



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGIA**

**CAMPUS JURQUILLA**

**“LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA  
DE CRECIMIENTO (GH) EN TEJIDOS DEL SISTEMA  
INMUNE DE POLLO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

**M. en C. ADRIANA JHENY RODRÍGUEZ MÉNDEZ**

**T U T O R A  
DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ**

Juriquilla, Querétaro, Noviembre de 2010.



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.

## DEDICATORIAS

A Dios, porque en Él están todas las preguntas y las respuestas...

A mi familia,  
A mis padres, Juana Méndez Gaspar y Elías Rodríguez Franco  
A mis hermanos, Iván y Hugo  
A mis sobrín@s, Samantha Elián e Ian David

A mis amig@s y compañer@s

A mis alumn@s

A los que ya no están más a mi lado, pero que en todo momento me brindaron su confianza

Al maestro Alejandro Pérez Romero<sup>†</sup> y al Dr. J. Benjamín Roberto Moreno Pérez<sup>†</sup>

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, por su confianza y apoyo incondicional, por su ejemplo de dedicación y su amistad.

A la Dra. Maricela Luna, por haber dirigido este trabajo, por el tiempo dedicado a la formación de nuevos alumnos.

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Carmen Clapp y el Dr. Enrique Pedernera, por sus contribuciones durante el desarrollo de esta investigación.

A los miembros del jurado, Dra. Luz María López Marín, Dra. Marta Romano Pardo, Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, por sus comentarios y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Steve Harvey, por su apoyo para realizar la estancia de investigación en su laboratorio.

A Martha Carranza, Gerardo Courtois, Marie-Laure Baudet, por toda la ayuda técnica, su apoyo y amistad.

A la Dra. Teresa García Gasca, por todo el apoyo, la confianza y cariño, pero sobre todo por ser una gran persona y brindarme su valiosa amistad.

A la Dra. Carmen Mejía, por su apoyo incondicional, sus consejos y cariño, y por ser una gran persona y una gran amiga.

A los amigos incondicionales, que han estado conmigo en todo momento y con quienes he compartido esta etapa de mi vida, Francisco Carmona, Elvira Núñez, Alejandra López, Marisol Rodríguez, Alma Bertadillo, Fabiola Espinosa, Mario Nava, Néstor Nazario, Miguel Mendoza, Ismael Gimete, Julio Medina, gracias por su apoyo y cariño.

A mis amigos y compañeros del laboratorio y del INB, José Luis Luna Acosta, José Ávila Mendoza, Carlos Martínez, Clara Alba, Marisela Ahumada, Salvador Xihuitl, Juan Carlos Méndez, Marcelino Montiel, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Medicina, los doctores Pablo García Solís, Juan Carlos Solís Sainz, Ludivina Robles Osorio, Hebert Luis Hernández Montiel, Carlos Saldaña Gutiérrez, Ma. Elena Villagrán Herrera, Marco Alonso Gallegos Corona, por todos los logros y por todo lo que nos falta.

A Leonor Casanova y Carmen, por la gran labor que realizan con paciencia y dedicación.

A mi mamá y mi papá, por todo el apoyo y la fortaleza, por su ejemplo y tenacidad, pero sobre todo por su paciencia y amor.

A mis hermanos, Iván, por su cariño, ayuda y consejos, a Hugo y su familia, por su cariño y apoyo.

A Samantha e Ian por todo su amor y alegría.

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE HORMONAS DEL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ Y COMO ASESOR EXTERNO EL DR. STEVE HARVEY DE LA UNIVERSIDAD DE ALBERTA, CANADÁ.

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) C60296, PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) IN210209, DGEP DE LA UNAM Y NSERC DE CANADÁ. LA AUTORA FUE APOYADA CON LA BECA CONACyT: 142396 Y DEGEP: 504014132

# ÍNDICE

<b>Dedicatorias</b>	i
<b>Agradecimientos</b>	ii
<b>Índice</b>	iv
<b>Índice de figuras</b>	vi
<b>Índice de tablas</b>	viii
<b>Resumen</b>	ix
<b>Abstract</b>	x
<b>Introducción</b>	1
<b>1. Antecedentes</b>	3
Hormona de Crecimiento (GH)	3
La Hormona de Crecimiento (GH): una familia de proteínas	4
Efectos de la Hormona de Crecimiento (GH)	6
Hormona de Crecimiento (GH) extrahipofisiaria	9
Función de la GH en el sistema inmune	10
El sistema inmune del pollo	12
La Hormona de Crecimiento (GH) y la bolsa de Fabricio (BF)	21
El timo	21
La Hormona de Crecimiento (GH) y el timo	24
La respuesta inmune en aves	24
<b>2. Planteamiento del problema</b>	28
<b>3. Hipótesis General</b>	29
3.1 Hipótesis Particulares	29
<b>4. Objetivo General</b>	29
4.1 Objetivos Específicos	29
<b>5. Estrategia</b>	29
<b>6. Materiales y Métodos</b>	30
6.1 Materiales	30
6.2 Métodos	30
6.2.1 Preparación de las muestras	30
6.2.1.1 Animales y tejidos del sistema inmune	30
6.2.1.2 Obtención de los extractos	30
6.2.1.3 Cuantificación de proteínas	31
6.2.1.4 Histología de la bolsa de Fabricio con hematoxilina y eosina (HyE)	31
6.2.1.5 Histología de las células epiteliales de la bolsa de Fabricio con azul alcian (AA)	31
6.2.2 Expresión del gen de la GH en bolsa de Fabricio y timo	32
6.2.2.1 Preparación de las sondas	32
6.2.2.2 Hibridación <i>in situ</i>	33
6.2.3 Localización de la GH en bolsa de Fabricio y timo	34
6.2.3.1 Inmunohistoquímica	34

6.2.4 Co-localización de la GH en bolsa de Fabricio	35
6.2.5 Cuantificación de la hormona de crecimiento (GH)	36
6.2.5.1 Ensayo de ELISA	36
6.2.6 Caracterización de la GH en bolsa de Fabricio y timo	37
6.2.6.1 Determinación de la heterogeneidad molecular	37
6.2.7 Efecto de LPS en la expresión de GH en tejidos inmunes	38
6.2.7.1 Administración de LPS	38
6.2.8 Análisis estadístico	38
<b>7. Resultados</b>	39
7.1 Estandarización de técnicas	39
7.1.1 Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	39
7.1.2 Inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia	39
7.2 Desarrollo e involución de la bolsa de Fabricio	41
7.3 Distribución del ARN mensajero de GH y de la proteína en bolsa de Fabricio (BF)	43
7.4 Co-localización de GH-IgG, GH-IgM, en la bolsa de Fabricio (BF)	48
7.5 Caracterización de células positivas a GH en la BF	54
7.6 Localización de la hormona de crecimiento (GH) presente en el timo de pollo	58
7.7 Contenido de la hormona de crecimiento (GH) presente en bolsa de Fabricio (BF) y timo a lo largo del desarrollo	65
7.8 Evaluación de la heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) presente en la bolsa de Fabricio (BF) y en el timo	69
7.9 Efecto del lipopolisacárido (LPS) de <i>Escherichia coli</i> en la concentración de hormona de crecimiento (GH) en bolsa de Fabricio (BF) y timo	74
<b>8. Discusión</b>	76
<b>9. Conclusiones</b>	92
<b>10. Bibliografía</b>	94

#### **Anexo I**

Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Harvey S, Arámburo C, Luna M. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships?. *General and Comparative Endocrinology*. 2010 167(2): 297-307.

#### **Anexo II**

Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C. Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Developmental and Comparative Immunology*. 2008 32(11): 1313-25.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Órganos inmunes primarios y secundarios del pollo	12
<b>Figura 2</b> Estructura del folículo linfoide de la bolsa de Fabricio	13
<b>Figura 3</b> Ontogenia de la Bolsa de Fabricio del pollo	15
<b>Figura 4</b> Estructura del timo de pollo	22
<b>Figura 5</b> Hibridación <i>in situ</i> del ARN mensajero de la GH en hipófisis de pollo	39
<b>Figura 6</b> Inmunohistoquímica de la GH en hipófisis de pollo	40
<b>Figura 7</b> Inmunofluorescencia de la GH en hipófisis de pollo	40
<b>Figura 8</b> Cambios histológicos e inmunohistoquímicos de la bolsa de Fabricio de pollo	41
<b>Figura 9</b> Determinación de la expresión de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio	43
<b>Figura 10</b> Detalle de la expresión de GH en bolsa de Fabricio (BF) perinatal	45
<b>Figura 11</b> Expresión de la hormona de crecimiento (GH) en la bolsa de Fabricio (BF) de etapas post-eclosión	46
<b>Figura 12</b> Cambios dinámicos en la expresión de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF)	47
<b>Figura 13</b> Co-localización de células IgG <sup>+</sup> -GH <sup>+</sup> durante el desarrollo en la bolsa de Fabricio	49
<b>Figura 14</b> Cuantificación de las células GH <sup>+</sup> , IgG <sup>+</sup> y su co-localización GH-IgG	50
<b>Figura 15</b> Co-localización de IgM-GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio	52
<b>Figura 16</b> Comparación de la co-localización de células GH-IgG y GH-IgM en la bolsa de Fabricio	53
<b>Figura 17</b> Caracterización de las células positivas a GH en el epitelio de la bolsa de Fabricio de 4 semanas	54
<b>Figura 18</b> Caracterización del tipo celular que expresa GH en los folículos de la bolsa de Fabricio de pollos de 4 semanas	55

<b>Figura 19</b>	Distribución de las células IgG+-GH+ en la bolsa de Fabricio de 4 semanas	56
<b>Figura 20</b>	Cambios histológicos e inmunohistoquímicos del timo de pollo en etapas perinatales	58
<b>Figura 21</b>	Cambios histológicos e inmunohistoquímicos del timo de pollo en etapas post-eclosión	59
<b>Figura 22</b>	Expresión de la hormona de crecimiento (GH) en el timo de pollos de distintas edades	61
<b>Figura 23</b>	Morfología de las células positivas a la hormona de crecimiento en el timo de pollo de distintas edades	63
<b>Figura 24</b>	Cambios en la concentración de la hormona de crecimiento (GH), peso y contenido total de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio	65
<b>Figura 25</b>	Cambios en la concentración de la hormona de crecimiento (GH), peso y contenido total de GH en la ontogenia del timo	67
<b>Figura 26</b>	Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF) bajo condiciones no reductoras	69
<b>Figura 27</b>	Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF) bajo condiciones reductoras	70
<b>Figura 28</b>	Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia del timo bajo condiciones no reductoras	71
<b>Figura 29</b>	Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia del timo bajo condiciones reductoras	72
<b>Figura 30</b>	Curvas de temperatura en pollos control y pollos a los cuales se les administró lipopolisacárido (LPS)	74
<b>Figura 31</b>	Efecto del lipopolisacárido (LPS) en la concentración de hormona de crecimiento (GH) en la hipófisis el suero, la bolsa de Fabricio y el timo del pollo	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Caracterización de las variantes de la hormona de crecimiento (GH) de pollo	6
<b>Tabla 2</b> Efectos de la hormona de crecimiento (GH) en el sistema inmune	11

## RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) tiene la capacidad de modular al sistema inmune. Existe evidencia de sus efectos sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia de células inmunitarias, y de su síntesis en los tejidos linfoides de distintos organismos. En este trabajo se exploró la expresión y la distribución de la GH durante el desarrollo de la bolsa de Fabricio (BF) y el timo en embriones y adultos de pollo, mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. En la BF y el timo se observaron células positivas a GH en el estroma y el epitelio. En etapas embrionarias la señal fue más intensa en ambos tejidos, con respecto a las etapas post-eclosión. En la BF la señal se localizó en linfocitos B, células dendríticas secretoras y células retículo epiteliales; durante la involución del tejido a las 20 semanas, se observó una disminución del 75 % de la señal respecto a las etapas previas. En el timo, un tejido de involución más tardía, la disminución de la concentración GH se observó después de las 4 semanas en un 50%, y se mantuvo con esa misma concentración en etapas posteriores. Las variantes moleculares en ambos tejidos presentaron formas oligoméricas de 35-45 kDa en etapas embrionarias y un fragmento de 17 kDa en etapas post-eclosión. En la hipófisis, que es el principal sitio en el que se sintetiza la GH, se presenta la variante monomérica (22 kDa). Durante un estímulo inflamatorio con lipopolisacárido en pollos de 4 semanas, se observó un incremento del 40% en la concentración de la GH en ambos tejidos con respecto al control.

Nuestros resultados confirman la producción local de la GH y podrían sugerir su participación como un factor en la proliferación, diferenciación y modulación inmune a través de sus efectos autócrinos y/o paracrinos.

## ABSTRACT

Growth hormone (GH) can modulate the immune system. There is evidence that GH affects the proliferation, differentiation and survival of immune cells, and that it is synthesized in lymphoid tissues of several organisms. This work explores GH expression and distribution in embryonic and adult stages of the chicken bursa of Fabricius (BF) and thymus, using *in situ* hybridization and immunohistochemistry. In the BF and thymus, GH-positive cells were observed in stroma and epithelium. Embryonic stages showed more intense signal in both tissues in comparison with post-hatching stages. In BF, signal was localized in B lymphocytes, secretory dendritic and reticulo epithelial cells; during tissue involution at 20 weeks, the GH signal and concentration decrease by over 75% with respect to previous stages. In thymus, a tissue with delayed involution, GH concentration decreased by 50% after 4 weeks, and it did not change in later stages. Molecular variants in both tissues showed oligomeric forms of 35-45 kDa in embryonic stages and a 17 kDa fragment in post-hatching stages. The pituitary gland, the main site of GH synthesis, showed mainly the monomeric variant (22 kDa). In 4 weeks chicks given lipopolysaccharide as an inflammatory stimulus, the GH concentration increased 40% in both tissues relative to the control.

Our results confirm local production of GH and suggest that it may participate as a modulator of proliferation, differentiation and immune function through its autocrine and/or paracrine effects.

## INTRODUCCIÓN

Recientemente, gran variedad de péptidos que desde hace varias décadas se encontró que se sintetizan en el sistema neuroendócrino, se han encontrado en los tejidos linfoides, como la hormona de crecimiento (GH). Esta hormona tiene diversos efectos en las células del sistema inmune y existe evidencia de su producción en células como macrófagos, células T y B de distintas especies. Como aún no se conocía la localización de la GH en bolsa de Fabricio (BF) y timo de pollo, ni los cambios que sufre durante la ontogenia, se exploró la expresión y la distribución de la GH en estos tejidos, desde etapas embrionarias hasta la etapa adulta. La expresión del gen de la GH en BF y timo, se demostró mediante la hibridación *in situ* (HIS) con una ribosonda específica (690 pb) y señal proveniente de la marca de la sonda se observó principalmente en regiones de estroma y epitelio, y su localización sugiere que estas células podrían ser del linaje inmunitario. La inmunohistoquímica (IHQ) realizada con un anticuerpo específico que reconoce a la GH, reveló la presencia de células positivas en médula y corteza de ambos tejidos. En etapas tempranas del desarrollo (15DE, 18DE y 1d) de la BF y el timo, la señal es muy intensa, tanto por HIS como por IHQ. En la BF la señal disminuye significativamente hacia las 20 semanas un 75%, coincidiendo con la involución del tejido, mientras que en el timo, la señal disminuye después de las 4 semanas (50%) y en etapas posteriores ya no se observaron cambios y parece mantenerse constante, lo cual correlacionó con la involución tardía de este tejido (después de las 50 semanas). En la BF se realizó la co-localización de la GH con marcadores celulares específicos con anticuerpos contra IgG e IgM, donde se observó que las células  $\text{GH}^+\text{-IgG}^+$  son más abundantes en etapas post-eclosión y las  $\text{GH}^+\text{-IgM}^+$  fueron más abundantes en etapas embrionarias. Lo anterior confirmó que la mayoría de las células (90%) productoras de GH corresponde a linfocitos B. La concentración de la GH se evaluó mediante ELISA, donde se observó una mayor concentración de esta hormona en la BF a las 4 semanas y en timo a las 2 semanas, con respecto al resto de las edades evaluadas en estos tejidos. Esta concentración fue 30 veces menor en la BF y 200 veces menor en el timo, que la concentración de GH hipofisaria, que se utilizó como control. Después de las 4 semanas, la BF y el timo, presentaron una disminución en la concentración de la GH con respecto a la edad donde mostraron la concentración más elevada, y fue mucho más notoria en la BF que en el timo. Mediante SDS-PAGE/Western blot se detectó a la GH inmunoreactiva (IR) y se utilizó como control a la hipófisis, ya que es la glándula que produce

la mayor cantidad de esta hormona. En la hipófisis la principal forma que se sintetiza es la variante monomérica (22 kDa), mientras que en la BF y el timo la principal variante fue un fragmento de 17 kDa (50%) en aves post-eclosión. En los embriones, solo el 20% del total de las variantes de GH correspondió a la variante 17 kDa y el 60% a las formas oligoméricas de 35-45 kDa.

Con la finalidad de simular una respuesta inflamatoria para determinar los cambios en la concentración en la GH de la BF y el timo, pollos de 4 semanas se inyectaron con lipopolisacárido (LPS). En ambos tejidos se observó un incremento significativo en la concentración de la GH después de la administración de LPS al compararlos con su respectivo control.

Los datos anteriores confirman la producción de la GH en la BF y el timo, y permiten sugerir que esta hormona podría participar como un factor en la proliferación, diferenciación y modulación de las células inmunitarias a través de sus efectos autócrinos y/o paracrinos.

## 1. ANTECEDENTES

### Hormona de Crecimiento (GH)

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína hipofisiaria constituida por alrededor de 191 residuos aminoácidos, que pueden variar dependiendo de la especie en la que se encuentre. Se sintetiza en los somatotropos como una prohormona de 225 aminoácidos. La forma que se libera principalmente es un monómero de 22 kDa, aunque también se han descrito variantes de distintas masas moleculares.

La estructura tridimensional de la GH (22 kDa) porcina y humana, se ha dilucidado gracias a la cristalografía de rayos X (Goffin y Kelly, 1996). En su estructura contiene un asa central grande y un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal, las cuales se forman debido a los 2 puentes disulfuro entre las cisteínas de los residuos 57-165 y 182-189. Esta hormona es 50%  $\alpha$ -helicoidal ya que contiene 4  $\alpha$ -hélices antiparalelas, distribuidas en los segmentos: 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183 (Abdel-Meguid *et al.*, 1987). Estos segmentos contienen 4 dominios ( $A_{GH}$ ,  $B_{GH}$ ,  $C_{GH}$  y  $D_{GH}$ ) que se encuentran muy conservados en la escala filogenética y están presentes en todos los vertebrados (Chen *et al.*, 1995).

En las aves se conoce tanto la estructura primaria de la proteína (191 aminoácidos), como la secuencia de su ARN mensajero (ARNm). Se ha comparado la homología entre la GH del pavo, el pato y el pollo, donde sólo se encontraron diferencias en 3 aminoácidos sustituidos y una deleción en la hormona de pato con respecto a la GH de pollo (Chen *et al.*, 1994; Hull y Havey, 1997). En el pollo, la forma de 22 kDa representa el 10% de la proteína hipofisiaria total (Arámburo *et al.*, 1993). Los puentes disulfuro se localizan en las posiciones 53-164 y 181-189, y tiene un punto isoeléctrico de 5.1 (Arámburo *et al.*, 1993; Hull y Havey, 1997).

La GH se une a su receptor mediante 2 sitios, el primero se localiza del centro al extremo carboxilo de la hélice 4, el segmento 54-74 de una de las asas y una porción de la hélice 1; el segundo sitio, que involucra la región amino terminal de la hélice 1, la hélice 3 y los residuos 12, 16 y 19, se une de forma secuencial a otra molécula de receptor con menor afinidad que el primero (Cunningham y Wells, 1991). La dimerización del receptor es indispensable para

iniciar la activación de la transducción de señales a nivel intracelular (Goffin y Kelly, 1996). Cuando se modificó la glicina 119, contenida en uno de los segmentos de la hélice 3 presente en todos los vertebrados, se encontró que es determinante en las acciones de la GH, tales como: la secreción del factor insulinoide tipo I (IGF-I) hepático, la lipólisis y el efecto tipo insulina (Chen *et al.*, 1995). En ratones transgénicos se expresó GH bovina en la que se sustituyeron 3 aminoácidos, entre ellos la glicina 119 por una arginina, y se observó que el crecimiento y la concentración de IGF-I circulante estaban disminuidos. Estos estudios propusieron el primer antagonista funcional de la GH y la participación de la glicina 119 para permitir la correcta interacción con el receptor (Chen *et al.*, 1991a y 1991b).

### **La Hormona de Crecimiento (GH): una familia de proteínas**

La GH es una familia de proteínas con un patrón de variación estructural, que se ha descrito en peces (Kawauchi *et al.*, 1986), anfibios (Andersen *et al.*, 1989), reptiles (Yasuda *et al.*, 1989), aves (Houston y Goddard, 1988; Arámburo *et al.*, 1989) y mamíferos (Hart *et al.*, 1984; Lewis, 1984; Bauman, 1999). Aún cuando la información disponible sobre la caracterización bioquímica y fisiológica de las variantes de la GH es contradictoria, existe evidencia de su importancia funcional. Se han propuesto algunos mecanismos mediante los cuales se pueden generar algunas de estas variantes, además se encontró que se secretan en distintas proporciones dependiendo del estado fisiológico del organismo. También se conocen algunos datos más específicos, como su actividad biológica, funcional y la potencia de sus efectos.

Una de las posibles explicaciones para la diversidad funcional que presenta la GH se asocia a su heterogeneidad molecular (Arámburo *et al.*, 1990, 2001), la cual puede originarse por diferentes mecanismos como: a) multiplicidad génica (Frankenne *et al.*, 1987; Untergasser *et al.*, 1996 y 1997), b) procesamiento diferencial del ARNm (Lewis, 1992; Bauman, 1991 y 1999), c) modificación postraduccional (Arámburo *et al.*, 1990b), y d) modificaciones post-secreción.

Como ejemplo de la multiplicidad génica, en los humanos se identificaron dos genes que codifican para la GH estructuralmente similar. Uno de los genes se denomina gen normal para la GH (hGH-N) y se expresa principalmente en los somatotropos hipofisarios. El gen

variable (hGH-V) en cambio, se expresa en el sincitiotrofoblasto de la placenta (Chen *et al.*, 1989) y en testículo, y su producto es una proteína con 92% de homología a la GH-N, tiene una diferencia en 13 aminoácidos (Frankenne *et al.*, 1987; Untergasser *et al.*, 1996 y 1997). La GH-V tiene un PM de 22 kDa, tiene una glicosilación tipo N y se une a receptores de prolactina (PRL) y receptores hepáticos de la GH, al parecer con mayor afinidad que la GH-N de la hipófisis. Lo anterior explica porque la GH-V se encarga del metabolismo durante la segunda mitad del embarazo y sustituye a la GH-N (Frankenne *et al.*, 1988; Bauman, 1991). En el caso de la GH-V de la placenta, así como en hipófisis, existen evidencias de distintas funciones de esta proteína y se ha corroborado en varias especies de primates, que han proporcionado mejores modelos de estudio (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2010).

En peces óseos (anguila, esturión, salmón) también se han identificado dos genes que codifican para la GH, ambos se expresan en la hipófisis: GH-I y GH-II (Kawauchi *et al.*, 1986; Yasuda *et al.*, 1992). En los esturiones los dos genes producen GH de 190 aminoácidos que solo difieren en 3 aminoácidos (Kawauchi *et al.*, 1986; Yasuda *et al.*, 1992).

El procesamiento diferencial del ARNm es otra alternativa para la producción de variantes de la GH, que en el caso de humanos y roedores se ha documentado ampliamente. El gen hGH-N puede producir 3 distintos ARNm: uno de ellos produce hGH de 22 kDa (191 aminoácidos). Otro de los ARNm dirige la síntesis de una proteína de 20 kDa que tiene una deleción del exón 3 (45 nucleótidos que representan la pérdida de 15 aminoácidos). La GH de 20 kDa constituye del 5-10% de la GH sintetizada en la hipófisis y también se ha encontrado en roedores (Sinha y Guilligan, 1984). La tercera modificación produce una variante de ~17 kDa (Lewis, 1992) que se ha detectado en el suero de humanos (Warner *et al.*, 1993) y también se ha observado en hipófisis de roedores (Sinha y Guilligan, 1984).

Otra forma en la que se pueden generar variantes de las proteínas es la modificación porstraduccional. Esta modificación se observa comúnmente en las proteínas y la GH no es la excepción. En el caso de esta hormona, las modificaciones que sufre después de su traducción incluyen la agregación que produce oligómeros, la desamidación, la proteólisis, la glicosilación, la fosforilación y la acetilación.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, indican que la presencia de variantes de masa en el pollo se origina principalmente por modificaciones postraduccionales. La oligomerización, para la formación de dímeros (44 kDa), trímeros (66 kDa) etc., la glicosilación (Arámburo *et al.*, 1991), fosforilación (Arámburo *et al.*, 1990b), acetilación y la proteólisis para la generación de fragmentos (Arámburo *et al.*, 2001b). También se encontró que estas variantes poseen distintas actividades biológicas (Tabla 1). Más aún, se tienen evidencias de que las variantes que se generan en la hipófisis también se secretan al torrente sanguíneo (Houston y Goddard, 1988; Arámburo *et al.*, 1990; Montiel *et al.*, 1992).

**Tabla 1.** Caracterización de las variantes de la hormona de crecimiento (GH) de pollo.

Isoforma	Caracterización	Referencia
Fragmento de GH 15 kDa	[↑] en embrión de pollo	Arámburo <i>et al.</i> , 2001b
	Baja afinidad RRA Angiogénesis (+) Lipólisis (+)	Arámburo <i>et al.</i> , 2001a
GH monomérica 22 kDa	Actividades relacionadas con la GH	Houston <i>et al.</i> , 1990
	Abundante en la hipófisis	Arámburo <i>et al.</i> , 2001a
GH fosforilada	Liberado por GHRH Fosforilado por PKA	Arámburo <i>et al.</i> , 1990
GH cortada 25 kDa	Baja afinidad RRA Proliferación de NB <sub>2</sub>	Arámburo <i>et al.</i> , 2001a
GH glicosilada 26 kDa	Baja afinidad RRA	Berúmen <i>et al.</i> , 2004
GH oligomérica 44 kDa 66, 88, 110 kDa	Baja afinidad RRA [↑] en pollos adultos	Arámburo <i>et al.</i> , 2001a

### Efectos de la Hormona de Crecimiento (GH)

La GH presenta una gran diversidad de funciones, algunas de las más importantes son estimular el crecimiento de tejidos blandos y esquelético, así como la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los efectos de la GH se realizan gracias a su receptor (GHR). El GHR se clasifica como miembro de la superfamilia de receptores clase I citocina/hematopoyetina (Kopchick y Andry, 2000). Esta superfamilia incluye las

subunidades del receptor a prolactina (PRL), a una variedad de receptores para citocinas y factores de crecimiento, como eritropoyetina (EPO), factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucinas (IL) 2-7, 9, 11 y 12, entre otros. Actualmente se sabe que la GH se une a 2 receptores (Cunningham y Wells, 1991), que a su vez están acoplados a Jak-2 tirosin cinasas que se encargan de activar, en respuesta a la GH, a varias moléculas de señalización (Kopchick y Andry, 2000). Se han estudiado el receptor y las vías de señalización que la GH activa con la finalidad de entender cómo es que esta hormona es capaz de llevar a cabo diversos efectos en el crecimiento y metabolismo de los organismos.

Mucho de lo que ahora sabemos acerca de los efectos de la GH, es gracias al conocimiento de la estructura de su receptor, que se clonó por primera vez de bibliotecas genómicas de hígado humano y de conejo. A partir de estos experimentos se obtuvo una proteína de ~70kDa, que podía sufrir glicosilación y ubiquitinación para mostrar una proteína de mayor tamaño (Harding *et al.*, 1994).

El receptor de la GH ha sido estudiado ampliamente para determinar su transducción de señales, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Se ha encontrado que un evento crucial para que la GH lleve a cabo su efecto es la dimerización de su receptor, en la que los dos receptores se unen por puentes disulfuro formando un complejo de ~220 kDa (Frank *et al.*, 1994). La dimerización del receptor conduce a la asociación de Janus cinasas (Jak-2) y a la fosforilación cruzada de otra Jak-2 (Wang *et al.*, 1996). Parte de la cascada de señalización que la GH activa, incluye un incremento en la biosíntesis de insulina, el aumento en la proliferación de distintas células (pre-condrocitos, linfocitos), aumenta la actividad de las tirosinas que fosforilan diversas proteínas, aumenta la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , la activación de proteínas STAT (signal transducer and activator of transcription), la expresión y la síntesis de c-fos (fos: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), la síntesis de proteínas y el transporte de la glucosa (Wang *et al.*, 1996).

La GH se considera, por lo anterior, un factor pleiotrópico que en conjunto, con la activación de diversas moléculas lleva a cabo el proceso de crecimiento de un organismo. Por esta misma razón es compleja la comprensión de las funciones que la GH lleva a cabo.

Uno de los efectos que más ha atraído la atención hacia la GH, es su efecto antiapoptótico en diferentes células. En los organismos vivos el control del desarrollo y crecimiento de diversos tejidos se encuentra regulado por una serie de procesos que interactúan de forma compleja mediante múltiples factores. Un tipo de muerte celular programada, la apoptosis, es uno de estos mecanismos, la cual incluye una secuencia de eventos que se realizan con base en el metabolismo y que tiene como objetivo la destrucción celular (Susan y Brad, 2005). Algunos de los detonantes de este proceso son el daño irreversible celular o a su material genético, lo cual provoca la activación de una serie de proteínas para la eliminación de la célula. La falla de este mecanismo puede causar padecimientos como el cáncer, cuando la muerte celular disminuye, o enfermedades neurodegenerativas, cuando el proceso es excesivo (Delhalle *et al.*, 2003).

Este proceso de muerte celular programada, es mediado por proteínas con actividad enzimática llamadas caspasas. Además involucra características como la condensación nuclear y citoplasmática, el rompimiento de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos, sin alterar la membrana plasmática. Las caspasas tienen actividad proteolítica y pueden activarse por varias señales, conocidas como proapoptóticas, el estrés celular, la privación de factores de supervivencia clásicos como diversos factores de crecimiento (EGF, VEGF, IGF-1) o algunas hormonas (PRL, GH). Así mismo, la administración de estos factores puede evitar la muerte celular, como se ha observado previamente (Lieberthal *et al.*, 1998).

En la actualidad hay una gran cantidad de evidencias del efecto que la GH tiene en la supervivencia celular, en modelos *in vitro* e *in vivo*. La administración de GH en ratas mostró un aumento de IGF-I en cerebro, lo cual se asoció a la inhibición de la apoptosis en el tejido (Frago *et al.*, 2002). El efecto de la GH se determinó en varios modelos *in vitro*, cultivos primarios de células de la granulosa (Sirotkin y Makarevich 1999), en cultivos primarios de cardiomiocitos (González-Juanatey *et al.*, 2004), en células del sistema inmune (Jensen *et al.*, 2005), y en todas estas células se encontró una disminución de la apoptosis en los tratamientos con la GH al compararlos con sus respectivos controles o tratamientos inductores de apoptosis.

## Hormona de Crecimiento (GH) extrahipofisiaria

Asimismo, en varios estudios en las últimas décadas se demostró que la GH se sintetiza no solo en la hipófisis, sino también en tejidos extrahipofisarios. Se han encontrado, tanto a la GH como a su ARNm en varios tejidos como la glándula pineal, glándula mamaria, hígado, riñón, pulmón, músculo, colon, estómago y ovario, de varias especies (Rev. en Render, *et al.*, 1995). En el caso de la placenta y testículo (Untergasser *et al.*, 1997) se ha demostrado la expresión específica del gen GH-V (hormona de crecimiento variable).

Otros sitios en los que también se ha encontrado a la GH son las células y tejidos del sistema inmune (Hattori *et al.*, 1990 y 2001; de Mello-Coelho *et al.*, 1998a), en cultivos de linfocitos humanos (Weigent *et al.*, 1988; Hattori *et al.*, 2001), en células mononucleares *in vivo* (Weigent y Blalock, 1991; Baxter *et al.*, 1991) entre otras. La síntesis de la hormona también se ha demostrado mediante la incorporación de aminoácidos radioactivos (Weigent y Blalock *et al.*, 1992) y la localización de su ARNm (Wu *et al.*, 1996). El receptor para GH también está presente en los linfocitos y los monocitos (Badolato *et al.*, 1994; Bresson *et al.*, 1999). Los receptores de la GH pertenecen a la superfamilia de los receptores para citocinas, ya que son estructuralmente homólogos (Wlodawer *et al.*, 1993), por lo que no es extraño encontrarlos en las células del sistema inmune.

La relación que existe entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune es estrecha, ya que ambos sistemas utilizan ligandos y receptores similares para establecer un circuito de comunicación, intra e intersistemas, que es muy importante para mantener la homeostasis (Berczi y Gorczynski, 2001).

## **Función de la GH en el sistema inmune**

Las primeras observaciones en relación a la función de la GH en el sistema inmune se realizaron en casos con deficiencia de esta hormona: por causas genéticas (enanismo), fisiológicas (envejecimiento) o experimentales (hipofisectomía). Estos casos se asociaron con un funcionamiento inmunológico deficiente, el cual se corregía al administrar GH exógena (Clark, 1997). En cambio, cuando había incrementos patológicos en la concentración de la GH (acromegalia producida por adenomas hipofisarios), se observó un hiperfuncionamiento del sistema inmune, que incluía tanto la inmunidad celular como la humoral (Hull y Harvey, 1997). Los efectos del exceso de GH pueden ser disminuidos o completamente bloqueados por inmunoneutralización de la GH circulante. La administración de anticuerpos contra la GH provoca la disminución en el peso y el número de células del bazo y del timo, así como la producción de anticuerpos en células B estimulada por linfocitos T (Crilly *et al.*, 1994). Estas observaciones reflejan la presencia de receptores para la GH en linfocitos tisulares y circulantes, así como en células epiteliales de bazo y timo. La inducción de citocinas y otros factores inmunológicos por la GH, parecen ejercer un efecto de retroalimentación en hipotálamo e hipófisis, para regular la liberación de la GH hipofisaria (Besedovsky y del Rey, 1996). Ahora, se han evaluado los mecanismos mediante los cuales se genera la comunicación bidireccional entre células inmunes y células liberadoras de GH y se ha propuesto que factores inmunes también pueden regular factores del sistema neuroendócrino. La GH desempeña papeles importantes en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune: aumenta la actividad de las células asesinas naturales (células NK: natural killer), estimula la eritropoyesis, linfopoyesis, granulopoyesis y la producción de aniones superóxido por neutrófilos y macrófagos (Hattori *et al.*, 2001). Se ha reportado que en los linfocitos humanos se sintetiza y secreta la GH (Kooijman *et al.*, 1996), también se han evaluado los efectos de la administración exógena de la GH (Tabla 2.).

Como los linfocitos poseen receptores para la GH (GHR) (Hull *et al.*, 1996; de Mello-Coelho *et al.*, 1998a; Hattori *et al.*, 2001), la hormona sintetizada por ellos mismos podría actuar sobre sus propios receptores en forma autocrina y/o paracrina. La localización de los GHR y las proteínas que unen a la GH inmunorreactiva podría indicar que la GH juega un papel importante para la proliferación, diferenciación, y/o la actividad de las células inmunes.

**Tabla 2.** Efectos de la hormona de crecimiento (GH) en el sistema inmune.

Efectos de la GH	Especie	Referencia
Proliferación de linfocitos T y B ( <i>in vitro</i> )	Humano y pollo	Kelley, 1990; Yoshida <i>et al.</i> , 1992
Actividad metabólica de monocitos, células NK	Humano y pollo	Kelley, 1990; Shimizu <i>et al.</i> , 2005
Diferenciación de precursores a neutrófilos	Humano	Kelley, 1990
Producción de timulina y proliferación de timocitos	Rata y perro	Kelley, 1990
La producción de citocinas (IL- 2, IL- 6, IgE, IgG)	Humano, aves y ratón	Kimata y Fujimoto, 1994; Savino <i>et al.</i> , 2003
Estimula el crecimiento de tejidos linfoides ( <i>in vivo</i> )	Aves y mamíferos	Marsh <i>et al.</i> , 1992; Villanua <i>et al.</i> , 1992

Además, se sabe que la GH puede afectar indirectamente la maduración de los linfocitos y su vía de almacenamiento en células del estroma de bazo y timo (Hull *et al.*, 1996).

Con la finalidad de determinar el nivel al que la GH lleva a cabo sus acciones, se ha investigado en varias especies, entre ellas el pollo, la presencia y localización celular de sus receptores. Se detectó el ARNm del receptor para la GH (GHR) en bazo, bolsa de Fabricio y timo del pollo (Hull *et al.*, 1996). El ARNm de la GH encontrado en estos órganos presenta homología y sitios de corte equivalentes a los del ARNm de la hipófisis con las enzimas de restricción Bam HI y RsaI (Render *et al.*, 1995). Resultados de nuestro laboratorio mostraron la presencia de la hormona en órganos como bazo, timo y bolsa de Fabricio en pollos, similar en tamaño y antigenicidad a la hormona hipofisiaria. Así mismo se han caracterizado algunos de los tipos celulares responsables de la producción de la GH (Luna *et al.*, 2008). El papel de la GH extrahipofisiaria se desconoce y existen pocas evidencias acerca de su función, aunque parece ser que también está directamente relacionada con la proliferación y diferenciación celular, hay trabajos que demuestran diferencias en sus actividades.

Como se mencionó previamente, la GH ha mostrado efectos antiapoptóticos en células del sistema inmune, en donde se ha encontrado que estimula la síntesis de ADN (Berczi *et al.*, 1991). En cultivos de linfocitos, monocitos y neutrófilos, tratados con GH demostró citometría de flujo de las células mostró que la GH fue capaz de inhibir la apoptosis en neutrófilos (Matsuda *et al.*, 1998). El efecto también se ha probado en otras líneas celulares, como las de precursores de linfocitos B (Ba/F3) que normalmente no expresan el receptor a GH. Estas células se transfectaron para expresar el receptor funcional de la GH y se encontró que la administración de la GH disminuía hasta en un 70% la proporción de células apoptóticas (Jeay *et al.*, 2000 y 2002). Lo anterior sugiere que la GH podría tener un efecto paracrino/autocrino.

### El sistema inmune del pollo

Parte de los componentes esenciales de defensa del sistema inmunológico en la mayoría de los vertebrados son las células B, T y asesinas naturales (NK), las cuales protegen de agentes patógenos potenciales. El sistema inmune de las aves está formado por órganos linfoides primarios y secundarios (Fig.1). Los órganos primarios proveen de microambientes necesarios donde los linfocitos se diferencian y proliferan para formar distintas clonas y de ahí se distribuyen hacia la médula ósea, el bazo y el resto de los órganos linfoides secundarios.

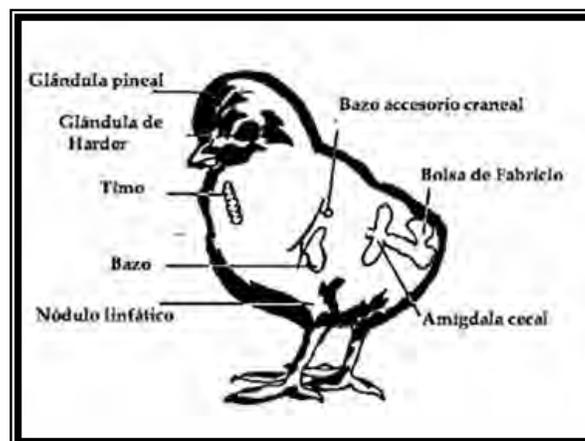
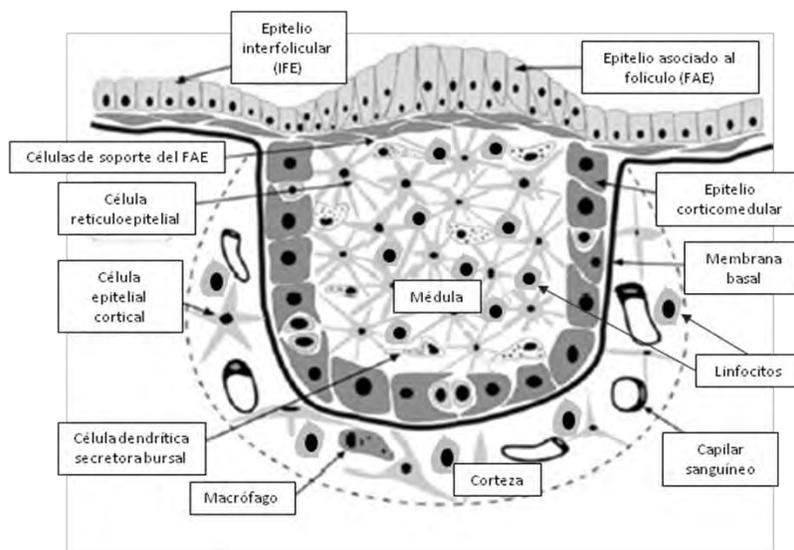


Fig.1. Órganos inmunes primarios y secundarios del pollo.

Los órganos linfoides primarios, en las aves, son la bolsa de Fabricio (BF) y el timo, y los órganos secundarios son la glándula de Harder y pineal, el bazo y los bazos accesorios, los nódulos linfáticos y la amígdala cecal. La inmunofisiología de las aves depende de la

presencia de células inmunocompetentes y accesorias. Las primeras se derivan de la bolsa de Fabricio o del timo.

**La bolsa de Fabricio (BF)** es un órgano específico de las aves, responsable de la maduración de los linfocitos B (Glick *et al.*, 1956). Se localiza en la cloaca del pollo, detrás de la última porción del tracto intestinal. Tiene una forma redonda u ovalada que contiene pliegues funcionalmente organizados en folículos, alrededor de 800 folículos por pliegue. El folículo bursal contiene una población celular heterogénea: esta recubierto por células epiteliales asociadas al folículo (FAE) e interfoliculares (IFE). Posee dos compartimentos: una **médula** y una **corteza** con linfocitos, linfoblastos, reticulocitos, macrófagos y células plasmáticas (Fig.2). La actividad pinocítica de las FAE permite que gran cantidad de sustancias solubles entren a la médula de la bolsa de Fabricio, lo cual estimula la producción de anticuerpos en el lumen bursal. Otra característica de este órgano es que comienza a involucionar después de las 10 semanas de edad, antes de la madurez sexual y se convierte en tejido fibroso al llegar a las 25 semanas de desarrollo (Ciriaco *et al.*, 2003).



**Fig.2. Estructura del folículo linfóide de la bolsa de Fabricio** (Modificado de Ciriaco *et al.*, 2003).

La **región medular** de la bolsa de Fabricio está constituida por linfoblastos y linfocitos inmersos en una red formada por las prolongaciones citoplasmáticas de las células reticuloepiteliales y dendríticas secretoras (Fig.2). En la periferia entre la región medular y la corteza existe una capa de células epiteliales que limitan a los dos compartimentos junto con la membrana basal, que en conjunto se llaman epitelio cortico-medular.

La **región cortical** (Fig.2) está formada por varias capas de linfocitos (de 8 a 10), macrófagos, algunas células epiteliales y mesenquimatosas de la lámina propia. En la corteza se encuentran vasos sanguíneos asociados a la membrana basal, lo que permite que exista una salida continua de linfocitos.

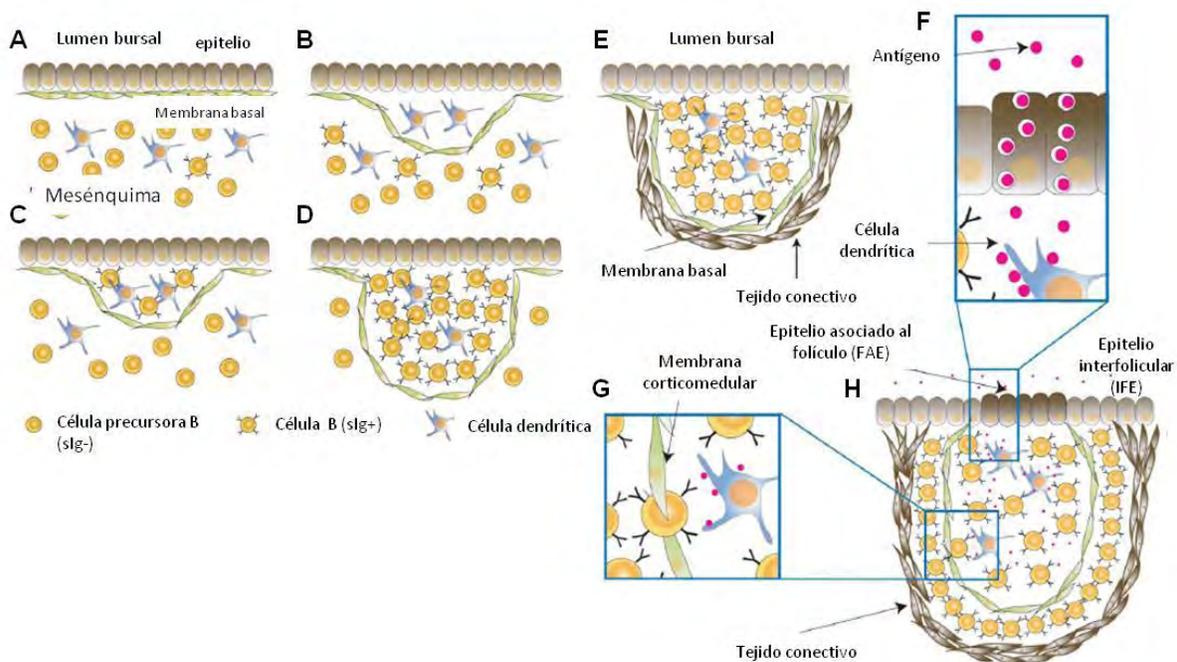
Durante la embriogénesis, la BF se coloniza por células precursoras esenciales para el desarrollo normal de los linfocitos B. En la BF, los linfocitos se dividen y diferencian antes de migrar a la periferia como linfocitos B maduros, donde funcionan ante los antígenos para convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Rev. Glick 1991; Ratcliffe 2002). En el microambiente de la bolsa de Fabricio los linfocitos proliferan en la región medular y migran a la corteza para abandonar la bolsa. Así mismo se ha observado que el crecimiento en la corteza y la médula es diferencial durante la etapa embrionaria y que tiende a igualarse post-natalmente, por lo que se ha propuesto la posibilidad que estos compartimentos tengan funciones distintas.

**Ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF).** La BF se desarrolla a partir del apéndice localizado en la porción dorsal de la cloaca. Los primordios de la BF se forman a partir del 4to día de incubación, en la superficie del epitelio ectodérmico (Fig. 3A). Entre el día 3-4 de incubación se encuentran células precursoras B en la región para-aórtica intraembrionaria. Estas células precursoras migran hacia el saco vitelino entre los días 5-6 de desarrollo embrionario (DE), y es posible detectar marcadores de superficie específicos de linfocitos B como la IgM y Bu-1 (Reynaud *et al.*, 1994). En el día 7 DE las células precursoras inician el rearreglo de la cadena ligera de las inmunoglobulinas (Ig's) en el tejido mesenquimatoso embrionario extra-bursal, aún cuando estas células no han colonizado la BF, por lo que se plantea que dicho rearreglo sea independiente de la BF (Mansikka *et al.*, 1990). Este rearreglo es lo que permite a las células precursoras migrar hacia los órganos linfoides como la BF y colonizarlos (Reynaud *et al.*, 1994). La diversificación de la región variable de las Ig's se inicia poco después, cuando las células expresan IgM de superficie durante la etapa de proliferación en los folículos linfoides de la BF (Mansikka *et al.*, 1990).

Al quinto día de desarrollo embrionario se observa la formación de un esbozo endodérmico rodeado por una cápsula de tejido mesenquimatoso, y se puede distinguir una evaginación dorsocaudal de la cloaca. Entre el día 6 y el 8 el cordón epitelial desarrolla una luz y se

conecta con el rudimento de la luz cloacal, así la BF crece como un tallo cilíndrico. Más tarde, hacia el día 10 de desarrollo embrionario aparecen las plicas o pliegues y a los 12-18 días ya se pueden observar varios esbozos epiteliales (Romppanen, 1982).

Otras células que juegan un papel importante para el desarrollo adecuado de la BF y la respuesta inmune específica, son las células dendríticas secretoras bursales (BSDC). Las BSDC se derivan de células precursoras conocidas como células mesenquimatosas oscuras. Estas células ingresan al epitelio a través de la membrana basal durante los días 11-13 DE, poco antes de que los precursores linfoides arriben para dar lugar a los primordios foliculares (Olah y Glick 1978; Olah *et al.*, 1992). Las BSDC presentan la característica de inmobilizar IgG en sus membranas, por lo que se ha propuesto que esta es la manera en la que interactúan con las células B para facilitar su expansión (Glick, 1995).



**Fig.3. Ontogenia de la bolsa de Fabricio del pollo.** (A) La colonización de la bolsa de Fabricio embrionaria se da por células basófilas dendríticas y precursores linfoides. (B) Se observan las primeras células basófilas que colonizan el tejido para formar los primordios del foliculo linfoides. (C) los precursores de las células B con inmunoglobulina de superficie (slg+) colonizan cada primordio folicular. (D) Las células slg+ (principalmente IgM+ y escasas IgG+) sufren una rápida proliferación antes de la eclosión. (E) Para el día del nacimiento el foliculo ya está formado. (F) Las células epiteliales asociadas al foliculo (FAE) tienen actividad pinocítica para permitir el contacto de antígenos en la región medular. (G) Algunos de los linfocitos migran a través de la membrana basal y se desarrolla la membrana cortico-medular. (H) Folículo bursal maduro en el período post-eclosión (Modificado de Ratcliffe, 2006).

La migración de las células precursoras linfoides (Fig. 3B) se lleva a cabo del día 8-15 (7.5-14) DE (Houssaint *et al.*, 1976) a través de la vascularización general (Moore y Owen, 1965),

y van del mesénquima extrabursal al tejido en desarrollo donde empiezan la formación y proliferación de los folículos bursales (Pink y Lassila, 1987; Glick, 1995). Las células precursoras y las células mesenquimatosas oscuras colonizan la BF a través del epitelio e inducen la formación del folículo linfoide (Reynaud *et al.*, 1994). La migración de estas células está ligada a la expresión de moléculas de superficie (carbohidrato X Lewis) que funcionan como ligandos para selectinas pertenecientes a la familia de receptores de adhesión vascular (Masteller y Thompson, 1994).

Existe evidencia de que la BF es colonizada casi simultáneamente por dos linajes hematopoyéticos entre los días 9 y 10 DE, uno de los linajes dará lugar a linfocitos y macrófagos, mientras que el segundo grupo dará lugar principalmente a macrófagos y algunos granulocitos y desaparecerán al final de la vida embrionaria (Houssaint, 1987). Los precursores hematopoyéticos se observan en el mesénquima y hasta después del día 10 DE penetran en el epitelio. Los precursores que no alcanzan el epitelio se comprometen para diferenciarse en la línea mieloide, principalmente en granulocitos (Houssaint, 1987).

A los 14 DE se distinguen cúmulos de células en el interior del epitelio: primordios epiteliales que representan la médula folicular temprana e indican el inicio de la formación de los folículos linfoides (Paniagua y Nistal, 1983). Los primordios epiteliales están formados, principalmente, por células precursoras, pero en esta etapa no es posible distinguir entre corteza y médula (Betti *et al.*, 1991). Las células indiferenciadas que se observan son probablemente derivadas del saco vitelino (células basófilas ricas en ribosomas), y algunos autores las consideran linfoblastos (Paniagua y Nistal, 1983). La migración de los linfoblastos se lleva a cabo a través de la lámina basal de los primordios en el día 15 DE (Paniagua y Nistal 1983).

Una de las características de las células B del pollo, es que se desarrollan en una sola oleada de diferenciación, que inicia cuando las células precursoras B se comprometen entre los días embrionarios 10 y 15 (McCormack *et al.*, 1989; McCormack y Thompson, 1990). Las células precursoras se encuentran de manera abundante en la BF embrionaria (14-18 DE), es relativamente raro encontrarlas en etapas post-eclosión y no se observan en animales adultos (Betti *et al.*, 1991).

Durante esta etapa de desarrollo el epitelio bursal parece desempeñar un papel fundamental al proveer a las células precursoras de un estímulo para inducir la aparición de antígenos mayores de histocompatibilidad clase II (MHC II), aún cuando la producción de Ig's no depende de la BF (Ratcliffe *et al.*, 1986). Al día 15 DE las células precursoras B también presentan IgM<sup>+</sup> de superficie, estas células desaparecen gradualmente después del nacimiento (Pink y Lassila, 1987).

El número de células precursoras B que colonizan inicialmente a cada folículo es pequeño (de 2-7 células) (Pink *et al.*, 1985) y el crecimiento del mismo se debe a la proliferación de estas células. Se forman alrededor de 10<sup>4</sup> folículos durante la colonización y este número permanece constante en la BF madura (Olah y Glick, 1978). Entre el día 18 embrionario y las 2 semanas post-eclosión, las células B sufren una diferenciación dependiente de la BF. Al término de esta etapa dependiente de la BF, los pollos tienen la capacidad de montar la respuesta inmune primaria, prácticamente contra todos los antígenos (McCormack y Thompson, 1990).

También entre los días 12-15 DE se desarrolla el epitelio que delinea los pliegues (Naukkarinen *et al.*, 1978), las células epiteliales se alargan y desarrollan prolongaciones citoplasmáticas que se interconectan para formar una red (Paniagua y Nistal, 1983). Así mismo, empieza su diferenciación en epitelio interfolicular (IFE) y epitelio asociado al folículo (FAE) (Naukkarinen *et al.*, 1978). Aún cuando las células FAE se encuentran presentes desde el día 15DE, su actividad pinocítica es detectable hasta el 19-21 (Fig. 3F) (Naukkarinen *et al.*, 1978). En la BF post-eclosión el FAE está soportado por 3-5 capas de células epiteliales estratificadas que son la continuación de las células epiteliales corticomedulares (Olah *et al.*, 1992). El FAE consiste en células M y células dendríticas secretoras. La comunicación entre el FAE y la médula se lleva a cabo mediante las células de soporte del FAE (Olah *et al.*, 1992).

Durante la etapa tardía de desarrollo embrionario y en pollitos recién nacidos, se observan pocas células B IgG<sup>+</sup>, incluso algunos autores no reportan señal positiva en estas etapas (Olah *et al.*, 1991). Una de las principales funciones de la BF en etapas embrionarias y tempranas post-eclosión es proporcionar un microambiente adecuado para que los linfocitos B proliferen y se diferencien antes de su migración a los tejidos periféricos como linfocitos B

maduros, donde llevaran a cabo su función inmune (Rev. Glick, 1991; Ratcliffe, 2002). Además se sabe que la BF permite que se lleve a cabo la diversidad inmunológica a través del rearrreglo de los genes de las Ig's, gracias a la liberación de diversos factores humorales que inciden sobre los precursores linfoides (Weill y Reynaud, 1987; Rev. Scott, 2004). Justo antes de la eclosión, las células bursales de los primordios epiteliales, migran a través de la membrana basal, lo cual permite distinguir algunos folículos linfoides con corteza y médula separadas por la membrana basal que ahora se convierte en membrana corticomedular (Reynolds, 1987) como se observa en la Fig. 3G.

