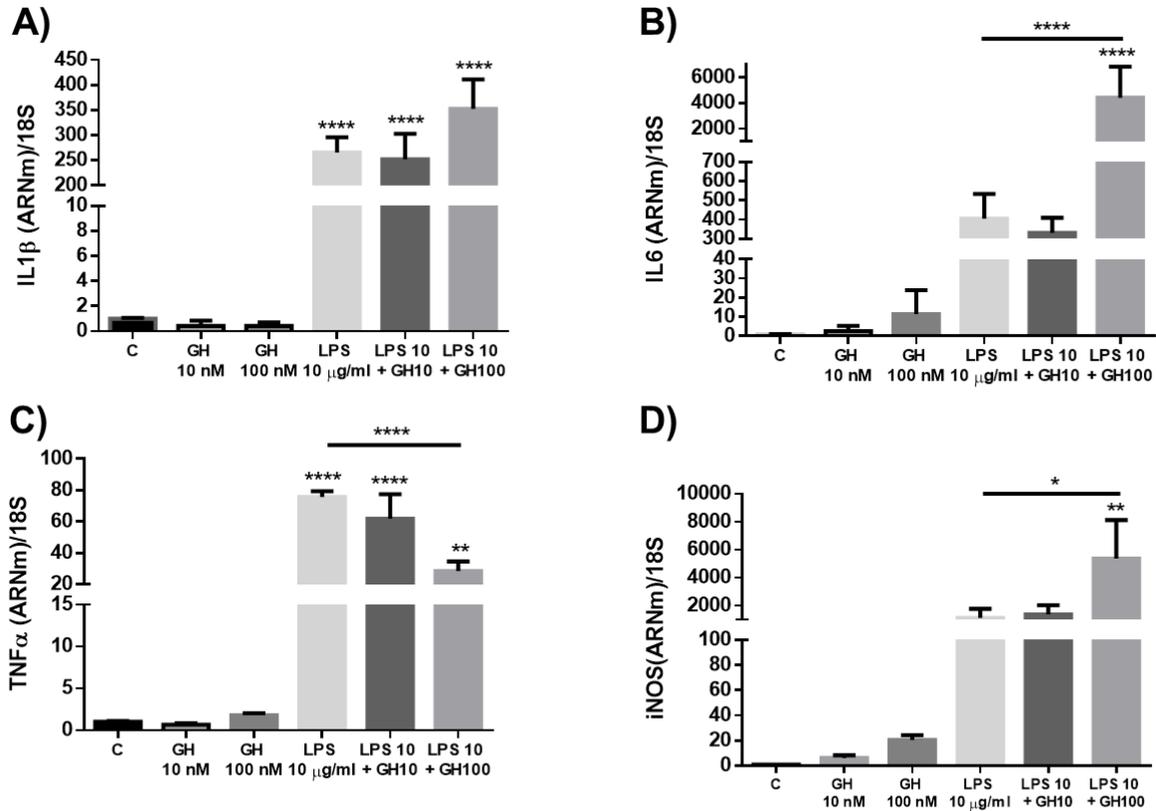


Figura 7. Efecto de la GH sobre la expresión de factores proinflamatorios clásicos en células SIM-A9 tratadas con LPS. Se cuantificaron los cambios en el ARNm de **A:** IL1 β , **B:** IL6, **C:** TNF α , **D:** iNOS por qPCR. La amplificación de ARN ribosomal (18S) se usó como referencia. Incubación de 6h y el control (C) no recibió tratamiento. Unidades en microgramos (μ g), nanomolar (nM), mililitros (ml) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, n=3 experimentos independientes (18 pozos por grupo experimental; 108 pozos totales), *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.001. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

8.8 Efecto de la GH y el LPS en la expresión de ARNm de TGFβ e IL10 en la línea celular SIM-A9

En la Figura 8 se muestra el efecto de la GH y el LPS en la expresión de las citocinas antiinflamatorias TGFβ e IL10. En la Figura 8A se observa un aumento significativo ($P < 0.05$) en la expresión de TGFβ cuando se coadministró el LPS (1 ng/ml) + GH (100 nM) con respecto a las células no tratadas. En la figura 8B se observa un aumento significativo ($P < 0.01$) de IL10 en ambos grupos donde se coadministró la GH con ambas dosis de LPS (1 y 10 ng/ml) con respecto al control.

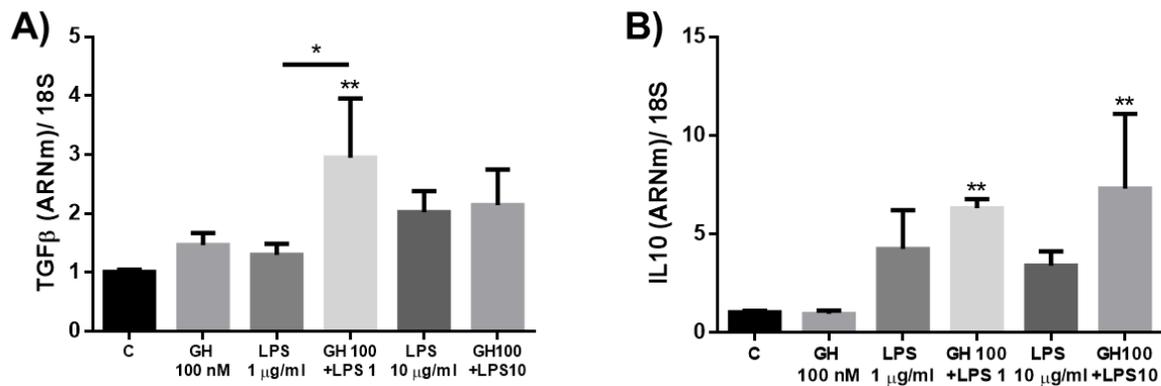


Figura 8. Efecto de la GH sobre la expresión de factores los antiinflamatorios TGFβ e IL10 en células SIM-A9 tratadas con LPS. La expresión del ARNm de **A:** TGFβ y **B:** IL10 se determinó por qPCR. La expresión de 18S (ARN ribosomal) se usó como referencia. Tratamientos por 6 h; control sin tratamiento (C). Unidades en microgramos (μg) y nanomolar (nM), mililitros (ml) y fold (expresión relativa de ARNm). Cada barra representa la media \pm error estándar, $n=3$ experimentos independientes (18 pozos por grupo experimental; 108 pozos totales), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Determinado por ANOVA con prueba *post hoc* Fischer's LSD.

9. DISCUSIÓN

Se ha reportado que la GH tiene efectos sobre la inflamación, pero estos son controversiales y paradójicos (Szalecki et al., 2018). Dentro de estos se encuentran efectos antiinflamatorios, donde su administración sistémica resulta en la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL1 β , la IL6 y el TNF α en diversos tejidos y tipos celulares como lo son en el estómago, los pulmones y en macrófagos de adipocitos en cultivo (Bozzola et al., 1998; Han et al., 2007; Yi et al., 2009; Kumar et al., 2014). Durante el progreso de infecciones bacterianas la administración de GH incrementa la capacidad protectora de los macrófagos (Edwards et al., 1992). Cabe destacar que, acompañado de estas acciones antiinflamatorias, la GH es capaz de reducir la apoptosis de células en el cerebro (Kireev et al., 2011). Contrariamente, se ha descrito que la GH tiene efectos proinflamatorios, aumentando la expresión de las citocinas proinflamatorias como IL1 β e IL6 en células del timo de ratón (Savino 2003). Así como la GH puede modular la producción de citocinas, igualmente, se ha observado que las citocinas tienen efectos sobre la síntesis y liberación de la GH de la hipófisis. Las citocinas IL1 β e IL6, así como el LPS aumentan la liberación de la GH hipofisiaria en humanos, en modelos ovinos, murinos y de manera *in vitro* en los somatotropos (Tsigos et al., 1997; Corsi et al., 1997; Fry et al., 1998; Daniel et al., 2005). Por el contrario, se ha reportado que la IL1 β y el TNF α disminuyen la liberación de la GH hipofisiaria en ratas y en un modelo *in vitro* de células somatotropas (Walton et al., 1989; Wada et al., 1995). La GH puede llegar a mimetizar las acciones del IFN γ en tejido linfoide y en macrófagos, el IFN γ es un potente activador de macrófagos (Kelley K., 1990; Edwards et al., 1992; Cantell et al., 1996; Khoury et al., 2019). A pesar de las evidencias, los efectos de la GH sobre los procesos inflamatorios en tejido nervioso siguen siendo ampliamente desconocidos y con resultados contradictorios.

