



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México



**EFFECTO NEURO-PROTECTOR DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO (GH) EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS
DE CEREBELO DE POLLO**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en ciencias
(Neurobiología)

Presenta

QFB Cinthya Córdoba Manilla

Director de Tesis

Dra. Maricela Luna Muñoz

Campus Juriquilla, Querétaro. Octubre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Cinthya Córdoba Manilla, cuyo título es: "Efecto neuro-protector de la hormona de crecimiento (GH) en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dra. Maricela Luna Muñoz

Vocal

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Suplente

Dr. Lenin Ochoa de la Paz

Suplente

Dra. Magdalena Giordano Noyola

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales Guzmán
Coordinador del Programa

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas dirigido por el Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, del Instituto de Neurobiología, y el apoyo financiero otorgado por PAPIIT-DGAPA, UNAM 210209, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) F1-60296, 118353 y becario No. 234456 (periodo 2009-2011).

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento a mi comité tutorial cuyas aportaciones enriquecieron este proyecto, apoyándome en mi formación académica y profesional.

Dra. Maricela Luna Muñoz
Dr. Lenin Ochoa de la Paz
Dra. Verónica Rodríguez Córdova

Agradezco también a cada uno de los integrantes de mi jurado de examen, quienes me ayudaron a lograr un mejor planteamiento de las ideas contenidas en esta tesis.

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dra. Maricela Luna Muñoz
Dra. María de la Luz Navarro Angulo
Dr. Lenin Ochoa de la Paz
Dra. Magda Giordano Noyola

A la técnico M en C Martha Carranza y a M en C Clara Alba quienes me enseñaron las técnicas y las bases para poder desarrollar este proyecto. A Gerardo Curtois por el apoyo brindado. Gracias.

Agradezco a MC Leonor Casanova de la Unidad de Posgrado por la atención y ayuda brindada en todos los trámites administrativos, a la técnico Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía por el apoyo brindado en el uso del microscopio confocal y a Román Pacheco por el excelente servicio que nos proporciona en la Biblioteca.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi familia, a mis padres Catarino y Elia, y a mis hermanos Jorge, Rubieth y Luz María, que me han apoyado en cada paso y han sido el motor que me ha permitido seguir adelante en todos mis proyectos.

A mis amigos y compañeros de clase: Adán, Daniela, Hugo, Sócrates, Ulises, Yunuen, Ernesto y Edna, con quienes he compartido momentos increíbles y llenos de risas, dentro y fuera del aula.

A mis compañeros de laboratorio: Clara, Marisela, Pepe, Carlos, José Luis y Candy, gracias a ustedes el laboratorio se convirtió en un lugar de diversión además de trabajo.

Finalmente a todos aquellos que de alguna forma estuvieron conmigo en este proceso, a mis amigos de toda la vida y a los que he tenido la fortuna de encontrar en mi camino, quienes aún estando lejos han logrado influir en mi vida siempre de forma positiva: Luis, Abraham, Adriana, Serafín, Laura, Julia, Minerva, Miriam, Rosario, Elvira, Claudia, Nahum, Caro, Paty, Fer, Naye y Farid.

Resumen

En el sistema nervioso central (SNC) de diversas especies se ha encontrado la presencia de hormona de crecimiento (GH), su ARNm y de su receptor (GHR), y se ha sugerido que puede ejercer un efecto neuro-protector. En el pollo, una de las estructuras del SNC con mayor expresión de GH es el cerebelo, una estructura altamente conservada en la filogenia y que es particularmente sensible a sufrir daño por isquemia. En este trabajo evaluamos el efecto anti-apoptótico de GH en un modelo de hipoxia-baja glucosa (HBG; 5% O₂, 1% glucosa) en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se observó que la estructura laminar de la corteza cerebelosa se conservó (capa molecular, Purkinje y granular) y que hay una co-localización de la inmunorreactividad a GH con NeuN en células granulares; con calbindina en células de Purkinje y en menor proporción con GFAP en astrocitos. La expresión de GH aumentó en condiciones de HBG en comparación con el grupo control de 311.3±43.8 a 596.6±70.8 ng/mg proteína, determinado por ELISA. Para evaluar el efecto anti-apoptótico de esta hormona se realizó el tratamiento con 1 y 10nM rcGH durante las condiciones de HBG y 24h posteriores de re-oxigenación. Se determinó la actividad de caspasa-3, como un marcador de la proporción de apoptosis, y se encontró un incremento en las condiciones de daño (11.6±2.1U/ml) con respecto al control (3.8±1.0 U/ml) la cual disminuyó significativamente con el tratamiento con rcGH (1nM, 6.0±0.1 U/ml). Además, se evaluaron mediante Western-blot dos proteínas de la familia Bcl-2 (Bax y Bcl-2), implicadas en la modulación de la permeabilidad en la membrana mitocondrial afectada por el daño HBG y se determinó que la proporción relativa Bax/Bcl-2 (control 67±19%) se ve afectada a favor de Bax en HBG (191±41%) y disminuye con el tratamiento de rcGH (1nM; 97±10%). En conclusión, el modelo de HBG utilizado afecta la permeabilidad mitocondrial, aumentando la relación Bax/Bcl-2, siendo la GH capaz de reducir esta proporción y como resultado esta hormona ejerce un efecto anti-apoptótico, determinado mediante la reducción de la actividad de caspasa-3.

Summary

The presence of GH, its mRNA and its receptor (GHR) has been confirmed in the central nervous system (CNS) of several species, and it has been proposed that this hormone exerts a neuro-protective effect. In the present study, we used the chicken cerebellum, a highly conserved structure in phylogeny which is particularly sensitive to damage by ischemia. We evaluated the anti-apoptotic effect of GH in a hypoxia-low glucose model (HLG; 5% O₂, 1% glucose) in organotypic cultures of chicken cerebellum. By Immunohistochemistry we showed that the laminar structure of the cerebellar cortex is preserved (molecular, Purkinje and granular layers) and there is a co-localization of GH immunoreactivity with NeuN in granular neurons, with calbindin in Purkinje cells, and to a less extent with GFAP in astrocytes. The expression of GH increased in HLG conditions compared with the control group from 311.3±43.8 to 596.6±70.8 ng/mg protein as determined by ELISA. To evaluate the anti-apoptotic effect of this hormone, we treated the culture with rcGH (1 or 10nM) during HLG conditions, and after 24h in conditions of re-oxygenation. We determined the activity of caspase-3 as a marker for apoptosis, and we found an increase under HLG conditions (11.6±2.1U/ml) compared to control conditions (3.8±1.0U/ml). The activity of caspase-3 decreased with rcGH treatment (1nM, 6.0±0.1 U/ml). We also evaluated, by Western-blot, two proteins from the Bcl-2 family (Bax and Bcl-2), involved in the modulation of mitochondrial membrane permeability that are affected by HLG damage. We found that the Bax/Bcl-2 ratio (control, 67±19%) augmented in HLG (191±41%) and decreased with rcGH (1nM; 97±10%). In conclusion, HLG conditions affect the mitochondrial permeability by increasing the Bax/Bcl-2 ratio, and GH can reduce this ratio and exert an anti-apoptotic effect, as determined by the decrement in caspase-3 activity.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
Ab	Anticuerpo
AMPA	Ácido <i>a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
CaBP	Calbindina
CCP	Capa de células de Purkinje
CG	Capa granular
cGH	Hormona de crecimiento de pollo
CM	Capa molecular
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
E	Días embrionarios
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFAP	<i>Proteína glial fibrilar acídica</i>
GH	Hormona de crecimiento
GH-IR	Hormona de crecimiento inmunorreactiva
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento
GHRP-6	Péptido liberador de GH 6
Glu	Glutamato
HBG	Hipoxia-baja glucosa
HI	Hipoxia isquémica
IGF-1	Factor de crecimiento insulinoide tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IP3K	Fosfatidil-inositol 3 cinasa
KPBS	Buffer de fosfatos salino con potasio
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
NeuN	Núcleo neuronal
NMDA	<i>N-metil-D-aspartato</i>

NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
OD	Densidad óptica
PBS	Buffer de fosfatos salino
PE	Post-eclosión
PI	Yoduro de propidio
PKC	Proteína cinasa C
rcGH	Hormona de crecimiento recombinante de pollo
rhGH	Hormona de crecimiento recombinante humana
RNS	Especies reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
rrGH	Hormona de crecimiento recombinante de rata
SB	Sustancia blanca
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGF β	Factor de crecimiento transformante tipo beta
TKPBS	Buffer de fosfatos salino con potasio y tritón
TPBS	Buffer de fosfatos salino con tritón

Índice

	pp
Resumen en español	III
Resumen en inglés (summary)	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	14
6. Materiales y métodos	15
7. Resultados	27
8. Discusión	41
9. Conclusiones	47
10. Literatura citada	49
11. Índice de Figuras	57
12. Abreviaturas	59

1. Introducción

La hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) es una proteína sintetizada y secretada principalmente por los somatotropos del lóbulo anterior de la hipófisis (Inzucchi & Robbins, 1993). Sus funciones se relacionan con la diferenciación y proliferación celular en los tejidos, así como con el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. En la actualidad se propone que la GH puede actuar de forma autócrina/parácrina, debido a que se ha localizado la presencia y expresión local tanto de la GH, como de su receptor (GHR) y su ARN mensajero en diferentes tejidos extra-hipofisarios: sistema inmune, sistema nervioso, y aparato reproductor de machos y hembras (Tresguerres *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000; Recher *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2004, 1998; Luna *et al.*, 2004, 2005; Hrabia *et al.*, 2008). En el sistema nervioso central (SNC) se ha descrito la presencia de GH, en diversas estructuras como: hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo de diferentes especies (Lobie *et al.*, 1993; Nyberg *et al.*, 2000; Ramesh *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2003). Se ha planteado que la GH puede estar implicada en procesos de neuro-protección (Scheepens *et al.*, 2001), sin embargo, hasta la fecha no se conoce por completo el mecanismo por el cual podría estar ejerciendo este efecto. En este trabajo estudiamos el efecto neuro-protector de la GH en cultivos organotípicos de cerebelo de pollos de 1 día post-eclosión (PE) sometidos a condiciones de hipoxia-baja glucosa (HBG). Se determinó mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) la presencia y distribución de la GH en los principales tipos celulares que conforman la corteza cerebelosa, y se cuantificó la cantidad de GH en los cultivos en las diferentes condiciones experimentales, así como también se evaluaron algunos marcadores de daño por apoptosis como son la actividad de caspasa-3, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax.

2. Antecedentes

2.1 Hormona de crecimiento

La GH o somatotropina es una proteína de naturaleza peptídica, sintetizada y liberada principalmente en la hipófisis anterior de todos los vertebrados así como también en la placenta de mamíferos (Harvey & Hull, 1997). Las funciones de esta hormona están íntimamente relacionadas con la diferenciación y proliferación celular en diferentes tejidos, además tiene efectos en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Estos efectos pueden ser llevados a cabo de manera directa, al interactuar con su receptor, o indirecta a través de mensajeros como el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I; Isaksson *et al.*, 1985).

La GH posee una estructura primaria de 191 aminoácidos (aa) y una masa molecular de 22 kDa, presenta 4 α -hélices y 2 puentes disulfuro que forman un asa grande central y un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal (Forsyth & Wallis, 2002). Se ha demostrado que existen variantes de GH originadas por diferentes mecanismos y/o modificaciones post-traduccionales como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación (Kopchick, 2003; Arámburo, 1991).

El GHR pertenece a la familia de receptores hematopoyetina/citocinas clase I y está conformado por tres dominios: extracelular, membranal e intracelular (Carter *et al.*, 1996). Debido a la naturaleza de sus funciones, se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los tejidos (Brooks *et al.*, 2008). El GHR se expresa como monómero en la superficie de la membrana celular, sin embargo, debe dimerizarse para desencadenar la transducción de señales al unirse con su ligando (Figura 1).

El primer paso en la transducción de señales de la GH consiste en la dimerización del GHR, inducida por la unión de la hormona en los sitios 1 y 2 de unión específicos al GHR, aunque se tiene evidencia de que el receptor también puede encontrarse en forma de dímero en ausencia de la GH (Brown *et al.*, 2005). Posteriormente ocurre una interacción entre las proteínas JAK2, acopladas a la región Box1 de cada una de las moléculas del receptor. Esta proximidad entre las JAKs lleva a la fosforilación mutua de residuos tirosina localizadas en el dominio cinasa de las mismas. Una vez activadas las

JAK2 fosforilan a su vez múltiples residuos tirosina presentes en el GHR, generando sitios de acoplamiento para otras moléculas que continúan la ruta de señalización como las STATs, que son activadas luego de la dimerización del GHR, principalmente STAT 5A y 5B (Brooks et., 2008).

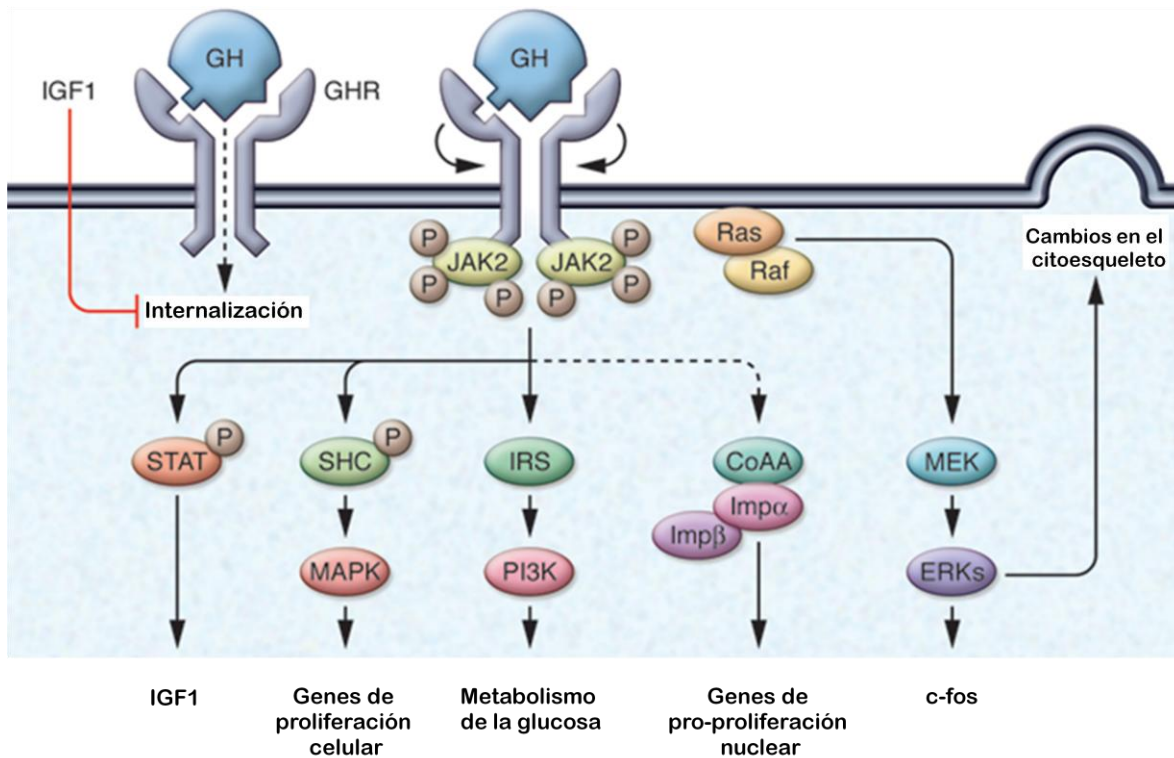


Figura 1. Unión de GH con su receptor. Una vez que se forma el complejo GHR-GH-GHR da lugar a la fosforilación de JAK2 (P) y la subsecuente transducción de señales. Los blancos de GH incluyen: IGF-1, c-fos, genes de proliferación celular, metabolismo de la glucosa y proteínas del citoesqueleto. La internalización y translocación de GHR (línea punteada) induce genes de pro-proliferación nuclear. (Modificado de Melmed, 2009).

La activación de las proteínas JAK2 activa al menos 3 vías de señalización: (1) la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); (2) la fosfatidil-inositol 3 cinasa (IP3K), y (3) la proteína cinasa C (PKC), todas importantes para los efectos metabólicos y proliferativos de la GH (Brooks et al., 2008).

Además de la forma clásica de producción y secreción de GH a través de los somatotropos de la hipófisis anterior, se ha observado la expresión de GH en diversos tejidos extrahipofisarios, por ejemplo: SNC, aparato reproductor masculino y femenino, tejidos del sistema inmune, sistema digestivo y sistema respiratorio (Harvey *et al.*, 2004; Hrabia *et al.*, 2008; Recher *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2004, 2005; Tresguerres *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Sin embargo, aún se desconoce si esta hormona producida localmente ejerce un efecto parácrino-autócrino y cómo está regulada la producción de GH en estos sitios extra-hipofisarios.

