



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Mecanismos que median los efectos de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio”

TESIS

que para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

PRESENTA

M. en C. José Luis Luna Acosta

TUTOR

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Instituto de neurobiología de la UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Instituto de neurobiología de la UNAM

Dra. Marta Romano Pardo

Centro de investigación y estudios avanzados del IPN

QUERETARO, MARZO 2016



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.

Resumen

La hormona del crecimiento (GH) se expresa en varios tejidos extra-hipofisarios, incluyendo a los órganos linfoides primarios y secundarios del sistema inmune. En aves, el ARNm de GH y su proteína muestran un patrón de distribución específico durante el desarrollo en la bolsa de Fabricio (BF), particularmente en células epiteliales y células B. Los cambios que se observan durante la ontogenia, tanto en la concentración como en la distribución celular de la GH local, sugieren que esta hormona puede estar involucrada en procesos de diferenciación y maduración de las células B, así como tener un papel funcional en la supervivencia celular, a través de mecanismos parácrinos y/o autócrinos. En este trabajo se analizaron los efectos anti-apoptóticos de la GH en cultivos primarios de células de BF, así como las rutas de señalización intracelular que pueden estar involucradas en esta actividad. Asimismo, se analizó si estos efectos de la hormona se ejercen de manera directa, o bien si son mediados a través del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I). Se observó que las células bursales cultivadas en ausencia de suero fetal mostraron una pérdida significativa de su viabilidad a las 4 horas de incubación (16% de disminución a las 4 horas y 45% a las 6 horas), así como un incremento significativo en la apoptosis. Por su parte, el tratamiento con GH 10 nM, o con IGF-I 40 nM, produjo un incremento significativo de la viabilidad en los cultivos celulares (16.7 ± 0.67 y $13.4 \pm 1.12\%$, respectivamente), en comparación con los controles no tratados. Además, la presencia de cuerpos apoptóticos (TUNEL) disminuyó dramáticamente (5.5 veces) después de los tratamientos con GH e IGF-I. De igual manera, tanto GH como IGF-1 fueron capaces de inhibir significativamente la actividad de caspasa 3 ($40 \pm 2.0\%$) en dichos cultivos. En contraste, el efecto anti-apoptótico mostrado por GH e IGF-I fue bloqueado de forma importante cuando las células tratadas se co-incubaron, respectivamente, con los anticuerpos específicos anti-GH o anti-IGF-I. La incubación con anticuerpo anti-IGF-I, sin embargo, no fue capaz de revertir los efectos anti-apoptóticos de GH, lo cual sugiere que dicha actividad se ejerce de manera directa y no está mediada por el IGF-I. La adición de

100 nM de wortmanina (un inhibidor de la vía de señalización PI3K) inhibió los efectos protectores de GH. Asimismo, el tratamiento con GH estimuló (3 veces) la fosforilación de Akt en las células bursales, mientras que la co-incubación con wortmanina bloqueó dicho efecto, de forma similar a lo observado con la inmunoneutralización con el anticuerpo anti-GH. Más aún, la GH fue capaz de estimular (7 veces) la expresión de Bcl-2. En conjunto, todos estos datos indican que la actividad anti-apoptótica de la GH se lleva a cabo de manera directa en los cultivos primarios de linfocitos B de la bolsa de Fabricio, utilizando la vía de señalización de PI3K/Akt.

INDICE

ANTECEDENTES	6
Hormona de crecimiento	6
Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento	7
Sistema inmune y hormona de crecimiento	7
Hormona de crecimiento y apoptosis	10
Estructura, receptor y transducción de señales de la hormona de crecimiento	14
Hipótesis y objetivos.....	17
MATERIALES Y METODOS	20
Modelo experimental.....	20
Obtención, dispersión y cultivo primario de células de bolsa de Fabricio	20
Inmunohistoquímica	21
Tratamientos.....	21
Preparación de las muestras de los cultivos primarios.....	23
Ensayo de TUNEL	23
Cuantificación de la actividad de caspasa 3	23
Western Blot	25
Análisis densitométrico.....	26
ELISA para IGF-1	26
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS	27
Caracterización celular de los cultivos primarios de bolsa de Fabricio.....	33
Efecto comparativo de GH e IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio	33
Efecto de la inmunoneutralización de la GH sobre la viabilidad y actividad de caspasa 3.....	42
Efecto del suero normal de conejo sobre la viabilidad y la apoptosis.....	44
Efecto del anticuerpo contra GH (C2) sobre la viabilidad y la apoptosis.....	46
Efecto del inhibidor del receptor a IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis ..	48
Efecto de la inmunoneutralización de IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis	50
Efecto del inhibidor de la activación de PI3K sobre la viabilidad y la apoptosis	53

Determinación de la activación de la vía de PI3K/Akt a través del estímulo con GH.....	56
Determinación de la presencia de IGF-I en el medio de cultivo	58
Presencia de Bcl2 en células de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio	59
DISCUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA	73

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de bioquímica de hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM (campus Juriquilla, Querétaro).

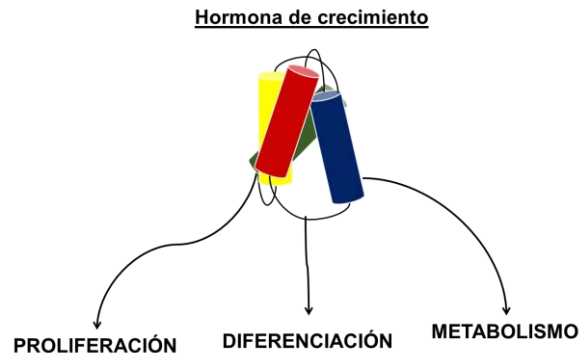
El proyecto se llevó a cabo con el apoyo de los donativos de PAPIIT-UNAM-IN205406 y CONACYT 60296 y 178335, así como de una beca de doctorado de CONACYT 200220

ANTECEDENTES

Hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) pertenece a una familia de proteínas con actividad hormonal que incluyen entre otras a la prolactina y al lactógeno placentario. La GH es sintetizada y secretada principalmente por los somatotrópos del lóbulo anterior de la glándula hipófisis. (Millar W.L., Eberhardt N.L., 1983). Esta hormona, denominada también somatotropina, despliega efectos que promueven la diferenciación y proliferación celular sobre sus órganos blanco (Thorner M.O., 1998), que puede llevarse a cabo tanto de forma directa, como a través del papel mediador de péptidos conocidos como IGF-I e IGF II (factores de crecimiento insulinoide del tipo I y II, respectivamente) (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995a). Además de su efecto somatotrópico, la GH muestra otros tipos de bioactividades, entre ellas se pueden mencionar las siguientes: lipolítica (Arámburo C. et. al., 1989), diabetogénica (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995b), similar a insulina (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995b), y actividad lactogénica (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995c) en humano. También inhibe la lipogénesis inducida por insulina (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995d) y la lipólisis inducida por epinefrina (Harvey S., Scanes C.G., Daughaday W.H., 1995d). Se ha postulado que la amplia diversidad funcional de esta hormona podría explicarse, al menos parcialmente, por la heterogeneidad estructural asociada a esta molécula (Lewis U.J., 1984). Ahora se conoce que la GH en realidad está constituida por una familia de proteínas similares, pero no idénticas, conocidas como variantes o isoformas de la hormona de crecimiento (Baumann G., 1991). Estas formas pueden generarse a partir de diversos mecanismos, por ejemplo: a) por la multiplicidad génica en algunos organismos (GH normal y GH variable); b) a través del procesamiento diferencial del ARNm de GH (que da origen a las formas 22, 20, 17.5 KDa); c) por modificaciones postraduccionales (fosforilación, glicosilación, amidación, proteólisis limitada y oligomerización, entre otras). Se ha descrito que algunas de estas

variantes pueden tener bioactividades discretas no compartidas por otros miembros de la familia (Baumann G., 1991). Un ejemplo claro de lo anterior se observa en el estudio hecho por Arámburo, Campbell y Scanes en el cual se determinó que existen diferencias en la bioactividad de dos variantes de carga de la GH ($R_f=0.22$ y $R_f=0.30$), donde la variante de 0.22 tuvo una actividad lipolítica significativamente mayor que la variante de 0.30 (Arámburo C. et. al., 1989), mientras que esta última tuvo una actividad anti-lipolítica.



Esquema 2. Efectos de la hormona de crecimiento sobre la fisiología celular

Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento

La secreción hipofisaria de la GH está regulada multifactorialmente por diversos mediadores y efectores, entre los que sobresalen los péptidos hipotalámicos: somatostatina (SRIF), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y la tiroliberina (TRH), quienes participan inhibiendo o estimulando la secreción de la hormona a partir de los somatotropos de la hipófisis anterior (Inzucchi S.E., and Robbins R.J., 1993). También, la secreción está regulada a través de asas que son sensibles a las concentraciones circulantes de otros compuestos importantes, como las hormonas tiroideas, el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I), la glucosa, los aminoácidos y las hormonas esteroides entre otras (Inzucchi S.E., and Robbins R.J., 1993). La GH es secretada en varios pulsos discretos a lo largo del día, siendo más abundante durante la etapa 3 y 4 del sueño de ondas lentas (Inzucchi S.E., and Robbins R.J., 1993). Durante el desarrollo de los organismos la producción mayor de GH ocurre durante la pubertad, aunque la secreción persiste después de la completa maduración del sistema óseo y luego declina de manera sostenida con la edad (Inzucchi S.E., and Robbins R.J., 1993). El patrón de secreción de GH en los adultos está caracterizado por pulsos

que son cada vez menores y más pequeños en amplitud. Ello se acompaña concomitantemente, con la disminución de los niveles circulantes de IGF-I. (Inzucchi S.E., and Robbins R.J., 1993).

Sistema inmune y hormona de crecimiento

Desde hace algún tiempo se conoce que la GH puede modular la actividad del sistema inmune y se ha demostrado que algunas células componentes de dicho sistema son capaces de producir GH (Kelly P.A., 1991). Estudios realizados 70 años atrás revelaron que la remoción quirúrgica de la glándula hipófisis resulta en atrofia tímica y aunque el papel del timo como una fuente de linfocitos T no fue apreciado en ese momento, este trabajo fue de los primeros en sugerir una asociación entre el sistema inmune y el endocrino (Smith P., 1930). En años posteriores surgió más evidencia de la unión funcional entre el sistema inmune y el endocrino obtenida de estudios que mostraban que el desarrollo y función de los linfocitos era deficiente en el modelo de ratón enano Snell; esta línea de ratones tiene defectos en la producción de PRL (prolactina), GH, IGF-I y hormonas tiroideas debido a una mutación en el gen que codifica para pit-1, factor de transcripción que regula el desarrollo de la hipófisis y la síntesis de PRL, GH y TSH (hormona estimulante de la tiroides) en las células de la hipófisis anterior (Baroni C.D., 1967; Baroni C.D. et al., 1967). En particular se observó que la GH tiene diversos efectos sobre el sistema inmune en experimentos *in vivo* en ratas y ratones, tanto infantiles como senescentes, a los cuales se trató con GH, encontrándose un incremento de la tasa de crecimiento y el número de células del timo, además de que revirtieron o previnieron la involución y estimularon la repoblación del tejido cuando a los animales se les indujo daño tisular por radiación (Buul-Offersa S.C., and Kooijman R., 1998). Más evidencia del papel de la GH como molécula inmunomoduladora proviene de trabajos realizados en linfocitos B y T maduros usando modelos de roedores deficientes en GH, por ejemplo: en ratas hipofisectomizadas y en ratones enanos Snell. Se observó un incremento en el peso del bazo cuando se les administró GH, así como un aumento en el número de linfocitos T y B, además de un incremento en la actividad de las células NK (*natural killers*) al compararlas con los no tratados (Buul-Offersa S.C., and Kooijman R., 1998).

Por otra parte, se observó la expresión de GH y de su receptor (GHR) en células leucémicas humanas y en leucocitos de sujetos normales, aunque este último fue encontrado principalmente en las células B y con una variación significativa entre individuos (Hattori N., et. al., 2001). La administración de GH exógena también regula directamente de manera positiva la secreción local de GH por células mononucleares de sangre periférica humana (Hattori N., et. al., 1993). Además, se demostró que la GH se sintetiza independientemente de GHRH en este mismo modelo (Hattori N., et. al., 2001).

Se ha determinado que la GH puede ejercer efectos antiapoptóticos y promover la proliferación en células mononucleares de sangre periférica de humano cuando estas son sometidas a estrés por radiación, y que los efectos antiapoptóticos son mediados por la proteína de células de linfoma 2 y 3 (Bcl 2 y 3), (Lempereur L., et. al., 2003). Estos antecedentes nos permiten destacar el papel de la GH en la modulación del sistema inmune y, en específico, en los procesos de apoptosis que se llevan a cabo en este sistema.

En este trabajo se utilizó la bolsa de Fabricio, un tejido linfoide primario exclusivo de las aves, como un modelo para evaluar la apoptosis. El papel de la bolsa de Fabricio es llevar a cabo la maduración de las células B inmaduras. También sirve como un sitio para el procesamiento de antígenos y desarrollo de la respuesta inmune humoral, así como el sitio primario para la diferenciación de las células B y la diversificación de las inmunoglobulinas. En este último efecto, los mecanismos apoptóticos están involucrados en la selección de linfocitos B para generar un repertorio de células inmunocompetentes (Compton M., and Waldrip H.M., 1998). Trabajos previos han demostrado que los linfocitos de la bolsa de Fabricio de pollo llevan a cabo una activación endógena de la apoptosis cuando se encuentran en cultivo (Schmitz G.G., et al. 1991; Neiman P.E., et. al., 1991). También se ha descrito que tanto la GH como su receptor se expresan en la bolsa de Fabricio (Luna M., et. al. 2005; Luna M., et. al., 2008). Además se encontraron diferencias entre la distribución del ARNm de GH y la proteína que expresa. El ARNm de GH se encontró principalmente en la corteza donde se encuentran principalmente los

linfocitos B progenitores, mientras que la GH inmunorreactiva (GH-IR) se encontró principalmente en la médula, lugar donde maduran los linfocitos B (Hull K.L., et. al. 1996; Luna M., et. al. 2005; Luna M., et. al., 2008). Más aun, se ha determinado que la concentración de la GH cambia durante la ontogenia. Se encontró que el ARNm de la GH se expresa principalmente en las capas y protuberancias epiteliales en el día 15 embrionario mientras que a las 2 semanas posteclosión se encontró ampliamente distribuida dentro del folículo y el epitelio interfolicular. A las 10 semanas hubo una disminución del ARNm de GH en el epitelio y a las 20 semanas solamente se observó en algunas células corticales y en el tejido conectivo. También es relevante mencionar que se observó colocalización considerable con IgM pero muy escasa con IgG durante la embriogénesis, mientras que lo opuesto ocurrió en las etapas posteclosión, lo cual sugiere un papel de la GH en el desarrollo del sistema inmune del pollo (Rodríguez-Méndez A.J., et. al., 2010). Por otra parte, el patrón de heterogeneidad de la GH durante el desarrollo en la bolsa de Fabricio mostró que la proporción relativa de la isoforma de 17kDa fue más alta (45-58%) en etapas posteclosión que en embriones de 15 y 18 días (21 y 19% respectivamente). En el caso de la isoforma de 26kDa estuvo presente en una menor proporción (menos del 4%) en fases embrionarias mientras que en etapas posteclosión se incrementó a 12-20%. Las isoformas de 37,40 y 45kDa estuvieron presentes de manera abundante (30% en el día embrionario 13, y 52% y 55% en los días embrionarios 15 y 18, respectivamente) e inversamente en pollos neonatos y juveniles las variantes solo contaron menos del 5% del total, todo esto indica cambios tejido-especificos y relacionados con la edad en la composición y contenido de la GH en los tejidos inmunes del pollo en los cuales es posible que exista una regulación parácrina o autócrina (Luna M., et. Al., 2005)

El desarrollo de la bolsa de Fabricio se puede dividir en tres fases de desarrollo posteclosión: a) una primera fase de crecimiento rápido (desde el primer día posteclosión hasta las 4 semanas) caracterizado por una gran proliferación y aumento de peso del tejido; b) una fase estacionaria (desde las 5 semanas de edad hasta las diez semanas) donde disminuye la tasa de crecimiento; y c) la tercera etapa es caracterizada por una involución del tejido (desde las 11 hasta las 20 semanas al inicio de la madurez sexual) en donde se ha determinado que la tasa de apoptosis se incrementa de manera significativa, indicando a la apoptosis como el proceso responsable de la regresión del tejido (Rodríguez-Méndez A.J., et. al., 2010).