Nuestra aproximación experimental incluyó la administración intravitreal de LPS en pollos neonatos como inductor de una respuesta ocular inflamatoria aguda bien localizada y sin efectos significativos en otros tejidos (Simmons et al., 2016). En pollos neonatales, se implementó un protocolo con una dosis de GH 24 h antes

de la administración del LPS para amplificar la producción de factores neurotróficos a partir de estudios previos de nuestro grupo (Fleming et al., 2019), y una siguiente dosis que combinaba LPS y GH con aplicación simultánea por 6 h. Mostramos por primera vez que el LPS intravitreal resulta en una respuesta inflamatoria en las células de la retina de pollo neonato al favorecer el aumento significativo de la expresión del ARNm de citocinas proinflamatorias como IL1 β , IL6, LITAF, IL8, iNOS e IFN γ . Los tratamientos intravitreales con LPS y GH solo lograron disminuir el efecto en la expresión de IL1 β , IL6, IL8, iNOS e IFN γ , pero no en LITAF, el cual es un marcador de TNF α , puesto que hasta la fecha no ha sido descrito en aves, por lo que se usa este marcador como un indicador indirecto de su efecto (Hong et al., 2006; Sundaresan et al., 2007). Es importante destacar que la administración intravitreal de la GH por sí misma generó una tendencia a aumentar la IL8, esta interleucina podría estar asociada con efectos angiogénicos clásicamente atribuidos a la hormona (Bruscolini et al., 2020). De manera similar, la GH aumentó la expresión del ARNm de LITAF, lo que sugiere que promueve la actividad de una proteína homóloga a TNF α en aves (Hong et al., 2006; Bushell et al., 2011). Recientemente reportamos que la GH modula al alza el receptor 2 de TNF α (TNFR2) en condiciones de daño neurotóxico, si bien este receptor es asociado a sobrevivencia y acciones antiapoptóticas, lo que sugiere que la acción del TNF α se encuentra parcialmente condicionada por la expresión de sus receptores en el tejido donde ejerce efectos y no depende totalmente de la concentración de su ligando (Fleming et al., 2019), es importante destacar que la GH no modifica los niveles del receptor TNFR1 (de respuesta proinflamatoria). La punción ocular o daño del cristalino son procesos que desencadenan respuestas inflamatorias locales, afortunadamente no existieron diferencias entre los controles intactos y los controles en los que se administró vehículo, lo que da evidencia que la lesión generada por la inyección no indujo cambios significativos en nuestros genes de estudio. Una enorme ventaja del ojo del pollo es su tamaño y su anatomía que permite un acceso al vítreo sin generar lesiones en otras estructuras. Estos resultados sugieren que la GH administrada intravitrealmente de manera dual es capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias cuando se administra en ojos de pollos neonatos de 1

día. Interesantemente, las inyecciones de GH, LPS y LPS+GH no modificaron los niveles de expresión de GHR. Un dato importante es que la administración de LPS disminuye la expresión del receptor TLR4, lo que sugiere un sistema de retroalimentación negativa (Shi et al., 2019), este sistema se ve inhibido cuando se administra el LPS de manera simultánea con la GH. Es importante destacar que estos receptores TLR4 son elementales para la progresión de una respuesta inflamatoria normal que permita restablecer la función normal del tejido. Sin embargo, es necesario realizar experimentos a diferentes técnicas, tiempos y dosis para entender las acciones de GH sobre el receptor TLR4.

La neuroinflamación es un importante elemento en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, ha sido vinculada en una gran cantidad de procesos patológicos, que van desde alteraciones en la morfología de las células gliales hasta la invasión de tejidos incipientes y la destrucción por leucocitos transmitidos por la sangre (Zhang et al., 2015; Becher et al., 2017). En condiciones patológicas, la respuesta glial, mayormente mediada por astrocitos y microglía, incluye una producción muy elevada de citocinas como IL1 β e IL6 (Callaghan et al., 2008; Becher et al., 2017).

La microglía es el tipo celular más abundante de las células inmunes en el cerebro, donde constantemente modifican el microambiente, producen citocinas y factores de crecimiento que influyen en los astrocitos de los alrededores y las neuronas (Garden et al., 2006; Glass et al., 2010; Perry H., 2016). La respuesta inmune de la retina es similar a la respuesta del cerebro (Langmann, 2007); involucra la activación de células microgliales, esto ocasiona que la microglía libere una serie de mediadores inmunes (Karstetter et al., 2010, 2015; Bauer et al., 2016). Un modelo de inflamación ocular en el que se activa la microglía es la administración de LPS de manera intravitreal donde se genera un efecto local bien delimitado y que no afecta a otros tejidos como cuando se administra sistémicamente (Baldwin et al., 2015; Lopes, 2016). El LPS induce una respuesta inflamatoria aguda similar a la de diversas condiciones oculares patológicas como lo son una endoftalmitis bacteriana y uveítis (Pollreisz et al., 2012). En adición, se conoce que la IL6 y la IL8 son citocinas representativas de la respuesta ocular inflamatoria; la IL6 juega un rol

crítico en enfermedades inflamatorias intraoculares como la AMD, RP y glaucoma, mientras que la IL8 es un mediador de la infiltración de neutrófilos y monocitos en las retinopatías inflamatorias como el glaucoma y la AMD (Murray et al., 1990; Meleth et al., 2005; Ghasemi et al., 2011).

Con la intención de determinar el papel específico de la microglía en la respuesta antiinflamatoria observada en el ojo del pollo neonato incluimos el uso de la línea celular SIM-A9 de microglía de ratón como un modelo experimental, la cual es una línea celular de microglía inmortalizada espontáneamente a partir de un cultivo primario de cortezas cerebrales murinas postnatales (Dave et al., 2020). Esta línea celular es un sistema *in vitro*, que permite el control de variables, tanto estimuladoras como inhibitoras de la microglía. Este modelo mantiene características típicas de la microglía y responden a estímulos inflamatorios (en respuesta al LPS) de manera similar que los cultivos primarios de microglía (Nagamoto-Combs et al., 2014).

La línea celular SIM-A9 respondió aumentando de manera drástica la expresión del ARNm de IL1 β , IL6, TNF α e iNOS al administrarse localmente el LPS. Este efecto estimulador del LPS fue inhibido por la GH, dado que se disminuyó la expresión del ARNm del TNF α . Interesantemente, la GH aumentó el efecto del LPS sobre la expresión de IL6 e iNOS. Existen reportes de que la IL6 es capaz de tener efectos neuroprotectores en la retina ante un daño neurotóxico (Sánchez et al., 2003; Chong et al., 2008; Leibinger et al., 2013). Contrario a lo esperado, la combinación del LPS con la GH aumentó la producción de iNOS en comparación con solo LPS, lo anterior en discordancia con la mayoría de los reportes donde la producción de NO por iNOS es promotor de daño y/o inflamación (Karpuzoglu et al., 2006; Hwang et al., 2017; Wu et al., 2019). Es importante destacar que altos niveles de NO resultan en la regulación negativa de IFN γ , esta propiedad del NO puede ser un mecanismo de homeostasis en la prevención de la generación de altos niveles de citocinas proinflamatorias y del fenotipo microglial M1 (Karpuzoglu et al., 2006). Se requiere ahondar en el estudio de los efectos de la GH sobre iNOS en modelos tratados con LPS dada la compleja función de la comunicación por NO y los diferentes tipos de NOS. Por otro lado, se observó que la GH es capaz de aumentar

la expresión de la IL10 y del TGF β cuando se combina con el LPS, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio.