2.2 GH en el Sistema Nervioso Central

En el caso del SNC es controversial la capacidad de la GH para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y existen diferentes propuestas al respecto: (a) la GH puede liberar mediadores secundarios de tejidos periféricos (IGF-1) capaces de cruzar la BHE y actuar en el SNC (Coculescu *et al.*, 1999); (b) la GH es capaz de cruzar la BHE y tener efecto de forma directa, ya que se ha encontrado GH en diversas estructuras cerebrales como los plexos coroides, hipotálamo e hipocampo en humano y rata (Nyberg *et al.*, 2000); (c) la GH es sintetizada localmente en el SNC. Esta última propuesta se apoya en evidencia de la presencia del ARNm de GH y GHR en amígdala, cerebelo, bulbo olfatorio, hipotálamo e hipocampo en rata (Lobie *et al.*, 1993), y en corteza cerebral y cerebelo en embriones de pollo (Harvey *et al.*, 2003; Alba-Betancourt *et al.*, 2011; Tabla 1).

Estudios recientes indican que la GH de circulación sistémica puede cruzar la BHE y afectar las funciones del SNC, lo cual fue determinado mediante el marcaje radioactivo de GH administrada en ratas y ratones; se observó que existe un sistema de transporte específico mediante el cual una pequeña cantidad de GH llega al SNC (Pan *et al.*, 2005). En contraste con estos estudios, Hojvat *et al.* demostraron que no se ve afectada la inmunorreactividad a GH (GH-IR) en el cerebro de ratas ante la falta de aporte de GH vía sistémica y que la distribución de esta hormona no cambia en regiones como corteza, hipocampo y tálamo, además, se determinó que la GH-IR observada en el

cerebro tiene un peso molecular, afinidad inmunológica y efectos biológicos similares a la producida en la hipófisis (Hojvat *et al.*, 1982).

Tabla 1. Presencia de GH en diferentes estructuras cerebrales de diversas especies

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

Además de los efectos clásicos de regular el metabolismo y el crecimiento somático, la GH y el IGF-I tienen efectos en SNC como: la regulación del crecimiento, desarrollo y diferenciación neuronal y mielinización, además efectos neuro-protectores y de neuroplasticidad, participan en la modulación de la neurotransmisión y en la conducta (Ajo *et al.*, 2001; Scheepens *et al.*, 2005; Aberg *et al.*, 2006; Isgaard *et al.*, 2007), por lo anterior, no es de extrañar que se encuentre GH-IR en los diferentes tipos celulares del SNC como neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Lobie *et al.*, 1993).

Existe evidencia de que la GH estimula la proliferación y diferenciación de neuronas en embriones de rata, mediante la vía de MAP cinasas y ERK's, además se le atribuyen

efectos de neuro-protección en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Scheepens *et al.*, 1999, 2001, 2005; Isgaard *et al.*, 2007). Se ha observado que durante la recuperación de una lesión cerebral se producen factores de crecimiento, como el IGF-I, el factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF β) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), mostrando un mayor nivel de actividad en el cerebro en desarrollo que en uno de adulto (Nieto-Sampedro *et al.*, 1982). También se tiene evidencia de que estos factores de crecimiento muestran una mayor expresión en las células cercanas a la lesión cerebral, lo cual señala un sistema de neuro-protección endógena que facilita la recuperación (Hughes *et al.*, 1999). Diferentes estudios han demostrado que un tratamiento subsecuente a lesiones cerebrales con algunos de estos factores de crecimiento pueden rescatar a las neuronas dañadas (McNeill *et al.*, 1994; Gluckman *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1991).

Existen diferentes modelos experimentales que se utilizan para generar una aproximación de las condiciones de daño cerebral, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rodrigo *et al.*, 2005). Uno de los modelos más utilizados para el estudio de la neuro-protección es la hipoxia isquémica (HI; Vannucci, 1993). Un ejemplo de modelo *in vivo* es la oclusión de la arteria carótida de forma unilateral, con lo cual se obtiene un hemisferio cerebral dañado, mientras que el otro hemisferio puede utilizarse como control (Guan *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2004). *In vitro*, existen modelos de cultivos primarios o incluso rebanadas de tejido (400 μ m), que son sometidas a hipoxia de forma aguda, utilizando mezclas de gases de diferentes combinaciones y concentraciones, y analizadas mediante histología, pruebas bioquímicas, de biología molecular o electrofisiológicas (Barenberg *et al.*, 2001; Ludvigsen & Folkow, 2009). Un modelo *in vitro* que ofrece muchas ventajas son los cultivos organotípicos, ya que permiten realizar tratamientos agudos y crónicos debido a que pueden mantenerse las rebanadas de tejido durante varias semanas, pudiendo analizar los efectos de la HI desde niveles moleculares, celulares y electrofisiológicos (Gähwiler *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 2000).

2.3 Hipoxia-baja glucosa (HBG)

La glucosa es el principal sustrato energético en el cerebro, el cual presenta altos requerimientos energéticos y se encuentra en constante demanda metabólica, siendo todos los tipos celulares presentes en el cerebro dependientes de un metabolismo oxidativo.

Cuando se somete al tejido nervioso a condiciones de HBG, se desencadena una serie de eventos que inducen la muerte neuronal, involucrando procesos de necrosis y apoptosis. Esto se lleva a cabo en dos fases: una inmediata o muerte necrótica aguda, y una tardía o crónica (Martin *et al.*, 1998). En la Figura 2 se encuentran esquematizados los principales sucesos implicados en la muerte celular por isquemia.

La isquemia afecta la función mitocondrial, el transporte transmembranal, las defensas antioxidantes y la actividad enzimática, en proteínas como: lipasas, proteasas y endonucleasas, la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS14) y la inhibición de la actividad de la superóxido dismutasa (Jensen *et al.*, 2003; Warner *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2005).

El suceso determinante en una lesión cerebral es la depleción de ATP, lo cual afecta el funcionamiento de la ATPasa de Na⁺ y K⁺, comprometiendo los sistemas de transporte membranar y dando lugar a la acumulación de cationes dentro de la célula, especialmente Na⁺ y Ca²⁺. Por otro lado, la pérdida de los sustratos energéticos da como resultado una liberación excesiva de glutamato (Glu, aa excitatorio) debido al funcionamiento en reversa de sus sistemas de recaptura ocasionado por el mismo desbalance iónico. La acumulación extracelular de Glu conlleva a la activación de sus receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (Ácido *a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico*) que debido a su permeabilidad promueve un flujo excesivo del ión Ca²⁺, el cual desencadena la activación de fosfolipasas y proteasas que degradan las membranas y proteínas que son necesarias para mantener la integridad celular (Lo *et al.*, 2003).

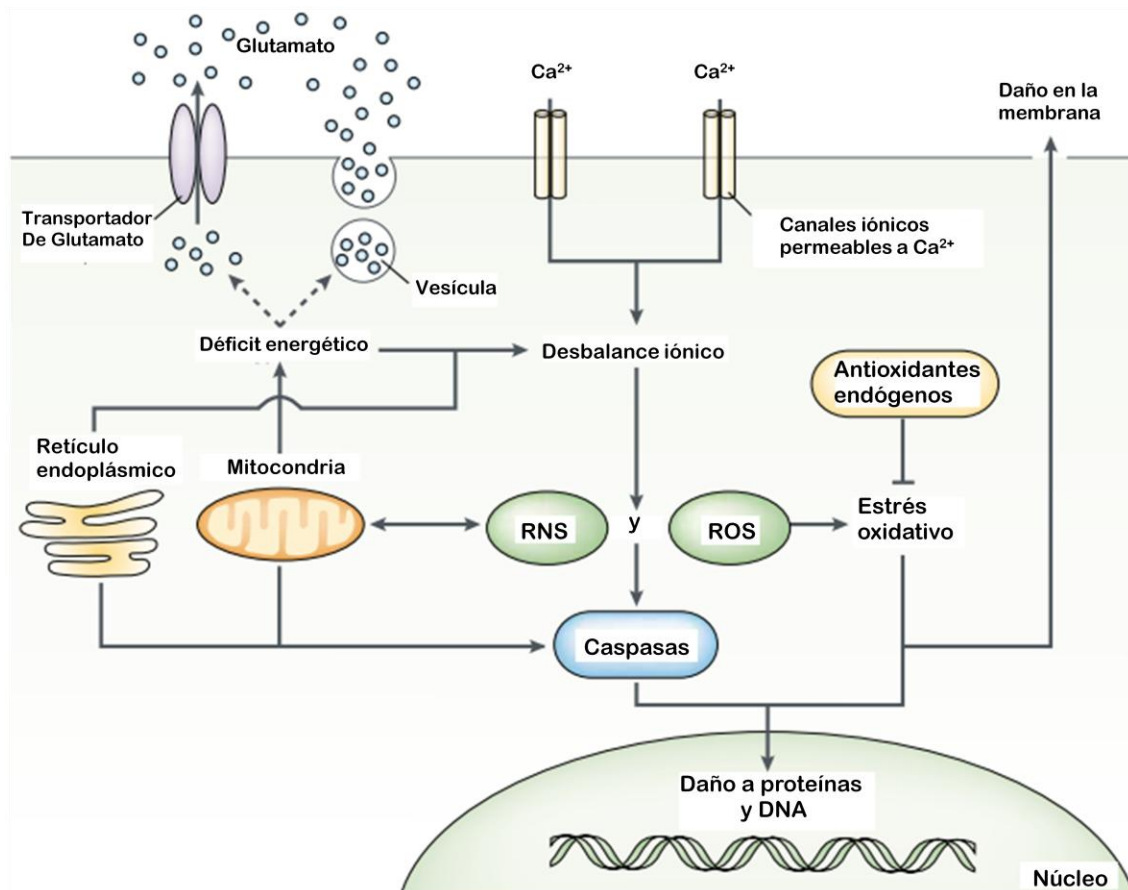


Figura 2. Principales vías implicadas en la muerte celular por isquemia: excitotoxicidad, desequilibrio iónico, estrés oxidativo y nitrosativo y mecanismos de tipo apoptótico. Existe una extensa interacción y superposición entre los múltiples mediadores de daño y muerte celular. La pérdida de los sustratos energéticos conduce a la disfunción mitocondrial y a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS). La deficiencia de energía lleva al desequilibrio de iones, liberación de glutamato a niveles excitotóxicos y un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} . El resultado de estos eventos incluye daño causado por radicales libres en la membrana lipídica, en proteínas celulares y DNA, así como la activación de proteasas activadas por Ca^{2+} y cascadas de caspasa. (Tomado de Lo et al., 2003).

Los astrocitos están implicados en los procesos de excitotoxicidad, debido a su capacidad para evitar la acumulación de Glu en el espacio sináptico, sin embargo, al no haber ATP disponible pierden la capacidad de recapturar este neurotransmisor, y debido al cambio en el gradiente iónico estos sistemas liberan el Glu al espacio extracelular, exacerbando el cuadro excitotóxico (Tan et al., 1996). Además, estas células también son capaces de reducir la acumulación de óxido nítrico (NO; Takuma et

al., 2004). Cuando el ATP baja en las neuronas aumenta la glicólisis y disminuye la actividad mitocondrial, potenciando los efectos pro-oxidantes.

Al verse afectada esta función de los astrocitos relacionada con la recaptura de Glu, nos damos cuenta de la compleja relación existente entre los diferentes tipos celulares presentes en el cerebro, en donde todos los tipos celulares, debido a sus requerimientos metabólicos, son susceptibles al daño por HBG y por consiguiente su sobrevivencia estará íntimamente ligada a la sobrevivencia de las células adyacentes con las que tiene conexión.

Las alteraciones que tienen lugar durante la hipoxia predisponen a la célula a un mayor daño durante la fase de re-oxigenación (Warner *et al.*, 2004), durante la cual el metabolismo anaeróbico del ATP produce una acumulación de purinas que serán el sustrato utilizado para la formación de radicales libres durante esta fase (Saugstad, 1996) por acción de la xantina oxidasa. Dependiendo de la severidad del daño serán activadas diferentes vías de señalización, las cuales llevarán a procesos tanto de apoptosis como de necrosis; en ambos casos la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial se ve involucrada (Fujimura *et al.*, 2000).

2.4 Apoptosis y efecto neuro-protector de la GH

La apoptosis o muerte celular programada es el resultado de una transducción de señales que involucran varias familias de proteínas altamente conservadas en la evolución. La morfología de las células apoptóticas incluye condensación nuclear y citoplásmica, rompimiento de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y mantenimiento de una membrana plasmática intacta (Fink & Cookson, 2005; Dikranian *et al.*, 2001). Los eventos apoptóticos incluyen la liberación de citocromo C mitocondrial y activación de caspasa-3. Como se mencionó anteriormente, la HBG causa una depleción del ATP, involucrando la vía intrínseca de la apoptosis (Figura 3), translocando el citocromo C hacia citosol, en donde interactúa con Apaf-1 y la deoxiadenosina trifosfato formando el apoptosoma, e induciendo la activación de caspasa-9, posteriormente de caspasa-3, seguida de caspasas 2, 6, 8 y 10 (Fujimura *et al.*, 2000).

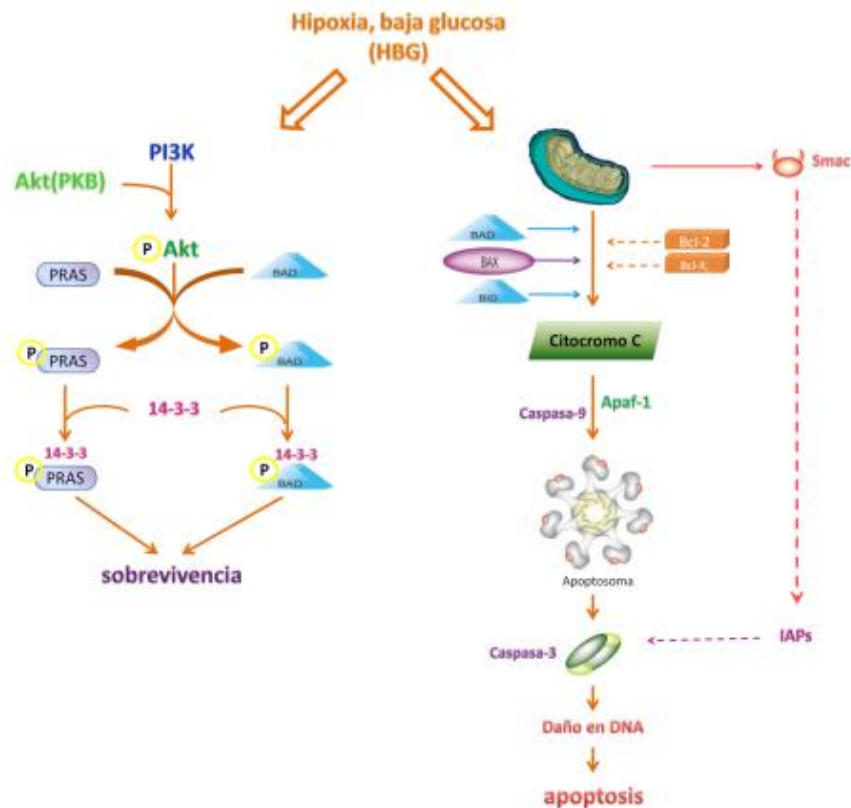


Figura 3: Señalización de supervivencia y muerte neuronal por apoptosis inducida por isquemia y mediada por la vía PI3K/Akt y por la vía intrínseca de la apoptosis (modificado de Chan, 2004).

Se conoce poco acerca del mecanismo de neuro-protección de la GH, por lo que se ha propuesto que ocurre mediante la inactivación de la vía de las caspasas, impidiendo que las células entren en un estado de apoptosis, y que esta inactivación es mediada por Bcl-2, una proteína anti-apoptótica (Tamatani *et al.*, 1998). Por otro lado, Shin *et al.* (2004) sugieren que el efecto protector de la GH se debe a la disminución de Bax y Bad (factores pro-apoptóticos), ya que no observaron cambios en la expresión de Bcl-2.

Un estudio realizado por Gustafson *et al.* (1999) se demostró que la administración de GH recombinante humana (rhGH), en dosis de 50 y 100 mg/kg aplicada de forma subcutánea en ratas neonatas sometidas a HI, confiere una neuro-protección moderada del 20%, aumentando la expresión del ARNm del GHR y del receptor a IGF-I posterior al tratamiento. Por otra parte, se tiene evidencia de la participación de la GH en el cerebro

de ratas juveniles sometidas a HI y tratadas con GH recombinante de rata (rrGH) por vía intracerebro-ventricular (una dosis de 20µg de rrGH), pues se observó un aumento en la GH-IR en diferentes áreas del cerebro, además incrementó la expresión de IGF-I, que previno la muerte neuronal demostrando un papel de neuro-protección del eje somatotrópico (Scheepens *et al.*, 2001).