Hormona de crecimiento y apoptosis

El control del desarrollo, crecimiento y eventual destrucción de los tejidos en los organismos vivos está finamente regulado por una variedad de procesos que interactúan de manera compleja a través de múltiples factores y mecanismos, uno de ellos, que posee gran importancia, es el que corresponde a la muerte celular programada, la cual se compone de una secuencia de eventos basados en el metabolismo que lleva finalmente a la destrucción celular (Susan L.F., and Brad T.C., 2005). La apoptosis (un tipo de muerte celular programada) es el resultado de una serie de eventos que involucran varias familias de proteínas que están altamente conservadas a lo largo de la evolución. El inicio de este proceso biológico no solamente está dado por daño celular o del material genético sino que también es importante durante el desarrollo de los tejidos y para mantener la homeostasis del organismo. Algunos defectos en la regulación del programa apoptótico pueden causar la acumulación de células inmortales, mientras que su carencia puede llevar a anomalías en el desarrollo de las extremidades, enfermedades autoinmunes y neoplasias entre otras; por otro lado un exceso de células apoptóticas puede provocar por ejemplo: enfermedades neurodegenerativas, neuromusculares o de inmunodeficiencia. (Delhalle S., et. al., 2003).

Originalmente, el término apoptosis fue definido puramente sobre aspectos morfológicos y por tanto este nombre fue aplicado a todo aquello que tuviera alguna característica estructural que indicara algún tipo de muerte celular programada. Sin embargo, conforme se han conocido mejor los mecanismos bioquímicos responsables de generar cambios que ocurren en la morfología celular, el término apoptosis se asoció con una amplia variedad de significados. Para evitar confusiones, de manera simplificada se ha propuesto que la apoptosis sea definida como la muerte celular programada mediada por las enzimas caspasas y que muestre las siguientes características morfológicas: condensación nuclear y citoplasmática, rompimiento de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y mantenimiento de una membrana plasmática intacta (Lieberthal W., et. al., 1998). Específicamente la definición molecular de la apoptosis puede estar basada sobre la actividad proteolítica de ciertas caspasas (caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) ya que estas enzimas median el proceso de la muerte celular apoptótica. En cultivos de células de vertebrados, la apoptosis puede ser inducida por una gran variedad de

señales proapoptóticas y estrés celular, incluyendo el retiro de factores de supervivencia [Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento epidermal (EGF), PRL, GH, IGF-I], y puede ser prevenida suplementando al medio con suero o algunos de los factores presentes en el mismo (IGF-I, GH, PRL, VEGF) (Lieberthal W., et. al., 1998). Las citosinas constituyen uno de los grupos de factores de supervivencia celular mejor caracterizados y se ha planteado que la GH pueda actuar como una citosina (Costoya J.A., et. al., 1999). Existen evidencias de que la GH puede tener efectos sobre la supervivencia celular tanto *in vivo* como *in vitro*. En un trabajo realizado en cerebros de ratas macho adultas, en donde los animales fueron tratados con GH, GHRP-6 (péptido liberador de la hormona de crecimiento) o solución salina como control, que se administraron a través de una cánula colocada en la vena yugular, se determinaron los niveles de fosforilación de la proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2 (BAD) mediante Western blot, los niveles de ARNm de IGF-I mediante RT-PCR y el nivel de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL en cortes histológicos, y se demostró que tanto el tratamiento con GH como GHRP-6 estimularon la expresión de IGF-I local por una parte e inhibieron la apoptosis en el tejido. Se propuso que uno de los mecanismos responsables de ese efecto fue a través de la vía de fosfatidilinositol 3'-OH cinasa/serina-treonina cinasa (PI3K/Akt) y la inactivación de BAD de manera directa o indirecta, a través de IGF-I (Frago L.M., et. al., 2002). Por otra parte también se determinó, en cultivos primarios de células de la granulosa de bovinos tratadas con GH (0-10µg/ml) en presencia o ausencia de inhibidores de PKA (proteína cinasa A), a través del ensayo de TUNEL, que la GH es capaz de inhibir la apoptosis y que la vía que media este efecto es a través del sistema de PKA/cAMP, ya que en presencia del inhibidor el efecto de GH sobre la apoptosis fue anulado. (Sirotkin A.V., and Makarevich A.V., 1999).

Otro modelo usado para evaluar el efecto antiapoptótico de la GH corresponde a los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatal (células PC) y la línea celular de cardiomiocitos HL-1. En cultivos de células PC se determinó, a través de la tinción de H^oechst que las células tratadas con 1 µg/ml de GH en medio sin suero y analizadas en microscopio de fluorescencia, que el número de células apoptóticas disminuyó al comparar con los cultivos en el grupo control, los mismos hallazgos se corroboraron usando el análisis de fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa; y además se observó por citometría de flujo a través del ensayo de TUNEL, que la GH tuvo un efecto antiapoptótico sobre los cultivos de las células

HL-1(21) (González-Juanatey J.R., et. al., 2004). En otro estudio, usando las líneas celulares del sistema inmune INS-1 e INS-1E de células β pancreáticas productoras de insulina se describió un efecto antiapoptótico de GH que es mediado a través de la vía JAK/STAT (Jensen J. et. al., 2005). Para evaluar el efecto de la GH se realizaron cultivos de las líneas celulares pancreáticas tratadas con distintas citosinas [Interleucina 1- β (IL-1- β), Interferon- γ (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)], para inducir apoptosis, y se incubaron en presencia o ausencia de GH (500 ng/ml). Para determinar si el efecto antiapoptótico de GH estaba mediado por la vía JAK/STAT las células fueron transfectadas con la mutante dominante negativa de STAT5, o solo el vector como control. Los resultados obtenidos por citometría de flujo a través del ensayo de anexina V y la incorporación de yoduro de propidio (PI) como un marcador doble determinante de apoptosis tardía, indican que la GH tiene mayor efecto antiapoptótico sobre las células que tenían el tratamiento combinado de las citocinas (Jensen J., et. al. 2005). Estos datos nos indican que la GH tiene efectos antiapoptóticos en diversos tipos celulares, incluyendo al sistema inmune al cual nos abocaremos en el siguiente párrafo.

Se evaluó el efecto antiapoptótico de la GH en cultivos celulares de neutrófilos, monocitos y linfocitos de sangre periférica de humano a través del análisis de fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa y citometría de flujo, y se observó que en los cultivos tratados por 12 horas con concentraciones de 100 ng/ml de GH se inhibió la apoptosis en neutrófilos (Matsuda T., et. al., 1998). También, en la línea celular EL4 de linfoma de células T a las cuales se les hizo sobre-expresar GH, además de ser tratadas con metilmetanosulfonato (MMS) para inducir apoptosis, se les evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa para determinar fragmentación de ADN, así como con micro-arreglos para determinar la expresión de Bax, BAD y las caspasas 3, 8, y 9. Los resultados indicaron que las células que producían un exceso de GH mostraron una importante reducción en la fragmentación del ADN, un indicativo del efecto inhibitorio sobre la apoptosis, y también se observó que la GH inhibió expresión de BAD, Bax y caspasas 3, 8 y 9 (Arnold R.E., and Weigent D.A., 2004). En otra línea celular de precursores de

linfocitos B (Ba/F3) que normalmente no expresan el receptor a GH se demostró a través del análisis de contenido de ADN por incorporación de yoduro de propidio cuantificado por citometría de flujo, que las células transfectadas que expresaban el receptor funcional a GH en presencia o ausencia de tratamientos de bGH (1 µg/ml) presentaban una disminución en la proporción de células en apoptosis de hasta un 73%, lo cual sugiere que el efecto de la GH no solo es endocrino sino también parácrino y/o autócrino (Jeay S., et. al., 2000).

Específicamente en el modelo de células ganglionares retinales de embrión de pollo, se determinó que durante el desarrollo la GH tiene efectos antiapoptóticos al inhibir la proteólisis de caspasa 9 y 3. Además, estos efectos son mediados por las vías dependientes de la proteína cinasa B y la activación de estas vías convergen en la unión de CREB a los sitios responsivos de la activación de AMPc (Sanders E.J., et. al., 2008).

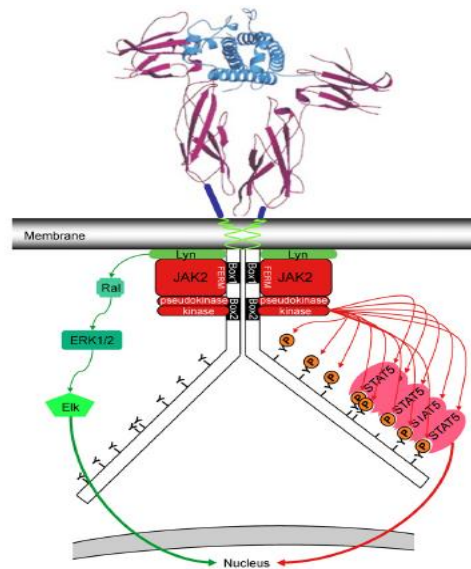
Estructura de la hormona de crecimiento

La estructura primaria de la GH contiene alrededor de 191 aminoácidos (aunque existen variaciones en número de residuos de especie a especie) y posee una masa molecular de aproximadamente 22 kDa. Contiene dos enlaces disulfuro y 4 α-hélices en su estructura primaria (Arámburo C. et. al., 2001). Las α-hélices (1, 2, 3 y 4) están localizadas entre los residuos 9 – 34, 72 – 92, 106 – 128 y 155 – 184 en la hGH y se encuentran muy conservadas en la escala evolutiva. Generalmente los puentes disulfuro se encuentran entre los residuos de Cys₅₃ – Cys₁₆₅ y Cys₁₈₂ – Cys₁₈₉ (Kopchick J.J., 2003).

Receptor de la hormona de crecimiento

La GH ejerce sus efectos a través de su receptor (GHR), el cual pertenece a la familia de las citocinas tipo I. El GHR consiste de dos dominios de fibronectinas tipo III β unidas por un conector flexible. Estos dominios están conectados también a un único dominio tipo-hélice transmembranal a través de un conector flexible. El dominio intracelular está compuesto de los motivos denominados caja 1 y 2, a los cuales se une la tirosina cinasa JAK2 (*Janus kinase 2*), así como algunos residuos de tirosina que son sustratos para la fosforilación por JAK2 a través de la cual estos

residuos fosforilados se vuelven sitios de unión para proteínas con el dominio SH2 (Brooks A.J., et. al., 2007).



Esquema 1. Estructura tridimensional de la hormona de crecimiento (estructuras alfa hélices azules) y unión con su receptor (estructuras beta laminas rojas), así como la asociación de proteínas transductoras en el dominio intracelular. (Brooks A.J., et. al., 2007).

Vías de transducción de señales en las acciones de hormona de crecimiento

Los efectos de la hormona de crecimiento son mediados a través de su receptor. El receptor de la hormona de crecimiento se encuentra como un homodímero en la superficie de la membrana celular (Schmitz G.G., et. al. 1991, Compton M., Waldrip H.M., 1998). Cuando la GH se une al receptor dimerizado induce un reposicionamiento de los dominios intracelulares que resultan en la activación de las tirosina-quinasa asociadas y la progresión de la vía de señalización. (Brown R.J., et. al., 2005; Gent J., et. al., 2002).

El receptor a hormona de crecimiento (GHR) pertenece a la clase I de la familia de receptores de las citocinas, los cuales no poseen actividad tirosina-quinasa intrínseca y por ende utilizan tirosina-quinasa asociadas al receptor para continuar la transducción de señales. La proteína Janus cinasa 2 (JAK2) es un componente importante de la transducción de señales de la GH. JAK2 está asociada a los motivos ricos en prolina llamados Box 1 en los dominios intracelulares del GHR, a través del dominio FERM de JAK2 que se encuentra en su parte amino terminal. Cuando la GH no está unida a su receptor se propone que el dominio JH2 de JAK2

interactúa con el dominio JH1 de esta cinasa y los inhibe, lo cual da como resultado la forma inactiva de JAK2. La unión de GH a su receptor causa una reorientación estructural del mismo, que a su vez conlleva a la reorientación estructural de JAK2 y por tanto la disrupción de la habilidad de JH2 para inhibir JH1 permitiendo la activación de JAK2. Una vez que JAK2 se activa, fosforila los residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor. Estos residuos proveen sitios de anclaje para proteínas con el dominio de homología a Src 2 (SH2). En particular para las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 5a y 5b (STAT5a y 5b). Estas proteínas una vez ancladas son fosforiladas por JAK2, se dimerizan y se translocan al núcleo para unirse a elementos responsivos a STAT y activar la transcripción (Inle J.N. and Gilliland D., 2007; Waters M.J., et. al., 2006).

Existe evidencia que la señalización de GH puede iniciarse de manera independiente a JAK2 a través de otras proteínas de la familia Src (Zhu T., et. al., 2002). Esto está ligado a la activación de las cinasas reguladas extracelularmente tipo 1 y 2 (ERKs). En células NIH 3T3 se ha demostrado que GH activa a c-Src, el cual a su vez activa a las GTPasas pequeñas similares a Ras (Ral1A y B), que lleva a la activación de las ERKs $\frac{1}{2}$ y a la transcripción mediada por Elk-1 (Zhu T., et. al., 2002). También se ha demostrado en células precursoras de linfocitos B de roedores que GH activa la vía de ERK1/2 a través de Lyn, que pertenece a la familia de proteínas Src (Zhu T., et. al., 2002).

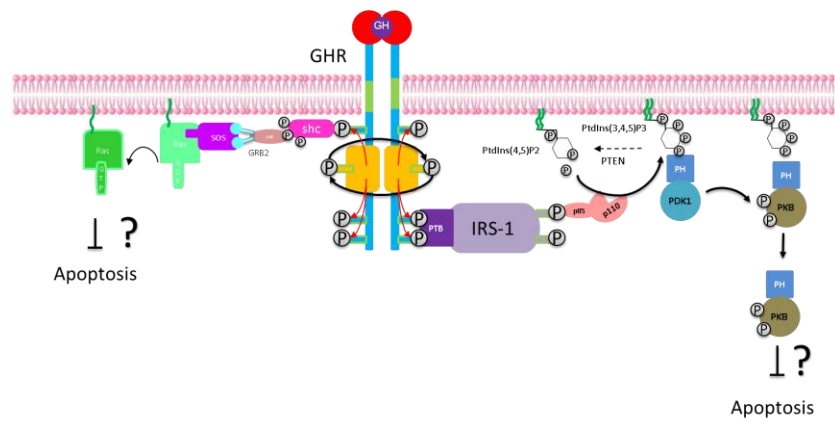
Otra vía de transducción que es activada por la GH es la de Ras/MAPK. Esta vía se ha propuesto que inicia cuando la activación de JAK2 induce la unión de la proteína adaptadora Shc al complejo GHR/JAK2 (Zhu T., et. al., 2001). Ello induce la unión de Grb2 y del factor de intercambio de nucleótidos SOS. A su vez, SOS induce la actividad de Ras, que activa a Raf, que a su vez activa a la cinasa activada por mitógenos, que finalmente lleva a la activación de ERK1/2 (Winston L.A., Bertics P.J., 1992).