Está reportado que la administración de prolactina en células de la placenta reduce la producción de citocinas proinflamatorias e inhibe la activación de la vía de NF- κ B inducida por LPS (Olmos-Ortiz et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha los mecanismos moleculares y las interacciones entre las vías de señalización activadas tanto por PRL como por GH son desconocidas. En macrófagos obtenidos de tejido adiposo, la GH reduce la inmunoreactividad de la proteína fosforilada p65, lo que indica un decremento en la activación y la translocación del factor transcripcional NF- κ B al núcleo (Lu et al., 2010; Kumar et al., 2014). Además, esta reducción tuvo una correlación con una reducción en la producción de IL6 y TNF α (Kumar et al., 2014). En la línea celular SIM-A9 la administración del LPS aumentó la inmunoreactividad de fosfo-p65 desde los 15 min hasta los 60 min, con un pico máximo a los 30 min. Durante el desarrollo de esta tesis, nos enfrentamos a imprevistos como las limitaciones de trabajo derivadas de la contingencia generada por el SARS-COV2. Sin embargo, nuestros resultados previos relativos a otras vías de transducción de señales mostraron una temporalidad de activación similar (Alba-Betancourt et al., 2013; Luna-Acosta et al., 2015; Fleming et al., 2019). De lo anterior, la máxima inmunoreactividad de anti-p65 a los 30 min es similar a las temporalidades de activación observadas en vías canónicas y alternativas estimuladas por GH. Los tratamientos con GH simultáneos con LPS mostraron un decremento significativo en la inmunoreactividad de fosfo-p65 a los 30 min de incubación, lo que claramente sugiere que la GH tiene la capacidad de reducir la activación de la vía NF- κ B, sin embargo, es importante destacar que esta reducción se da de manera moderada.

Paralelamente, logramos observar que los tratamientos con GH en esta línea celular fueron capaces de inducir la producción de todas las citocinas estudiadas, sin embargo, las magnitudes de respuesta en la expresión del ARNm de estas moléculas fueron de una magnitud drásticamente menores a las inducidas al incubar las células con LPS. Esto sugiere, que las citocinas proinflamatorias podrían tener un efecto dependiente de la concentración, donde a concentraciones bajas inducen

un efecto neurotrófico (Leibinger et al., 2013; Fischer et al., 2015) pero a concentraciones altas se podrían relacionar con la respuesta inflamatoria.

En esta respuesta inflamatoria se involucran las células microgliales, las cuales tienen un papel muy importante en la iniciación y regulación de la respuesta neuroinflamatoria tanto fisiológica como fisiopatológica (Madeira et al., 2015).

El glaucoma es una neuropatía que normalmente involucra un incremento en la presión intraocular (IOP) inducida por la alteración del drenaje del humor acuoso, lo que daña los axones que forman al nervio óptico generando apoptosis de las células ganglionares de la retina (RGCs) y de células en los colículos y el cuerpo geniculado lateral (Quingley 2011; Mac-Nair et al., 2015; Conlon et al., 2017). Hasta la fecha, todas las estrategias terapéuticas para el tratamiento del glaucoma van orientadas hacia el control de la IOP, sin embargo, la activación de mecanismos moleculares donde participan citocinas y factores de crecimiento juegan un papel importante en la progresión de daño a la retina y al nervio óptico (Agarwal et al., 2012; Mantravadi et al., 2015; Wang et al., 2018). De lo anterior, nace la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas que permitan controlar la progresión de la neurodegeneración desencadenada por el daño mecánico del nervio óptico (Weber, 2013).

En tiempos recientes, se ha hecho énfasis en el desarrollo de estrategias protectoras y regeneradoras del SNC y periférico que involucran la administración de factores de crecimiento, péptidos y de hormonas (como es el caso de la GH) (Fischer et al., 2004; Leibinger et al., 2013; Devesa et al., 2014; Martínez-Moreno et al., 2016, 2018b, 2019). Dichas terapias con factores neuroprotectores son estudiadas intensamente por su potencial como profilácticos en pacientes que presentan condiciones de riesgo para el desarrollo del glaucoma y otras retinopatías degenerativas (Quingley, 2011; Conlon et al., 2017).

Particularmente en la retina, la GH presenta un fuerte efecto neuroprotector en etapas embrionarias, así como acciones neuroregeneradoras en neuritas de RGCs *in vitro* (Sanders et al., 2006, 2008; Baudet et al., 2009). Recientemente, nuestro grupo de trabajo describió que estas acciones antiapoptóticas, regeneradoras y promotoras de la sobrevivencia no quedan limitadas a etapas

embrionarias, ya que estos efectos han sido observados en pollos neonatos a los cuales se les administró GH de manera crónica (Martínez-Moreno et al., 2018b, 2019; Fleming et al., 2019).

Durante el desarrollo del glaucoma en la retina, la desconexión de las RGCs de sus relevos neurales involucra excitotoxicidad, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación (Quingley 2011; Soto et al., 2014; Williams et al., 2017; Akopian et al., 2019). Estos procesos facultan la progresión del daño neural a otras capas de la retina (Agarwal et al., 2012; Opere et al., 2018). La disfunción de las RGCs induce importantes alteraciones en las células gliales de Müller y en la microglía, lo cual detona la producción de citocinas pro- y antiinflamatorias, las cuales, si se producen de manera exacerbada podrían amplificar el proceso neurodegenerativo, aunque también se ha demostrado que en etapas y en concentraciones específicas son capaces de participar limitando el daño (Tong et al., 2017; Williams et al., 2017; Wei et al., 2019).

El sistema inmune juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis de todos los tejidos y de la respuesta inmune ante una infección o una lesión, incluido en el sistema nervioso (Glass et al., 2010). La inflamación es una respuesta natural como defensa ante un estímulo que tenga como resultado un tejido dañado, causado por un daño físico, lesiones isquémicas, infección, exposición a toxinas o por otro tipo de lesiones como traumas mecánicos (Kuprash et al., 2016; Singh et al., 2019). La inflamación induce la activación de mecanismos celulares y respuestas inmunitarias que resultan en la reparación del tejido dañado y en la proliferación celular en el sitio del tejido lesionado, involucrando la producción de factores inflamatorios como las citocinas, así como la actividad de monocitos, neutrófilos y macrófagos (Callaghan et al., 2008; Glass et al., 2010; Singh et al., 2019). Sin embargo, la inflamación del sistema nervioso es mucho más compleja y diversa. Recientemente este concepto de “inflamación” en tejido neural o neuroinflamación ha incluido la participación de la microglía y la astrogliá, no solo en la retina sino en todo el SNC, dando lugar a lo que se conoce como respuesta neuroinflamatoria mediada por células gliales y la cual puede ser independiente a la infiltración de otras células inmunes (Callaghan et al., 2008).

La diferencia de especies en los modelos utilizados en este trabajo es una limitante importante para la interpretación de los resultados. La implementación de la línea celular SIM-A9 de ratón responde a las limitaciones técnicas para estudiar la fisiología de la microglía en aves, ya que existe una divergencia importante en las secuencias de citocinas e interleucinas, así como la ausencia de marcadores microgliales, como Iba-1 o de TNF α , que está ausente en estos vertebrados (no fue encontrado en el banco de genes del NIH a través de comparaciones proteicas y nucleotídicas). Independientemente de las diferencias de las especies, se obtuvieron resultados que claramente relacionan a la GH con la respuesta inmune en la retina. Es crítico considerar que no solo la microglía participa en la inflamación de la retina ya que existe una red de comunicación intercelular donde diferentes tipos celulares, como los astrocitos, las células de Müller y la astrogliá, pueden producir interleucinas, citocinas, factores de crecimiento y otras proteínas que modulan la neuroinflamación en la retina (Kumar et al., 2012; Sierra et al., 2014; Mac-Nair et al., 2015).

Este trabajo demuestra que en el modelo de inflamación inducida por LPS administrado localmente, la GH puede producir cambios importantes en la expresión de interleucinas, citocinas y factores de crecimiento en la retina del pollo neonato y además la hormona tiene efectos en línea celular de microglía en donde modifica la activación de la vía de señalización de NF κ B, así como la producción de moduladores inflamatorios.

10. Conclusiones

10.1 Conclusiones particulares

- El LPS incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias tanto en retina como en la línea celular SIM-A9.
- En retinas de pollos neonatos, la coadministración intravitreal de LPS+GH decrementa la expresión de IL1 β , IL6, IL8, IFN γ e iNOS.
- La GH previene el incremento de la activación de la vía de señalización NF- κ B en la línea celular SIM-A9 causado por LPS.
- En la línea celular SIM-A9, la coadministración de LPS+GH reduce la expresión de TNF α , y aumenta la expresión de IL6 e iNOS.