Después de la eclosión, el número de células en la BF continúa aumentando aunque a una proporción mucho menor, de manera que su tamaño se dobla cada semana (Lydyard *et al.*, 1976). A pesar de elevada proliferación celular de precursores B en la BF por día, solo el 5% de las células sobreviven y el resto muere *in situ* (Motyka y Reynolds, 1991). Las células de la corteza y de la médula se dividen rápidamente, pero el aumento en el tamaño no es proporcional debido a la muerte celular en la BF post-eclosión (Paramithiotis *et al.*, 1995).

Los valores de apoptosis en la BF son muy elevados, probablemente mayores a los observados en el timo de mamíferos y de aves, y marca a la BF como uno de los sitios de mayor muerte celular del sistema linfoides (Motyka y Reynolds, 1991). Los valores de apoptosis estimados hasta ahora, subestiman la verdadera proporción de muerte celular que sucede en la BF, ya que las células sufren rápidamente apoptosis y son fagocitadas de manera eficiente por los macrófagos, no solo en la BF, también en distintos órganos (Motyka y Reynolds, 1991). Existe evidencia que demuestra que las células que pierden la expresión de Ig's son inducidas a sufrir apoptosis (Paramithiotis *et al.*, 1995).

En los pollos post-eclosión la BF contiene de 10 a 15 pliegues o plicas, con 8000-12000 folículos bursales poliédricos (Olah y Glick, 1978). Cada folículo está organizado en una médula central y una corteza periférica (Grossi *et al.*, 1977). Y durante el desarrollo post-eclosión la BF también funciona como órgano linfoides secundario (Ekino *et al.*, 1985). Se ha observado que en la BF de pollos post-eclosión las células dendríticas secretoras bursales (BSDC) expresan la cadena completa de IgG (Glick y Olah, 1993). La evidencia anterior sugiere que la IgG y los productos granulares de las BSDC podrían estar funcionando como ligandos y señales para la expansión de las células B y la conversión génica (Glick y Olah,

1993). También se ha demostrado que la localización de las BSCD es estratégica, se localizan dentro y debajo de las células epiteliales asociadas al folículo (FAE), indicando su contacto con los antígenos que ingresan al órgano linfoide. También se observan en el borde corticomedular, sitio regenerador para las células BSCD (Gallego *et al.*, 1996). En la fase de crecimiento rápido (1d a las 4 semanas), el número de BSCD aumenta alrededor de 18 veces, posiblemente por la proliferación de precursores en los arcos del borde corticomedular (Olah *et al.*, 1992).

Durante la vida del pollo la BF incrementa su peso, alcanzando el valor máximo entre las 10-15 semanas. Después de este tiempo, el peso disminuye e inicia la formación de quistes, principalmente en la médula folicular (Naukkarinen y Sorvari, 1984). Con respecto a la tasa de proliferación de linfocitos también existen cambios dependiendo de la etapa de desarrollo. En el desarrollo embrionario la proliferación es de 6.4%/h, en pollos neonatos aumenta a 10%/h, y disminuye nuevamente al 6.4%/h después de las 6 semanas (Ekino, 1993). Después de las 10 semanas de edad, las células BSCD disminuyen dramáticamente, sugiriendo que la actividad pinocítica de las células FAE decrece debido a la regresión de la BF (Gallego *et al.*, 1996). En la semana 17.5, las células del FAE comienzan a perder su actividad pinocítica y los cúmulos de mucina comienzan a aparecer en la región de la médula, lo que forma los cúmulos mucoides que se observan en las fases tardías de la involución (Naukkarinen y Sorvari, 1984).

De acuerdo a lo anterior se ha determinado que la BF tiene un crecimiento marcado durante el desarrollo embrionario. Después del nacimiento su crecimiento se puede clasificar en tres etapas: la 1era fase es de crecimiento rápido, que va desde el nacimiento hasta las seis u ocho semanas de edad. En este periodo la BF incrementa su peso hasta alcanzar su máximo entre las 9 y las 15 semanas. La 2da fase, llamada de meseta, se inicia a partir de que la BF alcanza su peso máximo, después de las 9-10 semanas, donde no hay un cambio en el peso del tejido. Y posteriormente la fase de regresión que inicia alrededor de la semana 15 y se caracteriza por la involución del tejido, hasta cerca de las 23 semanas de edad, en donde la BF solo es un residuo de tejido fibroso (Frazier, 1974; Glick, 1984; Paniagua y Nistal, 1983; Ciriaco *et al.*, 2003).

Existe evidencia de que durante la etapa embrionaria y hasta las 6 semanas post-eclosión, la BF juega un papel de tejido linfoide primario para la proliferación y maduración de las células B, y que posterior a las 6 semanas y hasta la semana 16 funciona como órgano linfoide secundario (Naukkarinen y Sorvari, 1984). Gracias a la actividad pinocítica de las células epiteliales asociadas al folículo linfoide (FAE) y a su localización estratégica de la BF (en la parte posterior de la cloaca), se facilita el ingreso de diversas partículas antigénicas que al tener contacto con las células B diversifican el repertorio de anticuerpos.

Uno de los cambios que la BF sufre durante su regresión es la pérdida de peso, esto último debido a la involución histológica que sucede a las 18 semanas, y que consiste en el plegamiento del epitelio interfolicular (Glick, 1984; Ciriaco *et al.*, 2003). Otro de los fenómenos observados en la BF es la sustitución del tejido linfoide por tejido fibroso en la región subepitelial, que se conoce como involución mucoide (Zapata y Cooper, 1990). Los procesos de proliferación decrecen significativamente entre la semana 10 y 16, así mismo la actividad pinocítica se pierde en las células FAE y desaparecen hacia la semana 19-20 de desarrollo. Finalmente, después de la semana 23, la BF se encuentra como un residuo fibroso, sin estructuras linfoepiteliales (Zapata y Cooper, 1990).

El proceso de involución de la BF se ha asociado a la madurez sexual, ya que coincide con el incremento en el tamaño de las glándulas adrenales y el incremento en la producción de esteroides gonadales/adrenales (Glick, 1984). Algunos experimentos que apoyan dicha hipótesis, han demostrado que la administración de esteroides en etapas prepuberales induce la regresión de la BF (Glick *et al.*, 1956; Meyer *et al.*, 1959). Está bien documentado que los glucocorticoides tienen la capacidad de inducir apoptosis en células inmaduras T y B (Compton *et al.*, 1990) y también funcionan como inmunosupresores durante la respuesta inmune e inflamatoria. Se ha observado en experimentos *in vitro* realizados con células dendríticas secretoras, que la administración de dexametazona disminuye su la expresión de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II), por lo que los linfocitos T no sufren activación (Schwiebert *et al.*, 1995).

## La Hormona de crecimiento (GH) y la bolsa de Fabricio (BF)

El efecto de la GH se ha evaluado ampliamente en diversos tejidos inmunes y la BF no es la excepción. En investigaciones previas demostraron que los linfocitos de la BF sufren apoptosis a las pocas horas de haberse extraído del tejido (Neiman *et al.*, 1991). Los efectos de la GH se han explorado porque previamente se encontró la expresión del ARNm de la hormona, así como de su receptor (Render *et al.*, 1995; Hull *et al.*, 1996). En trabajo de nuestro grupo de investigación se ha descrito la concentración de la GH en distintas etapas del desarrollo de la BF (Luna *et al.*, 2005), así como la distribución de la GH y de su ARNm en pollos de 4 semanas (Luna *et al.*, 2008). La localización de la proteína y su ARNm en la región cortical de los folículos linfoides de la BF, sugieren que su producción se realiza en linfocitos B (Luna *et al.*, 2008). Así mismo, se ha inferido su participación en la supervivencia de los precursores linfoides, ya que se ha encontrado a la GH en células dendríticas secretoras (Luna *et al.*, 2008), que proporcionan diversos factores para la maduración de precursores B (Glick y Olah, 1993).

## El timo

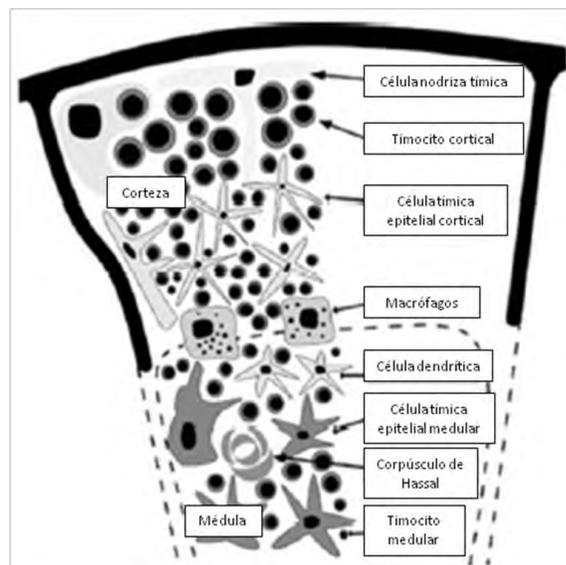
El timo es un órgano linfoide primario donde las células precursoras provenientes de la médula ósea se diferencian y maduran en células T inmunocompetentes (Rev. por Silva *et al.*, 2008). El proceso de timopoyesis o diferenciación intratímica es dirigida esencialmente por las señales del microambiente del timo (Fig.4.), una red tridimensional formada por las células tímicas epiteliales (TEC), células dendríticas, macrófagos, fibroblastos y componentes de la matriz extracelular (Rev. por Savino y Dardenne, 2000). El microambiente permite a los timocitos sufrir el proceso de selección, proliferación y diferenciación, para establecer el repertorio de células maduras, inmunocompetentes que expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) característico de las células T circulantes (Anderson *et al.*, 2001).

Dentro de los lóbulos las células inmaduras  $\text{TCR}^- \text{CD4}^- \text{CD8}^-$  y  $\text{TCR}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$  se localizan en la región cortical, mientras que las células maduras  $\text{TCR}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^-$  y  $\text{TCR}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^+$  se encuentran en la médula (Savino *et al.*, 2004). La migración es compleja, se controla por varias interacciones moleculares, incluyendo aquellas mediadas por la matriz extracelular

(ECM), quimosinas y semaforinas (Savino *et al.*, 2002 y 2004; Takahama, 2006; Lepelletier *et al.*, 2007). Este proceso es regulado, tanto por moléculas de superficie, como por factores solubles derivados del microambiente (Anderson y Jenkinson 2001; Savino *et al.*, 2004). Sin embargo el papel de algunas de estas señales no se conoce. La secuencia compleja de eventos que da lugar a la generación de células T en aves y mamíferos parece estar conservada (Moore y Owen, 1967; Moore, 2004), por lo que la información obtenida hasta ahora proviene tanto de mamíferos como de aves.

En las aves, el timo está conformado por siete lóbulos a cada lado del cuello hasta el tórax, algunas veces el último lóbulo se encuentra embebido en la tiroides. Los estudios histológicos muestran que el timo se divide en corteza y médula, y las células que conforman al tejido son semejantes a las descritas en el timo de los mamíferos.

El timo se desarrolla a partir del endodermo de la 3era bolsa faríngea con las interacciones subsiguientes del mesénquima epitelial y la participación de otros factores como Notch (Parreira *et al.*, 2003). La estratificación del epitelio inicia entre el 7mo y 8vo día de desarrollo embrionario (DE), y al mismo tiempo inicia un incremento en la expresión del MHC II, Delta 1 y el ligando de Notch, que juegan un papel crítico en el desarrollo de las células T (Parreira *et al.*, 2003).



**Fig.4. Estructura del timo de pollo** (Modificado de Ciriaco *et al.*, 2003).

En las aves, el timo parece ser colonizado en tres oleadas de células precursoras. En la 1era, las células troncales migran desde la región paraórtica al timo entre los 6.5 y 8 días de

DE y se pueden observar en el tejido del 11vo día de embrión. Las oleadas subsecuentes se llevan a cabo de en el 12vo y 18vo DE, provenientes de la médula ósea y del bazo (Coltey *et al.*, 1989).

El timo provee del microambiente necesario para la diferenciación de las células troncales en tres distintas subpoblaciones, los linfocitos T cooperadores, T reguladores y T citotóxicos. La conformación del timo es, básicamente, de linfocitos T en distintas etapas de maduración (Fig.4), células epiteliales (TEC), células dendríticas, macrófagos y fibroblastos, que forman la red del microambiente para la proliferación y diferenciación (Kendall, 1980).

La red de las células epiteliales, tanto corticales como medulares (Fig.4), son el principal componente del microambiente tímico y son responsables de la selección positiva de los timocitos. También produce varias citocinas quimosinas y matriz extracelular (ECM) (Savino y Dardenne, 2000). Es un tejido heterogéneo y las células en diferente ubicación de los lóbulos del timo pueden relacionarse con etapas específicas en la maduración de las células T.

Algunos de los cambios durante el desarrollo que se han descrito en el timo, incluyen variaciones en la densidad celular, donde se ha observado que la distinción entre corteza y médula se pierde durante el envejecimiento (Franchini y Ottaviani, 1999).

En pollos de la raza White Leghorn, se ve una reducción progresiva del área cortical, así como en el número de células epiteliales de la corteza y médula entre las 12 y las 24 semanas de desarrollo. Sin embargo, existen datos de que las células remanentes mantienen su capacidad funcional en el órgano (Aita *et al.*, 1995). También se ha observado que las células epiteliales liberan y/o son blanco de varios péptidos, y parece que sufren cambios dependientes de la edad (Kendall, 1980). Se ha determinado que en el timo hay un incremento, dependiente de la edad, en la expresión de receptores, y que su expresión aumenta durante la ontogenia (Franchini y Ottaviani, 1999).

La interacción de las células B, T y células accesorias es necesaria para una respuesta inmunológica óptima. Tanto el timo como la bolsa de Fabricio son de gran importancia para la función inmune de las aves, sobre todo en etapas tempranas de su desarrollo.

## **La Hormona de Crecimiento (GH) y el timo**

Desde 1930 se observó la involución tímica en animales a los cuales se les había sometido a hipofisectomía (Smith, 1930). Se sabe que la GH modula una gran cantidad de procesos en los animales, entre ellas, la proliferación y migración de los timocitos, la secreción de matriz extracelular, quimocinas y hormonas tímicas de las células tímicas epiteliales (TEC, por sus siglas del inglés) (Savino, 2007).

El efecto del aumento en los niveles de la GH en el timo de ratones se ha evaluado en distintos modelos. Y de manera consistente se ha encontrado que la GH aumenta el número de timocitos con respecto a los animales control. En ratones inyectados con GH se observaron de 10-15% más células en fase M, en comparación con su respectivo control (Smaniotto *et al.*, 2004 y 2005). Los ratones tratados con la GH también muestran un aumento en la migración de timocitos. Dicho efecto podría estar mediado por el incremento en la producción de fibronectina y laminina de las células tímicas epiteliales (TEC), que se incrementa en presencia de la GH en TEC en cultivo (de Mello-Coelho *et al.*, 1997). En el timo de mamíferos se ha evaluado de forma extensa el efecto de la GH. En el caso de las aves la información obtenida es menor.

En el timo de las aves el efecto de la GH se ha evaluado en pollos hipofisectomizados, en los que se observó un aumento en el peso del timo (Scanen *et al.*, 1986). En pollos enanos se ha observado que la administración de la GH incrementa significativamente la respuesta inmune humoral (Marsh *et al.*, 1984). También se ha encontrado la presencia del receptor a la GH (Hull y Harvey, 1998), por lo que se explica que el timo sea blanco de la GH.

## **La respuesta inmune en aves**

La respuesta inmune en las aves tiene varias características en común con la respuesta inmune de los mamíferos. Varias infecciones involucran a dos de los tipos de inmunidad: celular y humoral, y en ambos casos las células T están involucradas. Los microorganismos y virus dentro de células fagocíticas pueden liberar antígenos que pueden presentarse en el MHC I de la superficie celular. De esta manera los antígenos se reconocen por receptores de superficie CD8<sup>+</sup> de las células T e inician su división celular y la liberación de sustancias

químicas que matarán a la célula infectada. Los macrófagos también pueden destruir microorganismos invasores y presentar péptidos en sus moléculas de superficie MHC II. Estos péptidos son reconocidos de forma específica por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th1) y empiezan la liberación de citocinas, particularmente interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). De esta manera se estimula a los macrófagos para producir factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico y radicales de oxígeno, lo cual potencia la eliminación de microorganismos. Se ha propuesto que el reconocimiento específico se lleva a cabo gracias a las moléculas CD80 y CD86 que interactúa con el CD28 de la superficie de la célula T.

En el caso de las infecciones de aves causadas por bacterias gram negativas (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*) se han estudiado algunos detalles. La respuesta humoral se ha monitoreado mediante técnicas como la de ELISA (Hassan *et al.*, 1991). Se demostró en experimentos previos, que el suero de pollos de 4 semanas infectados con *Salmonella typhimurium* presentan títulos altos de anticuerpos específicos (IgM, IgG, IgA) contra las proteínas del flagelo y membrana de la bacteria una semana después de la infección (Barrow, 1992). Las bacterias gram negativas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, contienen lipopolisacáridos (LPS) en la superficie de su pared celular, los cuales también son llamados endotoxinas. Se cree que estas moléculas juegan un papel fundamental en la patogénesis causada por la invasión de estas bacterias (Rietschel, *et al.*, 1994). La estimulación de los macrófagos con LPS resulta en la producción de varias citocinas y lípidos proinflamatorios (prostaglandinas, leucotrienos, entre otros), lo que se conoce en conjunto como respuesta inflamatoria (Beutler y Rietschel, 2003). La respuesta inflamatoria aguda que se observa durante una infección se caracteriza por vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, activación y reclutamiento de neutrófilos y fiebre (Rosenberg y Gallin, 1999). La fiebre en respuesta a la infección está muy conservada evolutivamente (Kluger *et al.*, 1975) incluyendo a los vertebrados.

En la actualidad se conocen bien a los mediadores locales y sistémicos que generan la fiebre. Estos factores se conocen como citocinas inflamatorias, tales como el TNF- $\alpha$ , la interleucina-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  que son liberadas por neutrófilos y por monocitos/macrófagos, entre otros. La IL-1 y el TNF- $\alpha$  activan al estroma adyacente y el endotelio para que liberen una segunda oleada de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, así como citocinas quimiotácticas como IL-8 y la proteína quimiotáctica para monocitos (Monocyt Chemotactic Protein) (Baumann y Gauldie,

1994). El TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6 funcionan en el organismo como pirógenos endógenos, afectando el mecanismo de regulación de la temperatura por el hipotálamo. El TNF- $\alpha$  es un importante mediador de la inmunidad celular contra bacterias y parásitos, así como estimulador de neutrófilos (Ostberg *et al.*, 2000). Estas citocinas también provocan respuestas sistémicas como la estimulación de los hepatocitos para liberar proteínas de fase aguda (Baumann y Gauldie, 1994).

Las infecciones y traumas en el organismo además de producir inflamación, también generan claras alteraciones en el eje de la hormona de crecimiento–factor insulinoide tipo1 (GH-IGF-I) tal y como se ha observado en modelos animales y en humanos (Lang, *et al.*, 1996 y 1997). En ratas se encontró que la administración de LPS induce cambios en el sistema de IGF, esencialmente idéntico al que se produce durante la infección con bacterias gram negativas (Lang, *et al.*, 1996). En humanos la administración de LPS aumenta los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  2 horas después de su administración, mientras que la IL-6 tuvo un aumento máximo hacia las 3 horas. También provoca una marcada, pero transitoria elevación en la concentración de la GH y un aumento de 2-3 veces en la concentración del cortisol circulante (Lang *et al.*, 1997). Los glucocorticoides pueden ejercer una retroalimentación negativa, disminuyendo la transcripción y la estabilidad del ARNm de las citocinas proinflamatorias (Almawi *et al.*, 1996) Así mismo, se observó una disminución gradual de IGF-I en la circulación, la cual 5 horas después de la administración disminuyó 20% en comparación con los individuos control (Lang *et al.*, 1997).

Los estudios acerca del efecto de LPS y su mecanismo de acción en las aves son limitados en comparación con la cantidad de estudios realizados en mamíferos. Se sabe que los pollos son más resistentes a las endotoxinas de bacterias gram negativas (Roeder *et al.*, 1989). Sin embargo existen estudios que demuestran que es posible inducir una respuesta inflamatoria en pollos (Xie *et al.*, 2000). El efecto del LPS en el sistema inmune se lleva a cabo gracias al reconocimiento en los receptores TLR's, por sus siglas del inglés: Toll-like receptor, y se expresan en las células B (Akira *et al.*, 2001; Kawai y Akira, 2006). La administración de LPS estimula la producción de TNF- $\alpha$  en pollos, al igual que en mamíferos, sólo que su actividad máxima se observó hasta las 6 horas, a diferencia de lo observado en humanos (Lang *et al.*, 1997) y roedores (Roeder *et al.*, 1989) que fue a las 3 horas. Esta diferencia puede explicarse por la diferencia de especies, así como por la resistencia que las aves presentan a

los lipopolisacáridos, como se señaló anteriormente (Roeder *et al.*, 1989). Pero en general los mecanismos con los que responden las aves son igual a los de mamíferos durante una respuesta inflamatoria (Gehad *et al.*, 2002). Durante la endotoxemia, la primera citocina en aparecer es el TNF- $\alpha$ , que aparece a las 2 horas de la administración de LPS, siguiéndole IL-1 e IL-6 (Givalois *et al.*, 1994; Ottaway *et al.*, 1998). El TNF- $\alpha$  puede mediar la respuesta a la exposición de LPS, como la fiebre, cambios metabólicos y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) (Perlstein *et al.*, 1993).

En las aves se ha observado que el LPS activa el HPA, incrementa los niveles de glucocorticoides circulantes, que a su vez inhiben la secreción de varias citocinas, lo que evita que exista una sobreactivación del sistema inmune (Gehad *et al.*, 2002). En humanos este efecto se ha estudiado más ampliamente, la activación de este eje es notoria por el aumento transitorio de la GH. La GH es un potente estimulador de la expresión de IGF-I (Schwander *et al.*, 1983; Bichell *et al.*, 1992), y aunque el aumento de GH pueda llegar a estimular la producción de IGF-I, su concentración tiende a disminuir gradualmente, tanto en humanos como en roedores, después de 4-6 horas. Esto último se explica debido al efecto de resistencia a GH que existe en el tejido hepático, tal como se ha observado en ratas sometidas a endotoxemia, en las que se observa una disminución en la síntesis de ARNm del receptor a la GH en el hígado (Defalque *et al.*, 1999).

La regulación neuroinmunoendócrina se ha estudiado ampliamente en los últimos años, y ha mostrando que el funcionamiento de estos sistemas tiene una comunicación bidireccional que permite la homeostasia del organismo. Por lo anterior, el objetivo de varias investigaciones se ha relacionado con localización de moléculas descritas previamente en otros sistemas. Por ejemplo citocinas en el sistema endócrino, neurotransmisores y hormonas en el sistema inmune.

Resultados previos mostraron la presencia de la GH, su receptor y el ARNm de esta hormona, en los tejidos inmunes de aves post-eclosión (Render *et al.*, 1995; Hull *et al.*, 1996; Luna *et al.*, 2005). Así mismo se han caracterizado algunas de las células responsables de la síntesis de la GH en la bolsa de Fabricio (BF) (Luna *et al.*, 2008). Sin embargo aún no se ha determinado cuál es el papel que la GH desempeña en estos tejidos y si existe un cambio en su localización durante el desarrollo, que se correlacione con la fisiología de estos órganos linfoides.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han encontrado suficientes evidencias sobre la presencia de variantes de carga y de masa para la GH tanto en adenohipófisis (Arámburo *et al.*, 1990, 2001a; Houston y Goddard, 1988), como en plasma (Montiel *et al.*, 1992). En el caso de los órganos del sistema inmune del pollo, como bazo, bolsa de Fabricio y timo, se encontró evidencia sobre la presencia, tanto del ARNm de la GH, la presencia del receptor de esta hormona (Render *et al.*, 1995; Hull *et al.*, 1996), y se determinó la concentración total de la GH mediante radioinmunoensayo en los tejidos inmunes de animales de 4 semanas. En resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, además de corroborar la presencia de la GH en los diferentes tejidos inmunes, se determinó que esta hormona se modifica con respecto a la edad en la bolsa de Fabricio de pollos. Por otra parte, se observó que al igual que en la hipófisis también presenta un patrón de heterogeneidad molecular (Luna *et al.*, 2005). Las evidencias anteriores sugieren que la GH es sintetizada localmente en el bazo, la BF y el timo, donde posiblemente desempeña un papel importante, ya sea mediante una acción paracrina y/o autocrina. Hasta ahora se sabe que existe la GH, su ARNm y el receptor a la GH en estos tejidos, aunque aún no está completamente definido el papel de la GH que se sintetiza localmente y no se conoce cuál es el linaje celular específico que lleva a cabo su síntesis en la BF y el timo, ni la concentración de la GH en el timo. Todavía quedan muchas interrogantes por contestar, ya que aún cuando ya se ha demostrado la presencia extrahipofisiaria de la GH, existen pocos trabajos que demuestren claramente cuál es el papel de esta hormona sintetizada de forma local. Más aún, existe la duda si en realidad es relevante la síntesis de la GH de manera extrahipofisiaria, ya que todas las evidencias señalan que la hormona que se produce en la hipófisis es 1000 veces mayor a la detectada en los distintos tejidos extrahipofisiarios.

Por lo anterior, este trabajo permitirá avanzar en la caracterización y en el entendimiento del papel fisiológico que desempeña la GH local (paracrino y/o autocrino) en los tejidos linfoides primarios en pollo.

### **3. HIPÓTESIS GENERAL**

La GH que se expresa en órganos primarios del sistema inmune de pollo puede tener una actividad a nivel local, con implicaciones funcionales sobre la respuesta inmunológica.

#### **3.1 Hipótesis Particulares**

- ✓ La GH se expresa específicamente en ciertos linajes celulares de los órganos del sistema inmune.
- ✓ Esta proteína presenta un patrón de heterogeneidad molecular en los tejidos inmunes.
- ✓ Los niveles de la GH y sus variantes moleculares pueden cambiar durante el desarrollo o en respuesta a un reto inmunológico.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Localizar y caracterizar la presencia de la GH en órganos primarios (bolsa de Fabricio y timo) del sistema inmune de pollo.

#### **4.1 Objetivos Específicos**

Determinar en órganos inmunes primarios de pollo:

- ✓ La distribución celular del ARN mensajero de la GH durante el desarrollo.
- ✓ La distribución celular de la GH durante el desarrollo.
- ✓ La concentración de la GH.
- ✓ El patrón de heterogeneidad molecular de la GH.
- ✓ La concentración de la GH de pollos sometidos a un estímulo inflamatorio con lipopolisacárido (LPS).

### **5. ESTRATEGIA**

- ✓ Determinar la localización del ARN mensajero de la GH mediante hibridación *in situ*.
- ✓ Definir el tipo celular que produce la GH por inmunohistoquímica.
- ✓ Obtener los extractos a partir de la bolsa de Fabricio y timo, de diferentes edades, en animales control y en animales con una respuesta inflamatoria.
- ✓ Cuantificar proteínas por el método de Bradford y la concentración de la GH mediante ELISA.
- ✓ Determinar las variantes moleculares utilizando SDS-PAGE/Western blot en condiciones reductoras y no reductoras.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

Se utilizaron pollos Ross machos de diferentes edades (15DE, 18DE, 1d; 2, 4, 10 y 20 semanas), al menos 10 animales por edad. Los pollos se mantuvieron con ciclos de luz-oscuridad de 12 h/12 h, con agua y alimento *ad libitum*, antes de sacrificarlos. Las sales y los solventes empleados fueron de J.T. Baker (Xalostoc, México), SIGMA Chemical Co. (St. Louis MO), Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ), los reactivos de biología molecular fueron: Invitrogen (Carlsbad CA), Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) y BIO-RAD (Hercules CA). El resto de los reactivos utilizados fueron todos de grado analítico.

### 6.2 Métodos

#### 6.2.1 Preparación de las muestras

##### 6.2.1.1 Animales y tejidos del sistema inmune.

Huevos fertilizados White Leghorn se incubaron a 38° C en una atmósfera húmeda. Los huevos se rotaron un cuarto de revolución cada 50 min durante la incubación. Los tejidos inmunes, bolsa de Fabricio (BF) y timo, de embriones de 15 y 18 días de desarrollo embrionario (DE), se extrajeron mediante disección, se congelaron y almacenaron inmediatamente a -70 °C, o se fijaron en sublimado de Bouin-Hollande durante 48-72 h a temperatura ambiente. Los tejidos fijados se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (50-100%) y se incluyeron en parafina, para obtener cortes de 5-7 µm.

Los animales post-eclosión (1 día, 2, 4, 10, 20 semanas) fueron sacrificados por decapitación. Los tejidos inmunes se obtuvieron mediante disección y se congelaron de inmediato (-70° C) o se fijaron en sublimado de Bouin-Hollande, como se mencionó anteriormente.

##### 6.2.1.2 Obtención de los extractos.

Los tejidos se homogeneizaron y el extracto se obtuvo al agregar, en una proporción de 1/10 p/v, amortiguador de extracción (Tris 50 mM, pH 9) con un coctel de inhibidores de proteasas (Mini-Complete, Roche Mannheim, Germany) y 1 mM PMSF. La extracción de la GH se

realizó con agitación, a 4°C, durante 2 h. El sobrenadante se recuperó mediante centrifugación (30 min, a 12,500 rpm en una centrifuga Beckman modelo TJ-6 rotor Beckman TH-4) a 4°C.

#### **6.2.1.3** Cuantificación de proteínas.

En los extractos se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976). Las lecturas de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro (Beckman DU 640), a 595 nm, usando albúmina sérica bovina como estándar. Este ensayo tiene una sensibilidad de 0.5 µg, un intervalo útil de medición de 1 a 25 µg de proteína, y un coeficiente de variación intra e interensayo menor al 5% (1.0 y 1.3%, respectivamente).

#### **6.2.1.4** Histología de la bolsa de Fabricio con hematoxilina y eosina (HyE).

Secciones seriadas de los tejidos fueron desparafinadas en Citrisolv (Fisher) 3 veces (3X, 5 min c/u), se rehidrataron en un gradiente de etanol (100-50%, 5 min en c/u) y se lavaron en agua desionizada (5 min). Las preparaciones histológicas se incubaron 3 min en hematoxilina de Harris (hematoxilina Merck, Darmstadt, Germany al 0.5% en etanol, con 10% de sulfato de aluminio y potasio Sigma, St. Louis, MO., 0.25% óxido rojo de mercurio II Aldrich, St. Louis, MO), se lavaron con agua por 1 min y después se sumergieron rápidamente (5X) en agua amoniacal (NH<sub>4</sub>OH al 1% en agua desionizada) y se lavaron nuevamente con agua (1 min). Después las preparaciones se incubaron (15 s) con eosina Y (Sigma) 0.25% en alcohol al 60% acidificado, se lavaron con agua y se deshidrataron en un gradiente de etanol (50-100%, 1 min en c/u). Posteriormente se sumergieron en xilol (3X) antes de montarlas de forma permanente utilizando resina Entellan (Merck).

#### **6.2.1.5** Histología de las células epiteliales de la bolsa de Fabricio con azul alcian (AA).

Preparaciones histológicas rehidratadas como se describe previamente, se incubaron (3 min) en ácido acético al 3% y después en una solución de azul alcian (1% p/v de alcian blue 8GX Sigma, St. Louis, MO., en ácido acético glacial al 3%, pH 2.5) durante 45 min, para teñir a las células con alto contenido de mucopolisacáridos (Phillips *et al.*, 2004). Después, las preparaciones se lavaron en agua 2 min y se montaron para su observación en el microscopio.

## **6.2.2 Expresión del gen de la GH en bolsa de Fabricio y timo**

Para determinar la presencia y distribución del ARNm de la GH, se montó la técnica de hibridación *in situ*. Los tejidos se fijaron en sublimado de Bouin-Hollande (BHS) por 48 horas, ó paraformaldehído (PFA) al 4% toda la noche, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se realizaron cortes (5-7µm) que se procesaron mediante hibridación *in situ* (Baudet *et al.*, 2003).

### **6.2.2.1 Preparación de las sondas.**

El cDNA de la GH, se obtuvo mediante RT-PCR a partir del ARN total extraído de hipófisis de pollo (7s) con Trizol (Invitrogen). El ARN total libre de ADN se sometió a transcripción reversa utilizando 15 U de Thermoscript (Invitrogen), 2.5 µM de Oligo(dT)20, desoxiribonucleótidos trifostafato (1mM), amortiguador de síntesis para cDNA (1X), ditiotreitól (5mM) y 40 U de Rnase OUT (Invitrogen). La mezcla se desnaturalizó (5 min a 65°C) y se incubó a 59° C durante 1 hora. La reacción terminó con 5 min de incubación a 85° C, entonces se eliminó el templado de ARN utilizando RNase H (Invitrogen) a 37° C por 20 min. Como control negativo se utilizó ARN en ausencia de Thermoscript. El ADN complementario (ADNc, 1µl) se amplificó utilizando los oligos GH3 (5'-CGTTCAAGCAACACCTGAGCAACTCTCCCG-3') y GH5 (5'-GCCTCAGATGGTGCAGTTGCTCTCTCCGAA-3') diseñados para amplificar un fragmento de 690 pb (Render *et al.*, 1995). El ADNc amplificado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1.5% p/v) teñidos con bromuro de etidio y se observó con luz UV en comparación con el marcador de pares de bases. Posteriormente, el ADNc se purificó (Purification Kit de Qiagen), y se subclonó en el vector pCR 4BluntTOPO (Invitrogen). El vector se introdujo en células de *Escherichia coli* (TOP10F' One Shot chemically competent de Invitrogen). Las células se sembraron en placas de cultivo con medio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0.5% extracto de levaduras, 1% NaCl, pH 7) con 50 µg/ml de kanamicina o penicilina y se incubaron a 37° C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron 10 colonias del cultivo y se sembraron nuevamente en placas de medio LB con kanamicina y se incubaron durante 14 horas a 37° C. Cada colonia se sometió a amplificación por PCR, usando los oligonucleótidos GH3 y GH5, y el producto se observó en geles de agarosa. Después de 14 horas colonias individuales se cultivaron en 10 ml de medio LB/kanamicina y se incubaron a 37° C con agitación vigorosa por 8 h. Los cultivos celulares se centrifugaron, se desecho el medio de cultivo y el precipitado de células se utilizó para purificar el vector (HiSpeed Plasmid MidiKit

de Quiagen). Los insertos del vector se aislaron mediante digestión con *EcoRI* (Gibco) y se visualizaron en geles de agarosa con bromuro de etidio. Los insertos se secuenciaron utilizando oligonucleótidos T7 (DNA Core Facility, University of Alberta) y la secuencia se analizó con el software BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA). El vector se linearizó con las endonucleasas de restricción *Pst* I y *Not* I para la producción de las sondas antisentido y sentido, respectivamente. Las sondas marcadas con digoxigenina (DIG) se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* con T7 y T3 ARN polimerasa respectivamente, y la mezcla de DIG RNA labeling (Roche Diagnostics) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La concentración de las sondas se determinó mediante la técnica de dot blot, utilizando como referencia ARN marcado con DIG (Roche) de concentración conocida.

#### **6.2.2.2** Hibridación *in situ*.

Las secciones de tejido (6-7µm) se colocaron en laminillas como se mencionó anteriormente, se desparafinaron con Citrisolv (Fisher), se rehidrataron en un gradiente de etanol (100-50%) y se lavaron en agua con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC) y en PBS-DEPC. Después, las preparaciones histológicas se incubaron en PBS-DEPC recién preparado (2X15 min); para remover Rnasas, se trataron con proteinasa K (10 µg/ml, 10 min, 37° C), se post-fijaron en PFA al 4% (10 min), y se incubaron con 0.1 M de trietanolamina (pH 8) por 10 min. Las preparaciones se prehibridizaron (30 min, 60° C) con 50% de formamida/2X de solución salina de citrato de sodio (SSC) en una cámara húmeda. A continuación se incubó (16 h, 60° C) con la solución de hibridación (50% formamida, 2X SSC, 250 g/l tRNA, heparina, solución bloqueadora y la sonda antisentido o sentido marcada con DIG a una concentración de 2 µg/ml previamente desnaturalizadas 5 min a 80°C). Posteriormente se realizaron lavados consecutivos en 2XSSC (10 min), 2XSS/50% formamida 45 min a 45° C, 2XSSC (3X15 min), 2XSS (30 min a 37° C), 0.1XSSC (60 min, 60° C). Las preparaciones se lavaron (2X5 min) en amortiguador uno (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5), y la detección inmunohistoquímica de las sondas se realizó incubando (2h) con un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) en 1% de solución bloqueadora. Después, las preparaciones se lavaron en amortiguador uno (2X15 min), se equilibraron 5 min en amortiguador dos (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5), y se incubaron con un sustrato comercial para fosfatasa alcalina [5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y cloruro de tetrazolium nitro azul (NBT), Roche] en amortiguador dos hasta que el precipitado es evidente. La reacción se detuvo

lavando las preparaciones con amortiguador de Tris-EDTA (2X5 min). Al final las secciones se lavaron con PBS (3X15 min) y se montaron con un medio acuoso. Las secciones de hipófisis se trataron de forma similar, aunque con una concentración de las sondas de 200 ng/ml, y la señal observada en el lóbulo caudal (CA) proporcionó nuestro control positivo como parámetro de comparación.

### **6.2.3 Localización de la GH en bolsa de Fabricio y timo**

#### **6.2.3.1 Inmunohistoquímica.**

Para determinar la localización de la GH a nivel celular, los tejidos se fijaron con sublimado de Bouin-Hollande (BHS), por 48 h. Posteriormente los tejidos se deshidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente, desde 60% hasta alcohol absoluto, una mezcla xilol/etanol 1:1, xilol concentrado y, finalmente los baños de parafina. Los tejidos se incluyeron en bloques de parafina y se obtuvieron de dos a tres cortes seriados de 5-7  $\mu\text{m}$ , que se montaron sobre laminillas de alta fijación (superfrost), utilizando un baño de agua tibia con gelatina (0.03%). Las preparaciones histológicas se desparafinaron en un gradiente de solventes: xilol 100%, xilol 100%, etanol 95%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada, 5 min en cada uno. Después se continuó con lugol (para eliminar el mercurio del fijador BHS), tiosulfato de sodio 5% (para eliminar el yodo del lugol), y agua destilada, 2 min en cada solución. Posteriormente se incubó durante 1 h con una solución salina amortiguada con Tris 50 mM pH 7.6 (TBS), 50% metanol y 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  para eliminar la peroxidasa endógena. Al término de la hora se realizó un lavado con TBST (TBS con 0.1% de Triton X-100) y se incubó 1 h con leche descremada al 3% en TBST, como agente bloqueador. Se lavó con TBST y se eliminó el exceso de líquido para transferir las preparaciones a una cámara húmeda. A cada preparación histológica se le agregaron 500-750  $\mu\text{l}$  de anticuerpo primario policlonal contra GH de pollo (anticuerpo C1, generado contra GH recombinante de pollo, 1:200 en TBST con 1% de leche descremada [Arámburo *et al.*, 1989]) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se conservaron una o dos preparaciones histológicas sin anticuerpo como controles negativos. Al día siguiente, se lavaron con TBST (3X10 min). Posteriormente, se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario (1:200 en TBST-leche 1%). Una de las preparaciones sin anticuerpo primario se utilizó como control negativo para verificar la presencia de peroxidasa endógena o tinción excesiva inespecífica de fondo, por lo que no se le adicionó el anticuerpo secundario. Las preparaciones se lavaron con TBS y se

revelaron en solución de diaminobencidina (0.025 g de DAB en 100 ml TBS 1x, 35  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) recién preparada, dejando que la reacción procediera por 10-30 min hasta que el precipitado café fue evidente a simple vista. Los controles negativos se incubaron 15 min adicionales para garantizar la ausencia de señal. La reacción se detuvo lavando con TBS.

La solución de DAB se desechó en un contenedor al que se adicionó hipoclorito (cloro). Las preparaciones se deshidrataron de nuevo, desde alcohol hasta xilol, y se montaron con resina (Entellan), para preservarlas.

De forma alternativa, algunas de las preparaciones fueron inmunoteñidas para determinar la presencia de células IgG<sup>+</sup> con un anticuerpo (Ac) específico contra IgG (anti-IgG de pollo/pavo generado en conejo 1:200, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) y un Ac secundario marcado con peroxidasa (anti IgG de conejo generado en cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante, 1:200). Las preparaciones se revelaron con DAB y preservaron como se indica previamente.

#### **6.2.4 Co-localización de la GH en bolsa de Fabricio**

Así mismo se utilizaron cortes histológicos, previamente rehidratados como se menciona antes, para realizar la co-localización de células inmunoreactivas (IR): GH-IgG, GH-IgM, mediante inmunofluorescencia. Para las células GH-IgG positivas se determinó su proporción de co-localización con el programa MetaMorph (Meta Imaging Series Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando el método descrito previamente por Ramírez-Amaya *et al.*, 2005 y 2006.

Las células IgG<sup>+</sup> fueron teñidas con un Ac primario de conejo anti-IgG de pollo/pavo, 1:200 y un Ac secundario contra IgG de conejo generado en cabra marcado con isotiocianato de fluoresceína 1:100 (FITC, verde); y las células GH<sup>+</sup> con un Ac primario monoclonal de ratón anti-GH (ascitis del hibridoma IH7, Berghman *et al.*, 1988) 1:100, y un Ac secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a rodamina (TRITC con rojo, 1:100) en los folículos bursales. La co-localización en las células linfoides se determinó por el color amarillo después de la superposición de las imágenes obtenidas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 con laser a las longitudes de onda de excitación de 488 nm (FITC), 514 nm (TRITC) y 561 nm (Cy3).

Para la co-localización GH-IgM (amarillo), se marcó a las células IgM<sup>+</sup> con un Ac primario de cabra anti-IgM de pollo [específico para la cadena  $\mu$ ] conjugado con fluoresceína (FITC, verde), Rockland, Gilbertsville, PA., 1:200), y las células cGH<sup>+</sup>, con un Ac primario policlonal de conejo anti-GH de pollo [C1] 1:200, y un Ac secundario de cabra anti-IgG de conejo acoplado a Cy3 (rojo, Zymed, 1:2000). La co-localización se determinó en condiciones similares a las anteriores en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510.

En ambos casos los núcleos celulares se tiñieron con el colorante de contraste 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300 nM en PBS) y se observó utilizando un laser multifotónico (Coherent-XR) a una longitud de onda de 350 nm o alternativamente con otro laser (META) a 650 nm.

## **6.2.5 Cuantificación de la hormona de crecimiento (GH)**

### **6.2.5.1 Ensayo de ELISA.**

De cada extracto se cuantificó la GH mediante el ensayo inmunoenzimático, ELISA indirecto por competencia, previamente estandarizado en el laboratorio (Martínez-Coria, *et al.*, 2002). El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se forraron las placas de inmunoanálisis (Dynatech-Immulon de 96 pozos) con una solución de antígeno (12 ng de GH recombinante de pollo en 10 ml de amortiguador de carbonatos, 0.1 M pH =10.3) y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Simultáneamente, se prepararon las muestras y las diluciones del estándar para la curva patrón, que se incubaron (16 h, 4°C) con un anticuerpo policlonal de conejo contra la GH (1:100,000) en amortiguador TPBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH=7.5, Tween 20 0.05%) con 1% de leche descremada. Después de la incubación, se lavaron las placas con TPBS en un lavador automático (Bio-Rad, modelo 1250) y se bloquearon con TPBS y 3% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las placas con TPBS y se agregaron 100  $\mu$ l de las muestras (90  $\mu$ g de proteína) y la curva estándar (0.5 a 1024 ng de GH recombinante de pollo) previamente incubadas con el anticuerpo contra GH recombinante de pollo, a cada pozo para establecer la competencia durante 2 h. Concluidas las 2 h, se lavaron nuevamente las placas para agregar 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario (dilución 1:3,000, cabra anti-IgG acoplado a peroxidasa de rabano picante, *Bio-Rad*) en TPBS y 1% de leche descremada, se incubó

durante 2 h a temperatura ambiente y se volvió a lavar con TPBS. Finalmente se reveló con ABTS (Roche), se agregaron 100 µl por pozo, y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Al término de 30 min se determinó la absorbencia en el lector de placas *Bio-Rad*, Microplate Reader modelo 3550-UV, a 405 nm. Este ensayo tiene una sensibilidad de 4 ng, un intervalo útil de medición de 4 a 256 ng de la GH, y un coeficiente de variación intra e interensayo menor al 5% (3.5 y 3.3%, respectivamente).

## **6.2.6 Caracterización de la GH en bolsa de Fabricio y timo**

### **6.2.6.1 Determinación de la heterogeneidad molecular.**

La observación de variantes moleculares de la GH en la BF y el timo, se realizó mediante la inmunotransferencia de proteínas, previamente separadas por electroforesis en geles al 12.5% de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) reductoras ( $\beta$ -mercaptoetanol 5%) y no reductoras (Laemmli, 1970). Se colocaron 30 ó 40 µg de proteína total, por pozo, de los extractos de BF y timo de distintas edades, y se sometieron a SDS-PAGE. Al término de la electroforesis, los geles se equilibraron en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH=8.3) y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Después, las membranas se lavaron con TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) y se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS (2 h a 37° C). Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS (TBS con 0.05% de Tween 20), y se incubaron con el primer anticuerpo anti-GH CAP1 (1:10,000 en 1% de leche descremada en TTBS) a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS (3X10min) se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano; 1:3,000 en 1% de leche descremada en TTBS) durante 2 h. Al final, las membranas se lavaron con TTBS (3X15 min) y TBS (3X15 min). Para el revelado, primero se incubó por 5 min con solución sustrato ECL (Amersham/Pharmacia) y después se obtuvieron los luminogramas de las bandas inmunoteñidas, al exponer la película (Kodak Biomax) de revelado con las membranas de nitrocelulosa. Las películas se colocaron en una solución de revelado, se lavaron con agua corriente, se sumergieron en la solución de fijador y se lavaron con agua. Finalmente las películas reveladas se dejaron secar y se digitalizaron con un Scanner ScanJet Hewlett Packard. De esta forma se obtiene una imagen con un gradiente de color que va de blanco a negro, donde este último representa la mayor densidad. Con ayuda del

programa IP-Lab Scanalytics se obtiene la densidad óptica del área total de cada banda. Estos datos se graficaron comparando las diferencias entre las distintas bandas inmunorreactivas de los tejidos de distintas edades.

### **6.2.7 Efecto de LPS en la expresión de GH en tejidos inmunes**

#### **6.2.7.1 Administración de LPS.**

Se evaluó el efecto en la expresión de la GH en aves durante una respuesta inflamatoria, que fue inducida mediante la administración de lipopolisacárido (LPS). Los cambios en la concentración de la GH se determinaron en hipófisis, suero y a nivel local en los tejidos inmunes. El experimento se realizó en animales de 4 semanas, a los cuales se les administró intrabraqealmente LPS (5 mg/Kg de peso del animal, *Escherichia coli* 055:B5, Sigma, St Louis, MO), (Leshchinsky y Klasing, 2001; Gehad *et al.*, 2002). Para las determinaciones se colectó la hipófisis, el timo, la BF y el suero a las 2 y 8 h después de la administración del LPS y se analizaron como se mencionó anteriormente mediante la técnica de ELISA. También se construyó una curva de temperatura desde el inicio hasta 8 h después de la administración de LPS.

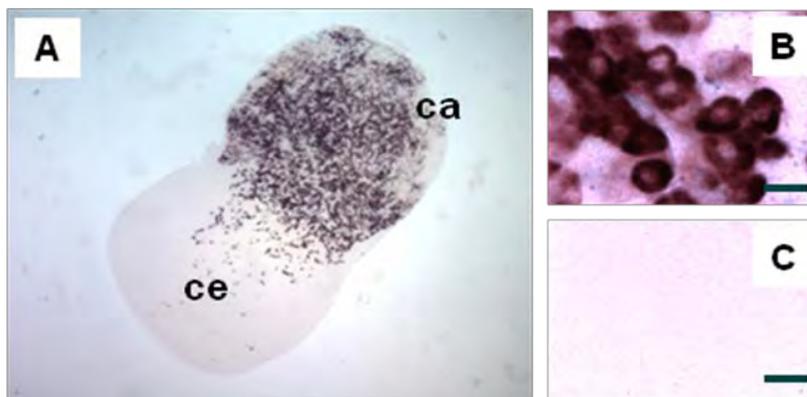
#### **6.2.8 Análisis estadístico**

La cuantificación de proteínas y de GH, así como los experimentos para determinar la heterogeneidad molecular, la expresión de la GH (inmuhistoquímica e hibridación *in situ*), se efectuaron al menos cuatro veces, por duplicado y/o triplicado. En el caso de los ensayos de cuantificación se obtuvo la media y la desviación estándar como medida de la dispersión de los datos. La curva para determinar la concentración de proteínas, se procesó mediante regresión lineal simple (utilizando Microsoft Excel). El análisis estadístico para el ensayo de ELISA se realizó con una ANOVA de una vía y una prueba posthoc (Tukey), que permitió la comparación entre las muestras de los tejidos inmunes (utilizando GraphPad Prism 4). En los tratamientos con LPS se realizó la comparación de las medias de la concentración de la GH de los tejidos y el suero, con su respectivo control, y se determinó la diferencia significativa con la prueba de Dunnett.

## 7. RESULTADOS

**7.1 Estandarización de las técnicas.** Se estandarizó la técnica de hibridación *in situ* (HIS), inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia. Así mismo, se realizaron las curvas patrón para determinar: la concentración de proteínas (método de Bradford), la concentración de la GH (ensayo de ELISA), y la presencia de variantes moleculares de la GH (electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras y no reductoras, y Western blot, datos no mostrados).

**7.1.1 Hibridación *in situ* (HIS).** Para evaluar la expresión del gen de la GH en los tejidos linfoides se realizó H/S, utilizando una ribosonda (sentido y antisentido) marcada con digoxigenina (DIG) específica para el ARN mensajero de la GH. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo contra DIG (1:2,000). Finalmente, las preparaciones histológicas se revelaron utilizando el complejo NBT/BCIP (ver Materiales y Métodos).

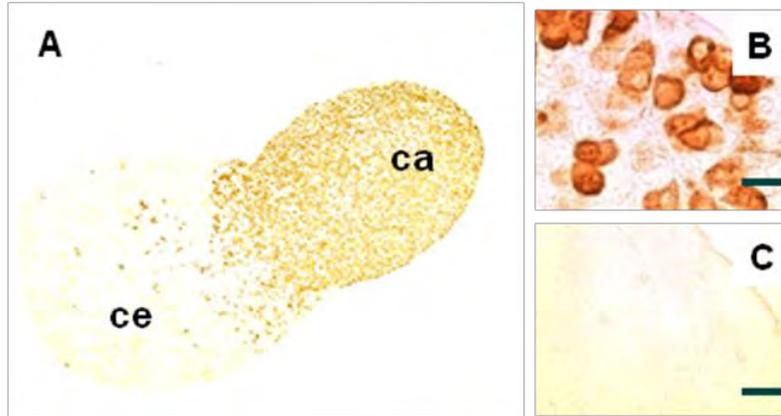


**Fig.5. Hibridación *in situ* del ARN mensajero de la GH en hipófisis de pollo (4 semanas), realizada con una ribosonda marcada con DIG (690 pb).** A) Control positivo (sonda antisentido) hipófisis: lóbulo caudal (ca) y cefálico (ce); B) amplificación del lóbulo caudal; C) lóbulo caudal de la hipófisis tratado con la sonda sentido, utilizado como control negativo. Magnificación A) 4x, B) y C) 100x, barra 10 $\mu$ m.

Se utilizaron, como control, cortes de hipófisis de pollo de 4 semanas, en los cuales se observó (Fig.5) tinción específica positiva en el lóbulo caudal (ca) en presencia de la sonda antisentido (Fig.5A, 5B), pero no se observó señal en el lóbulo cefálico (ce) (Fig.5A), ni en el lóbulo caudal de las preparaciones tratadas con la sonda sentido (Fig.5C).

**7.1.2 Inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia.** Con la finalidad de localizar la distribución de la GH en los tejidos inmunes, se utilizó la técnica de IHQ, en la que se utilizó un anticuerpo policlonal contra la GH (1:200) y un anticuerpo secundario acoplado a

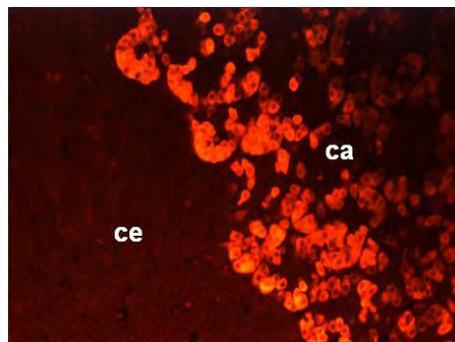
peroxidasa (1:200), y posteriormente se reveló con diaminobencidina (DAB). Durante la estandarización de la técnica se utilizaron, como control, cortes de hipófisis de pollo de 4 semanas, en los cuales se observó (Fig.6) inmunorreactividad en el lóbulo caudal (ca), sitio en el que se encuentran somatotropos. No se observó señal en el lóbulo cefálico (ce; Fig.6A), ni en hipófisis tratada con el anticuerpo preabsorbido (Fig.6C).



**Fig.6. Inmunohistoquímica de la GH en hipófisis de pollo (4 semanas)**, realizada con un anticuerpo policlonal contra GH de pollo. A) Control positivo hipófisis: lóbulo caudal (CA) y cefálico (CE), B) ampliación del lóbulo caudal, C) lóbulo caudal de la hipófisis tratada con el anticuerpo contra la GH previamente preabsorbido con GH recombinante de pollo, utilizado como control negativo. Amplificación A) 4x, B) y C) 100x, barra 10µm.

La distribución de la GH inmunorreactiva (GH-IR) se observó principalmente en el citoplasma de los somatotropos, y se utilizó como control positivo.