Además de las vías señaladas anteriormente se ha demostrado que GH induce la activación de la vía de fosfatidilinositol cinasa 3 y la proteína cinasa B (PI3K/Akt) (Jeay S., et. al., 2001). Uno de los mecanismos propuestos para la activación de

esta vía es a través de la fosforilación de la proteína designada sustrato del receptor de insulina (IRS). La fosforilación de IRS induce la unión de PI3K a esta proteína y la posterior conversión de los fosfolípidos fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol trifosfato (PIP₃). Estos fosfolípidos permiten el anclaje de Akt a la parte intracelular de la membrana y la translocación permite que las cinasas PDK fosforilen a Akt. Una vez activada Akt puede fosforilar a diversos sustratos, entre ellos moléculas involucradas con vías apoptóticas como son caspasa 9 y Bad (Jeay S., et. al., 2001).

Estas vías de señalización median los efectos de la GH a nivel intracelular y la identificación de cuál mecanismo específico media un efecto en particular en un tipo celular nos permite entender como un mensajero puede tener una gran cantidad de efectos sobre la fisiología de los organismos. En particular en este trabajo se pretende entender qué mecanismos median los efectos de la GH sobre la apoptosis en el sistema inmune.

Todos estos antecedentes nos permiten sugerir que la GH tiene un papel en la modulación del sistema inmune, tanto en la proliferación como en el desarrollo de los diferentes tejidos de este sistema. Específicamente, la GH tendría la capacidad de inhibir la apoptosis en células del sistema inmune y, en el caso de la bolsa de Fabricio, la GH parecería tener un papel funcional a lo largo de la ontogenia de este tejido e inhibir la apoptosis en estas células. Existen diversos mecanismos que pueden mediar dichos efectos y en este trabajo nos abocaremos a determinar qué procesos intervienen en la inhibición de la apoptosis en las células de la bolsa de Fabricio.



Esquema 3. Representación de las posibles vías de transducción de señales involucradas en la inhibición de la apoptosis (Modificada de Baltazar L.R., 2015, tesis de licenciatura)

Planteamiento del problema

La GH puede inhibir la apoptosis en células de cultivos primarios de linfocitos de la bolsa de Fabricio. Se ha demostrado que los mecanismos involucrados en los efectos antiapoptóticos de la GH pueden ser ejercidos de manera directa por la GH. También, se ha determinado que en células de la línea Ba/F3 (precursores de linfocitos B de ratón) la GH inhibe la apoptosis a través de la vía de señalización de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) /Proteína cinasa B (Akt). Por tanto con el fin de ahondar en los mecanismos que median los efectos de la GH en las células de la bolsa de Fabricio se ha planteado la siguiente hipótesis.

Hipótesis

La hormona de crecimiento ejerce sus efectos antiapoptóticos de manera directa a través de la vía de PI3K/Akt.

Objetivo general

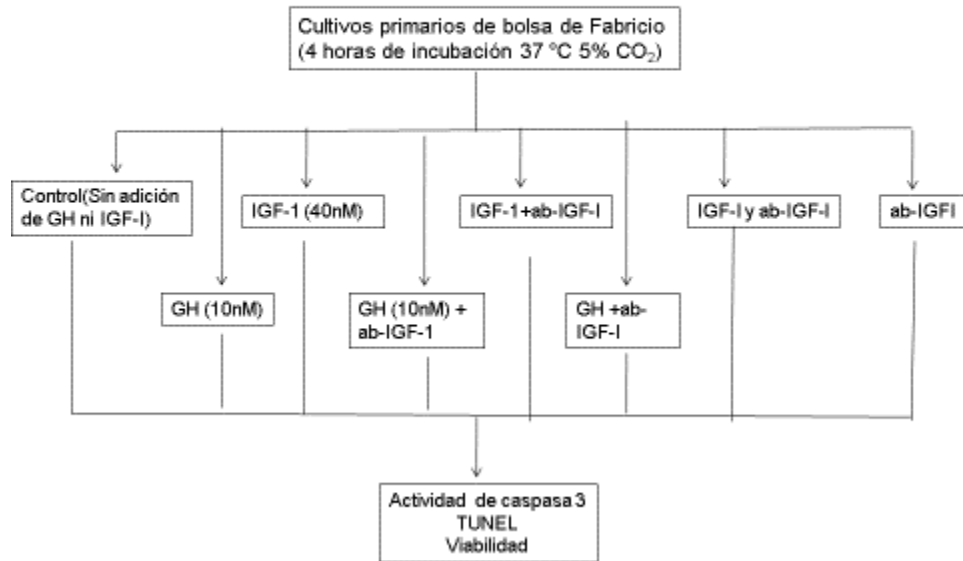
Determinar qué mecanismos moleculares están mediando el efecto antiapoptótico de la GH en cultivos primarios de células de la bolsa de Fabricio de pollo.

Objetivos particulares

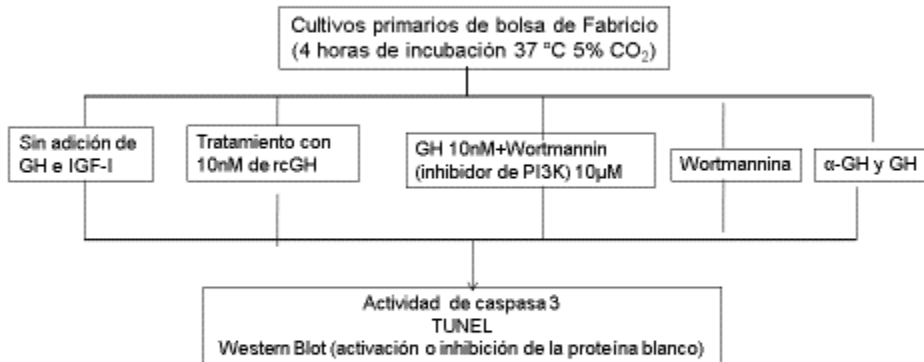
- Determinar en cultivos de células de la bolsa de Fabricio de pollo si el efecto de la GH es directo o mediado a través de IGF-I.
- Establecer cuál o cuáles vías de señalización son activadas por la GH en las células de la bolsa de Fabricio, así como el tiempo de activación óptima.
- Determinar cuál vía de señalización media los efectos antiapoptóticos de la GH.

Diseño experimental

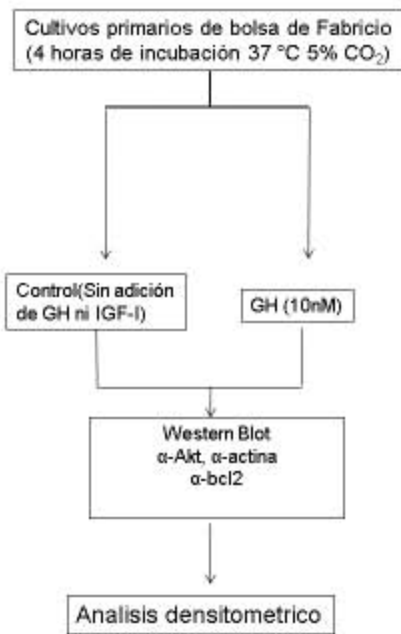
Determinar en cultivos de células de la bolsa de Fabricio de pollo si el efecto de la GH es directo o mediado a través de IGF-I.



Determinar cuál vía de señalización media los efectos antiapoptóticos de la GH.



Establecer cuál o cuáles vías de señalización son activadas por la GH en las células de la bolsa de Fabricio, así como el tiempo de activación óptima.



MATERIALES Y METODOS

Modelo experimental

Se utilizaron pollos machos de raza White Leghorn, de la línea Ross, obtenidos de las granjas Abrego en la ciudad de Querétaro, Querétaro, de 4 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el aviario del Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo un ciclo de luz oscuridad de 12 horas y con acceso a comida comercial y agua *ad libitum*. Los pollos fueron sacrificados por decapitación (siguiendo el protocolo aceptado por el Comité de Bioética del Instituto), se les extrajo la bolsa de Fabricio (BF) de manera aséptica y los tejidos fueron colocados en medio de Hank (Invitrogen No. cat. 14170-120) con un 1% de estreptomicina/penicilina

Obtención, dispersión y cultivo de células de la bolsa de Fabricio

Se sacrificaron pollos de 4 semanas de edad y se colectaron las BF de manera aséptica con pinzas y tijeras estériles. El tejido fue colocado en 10 ml de medio de Hank para transportarlo y ya en condiciones estériles en la campana de flujo laminar se descartó el medio y se agregaron 10 ml de medio de Hank para lavar el tejido, esto se repitió dos veces más. El tejido fue entonces colocado en una caja petri estéril con medio RPMI 1640 (Sigma R8758) y fue fragmentado en pedazos de aproximadamente 1 mm³ con bisturí. Estos fragmentos se pasaron a un homogeneizador de vidrio (Wheaton) y se homogeneizaron con 15 a 20 golpes con el pistilo de vidrio. El homogeneizado fue filtrado con una malla de 40 µm de poro (Biochem No. cat. 2340) a otro tubo y fue centrifugado a 300x g por 5 minutos (centrifuga Beckman Coulter rotor de 1.12 r a 1800 rpm). Posteriormente, la pastilla fue resuspendida y filtrada de nuevo. Se centrifugó y resuspendió con 5 ml de medio RPMI 1640 y se realizó un conteo celular utilizando un hemocitómetro (Houser Scientific Horsham), en el cual se contó el número de células de las cuatro áreas de la cuadrícula de la cámara y se obtuvo un promedio del número de células por área. El promedio fue multiplicado por la dilución (1:20) y por 10,000 para obtener el número de células por mililitro. Para realizar el ensayo de viabilidad con azul de tripano (Allied chemical and dye corporation No. cat 477) una alícuota de la suspensión celular se diluyó 1:10 v/v con medio y a 20 µl de esa dilución se les agregaron otros 20 µl de azul tripano, de esta mezcla se tomaron 10µl y se colocaron

en el hemocitómetro, se realizó el conteo celular como ya se describió, pero además se contaron las células teñidas con el colorante vital. Se sumó el número de células no teñidas y se dividió entre la suma de las células teñidas con azul de tripano y las células no teñidas para obtener el porcentaje de viabilidad.

Los cultivos fueron tratados con 10 nM de hormona de crecimiento de pollo de origen recombinante (rcGH, recombinant chicken Growth Hormone, American Cyanamid, Princeton, NJ, USA Lot-100) o bien con 1, 10 y 40 nM de IGF-I, así como un tratamiento conjunto de 40nM de IGF-I y 10nM de GH, respectivamente, preparándose de la manera siguiente: Después del conteo celular y el análisis de viabilidad en el tiempo 0, se procedió a realizar una dilución de la suspensión original de células para tener aproximadamente 4×10^6 cel/ml por tubo de cultivo en un volumen de 1 mililitro. Las células fueron incubadas por 4 horas a 37 °C y una atmósfera con 5% CO₂ en la incubadora (Nuair US autoflow). Al terminar el tiempo de incubación se realizó el conteo celular y el análisis de viabilidad como ya se describió anteriormente. El resto de las células fue centrifugado, retirado el medio y congelado a -70 °C.

Tratamientos

Los cultivos de células B fueron sometidos a los siguientes tratamientos: a) vehículo, b) 10 nM rcGH (American Cyanamid, Princeton, NJ, USA Lot-100); c) 40 nM rhIGF-I (recombinant human IGF-1, Cat. # 4119-100, Biovision Inc, Milpitas, CA, USA); d) 100 nM wortmannin (Cat. # 681675, Calbiochem, La Jolla, CA, USA); e) 10 nM rcGH + 100 nM wortmannin; f) 10 nM rcGH + anticuerpo anti-rcGH (Ab α -GH CAP1; dilución 1:100) (Ahumada-Solórzano et al., 2012; Arámburo et al., 1989); g) 10 nM rcGH + anti-IGF-1 (anticuerpo policlonal de conejo α -IGF-I, dilución 1:100, IGF-1 (H70): sc-9013, dirigidos contra los aminoácidos 49-118 de IGF-I humano, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA); h) 40nM rhIGF-I + anticuerpo α -IGF-I (dilución 1:100); o i) anticuerpo α -IGF-I (dilución 1:100).

Inmunohistoquímica

Los cultivos celulares (5×10^5 células) fueron colocados en portaobjetos por centrifugación en una centrífuga para células (cytospin, 1000 rpm), y fijados con solución de Carnoy (60% etanol, 30% cloroformo, 10% ácido acético) por 30 minutos. Los portaobjetos fueron secados por un día. La inmunocitoquímica fue realizada usando anticuerpos policlonales contra el antígeno bursal 1a (Anticuerpo

α -Bu-1a FITC-conjugado, dilución 1:500, Serotec no. MCA2170F, Raleigh, NC, USA); contra inmunoglobulina M de pollo (Anticuerpo α -chicken IgM FITC-conjugated, dilución 1:500, Rockland no. 603102007, Limerich, PA, USA) y contra inmunoglobulina G aviar (Anticuerpo α -chicken/turkey IgG, dilución 1:100, Zymed Laboratories, Cat. # 613120, San Francisco, CA., USA). Previamente, las células a teñir con α -Bu-1A y α -IgM de pollo fueron permeabilizadas con 0.1 % Triton-X en amortiguador TPBS, pH 7.4, por 5 minutos y entonces fueron lavadas 3 veces con TPBS. Para aquellas laminillas a teñir con α -IgG pollo/pavo, las condiciones incluyeron la incubación con 1% H₂O₂ por 1 hora y 50% de metanol para bloquear peroxidasas endógenas. Posteriormente se agregó la solución de bloqueo (3% de leche descremada en PBS) por dos horas. Las células fueron lavadas 3 veces con TPBS y subsecuentemente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en 1% de leche descremada en TPBS, a temperatura ambiente. Terminada la incubación los portaobjetos fueron lavados (3 X 10min) con TPBS. Las células tratadas con α -IgG pollo/pavo como anticuerpo primario fueron subsecuentemente incubadas con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa hecho en cabra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a una dilución 1:200 en 1% de leche descremada en TBST, por dos horas a temperatura ambiente. Se realizó una tinción mediante la reacción con diaminobencidina (DAB) y H₂O₂. El revelado de color fue detenido al lavar con amortiguador PBS. Para marcar los núcleos, las células fueron contrateñidas con una solución de 300 nM 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS, por 30 minutos. Las células fueron montadas con medio de fluorescencia DakoCytomation (Dako, Inc., Carpinteria, CA, USA) y la cuantificación se realizó en un microscopio Olympus BX51, equipado con una cámara Cool-Snap-proCF. El análisis fue hecho empleando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Para determinar la proporción relativa de cada subpoblación, el número de células inmunorreactivas (α -Bu-1A, α -IgM, α -IgG, respectivamente) fue dividido entre el número total de células positivas a DAPI.

Preparación de las muestras de los cultivos primarios

Las células obtenidas de los cultivos primarios fueron resuspendidas en 100 µl de amortiguador de lisis (HEPES/NaOH 10 mM pH 7.4, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, e inhibidores de proteasas). Posteriormente las células fueron lisadas por sonicación (sonicador Fisher FSH9) por 5 minutos y luego fueron homogeneizadas con un 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.

Ensayo de TUNEL

Se colocaron alícuotas de 5×10^6 células en portaobjetos por centrifugación en la Cytospin a 500 rpm. Las células fueron fijadas como se describe arriba. Para el análisis de TUNEL (Gavrieli et al., 1992), los portaobjetos fueron lavados con PBS, tratados con proteinasa K (10 µg/ml por 10 min a temperatura ambiente) y posteriormente lavados con PBS. Las células fueron posteriormente incubadas con 50 µl por muestra de la mezcla de reacción de TUNEL (Roche Molecular Biochemicals) por 1 h at 37 °C en una cámara húmeda. Una vez incubadas las muestras fueron lavadas (3 x 5 minutos) en PBS y contrateñidas con DAPI en PBS por 30 minutos. Después de los lavados las muestras fueron montadas con el medio de fijación DakoCytomation fluorescentes y analizadas por microscopía de fluorescencia usando el software Image Pro Plus Software para su cuantificación. Para determinar la proporción de células apoptóticas, el número de células marcadas con TUNEL fue dividido entre el número total de células positivas a DAPI.