10.2 Conclusión General

La GH reduce la expresión de citocinas proinflamatorias en el ojo del pollo neonato lo que sugiere acciones antiinflamatorias. En tanto en la línea celular microglial SIM-A9 se demostró la presencia del receptor GHR y un efecto inhibitorio de la activación de la vía NF- κ B. Los resultados obtenidos sobre el efecto de GH en la expresión de algunas citocinas en las células SIM-A9 tratadas con LPS demostraron la bioactividad de la hormona, pero no tuvieron el patrón observado en el ojo del pollo. Para tener una visión integrativa y comparativa es necesario continuar el estudio de las acciones de la GH en la microglía de la retina, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes especies y modelos experimentales.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alba-Betancourt C., Luna-Acosta J. L., Ramírez-Martínez C. E., Ávila-González D., Granados-Avalos E., Carranza M., Martínez-Coria H., Arámburo C., Luna M. Neuroprotective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *General and Comparative Endocrinology*. **2013**. 183: 17-31.
2. Agarwal R., Agarwal P. Glaucomatous neurodegeneration: an eye on tumor necrosis factor-alpha. *Indian Journal of Ophthalmology*. **2012**. 60 (4): 255-61.
3. Ahumada-Solórzano S.M., Carranza M. E., Pedernera E., Rodriguez-Mendez A. J., Luna M., Arámburo C. Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: Effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology*. **2012**. 175: 297-310.
4. Akopian A., Kumar S., Ramakrishnan H., Viswanathan S., Bloomfield S. A. Amacrine cells coupled to ganglion cells via gap junctions are highly vulnerable in glaucomatous mouse retinas. *The journal of comparative neurology*. **2019**. 527 (1): 159-173.
5. Arámburo C., Montiel J. L., Perera G., Navarrete S., Sanchez R. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bioactivities of cGH charge variants. *General and Comparative Endocrinology*. **1990**. 80: 59-67.
6. Arámburo C., Alba-Betancourt C., Luna M., Harvey S. Expression and function of growth hormone in the nervous system: A brief review. *General and Comparative Endocrinology*. **2014**. 203: 35-42.
7. Ávila-Mendoza J., Mora J., Carranza M., Luna M., Arámburo C. Growth hormone reverses excitotoxic damage induced by kainic acid in the green iguana neuroretina. *General and Comparative Endocrinology*. **2016**. 234: 57-67.
8. Balderas-Márquez, J.E., Efectos neurotróficos de la hormona de crecimiento (GH) en la retina de pollo. Tesis de licenciatura (nanotecnología). **2018**. Instituto Tecnológico Superior de Poza Rica, Tecnológico Nacional de México.
9. Baldwin K. T., Carbajal K. S., Segal B. M., Giger R. J. Neuroinflammation triggered by B-glucan/dectin-1 signaling enables CNS axon regeneration. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. **2015**. 112 (8): 2581-6.
10. Baudet M. L., Rattray D., Martin B. T., Harvey S. Growth hormone promote axon growth in the developing nervous system. *Endocrinology*. **2009**. 150: 2758-2766.

11. Bauer P.M., Castro Z. M., Abshill H., Deierborg T., Johansson F., Englund-Johansson U. Inflamed in vitro retina: cytotoxic neuroinflammation and galectin-3 expression. *PLoS One*. **2016**. 11 (9): e0161723.
12. Becher B., Spath S., Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*. **2017**. 17 (1): 49-59.
13. Berge J. C., Fazil Z., Born I. V., Wolfs R. C., Schreurs M. W., Dik W. A., Rothova A. Intraocular cytokine profile and autoimmune reactions in retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma and cataract. *Acta Ophthalmologica*. **2019**. 97 (2): 185-192.
14. Bianchi V. E., Locatelli V., Rizzi L. Neurotrophic and neurodegenerative effects of GH/IGF1. *International journal of molecular science*. **2017**. 18 (11): 2441.
15. Bilusic M., Heery C. R., Collins J. M., Donahue R. N., Palena C., Madan R. A., Karzai F., Marté J. L., Strauss J., Gatti-Mays M. E., Schlom J., Gulley J. L. Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *Journal for Immunotherapy Cancer*. **2019**. 7 (1): 240.
16. Bozzola M., De Amici M., Zecca M., Schimpff R. M., Rapaport R. Modulating effect of human growth hormone on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *European Journal of Endocrinology*. **1998**. 138 (6): 640-3.
17. Bradford M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein- Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **1976**. 72: 248-254.
18. Bruscolini A., Lambiase A., Segatto M., La Cava M., Nebbioso M., Sacchetti M. Evaluation of IL8 pathway on the ocular surface: new insights in patients with ocular mucous membrane pemphigoid. *Acta Ophthalmologica*. **2020**. 98 (2): e173-e177.
19. Bushell K. N., Leeman S. E., Gillespie E., Gower A. C., Reed K. L., Stucchi A. F., Becker J. M., Amar S. LITAF mediation of increased TNF-a secretion from inflamed colonic lamina propria macrophages. *PLoS One*. **2011**. 6 (9): e25849
20. Cantell K., Pirhonen J. IFN-gamma enhances production of IFN-alpha in human macrophages but not in monocytes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. **1996**. 16 (6): 461-3.

21. Catorce M. N., Gevorkian G. LPS-induced murine neuroinflammation model: Main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Current Neuropharmacology*. **2016**. 14 (2): 155-64.
22. Chen L., Sun D. Z., Fu Y. G., Yang P. Z., Lv H. Q., Gao Y., Zhang X. Y. Upregulation of microRNA-141 contributes to suppressing epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis laryngeal cancer through HOXC6-dependent TGF β signaling pathway. *Cell Signaling*. **2020**. 66: 109444.
23. Chen W. T., Chen T., Cheng C. S., Huang W. Y., Wang X., Yin H. S. Circular permutation of chicken interleukin-1 beta enhances its thermostability. *Chemical Communication (Cambridge)*. **2014**. 50 (32): 4248-50.
24. Chen X., Xiu M., Xing J., Yu S., Min D., Guo F. Lanthanum chloride inhibits LPS mediated expressions of Pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in HUVECs: involvement of NF-kB-Jmjd3 signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2017**. 42 (5): 1713-1724.
25. Cheng S. C., Huang W. C., Pang J. H., Wu Y. H., Cheng C. Y. Quercetin inhibits the production of IL1B induces inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NFkB signaling Pathways. *International journal of molecular science*. **2019**. 20 (12): 2957.
26. Chia, D. J. Minireview: Mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Molecular Endocrinology*. **2014**. 28: 1012-1025.
27. Chong D. Y., Boehlke C. S., Zheng Q. D., Zhang L., Han Y., Zacks D. N. Interleukin-6 as a photoreceptor neuroprotectant in an experimental model of retinal detachment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **2008**. 49 (7): 3193-200.
28. Clark D. A., Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **1998**. 30 (3): 293-8.
29. Conlon R., Saheb H., Ahmed I. I. Glaucoma treatment trends: a review. *Canadian Journal of Ophthalmology*. **2017**. 52 (1): 114-124.
30. Conlon K. C., Miljkovic M. D., Waldmann T. A. Cytokines in the treatment of cancer. *Journal of interferon & cytokine research*. **2019**. 39 (1): 6-21.

31. Corsi M. M., Fulgenzi A., Gaja G., Falchi M., Bertelli A. A., Boctelli A. A., Ferrero M. E. Effect of acute and chronic inflammation on plasma growth hormone levels in rats. *Drugs under experimental and clinical research*. **1997**. 23 (3-4): 177-22.
32. Costa G. N., Vindeirinho J., Cavadas C., Ambrósio A. F., Santos P. F. Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose. *Molecular and Cellular Neuroscience*. **2012**. 50 (1): 113-23.
33. Cuatrecasas G., Kumru H., Coves M., Vidal J. GH deficiency in patients with spinal cord injury: efficacy/safety of GH replacement, a pilot study. *Endocrine Connections*. **2018**. 7 (10): 1031-1039.
34. Daniel J. A., Elsasser T. H., Martínez A., Steele B., Whitlock B. K., Sartin J. L. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha mediation of endotoxin action on growth hormone. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **2005**. 289 (4): E650-7.
35. Dave K. M., Ali L., Manickam D. S. Characterization of the SIM-A9 cell line as a model of activated microglia in the context of neuropathic pain. *PLoS One*. **2020**. 15 (4): e0231597.
36. De Oliveira C. M., Sakata R. K., Issy A. M., Gerola L. R., Salomão R. Cytokines and pain. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. **2011**. 61 (2): 255-9.
37. Dehkhoda F., Lee C. M. M., Medina J., Brooks A. J. The growth hormone receptor: Mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. **2018**. 9: 35.
38. Devesa P., Agasse F., Xapelli S., Almenglo C., Devesa J., Malva J. O., Arce V.M. Growth hormone pathways signaling for cell proliferation and survival in hippocampal neural precursors from postnatal mice. *BMC Neuroscience*. **2014**. 15: 100.
39. Devesa J., Diaz-Getino G., Rey P., Garcia-Cancela J., Loures I., Nogueiras S., Hurtado de Mendoza A., Salgado L., Gonzalez M., Pablos T., Devesa P. Brain recovery after a plane crash: Treatment with growth hormone (GH) and neurorehabilitation: A case report. *International Journal of Molecular Science*. **2015**. 16: 30470-30482.
40. Devesa J., Lema H., Zas E., Munin B., Taboada P., Devesa, P. Learning and memory recoveries in a young girl treated with growth hormone and neurorehabilitation. *Journal of Clinical Medicine*. **2016**. 5 (2): 14.