En estudios de Frago *et al.* (2002) observaron un aumento del ARNm de IGF-I en hipotálamo, hipocampo y cerebelo, al administrar vía intravenosa durante 7 días una infusión de GH (100µg/d) o GHRP-6 (péptido liberador de GH 6; 150µg/d); en estas áreas se observó un incremento en la fosforilación de Akt y Bad, así como un incremento de Bcl-2; la conclusión de este trabajo indica que la GH y el GHRP-6 modulan la expresión de IGF-1 en el SNC de forma anatómico-específica, ya que en corteza no se observaron estos cambios. De esta forma se tiene evidencia de que el cerebelo es una estructura del SNC que responde ante un tratamiento con GH.

2.5 Cerebelo

La palabra cerebelo significa “cerebro pequeño” en latín y dentro de sus funciones se encuentran la coordinación de los movimientos voluntarios, el equilibrio y el tono muscular. El cerebelo, como el resto del SNC está formado por sustancia blanca y sustancia gris. El patrón de ramificación de la sustancia blanca se ha denominado “árbol de la vida” y las circunvoluciones corticales del cerebelo se conocen como folias u hojas (Carpenter, 1998). En el cerebelo de pollo existen folias de la I a la IX (Neudert & Redies, 2008).

La corteza cerebelosa está constituida por tres capas (Figura 4) que son: (1) capa molecular externa (CM), donde se encuentran las interneuronas en canasta y estrelladas; (2) capa media de células de Purkinje (CCP), como su nombre lo indica aquí se localizan los somas de las células de Purkinje que son neuronas de proyección y representan la única eferencia del cerebelo fuera del mismo; y por último (3) capa interna de células granulosas (CG), también de tipo interneurona (Carpenter, 1998).

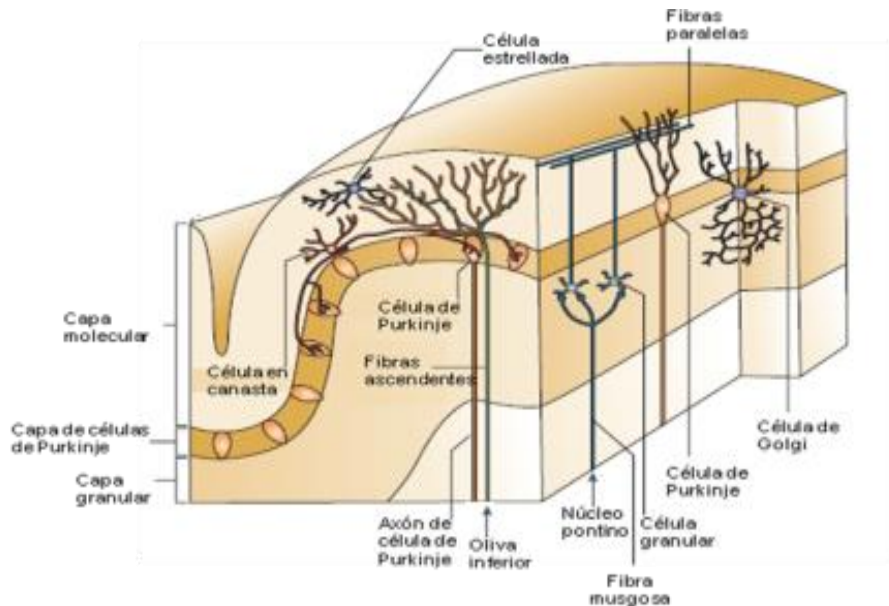


Figura 4. Arquitectura anatómica del cerebelo. Se observa la organización microestructural de la corteza cerebelosa, indicando las tres capas que la conforman así como los tipos celulares. (Modificado de Ramnani, 2006).

En el cerebelo de cerdos recién nacidos, Yue *et al.* (1997) encontraron que tras un daño de hipoxia, las células granulares mueren predominantemente por apoptosis mientras que las células de Purkinje muestran necrosis. Existen otros estudios donde se demuestra la muerte neuronal de células de Purkinje y células piramidales del hipocampo tanto por necrosis como por apoptosis (Sato *et al.*, 1990).

En nuestro laboratorio se han realizado estudios tanto *in vivo* (Ávila, 2009) como *in vitro* (Alba-Betancourt, tesis de doctorado), en los cuales se observó un efecto protector de la GH ante un daño por hipoxia. Los estudios *in vivo* se realizaron en un modelo de embriones de pollo de 15 y 18 días embrionarios (E), sometidos a hipoxia y se observó que los niveles de GH aumentaban con relación al grupo control. En tanto que los estudios *in vitro*, utilizando cultivos primarios neuronales de cerebelo de pollo, mostraron que el daño por HBG induce muerte neuronal por la vía apoptótica y que la adición de GH a estos cultivos tiene un efecto neuro-protector, por lo que se está estudiando la posible vía de señalización que participa en este rescate, a través de la inhibición de la actividad de caspasa-3 y la vía de PI3K (Figura 3).

3. Justificación

Las células de la corteza cerebelosa representan un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis y la neuro-protección por GH, debido a que son particularmente susceptibles a sufrir daño causado por HBG, como se mencionó anteriormente.

En particular, el cerebelo de las aves es comparable al de mamíferos tanto en histología como en el grado de diferenciación (Lee *et al.*, 2001). El cerebelo, además de ser una estructura altamente conservada filogenéticamente, es muy susceptible a sufrir daño por isquemia debido a que tiene una amplia presencia de receptores de Glu, razón por la cual es un blanco para procesos excitotóxicos.

Debido a que en el laboratorio se tienen antecedentes del efecto neuro-protector de la GH en cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo de pollo, además se tiene evidencia de que la concentración de GH endógena es relativamente alta en pollos 1PE (Alba-Betancourt *et al.*, 2011), por estos motivos nos interesó utilizar un modelo de cultivos organotípicos de esta estructura para el desarrollo de este proyecto. La utilización de los cultivos organotípicos nos permite conservar la citoarquitectura característica del cerebelo, mantener la conectividad neuronal, las interacciones glía-neurona y la estequiometría celular (Stoppini *et al.*, 1991; Vornov *et al.*, 1991; Gahwiler *et al.*, 1997), haciendo posible el análisis del efecto neuro-protector de la GH mediante la observación de los cambios morfológicos y de distribución de la inmunorreactividad en el tejido, así como la cuantificación de la concentración de GH local y de indicadores de apoptosis como son la actividad de Caspasa-3, la presencia de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la pro-apoptótica Bax.

4. Hipótesis:

La hormona de crecimiento tendrá un efecto neuro-protector en células de cerebelo en cultivos organotípicos posterior a un daño por hipoxia y baja glucosa.

5. Objetivo general:

Determinar si existe un efecto neuro-protector de la GH después de un daño de hipoxia y baja glucosa en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo.

5.1 Objetivos específicos:

1. Estandarizar los cultivos organotípicos de cerebelo de pollo de 1 día Post-eclosión.
2. Determinar la co-localización de la GH y marcadores celulares (NeuN, CaBP y GFAP) en el cerebelo mediante inmunohistoquímica.
3. Cuantificar la concentración de GH en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo en condiciones control y sometidos a hipoxia–baja glucosa.
4. Evaluar el efecto anti-apoptótico de la GH en cultivos organotípicos sometidos a hipoxia–baja glucosa.

6. Material y métodos:

6.1 Modelo experimental

Cultivos organotípicos de cerebelo de pollo 1PE.

Los huevos fértiles son incubados a 37°C, en condiciones de humedad, en una incubadora de huevos con movimiento (Incubadora automática, LAMEX S.A) hasta su eclosión.

6.2 Protocolo de cultivos organotípicos

Los cultivos organotípicos se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Stoppini *et al.* en 1991. La membrana (Millicell-CM low Height) es colocada en una caja de Petri de 35 mm que contiene 1 ml de medio de incubación MEM + Hepes (50% MEM, 0.4766 g Hepes, 25% suero de caballo inactivado, 25% solución de Hank, 6.5 mg/ml Glucosa y 1% penicilina/estreptomicina, pH 7.2)

Los animales son sacrificados por decapitación y los cerebelos son colectados de la cavidad craneal e inmediatamente lavados con medio de estabilización (50% MEM, 0.4766 g Hepes, 25% solución de Hank,, 6.5 mg/ml Glucosa. Posteriormente son colocados en la placa de teflón del cortador de tejido (McIlwain Tissue Chopper, modelo MTC/2). Se obtienen cortes sagitales de cerebelo de 300 o 400µm y estos son separados utilizando espátulas de madera bajo el microscopio estereoscópico en condiciones estériles, después son transferidas a las membranas, previamente preparadas en las cajas Petri, usando una pipeta Pasteur cuidando que el medio no cubra la membrana para que las rebanadas permanezcan expuestas al aire (Figura 5). En estas condiciones las rebanadas no se secan y la difusión a través de la membrana es suficiente para garantizar la sobrevivencia.

Las cajas Petri con las rebanadas se colocan en una incubadora a 37°C con una atmósfera de aire y 5% de CO₂ durante 14 días para su estabilización cambiando el medio cada 3 días. Las rebanadas se revisaron periódicamente mediante un microscopio de luz invertido para determinar que estuvieran en condiciones adecuadas

para ser sometidas a las condiciones experimentales, es decir, que el cultivo estuviera libre de bacterias y hongos.

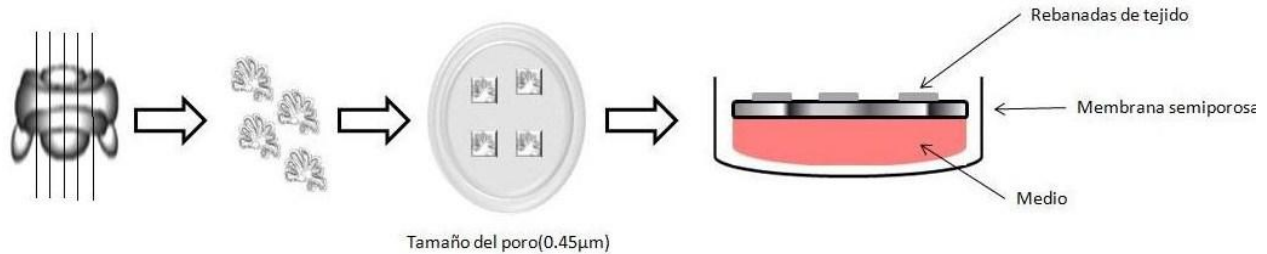


Figura 5. Esquema de la obtención de los cultivos organotípicos de cerebelo de pollo. Se realizan cortes sagitales, posteriormente se colocan en la membrana semipermeable que está sobre el medio de cultivo. Las rebanadas de tejido permanecen expuestas tanto al medio de cultivo como al aire.

6.3 Hipoxia y baja glucosa (HBG).

Las condiciones de HBG se logran utilizando un medio DMEM bajo en glucosa (1g/L) y una cámara hermética colocada en una incubadora a 37°C, dentro de la cual se inyecta durante 10 min una mezcla de gases que contiene 95% N₂ y 5% CO₂, logrando obtener una atmósfera con 5% de O₂, donde son mantenidos los cultivos por 1h, una vez transcurrido el tiempo se cambia el medio por MEM/Hepes y se mantienen 24h en la incubadora a 37°C en una atmósfera de aire y 5% de CO₂ para su re-oxigenación (Chung *et al.*, 2007). Posteriormente, el medio se retiró y las rebanadas se procesaron para su evaluación.

Para la realización de los tratamientos, se adicionó rcGH al medio tanto en el grupo control (o normoxia) como en el de HBG, en dos diferentes concentraciones, 1 o 10nM; el tratamiento se mantuvo durante la HBG y las 24h posteriores en medio MEM/Hepes en normoxia (aproximadamente 21% O₂), para después procesar los cultivos para las pruebas requeridas.

6.4 Inmunohistoquímica

Se realizaron técnicas de IHQ con doble marcaje para identificar núcleos neuronales utilizando GH&NeuN, para la identificación de células de Purkinje con GH&calbindina (CaBP) y para marcar células gliales usando GH&GFAP.

Se utilizaron como control cortes para-sagitales de 8 μ m de cerebelo de pollo 1PE incluidos en parafina y rebanadas de cerebelo (cultivos organotípicos) de 300 μ m.

Una vez transcurridos los 14 días de estabilización de los cultivos organotípicos, tanto en condiciones control como experimental (HBG), se fijan las rebanadas de 300 μ m con paraformaldehído al 4% para su posterior incubación con anticuerpos (Ab) monoclonales: α -NeuN, α -CaBP, α -GFAP y α - β -tubulina III; y policlonales: α -cGH (GH de pollo). Se utilizaron segundos Ab marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para el caso de los monoclonales o CY3 para el Ab policlonal. Se realizó un contraste con DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol), o TO-PRO 3 (monómero de cianina) para el marcaje de núcleos neuronales. Las preparaciones se observaron mediante microscopía de fluorescencia y confocal (microscopio Olympus 50 y un microscopio confocal LSM 510 Meta multifotónico de Carl Zeiss).

6.4.1 Inmunohistoquímica para GH&NeuN

El anticuerpo contra NeuN o Neuronal Nuclei, reconoce específicamente la proteína de unión al DNA, la cual se encuentra presente en la mayoría de los tipos neuronales de vertebrados tanto en SNC como sistema nervioso periférico (SNP); sin embargo, en el caso del cerebelo, las células de Purkinje no son reconocidas por este anticuerpo (Mullen *et al.*, 1992). En nuestro caso utilizamos este anticuerpo con la finalidad de localizar la inmunorreactividad de las neuronas granulares de la capa granular de la corteza cerebelosa.

Se fijaron las rebanadas con PFA 4% durante 4h a 4°C, los cortes fueron separados de la membrana y se lavaron 2 veces con PBS (buffer de fosfatos salino) durante 15 min. Se eliminaron las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% en PBS-tritón (TPBS) con metanol al 50% durante 1h, se lavaron con TPBS hasta eliminar burbujas. Se

bloquearon con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en TPBS durante 1h y se lavaron 3 veces con TPBS por 10 min. Se incubó el Ab primario α -NeuN (monoclonal, Chemicon) a una dilución 1:200 y α -GH (CAP-1 policlonal, hecho en conejo; Arámburo *et al.*, 1989) también 1:200 en TPBS con leche 1% y se dejaron incubando 24h, se lavaron 4 veces con TPBS. Se incubó el Ab secundario α -ratón hecho en cabra marcado con FITC (Bio-Rad) a una dilución 1:200 para NeuN y α -conejo hecho en cabra marcado con CY3 (Zymed; 1:4500) para GH en TPBS con leche 1% durante 2h, se lavaron 3 veces con TPBS durante 10 min y 2 veces 5 min con PBS. Para contrastar se utilizó DAPI o TO-PRO 3 durante 30 min y se lavaron 3 veces con PBS.

6.4.2 Inmunohistoquímica para GH&GFAP

Para determinar si las células gliales son positivas a GH, específicamente los astrocitos, se realizó un doble marcaje utilizando el Ab α -GH y el anticuerpo α -GFAP (Glial fibrillary acidic protein). Esta proteína es un filamento intermedio clase-III, el principal constituyente de los filamentos intermedios en astrocitos con lo cual se pueden distinguir de otras células gliales y de neuronas durante el desarrollo del SNC (Dahl & Bignami, 1973). En el cerebelo de las aves, la principal proteína que constituye el citoesqueleto de la glía de Bergmann es la vimentina, en comparación con los mamíferos en los cuales la vimentina caracteriza a la astrogía inmadura, siendo GFAP la proteína encontrada en la glía madura (Ajtai & Kálmán, 1998). Sin embargo, cuando existen lesiones en el SNC en un modelo de pollo, se ha encontrado astrogía positiva a GFAP localizada en el sitio de lesión, razón por la cual hemos decidido utilizar este marcador en nuestro modelo (Ajtai & Kálmán, 1998).

Se fijaron las rebanadas con PFA 4% durante 4h a 4°C, se separaron los cortes de la membrana y se lavaron 2 veces con KPBS (buffer de fosfatos salino con potasio) durante 15 min. Se eliminaron las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% en KPBS-tritón (TKPBS) con metanol al 50% durante 1h, se lavaron con TKPBS hasta eliminar burbujas. Se bloquearon con leche al 5% en TKPBS durante 1h y se lavaron 3 veces con TKPBS por 10 min. Se incubó el Ab primario α -GFAP (monoclonal, Chemicon) a una dilución 1:500 y α -GH (CAP-1 policlonal) con una dilución 1:200 en KPBS + NRS al

2% + leche 1% y deja incubando 48h, se lavaron 4 veces con TKPBS. Se incubó el Ab secundario α -ratón con FITC (1:200) para GFAP y α -conejo con CY3 (1:4500) para GH en TKPBS con leche 1% durante 2h, se lavaron 3 veces con TKPBS durante 10 min y 2 veces 5 min con KPBS. Finalmente se utilizó DAPI o TO-PRO 3 para contrastar núcleos durante 30 min y se lavaron 3 veces con KPBS.