Cuantificación de la actividad de Caspasa 3

Para realizar la cuantificación de la actividad de caspasa 3 se utilizó el ensayo colorimétrico para caspasa 3 (Caspase-3 Colorimetric Assay Kit de Assay Designs No. de cat. 907-013 Ann Arbor, MI, USA, Cat. No. 907-1013). En la placa de 96 pozos (incluida en el estuche) se colocaron 50 µl de amortiguador activo de reacción de caspasa 3 (amortiguador de reacción de caspasa 3 y ditiotreitól) en los pozos blanco. En dos pozos de la placa se colocan 125 µl de calibrador de p-nitroanilina

(solución de p-nitroanilina 50 μ M en amortiguador de reacción de caspasa 3). Para hacer los estándares se utilizan 4 tubos donde se colocan 125 μ l del amortiguador de reacción activo de caspasa 3. Se reconstituye el frasco del estándar de caspasa 3 con el amortiguador de reacción activo de caspasa 3 (el frasco se toma como tubo 1). Se toman 125 μ l del tubo 1 y se pasan al tubo 2, se mezcla y 125 μ l del tubo 2 se pasa al tubo 3 y se repite lo mismo para el tubo 4 y el 5. Una vez hechos los estándares se pipetea 50 μ l de cada tubo por duplicado en cada pozo de la placa. Después de colocar los estándares se colocan 50 μ l de las muestras y en todos los pozos se pipetea (excepto en los pozos con pNA) 75 μ l del substrato de caspasa (incluido en el estuche), se mezcla suavemente, se cubre la placa y se incuba por 3 horas a 37 °C. Para detener la reacción se colocan 10 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 405 nm de longitud de onda. Para realizar la determinación de la actividad de caspasa 3 en las muestras se calcula el promedio neto de la densidad óptica (D.O.) 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:

Para determinar los valores de las muestras se grafican los valores de los estándares y se interpolan en la recta.

Western Blot

Las células (4×10^6) fueron lisadas por sonicación (15 min, Fisher Scientific FS9H) en Tris-HCl conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Mini-complete, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), 1 mM PMSF, pH 9.0. Los lisados fueron centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos y se colectaron los sobrenadantes. El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad). Las muestras fueron entonces concentradas (30 μ g de proteína) en un concentrador Savant (Instruments Inc. Model RH 40-11, San Diego, CA, USA). Posteriormente, las muestras se analizaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5% (1.0 mm de grosor, 6 cm de largo), bajo condiciones reductoras (2-mercaptoetanol al 5%, p/v), usando el sistema de amortiguador descrito por Laemmli (1970), en una cámara mini-Protean II (Bio-Rad). Las muestras, así como los marcadores de peso molecular (5 μ l low molecular weight markers, Page Ruler Fementas Life Sciences, Glen Burnie, MD, USA) fueron corridos a 200 mV por 1 hora. Después de la electroforesis los geles fueron equilibrados en amortiguador de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, and 20% metanol (v/v); pH 8.3) por 30-60 min y electrotransferidos (200 mA, 1 h) a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas fueron lavadas por 5 minutos con TBS (30 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH7.5) y bloqueadas con 5% de leche descremada en TBS por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios, respectivamente, durante toda la noche: anticuerpos policlonales generados en conejo contra p-Akt (Cat. # Ab66138, Abcam, Cambridge, MA, USA, dilución 1:750), y contra IGF-I (IGF-1 (H-70): sc-9013, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA, dilución 1:750); o anticuerpos monoclonales generados en ratón contra Bcl-2 (Cat. # 13-8800, Invitrogen, Camarillo, CA, USA, dilución 1:1000), y contra actina (Cat. # sc-58673, Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:3000), los cuales fueron usados como control de carga. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS y después se incubaron con el anticuerpo secundario, ya sea anticuerpo generado en cabra anti-IgG de conejo acoplado con HRP (Cat. # 656120, Invitrogen) o anticuerpo generado en cabra anti-ratón IgG-HRP (Cat. # 616520, Invitrogen) en una dilución 1:3000 en 1% de leche descremada en TBS por 2 h, a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas fueron reveladas por la

incubación con reactivo quimioluminiscente ECL (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) por 1 min y expuestas a una película Kodak Biomax ML. Con el fin de cuantificar la proporción relativa de las bandas entre los tratamientos, se utilizó el método de “stripping” (Alba-Betancourt et al., 2013). En cada caso, la intensidad de las bandas de IGF-I, p-Akt o Bcl-2 fue normalizado por actina como control de cargado.

Análisis densitométrico

La proporción relativa de las bandas inmunorreactivas de IGF-I, p-Akt, Bcl-2 y actina se determinó por densitometría tras digitalizar los luminogramas en un scanner Cannon, empleando un software IP LabGel 2.2 (Scanalytics, Fairfax, VA, USA).

ELISA de IGF-I

La concentración de IGF-I fue cuantificada usando un estuche de ELISA competitivo, de fase sólida, para IGF-I (Mybiosource Inc., San Diego, CA, USA, Cat. # MBS739221). La sensibilidad del ensayo es 1.0 ng/ml, y los coeficientes de variabilidad (CV) fueron menores a 10% (Luna et al., 2015). Brevemente, las células (16×10^6) fueron lisadas por sonicación (15 min, Fisher Scientific FS9H) y suspendidas en PBS conteniendo inhibidores de proteasas (Mini-complete, libre de EDTA, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA, Cat. 1836170). Luego, 100 μ l de las alícuotas de muestra (correspondiendo a 500 μ g de los lisados de las proteínas de cada tratamiento), estándares y blancos (100 μ l de PBS) fueron pipeteados en la placa de 96 pozos por duplicado. Se agregaron 10 μ l y 50 μ l de conjugado a cada pozo y la placa fue incubada por 1 h a 37 °C. Más tarde, la placa fue lavada (5 x) y se añadieron 50 μ l del substrato A y 50 μ l del substrato B a todos los pozos, y se incubó la placa por 15 minutos a 37°C. Finalmente, 50 μ l de la solución de paro fue agregada a cada pozo. La absorbencia fue inmediatamente leída a 405 nm en el lector de micro placas 3350-UV (Bio-Rad).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm SEM. El análisis estadístico entre los grupos se realizó usando la prueba t de Student, o bien ANOVA de una vía, seguido por la prueba *post-hoc* de Tuckey (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Solo los resultados con un valor de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Caracterización celular de los cultivos primarios de bolsa de Fabricio

Con el fin de identificar la proporción de linfocitos B presentes en los cultivos primarios de bolsa de Fabricio se realizó un estudio por inmunocitoquímica, empleando anticuerpos que reconocen: a) el antígeno bursal Bu-1 presente principalmente en células B, b) la inmunoglobulina M (IgM), para reconocer a células B inmaduras, y c) la inmunoglobulina G (IgG), como marcador de los linfocitos B maduros. Los cultivos se mantuvieron por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI 1640. La viabilidad de los cultivos fue de 95.31±0.8%.

Las micrografías muestran una alta proporción de células inmunorreactivas para Bu-1 (95.41±0.95%), mientras que las células inmunorreactivas a IgM fue de 24.8±8.4%, y las células inmunorreactivas a IgG tuvieron una proporción de 69.07±7.2%. Los resultados indican una población enriquecida de linfocitos B maduros en los cultivos primarios de Bursa. (Figura 1 y 2).

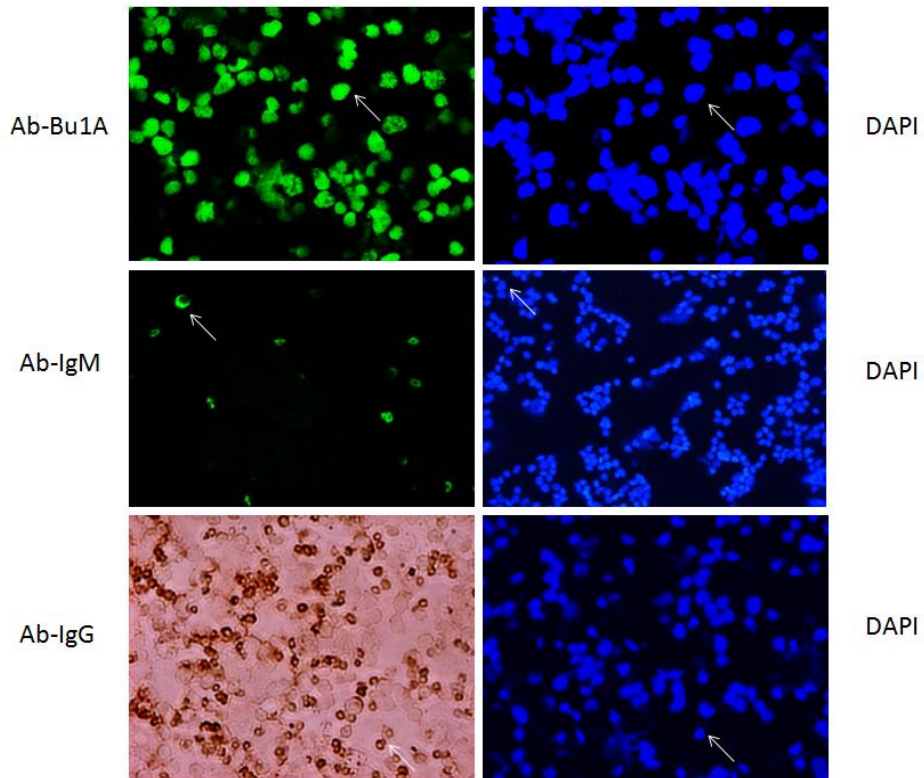


Figura 1. Micrografías de frotis de células de bolsa Fabricio incubadas con los anticuerpos: anti-Bu (α -Bu), anti-inmunoglobulina M (α -IgM) y anti-inmunoglobulina G (α -IgG). Las células fueron contrateñidas con DAPI.

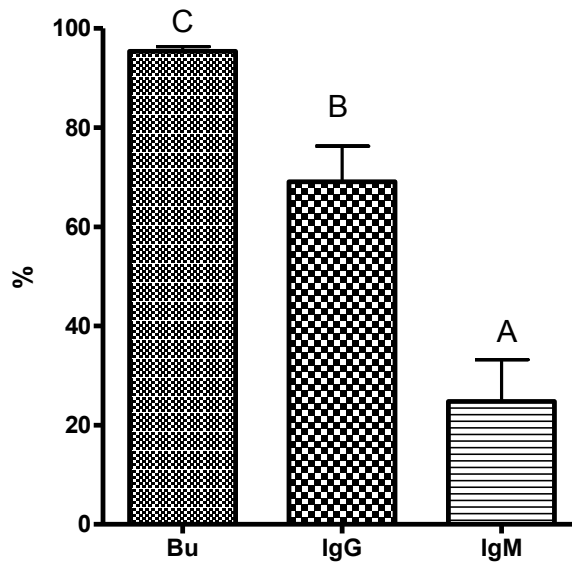


Figura 2. Cuantificación de la proporción de células inmunorreactivas a Bu-1, IgG e IgM. Cada barra representa la media y el error estándar (n=6, $P < 0.05$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto de IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio

Se realizaron cultivos primarios de la bolsa de Fabricio con el fin de evaluar el efecto de IGF-I sobre la viabilidad y determinar la concentración óptima para realizar los experimentos posteriores. Los cultivos fueron incubados por 4 horas en ausencia o presencia de 1nM, 10nM ó 40nM de IGF-I. Para determinar la viabilidad se realizó el ensayo de azul de tripano. Los resultados obtenidos muestran que con concentraciones de 10 y 40nM de IGF-I el delta de la viabilidad [Se considera delta (Δ) la diferencia en porcentaje entre el grupo control, tomado como 100%, y los grupos experimentales] es significativamente mayor que el control ($\Delta = 3.57 \pm 2.44\%$ y $\Delta = 6.85 \pm 2.63\%$ respectivamente), (figura 3). Este resultado nos permitió seleccionar la concentración de 40nM como la adecuada para realizar los tratamientos realizados en los experimentos posteriores.

Tratamientos	Media \pm SD (%)	delta (Δ)
Control	82.00 \pm 7.6	0
IGF-I 40 nM	88.85 \pm 7.1	6.85 \pm 2.63
IGF-I 10 nM	85.57 \pm 7.8	3.57 \pm 2.44
IGF-I 1 nM	85.00 \pm 3.5	3.00 \pm 2.1

Cuadro 1. Se muestran la viabilidad celular con sus medias y desviaciones estándar de los cultivos tratados con IGF-I (1nM, 10nM y 40nM) en comparación con el grupo control, y las Deltas correspondientes. Los cultivos fueron incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂.

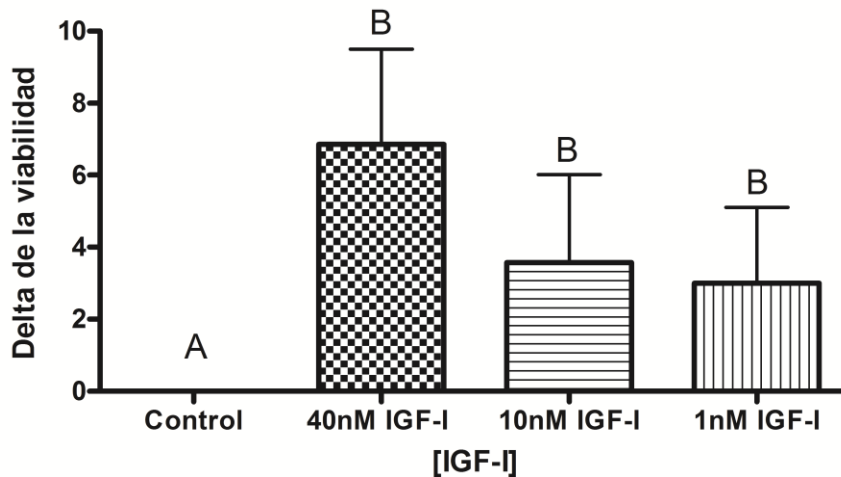


Figura 3. Delta de la viabilidad celular de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 1nM, 10nM, 40nM de IGF-I, o bien el control sin tratamiento, incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. (n = 5, P < 0.05 por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto comparativo de GH e IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio

Con el objetivo de determinar si el IGF-I tiene un efecto similar a GH sobre la viabilidad celular y la apoptosis en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio, éstos fueron incubados en ausencia o presencia de 10nM de GH o 40nM de IGF-I. Cuando se evaluó la viabilidad de los cultivos primarios se encontró que tanto el tratamiento con GH (10nM) como de IGF-I (40nM) estimularon un incremento significativo sobre la viabilidad ($\Delta=16.71\pm0.67\%$ y $\Delta=13.46\pm1.12\%$, respectivamente), en comparación con el control. Este resultado nos indica que IGF-I y GH tienen un efecto similar sobre la viabilidad en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio (figura 4).

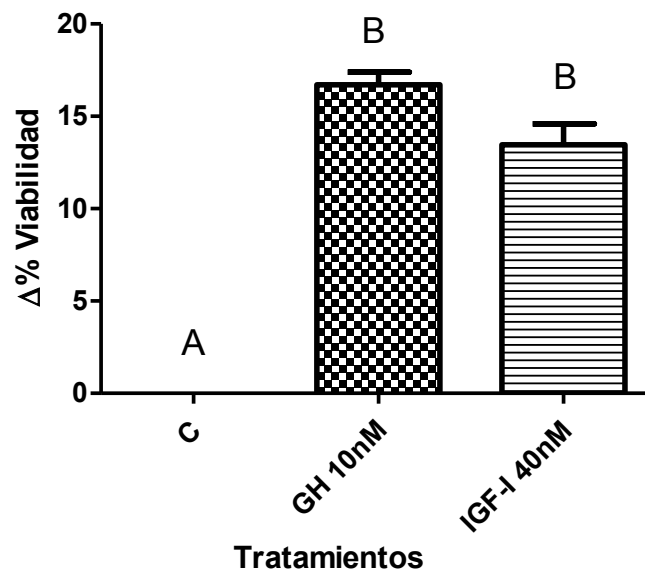


Figura 4. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 10nM GH o 40nM de IGF-I incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Cada barra representa la media y el error estándar de la delta de la viabilidad (n = 5, P < 0.05, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

En la figura 5 se muestra que la incubación de los cultivos con GH e IGF-I resultó en una disminución significativa de la actividad de caspasa 3 ($54.36 \pm 9.86\%$ y $60.82 \pm 9.45\%$, respectivamente) con respecto al control ($100 \pm 5.7\%$). Estos datos indican que GH así como IGF-I tienen una capacidad similar de inhibir la apoptosis.