41. Edwards C. K., Arkins S., Yunger L. M., Blum A., Dantzer R., Kelley K. W. The macrophage-activating properties of growth hormone. *Cellular and molecular neurobiology*. **1992**. 12 (5): 499-510.
42. Ehlken C., Grundel B., Michels D., Junker B., Stajl A., Schlunck G., Hansen L. L., Feltgen N., Martin G., Agostini H. T., Pielen A. Increased expression of angiogenic and inflammatory proteins in the vitreous of patients with ischemic central retinal vein occlusion. *PLoS One*. **2015**. 10 (5): e0126859.
43. Fischer A. J., Schmidt M., Omar G., Reh T. A. BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Müller glia in the retina. *Molecular and Cellular Neuroscience*. **2004**. 27 (2004): 531-542.
44. Fischer A. J., Zelinka C., Gallina D., Scott M. A., Todd L. Reactive microglia and macrophage facilitate the formation of Müller glia-derived retinal progenitors. *Glia*. **2014**. 62 (10): 1608-28.
45. Fischer A. J., Zelinka C., Milani-Nejad N. Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. *Glia*. **2015**. 63 (2): 313-27.
46. Fleming T., Martínez-Moreno C. G., Mora J., Aizouki M., Luna M., Arámburo C., Harvey S. Internalization and synaptogenic effect of GH in retinal ganglion cells (RGCs). *General and Comparative Endocrinology*. **2016**. 234: 151-160.
47. Fleming T., Martínez-Moreno C. G., Carranza M., Luna M., Harvey S., Arámburo C. Growth hormone promotes synaptogenesis and protects neuroretinal dendrites against kainic acid (KA) induced damage. *General and Comparative Endocrinology*. **2018**. 265: 111-120.
48. Fleming T., Balderas-Márquez J. E., Epardo D., Ávila-Mendoza J., Carranza M., Luna M., Harvey S., Arámburo C., Martínez-Moreno C. G. Growth hormone neuroprotection against kainite excitotoxicity in the retina is mediated by Notch/PTEN/Akt signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **2019**. 60 (14): 4532-4547.
49. Frago L. M., Baquedano E., Argente J., Chowen J. A. Neuroprotective actions of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. **2011**. 4: 23.
50. Fry C., Gunter D. R., McMahon C. D., Steele B., Sartin J. L. Cytokine-mediated growth hormone release from cultured ovine pituitary cells. *Neuroendocrinology*. **1998**. 68 (3): 192-200.

51. Garden G. A., Möller T. Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. **2006**. 1 (2): 127-37.
52. Gelders G., Baekelandt V., Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of Immunology Research*. **2018**. 2018: 4784268.
53. Ghasemi H., Ghazanfari T., Yaraee R., Faghihzadeh S., Hassan Z.M. Roles of IL8 in ocular inflammations: a review. *Ocular Immunology and Inflammation*. **2011**. 19 (6): 401-12.
54. Ghasemi M., Alizadeh E., Saei Arezoumand K., Fallahi Motlagh B., Zarghami N. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) delivery to retina: An overview of current research advancements. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*. **2017**. 46 (8): 1694-1707.
55. Ghasemi H. Roles of IL-6 in ocular inflammation: A review. *Ocular immunology and inflammation*. **2018**. 26 (1): 37-50.
56. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M. F., Conway S. J., Ng L. G., Stanley E.R., Samokhvalov I. M., Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. **2010**. 330 (6005): 841-5.
57. Glass C. K., Saijo K., Winner B., Marchetto M. C., Cage F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*. **2010**. 140 (6): 918-34.
58. Guymer C., Wood J. P., Chidlow G., Casson R. J. Neuroprotection in glaucoma: Recent advances and clinical translation. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. **2019**. 47 (1): 88-105.
59. Guzman-Soto I., Salinas E., Quintanar J. L. Leuprolide acetate inhibits spinal cord inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing NF- κ B activation. *Neuroimmunomodulation*. 2016. 23 (1): 33-40.
60. Hamby M. E., Gragnolati A. R., Hewett S. J., Hewett J. A., TGF beta 1 and TNF alpha potentiate nitric oxide production in astrocyte cultures by recruiting distinct subpopulations of cells to express NOS-2. *Neurochemistry international*. **2008**. 52 (6): 962-71.
61. Han J., Li Y., Liu X., Zhou T., Sun H., Edwards P., Gao H., Yun F. S., Qiao X. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One*. **2018**. 13 (3): e0193031.

62. Han X., Benight N., Osuntokun B., Loesch K., Frank S. J., Denson L.A. Tumour necrosis factor alpha blockade induces an Anti-inflammatory growth hormone signaling pathway in experimental colitis. *Gut*. **2007**. 56 (1): 73-81.
63. Hanna A., Frangogiannis N. G. The role of the TGF β superfamily in myocardial infarction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. **2019**. 6: 140.
64. Haritoglou C. H., Maier M., Neubauer A. S., Augustin A. J. Current concepts of pharmacotherapy of diabetic macular edema. *Expert opinion on pharmacotherapy*. **2020**. 21 (4): 467-475.
65. Harvey S. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine*. **2010**. 38: 335-359.
66. Harvey S., Arámburo C., Sanders E. J. Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: An overview. *Endocrine*. **2012**. 41: 19-30.
67. Harvey S. Growth hormone and growth? *General and Comparative Endocrinology*. **2013**. 190: 3-9.
68. Harvey S., Baudet M. L. Extrapituitary growth hormone and growth? *General and Comparative Endocrinology*. **2014**. 205: 55-61.
69. Hatton J., Kryscio R., Ryan M., Ott L., Young B. Systemic metabolic effects of combined insulin-like growth factor-I and growth hormone therapy in patient who have sustained acute traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. **2006**. 105 (6): 843-52.
70. Hirsch E. C, Vyas S., Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. **2012**. 18 Suppl 1: S210-2.
71. Holtmann H., Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften*. **1995**. 82 (4): 178-87.
72. Hong Y. H., Lillehoj H. S., Lee S. H., Park D., Lillehoj E. P. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF). *Developmental and Comparative Immunology*. **2006**. 30 (10): 919-29.
73. Hua Q., Gu X., Chen X., Song W., Wang A., Chu J. IL-8 is involved in radiation therapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of PCNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2019**. 676: 108158.
74. Huang Z., Zhou T., Sun X., Zheng Y., Cheng B., Li M., Liu X., He C. Necroptosis in microglia contributes to neuroinflammation and retinal degeneration through TLR4 activation. *Cell Death and Differentiation*. **2018**. 25: 180-189.