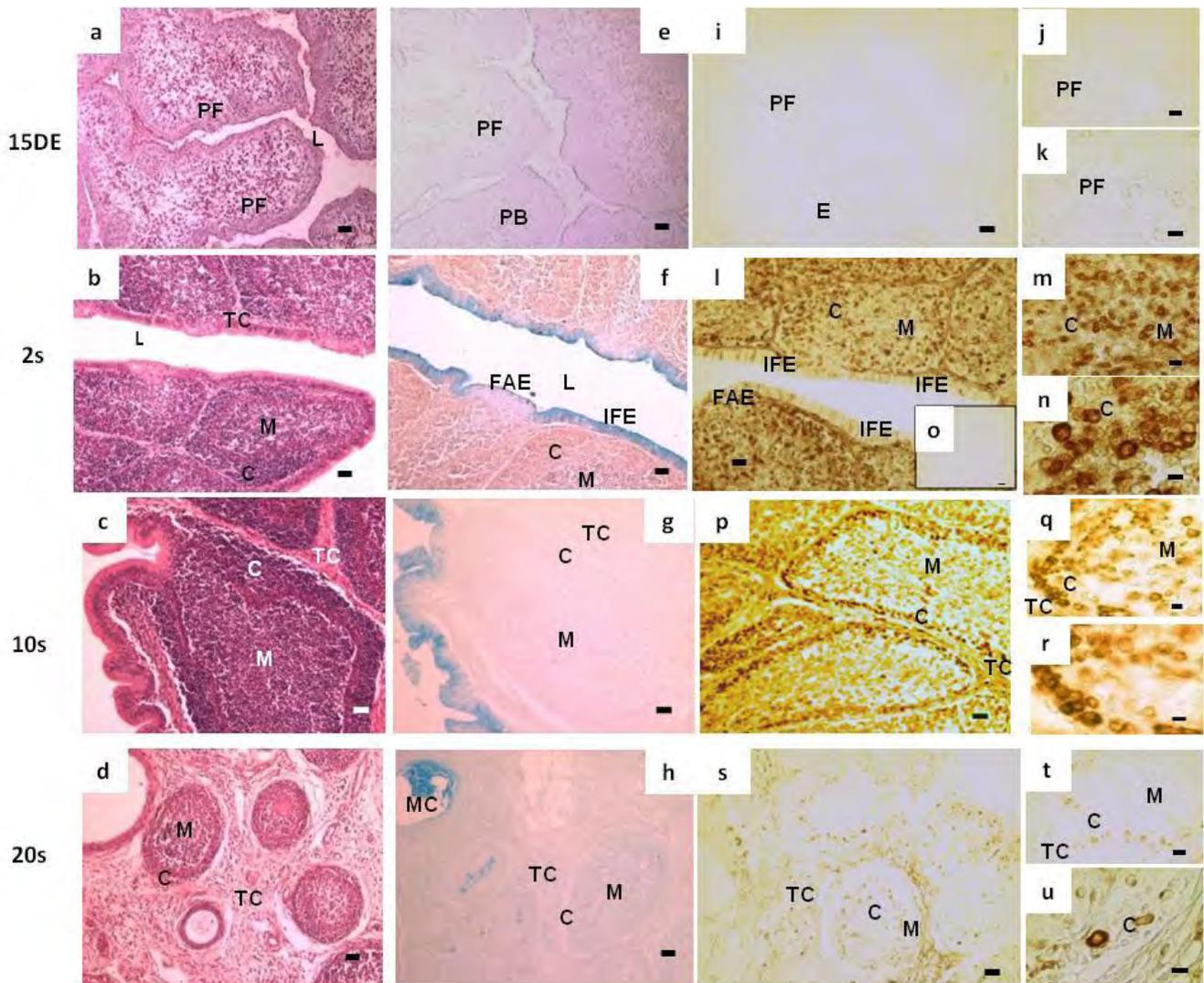
La co-localización de la GH con IgG e IgM, se realizó en los tejidos inmunes con la técnica de inmunofluorescencia, en la que se utilizó un anticuerpo policlonal contra GH (1:200) y un anticuerpo secundario acoplado a TRITC (1:100) o a Cy3 (1:2000). En la hipófisis control se detectó la señal fluorescente a la GH en el lóbulo caudal de la hipófisis (Fig.7).



**Fig.7. Inmunofluorescencia de la GH en hipófisis de pollo (4 semanas)**, realizada con un anticuerpo policlonal contra la GH de pollo y un anticuerpo secundario marcado con TRITC. Lóbulo caudal (CA) y lóbulo cefálico (CE). Amplificación 40x.

## 7.2 Desarrollo e involución de la bolsa de Fabricio

Características de la bolsa de Fabricio en la ontogenia. Para determinar el proceso de involución en la bolsa de Fabricio, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina (Fig.8 a-d), la tinción con azul alcian (Fig. 8 e-h) y la inmunohistoquímica con un anticuerpo contra IgG de pollo (Fig. 8 i-n, p-u).

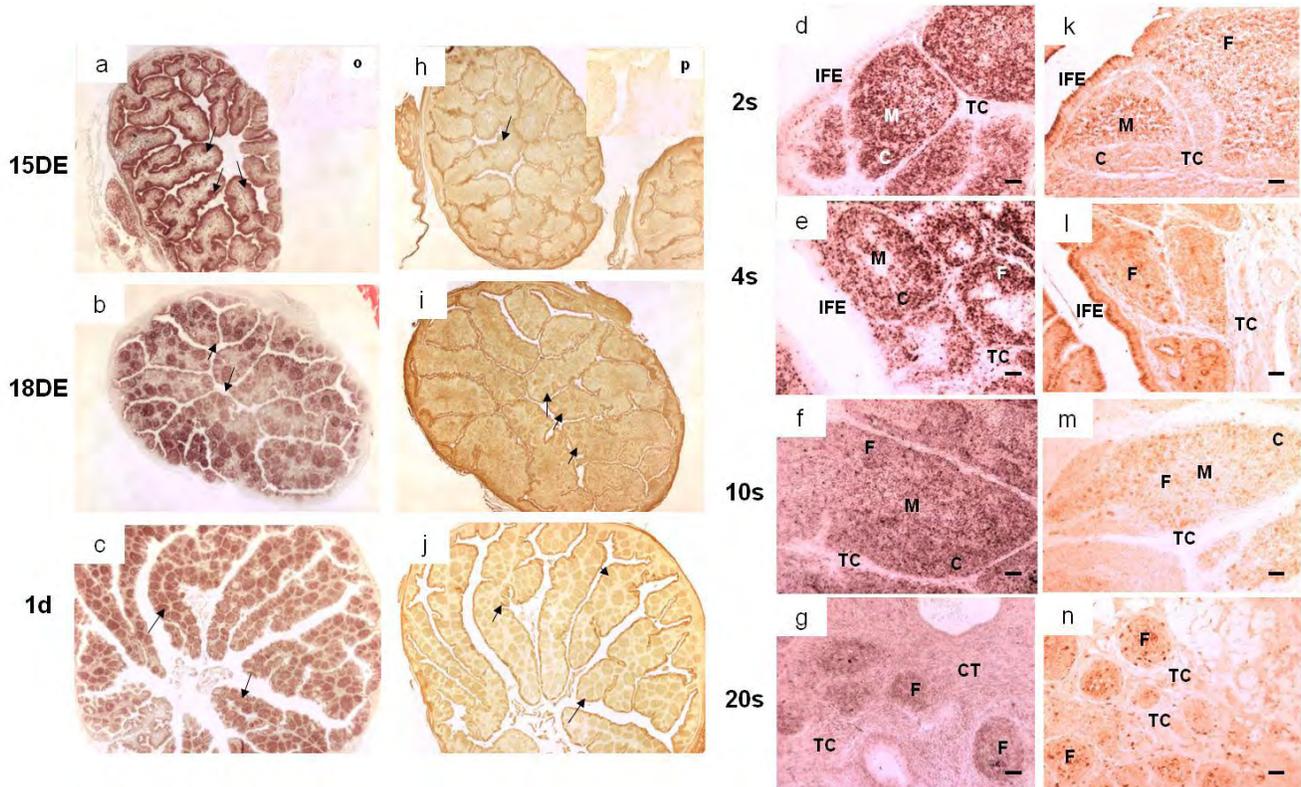


**Fig.8. Cambios histológicos e inmunohistoquímicos de la bolsa de Fabricio de pollo de 15DE (a, e, i, j, k), 2s (b, f, l, m, n), 10s (c, g, p, q, r) y 20s (d, h, s, t, u) observados mediante la tinción con hematoxilina y eosina (a, b, c, d); tinción con azul alcian (e, f, g, h); y mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra IgG de pollo (i-n, y p-u). En o) se observa el control negativo: BF de 2 semanas sin el anticuerpo primario. PB: pliegue bursal; L: lumen; E: epitelio; PF: primordio folicular; TC: tejido conectivo; M: médula; C: corteza; FAE: células epiteliales asociadas al folículo; IFE: células epiteliales interfoliculares; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación en (a–h, i, l, p, s): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (j, m, q, t, o): 40x, barras: 10  $\mu$ m; en (k, n, r, u): 100x, barras 5  $\mu$ m.**

En los tejidos embrionarios se observa la formación de los pliegues bursales (PB), estructuras que en el ave post-eclosión albergarán a los folículos linfoides, sin embargo a esta edad aún no se observan los folículos linfoides (Fig.8a). Otra característica es la presencia de una gran cantidad de células basófilas dentro de los pliegues, que de acuerdo a la literatura (Ratcliffe, 2006) corresponden a células precursoras. Durante el desarrollo embrionario no es posible distinguir entre células epiteliales interfoliculares (IFE) y células epiteliales asociadas al folículo (FAE) (Fig.8e) y la expresión de IgG aún no es muy evidente (Fig.8 i, j, k). A las 2 semanas de desarrollo, la BF presenta miles de folículos linfoides de gran tamaño, con corteza y médula bien definidos (Fig.8b). Así mismo, las zonas epiteliales se diferencian claramente en IFE y FAE (Fig.8f), y las células positivas a IgG son abundantes en todo el folículo (Fig.8 l, m, n). Durante las 10 semanas de desarrollo, la BF muestra folículos bien definidos con abundantes células, principalmente linfoides (Fig.8c), epitelios bien definidos (Fig.8g) y una mayor proporción de células IgG+, principalmente en la zona de la corteza folicular (Fig.8 p, q, r). El cambio es drástico entre la BF de 10 semanas y la de 20 semanas, en ésta última se puede observar claramente el proceso de involución con abundante tejido conectivo y una disminución del tamaño folicular (Fig.8d) en el que la zona correspondiente a la corteza casi ha desaparecido. En esta etapa, también se observa una gran acumulación mucoide (Fig.8h) y una notoria disminución de las células IgG positivas (Fig.8 s, t, u).

### 7.3 Distribución del ARN mensajero de GH y de la proteína en bolsa de Fabricio (BF)

Expresión del gen de GH. Para determinar la expresión del gen de GH en la bolsa de Fabricio, se utilizó una sonda específica para el ARN mensajero de GH y un anticuerpo policlonal contra cGH para determinar la presencia de la proteína (Fig.9).



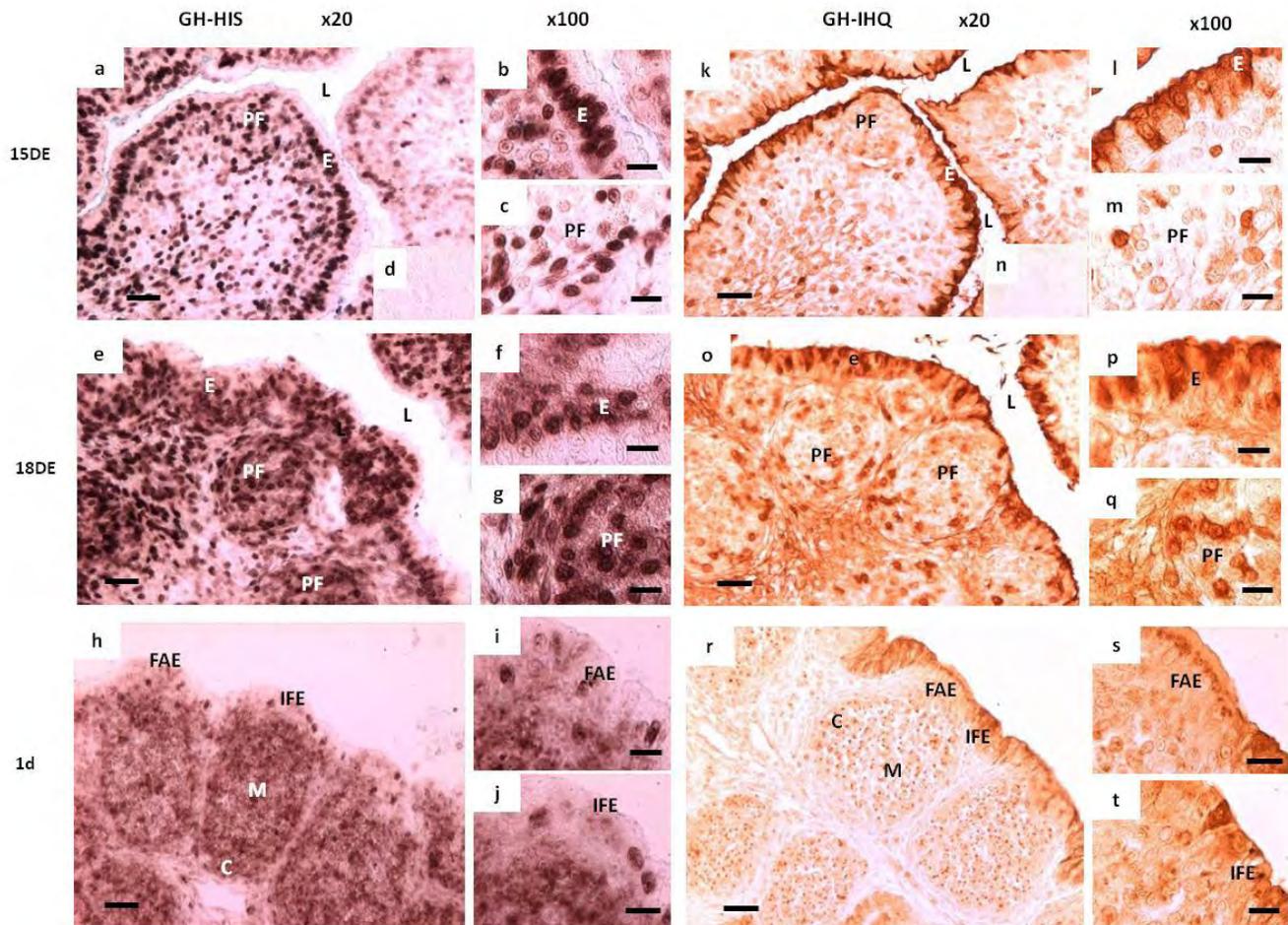
**Fig.9. Determinación de la expresión de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio.** Hibridación *in situ* del ARN mensajero de GH en BF de pollo de 15DE (a), 18DE (b), 1d (c), 2s (d), 4s (e), 10s (f) y 20s (g), realizada con una ribosonda marcada con DIG (690 pb). En (o) se muestra el control negativo: BF tratada con la sonda sentido. Inmunohistoquímica de GH en BF de pollo de 15DE (h), 18DE (i), 1d (j), 2s (k), 4s (l), 10s (m) y 20s (n) realizada con un anticuerpo policlonal contra cGH de pollo. Control negativo (p): BF tratada con el anticuerpo preabsorbido con rcGH. Las flechas señalan los pliegues bursales (PB) con primordios foliculares (PF); IFE: células epiteliales interfoliculares; TC: tejido conectivo; M: médula; C: corteza; F: folículo linfóide; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación en (a-c, h-j): 4x; en (d-g, k-n): 10x, barras 30 µm.

En las imágenes panorámicas se observan cambios dinámicos en la distribución de ARNm de GH y la proteína. Desde los 15 días de desarrollo embrionario (15DE) de la bolsa de Fabricio se observó señal para el ARNm de GH, principalmente en el epitelio folicular de los pliegues bursales (Fig.9a), mientras que la señal para la proteína es mínima y se observó con más intensidad en los epitelios (Fig.9h). A los 18DE ya se alcanzan a observar abundantes primordios foliculares (PF) con señal para el ARNm de GH en el interior de los pliegues (Fig.9b) así como para la proteína correspondiente (Fig.9i). La señal también fue

muy clara en la BF de animales de 1d post- eclosión tanto para el ARNm (Fig.9c) como para la proteína (Fig.9j). A las 2 semanas (Fig.9 d, k), 4 semanas (Fig.9 e, l) y 10 semanas (Fig.9 f, m), también se observó una señal ampliamente distribuida para la GH y su ARNm. Mientras que a las 20 semanas (Fig.9 g, n) se detectó una disminución de la señal del ARNm y de la hormona.

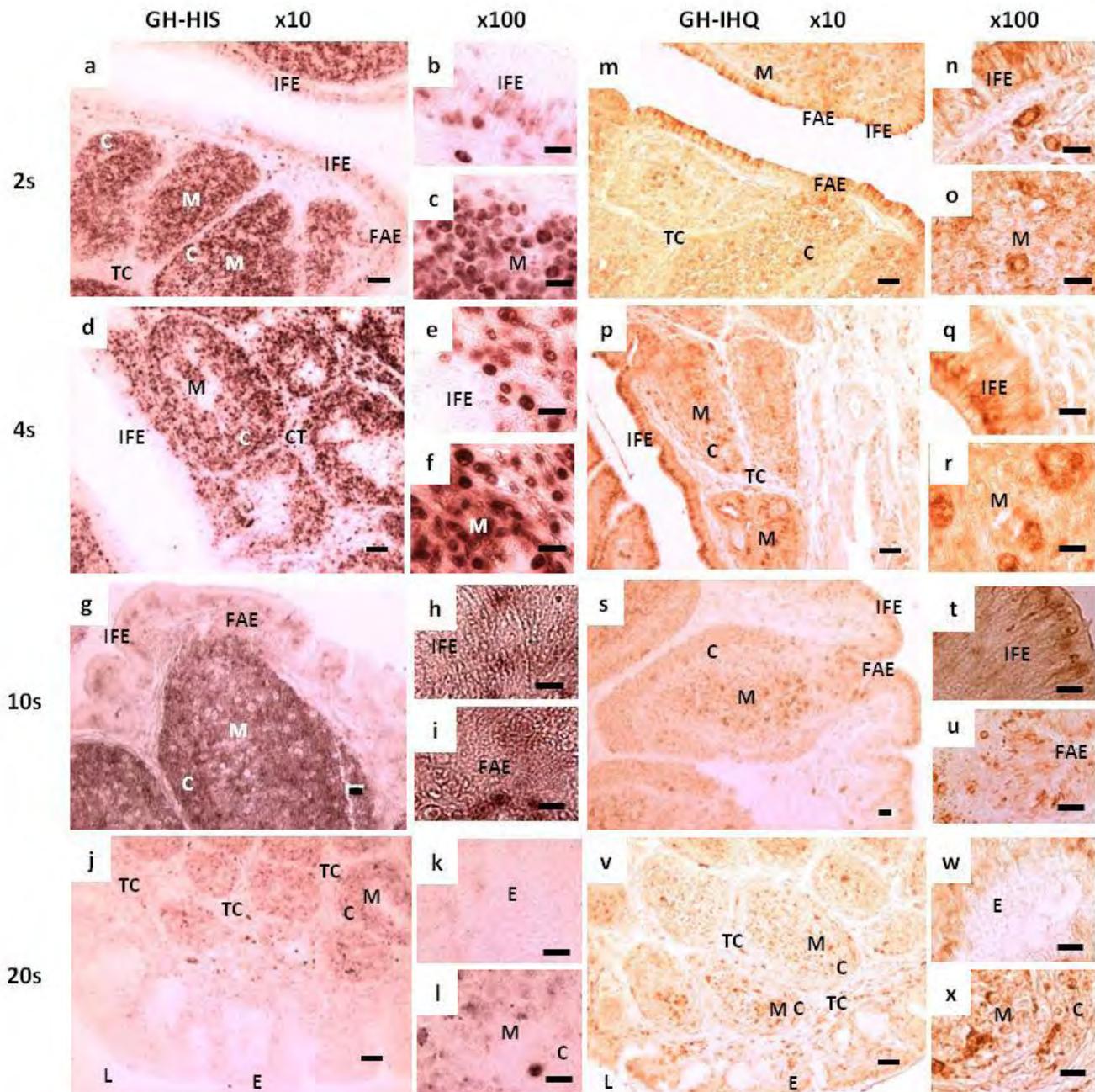
En una amplificación de los campos de la BF (Fig. 10) de 15DE se observó la presencia del ARN mensajero de la GH (Fig.10a) en la región correspondiente al epitelio (Fig.10b) y en las zonas internas de los pliegues (Fig.10c) en los primordios foliculares (PF) que más tarde darán lugar a los folículos maduros. En esta edad la proteína (Fig.10k) se observó principalmente en las zonas del epitelio (Fig.10l) y solo algunas células dentro del primordio bursal contienen a la proteína (Fig.10m).

A los 18DE la marca para el ARNm de GH fue abundante (Fig.10e), tanto en células del epitelio (Fig.10f), como en las células de los primordios foliculares (Fig.10g). En cuanto a la proteína (Fig.10o), esta se encontró principalmente en las células del epitelio (Fig.10p) y hubo un incremento en la inmunoreactividad de la zona del primordio folicular (Fig.10q). En los pollos de 1d post-eclosión (Fig.10h) se observaron cambios en la distribución del ARNm, que disminuyó tanto en las regiones de células epiteliales asociadas al folículo (FAE, Fig.10i), como en células epiteliales interfoliculares (IFE, Fig.10j). Así mismo, se observaron cambios en la distribución de la proteína (Fig.10r): tanto en el interior de los folículos en desarrollo (Fig.10r) como en ambos epitelios (Fig.10 s, t).



**Fig.10. Detalle de la expresión de GH en bolsa de Fabricio (BF) perinatal.** Hibridación *in situ* del ARN mensajero de GH en BF de pollo de 15DE (a, b, c), 18DE (e, f, g) y 1d (h, i, j), realizada con una ribosonda marcada con DIG (690 pb). Como control negativo: BF tratada con la sonda sentido (d). Inmunohistoquímica de GH, realizada con un anticuerpo policlonal contra cGH de pollo en BF de 15DE (k, l, m), 18DE (o, p, q) y 1d (r, s, t). Control negativo (n): BF tratada con el anticuerpo preabsorbido con rGH. L: lumen; E: epitelio; PF: primordio folicular; M: médula; C: corteza; FAE: células epiteliales asociadas al folículo; IFE: células epiteliales interfolliculares; DE: días de desarrollo embrionario; d: días. Amplificación en (a, e, h, k, o, r): 20x, barras: 30  $\mu$ m; en (b-d, f, g, i, j, l-n, p, q, s, t): 100x, barras: 10  $\mu$ m.

En la Fig.11 se observó la HIS de la BF de distintas edades post-eclosión, donde se mostró una disminución gradual de la señal del ARNm de la GH de la BF de las 4 a las 20 semanas de edad. La disminución en la presencia del ARNm de GH y de la hormona coincidió con la involución del tejido a las 20 semanas. A las 2 semanas (Fig.11a) la señal del ARNm se observó en algunas de las células del IFE (Fig.11b) y fue muy abundante en la corteza y médula del folículo linfóide (Fig.11c). En esta edad, la distribución de la GH (Fig.11m) coincidió con la del ARNm, tanto en el IFE (Fig.11n) como en el folículo (Fig.11m).

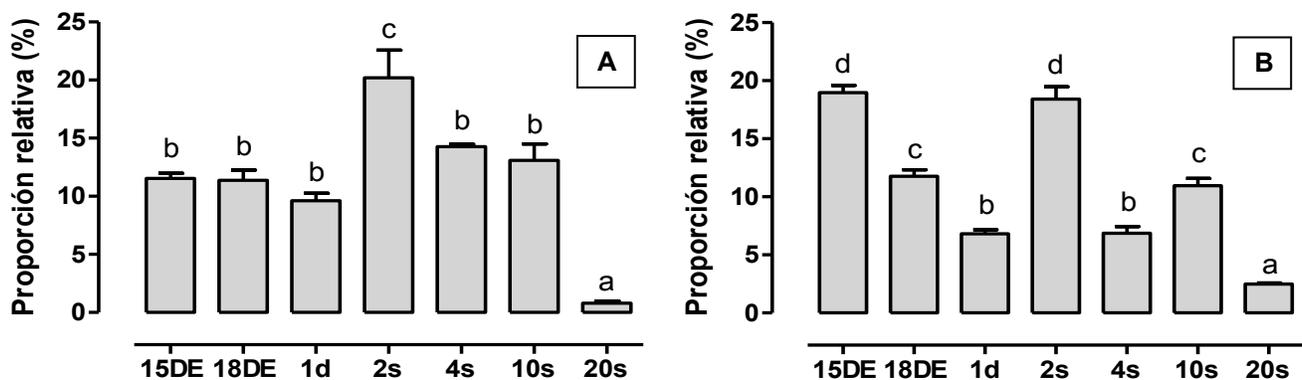


**Fig.11. Expresión de la hormona de crecimiento (GH) en la bolsa de Fabricio (BF) de etapas post-eclosión.** Hibridación *in situ* del ARN mensajero de la GH en la BF de pollo de 2s (a, b, c), 4s (d, e, f), 10s (g, h, i), 20s (j, k, l) realizada con una ribosonda marcada con DIG (690 pb). Inmunohistoquímica de GH en BF de pollo de 2s (m, n, o), 4s (p, q, r), 10s (s, t, u) y 20s (v, w, x) realizada con un anticuerpo policlonal contra cGH de pollo. E: epitelio; TC: tejido conectivo; M: médula; C: corteza; FAE: células epiteliales asociadas al folículo; IFE: células epiteliales interfolliculares; L: lumen; s: semanas. Amplificación en (a, d, g, j, m, p, s, v): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (b, c, e, f, h, i, k, l, n, o, q, r, t, u, w, x): 100x, barras: 10  $\mu$ m.

A las 4 semanas (Fig.11d) la señal del ARN fue escasa en los epitelios (Fig.11e) y muy abundante en la zona de la corteza y la médula (Fig.11f). La proteína en cambio, se distribuyó principalmente en las células del IFE (Fig.11q) y en las regiones medulares

(Fig.11m). A las 10 semanas (Fig.11g, s) también se observó una señal baja del ARNm (Fig.11 h, i) en los epitelios y de la proteína (Fig.11 t, u). Finalmente a las 20 semanas se observó una notoria disminución, tanto del ARNm (Fig.11j) como de la proteína (Fig.11v). En los epitelios la señal para el ARNm (Fig.11 k) y la proteína (Fig.11 w) casi ha desaparecido y dentro de los folículos esta señal solo se observó en algunas células (Fig.11 l, x).

Quantificación de la señal obtenida mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Para determinar los cambios en la expresión del gen de GH en la bolsa de Fabricio en distintas edades, se utilizó el programa IMAGE-Pro, para evaluar el de área positiva expresada en proporción relativa (porcentaje) en los cortes de BF de distintas edades (Fig.12).



**Fig.12. Cambios dinámicos en la expresión de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF).** **A.** Cuantificación de la señal de la hibridación *in situ* del ARN mensajero de GH, en la BF de distintas edades. **B.** Cuantificación de la señal de la inmunohistoquímica de GH, en la BF de distintas edades. Se contaron 6 campos de cada edad (n=5), se calculó la media  $\pm$  error estándar y mediante ANOVA se determinó la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) y se realizó la comparación correspondiente. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

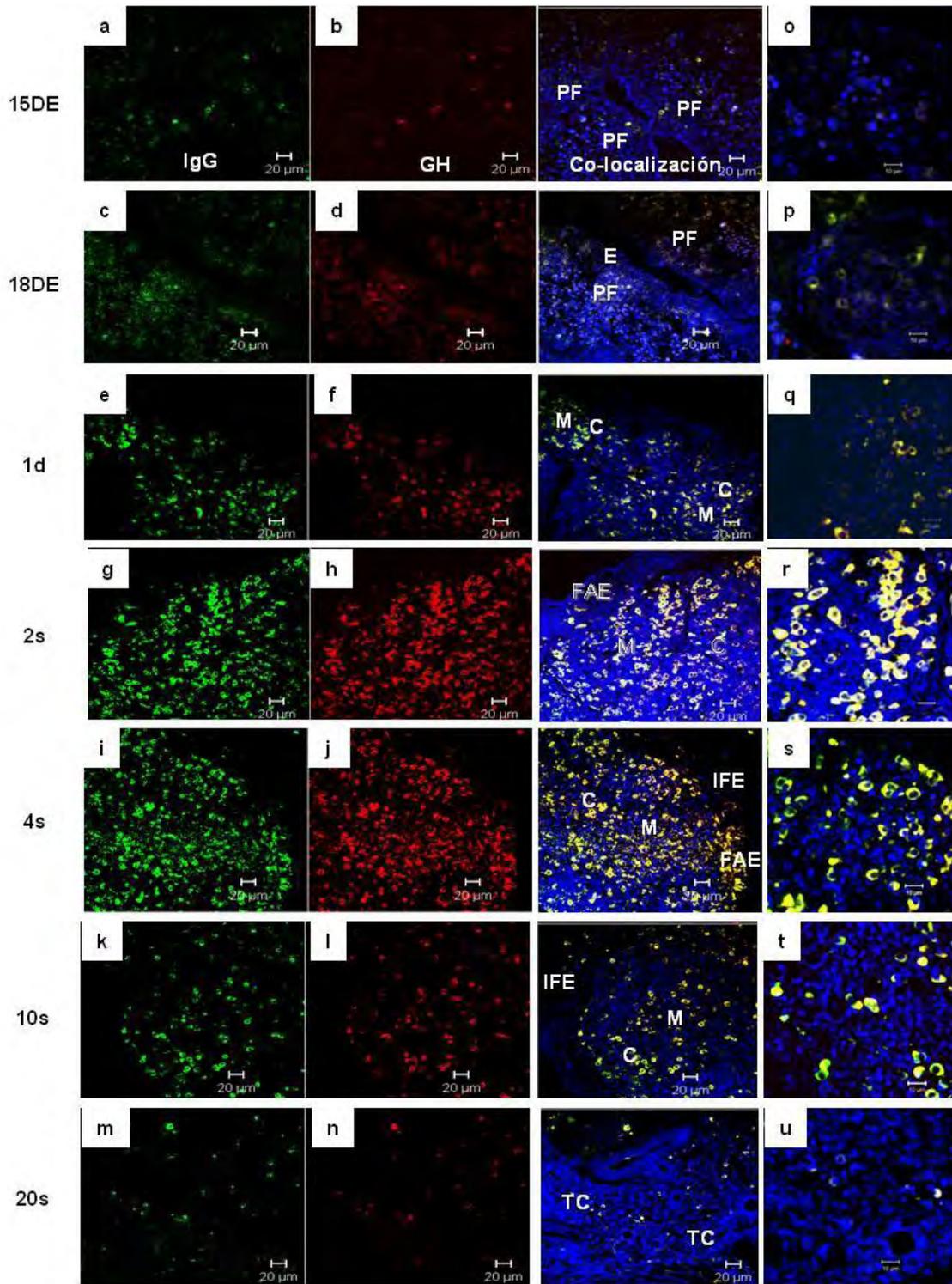
De cada una de las preparaciones histológicas (n=5) se fotografiaron 6 campos con un aumento de 40x. Se calculó el área total (19480  $\mu\text{m}^2$ ) y se evaluó el porcentaje de área positiva. Como se muestra en la Fig.12, existe una mayor proporción de la señal positiva para el ARNm de GH en la BF proveniente de dos semanas de edad (~20%), en tanto que se mantiene igual en etapas embrionarias (~10%) y edades posteriores a las 2 semanas (4 y 10 semanas, ~13%), disminuyendo drásticamente a las 20 semanas (~1%). En el caso de proteína, también existió un incremento a las 2 semanas (~18%) y en embriones de 15 días (~18%) y disminuyó a las 20 semanas (~2.5%), más del 80% al compararlas con la BF de 2 semanas y las etapas embrionarias. Esta disminución correlaciona con los datos obtenidos mediante ELISA.

## 7.4 Co-localización de GH-IgG, GH-IgM, en la bolsa de Fabricio (BF)

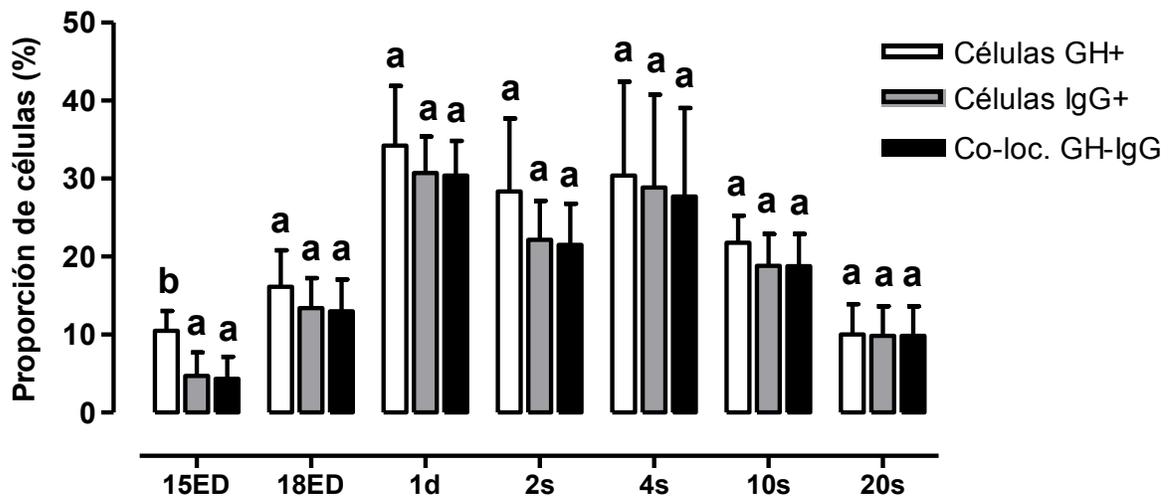
Co-localización de la hormona de crecimiento (GH) e inmunoglobulina G (IgG). La co-localización de GH e IgG en la bolsa de Fabricio, se realizó con un anticuerpo monoclonal contra GH y un anticuerpo policlonal contra IgG (Fig.13).

Y con la finalidad de estimar los cambios de forma cuantitativa, se realizó el recuento de células positivas a cada uno de los marcadores GH e IgG, células que co-localizan y su proporción con respecto al total de células (Fig.14). De manera consistente a lo que ya se había observado previamente, existe una mayor proporción de células  $IgG^+$ ,  $GH^+$  e  $IgG^+-GH^+$ , en tejidos de entre 1d y 4s y una disminución hacia el periodo de involución (Fig.14).

A los 15DE la señal tanto para IgG (~5%, Fig.13a y Fig.14) como para GH (~10%, Fig.13b y Fig.14) se observó muy escasa, y existe una proporción baja (~4%) de co-localización (Fig.13o). A los 18DE el número de células  $IgG^+$  (~13%, Fig.13c y Fig.14) comienza a aumentar, al igual que las células  $GH^+$  (~16%, Fig.13d y Fig.14) y la co-localización IgG-GH es de un ~13% (Fig.13p). En la BF de 1d, 2 y 4 semanas (Fig.13 e, g, i, respectivamente), se observó un notable aumento de las células  $IgG^+$  (Fig.14, ~27%) y numerosas células  $GH^+$  (~30%, Fig.14, Fig.13 f, h, j, respectivamente). En el tejido de 1d, 2 y 4 semanas (Fig.13 q, r, s, respectivamente), también se observaron abundantes células con co-localización IgG-GH (~27%, Fig.14). A las 10 semanas post-eclosión disminuyó el número de células  $IgG^+$  (~19%, Fig.13k y Fig.14) y  $GH^+$  (~22%, Fig.13l y Fig.14), pero la co-localización aún es evidente (~19%, Fig.13t y Fig.14). Durante la etapa de involución a las 20 semanas las células  $IgG^+$  (~10%, Fig.13m y Fig.14) y  $GH^+$  (~10%, Fig.13n y Fig.14) son muy escasas, así mismo la disminución en las células que son  $IgG^+-GH^+$  es muy evidente (~10%, Fig.13u y Fig.14).



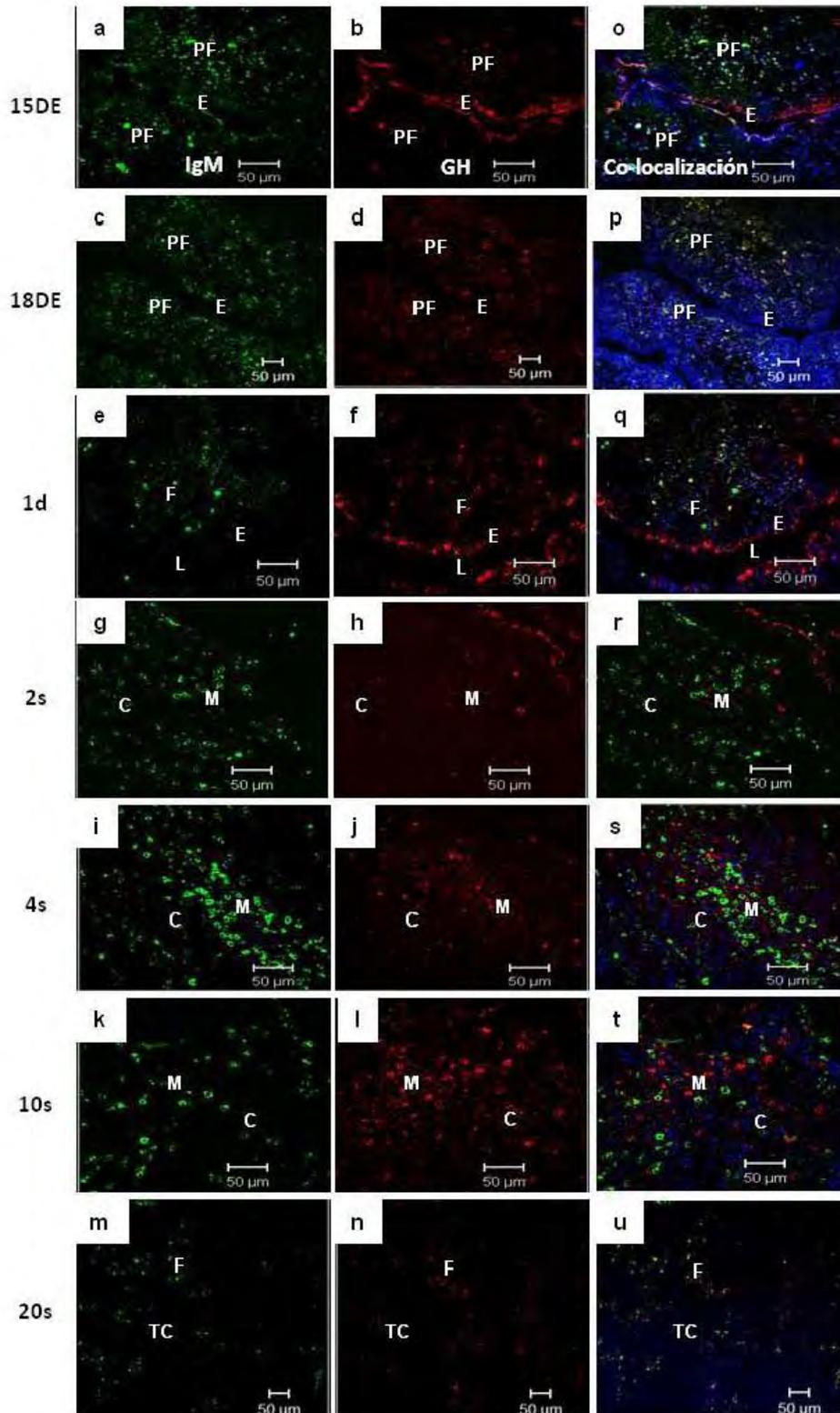
**Fig. 13. Co-localización de células  $IgG^+$ - $GH^+$  durante el desarrollo en la bolsa de Fabricio.** Imágenes confocales de secciones con triple tinción de 15DE (a, b, o); 18DE (c, d, p); 1d (e, f, q); 2s (g, h, r); 4s (i, j, s); 10s (k, l, t); 20s (m, n, u). Las células  $IgG^+$  se muestran en verde (1er Ac: policlonal anti-IgG; 2do Ac: anti-conejo IgG-FITC) y las células  $GH^+$  en rojo (1er Ac: monoclonal anti-cGH; 2do Ac: anti-ratón IgG-TRITC) en la BF. La co-localización en las células linfoides se muestra en amarillo después de la superposición de las imágenes obtenidas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 (laser a  $\lambda$  de 488, 514 y 650 nm). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. PF: primordio folicular; M: médula; C: corteza; IFE: epitelio interfolículo; FAE: epitelio asociado al folículo; TC: tejido conectivo; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación: a-n de 40x, barras 20  $\mu$ m; o-u de 80x, barras 10  $\mu$ m.



**Fig. 14. Cuantificación de las células GH<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup> y su co-localización GH-IgG**, durante el desarrollo de la bolsa de Fabricio. El análisis se realizó de las imágenes confocales (Fig.13) obtenidas previamente. Las células GH<sup>+</sup> (□), IgG<sup>+</sup> (■) y células con co-localización GH-IgG (■) se contaron por unidad de área (10,000 μ<sup>2</sup>) y los valores se expresan como proporción relativa con respecto al total de células observadas. El análisis se realizó con el programa MetaMorph. Los valores se representaron como la media±error estándar, n=4. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

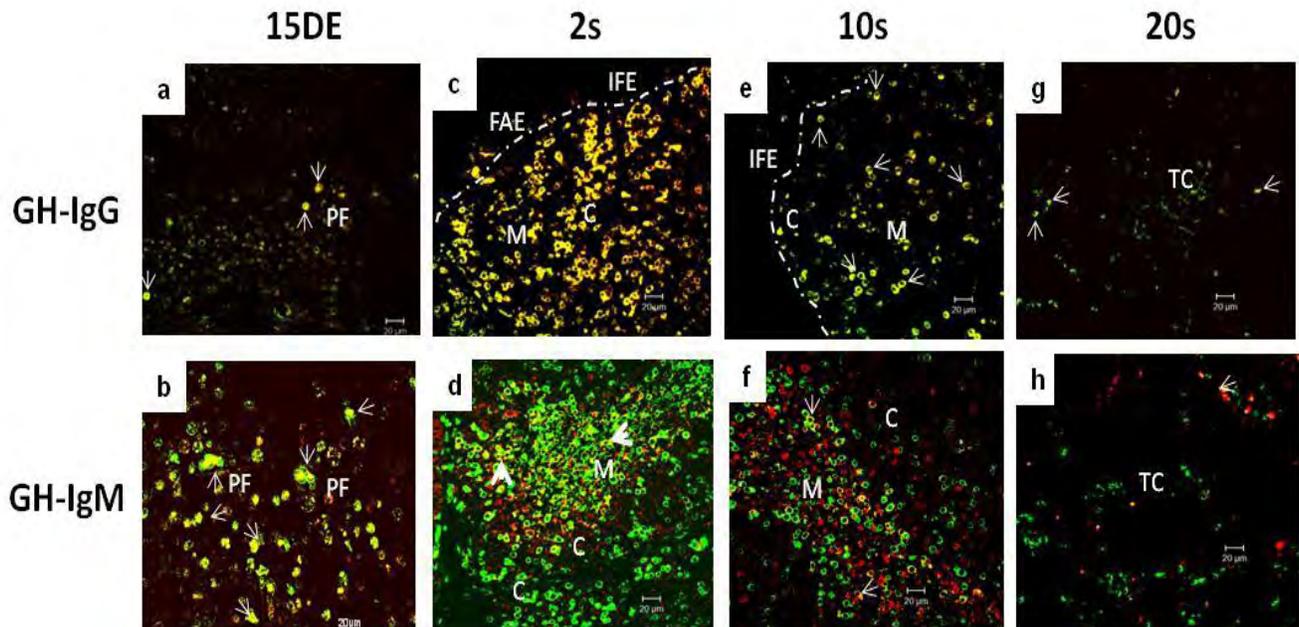
Co-localización de GH e IgM. Para determinación de la co-localización entre IgM y GH en la bolsa de Fabricio, se utilizó un anticuerpo policlonal contra GH y un anticuerpo monoclonal contra IgM (Fig.15). Dentro de los primordios foliculares de la BF de 15DE se observaron células IgM<sup>+</sup> (Fig.15a) y células positivas a GH (Fig.15b) y la co-localización IgM-GH fue muy abundante (~80%) (Fig.15o). A los 18DE se observó un incremento en el porcentaje de células IgM<sup>+</sup> (Fig.15c) y GH<sup>+</sup> (Fig.15d), así como en su co-localización (Fig.15p).

En los tejidos de pollos de 1d post-eclosión se continuó observando células IgM<sup>+</sup> (Fig.15e) dentro de los folículos en desarrollo, mientras que las células GH<sup>+</sup> se observaron en los folículos y en las regiones de los epitelios (Fig.15f). La co-localización IgM-GH a en la BF de 1d aún se observó (Fig.18q), pero en menor proporción con respecto a la de etapas embrionarias. La BF de 2 semanas, muestra células IgM<sup>+</sup> distribuidas en todo el folículo linfoide (Fig.15g) y células GH<sup>+</sup> tanto en el folículo como en los epitelios (Fig.15h). En esta etapa de desarrollo la BF tiene una muy baja co-localización IgM-GH (Fig.15r). La señal positiva para células IgM a las 4 semanas se localizó principalmente en la región medular del tejido (Fig.15i), mientras que las células GH<sup>+</sup> se observaron en todo el folículo linfoide (Fig.15j). A las 4 semanas la co-localización también fue mínima (Fig.15s). A las 10 semanas se observó una disminución de las células IgM<sup>+</sup> (Fig.15k), en cuanto a las células positivas a GH (Fig.15l) su distribución fue similar a la observada a las 4 semanas y la co-localización también fue muy baja (Fig.15t). Durante las 20 semanas se observó una clara disminución en la señal para IgM (Fig.15m) y GH (Fig.15n). Así mismo, la co-localización IgM-GH fue muy baja (Fig.15u).



**Fig.15. Co-localización de IgM-GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio.** Imágenes confocales de secciones de BF con triple tinción de: 15DE (a, b, o); 18DE(c, d, p); 1d (e, f, q); 2s (g, h, r); 4s (i, j, s); 10s (k, l, t); 20s (m, n, u). Las células IgG<sup>+</sup> se muestran en verde (1er Ac: policlonal anti-IgG; 2do Ac: anti-conejo IgG-FITC) y las células cGH<sup>+</sup> en rojo (1er Ac: monoclonal anti-cGH; 2do Ac: anti-ratón IgG-TRITC). La co-localización se muestra en amarillo (microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510: laser a  $\lambda$  de 488, 514 y 650 nm). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. PF: primordio folicular; TC: tejido conectivo; M: médula; C: corteza; E: epitelio. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación: a-u de 40x, barras 50 $\mu$ m.

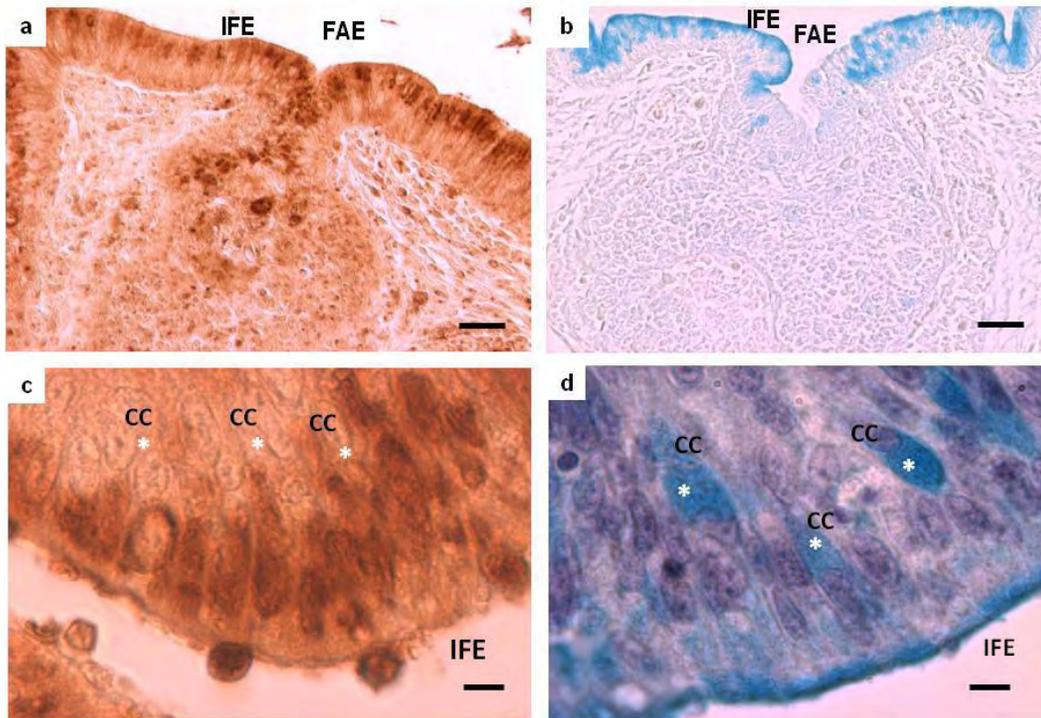
Durante la comparación de la co-localización (Fig.16) se observó que en etapas de desarrollo embrionario las células GH-IgG (Fig.16a) fueron escasas, mientras que las células GH-IgM fueron abundantes (Fig.16b). A diferencia de las etapas post-eclosión, las células GH-IgG fueron abundantes (Fig.16c) y las células GH-IgM disminuyeron, aún cuando la proporción de células IgM<sup>+</sup> es elevada (Fig.16d). A las 10 semanas continúa existiendo un gran número de células GH-IgG positivas (Fig.16e), mientras que las células GH-IgM (Fig.16f) fueron menos que en la etapa anterior. A las 20 semanas se observaron solo unas cuantas células GH-IgG positivas (Fig.16g) y las células GH-IgM fueron escasas (Fig.16h).



**Fig.16. Comparación de la co-localización de células GH-IgG y GH-IgM en la bolsa de Fabricio.** Imágenes confocales de secciones de BF con triple tinción de 15DE (a, b); 2s (c, d); 10s (e, f); 20s (g, h). La co-localización GH-IgG se muestra en amarillo (a, c, e, g). La co-localización GH-IgM se muestra en amarillo (b, d, f, h). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 (laser a  $\lambda$  de 488, 514). PF: primordio folicular; IFE: epitelio interfolicular; FAE: epitelio asociado al folículo; M: médula; C: corteza; TC: tejido conectivo; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación: a-h de 40x, barras 20 $\mu$ m.

## 7.5 Caracterización de células positivas a GH en la BF

Caracterización de células positivas a GH en la BF. Con la finalidad de caracterizar a las células responsables de la producción de GH en la BF se utilizaron técnicas histológicas, inmunohistoquímicas e hibridación *in situ* en secciones de este tejido de pollos de 4 semanas.

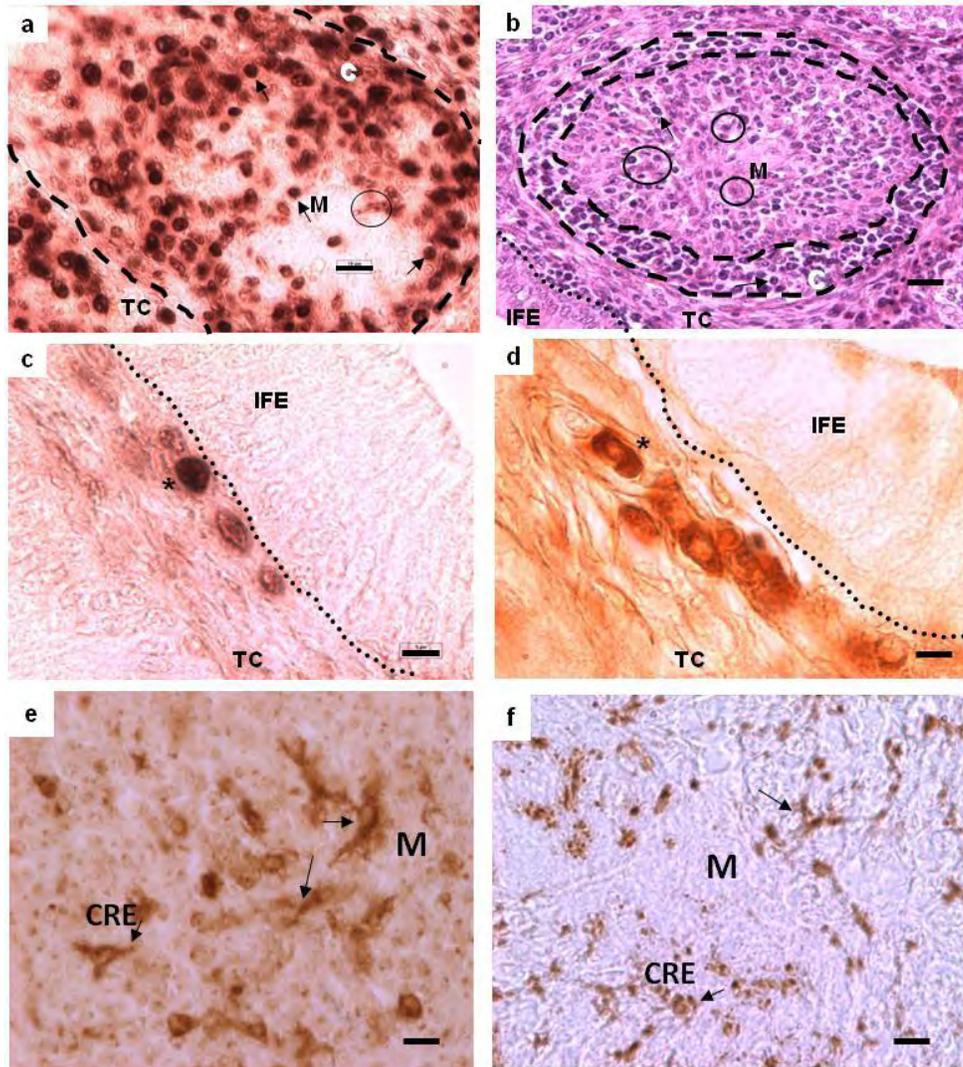


**Fig.17. Caracterización de las células positivas a GH en el epitelio de la bolsa de Fabricio de 4 semanas.** En (a, c) inmunohistoquímica de GH en BF de pollo, realizada con un anticuerpo policlonal contra cGH. En (b, d) tinción histológica con azul alcian en BF para determinar células con acumulación de mucopolisacáridos. IFE: epitelio interfolicular; FAE: epitelio asociado al folículo; CC: célula calciforme (célula epitelial que acumula componentes mucoides señalada con asteriscos\*). Amplificación: a-b de 20x, barras 30 $\mu$ m; c-d de 100x, barras 5 $\mu$ m.

Las células epiteliales interfoliculares (IFE) y epiteliales asociadas al folículo (FAE) positivas a GH detectadas mediante inmunohistoquímica (Fig.17 a, c), se caracterizaron mediante la técnica histológica con azul alcian (Fig.17 b, d). La tinción con azul alcian es específica para células epiteliales interfoliculares (IFE) ya que tienen la característica de acumular gran cantidad de mucopolisacáridos ácidos que facilitan la unión de este colorante. Esta tinción nos permitió distinguir entre células epiteliales interfoliculares (IFE) y células epiteliales asociadas al folículo (FAE). Las FAE no se tiñen con el azul alcian y fácilmente se distinguen ambas zonas del epitelio (Fig.17 b y d). Se determinó que ambos epitelios muestran señal positiva a GH (Fig.17a), tanto el IFE como el FAE (Fig.17b). Se observaron células negativas

a GH (Fig.17c) llamadas células caliciformes CC: célula epitelial especializada en secretar gran cantidad de componentes mucoides (del inglés: globet cell, Fig.17d).