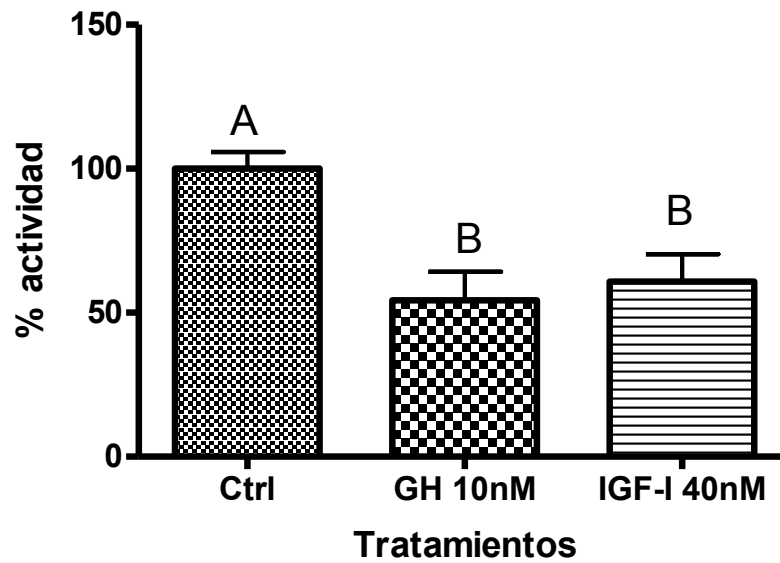


Figura 5. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH o 40nM de IGF-I. Cada barra representa la media y el error estándar de la actividad de caspasa 3 (n = 5, P < 0.05, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Además del ensayo de actividad de caspasa 3, se realizó el ensayo de TUNEL en frotis de células de bolsa de Fabricio, tratadas con GH (10 nM) o IGF-I (40 nM), para observar la presencia de cuerpos apoptóticos. Los resultados mostraron que ambos tratamientos provocaron un decremento significativo (5.51 veces) en la proporción de células apoptóticas en comparación con el control, pasando de un $44.13 \pm 9.35\%$ en los cultivos no tratados, hasta un $8.0 \pm 3.0\%$ y $8.0 \pm 5.1\%$, respectivamente (Figura 6).

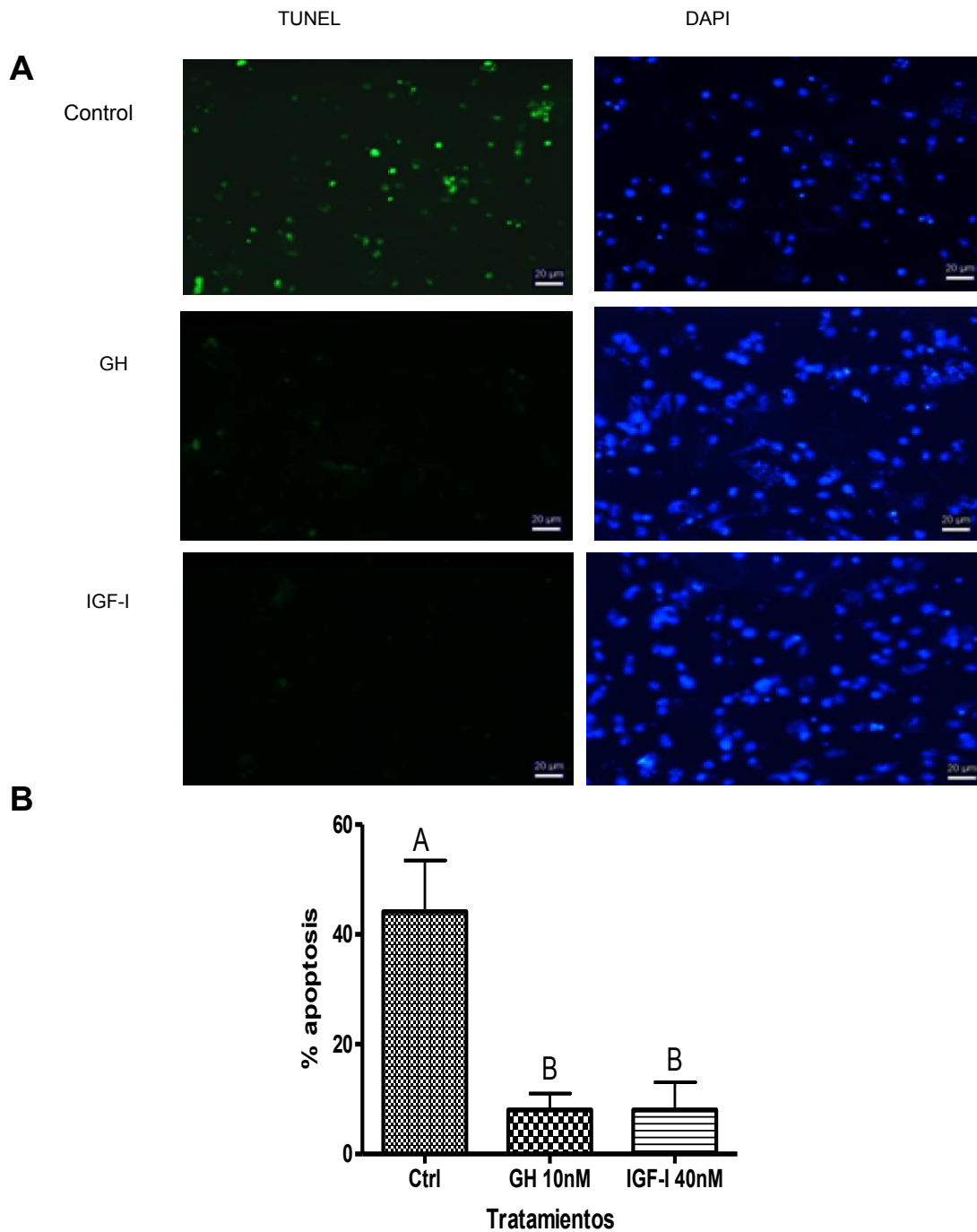


Figura 6. Proporción de células en apoptosis a través del ensayo de TUNEL en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10 nM GH o 40 nM de IGF-I. (A) Micrografías de frotis de células de bolsa Fabricio marcadas con TUNEL (columna izquierda) y DAPI (panel derecho). (B) Cuantificación de la proporción de células en apoptosis. Cada barra representa la media y el error estándar de la actividad de caspasa 3 ($n = 3$, $P < 0.05$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Por otra parte, la aplicación simultánea de GH 10 nM con IGF-I 40 nM no mostró un efecto sinérgico entre estos dos factores sobre el incremento en la viabilidad celular de los cultivos primarios de bolsa de Fabricio ($\Delta = 18.46 \pm 1.12\%$), en comparación con el tratamiento con GH 10 nM ($\Delta = 16.71 \pm 0.67\%$), aunque sí hubo una diferencia significativa de ambos tratamientos con respecto a la adición de IGF-I 40 nM ($\Delta = 13.46 \pm 1.12\%$), tal como se muestra en la Figura 7.

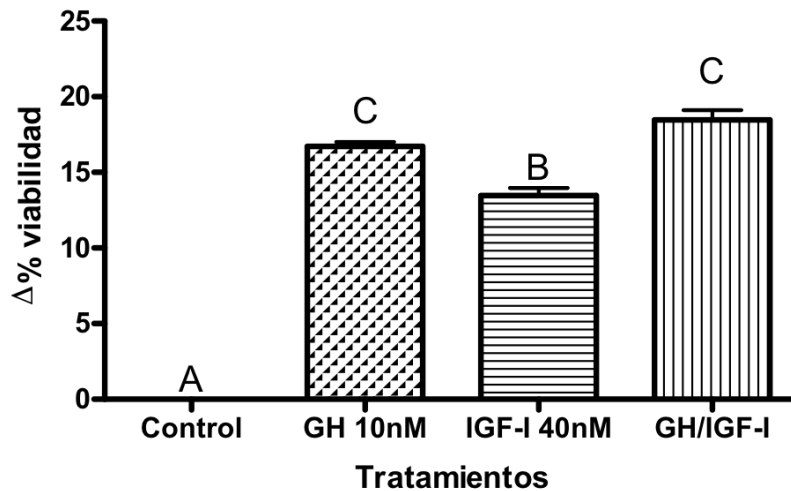


Figura 7. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 10nM GH, 40nM de IGF-I o GH + IGF-I (10nM y 40nM respectivamente) incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Cada barra representa la media y el error estándar de la delta de la viabilidad (n = 4, P < 0.05, P < 0.01, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Con respecto al efecto de los diversos tratamientos sobre la actividad de caspasa 3, como un indicador de apoptosis, se observó que tanto GH como IGF-I provocaron un decremento significativo de dicha actividad ($54.36 \pm 9.86\%$ y $60.82 \pm 9.45\%$, respectivamente) en relación con el grupo control ($100 \pm 5.74\%$). En contraste, el tratamiento combinado de GH + IGF-I no mostró ser significativamente diferente del control ($90.80 \pm 0.98\%$), aunque se puede observar una posible tendencia de disminución (Figura 8).

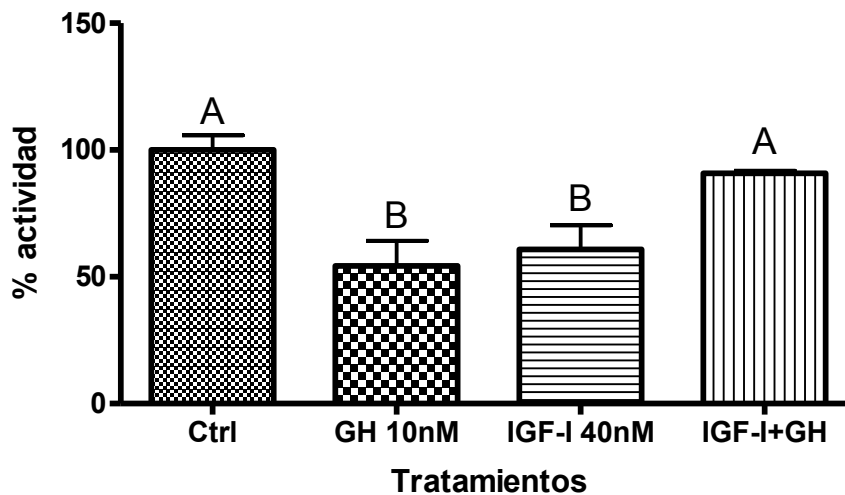


Figura 8. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH o 40nM de IGF-I, o bien la combinación de GH 10nM + IGF-I 40nM. Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 (n = 5, P < 0.01, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto del suero normal de conejo sobre la viabilidad y la apoptosis

Se ha determinado previamente que la adición de suero es capaz de recuperar la viabilidad e inhibir la apoptosis en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio (Luna-Acosta, 2008, tesis de maestría). Con el fin de comparar los efectos de GH e IGF-I con el suero normal de conejo sobre la viabilidad y la apoptosis se evaluó la viabilidad por azul de tripano y la actividad de caspasa 3 en estas células.

Los resultados muestran que tanto GH como IGF-I, así como el SNC pueden incrementar la viabilidad de manera significativa (Figura 9). El SNC llega a incrementar la viabilidad hasta un $19 \pm 1.9\%$.

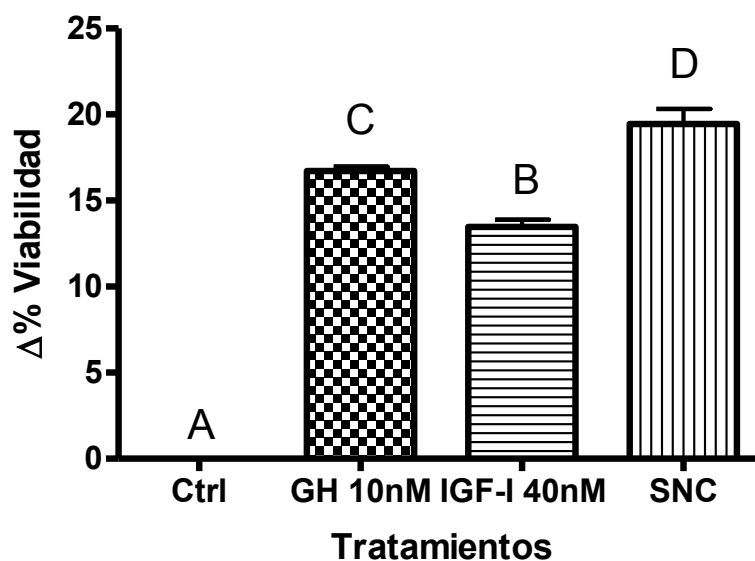


Figura 9. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 10nM GH, 40nM de IGF-I o una dilución 1:100 de SNC, incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Cada barra representa la media y el error estándar de la delta de la viabilidad (n = 4, P < 0.01, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

El efecto del SNC sobre la apoptosis evaluado a través del ensayo de caspasa 3, muestra que también disminuye la actividad de caspasa 3 significativamente de manera similar a los tratamientos con GH o IGF-I. La actividad disminuye un 44±0.89% con el tratamiento de SNC (Figura 10). Estos datos indican que los resultados con el anticuerpo contra GH pudieron deberse a la presencia de SNC en la solución usada para inmunoneutralizar a GH endógena.

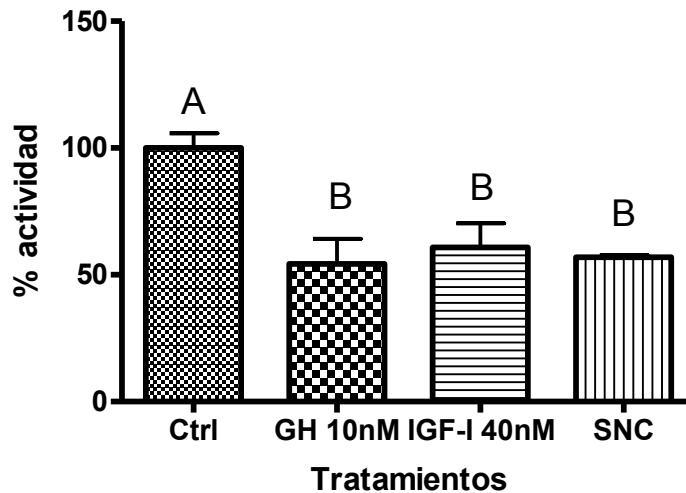


Figura 10. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH o 40nM de IGF-I o una dilución 1:100 de SNC. Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 (n = 5, P < 0.01, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto del anticuerpo contra GH (C2) sobre la viabilidad y la apoptosis

Con el fin de determinar si la presencia de GH local en el medio de los cultivos primarios de la bola de Fabricio puede tener un efecto sobre la viabilidad y la apoptosis se realizó una inmuno-neutralización de la GH (no se adiciono ni GH ni IGF-I exógena) utilizando un anticuerpo disuelto en un medio inocuo. El anticuerpo C2 se usó en una concentración de 1 a 20.

La viabilidad muestra que C2 incrementa la viabilidad significativamente con respecto al control ($7.9 \pm 1.9\%$). Sin embargo hay diferencias significativas entre el tratamiento de C2 y GH o IGF-I. Un efecto similar se observa con GH+C2 (Figura 11).