6.4.3 Inmunohistoquímica para CaBP&GH

Las células de Purkinje son las neuronas más representativas de la corteza cerebelar, sin embargo, no son reactivas al anticuerpo que marca núcleos neuronales (NeuN), por lo que se decidió utilizar una proteína de unión a Calcio (CaBP) que se encuentra tanto en el soma como en el árbol dendrítico (Rogers, 1989), para identificar a estas neuronas.

Se fijaron las rebanadas con PFA 4% durante 4h a 4°C, se separaron los cortes de la membrana y se lavaron 2 veces con PBS- CaCl₂ durante 15 min. Se eliminaron las peroxidases endógenas con H₂O₂ al 3% en TPBS- CaCl₂ con metanol al 50% durante 1h, se lavaron con TPBS- CaCl₂ hasta eliminar burbujas. Se desenmascararon epítopes al incubar durante 15 min en buffer de ácido cítrico pH 6.0 en baño María 80 °C, se lavaron 2 veces con TPBS- CaCl₂ durante 10 min. Se bloquearon con leche al 5% en TPBS- CaCl₂ durante 1h y se lavaron 3 veces con TPBS- CaCl₂ por 10 min. Se incubó el Ab primario α -CaBP-D-28K (monoclonal, Sigma) a una dilución 1:50 y α -GH (CAP-1 policlonal) con una concentración 1:200 en TPBS- CaCl₂ + leche 1% y se dejó incubando 24h, se lavó 4 veces con TPBS- CaCl₂. Se incubó el Ab secundario 1:200 α -ratón con FITC para CaBP y α -conejo con CY3 para GH en TPBS- CaCl₂ con leche 1% durante 2h, se lavaron 3 veces con TPBS- CaCl₂ durante 10 min y 2 veces 5 min con PBS-CaCl₂. Se utilizó finalmente DAPI o TO-PRO 3 durante 30 min y se lavaron 3 veces con PBS- CaCl₂.

6.4.4 Inmunohistoquímica para β -tubulina III

La β -tubulina III es una proteína expresada en neuronas del SNC y SNP, que contribuye a la estabilidad de los microtúbulos en los somas neuronales, y en los axones, además participa en el transporte axonal. Este anticuerpo es específico de neuronas ya que no reconoce la β -tubulina encontrada en la glía. En este proyecto decidimos utilizar a esta proteína para identificar cuerpos neuronales en el ensayo con yoduro de propidio (PI). El PI es una sustancia química capaz de unirse al DNA al intercalarse entre las bases, con poca o nula preferencia por la secuencia de las mismas, un marcaje por cada 4-5 pares de bases de DNA. El PI también es capaz de unirse al RNA. Una vez que se une al material genético es capaz de emitir fluorescencia alrededor de los 595 nm. Por lo general las membranas celulares son impermeables al PI o es excluido de forma exitosa por las células viables, sin embargo, cuando la membrana está dañada es capaz de unirse al DNA y RNA, por lo que es comúnmente utilizado para identificar células muertas en una población (Brana *et al.*, 2002; Riley *et al.*, 2006).

Una vez que el grupo experimental fue sometido a las condiciones de HBG y posterior a las 24 en normoxia, se añadió al medio MEM/Hepes el PI, en una concentración de 2 μ g/ml durante 30 min y se lavó con TPBS durante 15 min, posteriormente se fijaron las rebanadas con PFA 4% durante 4h a 4°C, se separaron los cortes de la membrana y se lavaron 2 veces con PBS durante 15 min. Se eliminaron las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% en TPBS con metanol al 50% durante 1h, se lavaron con TPBS hasta eliminar burbujas. Se bloquearon con leche al 5% en TPBS durante 1h y se lavaron 3 veces con TPBS por 10 min. Se incubó el Ab primario α - β -tubulina III (monoclonal, Abcam) a una dilución 1:200 en TPBS con leche 1% y dejó incubando 24h, se lavaron 4 veces con TPBS. Se incubó el Ab secundario α -ratón con FITC (1:200) en TPBS con leche 1% durante 2h, se lavaron 3 veces con TPBS durante 10 min y 2 veces 5 min con PBS. Para contrastar se utilizó TO-PRO 3 o DAPI durante 30 min y se lavo 3 veces con PBS.

6.5 Condensación de material genético por TUNEL, fluorescencia.

El ensayo de TUNEL (por sus siglas en inglés para Terminal Deoxy-nucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) detecta fragmentación del DNA y consiste en la incorporación de las bases análogas dUTPs marcadas con fluoresceína (FITC) a las partes terminales 3'-OH del DNA. Cuando el DNA se fragmenta como parte de un proceso apoptótico, quedan expuestos un mayor número de regiones terminales 3'-OH del DNA. Una vez que se incorpora el BrdU al DNA, éste puede ser detectado mediante un anticuerpo α -BrdU usando técnicas comunes de inmunohistoquímica siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando se han obtenido los grupos experimentales, las rebanadas se fijan con PFA 4% durante 4h a 4°C, se separan los cortes de la membrana y se lavan 2 veces con PBS durante 15 min. Inmediatamente después se incubaron con proteinasa K (solución de trabajo 10µg/ml en 10mM de Tris/HCl pH 7.4) por 15 min a temperatura ambiente (de 21 a 37°C) en una cámara húmeda para permeabilizar y después de la etapa de permeabilización fueron lavadas tres veces con PBS.

Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó el kit para detección de muerte celular POD *in situ* de ROCHE (No. de Cat. 11684795910) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de la manera siguiente: A cada cubreobjetos con 3 rebanadas de los diferentes grupos se le agregaron 50µl de la mezcla de TUNEL (50µl de la solución con TdT en 450µl de la solución con los dUTPs) y se cubrieron con cuadros de parafilm. Se realizó una incubación de 1h a 37 °C en una cámara húmeda, después de la incubación se realizaron tres lavados con PBS.

Para tener una mejor observación de las células con marcaje del TUNEL, se realizó de igual manera la tinción con DAPI o TO-PRO 3 y las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 min, después de este tiempo se descarta la solución, se lavan 2 veces con PBS, finalmente los cultivos fueron observados en el microscopio.

6.6 Ensayos bioquímicos

6.6.1 Homogenización del tejido

Para la realización de ensayos bioquímicos se hicieron *pools* de 12 rebanadas y se agregaron 100µl de amortiguador de lisis (HEPES/NaOH 10mM pH 7.4, EDTA 2mM, DTT 1mM e inhibidores de proteasas), se homogenizaron las muestras con un pistilo de plástico (Micro tissue grinder, Wheaton) y se realizó la extracción con agitación durante 2h a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 10,000 RPM durante 20 min (centrífuga SORVALL RMC 14 rotor FAMicro/1.5ml) a una temperatura de 4°C, el sobrenadante fue colectado para cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.6.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford

Se prepara la curva patrón por duplicado con una proteína estándar (albúmina sérica bovina) utilizando 5 concentraciones de proteína (1-20µg de proteínas) en un volumen de 800 µl de agua desionizada y adicionando 200 µl del reactivo de Bradford, en el caso de las muestras se utilizan alícuotas de 2µl. La curva estándar y las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 20 min y posteriormente se lee su densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro (Beckman DU 640).

6.6.3 Cuantificación de GH por ELISA

La cuantificación de la cGH total en las rebanadas de cultivos organotípicos se realizó mediante un ELISA indirecto por competencia (Martínez-Coria *et al.*, 2002). Las placas de inmunoanálisis de 96 pozos se forraron con una solución de rcGH (GH recombinante de pollo) 12ng/pozo. Simultáneamente las muestras y las diluciones del estándar para la curva patrón se incubaron con el Ab policlonal contra cGH CAP1 en una dilución final de 1:100,000 en TPBS + leche al 1% durante 16h a 4°C.

Las placas se lavaron con TPBS 5 veces y se bloquearon para evitar unión inespecífica con leche descremada al 3% en PBS por 1h. La placa se lavó 5 veces con TPBS y se le

agregó la mezcla incubada previamente con el primer Ab a la placa y se incubó durante 2h.

Después de lavar se le adicionó la solución con el Ab secundario unido a peroxidasa de rábano a una dilución de 1:3000 (100ul por pozo), se incubó durante 2h y se reveló con una solución del sustrato (ABTS en buffer dilución 1:10; sustrato 2.1mg/ml; Roche No. de cat. 11204521001) durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se cuantificó el desarrollo de color en un lector de placas (Bio-Rad, Microplate Reader modelo 3550-UV) a una longitud de onda de 405 nm.

Este ensayo tiene una sensibilidad de 2ng/pozo (20ng/ml) y un coeficiente de variabilidad intra e interensayo menor al 5% (Martínez-Coria *et al.*, 2002).

6.6.4 Ensayo de caspasa-3

- Preparación de las muestras de los cultivos primarios

Las rebanadas obtenidas de los cultivos organotípicos fueron suspendidas en 100ul de amortiguador de lisis (HEPES/NaOH 10mM pH 7.4, EDTA 2mM, DTT 1mM, e inhibidores de proteasas). Posteriormente las células se lisaron por sonicación (sonicador, Fisher FSH9) durante 5 min y luego homogeneizadas con pistilo de plástico (Micro tissue grinder Wheaton) y centrifugadas a 12000 RPM (centrifuga SORVALL RMC 14 rotor FAMicro/1.5ml) a temperatura ambiente, el sobrenadante fue colectado para cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford descrito previamente.

- Cuantificación de la actividad de caspasa-3

Para realizar la cuantificación de la actividad de caspasa-3 se utiliza un ensayo colorimétrico comercial específico para esta caspasa (Caspase-3 Colorimetric Assay Kit de Assay Designs No. de cat. 907-013). La caspasa-3 es una cisteín-proteasa intracelular que existe como pro-enzima y que se activa durante la secuencia de eventos asociados a la apoptosis. El principio del ensayo involucra la conversión de un sustrato cromogénico específico para caspasa-3, seguido de su detección por colorimetría a 405nm.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, en la placa de 96 pozos (incluida en el estuche) se colocaron 50 μ l de amortiguador activo de reacción de caspasa-3 (amortiguador de reacción de caspasa-3 y dithiothreitol) en los pozos blanco. En dos pozos de la placa se colocaron 125 μ l de calibrador de p-nitroanilina (Solución de p-nitroanilina 50 μ M en amortiguador de reacción de caspasa-3). Para hacer los estándares se utilizaron 4 tubos donde se colocaron 125 μ l del amortiguador de reacción activo de caspasa-3. Se reconstituyó el vial del estándar de caspasa-3 con el amortiguador de reacción activo de caspasa-3 (el vial se toma como tubo 1). Se tomaron 125 μ l del tubo 1 se pasaron al tubo 2, se mezclaron y se continúa con diluciones seriadas hasta el tubo 5. Una vez hechos los estándares se pipetearon 50 μ l de cada tubo por duplicado en cada pozo de la placa. Después de colocar los estándares se colocaron 50 μ l de las muestras y en todos los pozos se pipetearon (excepto en los pozos con pNA) 75 μ l del substrato de caspasa (incluido en el estuche), se mezclaron suavemente, se cubrió la placa y se incubó por 3h a 37°C. Para detener la reacción se colocaron 10 μ l de la solución de bloqueo del estuche en cada pozo y se lee en el lector de ELISA (Bio-Rad 3550-UV) con 405nm de longitud de onda.

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

- Factor de conversión (OD/unidades) = Promedio de la densidad óptica neta del pNA/34.72 unidades
- Actividad (unidades/ml) = Promedio de la densidad óptica neta de los estándares/0.05ml/Factor de conversión
- Para determinar los valores de las muestras se grafican los valores de los estándares y se interpolan en la recta.

6.6.5 Evaluación de la expresión de Bcl-2

Una vía involucrada en la sobrevivencia de las células depende de miembros de la familia de Bcl-2 (Burlacu, 2003). Se evaluó la expresión de Bcl-2 mediante Western-blot utilizando un Ab policlonal (Santa Cruz, CA) en los homogenados de cultivos organotípicos de cerebelo, tanto del grupo control, como del grupo de HBG y tratados con GH (Costoya *et al.*, 1999).

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras con un gel de poliacrilamida al 12.5%. Se corrieron las muestras obtenidas de los cultivos organotípicos, de 70 a 90µg de proteína total (determinada por el método de Bradford) en 20µl de buffer reductor (5%p/v 2-mercaptoetanol) y los marcadores de peso molecular (8µl; Rainbow molecular weight markers). El gel se equilibró con amortiguador de transferencia (TRIS 25 mM, Gly 192 mM, Metanol 20 %, aprox. pH 8.3) 10 min. Al mismo tiempo se equilibraron las membranas (nitrocelulosa), el papel filtro y las fibras en amortiguador de transferencia.

Se realizó la transferencia de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa, a 200mA (corriente constante) durante 1h, en agitación constante. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% (Bio-Rad) en TBS (30nM Tris, 500nM NaCl, pH 7.5) durante 2h a temperatura ambiente y en agitación, se lavaron con TTBS (TBS + Tween-20 0.05%) 3 veces por 10 min e incubaron con el primer Ab α-Bcl-2 con una dilución 1:750 durante toda la noche. Se lavaron con TTBS 3 veces por 10 min cada vez y se incubó con el Ab secundario (anti IgG de ratón conjugado con HRP) dilución 1:1000 durante 2h en agitación, nuevamente se lavaron 3 veces con TTBS y dos con TBS, por 10 min cada vez y se procedió a revelarlas utilizando un sustrato quimioluminiscente (ECL; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) y se expusieron en películas Kodak Biomax ML film.

Control de cargado: Para detectar la presencia de actina en las mismas membranas se lavaron 3 veces por 15 min con TBS y se incubaron en el buffer de stripping (100mM 2-mercaptoetanol + 10% SDS + 62.5mM TRIS-HCl pH 6.7) durante 45 min entre 70 y 80°C en baño maría con agitación constante, transcurrido este tiempo se lavaron las membranas 3 veces por 15 min con TTBS y se procedió a realizar el bloqueo con leche al 5% en TTBS por 2h, nuevamente hicieron 3 lavados (15 min cada uno) con TTBS.

Las membranas se incubaron con el primer Ab α -actina hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology) con una dilución 1:3000 durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron las membranas con TTBS 3 veces por 10 min cada vez y se incubaron con el Ab secundario (anti IgG de cabra y conjugado con HRP) dilución 1:3000 durante 2h en agitación constante. De nueva cuenta las membranas fueron lavadas 3 veces con TTBS y dos con TBS, por 10 min cada vez y se procedió a revelarlas utilizando el sustrato quimioluminiscente y se expusieron en las placas fotográficas.

Se realizó el análisis de los pesos moleculares de las bandas de los luminogramas después de ser escaneados mediante el programa IPLab-GEL.

6.6.6 Evaluación de la expresión de Bax

Otra vía miembro de la familia de Bcl-2 que fue evaluado es Bax, mediante Western-blot. Se siguió el mismo procedimiento descrito con Bcl-2 para evaluar la expresión de esta proteína, en este caso utilizando un Ab policlonal hecho en conejo a una dilución de 1:300 (Santa Cruz biotechnology). El Ab secundario utilizado fue α -IgG de conejo hecho en cabra y conjugado con HRP en una dilución 1:1000 El control de cargado en este caso también fue Actina y el análisis de las bandas de los luminogramas analizados con IPLab-GEL.

6.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante una prueba U de Mann-Whitney para determinar la diferencia entre los diferentes grupos experimentales. Se utilizó el programa Graph-Pad Prism 4.0.

7. Resultados

7.1 Objetivo 1: Estandarización de los cultivos organotípicos de cerebelo de pollo 1 PE.

Estudios previos de cultivos organotípicos de cerebelo de pollo de diferentes edades: en etapas embrionarias (15 y 18 E) y post-eclosión (1 y 5PE) permitieron determinar que la mejor edad era 1PE debido a que los cultivos se preservaron con una mejor citoarquitectura, mostrando un mantenimiento de las folias y las capas de la corteza cerebelosa al observarse bajo el microscopio estereoscópico (Figura 6) .