75. Huh Y., Ji R., Chen G. Neuroinflammation, bone marrow stem cells, and chronic pain. *Frontiers in immunology*. **2017**. 8: 1014.
76. Hwang J. S., Kwon M. Y., Kim K. H., Lee Y., Lyoo I. K., Kim J. E., Oh E. S., Han I. O. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated iNOS induction is increased by glucosamine under normal glucose conditions but is inhibited by glucosamine under high glucose conditions in macrophage cells. *The Journal of the biological chemistry*. **2017**. 295 (5): 1724-1736.
77. Ikeda H., Old L. J., Schreiber R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **2002**. 13 (2): 95-109.
78. Jang S., Lee J. H., Choi K. R., Kim D., Yoo H. S., Oh S. Cytochemical alterations in the rat retina by LPS administration. *Neurochemical Research*. **2007**. 32 (1): 1-10.
79. Jo D. H., Yun J. H., Chi C. S., Kim J. H., Kim J. H., Co C. H. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Glia*. **2019**. 67 (2): 321-331.
80. Karlstetter M., Ebert S., Langmann T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology*. **2010**. 215 (9-10): 685–691.
81. Karlstetter M., Scholz R., Rutar M., Wong W. T., Provis J.M., Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*. **2015**. 45: 30-57.
82. Karpuzoglu E., Ahmed S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric oxide: Biology and chemistry*. **2006**. 15 (3): 177-86.
83. Keino H., Horie S., Sugita S. Immune privilege and eye-derived t-regulatory cells. *Journal of Immunology Research*. **2018**. 2018: 1679197.
84. Kelley K. W. The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Annals of the New York Academy of Science*. **1990**. 594: 95-103.
85. Khalin I., Alyautdin R., Kocherga G., Bakar M.A. Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *International Journal of Nanomedicine*. **2015**. 10: 3245-3267.

86. Khoury O., Atala A., Murphy S. V. Stromal cell from perinatal and adult sources modulate the inflammatory immune response in vitro by decreasing Th1 cell proliferation and cytokine secretion. *Stem Cell Translational Medicine*. **2020**. 9 (1): 61-73.
87. Kireev R. A., Cuesta S., Vara E., Tresguerres J. A. F. Effect of growth hormone and melatonin on the brain: from molecular mechanisms to structural changes. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. **2011**. 7 (2): 337-50.
88. Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*. **2013**. 54(4): 391-406.
89. Kumar P. A., Chitra P. S., Lu C., Sobhanaditya J., Menon R. Growth Hormone (GH) differentially regulates NFkB activity in preadipocyte and macrophages implications for GH's role in adipose tissue homeostasis in obesity. *Journal of physiology and biochemistry*. **2014**. 70 (2): 433-40.
90. Kuprash D. V., Nedospasov S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Biochemistry Biokhimiia*. **2016**. 81 (11): 1237-1239.
91. Lambertsen K. L., Biber K., Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. **2012**. 32 (9): 1677-98.
92. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*. **2007**. 81 (6): 1345–1351.
93. Lee M. S., Wan J., Goldman D. Tgf3 collaborates with PP2A and notch signaling pathways to inhibits retina degeneration. *Elife*. **2020**. 9: e55137.
94. Leibinger M., Müller A., Gobrecht P., Diekmann H., Andreadaki A., Fischer D. Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. *Cell death and disease*. **2013**. 4 (4): e609.
95. Li G., Che M. T., Zhang K., Qin L. N., Zhang Y. T., Chen R. Q., Rong L. M., Liu S., Ding Y., Shen H. Y., Long S. M., Wu J. L., Ling E. A., Zeng Y. S. Graft of the NT-3 persistent delivery gelatin sponge scaffold promotes axon regeneration, attenuates inflammation, and induces cell migration in rat and canine with spinal cord injury. *Biomaterials*. **2016**. 83: 233-48.
96. Li Y., Xiang Y., Song Y., Wan L., Yu G., Tan L. Dysregulated miR-142, -33b, and -423 in granulosa cells target TGFBR1 And SMAD7: a possible role in polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*. **2019**. 25 (10): 638-646.

97. Linker R. A., Mäurer M., Gaupp S., Martini R., Holtman B., Giess R., Rieckmann P., Lassmann H., Toyka K. V., Sendtner M., Gold R. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nature Medicine*. **2002**. 8 (6): 620-4.
98. Liu X., Huang D., Guo P., Wu Q., Dai M., Cheng G., Hao H., Xie S., Yuan Z., Wang X. PKA/CREB and NF- κ B pathway regulates AKNA transcription: a novel insight into T-2-toxin-induced inflammation and GH deficiency in GH3 cells. *Toxicology*. **2017**. 392: 81-95.
99. Lopes P. C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology*. **2016**. 24 (5): 291-293.
100. Lowenstein C. J., Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science*. **2004**. 117 (14): 2865-7.
101. Lu C., Kumar P. A., Fan Y., Sperling M. A., Menon R. K. A novel effect of growth hormone on macrophage modulates macrophage-dependent adipocyte differentiation. *Endocrinology*. **2010**. 151 (5): 2189-99.
102. Luna-Acosta J. L., Alba-Betancourt C., Martínez-Moreno C. G., Ramirez C., Carranza M., Luna, M., Arámburo, C. Direct antiapoptotic effects of growth hormone are mediated by PI3K/AKT pathway in the chicken bursa of Fabricius. *General and Comparative Endocrinology*. **2015**. 224: 148-159.
103. Luna M., Rodríguez-Mendez A. J., Luna-Acosta, J. L., Carranza M., Arámburo C. Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *General and Comparative Endocrinology*. **2013**. 190: 182-187.
104. Mac-Nair C. E., Kickells R. W. Neuroinflammation in glaucoma and optic nerve damage. *Progress in molecular biology and translational science*. **2015**. 134: 343-63.
105. Madeira M. H., Boia R., Santos P. F., Ambrosio A. F., Santiago A. R. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators of inflammation*. **2015**. 2015:673090.
106. Mahalingam S., Chaudhri G., Tan C. L., John A., Foster P. S., Karupiah G. Transcription of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokine Mig in IFN-gamma-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*. **2001**. 276 (10): 7568-74.
107. Mansour S. E., Browning D. J., Wong K., Flynn H. W., Bhavsar A. R. The evolving treatment of diabetic retinopathy. *Clinical ophthalmology*. **2020**. 14: 653-678.

108. Mantravadi A. V., Vadhar N. Glaucoma. *Primary Care*. **2015**. 42 (3): 437-49.
109. Martínez-Moreno C. G., Giterman D., Henderson D., Harvey S. Secretagogue induction of GH release in QNR/D cells: Prevention of cell death. *General and Comparative Endocrinology*. **2014**. 203: 274-280.
110. Martínez-Moreno C. G., Ávila-Mendoza J., Wu Y., Arellanes-Licea E. del C., Louie M., Luna M., Arámburo C., Harvey S. Neuroprotection by GH against excitotoxic-induced cell death in retinal ganglion cells. *General and Comparative Endocrinology*. **2016**. 234: 68-80.
111. Martínez-Moreno C. G., Calderon-Vallejo D., Harvey S., Arámburo C., Quintanar J. L. Growth hormone (GH) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the central nervous system: A potential neurological combinatory therapy? *International Journal of Molecular Science*. **2018**. 19 (2): 375.
112. Martínez-Moreno C. G., Fleming T., Carranza M., Avila-Mendoza J., Luna M., Harvey S., Arámburo C. Growth hormone protects against kainate excitotoxicity and induces BDNF and NT3 expression in chicken neuroretinal cells. *Experimental Eye Research*. **2018b**. 166: 1-12.
113. Martínez-Moreno C. G., Epardo D., Balderas-Márquez J. E., Fleming T., Carranza M., Luna M., Harvey S., Arámburo C. Regenerative effect of growth hormone (GH) in the retina after kainic acid excitotoxic damage. *International Journal of Molecular Science*. **2019**. 20 (18): 4433.
114. Massengill M. T., Ahmed C. M., Lewin A. S., Ildefonso C. J. Neuroinflammation in retinitis pigmentosa, diabetic retinopathy, and age-related macular degeneration: A minireview. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **2018**. 1074: 185-191.
115. McGinley L., Sims E., Lunn J., Kashlan O., Chen K., Bruno E., Pacut C., Hazel T., Johe K., Sakowski S., Feldman E. Human cortical neural stem cells expressing insulin-like growth factor-1: a novel cellular therapy for Alzheimer's disease. *Stem Cells Translational Medicine*. **2016**. 5 (3): 379-91.
116. Meleth A. D., Agron E., Chan C. C., Reed G. F., Arora K., Byrnes G. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **2005**. 46: 4295–301.
117. Mesquida M., Drawnel F., Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease. *Seminars in immunopathology*. **2019**. 41 (4): 427-445.