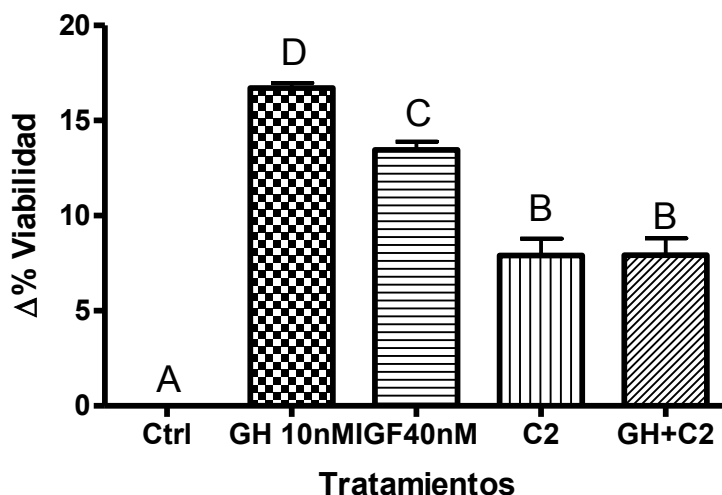


Figura 11. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 10nM GH, 40nM de IGF-I, una dilución 1:20 de C2 o GH 10nM y C2 1:20, incubados por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Cada barra representa la media y el error estándar de la delta de la viabilidad (n = 4, P < 0.01, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

El efecto de C2 y GH+C2 sobre la apoptosis evaluado a través del ensayo de caspasa 3, muestra que C2 puede inmunoneutralizar a la GH exógena puesto que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos y el control (Figura 12). Estos datos indican que el anticuerpo puede inhibir los efectos de la GH exógena.

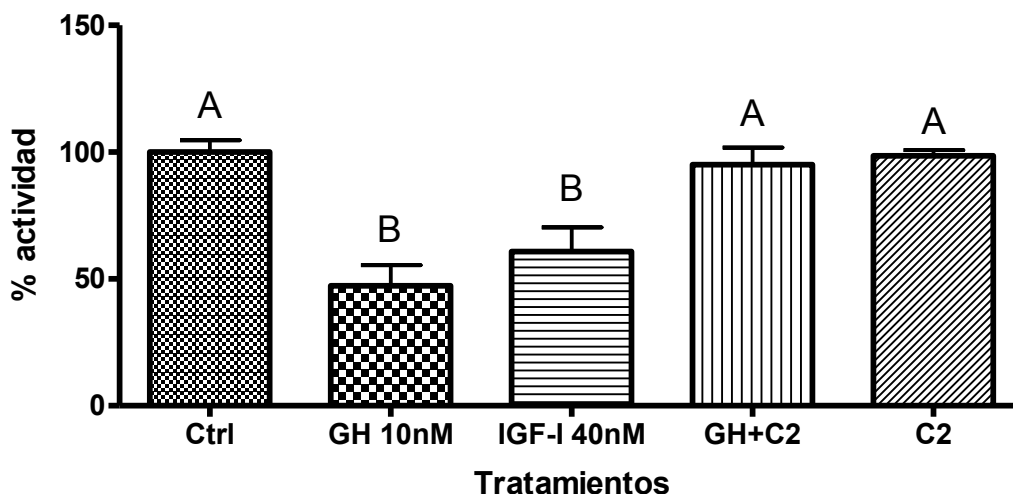


Figura 12. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH o 40nM de IGF-I una dilución 1:20 de C2 o GH 10nM y C2 1:20. Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 (n = 5, P < 0.01,

por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto de la inmunoneutralización de IGF-I sobre la viabilidad y la apoptosis

Se realizó la inmunoneutralización de IGF-I con un anticuerpo policlonal (ab-IGF-I) para determinar si los efectos de la GH sobre la viabilidad y la apoptosis son mediados a través de IGF-I o son directos a través de GH.

Los resultados sobre la viabilidad muestran que existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos de GH+ab-IGF-I ($18\pm 0.78\%$), IGF-I+ab-IGF-I ($8\pm 0.54\%$) y solo el anticuerpo contra IGF-I ($6\pm 0.24\%$). Sin embargo las diferencias entre los tratamientos con GH e IGF-I son significativamente superiores a estos 3 últimos tratamientos (Figura 13).

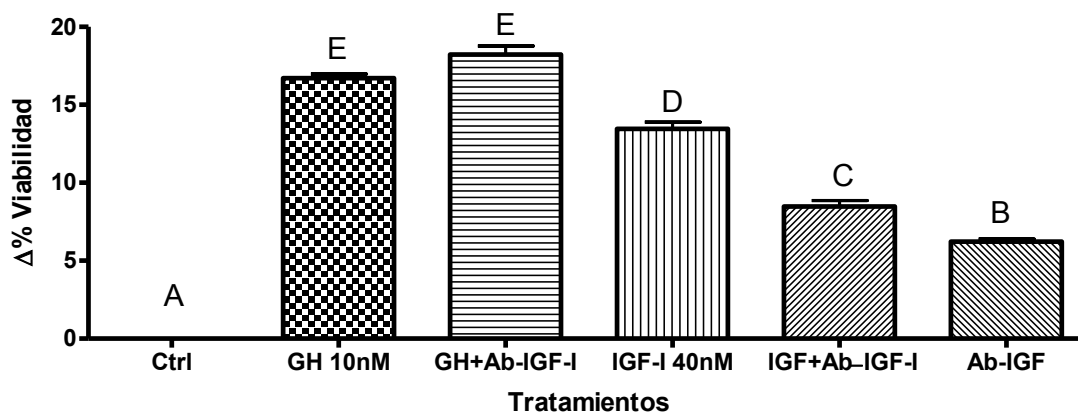


Figura 13. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados con 10nM GH, 40nM de IGF-I, 10nM de GH y α -IGF-I, 40nM de IGF-I y α -IGF-I y α -IGF-I. Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 ($n = 3$, $P < 0.01$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Al evaluar los efectos de la inmunoneutralización de IGF-I sobre la apoptosis se observa que cuando se trata a las células con GH y el anticuerpo contra IGF-I no se inhibe el efecto de GH sobre la actividad de caspasa 3 ($64\pm 1\%$ de actividad). Sin embargo tanto IGF-I+ab-IGF-I o ab-IGF-I no presentan diferencias significativas ($88\pm 15\%$ y $72\pm 4\%$ de actividad respectivamente) al compararlas con el control (Figura 14).

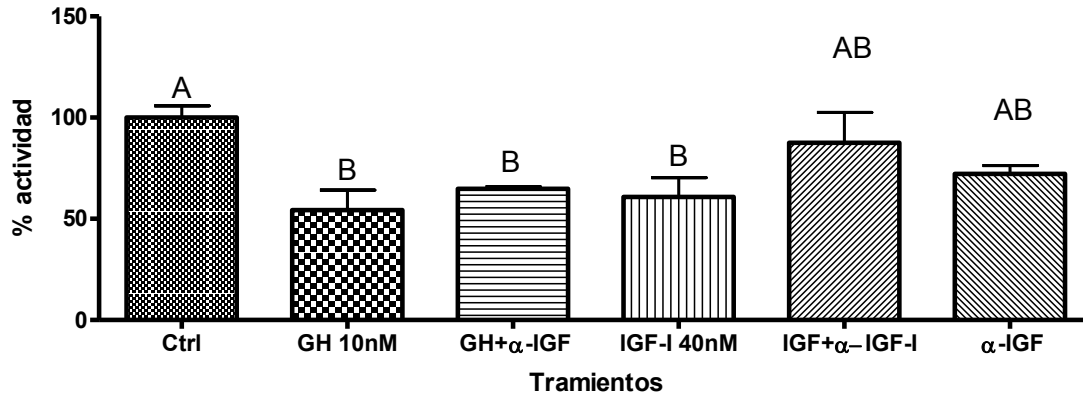


Figura 14. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH, 40nM de IGF-I 10nM de GH y α -IGF-I, 40nM de IGF-1 y α -IGF-I y α -IGF-I. Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 ($n = 3$, $P < 0.01$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Para corroborar estos resultados se utilizó el ensayo de TUNEL en frotis de células de la bolsa de Fabricio. Los resultados muestran que la proporción de células con señal fluorescente es significativamente menor en los tratamientos con GH, IGF-I y GH+ab-IGF-I. Por lo que el tratamiento de GH+ab-IGF-I es capaz de reducir la proporción de células marcadas con TUNEL en un $40 \pm 2\%$. Cuando se inmunoneutraliza IGF-I se observa que la proporción de células no disminuye significativamente ($34\% \pm 7$) al compararlo con el control ($44 \pm 9\%$). Lo mismo se observa con el anticuerpo contra IGF-I ($48 \pm 13\%$). Tomados juntos, estos datos soportan la idea que GH ejerce su efecto de manera directa y no a través de IGF-I. (Figura 15).

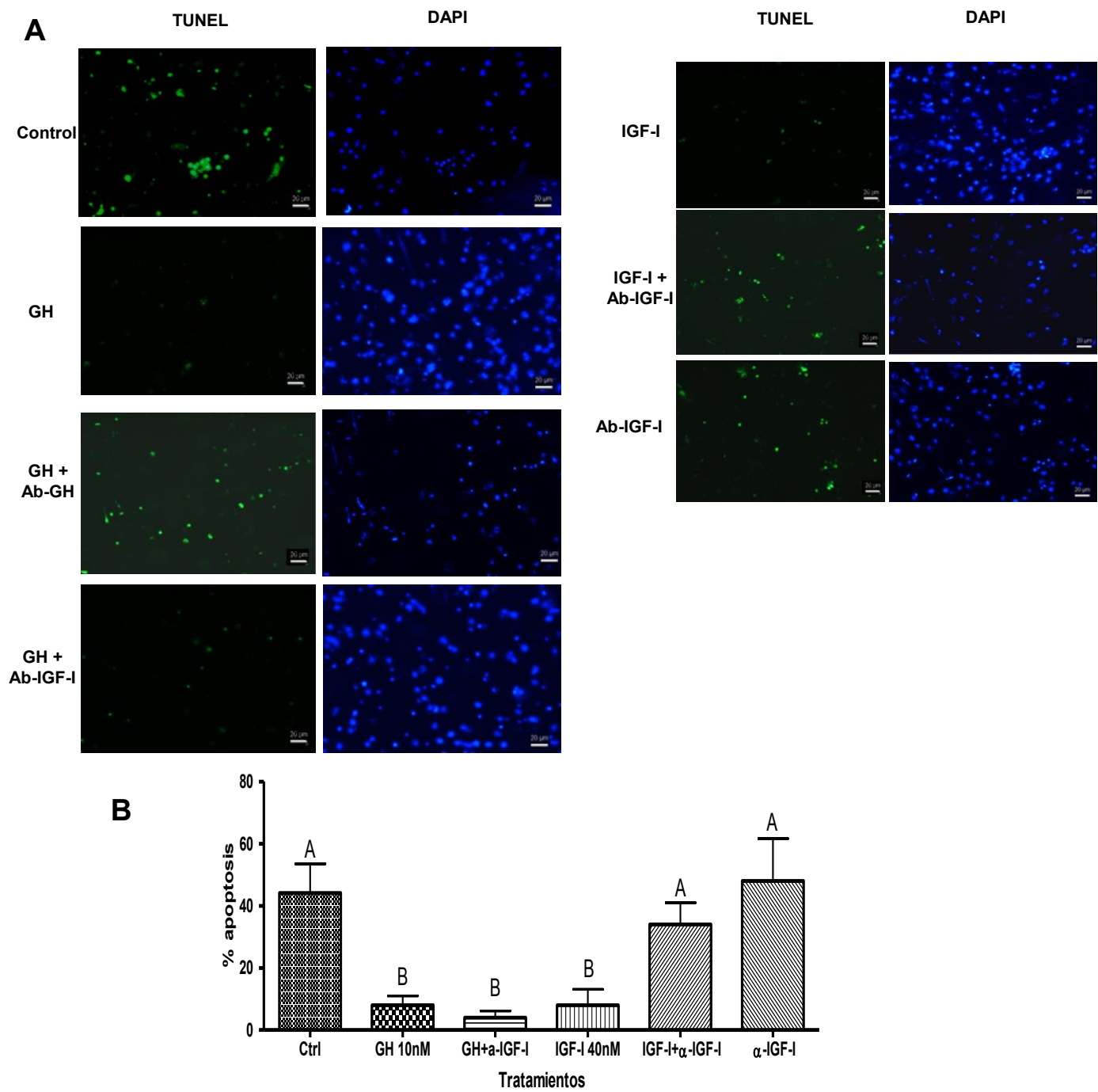


Figura 15. Proporción de células en apoptosis a través del ensayo de TUNEL en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en ausencia o presencia de 10nM GH o 40nM de IGF-I. 40nM de IGF-I+10nM de GH y α-IGF-I, 40nM de IGF-I y α-IGF-I. (A) Micrografías de frotis de células de bolsa Fabricio marcadas con TUNEL (columna izquierda) y DAPI (panel derecho). (B) Cuantificación de la proporción de células en apoptosis. Cada barra representa la media y el error estándar de la actividad

de caspasa 3 ($n = 3$, $P < 0.05$, $P < 0.01$ por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Determinación de la activación de la vía de PI3K/Akt inducido por GH

Para determinar si la GH era capaz de activar la vía de PI3K/Akt, se decidió utilizar un anticuerpo contra actina y su forma activa fosfo-Akt en células incubadas en diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 minutos) con la adición de 10nM. Las membranas fueron probadas con los dos anticuerpos y un control de cargado de actina. Las bandas fueron analizadas por densitometría y se cuantificó el porcentaje de activación. Los resultados muestran que la activación de Akt ocurre desde los 5 minutos y alcanza su máximo punto de activación a los 60 minutos con un $100 \pm 50\%$. (Figura 16).

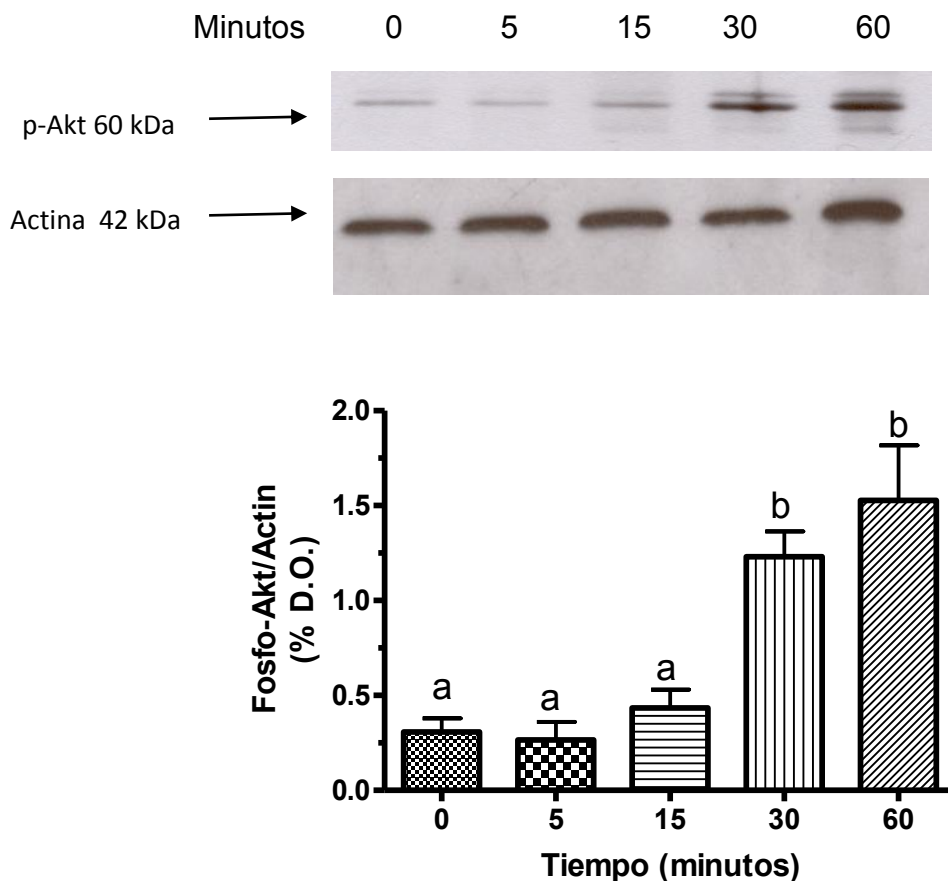


Figura 16. Análisis densitométrico de un ensayo de western blot realizado con células de la bolsa de Fabricio. Se usaron $40\mu\text{g}$ de proteína en cada carril y se incubaron con GH 10nM por tiempos de 0,

5, 15, 30, 60 minutos. El panel superior muestra las bandas correspondientes a fosfo-Akt y actina. Panel Inferior muestra la relación fosfo-Akt/Actina por densitometría. ($p < 0.05$, $n = 5$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Efecto del inhibidor de la activación de PI3K sobre la viabilidad y la apoptosis

Con el fin de determinar si la vía de PI3K/Akt interviene en la mediación del efecto sobre la apoptosis en los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio se realizó un tratamiento con $10\mu\text{M}$ de wortmanina (un inhibidor específico de la activación de PI3K).