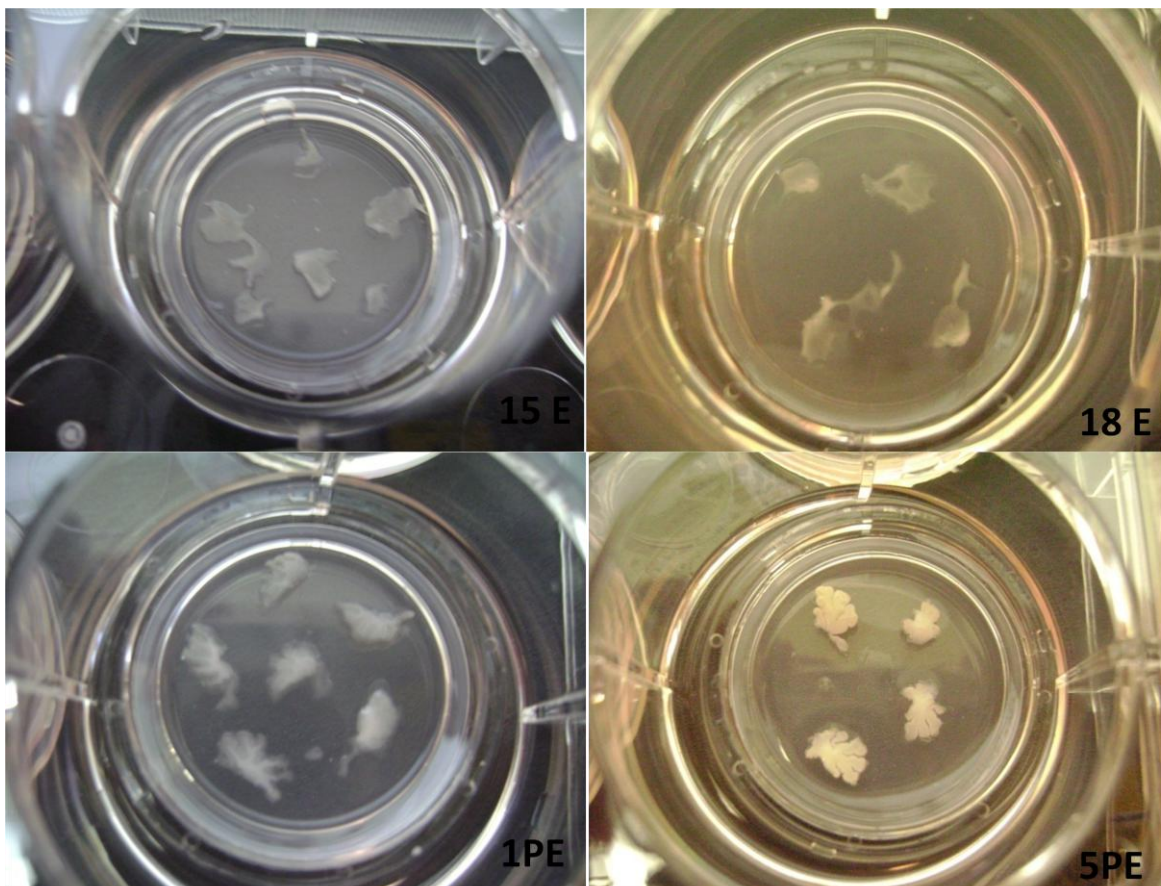


Figura 6. Cultivos organotípicos de cerebelo de pollo en diferentes edades: 15 y 18 días embrionarios, 1 y 5 días post-eclosión.

Como se observa en la Figura 6, en edades embrionarias los cortes sufren desdiferenciación en tanto que en el caso de los de 5 días sufrieron necrosis por lo que

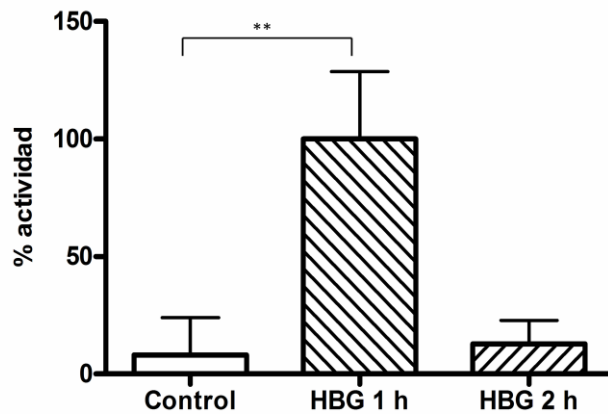
se estableció que las condiciones óptimas para los cultivos organotípicos de cerebelo de pollo fueron de 1PE. Se determinó un grosor de 300 μ m para los cortes utilizados en histología, con la finalidad de obtener una mejor penetración del láser al capturar las imágenes. En el caso de los ensayos bioquímicos los cortes utilizados tuvieron un grosor de 400 μ m.

Se colocaron de 4 a 5 cortes por membrana en un medio de incubación MEM/Hepes (Figura 7), con el fin de mantener las rebanadas separadas unas de otras y con espacio suficiente para la perfusión del medio a través de la membrana.



Figura 7. Imágenes representativas de cultivos organotípicos de cerebelo de pollo 1PE después de dos semanas de estabilización.

Para establecer las condiciones experimentales de daño por HBG se probaron diferentes tiempos de incubación (1 y 2 h). Se observó que con 1h de incubación bajo estas condiciones se podía inducir el daño celular que lleva a procesos de apoptosis, lo cual fue determinado mediante el ensayo de casapasa-3 (Figura 8) al encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el de HBG 1h.



*Figura 8. Actividad de caspasa-3 en porcentaje, determinada en cultivos organotípicos bajo condiciones control e HBG 1 y 2 h. Cada barra representa la media \pm DE n=3 ** p <0.01.*

Se puede apreciar en la gráfica anterior que la actividad de caspasa-3 aumenta significativamente en condiciones de HBG 1h con respecto al grupo control, sin embargo, cuando las condiciones de daño persisten por más tiempo, la actividad de esta proteasa se ve notablemente disminuida debido posiblemente a que las células entran en necrosis.

7.2 Objetivo 2: Determinación del tipo celular que expresa GH en el cerebelo.

La corteza cerebelosa posee una estructura de tres capas en la cual se encuentran relativamente pocos tipos celulares con características muy particulares. Para determinar la presencia de los tres principales tipos celulares característicos del cerebelo (células de Purkinje, células granulares y glía), se realizaron técnicas de IHQ con doble marcaje en los cultivos organotípicos, determinando la presencia de inmunorreactividad a GH&GFAP para la observación de glía (astrocitos), GH&NeuN para observar neuronas granulares y GH&CaBP para el inmunomarcaje de las células de Purkinje, las más características del cerebelo.

Para identificar la citoarquitectura de las capas de la corteza cerebelosa y comparar con las rebanadas de organotípicos, se realizó inmunomarcaje con GH&CaBP en cortes de cerebelo de 8 μ m.

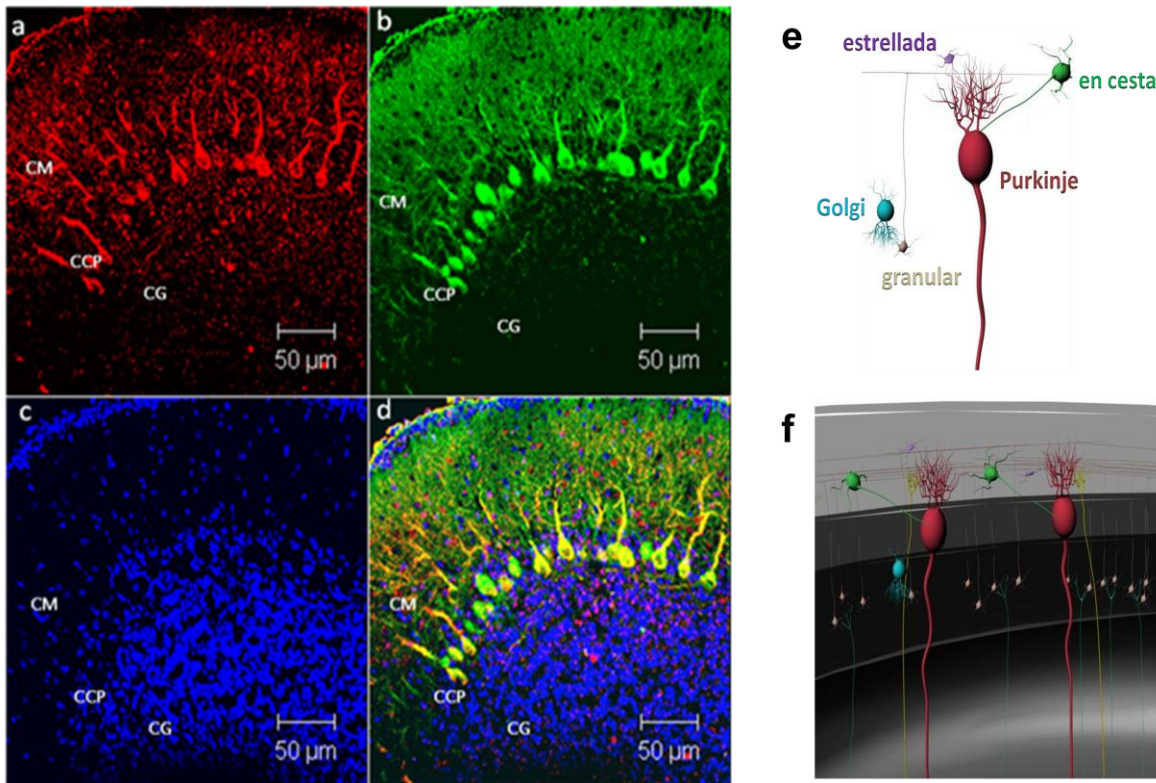


Figura 9. Microfotografías representativas del doble inmunomarcaje GH&CaBP en cortes parasagittales de cerebelo de pollo 1PE. a) se observa GH-IR (rojo) en la CCP. b) inmunomarcaje con CaBP (verde) para la observación de las células de Purkinje. c) marca de núcleos celulares con DAPI (azul). d) co-localización (amarillo) del marcaje de los anticuerpos GH y CaBP. En e y f se muestra un esquema de los tipos celulares presentes en la corteza cerebelosa. La barra representa 50 μ m.

En la Figura 9 se muestra el doble marcaje GH&CaBP, en cortes parasagittales de cerebelo de pollo 1PE, donde se observa la marca positiva de GH (rojo) en los somas de células de Purkinje, así como en sus árboles dendríticos en co-localización con la marca de CaBP.

Las Figuras 10, 11 y 12 muestran dobles marcajes: GH&NeuN, GH&GFAP y GH&CaBP en cultivos organotípicos para los grupos control e HBG. En estas figuras es posible

observar que la citoarquitectura laminar del cerebelo se mantiene en gran medida en los cortes de los organotípicos.

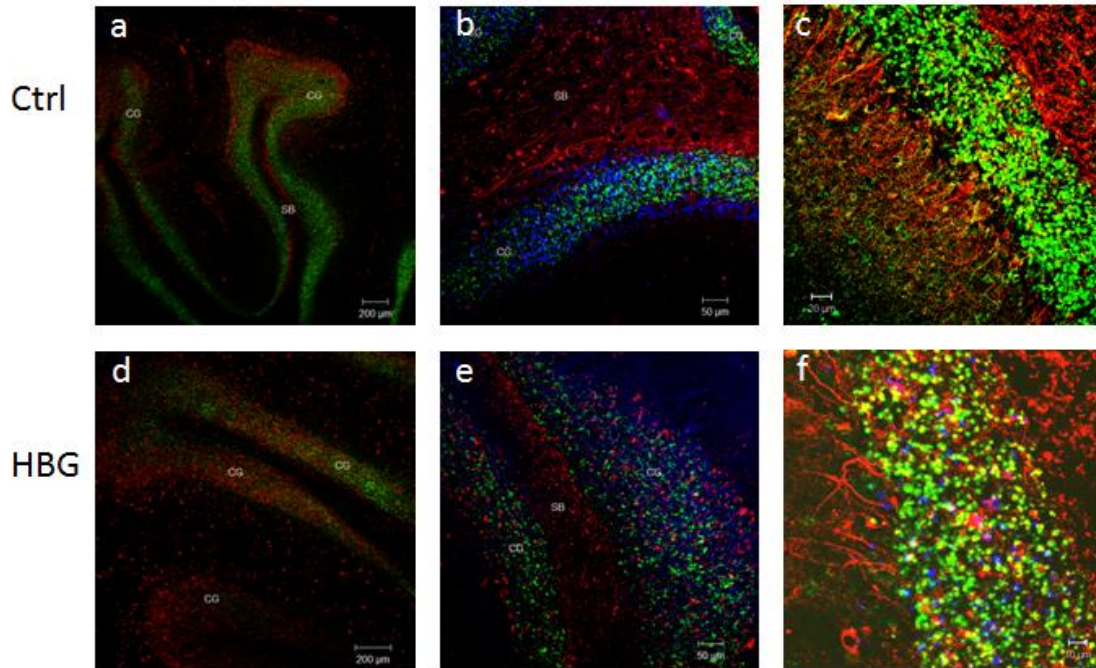


Figura 10. Microfotografías representativas del doble inmunomarcaje GH&NeuN en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo 1PE, para el grupo control (a, b y c) y el grupo HBG (d, e y f). Se observa GH-IR (rojo) en la CG así como en la SB y en algunos campos en la CCP. El Inmunomarcaje con NeuN (verde) para la observación de las neuronas granulares se observa delimitado. En azul se observa la marca de núcleos celulares con DAPI. Co-localización del marcaje de los anticuerpos GH y NeuN en amarillo. La barra representa 200 μ m; en b y e, 50 μ m; en c y f, 20 μ m.

En la Figura 10 se observa la co-localización (amarillo) de GH con el Ab α -NeuN, que marca los núcleos neuronales (verde), se puede apreciar que la capa de neuronas granulares (CG) mantiene su estructura delimitada; la marca de GH (rojo) puede observarse con amplia distribución en el corte, tanto en la sustancia blanca (SB) como en las capas de la corteza cerebelosa.

La mayor diferencia apreciada entre las diferentes condiciones es el marcaje de GH, ya que su distribución se observa en las diferentes capas de la corteza cerebelosa y

núcleos profundos. En cuanto a la citoarquitectura, no se observan muchas diferencias entre los grupos control e HBG, en ambos se mantiene la capa granular delimitada.

En la Figura 11 se muestra el inmunomarcaje de GH&GFAP. La inmunorreactividad positiva a GFAP (verde) se observa en áreas de la CG y mayoritariamente en la SB, mientras que la GH (rojo) se aprecia con una amplia distribución en las tres capas de la corteza cerebelosa y en la SB. En este modelo los astrocitos no parecen estar expresando GH ya que se observan muy pocas células donde co-localizan ambos marcadores (amarillo).

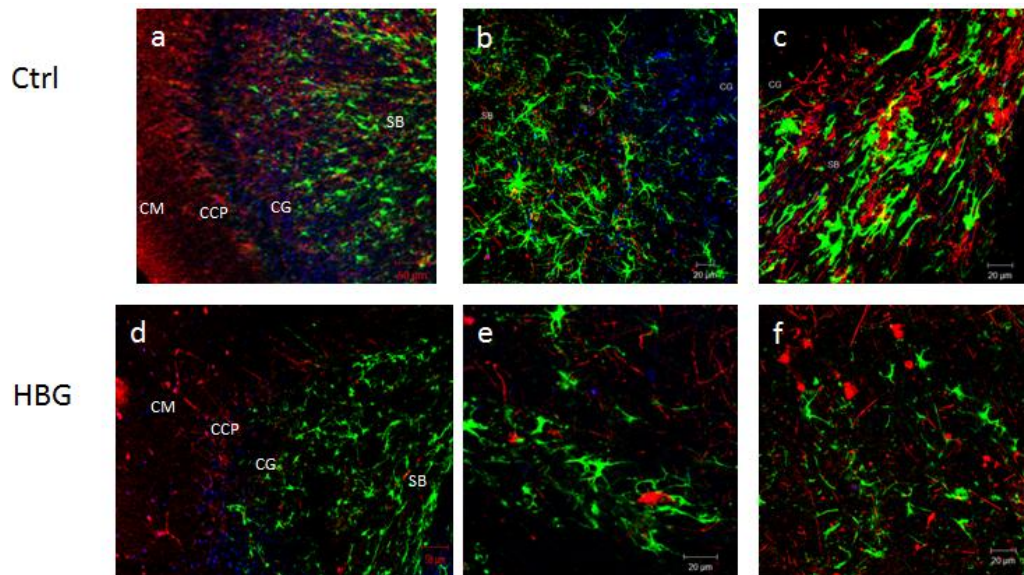


Figura 11. Micrografías representativas de doble marcaje de GH&GFAP del grupo control (a, b y c) y del grupo HBG (c, d y f). Se observa GH-IR (rojo) en las tres capas de la corteza cerebelosa. El inmunomarcaje con GFAP (verde), las células gliales se observan mayoritariamente en la SB. En azul la marca de núcleos celulares con DAPI. La co-localización (amarillo) del marcaje de los anticuerpos GH y GFAP en los campos observados es mínima. Cada barra representa 20 μm .

La Figura 12 corresponde a un doble marcaje con GH&CaBP para los grupos control e HBG. En el caso del marcaje con CaBP se observan diferencias entre los grupos, ya que hemos notado la ausencia de un marcaje claro de células de Purkinje en condiciones de HBG, además de una desorganización de la capa que conforman estas células de gran tamaño.