118. Mimura T., Funatsu H., Noma H., Shimura M., Kamei Y., Yoshida M., Kondo A., Watanabe E., Mizota A. Aqueous humor levels of cytokines in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. **2019**. 241 (2): 81-89.
119. Minhas R., Bansal Y., Bansal G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: a comprehensive update. *Medicinal Research Review*. **2020**. 40 (3): 823-855.
120. Mitchell S., Vargas J., Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*. **2016**. 8 (3): 227-41.
121. Morita Y., Miwa Y., Jounai K., Fujiwara D., Kurihara T., Kanauchō O. Lactobacillus paracasei KW3110 prevents blue light induces inflammation and degeneration in the retina. *Nutrients*. **2018**. 10 (12): 1991.
122. Moshal K. S., Order K., Kabakov A. Y., Werdich A. A., Chiang E. Y., Turan N. N., Xie A., Kim T. Y., Cooper L. L., Lu Y., Zhong M., Li W., Terentyev D., Choi B. R., Karma A., MacRae C. A., Koren G. LITAF (Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor) Regulates cardiac L-type calcium channels by modulating NEDD (Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated Protein) 4-1 Ubiquitin ligase. *Circulation, Genomic and precision medicine*. **2019**. 12 (9): 407-420
123. Murray P. I., Hoekzema R., Van Haren M. A., de Hon F. D., Kijlstra A. Aqueous humor interleukin-6 levels in uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **1990**. 31: 917–20.
124. Nagamoto-Combs K., Kulas J., Combs C. K. A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia. *Journal Neuroscience Methods*. **2014**. 233: 187-98.
125. Naruishi K., Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on gingival fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *Journal of cellular physiology*. **2018**. 233 (9): 6393-6400.
126. Noailles A., Maneu V., Campello L., Lax P., Cuenca N. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell death & disease*. **2018**. 9 (3): 350.
127. Nylander E., Gronbladh A., Zelleröth S., Diwakarla S., Nyberg F., Hallberg M. Growth hormone is protective against acute methadone-induced toxicity by modulating the NMDA receptor complex. *Neuroscience*. **2016**. 339: 538-547.
128. Olmos G., Lladó J. Tumor necrosis factor Alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*. **2014**. 2014: 861231.

129. Olmos-Ortiz A., Déciga-García M., Preciado-Martínez E., Bermejo-Martínez L., Flores-Espinosa P., Mancilla-Herrera I., Irlés C., Helguera-Repetto A. C., Quesada-Reyna B., Goffin V., Diaz L., Zaga-Clavellina V. Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. *Molecular human reproduction*. **2019**. 25 (10): 660-667.
130. Opere C. A., Heruye S., Njie-Mbye Y. F., Ohia S. E., Sharif N. A. Regulation of excitatory amino acid transmission in the retina: Studies on neuroprotection. *Journal of Ocular Pharmacology Theraphy*. **2018**. 34: 107-118.
131. Oppenheim J. J. Cytokines: past, present, and future. *International journal of hematology*. **2001**. 74(1):3-8.
132. Pérez V. L., Saeed A. M., Tan Y., Urbietta M., Cruz-Guilloty F. The eye: A window to the soul of the immune system. *Journal Autoimmunity*. **2013**. 45: 7-14.
133. Perry V. H. Microglia. *Microbiology spectrum*. **2016**. 4(3).
134. Pollreis A., Rafferty B., Kozarov E., Lalla E. Klebsiella pneumoniae induces an inflammatory response in human retinal-pigmented epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2012**. 418: 33–7.
135. Pulido J., Johnson P. B., Nowakowki G. S., Castellino A., Raja H. The diagnosis and treatment of primary vitreoretinal lymphoma: a review. *International journal of retina and vitreous*. **2018**. 4: 28.
136. Puthothu B., Krueger M., Heinze J., Forster J., Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphism on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clinical and Molecular Allergy*. **2006**. 4:2.
137. Quingley H. A. Glaucoma. *Lancet*. **2011**. 377 (9774): 1367-77.
138. Ramani T., Auletta C. S., Weinstock D., Mounho-Zamora B., Ryan P. C., Salcedo T. W., Bannish G. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. *International journal of toxicology*. **2015**. 34 (4): 355-65
139. Resmini E., Morte B., Sorianello E., Gallardo, E., de Luna N., Illa I., Zorzano A., Bernal J., Webb S. M. Identification of novel GH-regulated genes in C2C12 cells. *Hormone and Metabolism Research*. **2011**. 43: 919-930.
140. Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*. **2004**. 82 (11): 844–851.

141. Ritvo P. G., Klatzmann, D. Interleukin-1 in the response of follicular helper and follicular regulatory T Cells. *Frontier of Immunology*. **2019**. 10: 250.
142. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **2018**. 10 (2): a028415.
143. Rutz S., Ouyang W. Regulation of interleukin-10 expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **2016**. 941: 89-116.
144. Sanchez R. N., Chan C. K., Garg S., Kwong J. M. K., Wong M. J., Sadun A. A., Lam T. T. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **2003**. 44 (9): 4006-11.
145. Sanders E. J., Parker E., Harvey S. Retinal ganglion cell survival in development: mechanisms of retinal growth hormone action. *Experimental Eye Research*. **2006**. 83: 1205-1214.
146. Sanders E. J., Parker E., Harvey S. Growth hormone-mediated survival of embryonic retinal ganglion cells signaling mechanism. *General and Comparative Endocrinology*. **2008**. 156: 613-621.
147. Sanders E. J., Lin W. Y., Parker E., Harvey S. Growth hormone promotes the survival of retinal cells *in vivo*. *General and Comparative Endocrinology*. **2011**. 172: 140-150.
148. Sapienza P., Hamel D., Shao Z., Rivera J. C., Zaniolo K., Joyal J. S., Chemtob S. Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **2010**. 42 (1): 5-12.
149. Savino W., Smaniotto S., Binart N., Postel-Vinay M. C., Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymic cells. *Annals of the New York Academy of Science*. **2003**. 992: 179-85.
150. Saxena A., Khosraviani S., Noel S., Mohan D., Donner T., Hamad A. R. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. **2015**. 74 (1): 27-34.
151. Schain M., Kreisl W. C. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders-a review. *Current Neurology and Neuroscience Report*. **2017**. 17 (3): 25.
152. Schmidt-Weber C., Blaser K. The role of TGF-beta in allergic inflammation. *Immunology and allergy clinics of North America*. **2006**. 26 (2): 233-44.

153. Sequeira A., Maisey K., Imarai M. Interleukin 4/13 receptors: An overview of genes, expression and functional role in teleost fish. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **2017**. 38: 66-72.
154. Shabab T., Khanabdali R., Moghadamtousi S. Z., Kadir H. A., Mohan G. Neuroinflammation pathways: A general review. *International Journal of Neuroscience*. **2017**. 127 (7): 624-633.
155. Shi L., Fang B., Yong Y., Li X., Gong D., Li J., Yu T., Gooneratne R., Gao Z., Li S., Ju X. Chitosan oligosaccharide-mediated attenuation of LPS-induced inflammation in IPEC-J2 cells is related to the TLR4/NF κ B signaling pathway. *Carbohydrate polymers*. **2019**. 219: 269-279.
156. Sierra A., Navacués J., Cuadros M. A., Calvente R., Martín-Oliva D., Ferrer-Martín R. M., Martín-Estebané M., Carrasco M. C., Marín-Teva J. L. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One*. **2014**. 9 (8): e106048.
157. Simmons K. T., Xiao Y., Pflugfelder S. C., de Paiva C. S. Inflammatory Response to Lipopolysaccharide on the Ocular Surface in a Murine Dry Eye Model. *Investigative ophthalmology and visual Science*. **2016**. 57 (6): 2443-51.
158. Singh N., Baby D., Prasad J. R., Pankaj B. P., Thakkannavar S. S., Bhojaraj V. P. Inflammation and Cancer. *Annals of African Medicine*. **2019**. 18 (3): 121-126.
159. Sitalaksmi R. M., Ito K., Ogasawara K., Suto Y., Itabashi M., Ueda K., Hirasawa N., Narushima T., Hendrijantini N., Kresnoadi U., Sasaki K. COX-2 induces T cell accumulation and IFN- γ production during the development of chromium allergy. *Autoimmunity*. **2019**. 52 (5-6): 228-234.
160. Soto I., Howell G. R. The complex role of neuroinflammation in glaucoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **2014**. 4 (8): a017269.
161. Sundaresan N. R., Anish D., Sastry K. V., Saxena V. K., Mohan J., Saxena M., Differential expression of lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) in reproductive tissues during induced molting of white leghorn hens. *Animal Reproduction Science*. **2007**. 102 (3-4): 335-42.