El resultado obtenido muestra que el tratamiento con wortmanina es capaz de disminuir en un 59.83% el efecto estimulante de la GH sobre la viabilidad celular, de forma análoga a la inmunoneutralización de GH con el anticuerpo específico. (Figura 17).

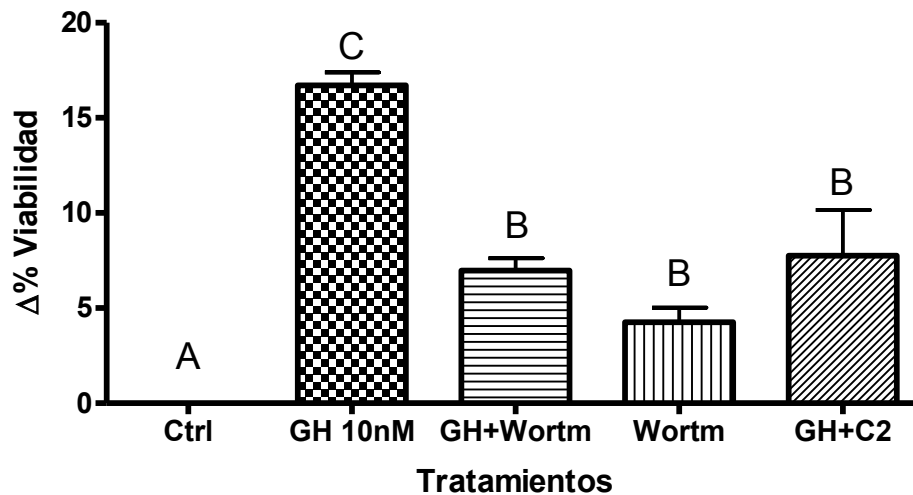


Figura 17. Delta de la viabilidad de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en la ausencia o presencia de 10nM de GH, 10nM de GH y $10\mu\text{M}$ de wortmannin, $10\mu\text{M}$ de wortmannin o 10nM de GH y el anticuerpo contra GH C2 (dilución 1:20). Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 ($n = 3$, $P < 0.01$ por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

La actividad de caspasa 3 no disminuyó significativamente con respecto al control ($100 \pm 5.74\%$ de actividad) cuando se realizó el tratamiento con GH y wortmannin

(87.7±1.97% de actividad). Lo cual evidencia que el efecto de GH sobre la apoptosis puede estar mediado por la vía de PI3K/Akt (Figura 18).

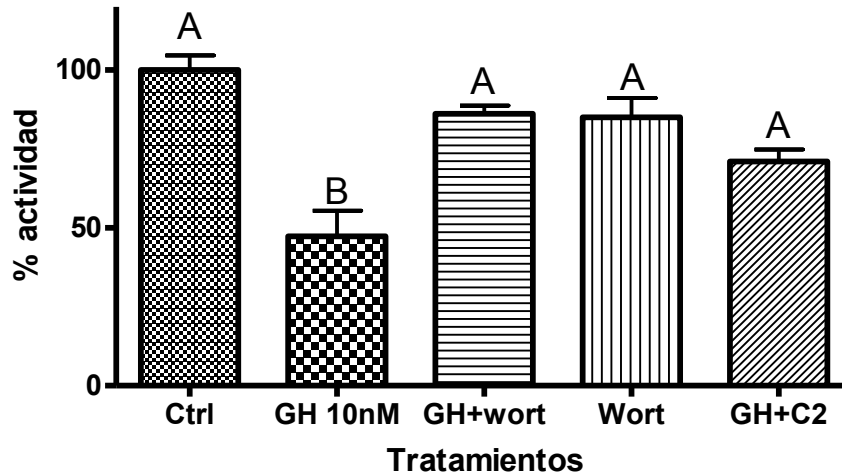


Figura 18. Actividad de caspasa 3 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en la ausencia o presencia de 10nM de GH, 10nM de GH y 10µM de wortmannin, 10µM de wortmannin o 10nM de GH y el anticuerpo contra GH C2 (dilución 1:20). Cada barra representa la media y el error estándar del porcentaje de actividad de caspasa 3 (n = 3, P < 0.01 por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Para corroborar estos resultados se utilizó el ensayo de TUNEL en frotis de células de la bolsa de Fabricio. Los resultados muestran que la proporción de células con señal fluorescente es significativamente menor en presencia de GH 10nM (15.98±5.22), (Figura 19).

Wortmannin (100nM) es capaz de incrementar la proporción de células marcadas con TUNEL en un 42.54±9.99. Este resultado también nos indica que los efectos antiapoptóticos de GH están mediados por la vía de PI3K/Akt.

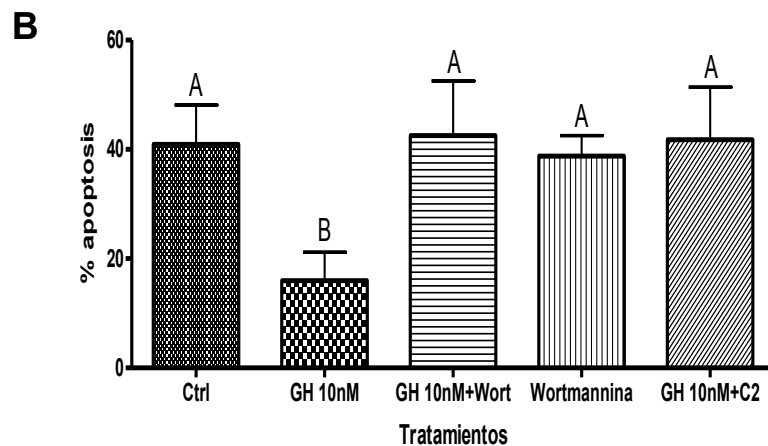
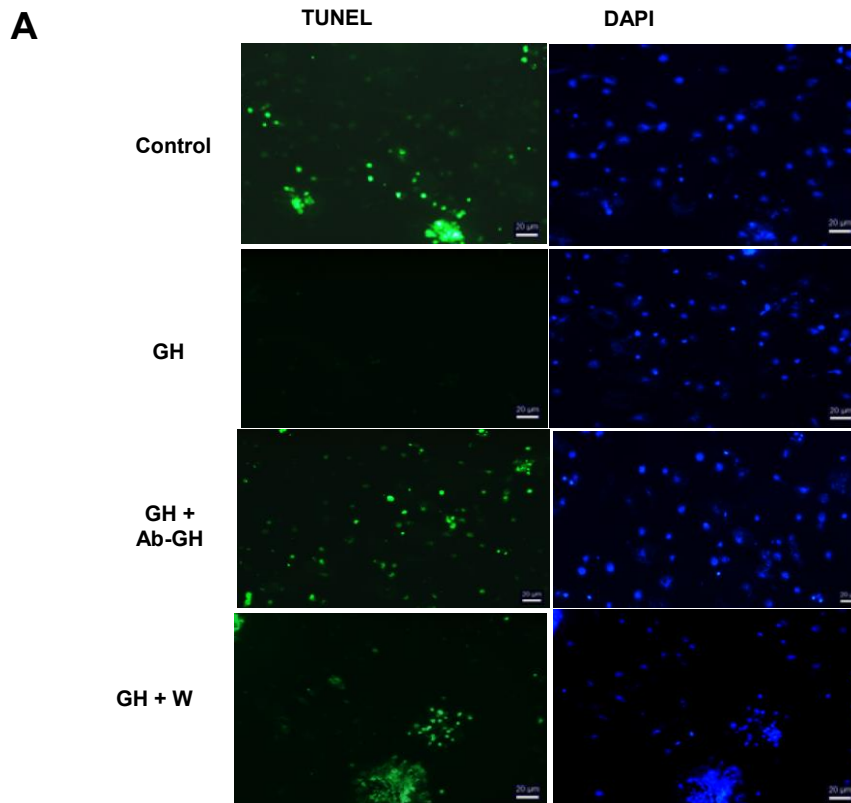


Figura 19. Ensayo de TUNEL realizado en células de la bolsa de Fabricio tratadas en ausencia o presencia de GH, GH/wortmannin, wortmannin, GH/C2. (A) Micrografías de frotis de células de bolsa Fabricio marcadas con TUNEL (columna izquierda) y DAPI (panel derecho). (B) Cuantificación de la proporción de células en apoptosis. Cada barra representa su media y error estándar. ($P > 0.05$, $n = 3$)

por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey) Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Además de los ensayos de actividad de caspasa 3 y de TUNEL, se realizó el ensayo de western blot utilizando el anticuerpo contra fosfo-Akt, con los mismos tratamientos de los ensayos anteriores (En ausencia de GH, GH 10nM, GH 10nM + wortmanina, wortmanina y GH 10nM + anticuerpo contra GH C2).

Los resultados obtenidos indican que wortmanina es capaz de inhibir significativamente el efecto de GH sobre la apoptosis, (GH=75.22±21.99% de activación y GH+wortmanina=18.22±8.02% de activación). Más aun el tratamiento de GH+wortmanina inhibe la activación de Akt a niveles del control (26.83±8.8), (Figura 20). Todos estos datos evidencian que GH inhibe la apoptosis a través de la vía de PI3K/Akt.

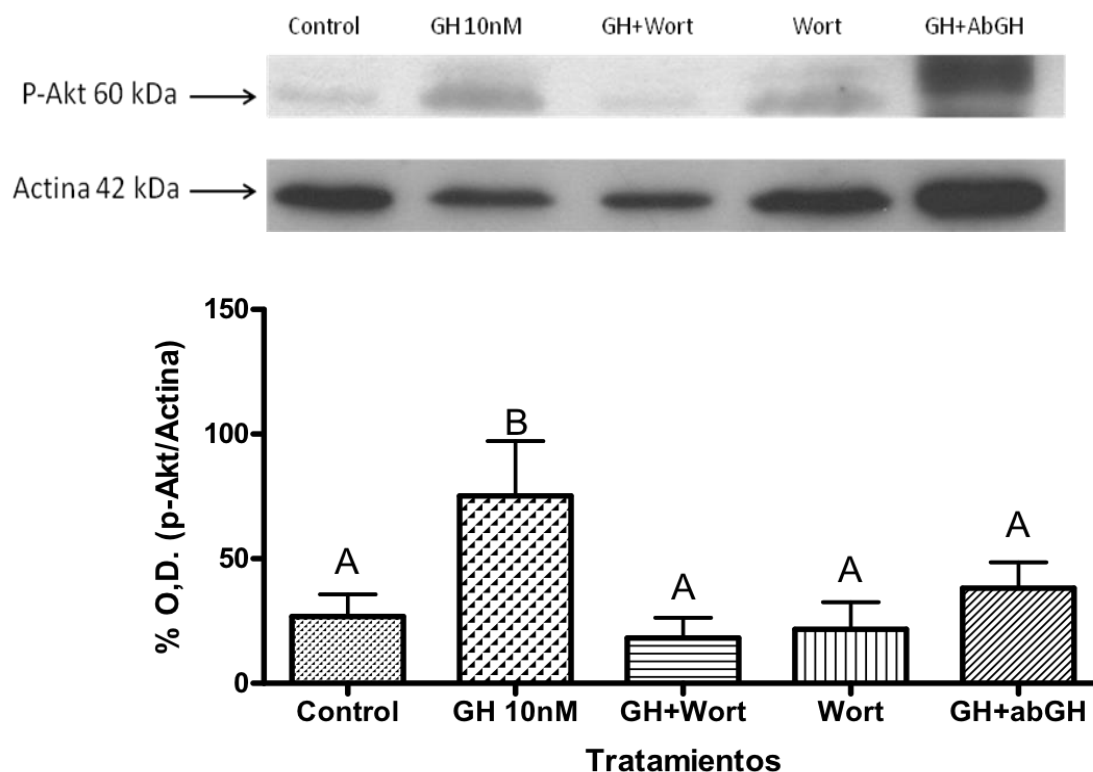


Figura 20. Ensayo de western blot y análisis densitométrico para determinar la proporción de activación de Akt en cultivos primarios de bolsa de Fabricio incubados en la presencia o ausencia de GH 10nM, GH+wortmanina, Wortmanina y GH+anticuerpo contra GH C2. ANOVA con prueba

posthoc de Tuckey ($p < 0.05$, $n = 5$, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey) Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Presencia de Bcl2 en células de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio

La expresión de proteínas antiapoptóticas es un indicativo de los efectos de la GH sobre la apoptosis, por lo que se realizó el ensayo de western blot en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio incubados con 10nM de GH a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 minutos), para determinar la cinética de expresión de Bcl-2. Se observó una cinética de expresión de bcl-2 creciente desde los 5 minutos y hasta los 60 minutos, (Figura 21).

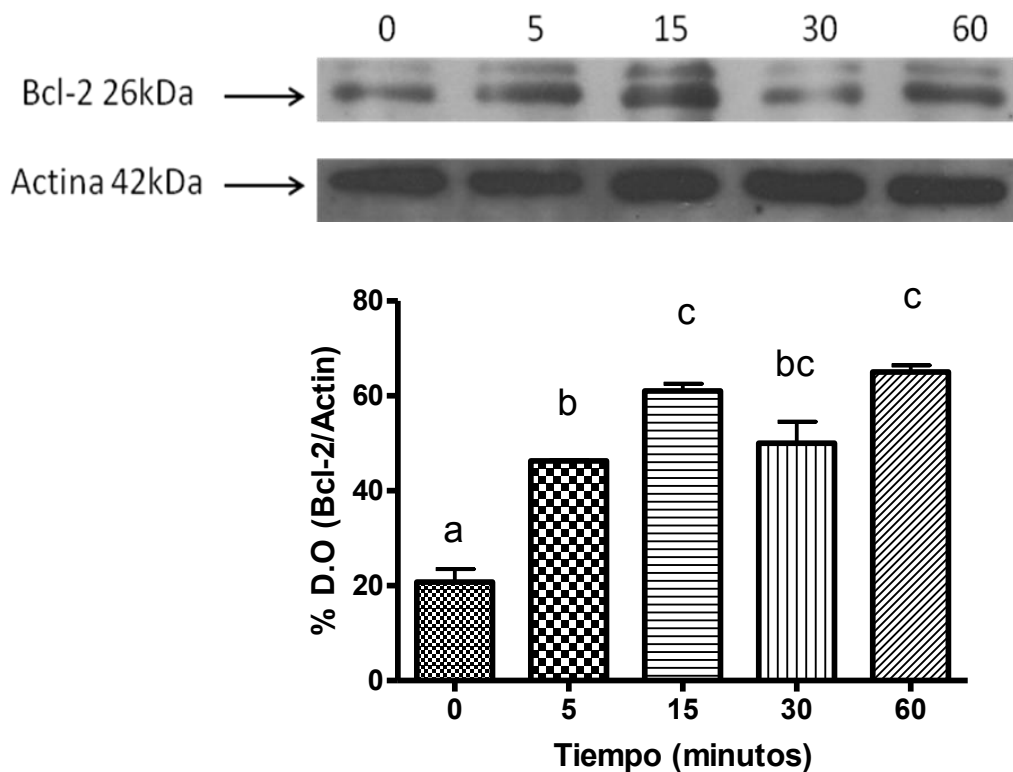


Figura 21. Determinación de la cinética de expresión de Bcl-2 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio de pollos de 4 semanas incubados a 37°C, 5% de CO₂ en la presencia de 10nM de GH por 0, 5, 15, 30 y 60 minutos ($p < 0.05$, $n = 3$ por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey) Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Además, se realizó el ensayo de western blot para determinar si el estímulo de GH, induce la expresión de Bcl2. (Figura 22). Los resultados muestran que efectivamente GH promueve la expresión de Bcl2 lo que sugiere por los resultados anteriores que esta expresión es mediada por la vía de PI3K/Akt.