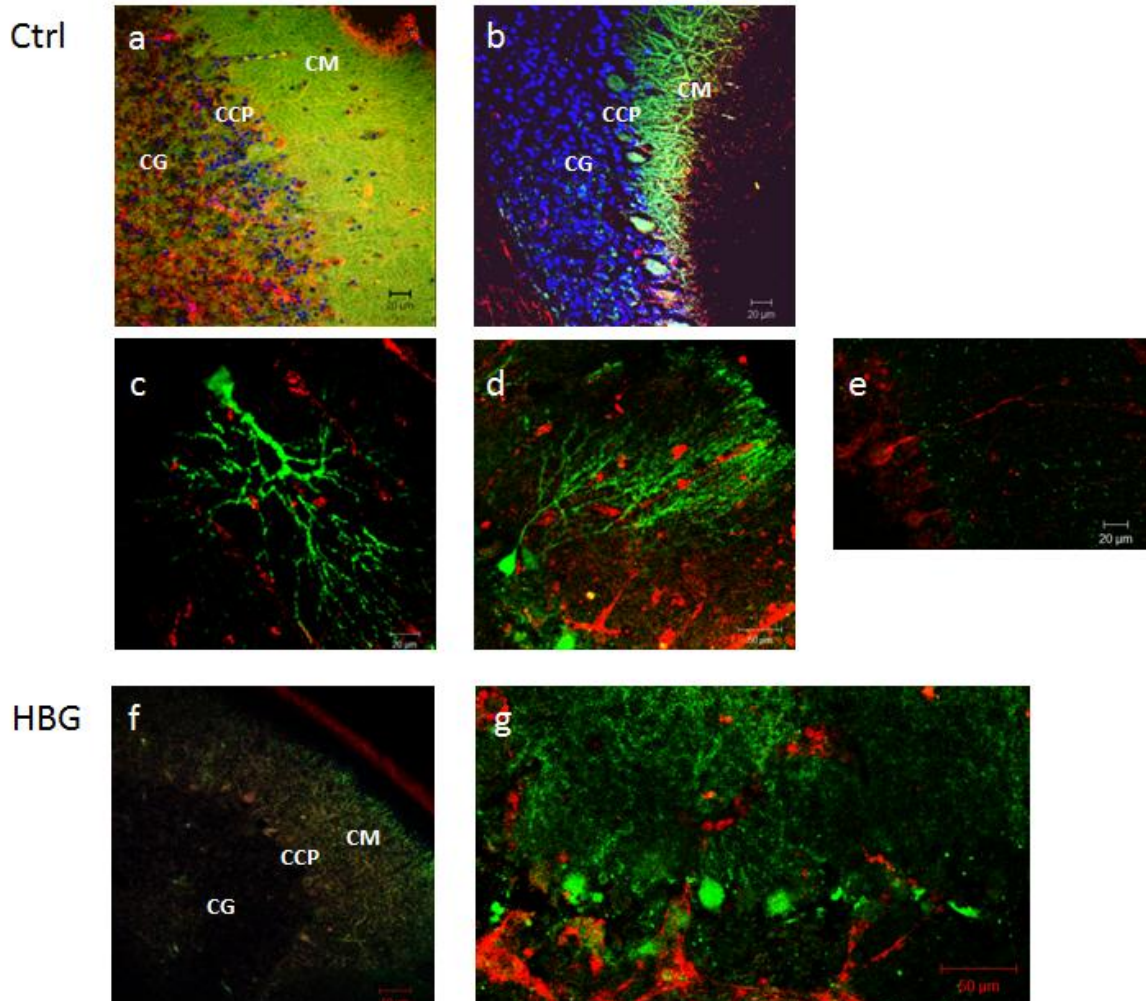


Figura 12. Micrografías representativas de doble marcaje de GH&CaBP para el grupo control e HBG. En a y b se observan las 3 capas de la corteza cerebelosa con su citoarquitectura característica. En c, d y e las células de Purkinje se observan con un mayor aumento marcadas con CaBP (verde), se visualiza su árbol dendrítico en la CM. Se observa GH-IR (rojo) en la células de Purkinje (e). En f y g se observan imágenes correspondientes al grupo experimental HBG. La capa granular se observa marcada con DAPI (azul).

En los cultivos organotípicos observamos que la citoarquitectura de la corteza cerebelosa parece mantenerse, ya que las capas molecular, granular y de células de Purkinje se encuentran bien definidas, siendo inmunorreactivas a los marcadores neuronales como NeuN y CaBP, así como a los marcadores de glía, en este caso GFAP. Además, se encontró una amplia inmunorreactividad a GH distribuida en diferentes tipos celulares.

7.3 Objetivo 3: Cuantificación de la concentración de GH

Se estandarizaron las condiciones del ensayo de ELISA para evaluar la concentración de GH en los cultivos, fue necesaria la homogenización de 12 rebanadas para poder obtener la cantidad de proteína necesaria para el ensayo (400µg proteína total) y se utilizaron alícuotas de 90 µg de proteína por pozo y las muestras se analizaron por triplicado. En estas condiciones la concentración de GH en cultivos organotípicos de cerebello de pollo se muestra en la Figura13.

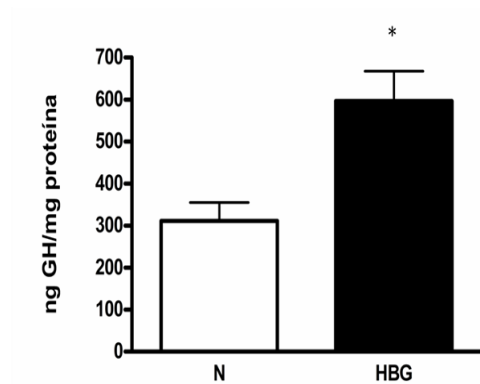


Figura 13. Concentración de GH en cultivos organotípicos de cerebello de pollo 1PE comparando grupo control (N) vs HBG. Cada barra representa la media \pm EE $n=9$ * $p<0.05$.

Los resultados obtenidos muestran que hay un aumento cercano al doble, en la concentración de GH en los cultivos sometidos a HBG con respecto al grupo control. Los datos fueron analizados mediante una U de *Mann-Whitney* y se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos con $P<0.05$.

7.4 Objetivo 4: Evaluar el efecto anti-apoptótico de la GH en los cultivos sometidos a daño por HBG.

Se realizaron inmunomarcajes con β -tubulina III previa exposición a PI (Figura 14) para evaluar si existía muerte celular, ya que el PI es capaz de entrar a la célula únicamente

cuando la membrana de la misma está dañada, además se realizó un marcaje de los núcleos utilizando TO-PRO 3.

En el grupo control se encontró un marcaje basal de PI, mientras que en el grupo de HBG se observó cualitativamente un aumento en el marcaje de células positivas a PI, mayoritariamente en la capa granular.

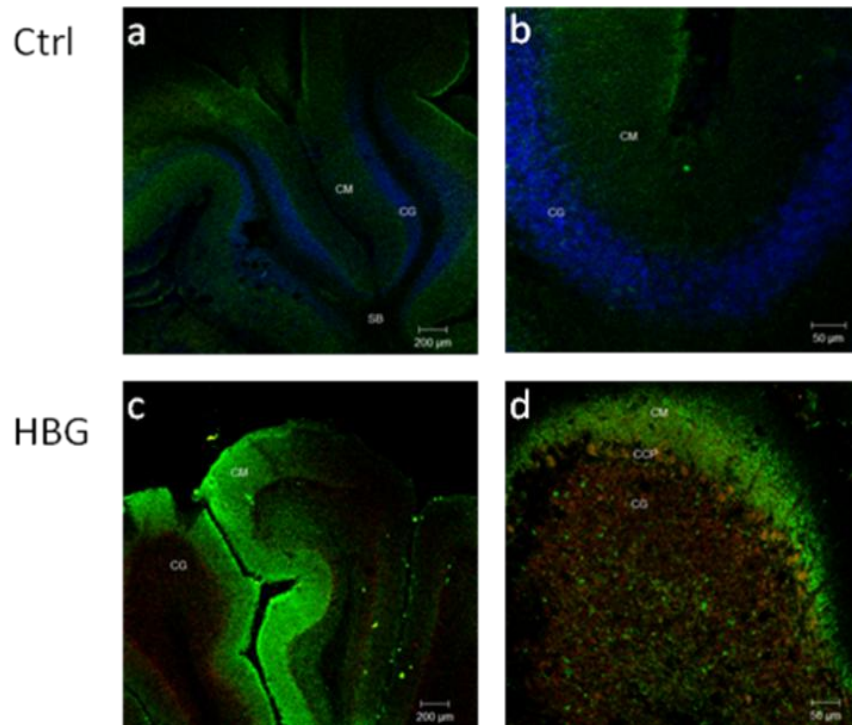


Figura 14. Micrografías representativas de inmunomarcaje para β -tubulina III (verde) expuestas a PI (rojo), los núcleos se ven en azul marcados con TO-PRO 3. En el grupo control (a y b) no se observan células marcadas con PI; en el grupo HBG (c y d) se observa el marcaje de células dañadas en la CG y en la CCP. En a y c la barra representa 200 μm y en b y d 20 μm .

También se evaluó si la muerte celular era de tipo apoptótico, para lo cual se realizó la técnica de TUNEL y se utilizó TO-PRO 3 para el marcaje de núcleos. En el grupo HBG se observa un aumento de células apoptóticas en la capa granular (Figura 15).

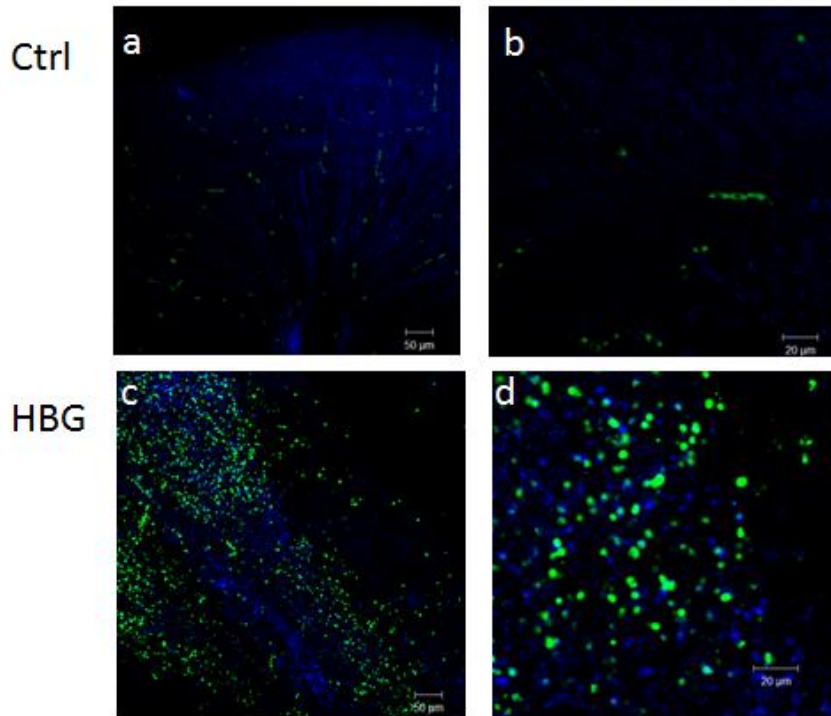


Figura 15. Imágenes representativas de la técnica de TUNEL mediante la cual se pone en evidencia el DNA degradado (verde). En el grupo control (a y b) se observan un marcaje basal de células; en el grupo HBG (c y d) células con marca fluorescente correspondiente a la condensación del material genético que es marcado con el TUNEL en la CG. En azul se observa el marcaje de núcleos con DAPI. En a y c la barra representa 50 μ m y en b y d la barra 20 μ m.

Estos resultados muestran que la muerte celular en los cultivos organotípicos de cerebelo es de tipo necrótico y apoptótico. Cualitativamente se observaron diferencias entre los grupos control e HBG, existiendo en el primero un marcaje basal de células dañadas, mientras que en HBG el área de células dañadas observada bajo el microscopio es mayor al ser teñidas con PI. Con la técnica de TUNEL se observó cualitativamente un marcaje de células apoptóticas principalmente en la capa granular.

Actividad de caspasa-3, ELISA

Para evaluar la muerte celular por apoptosis en los cultivos organotípicos, se realizó un ensayo colorimétrico para caspasa-3, una proteasa de cisteína implicada en los procesos de apoptosis. Se analizó la actividad de esta caspasa efectora para los grupos

control e HBG y con tratamientos de rcGH en dos diferentes concentraciones: 1 y 10 nM (Figura 16).

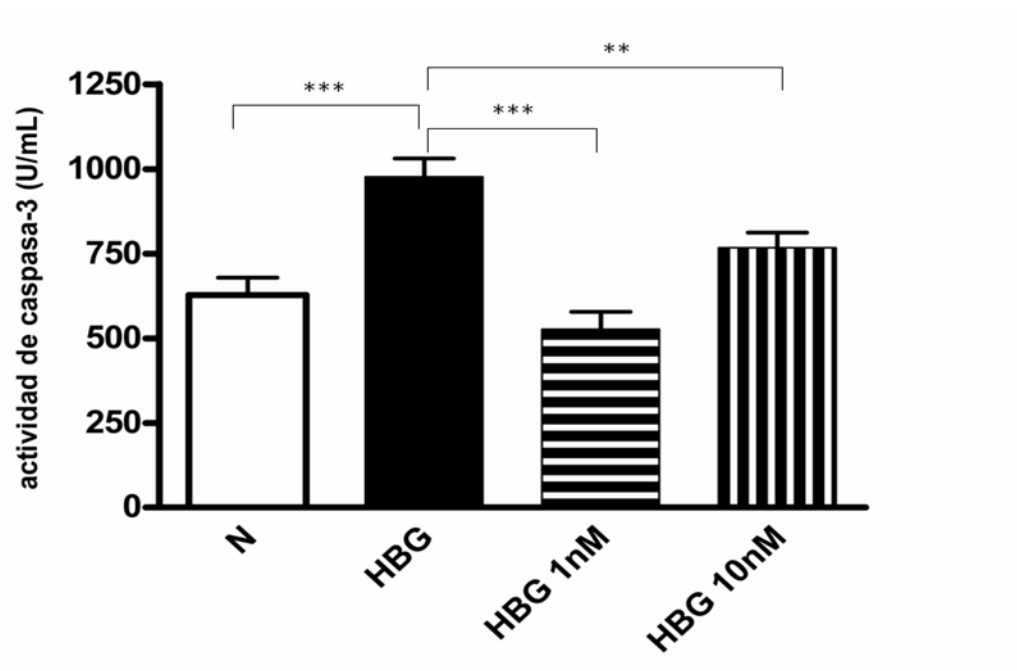


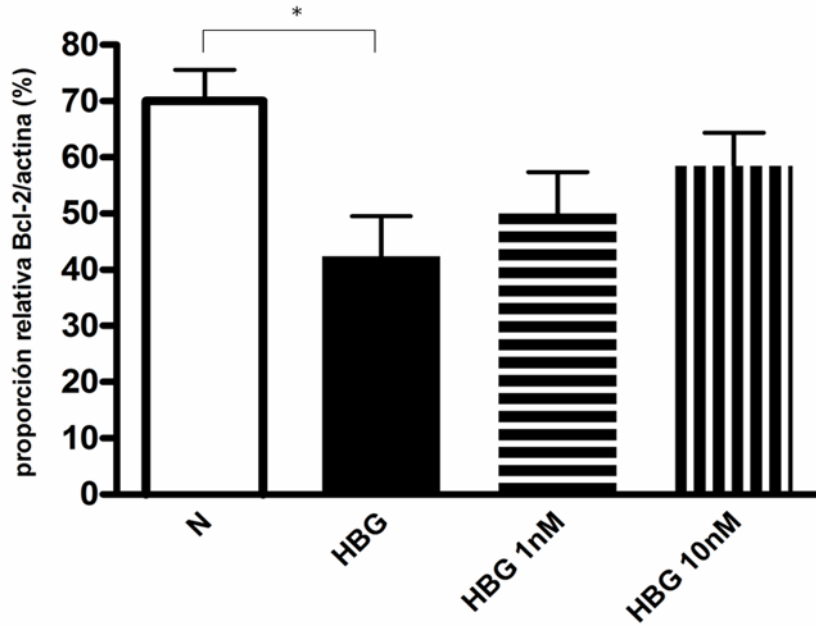
Figura 16. Cuantificación de la actividad de caspasa-3 para los diferentes grupos experimentales. Cada barra representa la media \pm EE, n=6, **P<0.01, ***P<0.001

En el grupo de HBG aumentó significativamente la actividad de caspasa-3 con respecto al grupo control, y se obtuvo una disminución significativa de la actividad de esta proteasa en los grupos donde se adicionó rcGH, mostrando un mayor efecto protector a una concentración de 1nM.