162. Szalecki M., Malinowska A., Prokop-Piotrkowska M., Janas R. Interactions between the growth hormone and cytokines – A review. *Advances in Medical Science*. **2018**. 63 (2): 285-289.
163. Takeda A., Shinozaki Y., Kashiwagi K., Ohno N., Eto K., Wake H., Nabekura J., Koizumi S. Microglia mediate non-cell-autonomous cell death of retinal ganglion cells. *Glia*. **2018**. 66 (11): 2366-2386.
164. Takimoto T., Sato K., Akiba Y., Takahashi K. Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. *Journal of immunology*. **2008**. 180 (12): 8327-32.
165. Tezel G., Li L. Y., Patil R. V., Wax M. B. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Investigative ophthalmology and visual Science*. **2001**. 42 (8): 1787-94.
166. Tong Y., Zhou Y.L., Zheng Y., Biswal M., Zhao P. Q., Wang Z. Y. Analyzing cytokines as biomarkers to evaluate severity of glaucoma. *International Journal of Ophthalmology*. **2017**. 10 (6): 925-930.
167. Trifunović J., Miller L., Debeljak Z., Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression—a review. *Biochemia Medica (Zagreb)*. **2015**. 25 (1): 36-48.
168. Tsigos C., Papanicolaou D. A., Defensor R., Mitsiadis C. S., Kyrou I., Chrousos G. P., Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology*. **1997**. 66 (1): 54-62.
169. Tzeng S. F., Huang H. Y., Lee T. I., Jwo J. K. Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglial activation by preexposure to neutrophin-3. *Journal of Neuroscience Research*. **2005**. 81 (5): 666-76.
170. Wada Y., Sato M., Niimi M., Tamaki M., Ishida T. inhibitory effects of interleukin-1 on growth hormone secretion in conscious male rats. *Endocrinology*. **1995**. 136 (9): 3936-41.
171. Walton P. E., Cronin M. J., Tumor necrosis factor alpha inhibits growth hormone secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology*. **1989**. 125 (2): 925-9.
172. Wang J. W., Chen S. D., Zhang X. L., Jonas J. B. Retinal Microglia in glaucoma. *Journal of Glaucoma*. **2016**. 25 (5): 459-65.
173. Wang Y., Chen S., Liu Y., Huang W., Li X., Zhang X. Inflammatory cytokine profiles in eyes with primary angle-closure glaucoma. *Bioscience reports*. **2018**. 38(6): BSR20181411.

174. Weber A. J. Autocrine and paracrine interactions and neuroprotection in glaucoma. *Cell Tissue Research*. **2013**. 353: 219-230.
175. Wei X., Cho K. S., Thee E. F., Jager M. J., Chen D. F. Neuroinflammation and microglia in glaucoma: time for a paradigm shift. *Journal of neuroscience research*. **2019**. 97 (1): 70-76.
176. Whalen M. J., Carlos T. M., Kochenek P. M., Wisniewski S. R., Bell M. J., Clark R. S., DeKosky S. T., Marion D. W., Adelson P. D. Interleukin-8 is increased in cerebrospinal fluid of children with severe head injury. *Critical care medicine*. **2000**. 28 (4): 929-34.
177. Williams P. A., Marsh-Armstrong N., Howell G. Neuroinflammation in glaucoma: a new opportunity. *Experimental Eye Research*. **2017**. 157: 20-27.
178. Won J. S., Im Y. B., Singh A. K., Singh I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radical Biology & Medicine*. **2004**. 37 (11): 1834-44.
179. Wu J. J., Yuan X. M., Huang C., An G. Y., Liao Z. L., Liu G. A., Chen R. X. Farnesyl thiosalicylic acid prevents iNOS induction triggered by lipopolysaccharide via suppression of iNOS mRNA transcription in murine macrophages. *International immunopharmacology*. **2019**. 68: 218-225.
180. Yang S., Li R., Qu X., Tang L., Ge G., Fang W., Qiao Z., Ma J., Hou Y., Liu H. Fosinoprilat alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by inhibiting TLR4/NF-kB signaling in monocytes. *Cellular Immunology*. **2013**. 284 (1-2): 182-6.
181. Yi C., Cao Y., Mao S. H., Liu H., Ji L. L., Xi S. Y., Zhang M., Huang Y. Recombinant human growth hormone improves survival and protects against acute lung injury in murine *Staphylococcus Aureus* sepsis. *Inflammation Research*. **2009**. 58 (12): 855-62.
182. Yuan Z., Chen X., Weimin Y., Bingsheng L., Ye N., Liu Y. The anti-inflammatory effect of minocycline on endotoxin-induced uveitis and retinal inflammation in rats. *Molecular Vision*. **2019**. 25: 359-372.
183. Zeng Y., Cao D., Yu H., Zhuang X., Yang D., Hu Y., He M., Zhang L. Comprehensive analysis of vitreous chemokines involved in ischemic retinal vein occlusion. *Molecular vision*. **2019**. 25: 756-765.
184. Zhang J. C., Wu J., Fujita Y., Yao W., Ren Q., Yang C., Li S. X., Shirayama Y., Hashimoto K. Antidepressant effects on TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic

- changes in mice after inflammation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. **2014**. 18 (4): pyu077.
185. Zhang F., Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*. **2015**.11: 243–56.
186. Zhang J. C., Yao W., Hashimoto K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Current Neuropharmacology*. **2016**. 14 (7): 721-31.
187. Zhang K., Wang H., Xu M., Frank J. A., Luo J. Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain. *Journal of Neuroinflammation*. **2018**. 15 (1): 197.
188. Zhou H., Lamont S. J. Association of transforming growth factor beta genes with quantitative trait loci for antibody response kinetics in hens. *Animal Genetics*. **2003**. 34 (4): 275-82.
189. Zymo Research, “Manual Direct-zol RNA MiniPrep”, USA, Zymo Research Corp., Catálogo R2050-R2053.

12. ANEXOS

Figuras Suplementarias

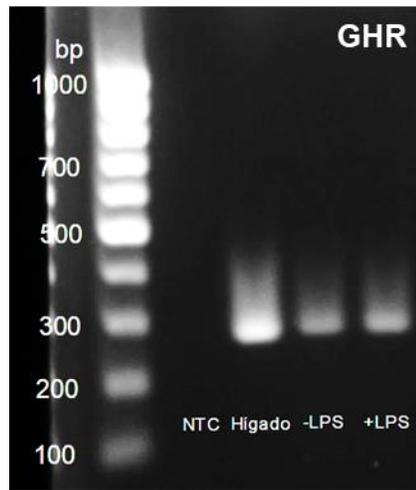


Fig. suplementaria 1. Fragmentos de PCR correspondientes a la expresión de GHR. Los fragmentos fueron obtenidos con los oligonucleótidos de GH. NTC: Control Negativo sin templado, Hígado (Control Positivo), -LPS: células SIM-A9 sin tratamiento con LPS, +LPS: células SIM-A9 tratadas con LPS.

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Akt	Proteína serina-treonina cinasa
AMD	Degeneración macular asociada a la edad
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor derivado del cerebro
BMP4	Proteína morfogénica ósea 4
BSA	Albúmina de suero fetal bovino
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
Ctrl	Control
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
dNTPs	4 desoxirribonucleótidos-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FBS	Suero fetal bovino
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GH	Hormona de Crecimiento
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento
IFN γ	Interferón γ
IL	Interleucina
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
IL1 β	Interleucina 1 β
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
INT	Control intacto
IOP	Presión intraocular
JAK	Janus cinasa
KA	Ácido kaínico
LITAF	Factor inductor de TNF α por LPS
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NIH	National Institutes of Health

NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NR	Neuroretina
NT3	Neurotrofina 3
NTC	Control negativo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI3K	Cinasa del fosfatidil-inositol trifosfato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RGC	Células ganglionares de la retina
RP	Retinitis pigmentosa
RVO	Oclusión de vena retinal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIM-A9	Microglía inmortalizada espontáneamente A9
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Proteína traductora de señales y activadoras de la transcripción
TBS	Buffer salino de TRIS
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo toll
TLR4	Receptor tipo toll 4
TNF α	Factor de necrosis tumoral alpha
TNFR1	Receptor a TNF 1
TNFR2	Receptor a TNF 2
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano1,3-diol
UV	Ultravioleta
WB	Western Blot