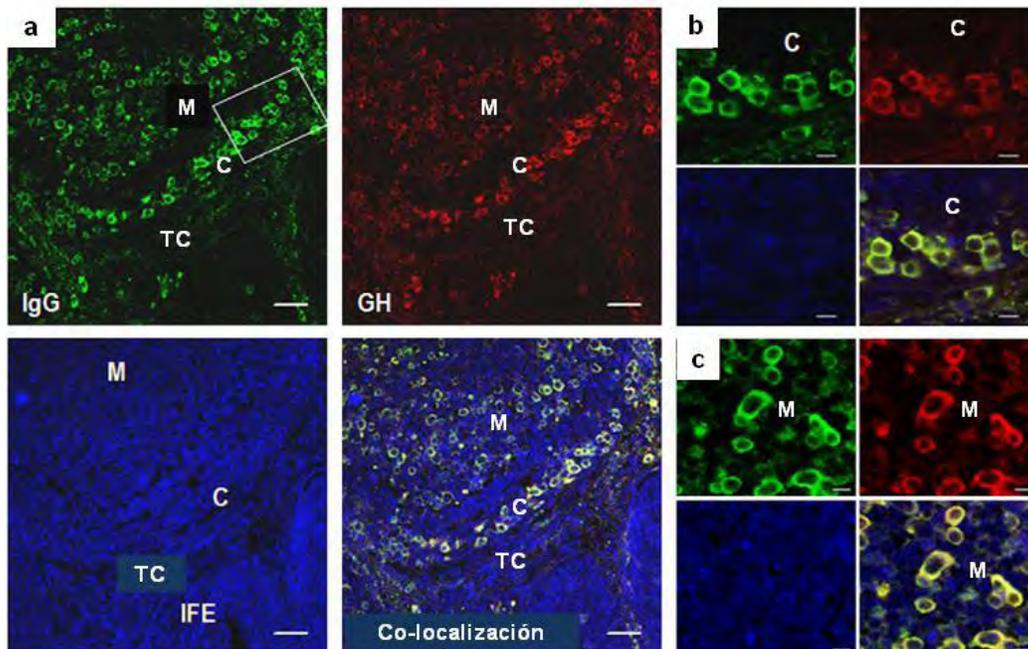
En la Fig.18a se muestra la localización del ARNm de la GH en un folículo linfoide, en donde se observa una señal abundante en la región de la corteza. La comparación de la tinción con hematoxilina-eosina muestra que las zonas con células positivas al ARNm corresponden a la corteza y a la médula. La corteza es rica en linfocitos B y la zona medular, además de linfocitos, presenta algunas células dendríticas secretoras (círculos, Fig.18b).



**Fig.18. Caracterización del tipo celular que expresa GH en los folículos de la bolsa de Fabricio de pollos de 4 semanas.** Se observa la comparación de la localización del ARN mensajero de GH (a, c) con la tinción de hematoxilina-eosina en el panel b; la localización del ARNm de GH con la localización de las células  $IgG^+$  (en el panel c y d respectivamente); y la inmunohistoquímica con un anticuerpo contra GH en el panel e y  $\alpha$ -citoqueratina en el f. En b y d las flechas señalan linfocitos B en la corteza (C) y en la médula (M). Los círculos marcan algunas células dendríticas secretoras. En c y d se observan linfocitos B (asteriscos) en la zona basal del epitelio. Y en e y f se muestran células reticulares epiteliales (CRE, flechas) en la médula del folículo. TC: tejido conectivo, IFE: epitelio interfolicular. Amplificación: a-b 40x, barras 10  $\mu$ m; c-f 100x, barras 5  $\mu$ m.

En la Fig.18c se observaron células linfoides positivas para el ARNm de GH y al comparar la zona en la cual se observaron células IR a IgG (Fig.18d) éstas fueron similares específicamente debajo de la lamina basal del epitelio. Para caracterizar a las células positivas a GH localizadas en la médula (Fig.18e), se realizó una inmunohistoquímica con un anticuerpo contra citoqueratina (Fig.18f) para detectar células reticulares epiteliales (CRE). La morfología observada, sugiere que las CRE contienen a la GH. El anticuerpo anti- $\alpha$ -citoqueratina es específico para el reconocimiento de células reticulares epiteliales (CRE), que tienen una morfología alargada muy característica (Fig.18f, flechas) y que es muy parecida a la morfología de las células que también fueron positivas a GH (Fig.18e, flechas).

Con la finalidad de identificar, de acuerdo a su ubicación y co-localización, a las células productoras de GH se realizó la técnica de inmunofluorescencia.



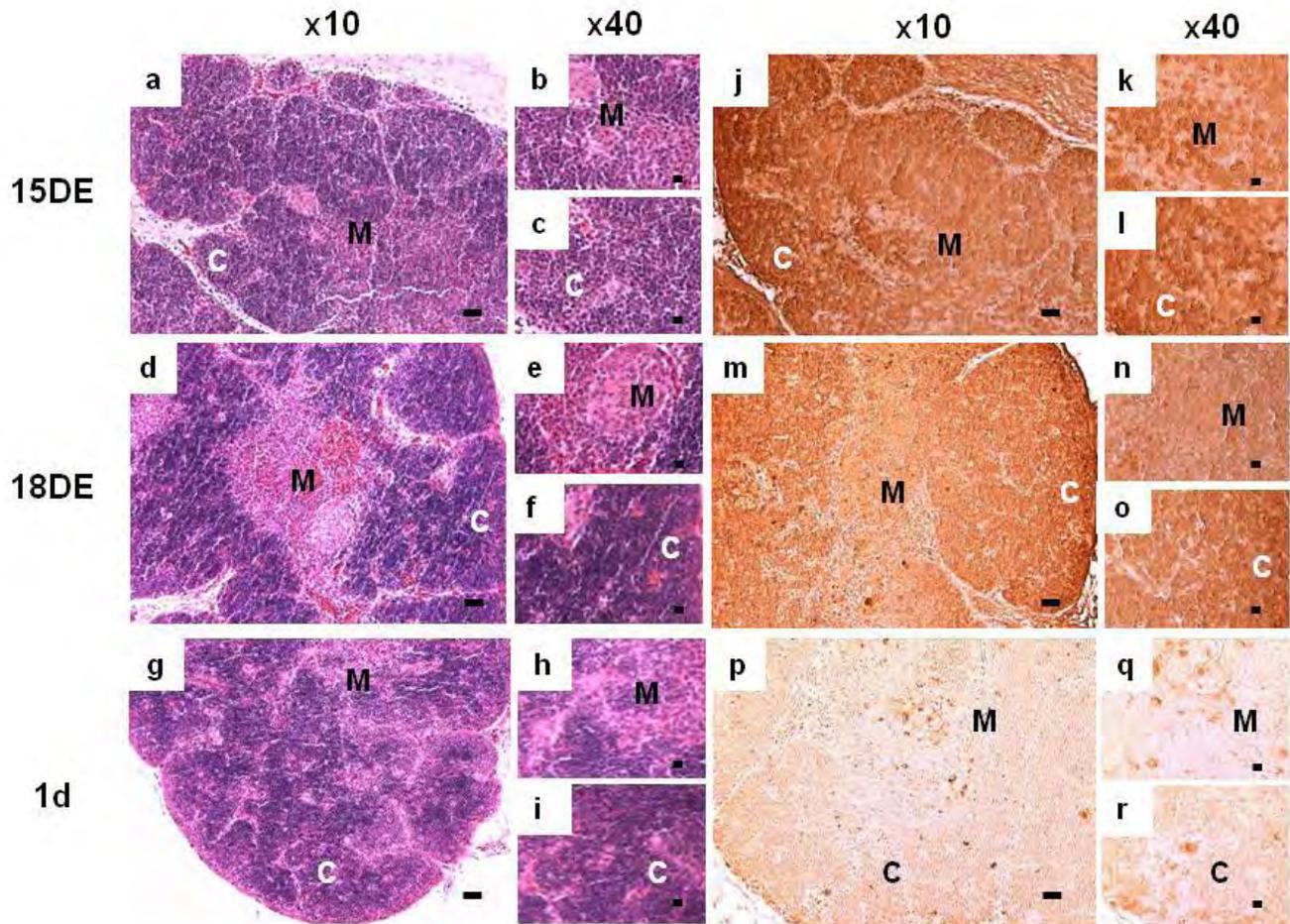
**Fig.19. Distribución de las células  $IgG^+$ - $GH^+$  en la bolsa de Fabricio de 4 semanas.** Imagen confocal de secciones con triple tinción. En el panel (a) se muestran en verde las células  $IgG^+$  (1er Ac: policlonal anti-IgG; 2do Ac: anti-conejo IgG-FITC) y en rojo las células  $cGH^+$  (1er Ac: monoclonal anti-cGH; 2do Ac: anti-ratón IgG-TRITC) en los folículos bursales; la contratinción de núcleos celulares se realizó con DAPI y se muestran en azul; la co-localización se muestra en amarillo. En (b) y en (c) se muestra con mayor detalle a las células  $IgG^+$   $GH^+$  así como la co-localización que se muestra en amarillo tanto en la médula como en la corteza. La co-localización se obtuvo después de la superposición de las imágenes tomadas con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 (laser a  $\lambda$  de 488, 514 y 650 nm). M: médula; C: corteza; IFE: epitelio interfollicular; TC: tejido conectivo. Amplificación: a de 40x, barras 20 $\mu$ m; b-c de 80x, barras 5 $\mu$ m.

En la Fig.19a se observa a las células  $IgG^+$  marcadas con fluoresceína (verde), distribuidas en todo el folículo linfoides; a las células  $GH^+$  se les marcó con rodamina (rojo) y se

observaron principalmente en la región de la corteza del folículo linfoide y algunas en la zona medular. En la Fig.19b se observó un mayor aumento en la co-localización de las células IgG-GH en la región de la corteza y en la Fig.19c la co-localización de la región medular en ambos casos el porcentaje de co-localización fue de más del 90%.

## 7.6 Localización de la hormona de crecimiento (GH) presente en el timo de pollo

Características del timo en la ontogenia. Con la finalidad de localizar la corteza y la médula del timo y observar los cambios durante el desarrollo del tejido, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina (Fig. 20 a-i y 21 a-i). Así mismo, mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo contra GH (Fig. 20 j-r y 21 j-r) se ubicaron las zonas positivas a GH dentro del tejido.

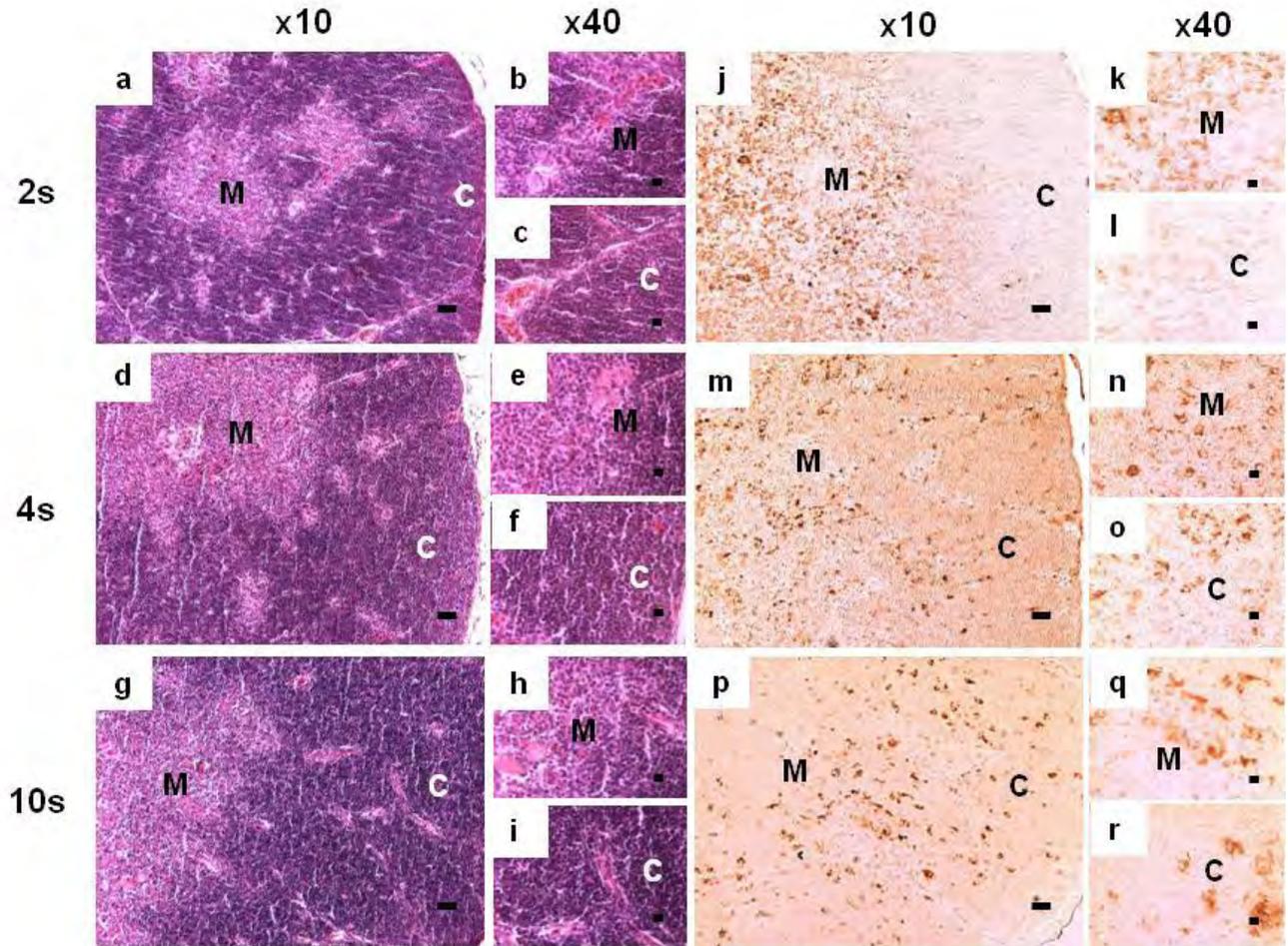


**Fig.20. Cambios histológicos e inmunohistoquímicos del timo de pollo en etapas perinatales.** Se utilizó el timo de pollos de 15DE (a-c, j-l), 18DE (d-f, m-o) y 1d (g-i, p-r), los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina (a-i); e inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra GH (j-r). M: médula; C: corteza; DE: días de desarrollo embrionario; d: días. Amplificación en (a, d, g, j, m, p): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (b, c, e, f, h, i, k, l, n, o, q, r): 40x, barras: 15  $\mu$ m.

En los resultados con la tinción de hematoxilina y eosina observamos cómo se va modificando la proporción entre la médula (región basófila en rosa) y la corteza (región acidófila en morado) de cada una de las etapas. En el timo de los embriones de 15 días (Fig.20a) la médula no se aprecia de forma clara (Fig.20b) y la corteza (Fig.20c) abarca casi

todo el tejido. A los 18DE (Fig.20d) la médula es más notoria (Fig.20e) y la corteza (Fig.20f) continúa creciendo. En el timo de pollos de 1 día (Fig.20g) se observó la zona de médula (Fig.20h) y un área mayor de corteza (Fig.20i), donde existen abundantes células acidófilas. Las células en la corteza corresponden a timocitos (linfocitos T inmaduros) inmersos en una red de células que secretan sustancias que estimulan a su diferenciación (las células nodriza, entre otras).

En la evaluación mediante inmunohistoquímica, en el timo de 15DE (Fig.20j) se observaron algunas células positivas a GH en la médula (Fig.20k), y abundantes células en la región de la corteza (Fig.20l). A los 18DE (Fig.20m) la médula que ha crecido tiene escasas células positivas a GH (Fig.20n), la mayoría de las células GH<sup>+</sup> están en la región de la corteza (Fig.20o). En los tejidos de 1d post-eclosión (Fig.20p), algunas células positivas a GH se observaron tanto en la región medular (Fig.20q), como en la región cortical (Fig.20r).

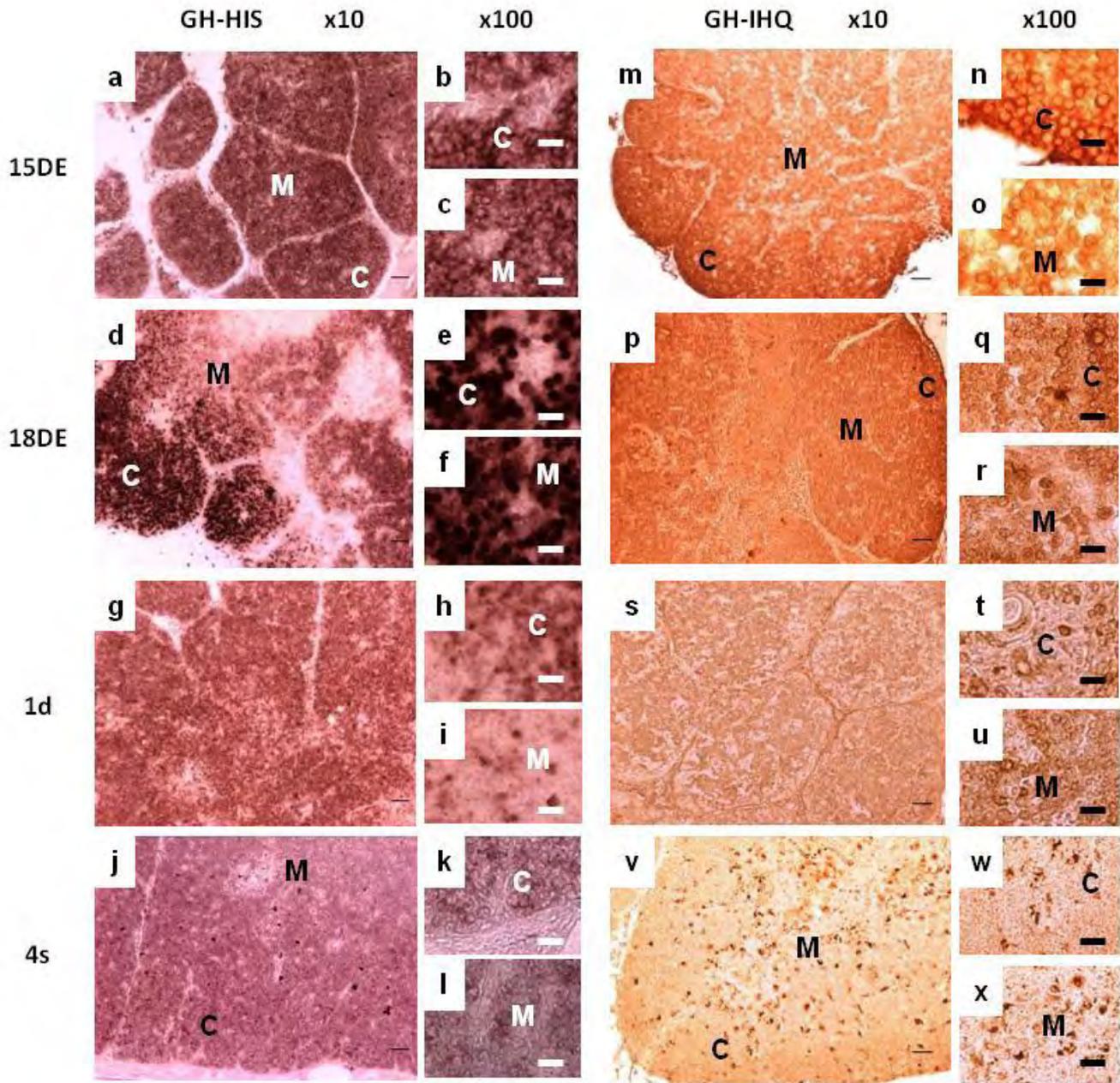


**Fig.21. Cambios histológicos e inmunohistoquímicos del timo de pollo en etapas post-eclosión.** Se utilizó el timo de pollos de 2s (a-c, j-l), 4s (d-f, m-o) y 10s (g-i, p-r), los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina (a-i); y mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra GH (j-r). M: médula; C: corteza; s: semanas. Amplificación en (a, d, g, j, m, p): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (b, c, e, f, h, i, k, l, n, o, q, r): 40x, barras: 15  $\mu$ m.

En las siguientes etapas evaluadas, 2 semanas (Fig.21a), 4 semanas (Fig.21d) y 10 semanas (Fig.21g), se observó un aumento de la región basófila, la médula (Fig.21 b, e y h, respectivamente). Estos resultados indican que existe un aumento en la cantidad de células en esta región, algunos linfocitos T maduros, células reticulares y algunos macrófagos. La región de la corteza también aumento en a las 2 (Fig.21c), 4 (Fig.21f) y 10 semanas (Fig.21i). No se observaron cambios notorios de las 2 a las 10 semanas, en este periodo existe una constancia en las proporciones de la médula y la corteza.

En la evaluación mediante inmunohistoquímica los tejidos de pollos de 2 semanas (Fig.21j) se observó un aumentó en la señal en las células de la médula (Fig.21k) y es poco evidente en las células de la corteza (Fig.21l). A las 4 semanas (Fig.21m) la señal parece menor que a las 2 semanas y parece ser ubicua, pero aún se observa en mayor número de células de la médula (Fig.21n) que en la corteza (Fig.21o). La señal se mantuvo constante a las 10 semanas (Fig.21p), distribuida tanto en la médula (Fig.21q) como en la corteza (Fig.21r).

Expresión de la hormona de crecimiento (GH) en el timo de pollo. Para determinar la localización de la expresión de GH en timo, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* (HIS) para detectar el ARNm de la GH (Fig.22 a-j) e inmunohistoquímica (IHQ) para detectar a la proteína (Fig.22 m-x).



**Fig.22. Expresión de la hormona de crecimiento (GH) en el timo de pollos de distintas edades.** Se realizó la hibridación *in situ* del ARN mensajero de la GH en el timo de pollo de 15DE (a, b, c), 18DE (d, e, f), 1d (g, h, i) y 4s (j, k, l), con una ribosonda marcada con DIG (690 pb). Para la localización de la proteína se hizo una inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal contra GH de pollo en cortes de timo de 15DE (m, n, o), 18DE (p, q, r), 1d (s, t, u) y 4s (v, w, x) previamente fijados e incluidos en parafina. M: médula; C: corteza; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación en (a, d, g, j, m, p, s, v): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (b, c, e, f, h, i, k, l, n, o, q, r, t, u, w, x): 100x, barras: 10  $\mu$ m.

Para la HIS se empleó una ribosonda marcada con digoxigenina y para la IHQ se utilizó un anticuerpo específico contra GH (como se menciona en Materiales y Métodos).

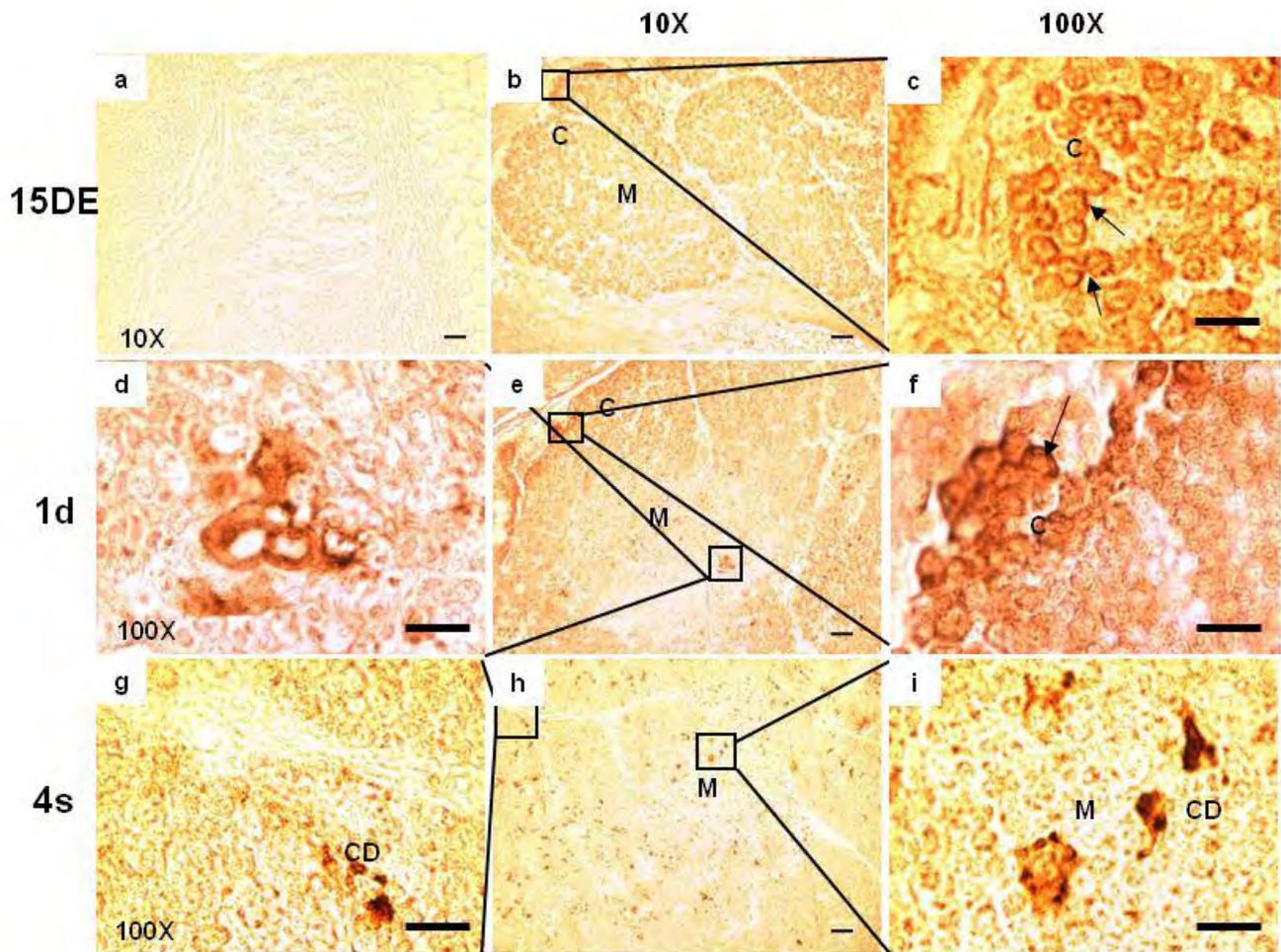
Las preparaciones histológicas de embriones de 15DE mostraron abundante marca positiva para el ARNm de GH en células de todo el lóbulo en desarrollo (Fig.22a): se observaron tanto en corteza (Fig.22b) como en médula (Fig.22c), con excepción de las regiones de tejido conectivo y trabéculas. La inmunorreactividad (IR) a la proteína en esta edad embrionaria también se observó distribuida en casi todo el lóbulo (Fig.22m), de forma abundante en la región de la corteza (Fig.22n) y en varias células de la médula (Fig.22o).

A los 18DE (Fig.22d) la señal para el ARNm de la GH es muy intensa en la región de la corteza (Fig.22e) y se observan zonas en la región que dará lugar a la médula (Fig.22f) con poca señal. La proteína mostró una distribución semejante (Fig.22p) a la del ARNm, la intensidad fue mayor en la región correspondiente a la corteza (Fig.22q), y algunas células presentaron señal positiva en la médula (Fig.22r).

En los tejidos de 1d post-eclosión, la señal del ARNm (Fig.22g) y de la proteína (Fig.22s) es casi ubicua, ya que se observaron células positivas en todo el lóbulo. Lo anterior se puede apreciar con más detalle en la Fig.22 h-i, para el ARNm y en la Fig.22 t-u para la proteína.

El timo de 4 semanas mostró diferencias en la distribución del ARNm (Fig.22j) con respecto a la distribución de la proteína (Fig.22v). Mientras que el ARNm se observa de forma abundante en corteza (Fig.22k) y médula (Fig.22l), la proteína es más escasa, se observan menos células positivas en la corteza (Fig.22w) y la médula (Fig.22x).

Identificación de células positivas a la hormona de crecimiento (GH) en el timo. En la Fig.23 se realizó una observación más detallada con la finalidad de identificar morfológicamente algunas de las células positivas a la GH. Como se había descrito previamente en la Fig.22, a los 15DE (Fig.23 a-c), la inmunoreactividad que se observó en el timo, se localizó en células de la médula y corteza, a diferencia de la señal observada a los 1d (Fig.23 d-f) que principalmente se encontró en la corteza del tejido y en menor cantidad en la médula. A la edad de 4 semanas post-eclosión la señal no mostró una localización específica, ya que se observaron escasas células positivas a GH tanto en corteza como en médula.

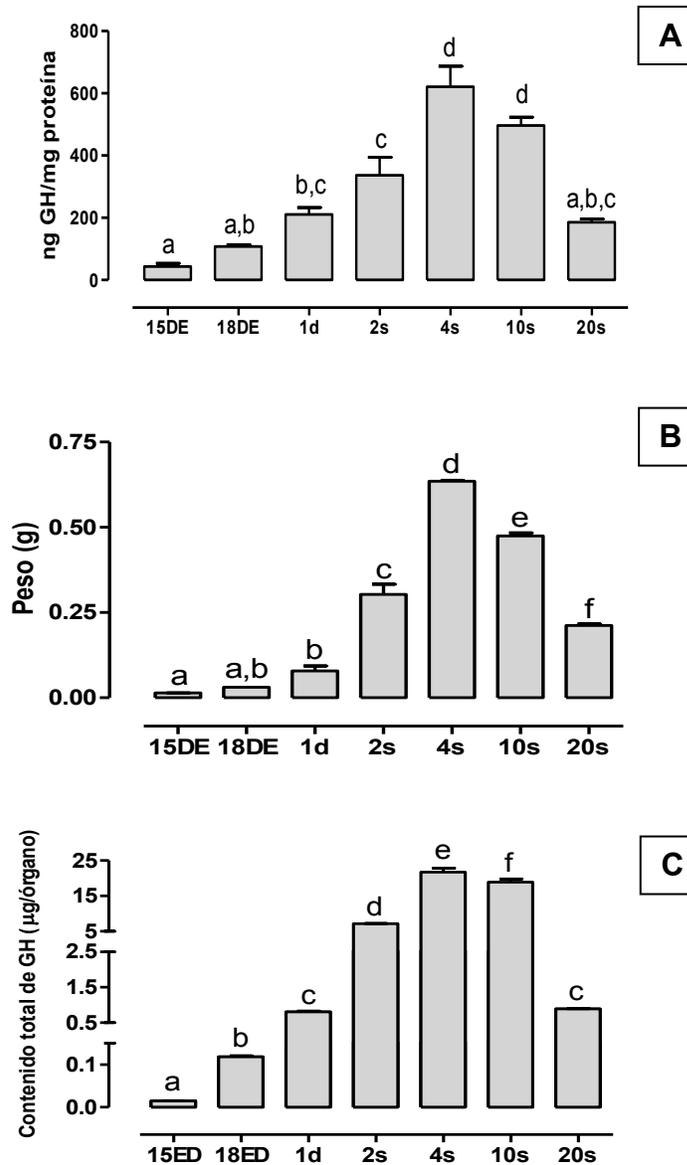


**Fig.23. Morfología de las células positivas a la hormona de crecimiento en el timo de pollo de distintas edades.** Se realizó la inmunohistoquímica en timos de 15DE (a, b, c), 1d (d, e, f) y 4s (g, h, i) con un anticuerpo policlonal contra GH de pollo. La inmunoreactividad se localizó en células de la corteza en etapas embrionarias y en la médula en el tejido de 4s post-eclosión. Corteza (C) con abundantes linfocitos (flechas) positivos a cGH, y la médula (M) con células positivas a cGH con morfología de células dendríticas (CD). (a) con el 1er anticuerpo preabsorbido con GH, como control negativo M: médula; C: corteza; DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas. Amplificación en (a, b, e, h): 10x, barras: 30  $\mu$ m; en (c, d, f, g, i): 100x, barras: 10  $\mu$ m.

En las micrografías de mayor aumento se puede observar que la zona de la corteza (Fig.23c) las células positivas a la GH son muy redondas, lo cual sugiere que corresponden a timocitos corticales. En el detalle del timo de 1d post-eclosión, se observaron grupos de células en la región medular (Fig.23d) y también en la región cortical que sugieren ser timocitos (Fig.23f). A las 4 semanas, en la región medular del timo se observaron células positivas con procesos, lo cual sugiere que se trata de células dendríticas (Fig.23 g, i), además de células que semejan macrófagos y algunos timocitos (Fig.23i).

## 7.7 Contenido de la hormona de crecimiento (GH) presente en bolsa de Fabricio (BF) y timo a lo largo del desarrollo

Cuantificación de la GH en la BF. A continuación se presentan los resultados obtenidos de BF, de distintas edades, para la concentración de GH determinada mediante ELISA.



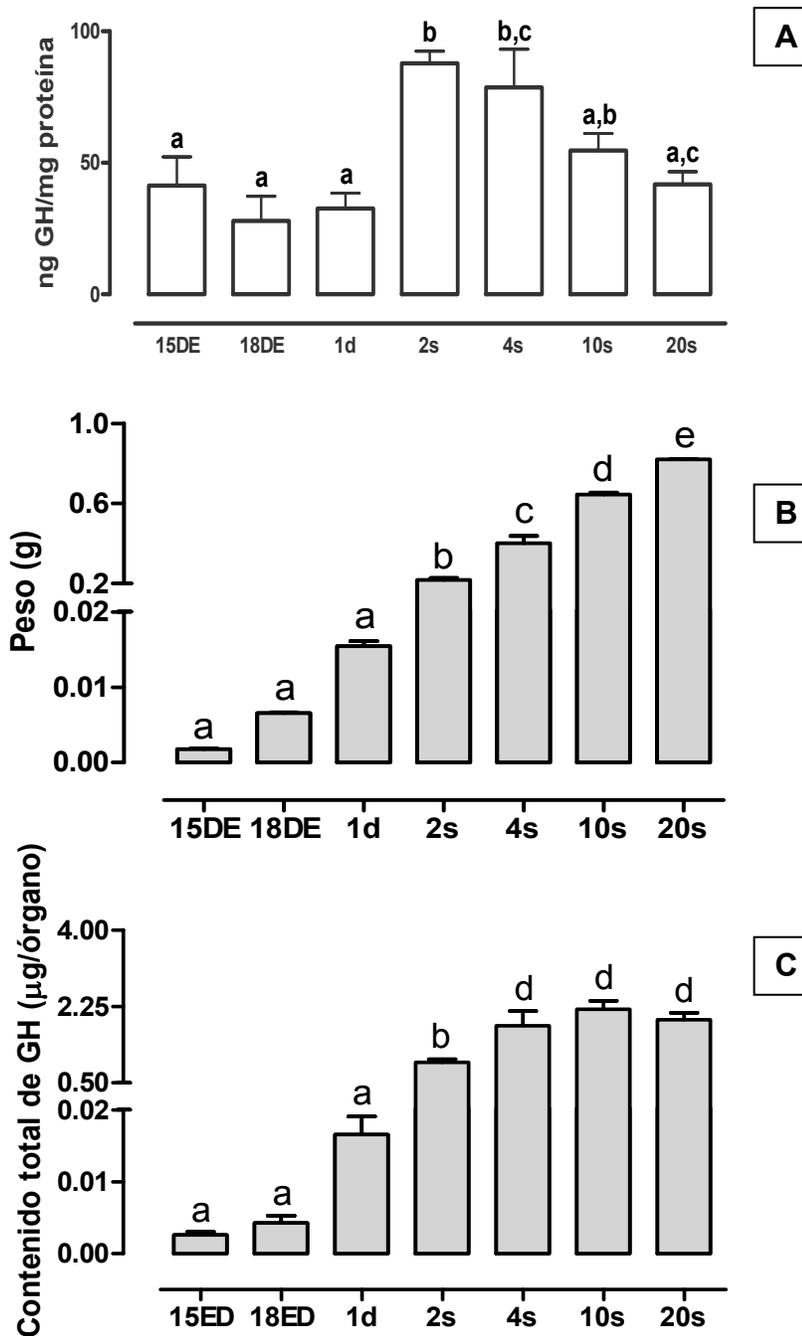
**Fig.24. Cambios en la concentración de la hormona de crecimiento (GH), peso y contenido total de GH en la ontogenia de la bolsa de Fabricio.** **A.** Cuantificación de GH mediante el ensayo de ELISA en extractos de la BF de pollos de distintas edades (DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas). Se colocaron 80µg de proteína por pozo en el ensayo por triplicado (n=11). **B.** Cambios en el peso de la BF durante el desarrollo. **C.** Contenido total de GH en la BF de distintas edades. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la comparación de medias  $\pm$  error estándar.

Se realizó la determinación de cGH en extractos de BF de distintas edades (15DE, 18DE, 1d; 2, 4, 10 y 20 semanas). En la Fig.24A, se observó una mayor concentración de GH en tejidos provenientes de pollos de 4 semanas (620 ng de GH/mg de proteína) al compararlo con los resultados del resto de las edades evaluadas. En edades embrionarias los niveles de GH fueron los más bajos (43 ng GH/mg proteína a los 15DE), y esto coincide con que en esta etapa aún no se ha conectado el puente hipotálamo-hipófisis, por lo que se plantea que la GH que se detectó posiblemente sea la que se esté sintetizando en la BF. A las 10 semanas (500 ng de GH/mg de proteína) se observó una meseta en la concentración de GH y a partir de aquí se sabe que inicia el proceso de involución y consecuentemente una tendencia a disminuir. Por otra parte, en animales de 20 semanas la concentración de la GH disminuyó significativamente con respecto a la BF de 4 semanas y solo se detectaron 185 ng de GH/mg de proteína, siendo este valor el menor de todas las edades post-eclosión que se evaluaron.

Así mismo, se determinaron los cambios en peso de la BF durante el desarrollo del ave (Fig.24B). Se observó un incremento de peso del tejido linfoide, alcanzando su máximo alrededor de las 4 semanas. A las 10 semanas el peso ha disminuido significativamente y esta disminución es más evidente a las 20 semanas (aproximadamente el 50% con respecto al tejido de 4 semanas), cuando el tejido se encuentra en pleno proceso de fibrosis e involución.

Con respecto a la determinación del contenido total de la GH en la BF (Fig.24C), se encontró que el contenido total de esta hormona se incrementa concomitantemente a su concentración y al peso del tejido. Los valores máximos del contenido de la GH en la BF se observaron a las 4 semanas de edad.

Cuantificación de la GH en el timo. También se determinó la concentración de GH en timo de distintas edades mediante ELISA (Fig.25).



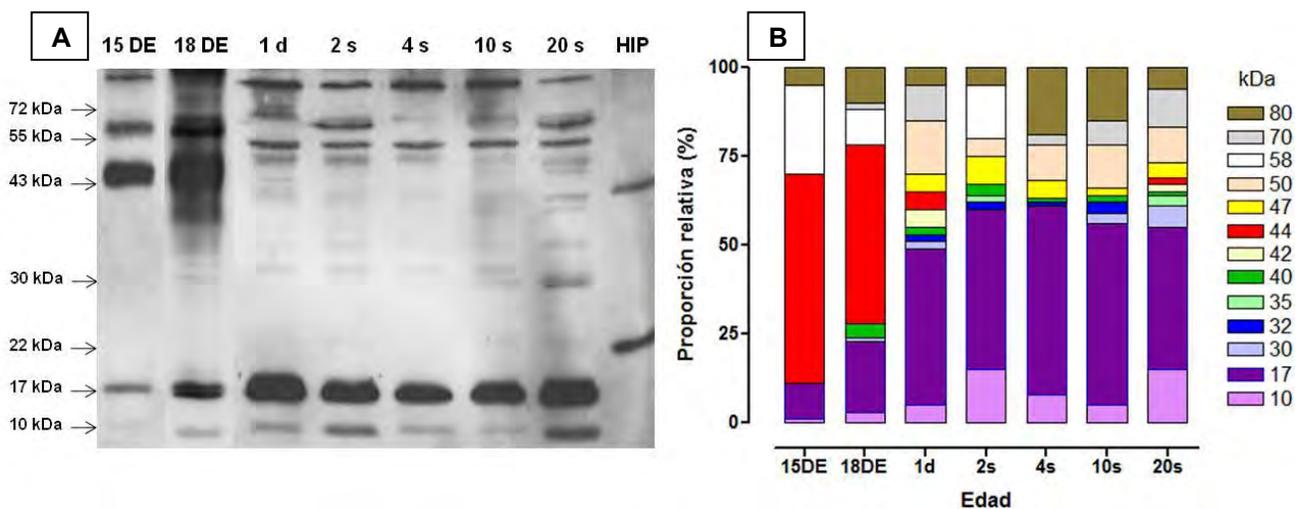
**Fig.25. Cambios en la concentración de la hormona de crecimiento (GH), peso y contenido total de GH en la ontogenia del timo.** A. Determinación del contenido de cGH mediante el ensayo de ELISA en extractos de timo de pollos de distintas edades (DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas). Se colocaron 80 $\mu\text{g}$  de proteína por pozo en el ensayo por triplicado (n=11). B. Cambios en el peso del timo (por lóbulo) durante el desarrollo. C. Contenido total de GH en el timo de distintas edades. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la comparación de medias  $\pm$  error estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante ELISA (Fig.25A), se observó que la máxima concentración de la GH en el timo fue entre la segunda y la cuarta semana de desarrollo (88 y 79 ng GH/mg proteína respectivamente) y fue significativamente diferente con respecto a todas las edades analizadas en este trabajo (15 y 18DE, 1d; 4, 10 y 20 semanas). Durante las etapas tempranas de desarrollo (15 DE, 18 DE y 1d post-eclosión) la concentración de la hormona se mantuvo constante, alrededor de 35 ng GH/mg proteína. Y, se observó un incremento estadísticamente significativo en la semana 2 y 4 de desarrollo al compararla con la concentración de 18DE ( $p < 0.01$ ) y con 1d ( $p < 0.05$ ).

En el Fig.25B se observó un incremento en el peso del tejido y se mantuvo constante hasta después de las 20 semanas, debido a que no sufre una involución temprana. Así mismo, al correlacionar el peso del tejido con la concentración de GH para obtener el contenido total de GH (Fig.25C) muestra un incremento constante hasta las 10 semanas, donde parece permanecer constante hasta las 20 semanas e incluso más allá de esta edad.

## 7.8 Evaluación de la heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) presente en la bolsa de Fabricio (BF) y en el timo

Determinación de la heterogeneidad molecular de la GH en la BF. Para determinar las variantes de masa de la GH presentes en la bolsa de Fabricio, se realizó la técnica de SDS-PAGE/Western blot, como se describe en Materiales y Métodos. El resultado, se observa en el luminograma de la Fig.26A. Cada luminograma se analizó por densitometría (software IP-Lab, Analytics) y se determinó la proporción relativa, que se expresó en porcentaje con respecto al área bajo la curva y con estos valores se construyó la gráfica de barras (Fig.26B). La proporción relativa de cada banda se calculó considerando como el 100% a la inmunoreactividad de la suma del área bajo la curva de todas las bandas detectadas en cada uno de los carriles. Los gráficos (Fig.26B) muestran el cambio en el porcentaje de cada variante (condiciones no reductoras) durante el desarrollo de la BF.

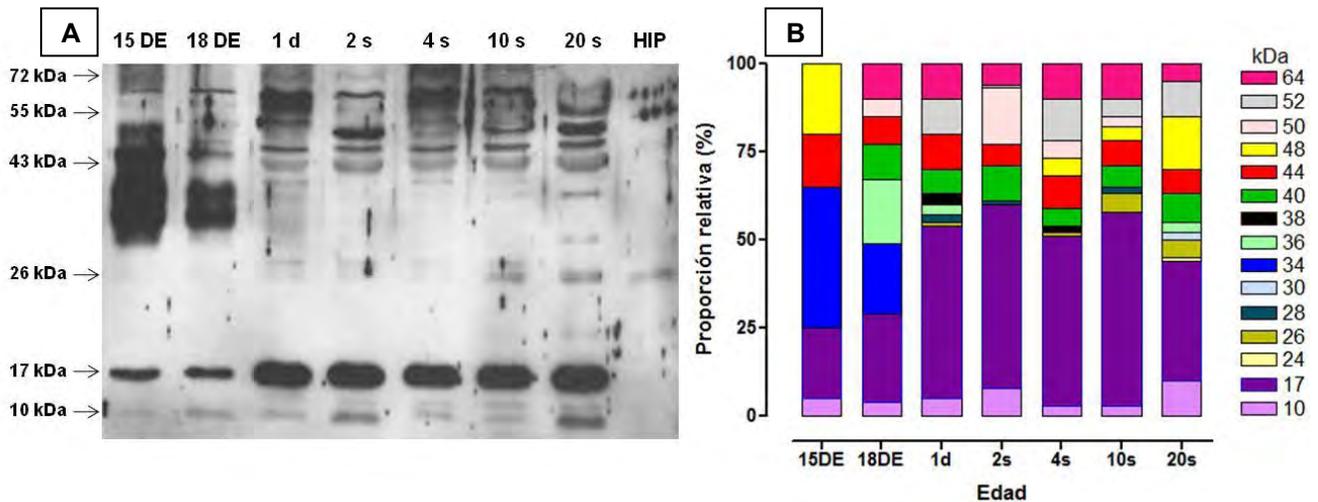


**Fig.26. Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF) bajo condiciones no reductoras.** A. Luminograma representativo para la determinación de bandas inmunoreactivas a la GH en la BF obtenidas mediante SDS-PAGE/Western blot (condiciones no reductoras). Se utilizaron los extractos de la BF de distintas edades: 15DE, 18DE, 1d, 2s, 4s, 10s y 20s. Se colocaron 5 µg de proteína para los tejidos embrionarios y 30 µg de proteína por pozo en los tejidos de animales post-eclosión; y 0.1 µg de extracto de hipófisis (HIP) como control. B. Análisis de bandas inmunoreactivas a la GH. Proporción relativa de cada variante de masa, expresada en porcentaje. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

Los resultados obtenidos (Fig.26A) de la ontogenia de la BF muestran que las bandas de 10,17 y 80 kDa están presentes en todas las edades evaluadas. En el caso de los extractos provenientes de embriones, hay una mayor intensidad en la banda de 44 kDa (~50%), además se observó una mayor proporción de variantes de alto peso molecular (58 y 80 kDa),

con respecto a los extractos de pollos post-eclosión, en donde la variante de 17 kDa fue la de mayor proporción. Esta variante de 17 kDa, incrementó su concentración de ~15% en 15DE hasta ~50% entre las 4 y 10 semanas de desarrollo del tejido. Otra diferencia que se observó fue la presencia de un fragmento de 10 kDa que parece aumentar después de la eclosión en los tejidos de 1d, 2 semanas y 20 semanas. En algunas edades se observan bandas semejantes a las presentes en el extracto de hipófisis, como la de 44 kDa en los embriones y 1d post-eclosión, y en menor proporción a las 20 semanas.

Las variantes de masa de la BF de distintas edades, también se analizaron bajo condiciones reductoras, como se observa en la Fig.27. Nuevamente se observó en todas las edades la variante de 17 kDa y en las etapas post-eclosión fue la más abundante (Fig.27A). En etapas embrionarias se observaron variantes de entre 34-36 kDa, en particular en el embrión de 15DE se observaron variantes de 34-48 kDa con la mayor proporción relativa (~50%), estas formas oligoméricas posiblemente correspondan al dímero no reducido. Otra forma oligomérica de 64 kDa se observó en una proporción relativa constante (~10%) desde 18 DE y a lo largo del desarrollo hasta las 20 semanas.

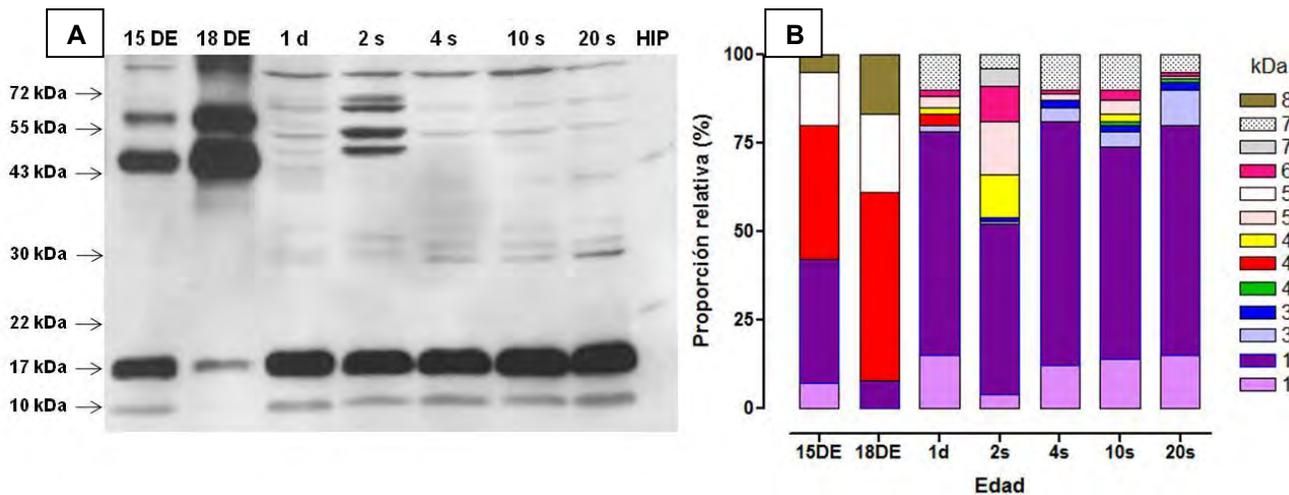


**Fig.27. Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia de la bolsa de Fabricio (BF) bajo condiciones reductoras. A.** Luminograma representativo para la determinación de bandas inmunoreactivas a la GH en BF obtenidas mediante SDS-PAGE/Western blot (condiciones reductoras). Se utilizaron los extractos de bolsa de Fabricio de distintas edades: 15DE, 18DE, 1d, 2s, 4s, 10s y 20s. Se colocaron 5 µg de proteína para los tejidos embrionarios y 30 µg de proteína por pozo en los tejidos de animales post-eclosión; y 0.1 µg de extracto de hipófisis (HIP) como control. **B.** Análisis de bandas inmunoreactivas a la GH. Proporción relativa de cada variante de masa, expresada en porcentaje. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

En el caso de las BF obtenidas de pollos post-eclosión, se detectó la presencia principalmente del fragmento de 17 kDa, que en casi todas las etapas post-eclosión

representa alrededor del 50% del total de las variantes, y se detectó desde etapas embrionarias (Fig.27a). Además, también se observó otra forma submonomérica de 10 kDa en etapas embrionarias y post-eclosión.

Determinación de la heterogeneidad molecular de la GH en el timo. La presencia de variantes moleculares de la GH en los extractos obtenidos del timo, también se evaluaron en SDS-PAGE/Western blot (condiciones no reductoras y reductoras) y su correspondiente transferencia a membranas de nitrocelulosa, se revelaron y se analizaron (programa IP-Lab, Analytics).

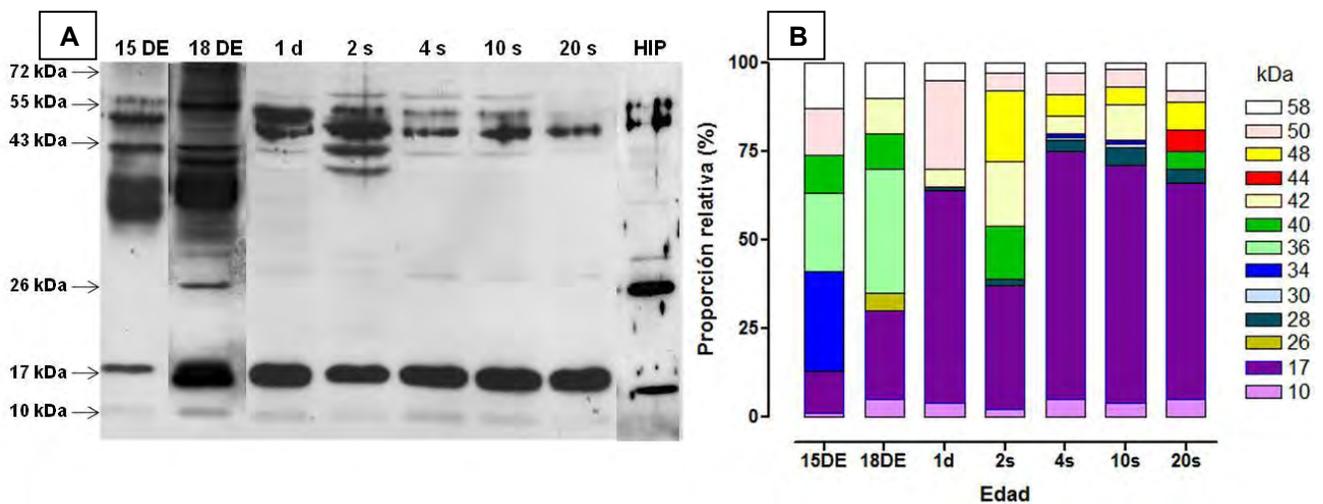


**Fig.28. Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia del timo bajo condiciones no reductoras.** **A.** Luminograma representativo para la determinación de bandas inmunoreactivas a la GH en el timo, obtenidas mediante SDS-PAGE/Western blot (condiciones no reductoras). Se utilizaron los extractos del timo de pollos de distintas edades: 15DE, 18DE, 1d, 2s, 4s, 10s y 20s. Se colocaron 5 µg de proteína para los tejidos embrionarios y 30 µg de proteína por pozo en los tejidos de animales post-eclosión; y 0.1 µg de extracto de hipófisis (HIP) como control. **B.** Análisis de bandas inmunoreactivas a la GH. Proporción relativa de cada variante de masa, expresada en porcentaje. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

La distribución de las variantes moleculares observadas en el timo bajo condiciones no reductoras (Fig.28A), mostró un patrón distinto al de la hipófisis, en las edades evaluadas se observó la presencia principalmente de un fragmento de 17 kDa (Fig.28A). En los extractos obtenidos de embriones, la intensidad de las bandas mostró que las variantes de mayor proporción fueron las 44, 58 y 80 kDa (Fig.28B). La variante de 44 kDa que representa más del 35% de las variantes en etapas embrionarias, disminuyó a 3% en 1d post-eclosión y ya no está presente en las siguientes etapas. Otra de las bandas inmunoreactivas presentes en los extractos fue la de 10 kDa. Algunas de las variantes solo se observaron en etapas

embrionarias y fueron de alto peso molecular como las de 58 y 80 kDa, que no están presentes en etapas post-eclosión. También se observó que la variante de 30 kDa va en aumento de 1d (2%) a las 20 semanas (10%). Estos resultados (Fig.28B) demostraron diferencias en las proporciones relativas de la mayoría de variantes, a las 2 semanas hay mayor expresión de las variantes de entre 47-65 kDa. Estos datos indican una expresión diferencial de las variantes moleculares de la GH relacionada con la edad, aún cuando el timo no sufre involución temprana durante la vida del pollo.

También se evaluó la presencia de estas variantes en condiciones reductoras (Fig.29A), donde se observó de manera constante la variante de 17 kDa, aunque en embriones mostró la menor proporción relativa (12%) de las edades evaluadas.