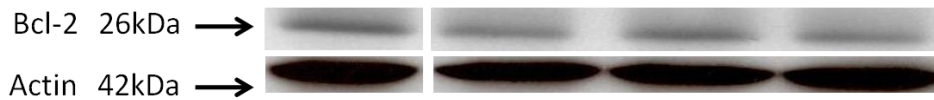
Expresión de Bcl-2

Se evaluó la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 mediante la técnica de Western-blot (Figura 17). En diferentes modelos experimentales se ha observado una modificación en la expresión de esta proteína al ser sometidos a HBG. En nuestro modelo se encontró una disminución significativa de su expresión en el grupo HBG al compararlo con el grupo control.

a)



b)



*Figura 17. Expresión de Bcl-2 en cultivos organotípicos de cerebelo mediante Western-blot en los diferentes grupos experimentales. (a) Porcentaje de la proporción relativa Bcl-2/Actina, cada barra representa la media \pm EE, n=5, *P<0.05. (b) Inmunoblot obtenido de extractos de los cultivos organotípicos, se obtuvo una banda de 26kDa con el anticuerpo anti-Bcl-2; se utilizó Actina como control de cargado (46kDa).*

En los grupos de HBG a los cuales se les adicionó rcGH se observa una tendencia de aumento en la expresión de Bcl-2, principalmente al usar una concentración de 1nM de rcGH, sin embargo, al realizar las pruebas estadísticas no se detectaron diferencias significativas con respecto al grupo de HBG con una n=5.

Expresión de Bax

Como se mencionó anteriormente en la familia de Bcl-2 se incluyen miembros con dominios de homología pero con funciones antagónicas, mientras que Bcl-2 promueve la supervivencia celular, existen otros que facilitan la apoptosis, tal es el caso de Bax,

proteína que altera la permeabilidad mitocondrial generando de esta forma la muerte celular.

Los datos obtenidos de la expresión de Bax mediante Western-blot (Figura 18), muestran un aumento en su expresión cuando los cultivos son sometidos a las condiciones de HBG, en comparación con el grupo control; y una disminución cuando se adicionan los tratamientos de rcGH, mostrando un decremento significativo con 1nM de rcGH.

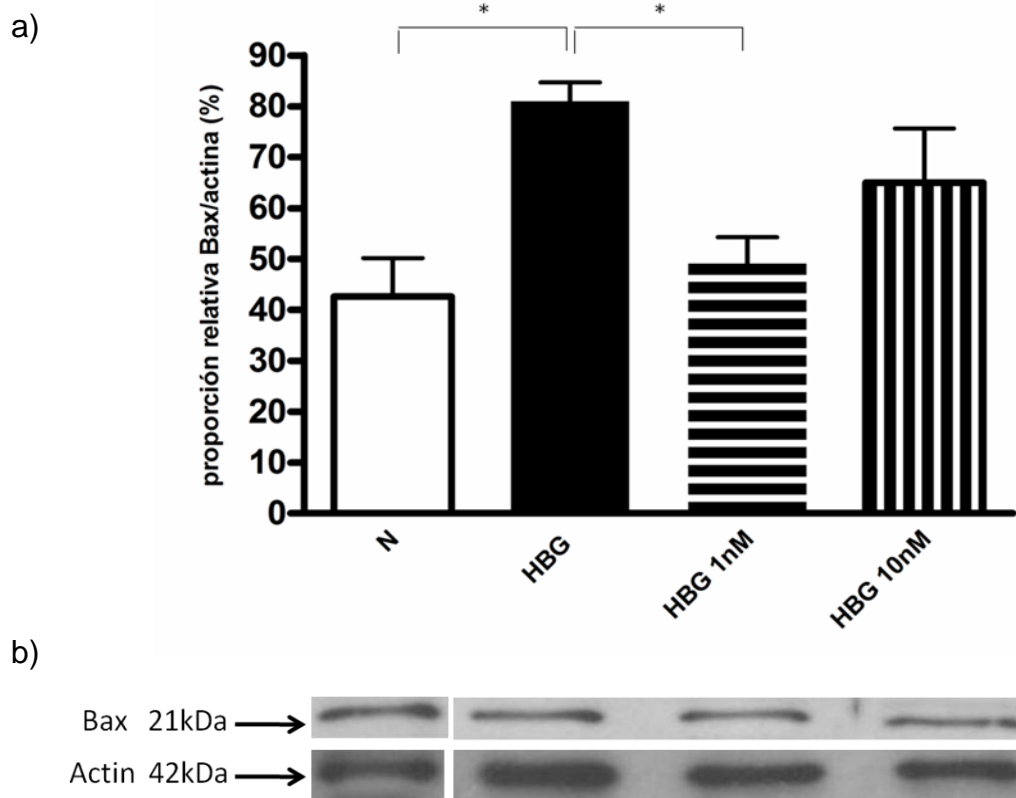


Figura 18. Expresión de Bax en cultivos organotípicos de cerebelo mediante Western-blot para los diferentes grupos experimentales. (a) Proporción relativa Bax/Actina (%), cada barra representa la media \pm EE, n=3, *P<0.05. (b) Inmunoblot obtenido de extractos de los cultivos organotípicos, se obtuvo una banda de 21kDa con el anticuerpo anti-Bax; se utilizó Actina como control de carga (46kDa).

Al analizar la proporción relativa Bax/Bcl-2 (Figura 19) observamos que las condiciones de HBG tienen un efecto pro-apoptótico en la relación que presentan estas proteínas.

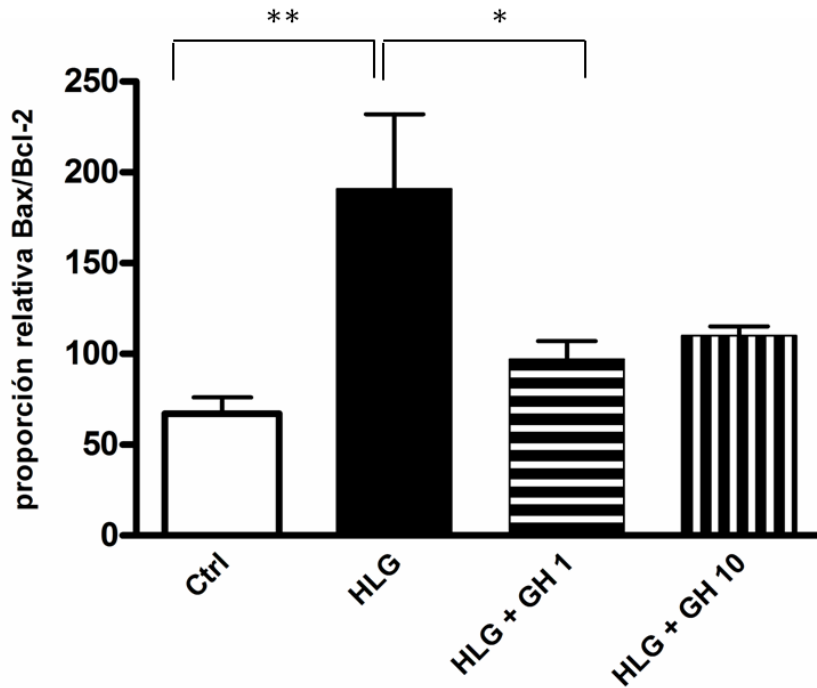


Figura 19. Proporción relativa de la expresión de Bax/Bcl-2. Cada barra representa la media \pm EE * p <0.05, ** p <0.01

En el grupo control se observa que la proporción de Bax con respecto a Bcl-2 es pobre, sin embargo, esto cambia en condiciones de HBG, donde la expresión de Bax aumenta significativamente. Cuando se agrega el tratamiento de rcGH 1nM la proporción Bax/Bcl-2 se ve modificada a favor de la proteína anti-apoptótica.

8. Discusión

Mediante este trabajo tratamos de demostrar que la GH tiene un efecto anti-apoptótico en células del cerebelo, el cual se ha reportado en otros modelos y tipos celulares (Aberg *et al.*, 2005; Jeay *et al.*, 2008; Costoya *et al.*, 1999).

En el caso del cerebelo, los cultivos organotípicos representan una ventaja debido a que el cultivo primario de células de Purkinje es difícil de mantener, mientras que en los organotípicos se puede mantener la mayoría de los tipos celulares que conforman esta estructura. Otra ventaja de los cultivos organotípicos es que se conservan las conexiones sinápticas entre neuronas y glía manteniéndose el circuito íntegro, con lo cual es posible evaluar el desarrollo cerebelar, electrofisiología, sobrevivencia celular en el cultivo o en respuesta a estímulos pro-apoptóticos, excitotoxicidad o privación de oxígeno (Hurtado de Mendoza *et al.*, 2011).

Las rebanadas de cerebelo en cultivos organotípicos mostraron inmunorreactividad a NeuN, un anticuerpo monoclonal que reconoce una proteína específica de neuronas el cual se encuentra distribuido en todo el SNC de diferentes especies de vertebrados, incluyendo aves y mamíferos y que se localiza en el núcleo de las neuronas post-mitóticas (Mullen *et al.*, 1992). Mediante este marcaje se pudieron localizar las neuronas de la capa granular en la corteza cerebelosa y al hacer un doble marcaje con GH se pudo corroborar que existe una co-localización de estos dos marcadores, lo cual nos indica la presencia local de GH que es expresada en cuerpos neuronales, esto coincide con datos reportados previamente en aves y en murinos (Lobie *et al.*, 1993; Harvey *et al.*, 2003; Scheepens *et al.*, 2001; Alba-Betancourt *et al.*, 2011).

Se ha reportado previamente por nuestro grupo de trabajo que existe una co-localización de CaBP con GH en cortes de cerebelo en diferentes etapas embrionarias y post-eclosión (Alba-Betancourt *et al.*, 2011). En las rebanadas de cultivos organotípicos pudimos observar que las células de Purkinje conservan su inmunorreactividad a CaBP, y que existe co-localización de este marcador con GH, por lo que podemos decir que este tipo neuronal expresa GH, y que esta hormona podría estar actuando de forma autócrina/parácrina debido a que se tiene evidencia de la presencia del GHR en las células de Purkinje (Lobie *et al.*, 1993; Alba-Betancourt *et al.*,

2011). En condiciones de hipoxia se observaron anomalías morfológicas de las células de Purkinje, tales como obscurecimiento citoplásmico, condensación nuclear, necrosis autolítica con vacuolas citoplásmicas y soma más pequeño y redondeado (Barenberg *et al.*, 2001), en nuestro caso observamos que en el grupo de HBG los somas de las células de Purkinje se perciben más pequeños.

Por otro lado, también se observó inmunorreactividad a un marcador de astrocitos (GFAP), el inmunomarcaje con GFAP se observó con una distribución mayoritaria en la sustancia blanca. Como se mencionó anteriormente, en este tipo de cultivos se ha observado la presencia de gliosis en la parte de interacción de la rebanada con la membrana semiporosa (Dusart, 1997; Ayoub *et al.*, 2005) y en nuestro caso también observamos este fenómeno. Otro factor que se ha observado promueve el proceso de gliosis es la HBG (citado en Sarna, 2003). El modelo utilizado en este proyecto tiene una característica particular en cuanto al marcate de astrocitos con GFAP ya que, a diferencia de los mamíferos en los cuales la glía de Bergmann presente en el cerebelo contiene esta proteína fibrilar, en aves el citoesqueleto de la glía de Bergmann está constituido por vimentina, la cual es característica en los astrocitos inmaduros de mamíferos (Ajtai & Kálmán, 1998). Sin embargo, a pesar de ser la vimentina el principal componente de los astrocitos en aves, se ha observado que al realizar una lesión en el cerebelo, hay una inmunorreactividad a GFAP alrededor del sitio de lesión, lo cual se ha atribuido a diferentes procesos, como la migración de células GFAP-positivas hacia el sitio de lesión o a la proliferación de una nueva población de astrocitos. A pesar de observar inmunorreactividad a GFAP en la sustancia blanca, donde también se ha observado una amplia distribución de la inmunorreactividad a GH, los campos donde se observó una co-localización de estos dos marcadores fueron escasos, lo cual sugiere que la presencia de la GH no está relacionada con este tipo celular en este modelo particular, ya que se ha reportado por el grupo de Harvey (2003) que en pollos en etapas embrionarias (14E), existe inmunorreactividad a GH en células de la corteza cerebral que posiblemente sean astrocitos.

Una vez que corroboramos que los cultivos eran inmunorreactivos a marcadores neuronales y de astrocitos, se realizó la estandarización de las condiciones experimentales de HBG. De acuerdo con la literatura, la utilización de este tipo de

cultivos ha demostrado ser de gran utilidad para estudiar los procesos resultantes de isquemia (Strasser & Fisher, 1995; Ray *et al.*, 2000; Meli *et al.*, 2003; Raval *et al.*, 2005; Quintana *et al.*, 2006; Moroni *et al.*, 2009). Se determinó que 1h de isquemia experimental (HBG) era suficiente para la inducción de apoptosis, utilizando como marcador a caspasa-3. Lo anterior esta en concordancia con lo encontrado por Alba-Betancourt (2011) en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de pollo. Al permanecer más tiempo (2h) en HBG, observamos que la actividad de caspasa-3 disminuye, lo cual podría explicarse por fenómenos de muerte celular diferentes a la apoptosis, ya que como se mencionó anteriormente, dependiendo de la severidad del daño inducido, se obtendrán diferentes tipos de muerte celular, por ejemplo necrosis, en la cual no se observaría una actividad de caspasa-3 elevada como es nuestro caso.

Además de la actividad de caspasa-3, también se realizaron técnicas histológicas para la determinación del tipo de muerte celular presente en los cultivos. Se corroboró, mediante la técnica de TUNEL, la presencia de cuerpos apoptóticos; además de la presencia de células necróticas mediante la tinción con PI, en ambos casos se obtuvo un marcaje basal en el grupo control mientras que en el grupo de HBG el marcaje aumenta. Se sabe que durante el tiempo de estabilización *in vitro*, las rebanadas de tejido se adelgazan hasta alcanzar casi el grosor de una monocapa, en la cual se preserva en gran medida la diferenciación celular y las conexiones (Vornov *et al.*, 1991), además también se ha observado que existe una migración celular desorganizada y muerte celular en general en la parte de las rebanadas que están en contacto con la membrana (Tanaka *et al.*, 2000), por lo que podemos atribuir el marcaje basal tanto de TUNEL como de PI en los cultivos organotípicos a estas causas.

Después de que fueron estandarizadas las condiciones de HBG capaces de inducir apoptosis, determinamos la concentración de GH presente en las rebanadas. Al someter los cultivos a HBG se observó que la concentración de GH aumentó significativamente con respecto al grupo control. Estos resultados se suman a datos previos en un modelo de rata, donde señalan que un daño de hipoxia incrementa la expresión de un factor similar a la GH, determinado por inmunohistoquímica, en regiones como el hipocampo, la corteza y el tálamo (Scheepens *et al.*, 2001); y datos de nuestro laboratorio en estudios *in vivo*, donde se observó un aumento en la

concentración local de la GH en extractos de todo el cerebro (Ávila, 2009). Estos son los primeros resultados, a nivel de cerebelo, en donde se muestra un claro incremento de la GH local que podría estar participando activamente, ya que se le ha implicado en la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de neuronas y glía (Harvey *et al.*, 1995).

Para este modelo en particular, el aumento en la concentración de GH local no es suficiente para ejercer un efecto de neuro-protección ante el daño causado por HBG, razón por la cual se decidió realizar tratamientos con rcGH y de esta forma evaluar el efecto anti-apoptótico que pudiera generar.

En estudios previos se determinó la presencia del GHR en células del cerebelo de pollo lo cual muestra la posibilidad de que la GH tenga un efecto sobre esta estructura (Alba-Betancourt *et al.*, 2011). Se probaron dos diferentes concentraciones de GH (1 y 10 nM) durante la HBG y en las 24h de re-oxigenación. La concentración de GH 1nM fue la más efectiva para evidenciar el efecto de inhibición de la apoptosis. A dosis mayores se observa un efecto de U invertida, lo que podría estar indicando una sobresaturación del receptor y/o una inhibición por competencia. Datos previos mostraron que el tratamiento con GH 1nM aumentó la viabilidad celular hasta 1,7 veces y mostró un efecto anti-apoptótico mediante la disminución tanto de las células apoptóticas (de $78,5\% \pm 1,3$ a $36\% \pm 1$) como de la actividad enzimática de caspasa-3, lo que sugiere una protección de las células ante HBG. Los datos obtenidos en este trabajo están en concordancia con lo reportado por Alba-Betancourt (2011), sugiriendo un efecto anti-apoptótico de la GH sobre células del cerebelo.

En los procesos apoptóticos, la desregulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial es un factor importante, siendo la familia de Bcl-2 los moduladores de esta permeabilidad, a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Oltvai *et al.*, 1993). En este trabajo se evaluó la expresión de dos miembros de esta familia, dos proteínas que tienen efectos opuestos, por un lado Bcl-2, la cual es una proteína anti-apoptótica que se ha relacionado con la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , como antioxidante y como factor de prevención de la liberación de los activadores mitocondriales de las caspasas citosólicas. Por otro lado Bax, que tiene una función

pro-apoptótica la cual es modulada mediante interacciones proteína-proteína con 14-3-3 (Burlacu, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un cambio en la expresión de Bax, pero no en la de Bcl-2, como se esperaba. En el caso de Bcl-2 se observó una disminución de su expresión en condiciones de HBG, que no fue restaurada al adicionar el tratamiento de rcGH, lo cual concuerda con lo reportado por el grupo de Costoya *et al.* (1999), donde a pesar de observar un efecto anti-apoptótico de la GH dependiente de la activación de la vía de PI3K, no se encontró aumento en los niveles de Bcl-2 posterior a la activación de GHR (Costoya *et al.*, 1999). Sin embargo, existen otros reportes en los cuales han observado un aumento en la expresión de Bcl-2, al realizar distintos tratamientos tanto *in vivo* como *in vitro* con GH. En el 2002, Frago *et al.*, observaron un efecto antiapoptótico de la GH mediado por IGF-1 y anátomo-específico ya que sólo lo determinaron en estructuras como hipotálamo, hipocampo y cerebelo, no así en corteza cerebral, sus datos muestran que la GH incrementó la fosforilación de Akt y Bad, además de incrementar la expresión de Bcl-2.