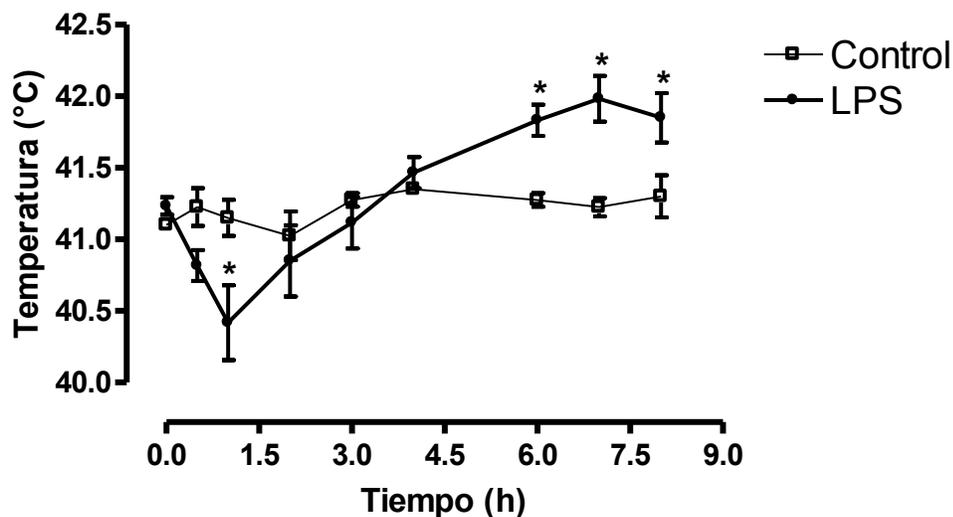
**Fig.29. Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento (GH) en la ontogenia del timo bajo condiciones reductoras.** **A.** Luminograma representativo para la determinación de bandas inmunoreactivas a la GH en el timo, obtenidas mediante SDS-PAGE/Western blot (condiciones reductoras). Se utilizaron los extractos del timo de pollo de distintas edades: 15DE, 18DE, 1d, 2s, 4s, 10s y 20s. Se colocaron 5 µg de proteína para los tejidos embrionarios y 30 µg de proteína por pozo en los tejidos de animales post-eclosión; y 0.1 µg de extracto de hipófisis (HIP) como control. **B.** Análisis de bandas inmunoreactivas a la GH. Proporción relativa de cada variante de masa, expresada en porcentaje. DE: días de desarrollo embrionario; d: días; s: semanas.

La proporción relativa de cada variante se observa en la Fig.29B. En etapas embrionarias, nuevamente se encontraron en mayor proporción las variantes de 34-40 kDa (~50%) y disminuyen en etapas post-eclosión. En el timo, así como se observó previamente en la BF de pollos de 1d a 20 semanas, la principal variante es la de 17 kDa, que alcanzó una proporción del 50% de todas las variantes observadas. En el timo, la variante de 42 kDa se observó en casi todas las edades, con excepción de 15DE y 20 semanas. La variante de 48

kDa se observó de las 2 a las 20 semanas. Las variantes de alto peso molecular, como las de 50 y 58 kDa, se encontraron a lo largo del desarrollo.

## 7.9 Efecto del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* en la concentración de hormona de crecimiento (GH) en bolsa de Fabricio (BF) y timo

Determinación de los cambios en temperatura después de la administración del LPS. Para corroborar el efecto pirético del LPS después de ser administrado por vía intravenosa, se determinó la temperatura corporal (rectal) de los pollos (4 semanas) y se observó un pico máximo de fiebre al final de la fase experimental que fue a las 8 horas (Fig.30), con respecto al control.

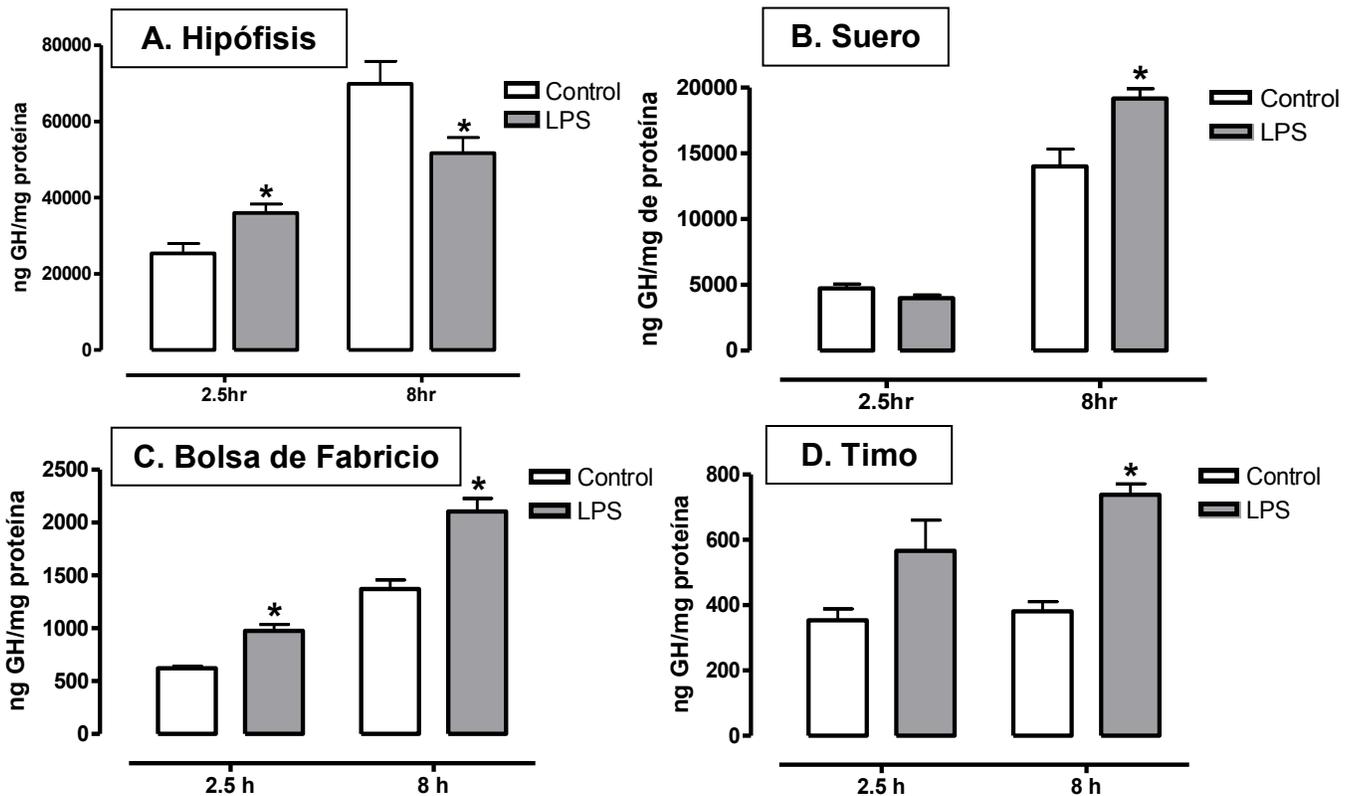


**Fig.30. Curvas de temperatura en pollos control y pollos a los cuales se les administró lipopolisacárido (LPS).** \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig.30) se colectaron muestras de suero y tejidos: la hipófisis, la BF y el timo a las 2.5 y 8 h posteriores a la administración del lipopolisacárido (LPS). Tanto en los sueros como en los homogeneizados de los tejidos se determinó el contenido de proteína y se realizó la cuantificación de la GH (Fig.31).

La concentración de la GH en la hipófisis (Fig.31A) mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) a las 2.5 h después de la administración de LPS. A las 8 h se observó un incremento de los niveles de la GH tanto en la hipófisis de los animales control como en los tratados con LPS, al comparar ambos grupos con respecto al tiempo post-administración, se encontró un aumento significativo en la concentración de la GH hipofisiaria a las 8 h con respecto a las 2.5 h. Sin embargo al realizar la comparación entre los grupos, a las 8 h el grupo control mostró una mayor concentración de la GH con respecto al grupo al que se le administró LPS.

Con la finalidad de integrar de manera más completa la información, también se determinó la concentración de la GH en el suero (Fig.31B). Mientras que a las 2.5 h no se observaron diferencias significativas entre los animales control y los tratados con LPS, a las 8 h el suero de los animales tratados con LPS si mostró un aumento significativo. Así mismo, se observó un incremento de la GH en el suero en ambos grupos experimentales al comparar 2.5 y 8 h post-administración.



**Fig.31. Efecto del lipopolisacárido (LPS) en la concentración de hormona de crecimiento (GH) en la hipófisis, el suero, la bolsa de Fabricio y el timo del pollo.** Se determinó la concentración de GH mediante el ensayo de ELISA en extractos de hipófisis (A), suero (B), bolsa de Fabricio (C) y timo (D), de pollos de 4 semanas: en condiciones control (□ Control) y tratados con lipopolisacárido (■ LPS). Se utilizaron 80µg de proteína en el ensayo por triplicado (n=12). Mediante ANOVA se determinó la diferencia significativa (\* p<0.01) de cada tejido al compararlo con su respectivo control (Dunnett).

En los tejidos inmunes, la bolsa de Fabricio (Fig.31C) mostró un incremento significativo (p<0.01) en la concentración de la GH a las 2.5 h y a las 8 h al comprar los datos con su respectivo control. En el timo a las 2.5 h (Fig.31D) no se observaron cambios significativos en la concentración de la GH, aunque si se notó una tendencia a incrementarse. A las 8 h este tejido si mostró un aumento significativo en la concentración de la GH, de casi el doble que su respectivo control.

## 8. DISCUSIÓN

En las últimas décadas surgió una nueva área de investigación, la neuroinmunoendocrinología, en la cual se ha evaluado la interacción que existe entre el sistema nervioso, endócrino e inmune. Debido a distintas observaciones, se ha logrado establecer, parcialmente, el tipo de relación que existe entre éstos sistemas, así mismo se han encontrado tanto mensajeros, como receptores que se comparten entre ellos. Lo anterior ha permitido una mejor comprensión de como se lleva a cabo la regulación, los efectos y la comunicación cruzada que tienen, pero al mismo tiempo también ha generado una gran cantidad de interrogantes.

En el sistema inmune (células y tejidos), se ha encontrado la presencia de varias moléculas típicas del sistema endócrino, como la GH (Luna *et al.*, 2008), la PRL (Kang *et al.*, 2007), la somatostatina (Aguila *et al.*, 1991), glucocorticoides (Lechner *et al.*, 2001), así como sus receptores. Pero existe poca evidencia acerca del papel que algunas de estas moléculas desempeñan de forma local. Tal es el caso de la GH, que aún cuando desde hace tiempo se sabe que se produce principalmente en la hipófisis y que existe evidencia de su producción extrahipofisiaria (aparato reproductor, sistema nervioso, inmune, glándula mamaria, entre otros; revisado por Murphy *et al.*, 2003), no se conoce con certeza su función local.

Investigaciones previas, han demostrado la presencia de la GH en tejidos del sistema inmune de distintas especies: roedores (Binder *et al.*, 1994; Recher *et al.*, 2001), aves (Luna *et al.*, 2005) y humanos (Hattori *et al.*, 1990; Hattori *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1996). En pollos adultos se ha descrito la presencia de su ARN mensajero (Render *et al.*, 1995) y en trabajos recientes de nuestro grupo se demostró la presencia de la GH en la BF, así como los cambios en su concentración y su patrón de heterogeneidad molecular a lo largo del desarrollo (Barraza, tesis de licenciatura, 2002; Luna *et al.*, 2005). Otros estudios determinaron la distribución del ARNm del receptor de la GH en la bolsa de Fabricio de pollos de 7s (Hull *et al.*, 1996). En este trabajo se muestra la distribución del ARNm de la GH y la correspondiente proteína en pollos de menor edad (4 semanas) (Luna *et al.*, 2009). Algunos de los cuestionamientos que aún quedan pendientes son: la distribución del ARNm y la proteína en el desarrollo y su posible relación con la función del tejido (BF). En el caso del timo de las aves la información acerca de la producción de GH en la ontogenia es muy

escasa, por lo que este sería uno de los primeros trabajos que describen los cambios en la localización y concentración de la hormona.

En esta tesis se determinó la presencia y los cambios de la hormona de crecimiento en tejidos del sistema inmune de pollo, la bolsa de Fabricio y el timo, y se describió la distribución de las células productoras de la GH. Lo anterior se demostró con la expresión del gen de la GH en la bolsa de Fabricio (BF) y el timo mediante hibridación *in situ*, y la presencia de la proteína por inmunohistoquímica, ELISA y Western blot, durante el desarrollo (en embriones y etapas post-eclosión). También se sugiere el papel que esta hormona podría estar realizando en la bolsa de Fabricio, ya que se determinó su co-localización con marcadores típicos de células linfoides de la BF: IgG e IgM. Esta evidencia sugiere la posible participación de la GH en la diferenciación y maduración de linfocitos, en ambos tejidos, así como un regulador en el inicio de la producción de inmunoglobulinas de los precursores de linfocitos B en la BF.

La bolsa de Fabricio tiene características morfo-funcionales particulares a lo largo del desarrollo y se observaron mediante técnicas histológicas (hematoxilina y eosina), lo cual fue consistente con las características morfológicas descritas previamente (Glick, 1991; Ciriaco *et al.*, 2003). Se identificaron las tres etapas de desarrollo que muestra la BF: crecimiento rápido, meseta e involución. En la etapa I: el tejido crece rápidamente, desde el día 1 post-eclosión y hasta las semanas 6-8 y alcanza su peso máximo en este período, que se mantiene entre las semanas 10 y 15 (Naukkarinen y Sorvari, 1984). Durante este tiempo se define la etapa II, de meseta, donde no hay cambios significativos en el peso del tejido, de la semana 10 hasta la 16 (Naukkarinen y Sorvari, 1984). Durante la etapa III, que ocurre después de la semana 18, la BF sufre un proceso de involución (Naukkarinen y Sorvari, 1984), que concluye alrededor de la semana 23.5 (Glick, 1984) con la acumulación de tejido fibroso y la pérdida de los folículos responsables de su función (Paniagua y Nistal, 1993; Glick, 1991; Ciriaco *et al.*, 2003).

Para determinar la expresión de la hormona de crecimiento y sus cambios dinámicos en la bolsa de Fabricio (BF), se evaluó el ARN mensajero de GH y la proteína inmunoreactiva (IR) en diferentes etapas de desarrollo. Se encontró que el ARNm de GH está presente desde los 15 y 18 DE y se localiza en la zona medular y epitelial de los primordios foliculares, con

proporciones que varían dependiendo de la edad. Las células presentes en los primordios foliculares de los embriones de 15 días, son principalmente precursores linfoides de células B, que colonizan este tejido para madurar y diferenciarse.

Las células precursoras migran desde el día 8 y hasta el día 15 embrionario (Pink y Lassila, 1987), por lo que en este período de tiempo ya hay precursores en la BF en formación. Por lo anterior se plantea que las células que expresan el ARNm de GH podrían corresponder a células precursoras linfoides. También se observó que el número de células positivas al ARNm de GH y GH aumenta hacia los 18 DE, lo que sugiere que la GH podría ser un factor de supervivencia celular que permite a las células precursoras proliferar y madurar en los folículos. En el primordio folicular también se encuentran células como las dendríticas secretoras y las reticulares epiteliales, que proveen del microambiente necesario para que se lleve a cabo la diferenciación y proliferación de los linfocitos B (McCormack y Thompson, 1990; Olah y Glick, 1992). Los datos señalan que tanto las células dendríticas secretoras como las reticulares epiteliales expresan GH (Luna *et al.*, 2008) y esta producción local podría proporcionar un estímulo positivo a la supervivencia y diferenciación de las células precursoras que ahí se encuentran. Durante el desarrollo embrionario no existe una diferencia clara entre los epitelios interfolicular (IFE) y asociado al folículo (FAE), entre los 14 y 15DE solamente se puede diferenciar a estos dos epitelios mediante microscopia electrónica (Bockman y Cooper, 1973; Naukkarinen *et al.*, 1978). Pero cerca de la eclosión o 1d después del nacimiento se pueden identificar fácilmente debido a que el IFE empieza a acumular una gran cantidad de mucopolisacáridos mientras que en las FAE no, como se observó con la tinción de azul alcian (Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010). Las células del FAE tienen como objetivo transportar diferentes sustancias que pueden funcionar como antígenos, hacia la médula de los folículos linfoides y activar la respuesta inmune específica mediante producción de anticuerpos contra diversos antígenos (McCormack y Thompson, 1990). En la BF de 1d la señal para la GH y su ARNm parece ser ubicua, incluso en las regiones de los epitelios. Se ha propuesto que la proliferación de linfocitos B en la etapa neonatal se vincula con la presencia de antígenos ambientales que llegan a la médula folicular mediado por la actividad pinocítica de las células FAE (Ekino, 1993).

Mediante la hibridación *in situ* del mensajero de la GH en la BF, de las 2 a las 10 semanas post-eclosión se observó una mayor señal en la zona medular de los folículos linfoides. Se

sabe que en la médula de los folículos bursales existe un microambiente que permite que se lleve a cabo la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Por lo anterior, se sugiere que la presencia del ARNm de GH y la hormona sintetizados en células ubicadas en la región medular podrían estar participando tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células linfoides y epiteliales o bien modular la secreción de otros factores. Uno de estos factores podría ser la bursina, que se ha asociado a la maduración de los linfocitos B (Otsubo *et al.*, 2001). A las 2 semanas se ha descrito que la BF es muy activa inmunológicamente, generando células maduras para la respuesta y en la producción activa de anticuerpos. Por lo tanto la producción elevada de GH se podría asociar a un incremento en su tamaño, resultado del aumento en el número de células.

Durante las etapas embrionarias y post-eclosión tempranas se ha encontrado que la zona de la corteza crece de manera más rápida, con respecto a las etapas posteriores de desarrollo (Ackerman y Knouff, 1959). En cuanto a las 4 semanas se sabe que es la edad en la que existe un crecimiento importante del tejido, por lo que se requiere una gran cantidad de factores promotores de la supervivencia celular. A las 10 semanas la BF está en la meseta de su desarrollo y se observan células productoras de GH distribuidas en la corteza y en el interior del folículo linfoide. En esta etapa la BF inicia el proceso de involución (Ciriaco, 2003).

Los cambios en la proporción y distribución de la GH coinciden con cada una de las etapas que se observan durante el desarrollo de la BF. A las 20 semanas cuando existe una disminución significativa tanto del ARNm de GH como de la hormona, coincide con el proceso de involución de este tejido. Lo anterior podría explicarse por la disminución en las células que conforman al tejido, varias de estas células (linfocitos, células dendríticas secretoras, FAE) producían GH en etapas previas y contribuían a los procesos de supervivencia. Durante la involución se sabe que gran cantidad de células se eliminan mediante mecanismos de muerte celular programada: apoptosis (Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010), y son reemplazadas por fibroblastos y acumulación mucoide (Franchini y Ottaviani, 1999), se pierde la funcionalidad del tejido y no hay más producción de células inmunes, por lo tanto también hay una disminución considerable del tamaño del tejido (Bickford *et al.*, 1985; Ciriaco *et al.*, 2003). Como se mostró en los resultados, el peso del tejido disminuyó hasta un 70% a las 20 semanas comparado con el pico de crecimiento que fue a las 4

semanas. En el caso de la presencia del ARNm de GH la intensidad de la señal disminuye conforme avanza la edad del pollo, por lo que el mensajero podría estar regulado por factores relacionados con ciertas etapas del desarrollo, como la producción de esteroides sexuales durante la etapa juvenil, ya que los esteroides inducen apoptosis (Compton *et al.*, 1990). Lo anterior se ha relacionado con estudios donde se encontró que la bolsa de Fabricio es un órgano blanco de las hormonas esteroides (Wilson y Boyd, 1990). Otros estudios han demostrado que las hormonas esteroides afectan el desarrollo de la función inmunológica de la BF si se administran antes de que se lleve a cabo el proceso de maduración de los linfocitos en el tejido (Glick, 1984). Como la testosterona, que causa burssectomía, evitando la diferenciación de las células dendríticas secretoras en etapas embrionarias (Glick y Oláh, 1984). Se ha demostrado que la administración de testosterona en embriones (antes de los 20 DE), por ejemplo, inhibe la formación de los folículos linfoides de la BF (Le Douarin *et al.*, 1980) por la falta de las células SDS, que son esenciales para la maduración de los linfocitos B. Nuestros resultados sugieren que la estructura de la BF también podría estar modulada por la GH, ya que en las etapas de mayor proliferación celular en el tejido hay mayor número de células IR a la hormona, y en etapas de involución, que coinciden con la madurez sexual, ésta disminuye drásticamente.

Todos estos datos sugieren que la GH que se expresa y produce localmente podría participar como un factor con la capacidad de modular la proliferación y diferenciación de las distintas estirpes celulares que conforman a la BF durante su desarrollo. Principalmente de linfocitos B, como ya se ha observado en la diferenciación de linfocitos B precursores de ratón (Sumita *et al.*, 2005).

Con la finalidad de caracterizar las células responsables de la producción de GH, se realizó la identificación de algunas de las células positivas a GH (GH<sup>+</sup>) mediante su morfología y también se corroboró mediante su co-localización con marcadores específicos.

Para determinar el tipo celular que sintetiza GH en este trabajo, se realizó la co-localización de GH con distintos marcadores específicos en varias edades representativas de las etapas importantes del tejido: 15 y 18 DE, edades post-eclosión: 1 día, 2, 4, 10 y 20 semanas (Luna *et al.*, 2008; Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010). Uno de los marcadores que se utilizaron fue la inmunoglobulina G (IgG), debido a que algunas de las células precursoras que arriban a la

BF presentan IgG de superficie (IgG-s) durante etapas tempranas de desarrollo embrionario (15-20 DE) que se cree es de origen materno y se une para favorecer la respuesta inmune (Ekino *et al.*, 1993 y 1995). Este marcador de superficie es mucho más evidente en etapas post-eclosión, ya que varias células B maduras dentro de los folículos comienzan a producirla y algunas otras células, como las presentadoras de antígenos las anclan en sus membranas (Ekino *et al.*, 1995). Existen trabajos que sugieren que las células dendríticas secretoras (SDC, por sus siglas del inglés) que se encuentran en el folículo linfóide están involucradas en el encendido o apagado de los cambios en la producción de IgM-IgG en los precursores de linfocitos B (Kincade y Cooper, 1971). Estas células se encuentran desde etapas embrionarias pero en un número reducido, como células mesenquimatosas oscuras con capacidad para unir IgG de origen materno en su superficie (Ekino, 1993). En nuestros resultados se observó que la co-localización entre GH e IgG va en aumento a partir de 1d post-eclosión y hasta las 4 semanas en donde se observó un mayor número de células con co-localización y de ahí en adelante disminuyen drásticamente de las 10 a las 20 semanas.

Otro de los marcadores que se utilizó para caracterizar a las células de la BF fue un anticuerpo contra IgM, que es un marcador de células precursoras. La distribución de IgM de acuerdo con la literatura, es más abundante en etapas embrionarias (Kincade y Cooper, 1971; Choi y Good, 1972), debido a que en este período su producción es mayor (Grossi *et al.*, 1977) y que eventualmente las células IgM<sup>+</sup> van desapareciendo con respecto a la edad (Pink y Lassila, 1987; McCormack y Thompson, 1990; Ekino *et al.*, 1995). Nuestros resultados mostraron que las células IgM<sup>+</sup> son más abundantes a los 15DE y a las 4 semanas, lo cual concuerda con los estudios previos (Kincade y Cooper, 1971; Choi y Good, 1972). Mientras que la co-localización GH-IgM es abundante en etapas embrionarias, esta disminuye drásticamente en las etapas post-eclosión (2, 10 y 20 semanas). Se sabe que la presencia de IgM está relacionada con la maduración de los precursores de linfocitos B, de tal suerte que se cree que las células productoras de IgM más tarde se convierten en productoras de IgG, y que si la primera no se produce, no será posible la sobrevivencia de esas células para producir anticuerpos (Lerner *et al.*, 1971; Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010).

Al comparar la co-localización que estos dos marcadores (IgG e IgM) tienen con la GH, se observó que en etapas embrionarias las células GH<sup>+</sup>-IgM<sup>+</sup> son más abundantes, mientras que las GH<sup>+</sup>-IgG<sup>+</sup> son escasas a diferencia de las etapas post-eclosión donde esta

distribución se invierte, la co-localización GH<sup>+</sup>-IgM<sup>+</sup> disminuye y la GH<sup>+</sup>-IgG<sup>+</sup> aumenta. Estos resultados sugieren que existe un encendido y apagado para la maduración de los linfocitos y la producción de GH podría participar en estos procesos favoreciendo la sobrevivencia de las células IgM<sup>+</sup> en etapas embrionarias para que maduren y en la diferenciación para ser productoras de IgG.

La co-localización de células GH<sup>+</sup>-IgG<sup>+</sup> en la región medular de los folículos linfoides, apoya la hipótesis de que algunas células productoras de GH son linfocitos B como previamente se ha propuesto (Luna *et al.*, 2008).

Mediante técnicas histológicas se identificaron algunas de las células productoras de GH, como es el caso de las células epiteliales interfoliculares (IFE) y epiteliales asociadas al folículo (FAE). Estas células no se pueden distinguir durante el desarrollo embrionario, pero después de la eclosión existen diferencias en la producción de mucopolisacáridos ácidos (Zapata y Cooper, 1990), que es mayor en el IFE, lo cual permite distinguirlas (Phillips *et al.*, 2004). Lo anterior también está relacionado con la función de cada una, las células FAE se especializan en el transporte de antígenos del lumen bursal a la médula de los folículos, mediante micropinocitosis (Bockman y Cooper, 1973; Lupetti y Dolfi, 1980). Se observó que las células que producen GH son principalmente células del FAE, lo cual podría estar relacionado con la secreción de moléculas que favorezcan la sobrevivencia de las células que van a llevar a cabo el contacto con el antígeno para generar la respuesta inmune y la producción de anticuerpos.

También se empleó un anticuerpo contra  $\alpha$ -citoqueratina, para caracterizar a las células productoras de GH. Este anticuerpo es un marcador que se utiliza para identificar a las células reticulares epiteliales, ya que previamente se ha utilizado para detectarlas en la BF de pichones (Sánchez-Refusta *et al.*, 1996). Al observar con detalle las preparaciones de inmunohistoquímica de la BF tratadas con el anticuerpo contra GH, se encontraron células estrelladas que forman redes con prolongaciones largas e irregulares en la médula. Este resultado fue similar al obtenido al utilizar el anticuerpo contra  $\alpha$ -citoqueratina, donde las células inmunoreactivas también mostraron la morfología de células reticulares epiteliales. Estos resultados coinciden con los publicados previamente, donde se encontró la co-

localización de células positivas a GH y citoqueratina en la médula de los folículos de BF de pollos de 4 semanas (Luna *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó previamente, las evidencias que existen sobre los efectos reguladores que tiene la GH hipofisiaria en el timo son abundantes. Sin embargo este es el primer trabajo donde se relaciona la producción y distribución local de la GH a lo largo del desarrollo, así como su contenido en este tejido.

En el timo se lleva a cabo el desarrollo, la selección positiva y maduración de los timocitos, proceso que involucra la expresión de varias proteínas y el rearrreglo de genes como el del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés). Los timocitos que no logran expresar un TCR de forma correcta, o que son autorreactivos, se eliminan mediante apoptosis (Savino y Dardenne, 2000). La GH modula una gran cantidad de eventos relacionados con la selección y generación de un microambiente adecuado para la proliferación y maduración de los timocitos (Dardenne *et al.*, 2009). Pero existe escasa información acerca del efecto de la GH que se produce localmente por las células del timo. En este trabajo se evaluó la distribución del ARNm de GH, de la proteína, su concentración y la concentración de GH, en distintas edades durante el desarrollo del pollo: 15 DE, 18DE, 1d y 4 semanas.

En el timo de 15DE la localización del ARNm de GH y su correspondiente proteína se observó en todo el lóbulo. En la corteza, donde se sabe que existe una gran cantidad de timocitos corticales, algunas células nodriza, células epiteliales reticulares (ERC) corticales y algunos macrófagos. En esta etapa embrionaria, ya se llevó a cabo la 2da etapa de colonización de las células precursoras de linfocitos T y se desarrolló el proceso de selección positiva (Coltey *et al.*, 1989), por lo que la GH podría estar participando como un factor antiapoptótico en las células que expresen de forma adecuada el TCR y el resto de sus marcadores de superficie como CD4 y CD8, que interaccionan con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Más aún, en esta etapa de desarrollo embrionario todavía no se tiene el aporte de GH hipofisiario, por lo que nuestros resultados sugieren que la GH que detectamos se sintetiza en el tejido.

A los 18 DE la señal positiva al ARNm de GH y a la proteína se encontró en la corteza y con menor intensidad, en la médula en formación de los lóbulos, en células que corresponden a timocitos en proceso de maduración. La señal en la región medular también puede provenir

de timocitos, algunas células nodriza, algunos macrófagos y células tímicas epiteliales (TEC) que previamente se han reportado como productoras de GH (De Mello-Coelho *et al.*, 1998b; Sabharwal y Varma, 1996). En esta etapa ya se efectuó la 3era etapa de migración de precursores. En experimentos que se realizaron en mamíferos se observó que la administración de GH modula procesos como la proliferación de los timocitos, la migración, la secreción de quimiocinas y hormonas tímicas, como la timulina a partir de las células tímicas epiteliales (TEC) (Savino y Dardenne, 2000). En modelos *in vivo*, la administración de GH mediante inyecciones intratímicas mostraron un incremento en el número de timocitos con respecto a los controles (Smaniotto *et al.*, 2004, 2005).

A un día post-eclosión la mayoría de los linfoblastos de la corteza se encuentran en la fase S del ciclo celular. Durante la maduración de estas células existe el proceso de migración hacia los bordes corticomedulares, donde los macrófagos y las SDC modulan la selección de los linfocitos T que alcanzarán la médula para ingresar a los capilares medulares y a su vez a la circulación (Kendall, 1980; Ciriaco *et al.*, 2003). En esta etapa el ARNm de GH y la hormona se encuentran tanto en la corteza como en la médula, lo cual podría indicar que la GH sintetizada en el tejido favorece tanto la supervivencia, proliferación (Smaniotto *et al.*, 2004, 2005), como la migración (de Mello-Coelho *et al.*, 1997) de estas células. Lo anterior se ha corroborado en experimentos en los que al administrar GH de manera exógena se produce el crecimiento del timo (Savino, 2007).

En etapas posteriores a la eclosión, donde los animales se encuentran en desarrollo, como a las 4 semanas, se observó que la señal de ARNm se mantiene casi ubicua en los lóbulos del timo, con excepción del tejido conectivo que separa cada lóbulo. Mientras que la proteína se observa en algunas células de la corteza y en un mayor número de células de la médula, donde se localizan células T maduras y células epiteliales de las cuales se ha sugerido que tienen función endócrina (Glick, 1980).

La caracterización celular en el timo solo se realizó mediante la identificación morfológica de algunas de las células que lo constituyen, tanto de la corteza como de la médula y se observaron células con un patrón que sugiere que podrían ser timocitos (en etapas embrionarias). Estas células de tamaño pequeño y forma regular se ubicaron principalmente en la corteza y en menor proporción en médula. En la zona de la medula se observaron

células estromales con procesos, una característica de las células dendríticas, y macrófagos de gran tamaño (4 semanas). Lo anterior coincide con las observaciones previas que se han realizado en timo de mamíferos, en donde principalmente los linfocitos T son capaces de secretar diversos factores como las citocinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, hormonas tímicas, timulina, entre otras y su función es influenciada por los niveles de GH (de Mello-Coelho *et al.*, 1998b; Savino *et al.*, 2003). En modelos con deficiencia de esta hormona, como los ratones enanos o hipofisectomizados existe una menor producción de dichas citocinas (Fabris *et al.*, 1971; Berczi, 1986). Además, se demostró que un tratamiento con GH en ratas envejecidas puede inducir el crecimiento e incremento en la producción de timulina (Kelly *et al.*, 1986). En nuestro estudio, el hecho de encontrar inmunoreactividad a GH en la corteza y en la médula del timo de pollos a lo largo del desarrollo podría señalar que estas células son capaces de secretar GH y que en consecuencia ésta podría actuar de forma autocrina y/o paracrina para favorecer la producción de los factores tímicos necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación de los precursores de linfocitos T. Además, se demostró la presencia de GH con concentraciones constantes en distintas etapas de desarrollo, lo cual coincide con que su involución es más lenta, con respecto a la BF. Aún cuando el timo sufre cambios graduales, estos comienzan a observarse entre la semana 3 y 6 de desarrollo (Franchini y Ottaviani, 1999; Aita *et al.*, 1995). Los efectos de la hormona de crecimiento proveniente de la hipófisis se han documentado de manera muy amplia. Como se mencionó previamente, se ha demostrado que el timo es muy sensible a la carencia de la GH hipofisaria, por lo que sabemos que es un factor importante para que el tejido funcione de manera adecuada y cabe la posibilidad de que cierta proporción de la GH que se detectó sea de origen hipofisario. En el timo de las aves se han determinado los cambios que sufren otras hormonas, como la pro-opiomelanocortina, que aumenta con respecto a la edad (Franchini y Ottaviani, 1999), lo que se ha asociado a la involución del tejido, como un activador de este proceso. En los mamíferos (ratón, humano), hay evidencia de la síntesis de GH en linfocitos (Weigent y Blalock, 1989; Hattori *et al.*, 1990; Rohn y Weigent, 1995; Wu y Devi, 1996), por lo que es posible que también se produzca GH en estas células en el pollo. Nuestros datos sobre la expresión de GH tanto en la BF como en el timo y principalmente en los linfocitos apoyan estos resultados. También complementan el hecho de que la producción de esta hormona cambia con respecto a la etapa de desarrollo del tejido así como algunas características estructurales de la hormona.

Con la finalidad de corroborar los cambios que se observaron en la inmunohistoquímica durante la ontogenia de ambos tejidos, se realizó la cuantificación de la GH mediante ELISA. La comparación de los resultados obtenidos para la BF y para el timo mostró tendencias distintas de acuerdo a las concentraciones de GH en cada uno de los órganos, lo cual podría explicarse por la diferencia en la fisiología de ambos tejidos. En el caso de la BF es un órgano inmune muy importante, que funciona como tejido linfoide primario durante las primeras etapas del desarrollo del ave, posteriormente funciona como tejido linfoide secundario e involuciona al llegar a la madurez sexual (Ciriaco *et al.*, 2003). En cambio el timo es un órgano linfoide primario que se mantiene activo durante casi toda la ontogenia del individuo, ya que su involución sucede después de las 50 semanas de vida en el pollo (Ciriaco *et al.*, 2003). Esta diferencia puede explicar, en parte, porque en el caso de la BF se observó una tendencia a incrementar la concentración de cGH hacia a las 4 semanas de desarrollo y, posteriormente seguir con un descenso significativo hacia las 20 semanas. En el caso del timo se observó el incremento entre las 2 y 4 semanas de desarrollo y disminuyó, pero sin diferencias significativas, a las 10 semanas y se mantuvo en las mismas concentraciones aún después de las 25 semanas (datos no mostrados). A diferencia de la BF, en el timo la concentración de cGH permanece constante antes y después de las 4 semanas de edad, lo cual podría correlacionar con el hecho de que este tejido no sufre una involución temprana.

Estos eventos pueden correlacionarse con las distintas etapas del desarrollo de la BF, ya que durante el desarrollo embrionario (15 DE y 18 DE) se diferencia la BF, existe una proliferación de las células del epitelio bursal, y se observa la presencia de linfocitos no diferenciados (Paniagua y Nistal, 1983). Probablemente la GH que se produce en esta etapa esté involucrada en los procesos de diferenciación y maduración, tanto del tejido como de los linfocitos que ahí se encuentran. Posteriormente la BF tiene su máxima actividad en las etapas post-eclosión y hasta las 8-9 semanas de desarrollo, donde también se observa un incremento de GH que pudiera estar relacionado con la actividad de este órgano (Glick, 1984). Al inicio de la madurez sexual, la BF presenta una disminución en su actividad, evento que correlaciona, como ya esta reportado, con la involución del tejido (Zapata y Cooper, 1990).

En los tejidos linfoides (BF, timo y bazo de pollo) también existen evidencias que sugieren la producción de reguladores de la GH, como el ARNm de la somatostatina (Aguila *et al.*, 1991), GHRH (Guarcello *et al.*, 1991) y Ghrelina (Hattori *et al.*, 2001). Lo que podría indicar que los controles básicos que se presentan en la hipófisis también podrían estar regulando la producción de GH en los tejidos inmunes. Aunque aún es necesario realizar estudios que confirmen si la secreción de GH se regula por estos factores en la BF y el timo.

Los datos que obtuvimos se pueden correlacionar con las distintas etapas de desarrollo de los tejidos: en etapas embrionarias, previas a la eclosión (15DE), en donde el 7.5% de las células bursales entran en mitosis cada hora (Reynolds, 1987), se requiere de una mayor cantidad de factores que estimulen la proliferación celular, la presencia de GH podría estar, al menos parcialmente, relacionada con estos procesos. Otra posibilidad es que la GH pudiera participar de forma indirecta a través del IGF-I, ya que no sólo está involucrado en procesos de proliferación celular, también se involucra en la diferenciación del sistema inmune (Kooijman *et al.*, 1996).

Se sabe que la hipófisis del pollo produce una gran cantidad de variantes moleculares de la GH y en este trabajo también fue posible evaluar la presencia de variantes moleculares en BF y en el timo, y en ambos tejidos el patrón de variantes cambia con respecto a la edad. En la hipófisis la principal isoforma que se produce y se secreta al plasma es la de 22 kDa (Arámburo *et al.* 1989, 1990a, etc), sin embargo hay un patrón de 11 variantes moleculares constituido por variantes de carga y masa. En este patrón se han encontrado isoformas glicosiladas, fosforiladas, formas submonoméricas, dímeros, oligómeros y además se observó que la proporción en la que se secretan es diferente con respecto a la edad (Arámburo *et al.*, 1990b).

Existen diferencias notorias al comparar las variantes moleculares de la hipófisis con las variantes encontradas en los tejidos inmunes, además esto también depende de la edad evaluada. Tal es el caso de las etapas embrionarias, en donde hay principalmente variantes de 35 a 45 kDa (~50%) y 17 kDa (~15%); en edades post-eclosión la principal variante es la de 17 kDa (~50%). En etapas embrionarias, bajo condiciones reductoras, se observan las bandas de peso molecular entre 35-45 kDa, lo cual podría indicar que el tipo de interacción

que forma estas variantes no es mediante puentes disulfuro. Se han descrito algunas variantes en las que se tienen interacciones fosfoéster, por ejemplo la variante fosforilada (Arámburo *et al.*, 1990), algunas otras como la variante glicosilada (Arámburo *et al.*, 1991; Berumen *et al.*, 2004), las cuales no se pierden mediante el tratamiento con agentes reductores como el ditrioteitol (DTT).

La variante de 17 kDa que se observó en todas las edades evaluadas, tanto en BF como en en el timo, también ha sido encontrada en otros tejidos extrahipofisarios como la retina, donde tiene un tamaño aproximado de 16.5 kDa (Baudet *et al.*, 2003 y 2007), mientras que en la hipófisis de embriones de pollo se observa un fragmento de 15 kDa (Arámburo *et al.*, 2001b). Por tal motivo esta variante ha generado un gran interés y se han evaluado los posibles mecanismos mediante los cuales se puede generar. La variante de 17 kDa se ha encontrado con una de 5 kDa, en hipófisis y en plasma de humanos (Such-Sanmartín *et al.*, 2009). La hipófisis es el modelo por excelencia que se ha investigado, ya que la GH representa un ejemplo de exquisita diversidad biológica. Algunas de las variantes que se producen a partir de la principal isoforma de GH humana, la de 22 kDa, se han generado mediante procesamiento proteolítico con enzimas como la pepsina (Fontana *et al.*, 2004), la tripsina (Graf *et al.*, 1992), la termolisina (Such-Sanmartín *et al.*, 2009). En los tratamientos con termolisina se encontraron, mediante espectrometría de masas, dos fragmentos uno de 5 y otro de 17 kDa (Such-Sanmartín *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que es posible que isoformas como la de 17 kDa se genere mediante mecanismos fisiológicos de modificación postraduccional, ya que hasta el momento no existe evidencia de un gen distinto o ARNm que la codifique en el sistema inmune de pollo. Sin embargo, el grupo de Takeuchi encontró en la retina del embrión de pollo un ARNm que codifica para una proteína de 16.5 kDa, uno de los primeros reportes de modificación pos-transcripcional para la generación extrahipofisaria de esta variante (Takeuchi *et al.*, 2001). En nuestro grupo de investigación se han caracterizado las variantes de masa de la GH de pollo, en donde hemos observado a la variante de 17 kDa exclusivamente en tejidos extrahipofisarios, como en el sistema inmune (Luna *et al.*, 2005) y aparato reproductor (Martínez-Moreno, tesis de maestría, 2006; Ahumada-Solorzano, tesis de maestría, 2007).

Previamente se ha reportado que algunas de las hormonas hipofisarias juegan un papel importante en la regulación de la función de los tejidos inmunes. Lo anterior se ha

documentado en modelos animales con hipofisectomía, que trae como consecuencia la disminución en el tamaño de los tejidos linfoides, así como deficiencias en la respuesta inmune celular y humoral (Kelley, 1989; Revisado por Kelley *et al.*, 2007). Por este motivo la GH que se está produciendo localmente tanto en la BF como en el timo, podría estar involucrada en los distintos cambios que sufren los tejidos linfoides, tanto proliferación como diferenciación. El efecto antiapoptótico de la GH es uno de los más estudiados en estos años (Sanders y Harvey, 2004). Se ha observado que las células de linfoma que sobreexpresan GH presentan una inhibición de la apoptosis (Arnold y Weigent, 2004). En nuestro grupo de investigación se evaluó el efecto que la GH tiene en cultivos primarios de células de la BF (Luna-Acosta tesis de maestría, 2008), donde se observó un incremento en la sobrevivencia de las células tratadas con 1 nM de GH (Rodríguez-Méndez *et al.*, 2010). Así mismo encontró mediante TUNEL, que existe un aumento en la apoptosis durante la etapa de involución del tejido. Estas evidencias apoyan la participación de la GH en la sobrevivencia de las células inmunes en etapas tempranas del desarrollo.

En las últimas décadas se ha estudiado más a fondo la relación que existe entre los distintos sistemas que conforman a los animales: sistema nervioso, sistema endócrino y sistema inmune. Se ha encontrado que cada uno de ellos tiene la capacidad para regular y modular a los demás. En el caso de la respuesta inmunológica, se sabe que varios factores que se producen durante un reto inmune pueden generar respuestas a nivel endocrino y nervioso, liberando diversas hormonas y neurotransmisores (Weigent y Blalock, 1995.). En este trabajo se evaluaron los cambios en la concentración de hormona de crecimiento durante una respuesta inflamatoria, con la finalidad de determinar si el comportamiento de la hormona que se produce de forma local es semejante al que previamente se ha observado con la GH hipofisiaria. En estudios previos se ha documentado ampliamente el efecto de LPS en la secreción de GH hipofisiaria a nivel circulante. Sin embargo existe muy escasa evidencia acerca del efecto de LPS en la producción de GH extrahipofisiaria. Por lo anterior, se evaluó la concentración de GH en la BF y el timo.

Durante la administración de lipopolisacárido (LPS) a los animales se observó una disminución de la temperatura alrededor de las 1.5 h y posteriormente la hipertermia alrededor de las 8 h, lo cual es consistente con los datos previos de la literatura (Leshchinsky y Klasing, 2001). Este proceso que incrementa la temperatura corporal en mamíferos, se

debe a la interacción de mediadores como IL-1, IL-2, IL-6, TNF entre otros, que al mismo tiempo causan la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Luheshi, 1999). En aves la administración de LPS estimula la producción de TNF- $\alpha$ , citocinas pro-inflamatorias y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) (Gehad *et al.*, 2002).

En este trabajo observamos un incremento en la concentración de GH en la hipófisis de pollos tratados con LPS a las 2.5 hrs con respecto al control. A las 8 h en la hipófisis de animales control se observó un incremento significativo, incluso mayor al de animales tratados con LPS. Este incremento a las 8 h puede explicarse debido a que el LPS no sólo afecta a la hipófisis, sino también a la glándula adrenal (Luheshi, 1999). La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal tiene una doble función: un efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor (Almawi *et al.*, 1996). Está documentado que la administración de LPS después de 1 h causa un incremento en la secreción de glucocorticoides en pollos (Gehad *et al.*, 2002; Curtis *et al.*, 1980) y que estos a su vez afectan la síntesis y liberación de GH. Lo cual podría explicar porque en animales que no tienen el estímulo del LPS existe un incremento superior, ya que la GH podría estar actuando como un protector ante el estrés de manera aguda (Almawi *et al.*, 1996). Sin embargo a las 8 h, hay una disminución en la concentración de GH hipofisiaria de los animales inyectados con LPS, lo cual podría explicarse con los datos que se observaron en el suero, en donde a las 8 h existió un incremento de la GH. Lo anterior podría sugerir que la GH hipofisiaria se liberó al torrente circulatorio.

Los datos anteriores se complementaron al evaluar la concentración de GH en el suero de los animales control y tratados con LPS. A las 2.5 h no se observaron cambios significativos en la concentración de GH, sólo una ligera tendencia a disminuir en el plasma de los animales tratados con LPS. En estudios previos se encontró que la concentración de GH disminuye 2 h después de la administración de LPS (Curtis *et al.*, 1980), seguido de un incremento hacia las 8 h. Lo anterior fue consistente con las observaciones que realizamos, ya que a las 8 h también observamos un incremento significativo con respecto al control.

Con respecto a los tejidos inmunes, los resultados mostraron que a las 2.5 h, en la BF y el timo, hay un incremento de GH, al igual que a las 8 h. Este incremento podría ser consecuencia de la síntesis de GH para promover la proliferación celular y de esta manera

poder responder de forma adecuada a la infección simulada por el LPS. También podría explicarse debido a la resistencia que se genera en el hígado, lo cual podría dejar mayor cantidad de GH libre para que el sistema inmune pueda utilizarla y favorecer la respuesta inmunológica. La GH tiene la capacidad de inducir la síntesis de ADN y así estimular la proliferación de células inmunes en tejidos linfoides (Yoshida *et al.*, 1992; Villanua *et al.*, 1992) y restablecer la inmunocompetencia en organismos hipofisectomizados (Berczi *et al.*, 1991). Por lo que el incremento que observamos podría estar relacionado con la preparación del organismo para establecer una respuesta inmunológica. Sin embargo aún no se define si el estímulo inflamatorio solamente induce la liberación de GH o también incrementa los niveles de otros factores relacionados al establecimiento del proceso inflamatorio, como son la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IFN- $\delta$  y que previamente se han descrito en otros modelos. Datos previos han mostrado que en aves la administración de LPS si causa el aumento de estas citocinas, por lo que resultaría interesante evaluarlas a la par de los cambios que sufre la GH.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos muestran que la inducción de una respuesta inflamatoria, con la administración del LPS, modifica no solo el contenido de la GH a nivel hipofisario, sino que también se refleja cambios en sus niveles circulantes. Además, con respecto al contenido de la GH que se produce localmente en los tejidos inmunes (BF y timo), también se observó un claro incremento en el contenido de GH. Estos datos en conjunto, plantean que la hormona de crecimiento además de sus efectos endocrinos también puede estar participando de manera autocrina y/o paracrina como uno de los múltiples factores que modulan el establecimiento de la respuesta inmunológica.

Por otra parte, la presencia de la GH, las diferencias en su secreción durante la ontogenia y su heterogeneidad molecular, en la BF y el timo, podría relacionarse con el desarrollo temprano del sistema inmune, donde la hormona pudiera actuar como un factor promotor de la diferenciación linfóide. Todo lo anterior apoyaría la hipótesis acerca de la función autocrina/paracrina de la GH local, ya que al parecer existe una regulación en la secreción de variantes con respecto a la edad y al tejido. Y su participación en estos tejidos sugiere la regulación de procesos como la supervivencia, mediada por su bien conocido efecto antiapoptótico en la línea linfóide.

## 9. CONCLUSIONES

Se confirmó la expresión del ARNm y la proteína de GH en tejidos inmunes primarios del pollo (BF y timo).

La expresión de GH se modifica con el desarrollo y existen diferencias claras entre BF, que es un tejido de involución temprana, con respecto al timo, en el que el proceso de involución es más tardío.

La citoarquitectura del timo, así como la distribución de GH no sufre cambios evidentes en etapas post-eclosión (como en 10 y 20 semanas), en contraste con los cambios que se observaron en la BF durante su involución, donde la GH mostró cambios dinámicos y su localización se modifica de forma notoria con respecto a la edad (10 y 20 semanas).

La concentración más elevada de GH fue a las 4 semanas en BF y la disminución significativa coincidió con la etapa de involución del tejido (20 semanas). En el timo, la concentración más elevada se detectó entre las 2 y 4 semanas, después la concentración disminuyó y permaneció constante hasta las 20 semanas.

La cGH que se expresa en los tejidos linfoides (BF y timo) tiene un patrón de heterogeneidad molecular que cambia en la ontogenia, y es distinto al observado en hipófisis.

Las variantes de masa más abundantes que se observaron en BF son: 17, 44, 48 y 70 kDa. En el timo, estas variantes fueron: 17, 27, 44, 48 y 70 kDa.

La GH que se expresa en la BF parece tener una participación dinámica en la maduración de células precursoras de linfocitos B, debido a que co-localiza con células  $IgM^+$  en etapas embrionarias. Las células  $IgM^+$  al madurar en etapas post-eclosión, se convierten en  $IgG^+$ . Así mismo, se produce en etapas post-eclosión por las células dendríticas secretoras y retículo epiteliales, que se encargan de mantener el microambiente para la maduración y diferenciación de los linfocitos B.

En el caso del timo, la GH que se produce por células que podrían ser timocitos y células dendríticas, sugiere que esta hormona participa en la maduración y sobrevivencia de los linfocitos T.

Por todo lo anterior se sugiere la participación de la GH de forma autocrina y/o paracrina en el proceso de desarrollo, proliferación y maduración de las células del sistema inmune (B y T).

Con base en estos resultados y debido a la importancia que podría tener la GH en la maduración adecuada de las células inmunutarias, resulta de gran interés explorar el papel que tiene la hormona de crecimiento en la respuesta inmune innata en pollo.

## 10. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN and Bentle LA. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6434-6437.

Ackerman GA and Knouff RA. 1959. Lymphocytopoiesis in the Bursa of Fabricius. *Am J Anatomy* 104: 163-205.

Aguila MC, Dees WL, Haensly WE and McCann SM. 1991. Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(24): 11485-9.

Ahumada-Solorzano SM. La hormona de crecimiento en el aparato reproductor de pollos hembras. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología. UNAM. 2007.

Aita M, Mazzone AM, Gabrielli F, Evangelista A and Brenna S. 1995. Identification of cells secreting a thymostimulin-like substance and examination of some histoenzymatic pathways in aging avian primary lymphatic organs: I. thymus. *Eur J Histochem* 39: 289-300.

Akira S, K Takeda and T Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680.

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA and Rieder MJ. 1996. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60: 563-72.

Andersen AC, Kawamura K, Pelletier G, Kikuyama S and Vaudry H. 1989. Localization and characterization of prolactin-like immunoreactivity in the pituitary of the frog *Rana ridibunda*. *Gen Comp Endocrinol* 73: 299-307.

Anderson G and Jenkinson EJ. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1: 31-40.

Anderson G, Pongracz J, Parnell S and Jenkinson EJ. 2001. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol* 31: 3349-54.

Aramburo C, Carranza M, Sanchez R and Perera G. 1989. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen Comp Endocrinol* 76: 330-339.

Arámbaro C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S and Sánchez R. 1990a. Molecular isoforms of chicken growth hormone. (cGH); different bioactivities of cGH charge variants. *Gen Comp Endocrinol* 80: 59-67.

Arámbaro C, Donoghue D, Montiel JL, Berghman LR and Scanes CG. 1990b. Phosphorylation of Chicken Growth Hormone. *Life Sciences* Vol. 47, pp. 945-952.

Aramburo C, Navarrette S, Montiel JL, Sanchez R and Berghman LR. 1991. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): evidence of G-cGH isoforms. *Gen Comp Endocrinol* 84: 135-146.

Arámbruro C, Montiel JL, Sanchez R, Perera G, Navarrete S, Carranza M, García-Moreno J y Fenton B. 1993. La hormona del crecimiento de pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso conmemorativo de jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, t I. México, UNAM*, 483-499.

Arámbruro C, Carranza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Berumen L, López J, Pascacio H, Huerta L and Luna M. 2001a. Molecular and functional heterogeneity of growth hormone. *Avian Endocrinology. A Dawson & CM Chaturvedi (Eds.)*. 273-286.

Arámbruro C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L and Scanes C. 2001b. Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15: 231-240.

Arnold RE and Weigent DA. 2004. The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmunomodulation* 11: 149-59.

Badolato R, Bond HM, Valerio G, Petrella A, Morrone G, Waters MJ, Venuta S and Tenore A. 1994. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human, peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 984-990.

Barraza, N. Caracterización de las Variantes Moleculares de la Hormona de Crecimiento en la Bolsa de Fabricio del Pollo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2002

Barrow PA. 1992. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* in chickens measured by ELISA. *Epidemiol Infect* 108: 231-41.

Baudet ML, Sanders EJ and Harvey S. 2003. Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology* 144: 5459-5468.

Baudet ML, Harvey S. 2007. Small chicken growth hormone (scGH) variant in the neural retina. *J Mol Neurosci* 31:261-71.

Bauman G. 1991. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev* 12: 424-447.

Baumann H and Gauldie J. 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80.

Bauman G. 1999. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res* 51: 2-6.

Baxter JB, Blalock JE and Weigent DA. 1991. Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor-I from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology* 129: 1727-1734.

- Berczi I, Nagy E, de Toledo SM, Matusik RJ and Friesen HG. 1991. Pituitary hormones regulate c-myc and DNA synthesis in lymphoid tissue. *J Immunol* 146: 2201-2206.
- Berczi I and Gorczynski RM. 2001. *NeuroImmune Biology, Vol. 1: New Foundation of Biology*. 200p.
- Berghman LR, van Beeumen J, Decuypere E, Kühn ER and Vandesande F. 1988. One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoadsorbent. *J Endocrinol* 118: 381-387.
- Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Cárabez A and Arámburo C. 2004. Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 139: 113-123.
- Besedovsky HO and del Rey A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrinology Reviews* 17: 64-102.
- Betti F, Worsmann TU, De Faria FP and Sesso A. 1991. Development of the cloacal bursa in the domestic fowl. II. A quantitative and fine structural analysis of the follicular cortex and medulla. *J Submicrosc Cytol Pathol* 23: 613-28.
- Beutler B and Rietschel ET. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3(2): 169-76.
- Bichell DP, Kikuchi K and Rotwein P. 1992. Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1899-908.
- Bickford AA, Kuney DR, Zander DV and McMartin DA. 1985. Histologic characterization of the involuting bursa of Fabricius in single-comb white Leghorn chickens. *Avian Dis* 29: 778-797.
- Binder G, Revskoy S and Gupta D. 1994. In vivo growth hormone gene expression in neonatal rat thymus and bone marrow. *J Endocrinol* 140: 137-143.
- Bockman DE and Cooper MD. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-477.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bresson JL, Jeay S, Gagnerault MC, Kayser C, Beressi N, Wu Z, Kinet S, Dardenne M and Postel-Vinay MC. 1999. Growth hormone (GH) and prolactin receptors in human peripheral blood mononuclear cells: relation with age and GH-binding protein. *Endocrinology* 140: 3203-3209.
- Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelinas RE and Seeburg PH. 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4: 479-497.

- Chen WY, Wight DC, Mehta BV, Wagner TE and Kopchick JJ. 1991a. Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. *Mol Endocrinol* 5: 1845-1852.
- Chen WY, White ME, Wagner TE and Kopchick JJ. 1991b. Functional antagonism between endogenous mouse growth hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology* 129: 1402-8.
- Chen WY, Chen NY, Yun J, Wagner TE and Kopchick JJ. 1994. In vitro and in vivo studies of antagonistic effects of human growth hormone analogs. *J Biol Chem* 269: 15892-15897.
- Chen WY, Chen NY, Yun J, Wight DC, Wang XZ, Wagner TE and Kopchick JJ. 1995. Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Mol Endocrinol* 9: 292-302.
- Choi YS and Good RA. 1972. Development of chicken lymphoid system. II. Synthesis of primordial immunoglobulin M by the bursa cells of chick embryo. *J Exp Med* 136: 8-20.
- Ciriaco E, Piñera PP, Díaz-Esnal B and Laura R. 2003. Age-Related Changes in the Avian Primary Lymphoid Organs (Thymus and Bursa of Fabricius). *Microsc Res Tech* 62: 482-487.
- Clark R. 1997. The somatogenic hormones and insuline-like growth factor: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 18: 157-169.
- Coltey M, Bucy RP, Chen CH, Cihak J, Lösch U, Char D, Le Douarin NM and Cooper MD. 1989. Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras. *J Exp Med* 170: 543-557.
- Compton MM, Gibbs PS and Johnson LR. 1990. Glucocorticoid activation of deoxyribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. *Poult Sci* 69: 1292-1298.
- Crilly PJ, Johnson PC, Gardner MJ and Flint DJ. 1994. Immunoneutralization of GH in neonatal rats results in defects in lymphatic tissues and the humeral immune response. *Endocr J* 2: 105-109.
- Cunningham BC and Wells JA. 1991. Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3407-3411.
- Curtis MJ, Flack IH, Harvey S. 1980. The effect of *Escherichia coli* endotoxins on the concentrations of corticosterone and growth hormone in the plasma of the domestic fowl. *Res Vet Sci* 28: 123-127.
- Dardenne M, Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM and Savino W. 2009. Growth hormone modulates migration of developing T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1153: 1-5.
- Defalque D, Brandt N, Ketelslegers JM and Thissen JP. 1999. GH insensitivity induced by endotoxin injection is associated with decreased liver GH receptors. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1): E565-572.

- Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M and Diederich M. 2003. An introduction to the Molecular Mechanism of Apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 1010: 1-8.
- de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Dardenne M, Savino W. 1997. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 76: 39-49.
- de Mello-Coelho V, Gagnerault MC, Sourberbielle JC, Strasburger CJ, Savino W, Dardenne M and Postel-Vinay MC. 1998a. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 139: 3837-3842.
- de Mello-Coelho V, Savino W, Postel-Vinay MC and Dardenne M. 1998b. Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Dev Immunol* 6: 317-23.
- Ekino S. 1993. Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage. *Eur J Immunol* 23: 772-775.
- Ekino S, Riwar B, Kroese FG, Schwander EH, Koch G and Nieuwenhuis P. 1995. Role of environmental antigen in the development of IgG<sup>+</sup> cells in the bursa of Fabricius. *J Immunol* 155: 4551-4558.
- Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B and Fontana A. 2004. Limited proteolysis. *Biochemistry* 51: 299-321.
- Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente JS and Chowen JA. 2002. Growth Hormone (GH) and GH-Releasing Peptide-6 Increase Brain Insulin-Like Growth Factor-I Expression and Activate Intracellular Signaling Pathways Involved in Neuroprotection. *Endocrinology* 143(10): 4113-4122
- Frank SJ, Gilliland G and Van Epps C. 1994. Treatment of IM-9 cells with human growth hormone (GH) promotes rapid disulfide linkage of the GH receptor. *Endocrinology* 135: 148-156.
- Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J and Hennen G. 1987. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 635-637.
- Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J and Hennen G. 1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 1171-1180.
- Franchini A and Ottaviani E. 1999. Immunoreactive POMC-derived peptides and cytokines in the chick thymus and bursa of Fabricius microenvironments: age-related changes. *J Neuroendocrinol* 11: 685-692.
- Frazier JA. 1974. The ultrastructure of the lymphoid follicles of the chick bursa of Fabricius. *Acta Anat (Basel)* 88: 385-397.
- Gallego M, Del Cacho E, Felices C, Varas A and Bascuas JA. 1996. Distribution of bursal secretory dendritic cells in the chicken. *Anat Rec* 246: 372-376.

- Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks GL 3<sup>rd</sup> and Mashaly MM. 2002. Initiation of humoral immunity. I. The role of cytokines and hormones in the initiation of humoral immunity using T-independent and T-dependent antigens. *Dev Comp Immunol* 26: 751-759.
- Givalois L, Dornand J, Mekaouche M, Solier MD, Bristow AF, Ixart G, Siaud P, Assenmacher I and Barbanel G. 1994. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol* 267: R164-170.
- Glick G, Chang TS and Jaap RG. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poult Sci* 35: 224-234.
- Glick B. 1980. The thymus and bursa of Fabricius: endocrine organs? In *Avian Endocrinology* (eds A. Eppler and M.H. Stetson), pp. 209–229. Academic Press, Inc., New York.
- Glick B. 1984. Interrelation of the avian immune and neuroendocrine systems. *J Exp Zool* 232: 671-682.
- Glick B, Oláh I, 1984. Methods of bursectomy. *Methods Enzymol* 108, 3.
- Glick B. 1991. Historical perspective: the bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present. *Vet Immunol Immunopathol* 30: 3-12.
- Glick B and Olah I. 1993. Bursal secretory dendritic-like cell: a microenvironment issue. *Poult Sci* 72: 1262-1266.
- Glick B. 1995. Embryogenesis of the bursa of Fabricius: stem cell, microenvironment, and receptor-paracrine pathways. *Poult Sci* 74: 419-426.
- Goffin V and Kelly PA. 1996. Prolactin and growth hormone receptors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45: 247-255.
- González-Juanatey JR, Piñeiro R, Iglesias MJ, Gualillo O, Kelly PA, Diéguez C and Lago F. 2004. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro through a calcineurin-dependent mechanism. *J Endocrinol* 180: 325-335.
- Graf L, Li CH and Jibson MD. 1992. Human growth hormone molecule with no loss of the complex. *Science* 255: 306-312.
- Grossi CE, Lydyard PM and Cooper MD. 1977. Ontogeny of cells in the chicken. II. Changing patterns of cytoplasmic IgM expression and modulation requirements for surface IgM by anti- $\mu$  antibodies. *J Immunol* 119: 749-756.
- Guarcello V, Weigent DA and Blalock JE. 1991. Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol*. 136: 291-302.
- Harding PA, Wang XZ, Kelder B, Souza S, Okada S and Kopchick JJ. 1994. In vitro mutagenesis of growth hormone receptor Asn-linked glycosylation sites. *Mol Cell Endocrinol* 106: 171-180.

- Hart IC, Blake LA, Chadwick PM, Payne GA and Simmonds AD. 1984. The heterogeneity of bovine growth hormone. Extraction from the pituitary of components with different biological and immunological properties. *Biochem J* 218: 573-581.
- Hassan JO, Mockett AP, Catty D and Barrow PA. 1991. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. *Avian Dis* 35: 809-819.
- Hattori N, Shimatsu A, Sugita M, Kumagai S and Imura H. 1990. Immunoreactive growth hormone (GH) secretion by human lymphocytes: augmented release by exogenous GH. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 396-401.
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K and Inagaki C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and Ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4284-4291.
- Houston B and Goddard C. 1988. Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J Endocrinol* 116: 35-41.
- Houssaint E, Belo M and Le Douarin NM. 1976. Investigations of cell lineage and tissue in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Dev Biol* 53: 250-264.
- Houssaint E. 1987. Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *J Immunol* 138: 3626-3634.
- Hull KL, Thiagarajah S and Harvey S. 1996. Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res* 286: 69-80.
- Hull KL and Harvey S. 1997. Growth hormone: an immune regulator in vertebrates. *Memorias XIII International Congress of Comparative Endocrinology, Yokohama, Japón*. 565-572.
- Hull KL, Harvey S. 1998. Autoregulation of central and peripheral growth hormone receptor mRNA in domestic fowl. *J Endocrinol* 156: 323-329.
- Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, and Baixeras E. 2000. Growth Hormone Prevents Apoptosis through Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Interleukin-3-Dependent Ba/F3 Cell Line. *Mol Endocrinol* 14: 650-661.
- Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA and Baixeras E. 2002. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 188: 1-7.
- Jensen J, Galsgaard ED, Karlsten AE, Lee YC and Nielsen JH. 2005. STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1 $\beta$ , interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor  $\alpha$  induced apoptosis independent of nitric oxide production. *J Endocrinol* 187: 25-36.
- Kang Z, Bédécarrats GY, Zadworny D. 2007. Expression patterns of the prolactin receptor gene in chicken lymphoid tissues during embryogenesis and posthatch period. *Poult Sci* 86: 2404-2412.

Kawai T and S Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-825.

Kawauchi H, Moriyama S, Yasuda A, Yamaguchi K, Shirahata K, Kubota J and Hirano T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch Biochem Biophys* 244: 542-552.

Kendall MD. 1980. Avian thymus glands: a review. *Dev Comp Immunol* 4: 191-209.

Kelley KW. 1989. Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol* 38: 705-713.

Kelley KW. 1990. The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Ann NY Acad Sci* 594: 95-103.

Kelley KW, Weigent DA and Kooijman R. 2007. Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun* 21: 384-392.

Kimata H and Fujimoto M. 1994. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce immunoglobulin (Ig)E and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med* 180: 727-732.

Kincade PW and Cooper MD. 1971. Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immunofluorescent analysis using purified antibodies to mu, gamma and light chains. *J Immunol* 106: 371-382.

Kluger MJ, Ringler DH and Anver MR. 1975. Fever and survival. *Science* 188: 166-168

Kooijman R, Hooghe-Peters EL and Hooghe R. 1996. Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Adv Immunol* 63: 377-454.

Kopchick JJ and Andry JM. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab* 71: 293-314

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lang CH, Fan J, Cooney R and Vary TC. 1996. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates sepsis-induced alterations in the insulin receptor antagonist attenuates sepsis-induced alterations in the insulin-like growth factor system and protein synthesis. *Am J Physiol* 270(3 Pt 1): E430-437.

Lang CH, Pollard V, Fan J, Traber LD, Traber DL, Frost RA, Gelato MC and Prough DS. 1997. Acute alterations in growth hormone-insulin-like growth factor axis in humans injected with endotoxin. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2): R371-378.

Lechner O, Dietrich H, Wieggers GJ, Vacchio M, Wick G. 2001. Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. *Int Immunol* 13: 769-776.

Le Douarin NM, Michel G and Baulieu EE. 1980. Studies of testosterone-induced involution of the bursa of Fabricius. *Dev Biol* 75: 288-302.

- Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DM, Nogueira AC, Dardenne M, Hermine O and Savino W. 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5545-5550.
- Lerner KG, Glick B and McDuffie FC. 1971. Role of bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken. *J Immunol* 107: 493-503.
- Leshchinsky T and Klasing K. 2001. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Dev Comp Immunol* 25: 629-638.
- Lewis UJ. 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Annu Rev Physiol* 46: 33-42.
- Lewis UJ. 1992. Growth hormone: what is it what does it do?. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3: 117-121.
- Lieberthal W, Triaca V, Koh JS, Pagano PJ and Levine JS. 1998. Role of superoxide in apoptosis induced by growth factor withdrawal. *Am J Physiol* 275: F691-702.
- Luheshi GL. 1999. Cytokines and fever. *Ann NY Acad Sci* 856: 83-89.
- Luna-Acosta JL. Efecto de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio de pollo. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología. UNAM. 2008.
- Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S and Arámburo C. 2005. Heterogeneity of Growth Hormona Immunoreactivity in Lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 144: 28-37.
- Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet M-L, Harvey S and Arámburo C. 2008. Immune growth hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol* 32: 1313-1325.
- Lupetti M and Dolfi A. 1980. Concerning bidirectional transport by the lymphoid follicle-associated epithelial cells. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol* 26: 609-613.
- Mansikka A, Sandberg M, Lassila O and Toivanen P. 1990. Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9416-9420.
- Marsh JA, Gause WC, Sandhu S and Scanes CG. 1984. Enhanced growth and immune development in dwarf chickens treated with mammalian growth hormone and thyroxine. *Proc Soc Exp Biol Med* 175: 351-360.
- Marsh JA, Johnson BE, Lillehoj HS and Scanes CG. 1992. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune thyroiditis (obese) strain chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 199: 114-122.
- Martínez-Coria H, López-Rosales J, Carranza M, Berúmen L, Luna M and Arámburo C. 2002. Differential secretion of chicken growth hormone variants alter growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* 17: 91-102.

- Martínez-Moreno CG. Síntesis y secreción de la hormona de crecimiento en cultivos de células testiculares. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología. UNAM. 2006.
- Masteller EL and Thompson CB. 1994. B cell development in the chicken. *Poult Sci* 73: 998-1011.
- Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Furukawa V, Ikeda S, and Muto T. 1998. Growth hormone inhibits apoptosis and up-regulates reactive oxygen intermediates production by human polymorphonuclear neutrophils. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 22: 368-374.
- McCormack WT, Tjoelker LW, Barth CF, Carlson LM, Petryniak B, Humphries EH and Thompson CB. 1989. Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Dev* 3: 838-847.
- McCormack WT and Thompson CB. 1990. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light-chain gene. *Adv Immunol* 48: 41-67.
- Meyer RK, Rao MA and Aspinall RL. 1959. Inhibition of the development of the bursa of Fabricius in the embryos of the common fowl by 19-nortestosterone. *Endocrinology* 64: 890-897.
- Montiel JL, Berghman LR and Arámburo C. 1992. Identification of Growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen Comp Endocrinol* 88: 298-306.
- Moore MAS and Owen JJT. 1965. Chromosome marker studies on the development of the hematopoietic system the chicken. *Nature* 208: 956.
- Moore MAS and Owen JJT. 1967. Experimental studies on the development of the thymus. *J Exp Med* 126: 715-722.
- Moore MA. 2004 Commentary: the role of cell migration in the ontogeny of the lymphoid system. *Stem Cells Dev* 13: 1-21.
- Motyka B and Reynolds JD. 1991. Apoptosis is associated with extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patches and the chicken bursa of Fabricius: a possible role for selection. *Eur J Immunol* 21: 1951-1958.
- Murphy AE, Peek H, Baudet ML and Harvey S. 2003 Extrapituitary GH in the chicken: underestimation of immunohistochemical staining by Carnoy's fixation. *J Endocrinol* 177: 223-234.
- Naukkarinen A, Arstila AU and Sorvari TE. 1978. Morphological and functional differentiation of the surface epithelium of the bursa Fabricii in chicken. *Anat Rec* 191: 415-432.
- Naukkarinen A and Sorvari TE. 1984. Involution of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. *J Leukoc Biol* 35: 281-290.

Neiman PE, Thomas SJ and Loring G. 1991. Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. In: Proc Natl Acad Sci USA 88: 5857-5861.

Olah I and Glick B. 1978. The number and size of the follicular epithelium and follicles in the bursa of Fabricius. Poult Sci 57: 1445-1450.

Olah I, Kendall C and Glick B. 1991. Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. Poult Sci 70: 1144-1152.

Olah I, Kendall C and Glick B. 1992. Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. Anat Rec 233: 111-120.

Ostberg JR, Taylor SL, Baumann H and Repasky EA. 2000. Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. J Leukoc Biol 68: 815-820.

Otsubo Y, Chen N, Kajiwara E, Horiuchi H, Matsuda H and Furusawa S. 2001. Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius. Dev Comp Immunol 25: 485-493.

Ottaway CA, Fong IW, da Silva B, Singer W and Karrass L. 1998. Integrative aspects of a human model of endotoxemia. Can J Physiol Pharmacol 76: 473-478.

Paniagua R y Nistal M. 1983. Introducción a la histología animal comparada. España. Labor 480p.

Paramithiotis E, Jacobsen KA and Ratcliffe MJ. 1995. Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius. J Exp Med 181: 105-113.

Parreira L, Neves H and Simões S. 2003. Notch and lymphopoiesis: a view from the microenvironment. Semin Immunol 15: 81-89.

Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH and Neta R. 1993. Synergistic roles of IL-6, IL-1, and TNF in adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology 132: 946-52.

Phillips AD, Brown A, Hicks S, Schüler S, Murch SH, Walker-Smith JA and Swallow DM. 2004. Acetylated sialic acid residues and blood group antigens localize within the epithelium in microvillous atrophy indicating internal accumulation of the glycocalyx. Gut 53: 1764-1771.

Pink JRL, Vainio O and Rijnbeek AM. 1985. Clones of lymphocytes B in individual follicles of the bursa of Fabricius. Eur J Immunol 15: 83-87.

Pink JR and Lassila O. 1987. B-cell commitment and diversification in the bursa of Fabricius. Curr Top Microbiol Immunol 135: 57-64.

- Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worky PF and Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced ARC mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25: 1761-1768.
- Ramírez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Workley PF and Barnes CA. 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26: 12237-12241.
- Ratcliffe MJ, Lassila O, Pink JR and Vainio O. 1986. Avian B cell precursors: immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur J Immunol* 16: 129-133.
- Ratcliffe MJ. 2002. B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 337-340.
- Ratcliffe MJ. 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol* 30: 101-118.
- Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC and Morel G. 2001. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem* 49: 347-354.
- Render CL, Hull KL and Harvey S. 1995. Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine* 3: 729-735.
- Reynaud CA, Bertocci B, Dahan A and Weill JC. 1994. Formation of the B cell repertoire: Ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol* 57: 353-378.
- Reynolds JD. 1987. Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *Eur J Immunol* 17: 503-507.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, Schrejer M, and Brade H. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8: 217-225.
- Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Harvey S, Arámburo C and Luna M. 2010. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships?. *Gen Comp Endocrinol* 167: 297-307.
- Rodríguez-Sánchez IP, Tejero ME, Cole SA, Comuzzie AG, Nathanielsz PW, Wallis M and Barrera-Saldaña HA. 2010. Growth hormone-related genes from baboon (*Papio hamadryas*): Characterization, placental expression and evolutionary aspects. *Gene* 450: 1-7.
- Roeder DJ, Lei MG and Morrison DC. 1989. Endotoxic-lipopolysaccharide-specific binding proteins on lymphoid cells of various animal species: association with endotoxin susceptibility. *Infect Immun* 57: 1054-1058.
- Romppanen T. 1982. Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic histoquantitative study. *Poult Sci* 61:2261-2270.

- Rosenberg HF and Gallin JI. 1999. Inflammation. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed.) Philadelphia; Lippincott-Raven, 1051-1066.
- Sabharwal P and Varma S. 1996. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2663-2669.
- Sánchez-Refusta F, Ciriaco E, Germana A, Germana G and Vega JA. 1996. Age-related changes in the medullary reticular epithelial cells of the pigeon bursa of Fabricius. *Anat Rec* 246:473-80.
- Sanders EJ and Harvey S. 2004. Growth hormone as an early embryonic and differentiation factor. *Anat Embryol (Berl)* 209: 1-9.
- Savino W and Dardenne M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 21: 412-43.
- Savino W, Postel-Vinay MC, Smaniotto S and Dardenne M. 2002. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 55: 442-452.
- Savino W, Smaniotto S, Binart N, Postel-Vinay MC and Dardenne M. 2003. In vivo effects of growth hormone on thymic cells. *Ann NY Acad Sci* 992: 179-185.
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E and Villa-Verde DM. 2004. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 75: 951-961.
- Savino W. 2007. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol* 92: 813-817.
- Scanes CG, Duyka DR, Lauterio TJ, Bowen SJ, Huybrechts LM, Bacon WL and King DB. 1986. Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl. *Growth (Spring)* 50: 12-31.
- Schwander JC, Hauri C, Zapf J and Froesch ER. 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113: 297-305.
- Scott TR. 2004. Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poult Sci* 83:574-579.
- Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF and Ono SJ. 1995. Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol* 165: 12-19.
- Silva AB, Aw D and Palmer DB. 2008. Functional analysis of neuropeptides in avian thymocyte development. *Dev Comp Immunol* 32: 410-20.

Sirotkin AV and Makarevich AV. 1999. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of cAMP/protein kinase A system. *J Endocrinol* 163: 317-327.

Shimizu K, Adachi K and Teramoto A. 2005. Growth hormone enhances natural killer cell activity against glioma. *J Nippon Med Sch* 72: 335-340.

Smaniotto S, Ribeiro-Carvalho MM, Dardenne M, Savino W and De Mello-Coelho V. 2004. Growth hormone stimulates the selective trafficking of thymic CD4+CD8- emigrants to peripheral lymphoid organs. *Neuroimmunomodulation* 11: 299-306.

Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M and Savino W. 2005. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. *Endocrinology* 146: 3005-3017.

Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anat Rec* 47: 119-143

Sinha YN and Gilligan TA. 1984. A "20K" form of growth hormone in the murine pituitary gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 177: 465-74.

Such-Sanmartín G, Bosch J, Segura J and Gutiérrez-Gallego R. 2009. Generation of 5 and 17 kDa human growth hormone fragments through limited proteolysis. *Growth Factors* 27: 255-264.

Sumita K, Hattori N and Inagaki C. 2005. Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *J Pharmacol Sci* 97: 408-416.

Susan LF and Brad TC. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73: 1907-1916.

Takahama Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6: 127-35.

Takeuchi S, Haneda M, Tshigawara K and Takahashi S. 2001. Identification of a novel GH isoform: a possible link between GH and melanocortin systems in the developing chicken eye. *Endocrinology* 142: 5158–5166.

Untergasser G, Kranewitter W, Walser F, Madersbacher S, Dirnhofer S and Berger P. 1996. The testis as eutopic production site of human growth hormone, placental lactogen and prolactin: possible autocrine/paracrine effects on testicular function. *Wien Klin Wochenschr* 108: 541-546.

Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, Madersbacher S, Dirnhofer S and Berger P. 1997. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 130: 53-60.

- Villanua MA, Szary A, Bartke A and Esquifino AI. 1992. Changes in lymphoid organs of Ames dwarf mice after treatment with growth hormone, prolactin or ectopic pituitary transplants. *J Endocrinol Invest* 15: 587-595.
- Wang X, Darus CJ, Xu BC and Kopchick JJ. 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol Endocrinol* 10: 1249-1260.
- Warner MD, Sinha YN and Peabody CA. 1993. Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. Relative proportions in morning and afternoon samples. *Horm Metab Res* 25: 425-429.
- Weigent DA, Baxter JB, Wear WE, Smith LR, Bost KL and Blalock JE. 1988. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J* 2: 2812-2818.
- Weigent DA and Blalock JE. 1989. Expression of growth hormone by lymphocytes. *Int Rev Immunol* 4: 193-211.
- Weigent DA and Blalock JE. 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol* 135: 55-65.
- Weigent DA, Baxter JB and Blalock JE. 1992. The production of growth hormone and insulin-like growth factor-I by the same subpopulation of rat mononuclear leukocytes. *Brain Behav Immun* 6: 365-376.
- Weigent DA and Blalock JE. 1995. Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukoc Biol* 57: 137-150.
- Weill J and C Reynaud. 1987. The chicken B cell compartment. *Science* 238: 1094-1098.
- Wilson TJ and Boyd RL. 1990. Cyclophosphamide- and testosterone-induced alteration in chicken bursal stroma identified by monoclonal antibodies. *Immunology* 70: 241-246.
- Wlodawer A, Pavlovsky A and Gustchina A. 1993. Hematopoietic cytokines –similarities and differences in structure, with implications for receptor binding. *Protein Sci* 2: 1373-1382.
- Wu H, Devi R and Malarkey WB. 1996. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system -a Clinical Research Center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1278-82
- Xie H, Rath C, Huff GR, Huff WE and Balog JM. 2000. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult Sci* 79: 33-40.
- Yasuda A, Yamaguchi K, Papkoff H, Yokoo Y and Kawauchi H. 1989. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*). *Gen Comp Endocrinol* 73: 242-251.

Yasuda A, Yamaguchi K, Noso T, Papkoff H, Polenov AL, Nicoll CS, Kawauchi H. 1992. The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser guldenstadti*). *Biochim Biophys Acta* 1120: 297-304.

Yoshida A, Ishioka C, Kimata H and Mikawa H. 1992. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free medium. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126: 524-529.

Zapata AG and Cooper EL. 1990. *The bursa of Fabricius En: The immune system comparative histophysiology*. John Wiley and Sons. Gran Bretaña. 335p.

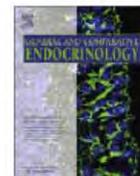
## **ANEXO I**

**Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Harvey S, Arámburo C, Luna M. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships?. General and Comparative Endocrinology. 2010 167(2): 297-307.**



Contents lists available at ScienceDirect

## General and Comparative Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygcen](http://www.elsevier.com/locate/ygcen)

## Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships?

A.J. Rodríguez-Méndez<sup>a</sup>, J.L. Luna-Acosta<sup>a</sup>, M. Carranza<sup>a</sup>, S. Harvey<sup>b</sup>, C. Arámburo<sup>a</sup>, M. Luna<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro. 76230, Mexico

<sup>b</sup>Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G2H7

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 December 2009

Revised 13 March 2010

Accepted 21 March 2010

Available online 27 March 2010

#### Keywords:

Growth hormone (GH)

GH mRNA

Bursa of Fabricius

Extrapituitary GH

Apoptosis

IgG

IgM

Paracrine/autocrine effects

Caspase-3

### ABSTRACT

Growth hormone (GH) is expressed in the chicken bursa of Fabricius (BF), an organ that undergoes three distinct developmental stages: rapid growth (late embryogenesis until 6–8 weeks of age [w]), plateaued growth (between 10 and 15w), and involution (after 18–20w). The distribution and abundance of GH-immunoreactivity (GH-IR) and GH mRNA expression in stromal and non-stromal bursal cells during development, as well as the potential anti-apoptotic effect of GH in bursal cell survival were the focus of this study. GH mRNA expression was mainly in the epithelial layer and in epithelial buds at embryonic day (ED) 15; at 2w it was widely distributed within the follicle and in the interfollicular epithelium (IFE); at 10w it clearly diminished in the epithelium; whereas at 20w it occurred in only a few cortical cells and in the connective tissue. Parallel changes in the relative proportion of GH mRNA expression (12, 21, 13, 1%) and GH-IR (19, 18, 11, <3%) were observed at ED 15, 2w, 10w, and 20w, respectively. During embryogenesis, GH-IR co-localized considerably with IgM-IR, but scarcely with IgG-IR, whereas the opposite was observed after hatching. Significant differences in bursal cell death occurred during development, with 9.3% of cells being apoptotic at ED 15, 0.4% at 2w, 0.23% at 10w, and 21.1% at 20w. Addition of GH increased cultured cell survival by a mechanism that involved suppression (up to 41%) of caspase-3 activity. Results suggest that autocrine/paracrine actions of bursal GH are involved in the differentiation and proliferation of B lymphocytes and in BF growth and cell survival in embryonic and neonatal chicks, whereas diminished GH expression in adults may result in bursal involution.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

It is now well established that while growth hormone (GH) is primarily produced in the pituitary gland, the GH gene is also expressed in many other tissues, including those of the immune system (Gelato, 1993; Clark, 1997). Previous studies have shown that GH plays an important regulatory role in the development and function of the immune system (Clark, 1997; Postel-Vinay et al., 1997; Sumita et al., 2005). Moreover, GH deficiency impairs immune function, which can be restored by addition of exogenous GH (Khansari and Gustad, 1991; Johnson et al., 1997). GH can also stimulate growth in primary and secondary immune organs (Marsh et al., 1992; Villanua et al., 1992), and induce lymphocyte proliferation, and the production of cytokines and other immune

factors (Yoshida et al., 1992; Murphy et al., 1993). These actions are likely to be receptor-mediated, since these immune tissues have been shown to express growth hormone receptor/binding proteins (GHR/GHBP) which are structurally related to the cytokine receptor super-family (de Mello-Coelho et al., 1998; Hull et al., 1996). These actions may be induced by pituitary GH in an endocrine way, but they may also reflect autocrine or paracrine actions of GH produced within immune tissues. Indeed, a knockdown of endogenous GH in immune cells by GH oligonucleotides impairs lymphocyte proliferation (Weigent and Blalock, 1991), as does the immunoneutralization of endogenous GH (Weigent et al., 1988; Weigent and Blalock, 1991; Sabharwal and Varma, 1996) and blockade of local GH action (Ratcliffe et al., 1986).

The bursa of Fabricius (BF) is a unique primary lymphoid tissue in birds and we have shown that it is also a site of GH production and GH action (Luna et al., 2005, 2008). This tissue undergoes striking changes in size during development, growing rapidly during late embryogenesis and for several months after hatching, before regressing in sexually mature adults (Glick, 1991; Ciriaco et al., 2003). The GH content of the BF parallels this pattern of development (Luna et al., 2005; Hull et al., 2005) suggesting it may be in-

**Abbreviations:** GH, growth hormone; BF, bursa of Fabricius; FAE, follicle-associated epithelium; IFE, interfollicular epithelium; C, cortex; M, medulla; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; IR, immunoreactivity; IHC, immunohistochemistry; ISH, *in situ* hybridization.

\* Corresponding author. Fax: +52 442238 1005.

E-mail address: [lunam@servidor.unam.mx](mailto:lunam@servidor.unam.mx) (M. Luna).

involved in BF development and involution. This developmental pattern in bursal GH content could reflect changes in the local expression of GH in one or more bursal cell types, since it is known that GH mRNA and GH are present in diverse bursal compartments in 4-week-old chicks (Luna et al., 2008). At that age, GH mRNA was found to be expressed mainly in the follicular cortex, which is mostly comprised of B lymphocyte, but was lacking in the medulla, where lymphocyte progenitor cells mature. In contrast, more GH-immunoreactivity was present in the medulla than in the cortex. In non-stromal structures, GH-IR and GH mRNA were primarily in lymphocytes, but also in macrophage-like cells, secretory dendritic cells (SDCs), and reticuloendothelial cells (RECs). In stromal structures, GH mRNA, GH, and GH receptor were expressed in cells near the connective tissue (CT) between follicles and below the serosa. In contrast, GH (but not GH mRNA or GHR) was present in cells of the interfollicular epithelium (IFE), the follicle-associated epithelium (FAE) and the interstitial corticoepithelium. In the BF, GHR co-localized with GH and IgG-immunoreactivities in immature lymphoid cells near the cortex and in IgG+ cells in connective tissue, suggesting a functional role for bursal GH on B cell differentiation (Luna et al., 2008).

The cellular distribution and abundance of GH and GH mRNA at other periods of bursal development and involution is, however, unknown. We have therefore studied the expression of GH and GH mRNA in stromal and non-stromal bursal cells during bursal development and involution, and explored further the likely autocrine/paracrine role of bursal GH on the IgM/IgG switch that occurs during B cell proliferation and differentiation by analyzing the simultaneous co-localization of GH in IgM+ cells and/or IgG+ cells in the developing BF. In addition, as GH is anti-apoptotic in other tissues (Sanders et al., 2006), the possibility that GH promotes cell survival in the BF was assessed.

## 2. Materials and methods

Embryonic bursae of Fabricius were obtained from pathogen-free White Leghorn fertile eggs (obtained from Alpes, Tehuacán, Mexico) that had been incubated at 38 °C in a humidified air chamber and rotated one-quarter of a revolution every 50 min during incubation. The tissues were collected at embryonic day (ED) 15 of the 21d incubation period, right after the bursal follicles start to develop within the plicae (12–13 days of embryogenesis) (Ciriaco et al., 2003; Ackerman and Knouff, 1991). The tissues were fixed in Bouin-Hollande sublimate (Falini and Taylor, 1983) for 24–48 h at room temperature, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin wax. Tissue sections (7 µm thick) were then cut using a microtome and mounted onto charged glass slides (Superfrost/Plus) [Fisher, Pittsburgh, PA]. After hatching, tissues were also collected from male chicks at 2 weeks of age when the bursal follicles were rapidly proliferating, at 10 weeks of age when the bursae were attaining a stationary phase in its growth (Ciriaco et al., 2003) and from birds at 20 weeks of age, when the bursae were involuting (Ciriaco et al., 2003). The birds were kept on a 14L:10D photoperiod and had access to commercial food and water *ad libitum* in the avian facilities at the Institute. The birds were killed by decapitation, with approval from the Institute of Neurobiology Committee on Bioethics.

### 2.1. Hematoxylin–eosin staining

Serial tissue sections were cleared in Citrisolv [Fisher], 3 × 5 min, rehydrated in a graded series of ethanol (absolute, 2 × 5 min; 96% 2 × 5 min; 70%, 5 min; 50%, 5 min; deionized water, 5 min), and equilibrated in water (1 min). Slides were incubated with Harris hematoxylin (0.5% hematoxylin [Merck, Darmstadt,

Germany] in 5% absolute ethanol, 10% aluminum potassium sulfate [Sigma, St. Louis, MO], 0.25% mercury (II) oxide red [Aldrich, St. Louis, MO] for 3 min, rinsed with water with agitation for 1 min and rapidly passed through acidic alcohol (0.1% HCl in 70% alcohol), washed in water for 1 min and then dipped five times in ammoniacal water (0.1% NH<sub>4</sub>OH in deionized water) and rinsed in distilled water for 1 min. The slides were then incubated in eosin Y [Sigma], 0.25% in 60% acidified alcohol) for 15 s, rinsed with water and then dehydrated in a graded series of ethanol (70%, 96% 3 ×, 100% 3 ×). Sections were then dipped in two baths of xylol (3 × each) before mounting permanently using Entellan [Merck].

### 2.2. Alcian blue staining

Rehydrated tissue sections were incubated in 3% acetic acid for 3 min and then in Alcian blue solution (1% w/v Alcian Blue 8GX [Sigma], in 3% glacial acetic acid, pH 2.5) for 45 min, to label mucous-secreting cells (Phillips et al., 2004). After rinsing 2 min in water the slides were coverslipped for observation under the microscope.

### 2.3. Immunohistochemistry

BF tissue sections were rehydrated with Citrisolv [Fisher], absolute alcohol, 95% alcohol, 70% alcohol, lugol, thiosulphate, and distilled water. Slides were equilibrated in Tris-buffered saline pH 7.6 (TBS), and then incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50% methanol to block endogenous peroxidase. The sections were washed in TBS (3 × 10 min) and then incubated in 0.1% Triton X-100 in TBS containing 5% non-fat dry milk [Bio-Rad, Hercules, CA] for 2 h. Tissue sections were incubated overnight with a specific rabbit polyclonal antibody directed against recombinant chicken GH (C-1, produced as described in Arámburo et al. (1989), 1:500 dilution), and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution for 2 h) [Zymed Laboratories, San Francisco, CA] and developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) [Sigma] and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Luna et al., 2008). The specificity of staining was determined by preabsorbing the primary antibody with excess recombinant chicken GH (0.7 mg/ml). The primary antibody was also replaced with normal rabbit serum or omitted, for further negative controls. The antibody has been used previously to stain GH-expressing cells in pituitary glands and BFs of chicks (Luna et al., 2008). Alternatively, tissue sections were incubated with commercial rabbit antibodies raised against chicken/turkey IgG [Zymed Laboratories, San Francisco, CA], at a final dilution of 1:200, and then incubated with HRP goat anti-rabbit IgG (1:200 for 2 h) to identify IgG+ mesenchymal cells.

Double staining and confocal analysis were performed to determine GH co-localization with immune-cell markers in bursal follicles. Thus, for the simultaneous demonstration of IgG and GH, tissue sections were incubated with a polyclonal rabbit anti-chicken/turkey IgG antibody [Zymed] at a dilution of 1:100, and a mouse monoclonal anti-cGH antibody (IH7) (Berghman et al., 1988), at a final dilution of 1:100 in 1% non-fat dry milk in TTBS overnight. After washing (3 × 10 min) in TTBS, sections were incubated with the secondary antibodies: goat anti-rabbit IgG-FITC [Zymed], 1:100, and goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100. Alternatively, goat anti-rabbit IgG-Cy3 antibodies [Zymed], 1:2000, were used in some experiments. For the simultaneous demonstration of IgM and GH, tissue sections were incubated with fluorescein conjugated affinity purified goat anti-chicken IgM (mu chain specific) antibodies (Rockland, Gilbertsville, PA) at a final dilution of 1:200, and a specific rabbit anti-chicken GH (C-1) 1:200, and then incubated with goat anti-rabbit IgG-Cy3 secondary antibodies at a final dilution of 1:2000.

To label cell nuclei, these sections were also counterstained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) [Invitrogen, Carlsbad, CA] in TBS for 45 min, rinsed three times with TBS and mounted with a fluorescent mounting medium. The slides were analyzed for IgG or IgM and cGH co-localization using a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope with lasers at excitation wavelengths of 488 nm (FITC), 514 nm (TRITC), 561 nm (Cy3), respectively. A Coherent-XR multiphotonic laser at 350 nm was also employed (DAPI). Semiquantitative analysis was performed using the MetaMorph program [Meta Imaging Series Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA].

## 2.4. *In situ* hybridization

### 2.4.1. Probe synthesis

A 690-bp full-length pituitary GH cDNA was obtained by PCR from total RNA extracted from adult (White Leghorn) pituitary glands, using oligonucleotide primers CLR1 (sense: 5'-CGTTC AAGC AACACCTGAGCAACTCTCCCG-3') and CLR2 (antisense: 5'-GCCTCAG ATGGTGCAGTTGCTCTCTCCGAA-3') (Luna et al., 2008). This cDNA was then subcloned into a PCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen). The vector was linearized with restriction endonuclease HindIII and NotI for subsequent production of antisense and sense probes, respectively (Luna et al., 2008). Digoxigenin (DIG)-labeled antisense and sense riboprobes were synthesized by *in vitro* transcription with T7 and SP6 RNA polymerases, respectively, and DIG RNA labeling mix [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany], according to the manufacturer's instructions. Probe concentrations were determined by dot-blot analysis against a DIG-labeled RNA standard. The riboprobe has been validated previously for detection of GH mRNA in cells of the pituitary gland and the BF of 4-week-old chicks (Luna et al., 2008).

### 2.4.2. Hybridization procedure

Bursae were fixed with Bouin-Hollande sublimate for 48 h, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Tissue sections were dewaxed in Citrisolv [Fisher], rehydrated through a graded alcohol series into distilled water containing 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) distilled water. The sections were then incubated in fresh DEPC-PBS (2 × 15 min) to remove RNase, treated with proteinase K (10 µg/ml for 10 min at 37 °C), post-fixed in 4% paraformaldehyde (10 min), and incubated in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0), containing 0.35% acetic anhydride for 10 min. The sections were prehybridized with 50% formamide/2 × saline sodium citrate (SSC) (30 min, 60 °C), and hybridized in a moist chamber (overnight, 60 °C) with hybridization solution [50% formamide, 2 × SSC, 250 µg/ml tRNA, 50 µg/ml heparin, 2% blocking solution [Roche Diagnostics], and sense or antisense DIG-labeled riboprobes (at concentrations of 2 µg/ml) that had previously been denatured (5 min, 85 °C). The sections were subsequently washed in 2 × SSC (10 min), 2 × SSC/50% formamide (45 min, 45 °C), 2 × SSC (3 × 15 min), 2 × SSC (30 min, 37 °C), and 0.1 × SSC (60 min, 60 °C). The sections were then washed (2 × 5 min) in buffer one (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5), and the hybridized probe was detected immunohistochemically by incubation (2 h) with an anti-DIG antibody (1:2000) conjugated to alkaline phosphatase [Roche Diagnostics] in 1% blocking solution. The sections were then washed in buffer one (2 × 5 min), equilibrated (5 min) in buffer two (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5), and incubated in buffer two containing a commercial substrate for alkaline phosphatase (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitroblue tetrazolium chloride) [Roche Diagnostics]. Color development was stopped by washing in Tris-EDTA buffer (2 × 5 min). The sections were then rinsed in PBS (3 × 5 min) and mounted with an aqueous medium.

## 2.5. Image analysis

For *in situ* hybridization, GH mRNA was quantified from stained sections examined at 40 × magnification (using an Olympus BX51 microscope) and images were obtained with a CoolSnapPro camera [Media Cybernetics, Silver Spring, MD]. Each picture had a total area of 19,400 µm<sup>2</sup> and quantitative analysis was performed using IP-lab software [Image Pro Plus, Media Cybernetics]. Five birds were studied at each age, and the analysis of each slide was based on 5–6 representative fields. The mean value of positive signals obtained from each slide was expressed relative to the total field, following the method of Ramírez-Amaya et al. (2005, 2006).

## 2.6. TUNEL assay

To study the appearance of apoptotic bodies during BF development, bursal tissue sections from ED 15, and 2-, 10-, 20-week-old birds were fixed in Bouin-Hollande solution embedded in paraffin wax and rehydrated. For the TUNEL analysis (Gavrieli et al., 1992), the sections were washed in PBS, treated with proteinase K (10 µg/ml for 10 min at room temperature) and then washed with PBS. Slides were then incubated with 50 µl of the reaction mixture per sample [Roche Diagnostics], for 1 h at 37 °C in a humid chamber. Samples were washed 3 × 5 min in PBS and then mounted with DakoCytomation fluorescent mounting medium [Dako, Inc., Carpinteria, CA] and analyzed for fluorescence microscopy and quantification of TUNEL labeling using Image Pro Plus Software [Media Cybernetics]. The proportion of TUNEL labeling was determined (relative to total tissue area) from 96 fields for each age group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA.

## 2.7. Primary cultures of BF cells

Primary cultures were prepared from bursal tissues as described elsewhere (Compton and Wickliffe, 1999). In brief, bursae were aseptically removed from birds after sacrifice, minced in RPMI 1640 media and gently homogenized using a glass homogenizer. The homogenate was filtered through a 100 µm nylon mesh and centrifuged at 300g for 5 min. The cell pellet was suspended in RPMI 1640 and the cell concentration was determined using a hemacytometer. The cell suspensions (4 × 10<sup>6</sup> cell) were incubated in Eppendorf tubes with 1 ml RPMI 1640 media supplemented with rcGH at different concentrations (10<sup>-7</sup> to 10<sup>-12</sup> M), for 4 h at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion assay (Tennant, 1964).

## 2.8. Caspase-3 assay

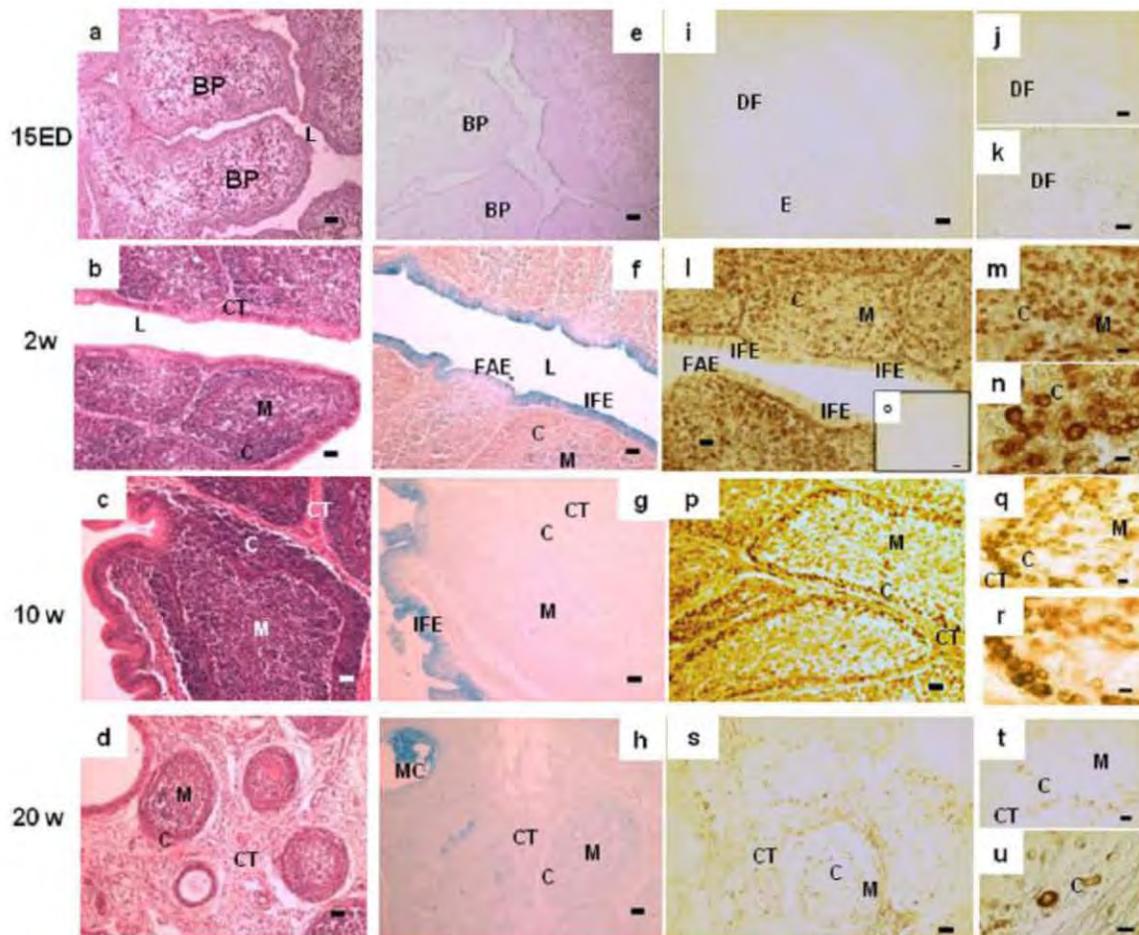
The levels of active caspase-3 in cell culture lysates were determined using a caspase-3 colorimetric assay kit [Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, Cat. No. 907-013]. The samples (4 µg of protein from cell lysate samples from each treatment, the standards, the *p*-nitroaniline calibrator (pNA), and the blank controls) were plated in duplicate in 96-well microplates. The conversion of substrate into the colored product was measured after a 3-h incubation at 37 °C, and the reaction was stopped with 1 N HCl, and absorbance was read rapidly in the 3350-UV microplate reader (Bio-Rad) at 405 nm. The concentrations of active caspase-3 in the samples were expressed as units per milligram of total protein tissue. The colorimetric assay was repeated twice for confirmation of the quantitative analyses (Cohen, 1997).

### 3. Results

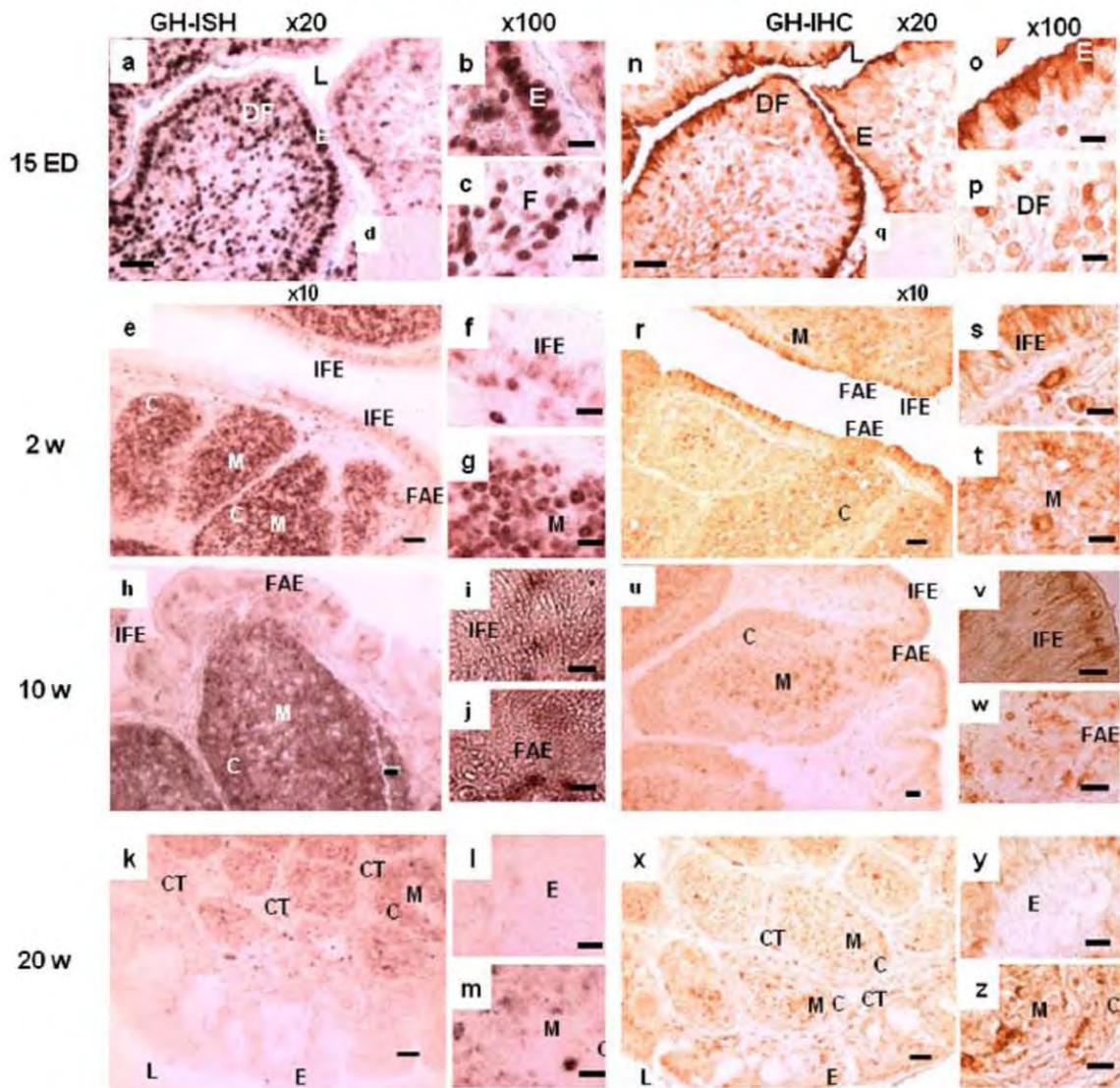
Dynamic changes in bursal development are shown in Fig. 1. At ED 15, primordial follicles are already apparent in the bursal plicae, as shown by H&E staining (Fig. 1a), whereas well defined follicles, classically separated into medullary and cortical zones, divided by connective tissue, were observed by 2 weeks of age and later (Fig. 1b and c). At 20 weeks of age there was an obvious reduction of follicle number and a striking increase in the amount of connective tissue between the remaining follicles (Fig. 1d). Developmental changes in the two types of bursal epithelium were shown by alcian blue staining, which is only able to stain the interfollicular epithelium (IFE) because of their mucopolysaccharide content. At ED 15 no alcian blue staining was present (Fig. 1e), indicating the absence of mature IFEs at this stage. At 2 weeks of age both IFE and follicle-associated epithelium (FAE) were present in the bursal follicles, but only the IFEs were staining (Fig. 1f). A similar pattern of staining was observed at 10 weeks of age (Fig. 1g). During bursal regression, at 20 weeks of age, no IFE was apparent and alcian blue staining was confined to mucoid cysts (Fig. 1h). At ED 15 only a few cells in the developing bursal follicles had little, if any, IgG-immu-

noreactivity (Fig. 1i–k), whereas at 2 weeks of age, darkly staining IgG-immunoreactive cells were abundantly observed in the follicular cortex and to a lesser extent in the medulla (Fig. 1l–n). At 10 weeks of age the distribution of IgG positive cells were present mainly in the follicular cortex, but some cells were present in the medulla (Fig. 1p–r). As expected (Ciriaco et al., 2003), the abundance of the IgG-bearing cells was greatly diminished at 20 weeks of age (Fig. 1s–u). The negative controls were completely devoid of staining (Fig. 1o).

These morphological and immunological changes were accompanied by changes in cellular distribution and abundance of GH and GH mRNA (Fig. 2). At ED 15, many cells in the inner epithelial layer and in the developing bursal follicles were darkly stained for the presence of GH mRNA (Fig. 2a–c). This staining was specific, since it was not seen when the riboprobe was replaced with the sense probe (Fig. 2d). At this stage, GH-immunoreactivity was mainly in the outer epithelial layer, although GH-immunoreactive cells were sparsely present in the developing bursal follicles (Fig. 2n–p). No staining was detected in sections where the primary antibody was preadsorbed with cGH excess (Fig. 2q). At 2 weeks of age, GH mRNA was widely distributed, but more abun-



**Fig. 1.** Histological changes during bursal follicle and epithelium development. Chicken bursal sections were stained with Harris hematoxylin–eosin (H&E) (a–d) and alcian blue (e–h) stains, and also by immunohistochemistry (IHC) (i–u) employing a specific anti-chicken/turkey IgG antibody to determine IgG<sup>+</sup> cells at different ages: ED 15 (a, e, and i–k); 2-week-old (b, f, and l–n); 10-week-old (c, g, and p–r); and 20-week-old (d, h, and s–u). (o) Negative control without primary anti-chicken/turkey IgG antibody. Images are representative of at least five bursae at each age. BP, bursal plicae; DF, developing bursal follicles; E, epithelium; L, lumen; CT, connective tissue; M, medulla; C, cortex; IFE, interfollicular epithelium; FAE, follicle-associated epithelium; MC, mucoid cyst. Magnification in (a–h, i, l, p, s): 10 $\times$ , bars: 30  $\mu$ m; in (j, m, q, t, o): 40 $\times$ , bars 10  $\mu$ m; in (k, n, r, u): 100 $\times$ , bars 5  $\mu$ m.