Para la proteína pro-apoptótica Bax se observó un aumento en su expresión en el grupo HBG y al usar rcGH 1nM la expresión de esta proteína disminuyó significativamente. Efectos similares se han observado por otro grupo de investigación (Shin *et al.*, 2004) quienes determinaron un aumento en la inmunorreactividad de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 (Bad y Bax) en la corteza cerebral de ratas neonatas sometidas a HI, mientras que en el grupo que recibió tratamiento de GH se redujo la inmunorreactividad de estas proteínas, con lo cual mostraron por primera vez evidencia de que un tratamiento de GH posterior a un daño por HI tiene un efecto neuro-protector y que el posible mecanismo por el cual se obtiene este efecto podría deberse a la modulación de la expresión de proteínas relacionadas con los procesos de apoptosis.

Se analizó la proporción relativa de la proteína pro-apoptótica contra la anti-apoptótica con el fin de evidenciar el efecto de la GH sobre la expresión de ambas. Se encontró que existe un aumento de esta proporción en condiciones de HBG, que es revertido con el tratamiento de GH 1nM. Lo anterior es una evidencia más que apoya la hipótesis de

que el balance en la expresión de estas proteínas determina la sobrevivencia celular posterior a un estímulo apoptótico (Oltavi *et al.*, 1993).

Como resultado de la modificación en la proporción relativa Bax/Bcl-2 a favor de Bcl-2, obtenemos una disminución en la actividad del marcador de apoptosis (caspasa-3), el cual es significativamente menor en el grupo HBG tratados con rcGH 1nM y con lo cual podemos inferir un efecto anti-apoptótico generado por esta hormona, estos resultados están en concordancia con lo reportado por otros grupos (Frago *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004); así como por otros factores relacionados a la GH como es el IGF-1, el cual también previene procesos de apoptosis mediante la inhibición de cambios en la proporción de Bax/Bcl-2 dando como resultado la falta de activación de caspasa-3 (Tamatani *et al.*, 1998)..

A pesar de las diferencias entre los modelos utilizados, las especie, el área o estructura del SNC estudiada, incluso las condiciones para generar el daño neuronal o muerte celular, los resultados obtenidos son consistentes en cuanto al efecto de neuroprotección y la disminución del proceso apoptótico resultado de la cascada de señalización de PI3K/AKT generada por la GH.

9. Conclusiones

Una vez obtenidos y analizados los resultados podemos concluir que en este modelo de hipoxia y baja glucosa durante 1h:

- Se induce un aumento significativo de la concentración de GH en respuesta al daño
- Se incrementa la muerte celular por apoptosis evaluada por el método de TUNEL.
- Se observó cualitativamente una mayor proporción de la actividad de caspasa-3 como marcador de apoptosis.

Por otra parte, desde el punto de vista morfológico en estos cultivos:

- Se observaron células inmunorreactivas a NeuN y CaBP que co-localizan con GH,
- Se mantuvo en gran medida la citoarquitectura característica de la corteza de cerebelo en condiciones control mientras que en el grupo de HBG se observó, particularmente en las células de Purkinje, un desarreglo en su configuración espacial

El tratamiento con GH no restaura la expresión de Bcl-2 disminuida en el grupo experimental HBG.

Mientras que en el caso de Bax la expresión se incrementa con la HBG, y el tratamiento con GH (1nM) disminuye significativamente su expresión.

Consecuentemente la relación de Bax/Bcl-2 en presencia de GH se modifica a favor de la inhibición de la apoptosis.

El incremento de la actividad de caspasa-3 inducido por la HBG disminuye significativamente con un tratamiento 1nM de GH, y en menor medida con una concentración de 10nM. Proponemos que esta disminución es el resultado de la estabilización de la relación Bax/Bcl-2 generada por la GH.

Todos estos resultados corroboran el efecto neuro protector de la GH en un daño por HBG y permiten proponer que uno de los mecanismos sea a través de la inhibición de la apoptosis

10. Literatura citada

Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J 2006 Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal* 6:53-80

Ajo R, Cacicedo L, González B y Sánchez-Franco F 2001 Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of embryonic brain cells via MAP/ERK signaling pathways. Program and Abstracts 83rd Annual Meeting at the Endocrine Society. Denver, Colorado, pp. 1-128

Ajtai BM, Kalman M 1998 Glial fibrillary acidic protein expression but no glial demarcation follows the lesion in the molecular layer of cerebellum. *Brain Res* 802:285-288

Alba-Betancourt C, Aramburo C, Ávila-Mendoza J, Ahumada-Solorzano SM, Carranza M, Rodríguez-Mendez AJ, Harvey S, Luna M 2011 Expression, cellular distribution, and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development. *Gen Comp Endocrinol* 170:528-540

Alba-Betancourt C Efecto protector de la hormona de crecimiento en cultivos neuronales de pollo 2011 Presentada en el Instituto de Neurobiología para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Allen JT, Bloor CA, Kedia RK, Knight RA, Spiteri MA 2000 Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung. *Neuropeptides* 34:98-107

Aramburo C, Navarrette S, Montiel JL, Sanchez R, 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

Arámuro C, Sánchez-García R, Femton-Navarro B, Perera-Marin JG y Valverde-Rodríguez 1989 Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona del crecimiento de pollo (cGH). *Veterinaria Mexico*. 20:397-405

Ávila D 2009 Efecto de la hipoxia en la concentración de la hormona de crecimiento en cerebro de embriones de pollo. Tesis de licenciatura. Laboratorio de Bioquímica de Hormonas, Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología

Ayoub AE, Cai TQ, Kaplan RA, Luo J 2005 Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 481:403-415

Barenberg P, Strahlendorf H, Strahlendorf J 2001 Hypoxia induces an excitotoxic-type of dark cell degeneration in cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci Res* 40:245-254

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

Brana C, Benham C, Sundstrom L 2002 A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc* 10:109-114

Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ 2008 Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1984-1989

Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, Waters MJ 2005 Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* 12:814-821

Burlacu A 2003 Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 7:249-257

Carpenter MB. Neuroanatomía. Fundamentos. 4a ed. Editorial Médica Panamericana S.A. 1998

Carter S, Schwartz J, Smith LS 1996 Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology*. 58; 180-207

Chan PH 2004 Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res* 29:1943-1949

Chung H, Kim E, Lee DH, Seo S, Ju S, Lee D, Kim H, Park S 2007 Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. *Endocrinology* 148:148-159

Coculescu M 1999 Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12:113-124

Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Searis R, Devesa J, Arce VM 1999 Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology* 140:5937-5943

Dahl D, Bignami A 1973 Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res* 61:279-293

Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW 2001 Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 8:359-379

Dusart I, Airaksinen MS, Sotelo C 1997 Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J Neurosci* 17:3710-3726

Fink SL, Cookson BT 2005 Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73:1907-1916

Forsyth IA, Wallis M 2002 Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:291-312

Frago LM, Paneda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, 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* 143:4113-4122

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH 2000 The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 20:2817-2824

Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM 1997 Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471-477

Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K 1992 A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182:593-599

Guan J, Miller OT, Waugh KM, McCarthy DC, Gluckman PD 2001 Insulin-like growth factor-1 improves somatosensory function and reduces the extent of cortical infarction and ongoing neuronal loss after hypoxia-ischemia in rats. *Neuroscience* 105:299-306

Gustafson K, Hagberg H, Bengtsson BA, Brantsing C, Isgaard J 1999 Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 45:318-323

Harvey S, Hull KL 1997 Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine* 7:267-279

Harvey S, Hull K 2003 Neural growth hormone: an update. *J Mol Neurosci* 20:1-14

Harvey S, Baudet ML, Murphy A, Luna M, Hull KL, Aramburo C 2004 Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 139:158-167

Hojvat S, Baker G, Kirsteins L, Lawrence AM 1982 Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain Res* 239:543-557

Hrabia A, Paczoska-Eliasiewicz HE, Berghman LR, Harvey S, Rzasz J 2008 Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell Tissue Res* 332:317-328

Hughes PE, Alexi T, Walton M, Williams CE, Dragunow M, Clark RG, Gluckman PD 1999 Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 57:421-450

Hurtado de MT, Balana B, Slesinger PA, Verma IM 2011 Organotypic cerebellar cultures: apoptotic challenges and detection. *J Vis Exp*

Inzucchi SE, Robbins RJ 1993 Effects of growth hormone on human bone biology. *J Clin Endocrinol Metab* 79:691-694

Isaksson OG, Eden S, Jansson JO 1985 Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Annu Rev Physiol* 47:483-499

Isgaard J, Aberg D, Nilsson M 2007 Protective and regenerative effects of the GH/IGF-I axis on the brain. *Minerva Endocrinol* 32:103-113

Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Baixeras E 2000 Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. *Mol Endocrinol* 14:650-661

Jensen A, Garnier Y, Middelani J, Berger R 2003 Perinatal brain damage--from pathophysiology to prevention. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:S70-S79

Kopchick JJ 2003 History and future of growth hormone research. *Horm Res* 60 Suppl 3:103-112

Lee C, Kim DW, Jeon GS, Roh EJ, Seo JH, Wang KC, Cho SS 2001 Cerebellar alterations induced by chronic hypoxia: an immunohistochemical study using a chick embryonic model. *Brain Res* 901:271-276

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA 2003 Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415

Lobie PE, Garcia-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ 1993 Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 74:225-233

Ludvigsen S, Folkow LP 2009 Differences in in vitro cerebellar neuronal responses to hypoxia in eider ducks, chicken and rats. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195:1021-1030

Luna M, Huerta L, Berumen L, Martinez-Coria H, Harvey S, Aramburo C 2004 Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 137:37-49

Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Aramburo C 2005 Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 144:28-37

Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C 1998 Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309

Martinez-Coria H, Lopez-Rosales LJ, Carranza M, Berumen L, Luna M, Aramburo C 2002 Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* 17:91-102

McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, Nikolics K, Gluckman P 1994 Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport* 5:901-904

Meli E, Pangallo M, Baronti R, Chiarugi A, Cozzi A, Pellegrini-Giampietro DE, Moroni F 2003 Poly(ADP-ribose) polymerase as a key player in excitotoxicity and post-ischemic brain damage. *Toxicol Lett* 139:153-162

Melmed S 2009 Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 119:3189-3202

Moroni F, Formentini L, Gerace E, Camaioni E, Pellegrini-Giampietro DE, Chiarugi A, Pellicciari R 2009 Selective PARP-2 inhibitors increase apoptosis in hippocampal slices but protect cortical cells in models of post-ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol* 157:854-862

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM 1992 NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211

Neudert F, Redies C 2008 Neural circuits revealed by axon tracing and mapping cadherin expression in the embryonic chicken cerebellum. *J Comp Neurol* 509:283-301

Nieto-Sampedro M, Lewis ER, Cotman CW, Manthorpe M, Skaper SD, Barbin G, Longo FM, Varon S 1982 Brain injury causes a time-dependent increase in neuronotrophic activity at the lesion site. *Science* 217:860-861

Nyberg F 2000 Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front Neuroendocrinol* 21:330-348

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ 1993 Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619

Pan W, Yu Y, Cain CM, Nyberg F, Couraud PO, Kastin AJ 2005 Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 146:4898-4904

Quintana P, Alberi S, Hakkoum D, Muller D 2006 Glutamate receptor changes associated with transient anoxia/hypoglycaemia in hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 23:975-983

Ramesh R, Kuenzel WJ, Buntin JD, Proudman JA 2000 Identification of growth-hormone- and prolactin-containing neurons within the avian brain. *Cell Tissue Res* 299:371-383

Ramnani N 2006 The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 7:511-522

Raval AP, Dave KR, Prado R, Katz LM, Busto R, Sick TJ, Ginsberg MD, Mochly-Rosen D, Perez-Pinzon MA 2005 Protein kinase C delta cleavage initiates an aberrant signal transduction pathway after cardiac arrest and oxygen glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:730-741

Ray AM, Owen DE, Evans ML, Davis JB, Benham CD 2000 Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. *Brain Res* 867:62-69

Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC, Morel G 2001 Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem* 49:347-354

Riley C, Hutter-Paier B, Windisch M, Doppler E, Moessler H, Wronski R 2006 A peptide preparation protects cells in organotypic brain slices against cell death after glutamate intoxication. *J Neural Transm* 113:103-110

Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A 2005 The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 39:26-50

Rogers JH 1989 Immunoreactivity for calretinin and other calcium-binding proteins in cerebellum. *Neuroscience* 31:711-721

Sarna JR, Hawkes R 2003 Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol* 70:473-507

Sato M, Hashimoto H, Kosaka F 1990 Histological changes of neuronal damage in vegetative dogs induced by 18 minutes of complete global brain ischemia: two-phase damage of Purkinje cells and hippocampal CA1 pyramidal cells. *Acta Neuropathol* 80:527-534

Saugstad OD 1996 Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 98:103-107

Scheepens A, Sirimanne E, Beilharz E, Breier BH, Waters MJ, Gluckman PD, Williams CE 1999 Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 68:88-100

Scheepens A, Sirimanne ES, Breier BH, Clark RG, Gluckman PD, Williams CE 2001 Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience* 104:677-687

Scheepens A, Modersheim TA, Gluckman PD 2005 The role of growth hormone in neural development. *Horm Res* 64 Suppl 3:66-72

Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae SR, Chang YP 2004 Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 354:64-68

Stoppini L, Buchs PA, Muller D 1991 A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182

Strasser U, Fischer G 1995 Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* 57:177-186

Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M 1998 Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Brain Res Mol Brain Res* 58:27-39

Tan WK, Williams CE, During MJ, Mallard CE, Gunning MI, Gunn AJ, Gluckman PD 1996 Accumulation of cytotoxins during the development of seizures and edema after hypoxic-ischemic injury in late gestation fetal sheep. *Pediatr Res* 39:791-797

Tanaka M, Momoi T, Marunouchi T 2000 In situ detection of activated caspase-3 in apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Brain Res Dev Brain Res* 121:223-228

Tresguerres JAF 1999 *Fisiología humana*. Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de Madrid, España

Vannucci RC 1993 Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *APMIS Suppl* 40:89-95

Vornov JJ, Tasker RC, Coyle JT 1991 Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures. *Exp Neurol* 114:11-22

Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I 2004 Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207:3221-3231

Williams CE, Gunn A, Gluckman PD 1991 Time course of intracellular edema and epileptiform activity following prenatal cerebral ischemia in sheep. *Stroke* 22:516-521

Yue X, Mehmet H, Penrice J, Cooper C, Cady E, Wyatt JS, Reynolds EO, Edwards AD, Squier MV 1997 Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:16-25

11. Índice de Figuras

	pp
<i>Figura 1. Unión de GH con su receptor</i>	3
<i>Figura 2. Principales vías implicadas en la muerte celular isquémica</i>	8
<i>Figura 3. Señalización de supervivencia y muerte neuronal por apoptosis inducida por isquemia</i>	10
<i>Figura 4. Arquitectura anatómica del cerebelo</i>	12
<i>Figura 5. Esquema de cultivos organotípicos</i>	17
<i>Figura 6. Imágenes representativas de cultivos organotípicos de cerebelo de pollo en distintas edades</i>	28
<i>Figura 7. Imágenes representativas de cultivos organotípicos de cerebelo de pollo 1PE</i>	29
<i>Figura 8. Gráfico de actividad de caspasa-3 en HBG 1 y 2h</i>	30
<i>Figura 9. Microfotografías de doble inmunomarcaje GH&CaBP en cortes de cerebelo</i>	31
<i>Figura 10. Microfotografías de doble inmunomarcaje GH&NeuN</i>	32

Figura 11. Micrografías de doble marcaje de GH&GFAP	33
<i>Figura 12. Micrografías de doble marcaje de GH&CaBP</i>	34
<i>Figura 13. Gráfico de la concentración de GH</i>	35
<i>Figura 14. Micrografías de inmunomarcaje para beta-tubulina III expuestas a PI</i>	36
<i>Figura 15. Imágenes representativas de la técnica de TUNEL</i>	37
<i>Figura 16. Gráfico de la actividad de caspasa-3</i>	38
<i>Figura 17. Gráfico e inmunoblot de la expresión de Bcl-2</i>	39
<i>Figura 18. Gráfico e inmunoblot de la expresión de Bax</i>	40
<i>Figura 19. Gráfico de la proporción relativa Bax/Bcl-2</i>	41