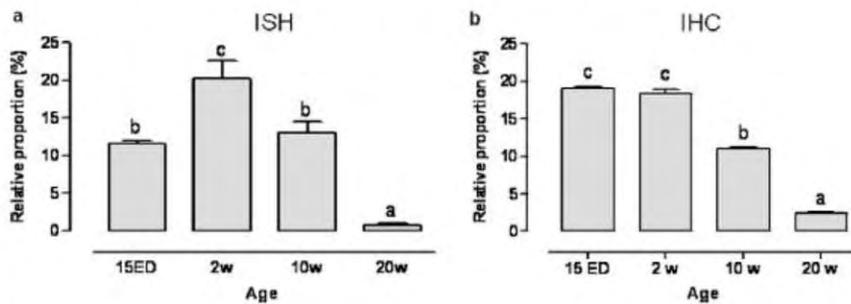


**Fig. 2.** Distribution of GH mRNA expression by *in situ* hybridization (a–m), and of GH-immunoreactivity by immunohistochemistry (n–z) during development of the bursa of Fabricius in the chicken. At ED 15 (a–c) GH mRNA expression was intense in the basal layer of the epithelium and within some developing follicles. At 2 (e–g) and at 10 weeks of age (h–j) GH mRNA expressing cells were widely distributed within the medulla and the cortex while only a few were found in the epithelium. At 20 weeks of age (k–m) GH mRNA signal was observed in a few cells within the regressing bursal follicles. No signal was observed in the bursal sections treated with the sense probe (d). Intense GH-immunoreactivity was observed at ED 15 (n–p) in the apical part of the epithelium and within the developing bursal follicles. At 2 (r–t) and at 10 weeks of age (u–w) GH-IR was observed in the IFE cells and in the follicular medulla and to a less extent in the cortex. At 20 weeks of age (x–z) GH-IR was much less intense in the epithelium and within the regressing follicles, both in the medulla and the cortex. GH staining was lost after preadsorbing the primary antibody with excess GH (q). Images are representative of at least five bursae at each age. L, lumen; E, epithelium; DF, developing bursal follicles; M, medulla; C, cortex; IFE, interfollicular epithelium; FAE, follicle-associated epithelium; CT, connective tissue. Magnification in (a, n): 20 $\times$ , bars: 30  $\mu$ m; in (e, h, k, r, u, x): 10 $\times$ , bars: 30  $\mu$ m; in (b–d, f, g, i, j, l, m, o, p, q, s, t, v, w, y, z): 100 $\times$ , bars: 10  $\mu$ m.

dant in the medulla than the cortex and relatively scarce in the IFE and FAE (Fig. 2e–g). GH mRNA was not expressed in the connective tissue between the follicles or below the epithelium. GH-immunoreactivity at this stage was mainly observed in medullary cells and in the IFE (Fig. 2r–t). At 10 weeks of age, GH mRNA was largely distributed within the follicles, some positive cells were also observed in the basal membrane and scarcely in the IFE or FAE (Fig. 2g and h). At this age GH-immunoreactivity was still present in the IFE, FAE and in the medulla, and less GH-IR was observed in the cortex (Fig. 2u–w). At 20 weeks of age, GH mRNA was not detected in epithelial cells and was only present in a few cells of the follicular cortex and (to a lesser extent) in a small number of medullary cells

(Fig. 2k–m). At this stage, only a few GH-immunoreactive cells were present in the epithelium and in the follicular cortex and medulla (Fig. 2x–z). These differences in GH mRNA and GH-immunoreactivity during bursal development are shown quantitatively in Fig. 3. Approximately 12% of the bursal cells expressed GH mRNA (as determined by ISH) at ED 15, 21% at 2 weeks of age, 13% at 10 weeks of age, and 1% at 20 weeks of age. Likewise, the relative proportion of GH-immunoreactivity intensity with respect to total area (evaluated by IHC) were approximately 19% at ED 15, and 18%, 11%, and <3% at 2, 10, and 20 weeks of age, respectively.

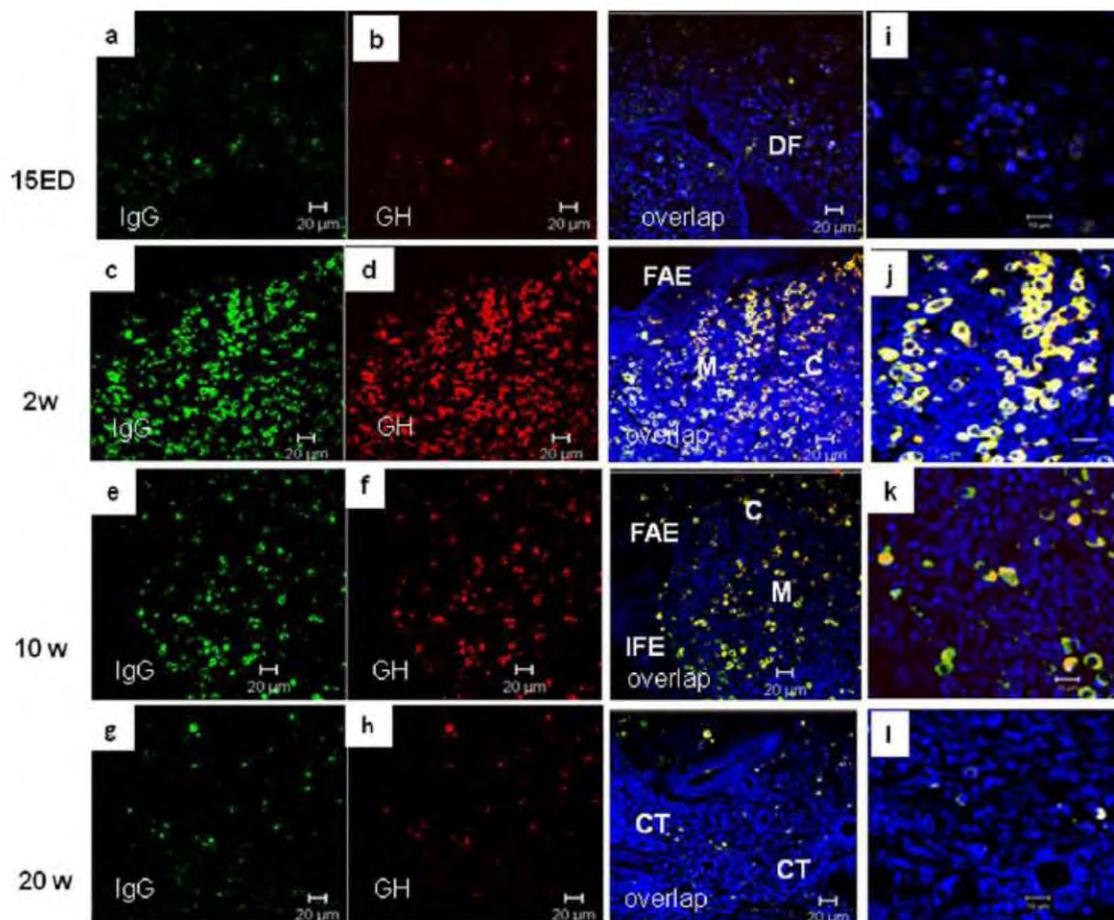
Within the BF, most GH-immunoreactivity was detected in IgG-bearing lymphocytes, as shown by the yellow coloration of merged



**Fig. 3.** Changes in the relative proportion of GH mRNA and GH-IR during BF development. (a) GH mRNA expression was studied by *in situ* hybridization (ISH). (b) GH-immunoreactivity was determined by immunohistochemistry (IHC). In both cases, image analysis was performed using IP-Lab software in 5–6 representative fields of each slide ( $n = 5$  birds) for each age. The mean values  $\pm$  SEM of positive signals obtained from each slide was expressed relative to the total field ( $19,400 \mu\text{m}^2$  at  $40\times$  magnification). Groups with different letters are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

images after confocal microscopy (Fig. 4). The number of IgG-immunoreactive cells clearly increased from ED 15, where they were scarcely present, (Fig. 4a) to 2 weeks of age, where they were very abundant, mainly in the medulla and the cortex (Fig. 4c). The

amount of IgG-IR cells clearly decreased between 10 (Fig. 4e) and 20 weeks of age (Fig. 4g), where only a few were detected. A similar pattern was observed in the number of GH-immunoreactive cells at those stages of development (Fig. 4b, d, f and h). At 2 weeks of



**Fig. 4.** Co-localization of IgG and cGH immunoreactivity during development of the bursa of Fabricius. Confocal images of triple stained sections at ED 15 (a, b, and i); 2 weeks of age (c, d, and j); 10 weeks of age (e, f, and k); 20 weeks of age (g, h, and l); show cells expressing IgG (green, 1st Ab: rabbit anti-chicken/turkey IgG 1:100; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FITC 1:100) and cGH (red, 1st Ab: mAb anti-cGH [IH7 hybridoma ascites fluid 1:100]; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursal follicles. Co-localization of IgG and GH in lymphoid cells is shown in yellow after merging images (overlap). Total cell nuclei were stained with 300 nM DAPI. The slides were analyzed using a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope with laser at excitation wavelengths of 488, 514, and 650 nm. Magnification in (a–h):  $40\times$ , bars  $20 \mu\text{m}$ ; in (i–l):  $80\times$ , bars  $10 \mu\text{m}$ . DF, developing bursal follicles; CT, connective tissue; M, medulla; C, cortex; IFE, interfollicular epithelium; FAE, follicle-associated epithelium.

age most of the cells bearing GH-IR and IgG-IR simultaneously were mainly located both in the cortex and medulla (Fig. 4j), whereas at 10 weeks of age this co-localization was more evident in the medulla (Fig. 4k). At 20 weeks of age both GH-IR and IgG-IR were very scarce, although the positive cells co-localized (Fig. 4l).

The proportion of cells showing GH-IR and IgG-IR changed during bursal development (Fig. 5). Interestingly, at most ages studied, the number of IgG-bearing cells also showed GH co-expression. At ED15,  $10.5 \pm 1.0\%$  of total bursal cells showed GH-immunoreactivity, while only  $4.7 \pm 1.2\%$  of the total cells were immunoreactive for IgG, but almost all of these co-expressed GH. At 2 weeks of age,  $28.4 \pm 3.8\%$  of total cells were GH-immunoreactive, while  $22.1 \pm 2.0\%$  of total cells were IgG-immunoreactive, of which most (91%) showed both markers simultaneously. At 10 weeks of age  $21.7 \pm 1.3\%$  of total cells showed GH-IR, while  $18.8 \pm 1.66\%$  were IgG-bearing cells, of which 99% co-expressed GH. At 20 weeks of age only  $10.0 \pm 1.6\%$  of total cells were GH-immunoreactive and only  $9.8 \pm 1.5\%$  of total cells were IgG immunoreactive, but practically all of these (99%) expressed both markers.

A differential pattern of GH-IR co-expression in IgG-IR and IgM-IR cells was observed during bursal development (Fig. 6). While IgG-IR cells were scarce at 15 ED (Fig. 6a), IgM-bearing cells were abundant at that age, and an important amount of IgM immunoreactive cells also co-expressed GH simultaneously (Fig. 6b). At 2 weeks after-hatch the proportion of GH-IR, IgG+, and IgM+ cells increased importantly. However, while most of the GH-IR cells co-localized with IgG-IR cells (>90%) in the medullary and cortical parts of the follicles, a much smaller co-localization of GH-IR and IgM-IR cells was observed mainly in the medulla (Fig. 6c and d). At later stages most of the IgG+ cells co-localized with GH-IR cells and only a few IgM+ cells also expressed GH (Fig. 6f and h).

TUNEL analysis showed marked differences in the distribution of apoptotic cells during BF development and in the relative proportion of labeled tissue areas (Fig. 7). Thus, bursal sections from ED 15 birds (bursal rapid growth phase) showed a labeling pattern of apoptotic bodies localized mainly, but not exclusively to the cortical region of some, but not all, developing follicles (Fig. 7a), whereas sections from 2-week-old bursae had a much less intense signal, with fluorescent spots distributed scarcely along the whole follicle (Fig. 7b). At 10-week-old (stationary growth phase) the TUNEL signal was similar to that observed at 2-week-old, and both were significantly different from the situation in the embryo. In contrast, bursal sections from 20-week-old birds (involution phase) showed a greater abundance of TUNEL labeling in both the cortical and medullary parts (Fig. 7d). The relative proportion

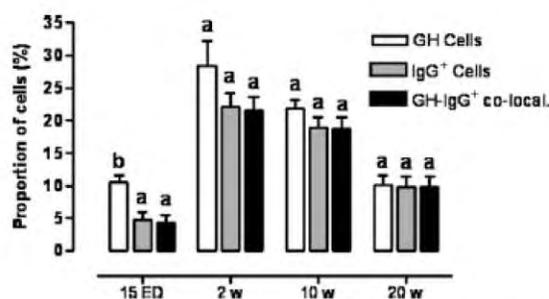


Fig. 5. Co-localization of IgG and GH-immunoreactivity during development of the bursa of Fabricius. Confocal images (as in Fig. 4) were analyzed for GH-immunoreactivity (□), IgG-immunoreactivity (■), or co-localization of both GH and IgG markers (■) counting the number of immunoreactive cells per unit area ( $10,000 \mu\text{m}^2$ ) and expressing the proportion of them relative to total cells. Quantitative analysis was performed using the MetaMorph program. (means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

of fluorescent labeling area (indicating the amount of apoptosis at each stage) is illustrated in Fig. 7e. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between ED 15 ( $9.3 \pm 0.6\%$ ), 2-week-old chicks ( $0.4 \pm 0.1\%$ ), 10-week-old ( $0.23 \pm 0.001\%$ ), and 20-week-old adults ( $21.1 \pm 3.8\%$ ), being much higher at this age.

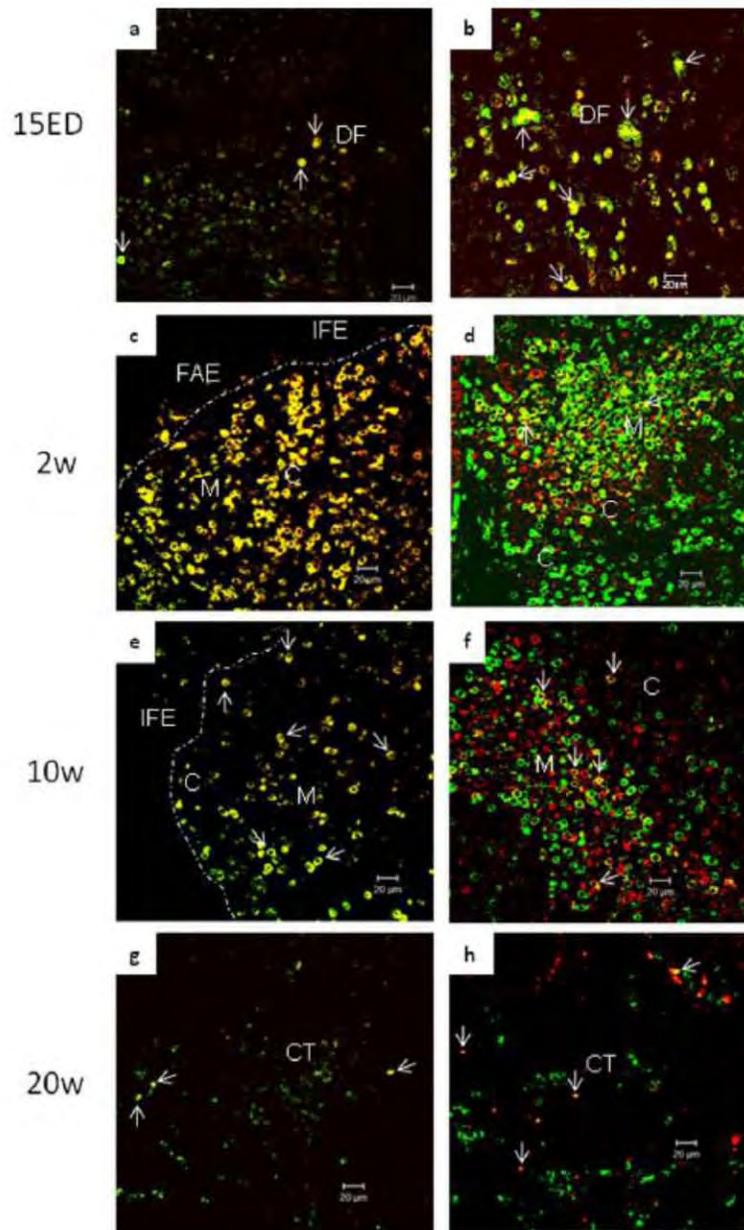
Bursal primary cell cultures obtained from 4-week-old animals showed a rapid decrease in cell viability when incubated *in vitro*, reaching 64.6% of total viable cells after 4 h of culture under the conditions employed in comparison with those at time 0. The addition of GH improved the survival of the cultured cells (Fig. 8a), especially at 1 nM concentration (by 90.0%,  $p < 0.05$ ). In contrast, the activity of caspase-3 (a key effector enzyme that promotes apoptosis) was decreased ( $p < 0.05$ ) when the bursal cultures were incubated with the same doses of GH (from  $49.2 \pm 3.3$  U/ml in the controls to  $29.2 \pm 3.2$  U/ml in the samples incubated with 1 nM GH, a 40.6% reduction in enzymatic activity) (Fig. 8b).

#### 4. Discussion

In this study we describe, for the first time, dynamic changes in GH mRNA and GH expression during bursal development (in embryos, neonates, and juveniles) and regression (in adults), which correlate with changes that occur in its co-localization with IgM and IgG presence between late embryogenesis and somatic maturation, strengthening the notion that GH may be involved in B cell proliferation and differentiation in the BF. Also, data presented here confirm and extend our previous finding that locally synthesized GH decreases in the bursa when it regresses around the time of somatic maturation. We also provide evidence that GH supports the viability of bursal cells and displays an anti-apoptotic function in the BF.

Previous work showed a parallel correlation between BF growth and local GH content during early development (from ED 13 to 9 weeks of age) in the chicken (Luna et al., 2005). Also, it is known that GH mRNA is present in lymphocytes, secretory dendritic cells (SDCs), corticoepithelial cells (CECs), and reticuloendothelial cells (RECs), as well as in cells in the interfollicular epithelium (IFE) and the follicle-associated epithelium (FAE) of 4-week-old chicks (Luna et al., 2008). The cellular distribution of GH in the BF at other periods of development was however, unknown. Here we present data that show how the expression of GH mRNA and GH change dynamically in different bursal compartments during ontogeny, and how these changes could be related with BF activity.

In this study GH mRNA was abundantly expressed in the basal layer of the epithelia and within the developing follicles, and GH-IR was also present at those sites at ED 15. At this stage of development many IgM+ cells were observed in the embryonic bursal follicles which also co-expressed GH, whereas only around half of the GH+ cells in the ED 15 BF showed some IgG-IR, which at this age may be of maternal origin (Kincade and Cooper, 1971). In the ED 15 embryo the bursal epithelium is known to play a fundamental role for B cell precursors that initiate bursal colonization by providing the stimulus to induce MHC II markers and surface immunoglobulins (slg), mainly IgM (Ratcliffe et al., 1986; Pink and Lassila, 1987). This is later accompanied by the appearance of cell-surface IgGs and the selection of these cells for subsequent expansion in post-eclosion bursal follicles (McCormack et al., 1989; Ratcliffe, 2006). Cells that fail to express surface immunoglobulins at this time are eliminated by apoptosis. It is thus possible that epithelial GH may be playing a paracrine role, in the regulation of the proliferation and differentiation of B cell precursors in the embryonic BF. It is possible to detect some IgM+ cells (<0.1%) from ED 12 (Lydyard et al., 1976) which increase significantly (>7%) at ED 15 (Kincade and Cooper, 1971) and reach up to 85% at ED 18 (Grossi et al., 1977). It is well known that at this

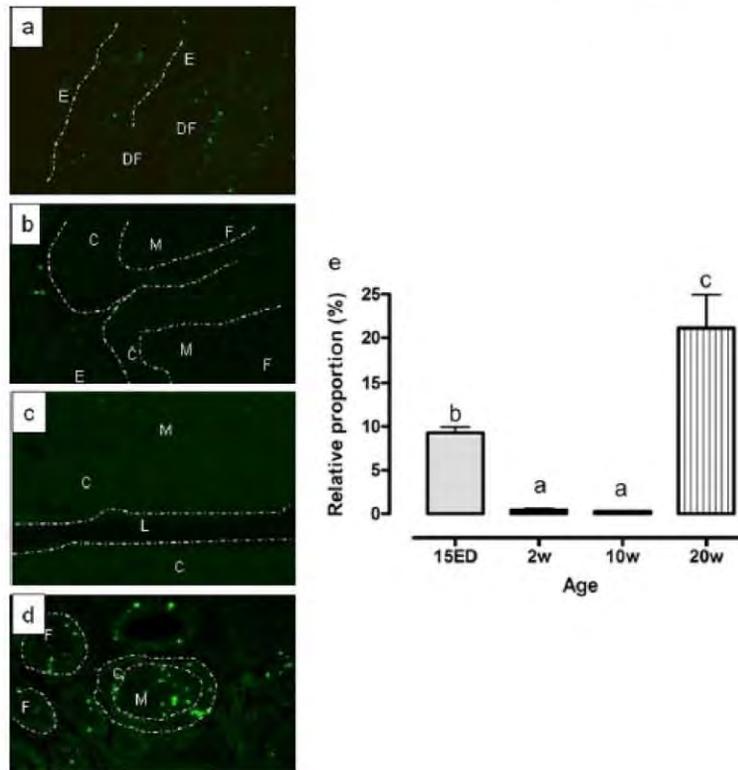


**Fig. 6.** Co-localization of GH-IR and IgG-IR (a, c, e, and g) or GH-IR and IgM-IR (b, d, f, and h) during development of the bursa of Fabricius. Merged confocal images of double stained sections at ED 15 (a); 2 weeks of age (c); 10 weeks of age (e); 20 weeks of age (g) show IgG+ cells (green, 1st Ab: rabbit anti-chicken/turkey IgG 1:100; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FTTC 1:100) and GH-IR cells (red, 1st Ab: mAb anti-cGH [IH7 hybridoma ascites fluid 1:100]; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursal follicles. Co-localization of IgG+ and GH-expressing cells are shown in yellow. On the other hand, merged confocal images of double stained sections at ED 15 (b); 2 weeks of age (d); 10 weeks of age (f); 20 weeks of age (h) show IgM+ cells (green, 1st Ab: fluorescein conjugated affinity purified goat anti-chicken IgM [ $\mu$  chain specific] antibodies at 1:200), and GH-IR cells (red, 1st Ab: a polyclonal rabbit anti-chicken GH [C1] 1:200, 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-Cy3 at 1:2000). Co-localization of IgM+ and GH-expressing cells are shown in yellow. The slides were analyzed using a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope with laser at excitation wavelengths of 488, 514, and 561 nm. DF, developing bursal follicles; CT, connective tissue; M, medulla; C, cortex; IFE, interfollicular epithelium; FAE, follicle-associated epithelium; Magnification in (a–h): 40 $\times$ , bars 20  $\mu$ m.

stage of development the presence of IgM in lymphocyte precursors is a crucial step for selection and further maturation, since cells that lose the expression of surface immunoglobulins (sIg) are channeled to undergo apoptosis (Paramithiotis et al., 1995). Precursor cells first develop into IgM-producing cells in the bursa on about day 14 of embryonic life, and some of these cells or their descendants become IgG producers in the bursa by day 21 (Lerner et al., 1971). It has been shown that in other tissues GH can act as a

survival factor (Compton and Wickliffe, 1999). In the embryonic bursa, GH may be a modulator of B cells precursor differentiation.

In this study we showed an important increase in GH-IR, IgG+ and IgM+ cells in the bursal follicles of 2-week-old chicks. Whereas most of the IgG-IR cells co-localized with GH-expressing cells (>90%) after-hatching (2w, 10w and 20w of age), the simultaneous co-localization of GH-IR cells and IgM+ cells decreased importantly, and when found was mostly confined to the medulla at



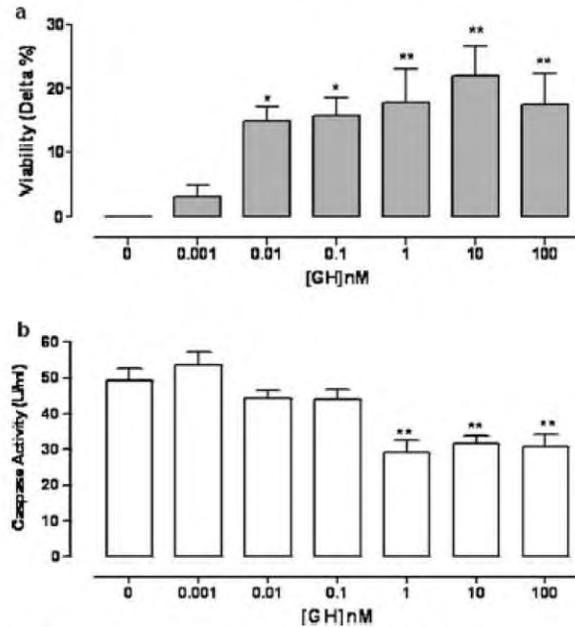
**Fig. 7.** Apoptosis in chicken bursal follicles during development. Apoptotic cells were revealed by TUNEL assay (green) in bursal sections from (a) ED 15, (b) 2-week-old, (c) 10-week-old and (d) 20-week-old chickens. Magnification: 40 $\times$ . F, follicle; E, epithelium; DF, developing bursal follicles; C, cortex; M, medulla; L, lumen. (e) The proportion of TUNEL labeling was determined (relative to total tissue area) from 96 fields for each age group by fluorescence microscopy and Image Pro Plus software. Dotted lines show the boundaries of medulla, cortex, and epithelium. Bars represent the means  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Groups with different letters are significantly different by ANOVA.

those ages, although some could also be observed in the cortex. Secretory dendritic cell (SDC) precursors (not expressing vimentin) enter the bursal epithelium between 11 and 13 days of embryogenesis, and bud formation precedes the appearance of vimentin-positive cells, which only appear in the developing follicle of 14-day embryos (Olah et al., 1992a). Between 15 days of embryogenesis and 2 weeks after eclosion, the changes in vimentin staining pattern revealed a cytological differentiation of the vimentin-positive cell (Olah et al., 1992a). After hatching (1d to 6–8 weeks of age), during the rapid bursal growth phase, the number of secretory dendritic cells increased about 18 times possibly by proliferation of vimentin-negative precursors in the epithelial arches of the corticomedullary border (Olah et al., 1992b), and their proliferation rate from hatching until around 6 weeks of ages is about 10% per hour (Ekino, 1993). During the first 2 weeks of life the vimentin-positive cells were found along the corticomedullary border and later became prominent in the medulla with the exception of a narrow zone adjacent to the corticomedullary border (Olah et al., 1992b). These SDCs have been proposed to be involved in B cell regulation (Glick and Oláh, 1984) since they are strategically placed where they would encounter the antigens and may function as bursal antigen-presenting cells providing a microenvironment that allows B cell proliferation (Szakal et al., 1985) and immunoglobulin class switching, promoting the production of high affinity IgG (Aydar et al., 2005) and allowing the transition of progenitor B cells to mature B cells. Thus, in the bursal follicles the continuous contact between lymphoid elements and material actively taken from the cloacal lumen may be mediated by the SDCs; the constant presence of antigens in the medulla of the follicles suggests that

amplification or diversification of B cell lineage development after hatching may be antigen-induced mechanisms (Lassila, 1989; McCormack et al., 1989; Glick and Olah, 1993). The surface-related IgG molecules and granular products of bursal secretory dendritic cells may act as ligands or signals for B cell expansion and gene conversion, probably via the release of a cytokine (Glick and Olah, 1987, 1993; Olah et al., 1991).

GH mRNA and GH were abundantly expressed in several locations during the rapid growth stages (ED15, 2-week-old) and with less intensity during the stationary phase of bursal growth, and in much less abundance during the involution stage. Interestingly, GH-IR was mainly found in IgM+ cells in the embryonic bursal sections and with IgG+ cells during post-hatching development. Data shown here are consistent with previous reports (Kincade et al., 1970; Kincade and Cooper, 1971; Cooper et al., 1972) that indicated that there is a switch during embryonic development that induces a change from IgM to IgG expression. Whereas only a few IgG+ cells are apparent before hatching their number increase quickly at 5 days after eclosion (Ekino et al., 1995). On the other hand, IgM+ cells are abundant in the embryonic bursae and remain so until around 5 weeks of age when they eventually start to decline (Pink and Lassila, 1987; Weill et al., 1986).

The bursa of Fabricius grows rapidly after hatching and reaches its maximum size and weight between 10 and 13 weeks of age. At this stage GH is present mainly inside the bursal follicles, where active antigen transport takes place through FAE cells. Previous reports have shown that both bursal proliferation rate and endocytic activity decreased at around 16 weeks of age, where BF also decreased its weight and started to lose its medullary structure (Nau-



**Fig. 8.** (a) Growth hormone effect upon bursal cell viability in primary cultures. Recombinant chicken (rc)GH [0.001–100 nM] was added to bursal primary cell cultures obtained from 4-week-old chickens and incubated for 4 h at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Data are expressed relative to the control (in the absence of GH). Means  $\pm$  SEM (n = 19) for each group of age,  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$ . (b) Growth hormone effect upon caspase-3 activity after addition of rcGH [0.001–100 nM] in bursal primary cell cultures obtained from 4-week-old animals and incubated for 4 h at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> atmosphere. Data are expressed relative to the control (in the absence of rcGH). Means  $\pm$  SEM, n = 5,  $p < 0.01$ .

kkarinen and Sorvari, 1984). It has also been proposed that the bursal main and central immune function (B lymphocyte maturation and development for antibody production) is complete by 6 weeks of age (Naukkarinen and Sorvari, 1984), and afterwards the BF functions like a peripheral lymphoid tissue until 16-week-old, and later (20w) the bursa appears as a fibrotic residue with large mucoid cysts. These data are consistent with our results that show that at 20 weeks of age the GH mRNA and GH expression decrease importantly showing its presence only scarcely in some cortical and medullar cells and practically disappeared in both the FAE and IFE. The dynamic changes observed in GH expression correlate with the structural and functional changes that occur during bursal development and support the notion that the decrease in BF GH production can be associated with the onset of bursal regression (Ciriaco et al., 2003; Glick et al., 1956).

Little is known about the regulation of local GH expression in the BF, and to date no clear mechanism to explain the decline in bursal GH at 16–20 weeks of age is available. The presence of some “classical” GH secretagogues (e.g., somatostatin, SRIH) has been reported in lymphoid organs (Aguila et al., 1991; Ali et al., 1996). Expression of SRIH mRNA was reported in the thymus, spleen and the bursa of Fabricius in the chicken, and in the thymus and spleen of the male rat. In the chicken, as in the rat, the concentration of SRIH was greater in the thymus than in the spleen; it was present in the bursa of Fabricius, also in higher concentration than in the spleen. There were large clusters of SRIH-positive cells in the medullary portion of each follicle of the bursa of Fabricius (Aguila et al., 1991). Rat leukocytes have been reported to produce and secrete growth hormone-releasing hormone (GHRH) which may be active in a local immune response (Weigent and Blalock, 1990). On the other hand, Hattori et al. (1994) described that GHRH, SRIH,

and IGF-I do not affect GH secretion from human peripheral lymphocytes, whereas GH up-regulated its own secretion. Further studies are needed to determine if lymphoid GH expression is mechanistically related to the presence of these GH secretagogues in immune tissues.

The results of this study show, for the first time, that the expression of GH in the BF was much higher during embryogenesis and neonatal development than in the adult, consistent with the content of bursal GH previously measured by ELISA in tissue extracts (Luna et al., 2005). Peak GH expression occurred since 2 weeks of age until 10 weeks of age, when the least number of TUNEL-labeled cells were detected in the BF. This suggests that GH promotes bursal cell survival, especially as the dramatic decline in bursal GH expression at 20 weeks of age correlated with a marked increase in cell death during bursal involution. Although BF cell proliferation is maximal in late embryogenesis, at the same time there is a developmental wave of apoptosis and a loss of undifferentiated B lymphocytes as revealed by TUNEL-labeling. The apoptosis of these cells is likely to reflect a discreet loss of GH expression, since exogenous GH was found to promote the viability of cultured BF cells (Fig. 8), as in other cell types (Sanders and Harvey, 2004). Anti-apoptotic actions of GH are well established as previously observed in lymphocytes (Mitsunaka et al., 2001; Lempereur et al., 2003; Arnold and Weigent, 2004). These anti-apoptotic actions often involve a suppression of caspase activity, as observed in this study. These results therefore suggest that GH expression during development promotes cell survival and BF growth and that diminished GH expression in adult results in BF involution.

In summary, these results detail the expression of GH in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during ontogeny and suggest autocrine or paracrine actions of bursal GH are causally involved in B cells survival and differentiation to IgG+ cells, as well as in bursal proliferation in embryonic and neonatal chicks, whereas the absence of bursal GH in adults is causally involved in bursal involution.

#### Acknowledgments

We thank Gerardo Courtois (lab assistant), Pilar Galarza (librarian), Lourdes Palma and E. Nydia Hernández (Microscopy Unit) for technical support, and Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript. This work was supported by grants from CONACYT (F1-60296) and PAPIIT-UNAM (IN205406-3, IN210209-3) of Mexico and by NSERC of Canada. A.J.R.M. and J.L.L.A. received graduate fellowships from CONACYT (142396, 200220) and UNAM (DGEP 504014132 and PDCB).

#### References

- Ackerman, G.A., Knouff, R.A., 1991. Lymphocytopoietic activity in the bursa of Fabricius. In: Good, R.A., Gabrielson, A.E. (Eds.), *The Thymus in Immunology*. Harper Row, New York, pp. 123–146.
- Aguila, M.C., Dees, W.L., Haensly, W.E., McCann, S.M., 1991. Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11485–11489.
- Ali, S.M., Chan, A.S., Leong, S.K., 1996. Histochemical and immunohistochemical localization of nitrergic neuronal and non-neuronal cells in the bursa of Fabricius of the chicken. *Cell Tissue Res* 285, 273–279.
- Arámbaro, C., Carranza, M., Sánchez, R., Perera, G., 1989. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 330–339.
- Arnold, R.E., Weigent, D.A., 2004. The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmunomodulation* 11, 149–159.
- Aydar, Y., Sukumar, S., Szakal, A.K., Tew, J.G., 2005. The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG. *J. Immunol.* 174, 5358–5366.
- Berghman, L.R., van Beeumen, J., Decuyper, E., Kühn, E.R., Vandesande, F., 1988. One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoadsorbent. *J. Endocrinol.* 118, 381–387.

- Criaco, E., Pinerra, P.P., Diaz-Esnal, P., Laura, R., 2003. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc. Res. Tech.* 62, 482–487.
- Clark, R., 1997. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr. Rev.* 18, 157–179.
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1–16.
- Compton, M.M., Wickliffe, J.K., 1999. Multiparametric assessment of bursal lymphocytes apoptosis. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 487–500.
- Cooper, M.D., Lawton, A.R., Kincade, P.W., 1972. A developmental approach to the biologic basis for antibody diversity. In: Hanna, M.G. (Ed.), *Contemporary Topics in Immunobiology*, vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 33–48.
- de Mello-Coelho, V., Gagnerault, M.C., Souberbielle, J.C., Strasburger, C.J., Savino, W., Dardenne, M., Postel-Vinay, M.C., 1998. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 139, 3837–3842.
- Ekón, S., Riwar, B., Kroese, F.G., Schwander, E.H., Koch, G., Nieuwenhuis, P., 1995. Role of environmental antigen in the development of IgG+ cells in the bursa of Fabricius. *J. Immunol.* 155, 4551–4558.
- Ekón, S., 1993. Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage. *Eur. J. Immunol.* 23, 772–775.
- Falini, B., Taylor, C.R., 1983. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 107, 105–117.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493–501.
- Gelato, M.C., 1993. Growth hormone-insulin like growth factor I and immune function. *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 106–110.
- Glick, G., Chang, T.S., Jaap, R.G., 1956. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poult. Sci.* 35, 224–234.
- Glick, B., Oláh, L., 1984. A continuum of cells leading to an *in vivo* humoral response. *Immunol. Today* 5, 162–165.
- Glick, B., Oláh, L., 1987. Contribution of a specialized dendritic cell, the secretory cell, to the microenvironment of the bursa of Fabricius. In: Weber, W.T., Ewert, D.L. (Eds.), *Avian Immunology*. Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 53–66.
- Glick, B., 1991. Historical perspective: the bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30, 3–12.
- Glick, B., Oláh, L., 1993. A bursal secretory dendritic cell and its contributions to the microenvironment of the developing bursal follicle. *Res. Immunol.* 144, 446–448.
- Grossi, C.E., Lydyard, P.M., Cooper, M.D., 1977. Ontogeny of cells in the chicken. II. Changing patterns of cytoplasmic IgM expression and modulation requirements for surface IgM by anti- $\mu$  antibodies. *J. Immunol.* 119, 749–756.
- Hattori, N., Ikekubo, K., Ishihara, T., Moridera, K., Hino, M., Kurahachi, H., 1994. Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-releasing hormone and somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1678–1680.
- Hull, K.L., Luna, M., Harvey, S., Arámburo, C., 2005. Growth hormone: a pituitary and extrapituitary chameleon during development. In: Dawson, A., Sharp, P.J. (Eds.), *Functional Avian Endocrinology*. Narosa Publishing House, New Delhi, India, pp. 389–414.
- Hull, K.L., Thiagarajah, A., Harvey, S., 1996. Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res.* 286, 69–80.
- Johnson, R.W., Arkins, S., Dantzer, R., Kelley, K.W., 1997. Hormones, lymphohemopoietic cytokines and the neuroimmune axis. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 116, 183–201.
- Khansari, D.N., Gustad, T., 1991. Effects of long-term, low-dose growth hormone therapy on immune function and life expectancy of mice. *Mech. Ageing Dev.* 57, 87–100.
- Kincade, P.W., Cooper, M.D., 1971. Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immunofluorescent analysis using purified antibodies to mu, gamma and light chains. *J. Immunol.* 106, 371–382.
- Kincade, P.W., Lawton, A.R., Bockman, D.E., Cooper, M.D., 1970. Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1918–1925.
- Lassila, O., 1989. Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *Eur. J. Immunol.* 19, 955–958.
- Lempereur, L., Brambilla, D., Scoto, G.M., D'Alcamo, M., Goffin, V., Crosta, L., Palmucci, T., Rampello, L., Bernardini, R., Cantarella, G., 2003. Growth hormone protects human lymphocytes from irradiation-induced cell death. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1411–1416.
- Lerner, K.G., Glick, B., McDuffie, F.C., 1971. Role of bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken. *J. Immunol.* 107, 493–503.
- Luna, M., Barraza, N., Berumen, L., Carranza, M., Pedemera, E., Harvey, S., Arámburo, C., 2005. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 28–37.
- Luna, M., Rodríguez-Méndez, A.J., Berumen, L., Carranza, M., Riesgo-Escovar, J., Baudet, M.-L., Harvey, S., Arámburo, C., 2008. Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1313–1325.
- Lydyard, P.M., Grossi, C.E., Cooper, M.D., 1976. Ontogeny of B cells in the chicken. I. Sequential development of clonal diversity in the bursa. *J. Exp. Med.* 144, 79–97.
- Marsh, J.A., Johnson, B.E., Lillehoj, H.S., Scanes, C.G., 1992. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune thyroiditis (obese) strain chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199, 114–122.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Barth, C.F., Carlson, L.M., Petryniak, B., Humphries, E.H., Thompson, C.B., 1989. Selection for B cells with productive Ig $\lambda$  gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Dev.* 3, 838–847.
- Mitsunaka, H., Dobashi, H., Sato, M., Tanaka, T., Kitanaka, A., Yamaoka, G., Tokuda, M., Matoba, K., Hiraishi, T., Ishida, T., 2001. Growth hormone prevents Fas-induced apoptosis in lymphocytes through modulation of Bcl-2 and caspase-3. *Neuroimmunomodulation* 9, 256–262.
- Murphy, W.J., Durum, S.K., Longo, D.L., 1993. Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function. *J. Exp. Med.* 178, 231–236.
- Naukkarinen, A., Sorvari, T.E., 1984. Involution of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. *J. Leukoc. Biol.* 35, 281–290.
- Oláh, L., Kendall, C., Glick, B., 1991. Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. *Poult. Sci.* 70, 1144–1152.
- Oláh, L., Kendall, C., Glick, B., 1992a. Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's bursa of Fabricius. *Anat. Rec.* 232, 121–125.
- Oláh, L., Kendall, C., Glick, B., 1992b. Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *Anat. Rec.* 233, 111–120.
- Paramithiotis, E., Jacobsen, K.A., Ratcliffe, M.J., 1995. Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius. *J. Exp. Med.* 181, 105–113.
- Phillips, A.D., Brown, A., Hicks, S., Schöler, S., Murch, S.H., Walker-Smith, J.A., Swallow, D.M., 2004. Acetylated sialic acid residues and blood group antigens localize within the epithelium in microvillous atrophy indicating internal accumulation of the glycocalyx. *Gut* 53, 1764–1771.
- Pink, J.R., Lassila, O., 1987. B-cell commitment and diversification in the bursa of Fabricius. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 135, 57–64.
- Postel-Vinay, M.C., de Mello Coelho, V., Gagnerault, M.C., Dardenne, M., 1997. Growth hormone stimulates the proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinology* 138, 1816–1820.
- Ramírez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Workley, P.F., Barnes, C.A., 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J. Neurosci.* 26, 12237–12241.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mildahe, D., Rosi, S., Workley, P.F., Barnes, C.A., 2005. Spatial exploration-induced ARC mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J. Neurosci.* 25, 1761–1768.
- Ratcliffe, M.J., Lassila, O., Pink, J.R., Vainio, O., 1986. Avian B cell precursors: immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur. J. Immunol.* 16, 129–133.
- Ratcliffe, M.J., 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 101–118.
- Sabharwal, P., Varma, S., 1996. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor 1 as an autocrine and paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2663–2669.
- Sanders, E.J., Harvey, S., 2004. Growth hormone as an early embryonic and differentiation factor. *Anat. Embryol. (Berl.)* 209, 1–9.
- Sanders, E.J., Parker, E., Harvey, S., 2006. Retinal ganglion cell survival in development: mechanisms of retinal growth hormone action. *Exp. Eye Res.* 83, 1205–1214.
- Sumita, K., Hattori, N., Inagaki, C., 2005. Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 408–416.
- Szalkai, A.K., Gieringer, R.L., Kosco, M.H., Tew, J.G., 1985. Isolated follicular dendritic cells: cytochemical antigen localization, Nomarski, SEM, and TEM morphology. *J. Immunol.* 134, 1349–1359.
- Tennant, J.R., 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2, 685–694.
- Villanua, M.A., Szary, A., Bartke, A., Esquifino, A.L., 1992. Changes in lymphoid organs of Ames dwarf mice after treatment with growth hormone, prolactin or ectopic pituitary transplants. *J. Endocrinol. Invest.* 15, 587–595.
- Weigent, D.A., Baxter, J.B., Wear, W.E., Smith, L.R., Bost, K.L., Blalock, J.E., 1988. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J.* 2, 2812–2818.
- Weigent, D.A., Blalock, J.E., 1990. Immunoreactive growth hormone-releasing hormone in rat leukocytes. *J. Neuroimmunol.* 29, 1–13.
- Weigent, D.A., Blalock, J.E., 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell. Immunol.* 135, 55–65.
- Weill, J.C., Reynaud, A., Lassila, O., Pink, J.R., 1986. Rearrangement of chicken immunoglobulin genes is not an ongoing process in the embryonic bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3336–3340.
- Yoshida, A., Ishioka, C., Kimata, H., Mikawa, H., 1992. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free medium. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 126, 524–529.

## **ANEXO II**

**Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C. Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Developmental and Comparative Immunology*. 2008 32(11):1313-25.**



Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)



## Immune growth hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius

M. Luna<sup>a</sup>, A.J. Rodríguez-Méndez<sup>a</sup>, L. Berumen<sup>a</sup>, M. Carranza<sup>a</sup>,  
J. Riesgo-Escovar<sup>b</sup>, M.-L. Baudet<sup>c</sup>, S. Harvey<sup>c</sup>, C. Arámburo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro 76230, México

<sup>b</sup>Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro 76230, México

<sup>c</sup>Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2H7

Received 29 November 2007; received in revised form 22 March 2008; accepted 16 April 2008  
Available online 21 May 2008

### KEYWORDS

Growth hormone (GH);  
GH mRNA;  
Growth hormone receptor (GHR);  
Bursa of Fabricius;  
Extrapituitary GH;  
Follicle-associated epithelium;  
Interfollicular epithelium;  
Paracrine/autocrine effects

### Summary

Expression of growth hormone (GH) and GH receptor (GHR) genes in the bursa of Fabricius of chickens suggests that it is an autocrine/paracrine site of GH production and action. The cellular localization of GH and GH mRNA within the bursa was the focus of this study. GH mRNA was expressed mainly in the cortex, comprised of lymphocyte progenitor cells, but was lacking in the medulla where lymphocytes mature. In contrast, more GH immunoreactivity (GH-IR) was present in the medulla than in the cortex. In non-stromal tissues, GH-IR and GH mRNA were primarily in lymphocytes, and also in macrophage-like cells and secretory dendritic cells. In stromal tissues, GH mRNA, GH and GHR were expressed in cells near the connective tissue (CT) between follicles and below the outer serosa. In contrast, GH (but not GH mRNA or GHR), was present in cells of the interfollicular epithelium (IFE), the follicle-associated epithelium (FAE) and the interstitial corticoepithelium. This mismatch may reflect dynamic temporal changes in GH translation. Co-expression of GHR-IR, GH-IR, GH mRNA and IgG was found in immature lymphoid cells near the cortex and in IgG-IR CT cells, suggesting an autocrine/paracrine role for bursal GH in B-cell differentiation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Abbreviations:* GH, growth hormone; GHR, growth hormone receptor; IR, immunoreactivity; FAE, follicle-associated epithelium; IFE, interfollicular epithelium; C, cortex; M, medulla; CT, connective tissue; CM, corticomedullary epithelium; SDC, secretory dendritic cells; ERC, epithelial reticular cells.

\*Corresponding author. Tel.: +52 442 238 1065;  
fax: +52 442 238 1004.

E-mail address: [aramburo@servidor.unam.mx](mailto:aramburo@servidor.unam.mx) (C. Arámburo).

0145-305X/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.dci.2008.04.008

## Introduction

Although growth hormone (GH) is primarily produced in the pituitary gland, GH gene expression has been demonstrated in immune tissues. In the human, rat, and dog immune systems the presence of GH and GH mRNA, as well as their cellular distribution in the spleen, thymus, bone marrow, tonsils, lymph nodes, Peyer's patches of the ileum, in the Kupffer cells of the liver [1–5] and in both tissue and circulating leukocytes [6–9], including lymphocytes [10–15], granulocytes and macrophages [16,17], and natural killer cells [18] have been described [19–20]. In some (but not all) of these tissues GH and GH mRNA are also present in the stromal cells. The expression pattern of GH in the thymus, in particular, is almost ubiquitous during fetal development but more restricted in adults [5], in which GH gene expression only occurs in a relatively small percentage (approximately 5–15%) of the immune cells [6,7]. GH mRNA, with the same nucleotide sequence as pituitary GH mRNA, has also been found in extracts of the chicken spleen, thymus, and bursa of Fabricius [21], a lymphoid tissue unique to avian species [22]. The GH gene is also present in cDNA libraries derived from these tissues [23], and its translation is indicated by the presence of GH immunoreactivity in bursal extracts [24]. The cellular location of GH in avian immune tissues has, however, not yet been determined, although GH receptor (GHR) distribution in the bursa of Fabricius has been described in domestic fowl [25]. As GH is thought to act as an autocrine or paracrine factor in avian immune tissues [26,27], the comparative distribution of GH and GHR as well as GH mRNA was, therefore, determined in the bursa of Fabricius of chickens.

## Materials and methods

### Immunohistochemistry

The pituitary and the bursa of Fabricius were collected from 4-week-old broiler fowls. The tissues were fixed with Bouin-Hollande sublimate for 48 h, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin wax. Tissue sections, 4–8  $\mu$ m, were then cut using a microtome and mounted onto charged slides. The sections were then rehydrated with xylene, absolute alcohol, 95% alcohol, 70% alcohol, lugol, thiosulphate and distilled water. Slides were then equilibrated in Tris-buffered saline pH 7.6 (TBS), and then incubated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% in TBS) to block endogenous peroxidase. The sections were washed in TBS (3  $\times$  10 min) and then incubated in 0.1% Triton X-100 in TBS containing 5% non-fat dry milk (Bio-Rad) for 2 h. Tissue sections were incubated overnight with a specific rabbit polyclonal antibody directed against recombinant chicken GH (C-1, produced as described in [28]; 1:500 dilution), and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution for 2 h) and developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [24]. The specificity of staining was determined by preadsorbing the primary antibody with excess recombinant chicken GH (0.7 mg/ml). The primary antibody was also replaced with normal rabbit serum or omitted, for further negative controls. The staining of somatotrophs in tissue sections of the adult chicken

pituitary gland provided a positive control, although the primary antibody was used at a higher dilution (1:3000). Commercial rabbit antibodies raised against chicken/turkey IgG (Zymed Laboratories, at a final dilution of 1:200), mouse monoclonal Anti-Pan Cytokeratin (Sigma, at a final dilution of 1:100), and mouse monoclonal anti-vimentin (porcine) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., at a final dilution of 1:50) were used to identify lymphocyte cells, epithelial reticular cells (ERC's), and secretory dendritic cells (SDC's), respectively [29]. Alcian Blue 8GX (Sigma, 1% w/v solution in 3% glacial acetic acid, pH 2.5) was used to label mucous-secreting cells [30].

To study the specific cellular location of GH expression in bursal follicles double staining and confocal analysis were performed in tissue sections to look for co-localization of GH and other immune-cell markers. Thus, for the simultaneous demonstration of IgG and GH, tissue sections were incubated with a polyclonal rabbit anti-chicken/turkey IgG antibody (Zymed Laboratories, at a dilution of 1:100) and a mouse monoclonal anti-cGH antibody (IH7 [31], at a final dilution of 1:100) in 1% non-fat dry milk in TTBS overnight. After washing (3  $\times$  10 min) in TTBS, sections were incubated with the secondary antibodies: goat anti-rabbit IgG-FITC, Zymed, 1:100, and goat anti-mouse IgG-TRITC, Zymed, 1:100. To label cell nuclei, these sections were also counterstained with 1  $\mu$ M TO-PRO-3 (Invitrogen, a monomeric cyanine nucleic acid dye) for 45 min, rinsed 3 times with TBS and mounted with a fluorescent mounting medium. The slides were analyzed for IgG and cGH co-localization in a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope using lasers at excitation wavelengths of 488, 540 and 650 nm, respectively.

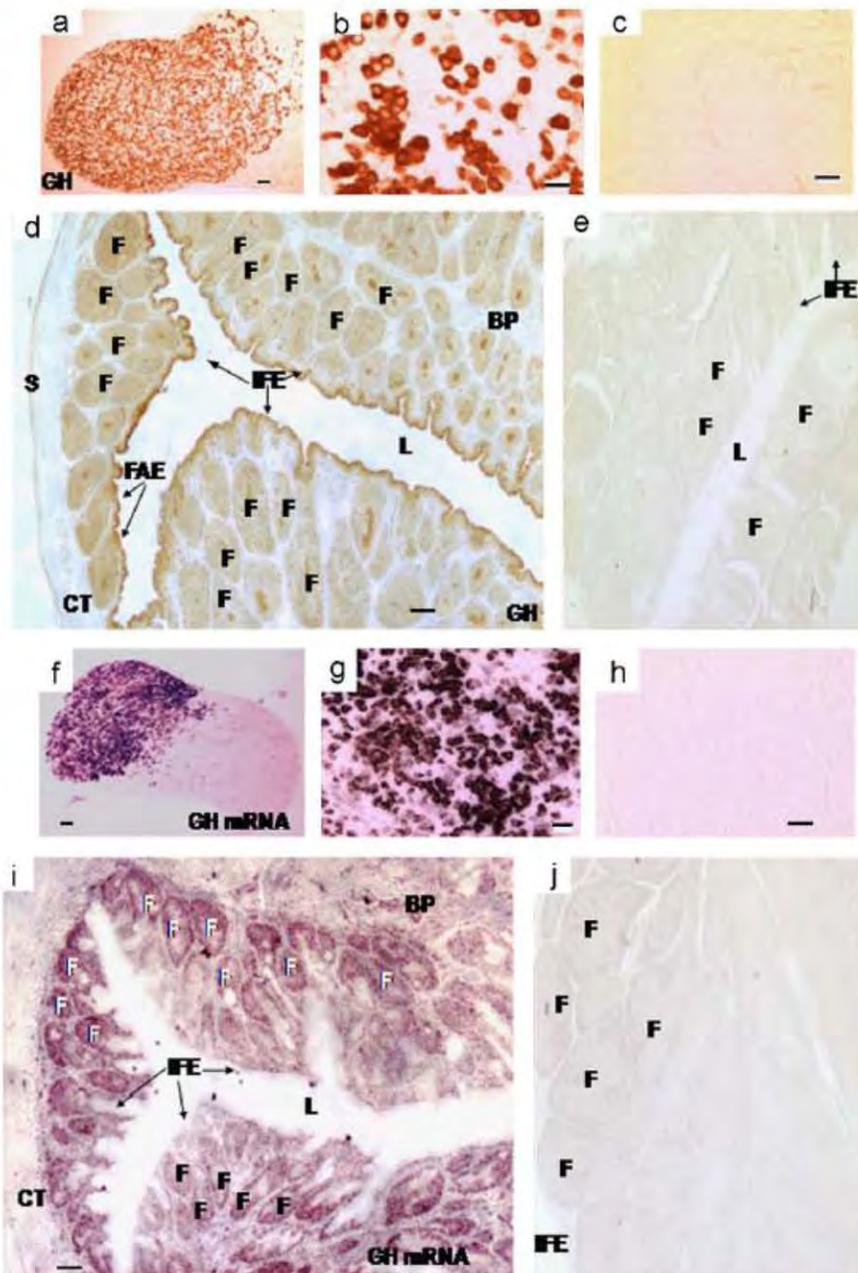
Other sections were analyzed for GH and vimentin co-expression, following the same general protocol conditions except that the primary antibodies were as indicated: for GH staining a rabbit polyclonal antibody was used (C-1, at a final dilution of 1:200) and for vimentin a monoclonal mouse anti-porcine vimentin (Zymed, at a final dilution of 1:50) was employed.

Some tissue sections were incubated overnight with mouse antibodies directed specifically against a synthetic fragment of the chicken GH receptor (CH17 [25], diluted 1:500), then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed, 1:100 dilution for 2 h) and developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alternatively, some bursal sections of 4-week-old chicks were double stained for cGHR (using a polyclonal antibody raised in rabbits against recombinant chicken GH-binding protein [25], diluted 1:500 and a goat anti-rabbit IgG-FITC, Bio-Rad, 1:100) and cGH (using a monoclonal antibody from IH7 hybridoma ascites fluid [31], diluted 1:100 and a goat anti-mouse IgG-TRITC secondary antibody, Bio-Rad, 1:100). These sections were also counterstained with 2  $\mu$ M TO-PRO-3 to label cell nuclei. The slides were analyzed for cGH and cGHR co-localization in a Carl Zeiss LSM 510 confocal microscope using lasers at excitation wavelengths of 488, 540, and 650 nm, respectively.

### In situ hybridization

#### Probe synthesis

A 690 bp full-length pituitary GH cDNA was obtained by PCR from total RNA extracted from adult (White Leghorn)



**Figure 1** Growth hormone (GH) (a–e) and GH mRNA (f–j) expression in the pituitary (a–c, f–h) and in the bursal plicae (BP, d and e, i and j) of 4-week-old chickens. (a) Growth hormone immunoreactivity (GH-IR) is demonstrated by immunocytochemistry (ICC) (employing a primary polyclonal  $\alpha$ -cGH antibody, C1) mainly in the pituitary caudal lobe (magnification  $\times 4$ , bar:  $30\ \mu\text{m}$ ) where most of the (b) somatotropes are present (magnification  $\times 40$ , bar  $5\ \mu\text{m}$ ). (c) GH staining is lost after preadsorbing the primary antibody with excess GH (magnification  $\times 40$ , bar:  $5\ \mu\text{m}$ ). (d) The inner medulla of the bursal follicles (F) has intense GH-IR, while the outer follicular cortex and the outer serosa have weaker GH staining. Strong GH staining is also present in the interfollicular epithelium (IFE) and in the follicle-associated epithelium (FAE), whereas little or no staining is present in the connective tissue between the follicles or below the serosa (magnification  $\times 4$ , bar:  $50\ \mu\text{m}$ ). (e) There is no GH staining if the primary antibody is preadsorbed with excess GH (magnification  $\times 4$ ). Representative of GH staining in bursas from at least 10 chickens. (f) GH mRNA expression is demonstrated by *in situ* hybridization (ISH) in the pituitary caudal lobe (magnification  $4\times$ , bar:  $30\ \mu\text{m}$ ) where most of the (g) somatotropes are present (magnification  $\times 20$ , bar:  $10\ \mu\text{m}$ ). (h) No GH mRNA staining is observed with a sense probe (magnification  $\times 20$ , bar:  $5\ \mu\text{m}$ ). (i) GH mRNA is expressed abundantly in the bursal plicae mainly in the follicular outer cortex and less intensely in the connective tissue (magnification  $\times 4$ , bar  $50\ \mu\text{m}$ ). (j) No staining is seen in the presence of the sense probe (magnification  $\times 4$ ). Representative of GH mRNA staining from at least 6 chickens. L: lumen; CT: connective tissue; S: serosa.

pituitary glands, using oligonucleotide primers CLR1 (sense) (5'-CGTTCAAGCAACACCTGAGCAACTCTCCCG-3') and CLR2 (antisense) (5'-GCCTCAGATGGTGCAGTTGCTCTCCGAA-3') [21]. This cDNA was then subcloned into a PCR<sup>®</sup>-II-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen). The vector was linearized with restriction endonuclease *Hind*III and *Not*I for subsequent production of antisense and sense probes, respectively [32]. Digoxigenin (DIG)-labeled antisense and sense riboprobes were synthesized by *in vitro* transcription with T7 and SP6 RNA polymerases, respectively, and DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Probe concentrations were determined by dot-blot analysis against a DIG-labeled RNA standard.

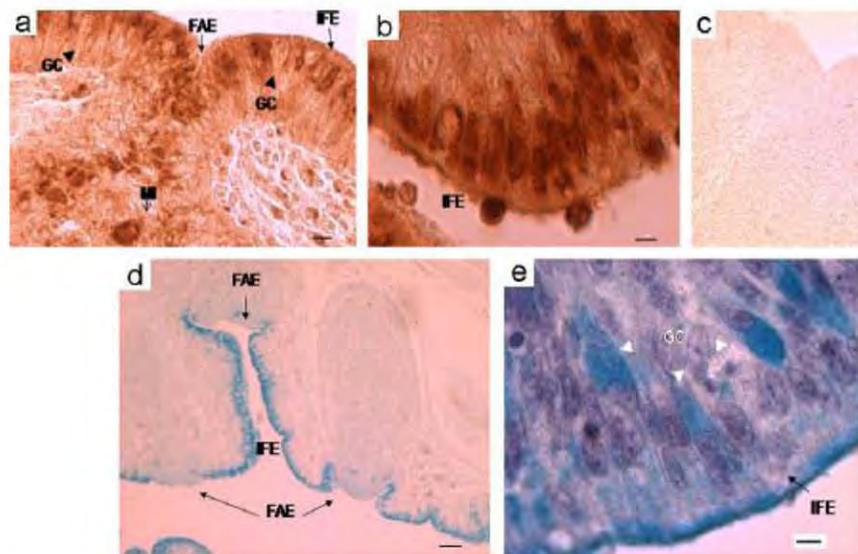
#### Hybridization procedure

Pituitaries and bursas were fixed with Bouin-Hollande sublimate for 48 h, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Tissue sections were rehydrated through a graded alcohol series into distilled water containing 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) distilled water. The sections were then incubated in fresh DEPC-PBS (2 × 15 min) to remove RNase, treated with proteinase K (10 µg/ml for 10 min at 37 °C), post-fixed in 4% paraformaldehyde (10 min), and incubated in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0), containing 0.35% acetic anhydride for 10 min. The sections were prehybridized with 50% formamide/2 × saline sodium citrate (SSC) (30 min, 60 °C), and hybridized in a moist chamber (overnight, 60 °C) with hybridization solution [50% formamide, 2 × SSC, 250 µg/ml tRNA, 50 µg/ml heparin, 2% blocking solution (Roche Diagnostics)], and sense or antisense DIG-labeled riboprobes (at concentrations of 2 µg/ml) that had previously been denatured (5 min, 85 °C). The

sections were subsequently washed in 2 × SSC (10 min), 2 × SSC/50% formamide (45 min, 45 °C), 2 × SSC (3 × 15 min), 2 × SSC (30 min, 37 °C), and 0.1 × SSC (60 min, 60 °C). The sections were then washed (2 × 5 min) in buffer one (0.01 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5), and the hybridized probe was detected immunohistochemically by incubation (2 h) with an anti-DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics) in 1% blocking solution (Roche Diagnostics). The sections were then washed in buffer one (2 × 5 min), equilibrated (5 min) in buffer two (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5), and incubated in buffer two containing a commercial substrate for alkaline phosphatase (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitro-blue tetrazolium chloride, Roche Diagnostics). Color development was stopped by washing in Tris-EDTA buffer (2 × 5 min). The sections were then rinsed in PBS (3 × 5 min) and mounted with an aqueous medium. Tissue sections from the pituitary glands of slaughterhouse (4 weeks) chickens were similarly treated, although at probe concentrations of 200 ng/ml, and the labeling of somatotrophs in the caudal lobe (Figure 1f and g) provided a positive control [33]. A Harris hematoxylin (0.5%) solution was used to counterstain some sections.

#### Results

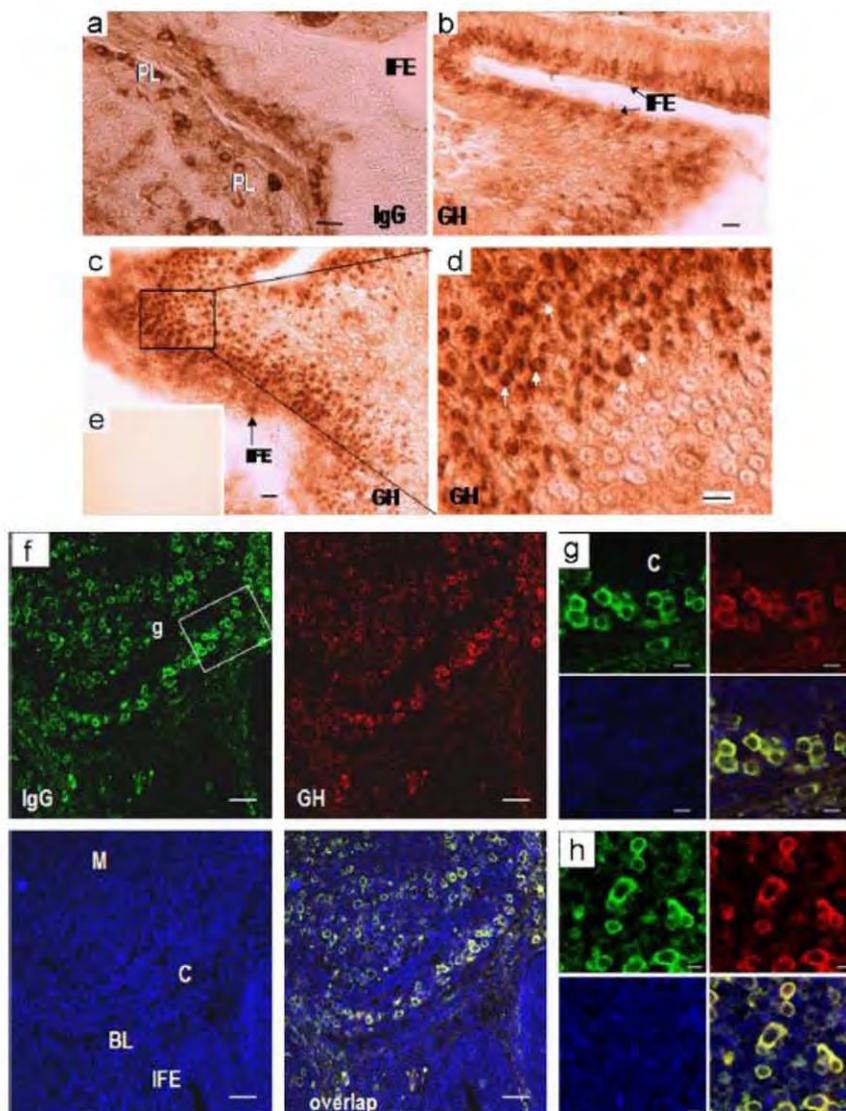
The expression of GH immunoreactivity (GH-IR) and GH mRNA was documented both in the pituitary (control) and the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens (Figure 1). In the pituitary, as expected, GH-IR was mainly associated to the caudal lobe (Figure 1a) where most somatotrophs (Figure 1b) are located. There was, however, no



**Figure 2** Growth hormone (GH) immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) GH staining in columnar cells of the interfollicular epithelium (IFE) and follicle-associated epithelium (FAE). Unstained goblet cells (GC) interspersed in the IFE are indicated by arrowheads. A stained macrophage-like (M) cell at the base of the folded FAE is indicated by the open arrow (magnification × 40, bar: 10 µm). (b) A higher magnification, × 100, of the IFE in (a) (bar: 5 µm). (c) GH staining is absent after preadsorbing the primary antibody with excess GH (magnification × 100, bar: 5 µm). (d) Alcian blue staining of mucous secreting epithelium in the IFE and the absence of mucous staining in the FAE (magnification 20 ×, 30 µm). (e) A higher magnification, × 100, of the IFE and goblet cells (arrowheads) in (c), counterstained (purple) with haematoxylin (bar: 5 µm).

staining observed when the primary antibody had been preadsorbed with excess recombinant chicken GH or replaced with normal rabbit serum (NRS) (Figure 1c). As shown in Figure 1d, GH-IR was also widespread within the bursa. Each bursal follicle (F) was immunoreactive, particularly in the inner compartments (medulla [M]), which were darkly stained. GH-IR was also intense in the interfollicular epithelium (IFE) separating the bursal plicae

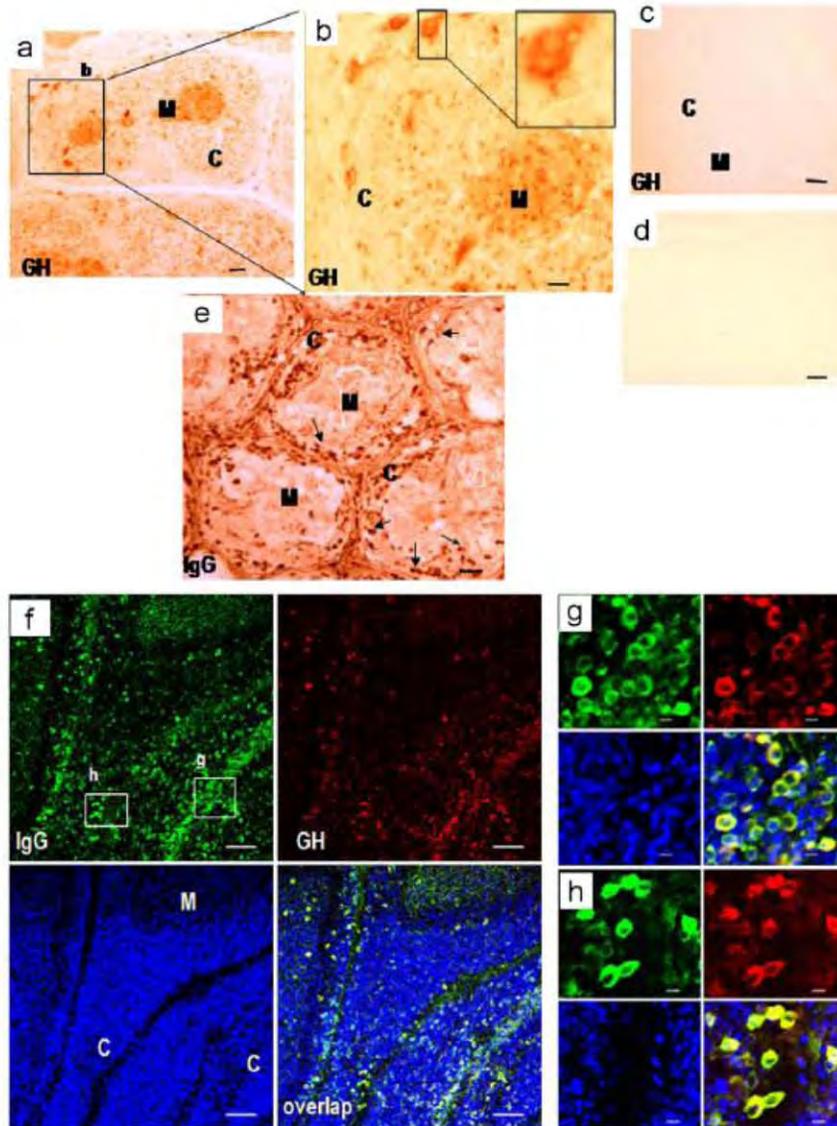
(folds), as it was in the follicle-associated epithelium (FAE), formed where the corticomedullary epithelium (CM) between follicles meets the IFE [34]. The serosa (S) of the bursa was also GH immunoreactive, although in marked contrast, the underlying connective tissue (CT) (the *lamina propria*, which also separates the bursal follicles) had little or no GH immunoreactivity. Again, the specificity of GH staining in the bursal sections was shown by its absence



**Figure 3** Growth hormone (GH) and IgG immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) Below the unstained interfollicular epithelium (IFE), round plasma cells (PL) are labeled by an anti-IgG antiserum (magnification  $\times 40$ , bar  $5\mu\text{m}$ ). (b) In contrast, epithelial cells in the IFE are GH-immunoreactive after labeling with a polyclonal specific  $\alpha$ -cGH antibody (magnification  $\times 40$ , bar  $30\mu\text{m}$ ). (c) Presumptive lymphocytes below the IFE with GH immunoreactivity (magnification  $\times 20$ , bar  $30\mu\text{m}$ ). (d) Some of these GH-IR cells are indicated by arrows in a higher magnification,  $\times 100$ , of the boxed area in (c) (bar:  $5\mu\text{m}$ ). (e) GH staining is absent if the primary antibody is preadsorbed with excess GH (magnification  $\times 20$ ). (f) Confocal images of triple stained bursal sections to identify cells expressing IgG (green, 1st Ab: rabbit anti-chicken/turkey IgG 1:100; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FITC 1:100) or GH (red, 1st Ab: mAB anti-cGH [IH7 hybridoma ascites fluid 1:100]; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursal follicles. Cell nuclei (blue) were labeled with TOPRO-3. Overlap of the confocal images show cells co-expressing IgG and GH (yellow) mainly in the follicular outer cortex (magnification  $\times 40$ , bars:  $20\mu\text{m}$ ). (g) and (h) Amplification crops ( $\times 2$ ) of diverse regions in (f) show cells that co-express IgG and GH (yellow) (bars  $5\mu\text{m}$ ). BL: basal layer; C: cortex; M: medulla.

when the primary antibody was preadsorbed with excess rcGH or replaced with NRS (Figure 1e). On the other hand, GH mRNA expression was demonstrated by *in situ* hybridization (ISH) in the pituitary caudal lobe (Figure 1f, positive control), where intense signal of the DIG-labeled antisense riboprobe was observed within the cytoplasm of somato-

tropes (Figure 1g). Conversely no signal corresponding to GH mRNA was observed when the sense probe was employed (Figure 1h). In the bursal sections, GH mRNA expression was also documented by intense hybridization to the DIG-labeled antisense riboprobe, observed mainly in the cortical area of the bursal follicles (Figure 1i). In marked contrast, no



**Figure 4** Growth hormone (GH) and IgG immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) GH immunoreactivity in the medulla and cortex (C) of bursal follicles employing a polyclonal (C1) anti-cGH antibody (magnification  $\times 10$ , bar:  $30\ \mu\text{m}$ ). (b) A higher magnification,  $\times 20$ , of the boxed area in (a). The insert is a higher magnification,  $\times 100$ , of the boxed area in (b) (bar  $10\ \mu\text{m}$ ). (c) The specificity of GH staining is shown by the lack of staining in the bursal cortex (C) and medulla (M) after preabsorption of the primary antibody with excess GH (magnification  $\times 40$ , bar  $30\ \mu\text{m}$ ). (d) Negative control without primary antibody (magnification  $\times 40$ , bar:  $30\ \mu\text{m}$ ). (e) IgG immunoreactivity in cortical (C) cells (arrows), but not medullary (M) cells, of bursal follicles (magnification  $\times 20$ ,  $30\ \mu\text{m}$ ). (f) Confocal images of triple stained bursal sections to identify cells expressing IgG (green, 1st Ab: rabbit anti-chicken/turkey IgG 1:100; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FITC 1:100) or GH (red, 1st Ab: mAB anti-cGH [IH7 hybridoma ascites fluid 1:100]; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursal follicles. Cell nuclei (blue) were labeled with TOPRO-3. Overlap of the confocal images show cells co-expressing IgG and GH (yellow) mainly in the follicular outer cortex (magnification  $40\times$ , bars  $50\ \mu\text{m}$ ). (g) and (h) Amplification crops ( $2\times$ ) of diverse regions in (f) show cells that co-express IgG and GH (yellow) (bars  $5\ \mu\text{m}$ ). C: cortex; M: medulla.

signal was detected when the sense probe was used (Figure 1j).

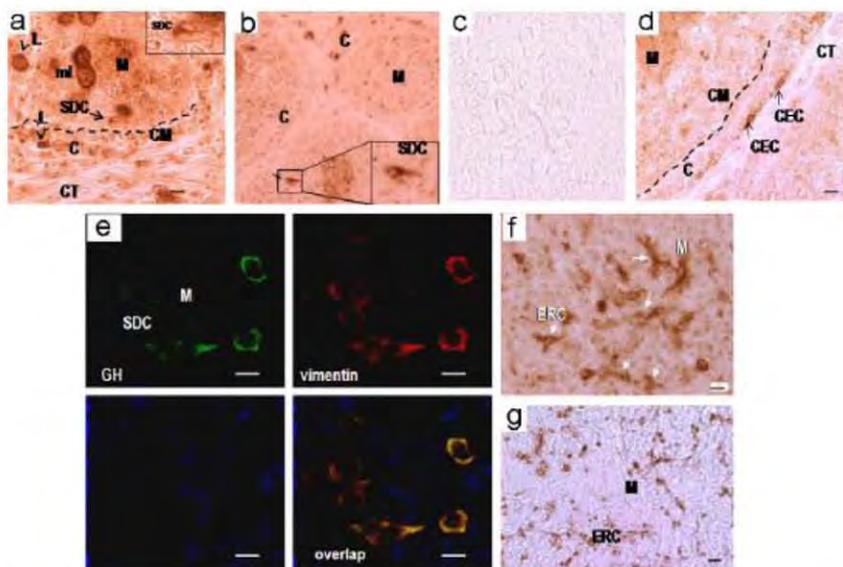
At higher magnification, GH staining in the IFE was intense in the columnar epithelial cells (Figure 2a and b) that were mucous secreting (Figure 2c and d), although it was not present in the interspersed goblet cells [35] (Figure 2a and e). Intense GH-IR was also abundant in the polygonal mesenchymal cells of the FAE (Figure 2a) that do not secrete mucous (Figure 2d) [35] and in the underlying stratified epithelial cells (Figure 2a and b). A number of large, scattered cells with macrophage-like (ML) appearance [34] with GH-IR were also present in the FAE (Figure 2a). Again, no labeled cells were found in the negative control section (Figure 2c).

Below the IFE numerous, large, rounded cells, presumably plasma cells (PL) [36], had IgG (Figure 3a) and GH (Figure 3b and c) immunoreactivity. Figure 3d shows an amplification of presumptive lymphocytes with strong GH-IR in the cytoplasm around the nucleus. Signal was lost when the primary antibody was preadsorbed with excess GH (Figure 3e). In another set of experiments, confocal images of triple stained bursal sections (Figure 3f) showed extensive labeling of cells expressing both IgG (green) and GH (red) immunoreactivities in the follicular cortex below the IFE, demonstrating that GH co-localizes in the same plasma cells that produce IgG (overlap in yellow). These results are

better seen at higher amplification of the cortical region (Figures 3g and h) showing clear overlap of both signals (yellow).

Within the bursal follicles, lymphocytes with immunoreactivity for IgG were largely restricted to the cortical compartments (Figure 4e). Small scattered cells of similar size, shape, and localization of lymphocytes also had GH-IR (Figure 4a and b). The specificity of the GH staining in the follicles was demonstrated by its absence in the negative controls (Figure 4c and d, respectively). Confocal images of triple stained bursal sections clearly demonstrated the co-expression of IgG (green) and GH (red) in the same plasma cell type (overlap in yellow) located mainly in the follicular outer cortex (Figure 4f–h).

In addition, some other cell types had GH-IR in the bursal follicles (Figure 5). Besides presumptive mature lymphocytes (L) [38], and large macrophage-like (ML) cells (Figure 5a), some large cortical cells with elongated processes, with the characteristic appearance of secretory dendritic cells (SDC's) [37] were also GH immunoreactive (Figure 5a) around the corticomedullary boundary and also in the bursal medulla (Figure 5b). Like before, there was no GH staining in the negative control (Figure 5c). Confocal analysis revealed that vimentin-positive cells (red, a marker of SDC's; Figure 5e) were also positive for GH-IR (green), thus indicating simultaneous expression of both proteins (overlap in yellow) in the



**Figure 5** Growth hormone (GH) immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) GH staining in the bursal cortex (C) and medulla (M) and in corticomedullary (CM) epithelial cells (below the dotted line) (magnification  $\times 40$ , bar:  $10\mu\text{m}$ ). GH staining of a secretory dendritic cell (SDC) in the medulla is indicated by the arrow and is magnified,  $\times 100$ , in the insert. (b) GH immunoreactivity in a secretory dendritic cell (SDC) in the corticomedullary region (C) of a bursal follicle (magnification  $\times 40$ ). The insert is a higher magnification,  $\times 100$ , of the SDC. (c) GH staining is absent if the primary polyclonal antibody is preadsorbed with excess GH (magnification  $\times 100$ ). (d) GH staining in the bursal cortex (C), medulla (M) and corticomedullary (CM) epithelium and in corticoepithelial cells (CEC, arrows) in the interstitial connective tissue (CT) (magnification  $\times 40$ , bar  $10\mu\text{m}$ ). (e) Confocal images of triple-stained bursal sections to identify cells expressing GH (green, 1st Ab: rabbit anti-cGH 1:200; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FITC 1:100) or vimentin (red, 1st Ab: mAB anti-porcine vimentin 1:50; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursal follicles. Overlap of the confocal images show secretory dendritic cells co-expressing GH and vimentin (yellow) mainly in the follicular medulla (magnification  $40\times$ , bars:  $5\mu\text{m}$ ). (f) GH immunoreactivity in presumptive endothelial reticular cells (ERCs, arrows) in medulla (M) of bursal follicles (magnification  $\times 40$ , bar  $10\mu\text{m}$ ). (g) cytokeatin immunoreactivity in ERCs of bursal follicles (magnification  $\times 40$ ,  $10\mu\text{m}$ ).

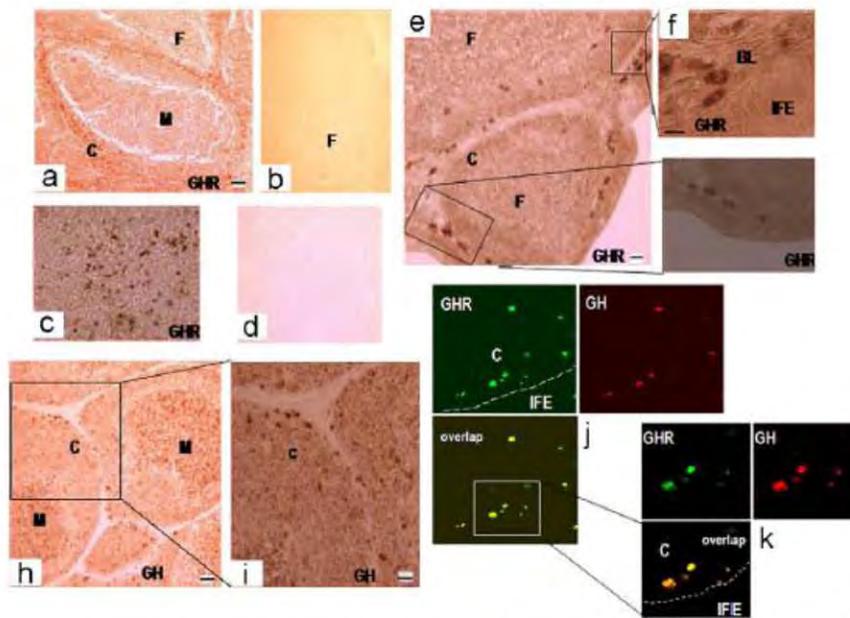
same cell type. Between the follicles, squamous corticoepithelial cells (CEC) were also GH immunoreactive (Figure 5d). Within the follicles, GH staining was also present in irregularly shaped epithelial reticular cells (ERC's) in the medulla [29] (Figure 5f); these cells were also identified by cytokeratin labeling (Figure 5g).

Immunoreactivity against the chicken GH receptor was clearly observed in the bursal cortex (Figure 6a) and was also associated with intensely stained large cells (corticoepithelial or immature lymphocytes) near the interstitial space and in the connective tissue as well as in the basal layer below the IFE (Figures 6e and g), with a distribution similar to that described by Hull et al. [25]. No clear GHR staining was observed in the bursal medulla or in the IFE or FAE. When the primary antibody was omitted (Figure 6b) GHR staining was not observed in any part of the follicles. As a positive control, liver sections were also analyzed to demonstrate the presence of GHR immunoreactivity with the antibody employed (Figures 6c and d). When similar bursal sections were treated with the anti-cGH antibody, GH-IR was also observed in cells that were morphologically similar to those expressing GHR in these locations (Figures 6h and i). Confocal images of double-stained

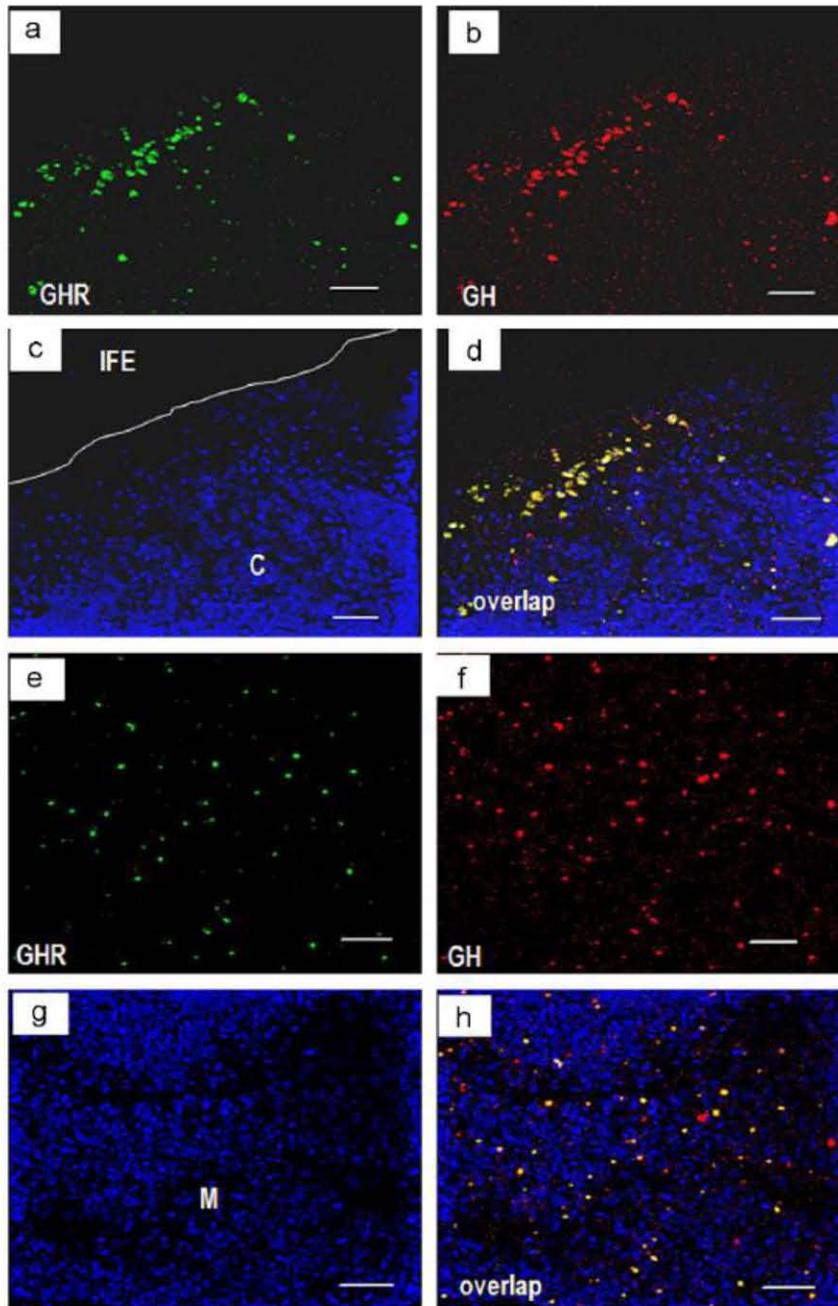
sections for cGHR and cGH showed some cells that co-expressed both antigens in the cortex near the interfollicular boundaries (Figures 6j and k).

GH receptor and GH co-localized in many cortical cells below the IFE (Figure 7a-d), whereas in the medulla only a fraction of GH expressing cells also expressed GHR (Figure 7e-h).

GH mRNA was also abundant and widespread in the bursa (Figure 8a), particularly within the bursal follicles. However, in marked contrast to the distribution of GH immunoreactivity, GH mRNA was more abundant in the outer follicular cortex (Figure 8b, e and f) than in the central medullary compartment (Figure 8c, e and f). Similarly, while no GH-IR was present in the connective tissue of the bursa, GH mRNA was detected in some connective tissue cells, although its hybridization to the antisense GH riboprobe was weak (Figure 8a-c). Likewise, although GH immunoreactivity was intense throughout the IFE and FAE, these tissues were devoid of staining for GH mRNA, which was, however, present in the connective tissue below the innermost layer of undifferentiated IFE cells (Figure 8b and c). The specificity of GH mRNA detection in these bursal tissues was demonstrated by the absence of staining when using the sense probe (Figure 8d).



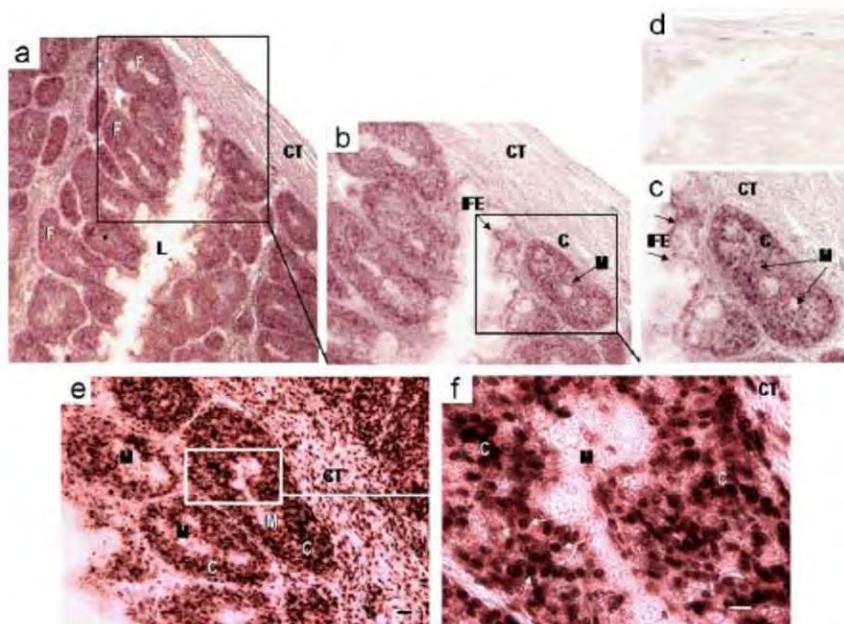
**Figure 6** Growth hormone receptor (GHR) and growth hormone (GH) immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. Immunohistochemistry of (a) bursal ( $\times 10$ , bar  $30\mu\text{m}$ ) and (c) liver ( $\times 40$ ) sections stained for growth hormone receptor (cGHR) with mouse primary polyclonal Ab (CH17, 1:500), followed by secondary Ab goat anti-mouse IgG-HRP (1:100); (b) bursal and (d) liver sections negative controls without primary antibody. (e) Another bursal section ( $\times 10$ , bar:  $15\mu\text{m}$ ) showing cGHR immunoreactivity near the interfollicular boundaries just above the IFE; (f) a  $100\times$  amplification of the boxed area at the top of (e) (bar  $10\mu\text{m}$ ); and (g) a  $40\times$  amplification of the boxed area at the bottom of (e). (h)  $10\times$  (bar  $30\mu\text{m}$ ) and (i)  $40\times$  (bar:  $20\mu\text{m}$ ) amplification of bursal sections stained for chicken growth hormone (cGH) with polyclonal rabbit anti-cGH primary Ab (C-1, 1:250), secondary Ab goat anti-rabbit IgG-HRP (1:100) showing cGH immunoreactivity near the interfollicular boundaries. (j) Confocal images of double-stained bursal sections to identify cells expressing GH-receptor (green, 1st Ab: rabbit anti-cGH-R 1:500; 2nd Ab: goat anti-rabbit IgG-FITC 1:100) or GH (red, 1st Ab: mAb anti-cGH [IH7 hybridoma ascites fluid 1:100]; 2nd Ab: goat anti-mouse IgG-TRITC 1:100) in bursae ( $40\times$ ). (k) An amplification ( $\times 64$ ) of the overlap of the two confocal figures shows the co-localization of GHR and GH in the same cells (yellow). The region where the positive cells appear correspond to the bursal follicular cortex. F: bursal follicle; C: cortex; M: medulla; BL: basal layer; IFE: interfollicular epithelium.



**Figure 7** Co-localization of growth hormone receptor (GHR) and growth hormone (GH) immunoreactivity in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens by confocal microscopy. Bursal sections were triple stained for GHR immunoreactivity (green) in cortex (a) and medulla (e); for GH immunoreactivity (red) in cortex (b) and medulla (f); and for cell nuclei (blue) in cortex (c) and medulla (g). Abundant co-expression of GHR and GH was observed in the bursal cortex below the IFE (d), whereas only a fraction of GH immunoreactive cells co-localized with GHR immunoreactivity in the medulla (h), bars: 5  $\mu$ m.

At higher magnification, staining for GH mRNA can be clearly seen in individual small rounded cells within the connective tissue surrounding a bursal follicle (Figure 9c and d). As similar cells have immunoreactivity for IgG

(Figure 9a and b) these GH mRNA-expressing cells are likely to be migratory lymphocyte cells. In marked contrast, GH mRNA is totally absent in the IFE above the bursal connective tissue (Figure 9c and d).



**Figure 8** Growth hormone (GH) mRNA staining in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) Strong staining is present in the outer cortex of the follicles (F), but the medulla lacks GH mRNA. Weaker staining is present in the connective tissue (CT) underneath the serosa (magnification  $\times 4$ ). (b) A higher magnification,  $\times 10$ , of the boxed area in (a). GH mRNA staining (arrow) is shown in the CT below the interfollicular epithelium (IFE) and below the outer serosa. (c) A higher magnification,  $\times 20$ , of the boxed area in (b). (d) No staining is seen in the presence of the sense probe (magnification  $\times 20$ ). (e) GH mRNA staining in the bursal cortex (C) and in the interstitial CT between follicles (magnification  $\times 20$ , bar  $30\ \mu\text{m}$ ). (f) A higher magnification,  $\times 40$ , of the boxed area in (E) (bar:  $30\ \mu\text{m}$ ). Presumptive lymphocytes are indicated by arrows. Representative of GH mRNA staining in bursas from at least 10 chickens.

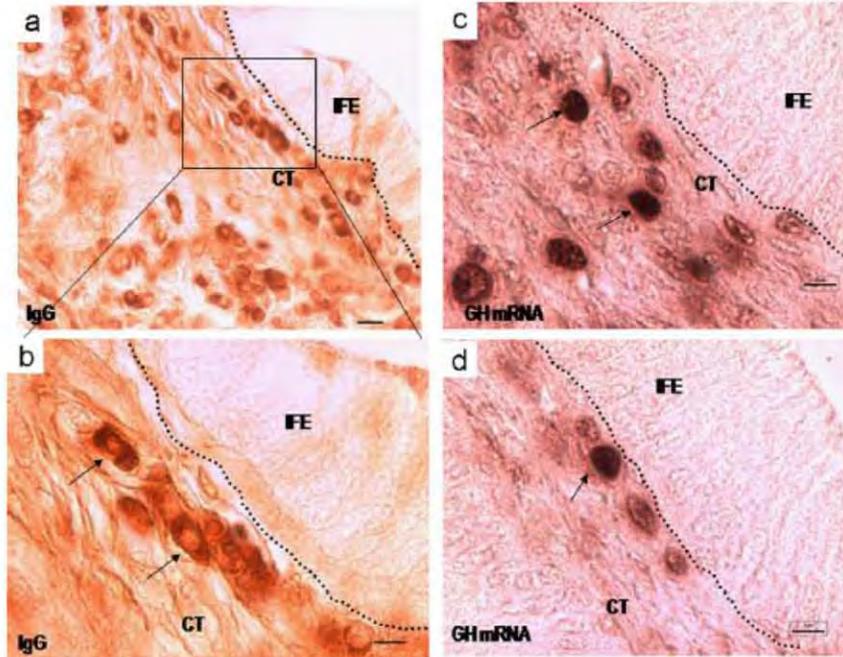
## Discussion

While GH and GH mRNA have previously been found in extracts of the bursa of Fabricius [21,23], the results of the present study clearly demonstrate, for the first time, their cellular localization in stromal and non-stromal cell types in this tissue.

A significant finding in this study was the discordant distribution of GH protein and GH mRNA. In non-stromal tissues, the GH message was primarily in the bursal cortex, which is primarily comprised of B-cell precursors, while the protein was mainly in the inner medulla, which contains SDCs and the maturing lymphocytes [22]. The expression of the GH gene in the bursa would thus appear to be similar to that in the testes, in which GH mRNA is confined to precursor cells (spermatogonia and primary spermatocytes) [32,39], whereas the GH protein is present in maturing cells (secondary spermatocytes and spermatids). This suggests that factors related to cell division stimulate GH expression and that GH has roles in cellular differentiation. Support for the former suggestion is provided by the observation that a suppression of lymphocyte proliferation was associated with a marked decrease in GH expression in rat lymphocytes [40], whereas an increase in epithelial cell proliferation correlated with increased GH production [41]. Support for the latter is provided by the GH requirement for the differentiation of adipocytes [42,43], osteoblasts [44], Leydig cells [45], chondrocytes [46], granulosa cells [47] and brain cortical cells [48]. A possible explanation for the discordant

distribution of GH and GH mRNA is that there is a specific temporal regulation of GH translation at this age, since in earlier stages (1-day to 2-week post-hatching) there is a concurrent expression of both GH mRNA and GH protein both in the medulla and in the cortex.

Within the immune system, exogenous GH has been shown to have numerous stimulatory roles [49], including the differentiation of B-lymphoid precursors in mouse bone marrow cultures [50]. This action, at physiological GH levels, was mediated through the induction of specific transcription factors, such as paired box gene-5 (Pax5), immunoglobulin-associated-alpha (1g-alpha/CD79a, 1g-beta/CD79b) and insulin-like growth factor (IGF)-1. As mRNAs for GH and the GHR are expressed in mouse B-cells precursors, Sumita et al. [50] concluded that GH induces B-lymphocyte differentiation in an autocrine or paracrine manner. A similar induction by exogenous GH of the differentiation in the thymocyte progenitors has also been shown in mouse bone marrow cultures [51]. Autocrine or paracrine actions of GH are thought to be responsible for lymphocyte proliferation in rats and humans, since this is blocked in the presence of antisense GH oligonucleotides [40], anti-GH antibodies [18,52,53] and a GH antagonist [15]. As the bursa of Fabricius is a source of immune stem cells in birds, it is therefore possible that GH produced within bursal follicles has a similar autocrine or paracrine role in lymphocyte differentiation in immature chicks. This proposal is supported by confocal microscopy analysis showing co-expression of GH and IgG in B lymphocytes of the bursal cortex and,



**Figure 9** Growth hormone (GH) mRNA expression and IgG staining in the bursa of Fabricius of 4-week-old chickens. (a) IgG immunoreactivity in lymphocyte cells in the connective tissue (CT) below the interfollicular epithelium (IFE) (separated by the dotted line, magnification  $\times 40$ , bar  $10\ \mu\text{m}$ ). (b) A higher magnification,  $\times 100$ , of the boxed area in (a). Immunoreactive lymphocytes are indicated by arrows. (c) and (d) GH mRNA staining in presumptive lymphocytes (cells showing similarities in morphology and location with those present in the connective tissue (CT) below the IFE (a) and (b), as indicated by arrows). Magnification  $\times 100$ , bars:  $5\ \mu\text{m}$ .

to a lesser extent, in medulla (Figures 3 and 4). The distribution of GHR-IR coincided with GH-IR mainly in certain large lymphoid cells near the bursal cortex and in the interstitial connective tissue (Figures 6 and 7). These cells also expressed GH mRNA and had IgG immunoreactivity (Figure 9). In this location there was concordance between GH mRNA and GH expression in the same IgG-producing cells. Confocal images showed co-expression of GHR and GH in cells in those locations, thus suggesting autocrine or paracrine actions of GH in lymphoid cells, which may be involved in B-cell differentiation. On the other hand, only some cells showed GHR-IR in the bursal medulla (Figure 7), while many had GH-IR, which suggests less autocrine or paracrine actions in that location. While GHRs are present in the bursa of newly hatched chicks, they are mainly associated with connective tissue or corticoepithelial cells in the interstitial space or with large cells that morphologically resemble macrophages [25]. This contrasts markedly with the presence of GH in the cortex and, to a greater extent, in the medulla of 4-week-old chicks. Nevertheless, since circulating lymphocytes (that express IgM and CD8 antigens) in 6-week-old chicks do express the GHR gene and are GHR immunoreactive [27], the cellular expression of the GHR in the bursa may be age related. Indeed, the ability of exogenous GH to induce lymphocyte proliferation in 7–8-week-old chickens [54] suggests that bursal-derived cells are responsive to GH stimulation, at least in older birds. It is, however, currently

uncertain if this reflects an autocrine or paracrine mechanism of GH action.

GH expression in the IgG-producing lymphocytes located in the bursal cortex was demonstrated by two different sets of specific anti-GH antibodies: a polyclonal one raised in rabbits (C-1) and a monoclonal one raised in mice (IH7) (Figures 3 and 4). Since these possibly recognize different epitopes of the cGH molecule and since in both cases labeling was lost after preadsorbing with rcGH excess, there is good support to conclude that GH expression detection in these cells was indeed specific.

Besides lymphocytes some other bursal cell types showed GH immunoreactivity: ERCs, macrophage-like cells, SDCs and CECs (Figure 5). Among them, the first three cell types occur in the medullary region. In particular, confocal images showed the co-expression of vimentin and GH in putative secretory dendritic cells (SDCs, Figure 5), thus suggesting that GH may be involved in the stimulation of epithelial cell proliferation or in the secretion of a specific bursal factor [37].

In addition to lymphoid bursal tissues, GH was also present in the epidermis, IFE, FAE, the epithelium of the CM junction, and in fibroblast-like supporting reticular cells. It is similarly well established that epithelial tissues are GH immunoreactive in mammalian immune tissues [2, 13, 20], as well as in mammary epithelia [55, 56], endometrial epithelia [41] and lung epithelia [57]. The presence of GH in these stromal cells is thought to reflect the local expression of the

GH gene and autocrine or paracrine actions of GH mediated through local GHRs. In contrast, GH mRNA was not detected in bursal IFE or FAE (Figures 8 and 9). Thus, while roles for epithelial GH in thymic immune function have been proposed in mammals [13,20], the functional significance of epithelial GH in the bursa of neonatal chicks is uncertain, especially as the IFE and FAE are devoid of GHR immunoreactivity, as shown here and also by results obtained in day-old chicks [25]. There are, however, some large GHR-expressing cells in the basal layer just below the IFE.

Within the bursa, GH-IR was widespread in stromal and non-stromal cells, but it is not known if similar or different GH moieties correlate with this cellular distribution. In previous studies, we have shown that the GH immunoreactivity in bursal extracts reflects the presence of heterogeneous GH variants that differ in molecular size [24], thus, it is possible that different moieties may be present in different cell types, but this requires further investigation.

In summary, the results of this study clearly show, for the first time, the cellular distribution of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius of juvenile chickens. In some parts of the bursa (i.e. medulla, IFE, and FAE) there was a differential distribution of the GH protein and its GH mRNA transcript, and also of GHR immunoreactivity. However, in lymphoid cells near the bursal cortex and the interstitial CT between follicles a clear co-expression of GH-IR and GHR-IR was found as well as the co-expression of GH-IR and IgG-IR, which matched with a similar distribution of GH mRNA in those cells that also co-localized with IgG immunoreactivity. These results suggest an autocrine/paracrine role for GH in B-cell differentiation. The functional significance of GH gene expression in the bursa should be further studied.

## Acknowledgments

We thank Gerardo Courtois (lab assistant), Pilar Galarza (librarian), Evelyn Flores and E. Nydia Hernández (Microscopy Unit) for technical support, as well as Dorothy Pless for carefully editing the manuscript. This work was supported by grants from CONACyT (F1-60296) and PAPIIT-UNAM (IN205406-3) of Mexico and by NSERC of Canada.

## References

- [1] Binder G, Revskoy S, Gupta D. *In vivo* growth hormone gene expression in neonatal rat thymus and bone marrow. *J Endocrinol* 1994;140(1):137-43.
- [2] Wu H, Devi R, Malarkey WB. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(3):1278-82.
- [3] Yang Y, Guo L, Ma L, Liu X. Expression of growth hormone and insulin-like growth factor in the immune system of children. *Horm Metab Res* 1999;31(6):380-4.
- [4] Lantinga van Leeuwen IS, Teske E, van Garderen E, Mol JA. Growth hormone gene expression in normal lymph nodes and lymphomas of the dog. *Anticancer Res* 2000;20(4):2371-6.
- [5] Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC, Morel G. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem* 2001;49(3):347-54.
- [6] Baxter JB, Blalock JE, Weigent DA. Expression of immunoreactive growth hormone in leukocytes *in vivo*. *J Neuroimmunol* 1991;33(1):43-54.
- [7] Weigent DA, Baxter JB, Blalock JE. The production of growth hormone and insulin-like growth factor-I by the same subpopulation of rat mononuclear leukocytes. *Brain Behav Immun* 1992;6(4):365-76.
- [8] Palmetshofer A, Zechner D, Luger TA, Barta A. Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 1995;113(2):225-34.
- [9] Melen L, Hennen G, Dullaart RP, Heinen E, Igout A. Both pituitary and placental growth hormone transcripts are expressed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin Exp Immunol* 1997;110(2):336-40.
- [10] Weigent DA, Riley JE, Galin S, LeBoeuf RD, Blalock JE. Detection of growth hormone and growth hormone-releasing hormone-related messenger RNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198(1):643-8.
- [11] Rohn WM, Weigent DA. Cloning and nucleotide sequencing of rat lymphocyte growth hormone cDNA. *Neuroimmunomodulation* 1995;2(2):108-14.
- [12] Liu J, Zheng D, Deng J, Xiao S, Liu S, Shi Y. Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. *Chin Med J (Engl)* 1997;110(5): 362-5.
- [13] de Mello-Coelho V, Gagnerault MC, Souberbielle JC, Strasburger CJ, Savino W, Dardenne M, et al. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 1998;139(9):3837-42.
- [14] Hattori N, Kitagawa K, Inagaki C. Human lymphocytes express hGH-N gene transcripts of 22kDa, 20kDa and minor forms of GH, but not hGH-V gene. *Eur J Endocrinol* 1999;141(4): 413-8.
- [15] Malarkey WB, Wang J, Cheney C, Glaser R, Nagaraja H. Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. *J Neuroimmunol* 2002;123(1-2):180-7.
- [16] Kooijman R, Malur A, Van Buul-Offers SC, Hooghe-Peters EL. Growth hormone expression in murine bone marrow cells is independent of the pituitary transcription factor Pit-1. *Endocrinology* 1997;138(9):3949-55.
- [17] Allen JT, Bloor CA, Kedia RK, Knight RA, Spiteri MA. Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding protein in human lung. *Neuropeptides* 2000;34(2):98-107.
- [18] Weigent DA, Blalock JE. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol* 1991;135(1):55-65.
- [19] Delhase M, Vergani P, Malur A, Hooghe-Peters EL, Hooghe RJ. The transcription factor Pit-1/GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues. *Eur J Immunol* 1993;23(4):951-5.
- [20] Maggiano N, Piantelli M, Ricci R, Larocca LM, Capelli A, Ranelletti FO. Detection of growth hormone-producing cells in human thymus by immunohistochemistry and non-radioactive *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 1994;42(10): 1349-54.
- [21] Render CL, Hull KL, Harvey S. Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine* 1995;3:729-35.
- [22] Glick B. The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery. *Poult Sci* 1994;73(7):979-83.
- [23] Liu HC, Kung HJ, Fulton JE, Morgan RW, Cheng HH. Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(16):9203-8.
- [24] Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, et al. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 2005;144(1):28-37.

- [25] Hull KL, Thiagarajah A, Harvey S. Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res* 1996;286(1):69–80.
- [26] Harvey S, Hull KL. Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine* 1997;7(3):267–79.
- [27] Hull KL, Nette F, Harvey S. Bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems: role of growth hormone. In: Dawson A, Chaturvedi CM, editors. *Avian endocrinology*. New Delhi, India: Narosa Publishing House; 2001. p. 437–46.
- [28] Arámburo-de-la-Hoz C, Sánchez-García R, Fenton-Navarro B, Perera-Marin JG, Valverde-Rodríguez C. Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Vet Mex* 1989;20:397–405.
- [29] Sánchez-Refusta F, Ciriaco E, Germana A, Germana G, Vega JA. Age-related changes in the medullary reticular epithelial cells of the pigeon bursa of Fabricius. *Anat Rec* 1996;246(4):473–80.
- [30] Franchini A, Ottavani E. Immunoreactive POMC-derived peptides and cytokines in the chick thymus and bursa of Fabricius microenvironments: age-related changes. *J Neuroendocrinol* 1999;11(9):685–92.
- [31] Berghman LR, van Beeumen J, Decuypere E, Kühn ER, Vandesande F. One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoabsorbent. *J Endocrinol* 1988;118(3):381–7.
- [32] Harvey S, Baudet M-L, Murphy A, Luna M, Hull KL, Arámburo C. Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 2004;139(2):158–67.
- [33] Baudet M-L, Sanders EJ, Harvey S. Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology* 2003;144(12):5459–68.
- [34] Oláh I, Glick B. Follicle-associated epithelial and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments. *Anat Rec* 1992;233(4):577–87.
- [35] Ciriaco E, Pinerra PP, Diaz-Esnal P, Laura R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc Res Tech* 2003;62(6):482–7.
- [36] Boyd RL, Ward HA. Lymphoid antigenic determinants of the chicken: ontogeny of bursa-dependent lymphoid tissue. *Dev Comp Immunol* 1984;8(1):149–67.
- [37] Nagy N, Magyar A, Tóth M, Oláh I. Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat Embryol* 2004;208(2):97–107.
- [38] Nagy N, Magyar A, Tóth M, Oláh I. Quail as the chimeric counterpart of the chicken: morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *J Morphol* 2004;259(3):328–39.
- [39] Luna M, Huerta L, Berumen L, Martínez-Coria H, Harvey S, Arámburo C. Growth hormone in the male reproductive tracts of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 2004;137(1):37–49.
- [40] Weigent DA, Blalock JE, LeBoeuf RD. An antisense oligodeoxynucleotide to growth hormone messenger ribonucleic acid inhibits lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 1991;128(4):2053–5057.
- [41] Slater M, Cooper M, Murphy CR. Human growth hormone and interleukin-6 are upregulated in endometriosis and endometrioid adenocarcinoma. *Acta Histochem* 2006;108(1):13–8.
- [42] Yarwood SJ, Sale EM, Sale GJ, Houslay MD, Kilgour E, Anderson NG. Growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes requires Janus kinase/signal transducer and activator of transcription but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase signaling. *J Biol Chem* 1999;274(13):8662–8.
- [43] Juarez-Aguilar E, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. A simple and sensitive assay for GH activity based on 3T3-F442A cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(4):935–41.
- [44] Kassem M. Cellular and molecular effects of growth hormone and estrogen on human bone cells. *APMIS Suppl* 1997;71:1–30.
- [45] Dombrowicz D, Sente B, Reiter E, Closset J, Hennen G. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *J Androl* 1996;17(6):639–50.
- [46] Maor G, Hochberg Z, von der Mark K, Heinegard D, Silbermann M. Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology* 1989;125(3):1239–45.
- [47] Jia XC, Kalmijn J, Hsueh AJ. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1986;118(4):1401–9.
- [48] Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sánchez-Franco F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 2003;114(3):1086–97.
- [49] Clark R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 1997;18(2):157–79.
- [50] Sumita K, Hattori N, Inagaki C. Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *J Pharmacol Sci* 2005;97(3):408–16.
- [51] Knyszynski A, Adler-Kunin S, Globerson A. Effects of growth hormone on thymocytes development from progenitor cells in the bone marrow. *Brain Behav Immun* 1992;6(4):327–40.
- [52] Weigent DA, Baxter JB, Wear WE, Smith LR, Bost KL, Blalock JE. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J* 1988;2(12):2812–8.
- [53] Sabharwal P, Varna S. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor 1 as an autocrine and paracrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(7):2663–9.
- [54] Haddad EE, Mashaly MM. Effect of thyrotropin-releasing hormone, triiodothyronine, and chicken growth hormone on plasma concentrations of thyroxine, triiodothyronine, growth hormone, and growth of lymphoid organs and leukocyte populations in immature male chickens. *Poult Sci* 1990;69(7):1094–102.
- [55] Mukhina S, Liu D, Guo K, Raccurt M, Borges-Bendris S, Mertani HC, et al. Autocrine growth hormone prevents lactogenic differentiation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology* 2006;147(4):1819–29.
- [56] Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, et al. High stromal and epithelial human GH gene expression is associated with proliferation disorders of the mammary gland. *J Endocrinol* 2002;175(2):307–18.
- [57] Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone expression in the perinatal and postnatal rat lung. *Dev Dyn* 2005;232(4):1037–46.