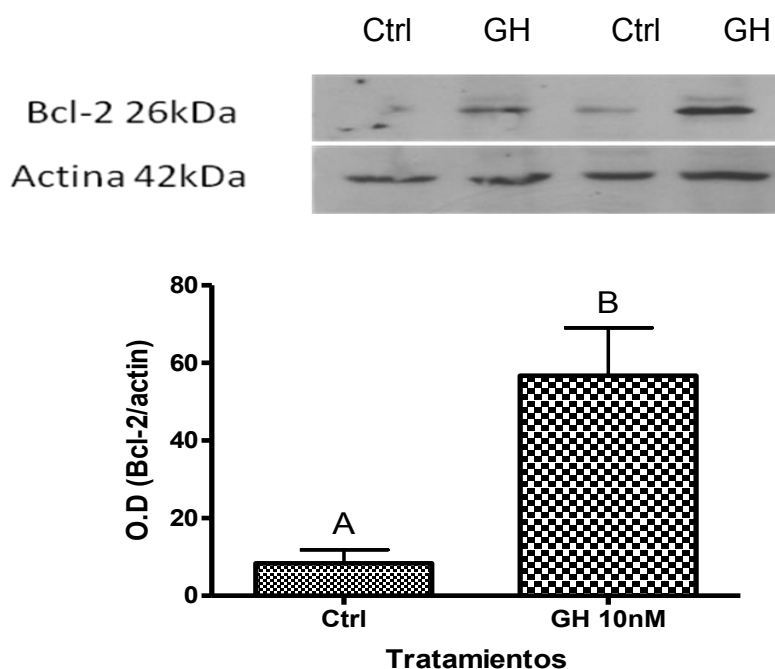


Figura 22. Determinación de la presencia de Bcl2 en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio tratados en la ausencia o presencia de GH. Panel superior Bcl-2 y control de cargado de actina Panel inferior análisis densitométrico que muestra la relación IGF-I/Actina. Cada barra representa la media y el error estándar (n=3 p< 0.05, por análisis de ANOVA con prueba posthoc de Tuckey). Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

Determinación de la presencia de IGF-I en el medio de cultivo

Se realizó western blot para determinar la presencia de IGF-I en las células y el medio de los cultivos de linfocitos bursales, con el fin de determinar si GH es capaz de inducir la síntesis y liberación de IGF-I. Los datos muestran que hay presencia de IGF-I en las células y que no hay diferencias significativas al adicionar GH. De manera similar no se observa diferencias significativa en la concentración de IGF-I secretada al medio en ausencia o presencia de 10nM de GH (2.36 ± 0.46 ng/ml y

2.53±0.48 ng/ml). Estos resultados demuestran que los linfocitos de la bolsa de Fabricio son capaces de sintetizar y secretar IGF-I de manera independiente al estímulo con GH, (Figura 23).

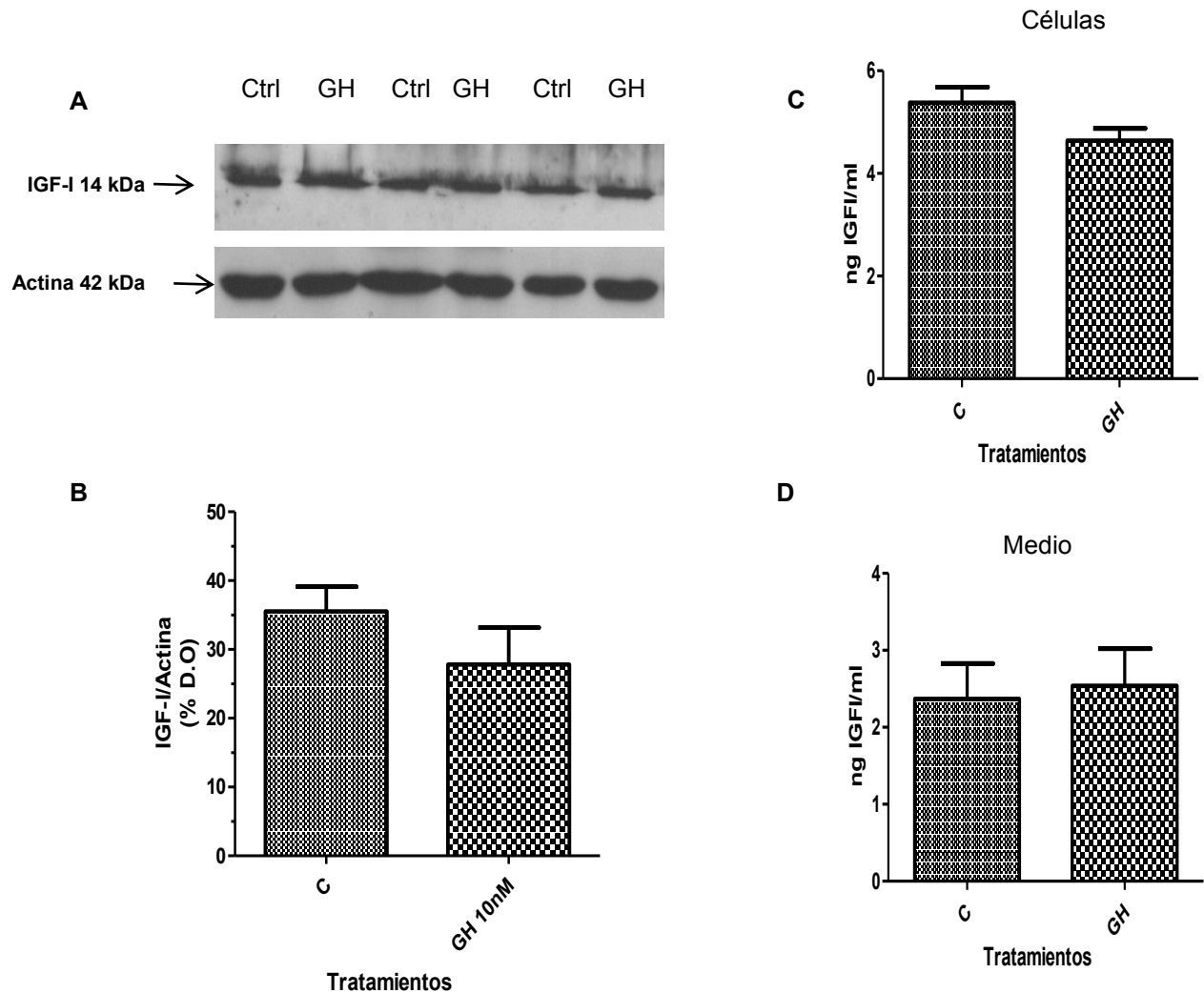


Figura 23. Determinación de la presencia de IGF-I en el medio y las células de los cultivos primarios de la bolsa de Fabricio. A) Western blot de IGF-I y control de cargado de actina en las células de bursa tratadas en ausencia o presencia de 10nM de GH. B) Análisis densitométrico que muestra la relación IGF-I/Actina. C) Concentración de IGF-I en las células de bursa expresado en ng de IGF-I por mililitro determinado por el ensayo de ELISA en células bursales tratadas en ausencia o presencia de 10nM de GH. Concentración de IGF-I en el medio de las células de bursa expresado en ng de IGF-I por mililitro determinado por el ensayo de ELISA en células bursales tratadas en ausencia o presencia de 10nM de GH. Cada barra representa la media y el error estándar. (n=3 p< 0.05, el análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado en trabajos previos que la GH tiene un papel significativo en el sistema inmune (Clark, 1997; Gelato, 1993; Luna et al., 2013; Postel-Vinay et al., 1997; Sumita et al., 2005). Se ha determinado que la deficiencia de GH provoca un efecto deletéreo en la función inmune, el cual puede ser corregido por la adición de GH exógena (Khansari and Gustad, 1991). También se sabe que la GH estimula el crecimiento de órganos linfoides y modula varias funciones del desarrollo incluyendo la proliferación de linfocitos (Villanua et al., 1992), producción de citosinas, secreción de inmunoglobulinas por células B, secreción de timulina por células epiteliales tímicas, actividad de células NK, fagocitosis, y la capacidad para fagocitar de los neutrófilos y macrófagos (Clark, 1997; Kooijman et al., 1997; Postel-Vinay et al., 1997; Sumita et al., 2005; Weigent et al., 2011, 2013). Se han descrito también los efectos de la GH sobre la diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Más aún, se ha demostrado que el tratamiento con GH estimula la timopoiesis y provoca un marcado incremento en la masa tímica y en las células T precursoras CD4⁺ de adultos infectados con HIV que presentaron atrofia tímica antes de la terapia (Napolitano et al., 2002).

También se ha descrito que tanto la GH como su receptor (GHR) se expresan en tejidos linfoides primarios y secundarios de aves (Luna et al., 2005, 2008, 2013; Render et al., 1995; Rodríguez-Méndez et al., 2010). En la bolsa de Fabricio (BF) la producción local de GH sigue un patrón de desarrollo específico desde la embriogénesis hasta la etapa de involución del órgano que ocurre durante la madurez sexual, lo cual sugiere un posible papel de la GH en la proliferación y diferenciación de células B así como en la supervivencia celular (Rodríguez-Méndez et al., 2010). Durante la embriogénesis, la inmunorreactividad a GH colocalizó con células inmunorreactivas a IgM y en menor grado con células que expresan inmunorreactividad a IgG; sin embargo, se observó lo opuesto después de la eclosión, lo que indica un posible papel de la hormona de crecimiento en la maduración de los linfocitos B (Rodríguez-Méndez et al., 2010). Se mostró la existencia de cambios paralelos entre la proporción relativa del ARNm de la GH y la inmunorreactividad de la GH durante el desarrollo de la BF, ocurriendo los más altos durante el periodo temprano de la etapa post-eclosión (2 semanas de edad) y los más bajos en la etapa de involución (20 semanas de edad), y ello correlacionó inversamente con la presencia de células apoptóticas, lo que sugirió que la disminución de la expresión de GH en ese tejido puede contribuir a los modular los mecanismos provocan la involución de la BF (Rodríguez-Méndez et al., 2010). Con base en estos resultados se ha propuesto que la GH puede jugar un papel antiapoptótico en la BF (Luna et al., 2013).

La apoptosis en el sistema inmunológico es un proceso regulatorio muy importante, pues está involucrado en los mecanismos de reconocimiento entre lo propio y lo

extraño y juega un papel clave en el control de la respuesta inmune y el desarrollo de la memoria inmunológica y la tolerancia (Hinton et al., 1998).

En este estudio nosotros analizamos los posibles mecanismos intracelulares empleados por la GH para inhibir la apoptosis y promover la supervivencia de las células en la BF y, también, explorar si dicho efecto se lleva a cabo de forma directa por la GH o bien si es mediado indirectamente por IGF-I, como se ha descrito en otros tipos celulares (Kooijman R, 2006).

Los cultivos celulares de la BF empleados en este trabajo, obtenidos de pollos machos de 4 semanas, estuvieron principalmente compuestos por células B, de las cuales alrededor de dos tercios fueron linfocitos B maduros que expresan IgG. Los cultivos sufrieron una rápida pérdida de viabilidad celular (alrededor de 25% y 60% a las 4 y 6 horas de incubación, respectivamente) bajo las condiciones utilizadas (sin adicionar suero en el medio), como resultado de un importante incremento en la muerte apoptótica, tal como se reveló por el incremento de células positivas a TUNEL y de la actividad de caspasa 3 (Luna et al., 2013; Rodríguez-Méndez et al., 2010).

Es importante destacar que el uso del ensayo de exclusión por azul de tripano es una tinción vital y como tal es excluido por células vivas cuya membrana no es permeable debido a algún daño (www.sigmaaldrich.com), por tanto no es un indicador de la muerte celular apoptótica. Un estudio realizado para evaluar el efecto de azitromicina en la proliferación y la autofagia en células de musculo liso de conejo utilizo el ensayo de azul de tripano para evaluar el número de células muertas en ausencia o presencia del fármaco y/o suero fetal bovino. Los resultados determinaron un aumento de la viabilidad de las células en la presencia de azitromicina lo cual se interpretó como un indicador de proliferación (Stamatiou R, et. al., 2009). Otro estudio en donde se utilizaron líneas celulares de cáncer de pulmón humano (H460, H1299 y H596) para evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción E2F-1 sobre la proliferación y la apoptosis, determino que E2F-1 fue capaz de inhibir apoptosis y proliferación en este modelo, el uso de azul de tripano se utilizó principalmente para determinar el efecto de E2F-1 sobre la proliferación (Kuhn H., et. al., 2002). También en otro trabajo en donde se evaluó la proliferación en cultivos de miofibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes asmáticos y no asmáticos tratados con FGF-2, trombina o suero determino que las células provenientes de pacientes asmáticos tuvieron un efecto reducido de FGF-2 y trombina sobre la proliferación comparada con las células de pacientes no asmáticos. En este estudio el ensayo de azul de tripano indico que la muerte celular de los miofibroblastos no se debió a lisis celular (Ward JE., et. al., 2008). Todos estos estudios nos indican que el ensayo de azul de tripano no es un indicador de la apoptosis sino más bien un indicador de la cantidad de células muertas por lisis celular lo cual puede ser utilizado para evaluar proliferación o muerte celular no apoptótica. En este estudio principalmente fue usado como un posible indicador del efecto de GH sobre la proporción de células vivas o viables, pero no como un indicador de apoptosis, pues otros ensayos fueron usados para determinar la

proporción de apoptosis (Ensayo de actividad de caspasa 3 y TUNEL). Como se observa, en nuestros resultados no siempre el cambio en viabilidad de las células de bursa correspondió con los resultados de apoptosis por caspasa y TUNEL corroborando la naturaleza del ensayo de exclusión por azul de tripano.

En este estudio nosotros encontramos que tanto la GH como el IGF-I, de forma independientemente mostraron efectos de supervivencia antiapoptóticos, por lo que la adición de 10nM de GH a los cultivos de BF incrementó significativamente la supervivencia de las células de manera similar a lo descrito previamente. Más aún, en este trabajo se mostró que el tratamiento con GH inhibió 5.5 veces la aparición de cuerpos apoptóticos y disminuyó a la mitad la actividad de caspasa 3 en estos cultivos, en comparación con el grupo control. Estos efectos fueron bloqueados de manera significativa cuando las células tratadas con GH fueron co-incubadas con el anticuerpo dirigido contra cGH lo cual indica que la actividad anti-apoptótica fue específica. Por otro lado, los tratamientos con 40nM de IGF-I a los cultivos de BF tuvieron un efecto similar a los de GH, al incrementar la viabilidad de las células B y disminuir los cuerpos apoptóticos y la actividad de caspasa 3. Estos efectos protectores fueron inhibidos cuando un anticuerpo específico contra IGF-I fue co-incubado con las células tratadas con IGF-I. Es importante destacar que el anticuerpo contra IGF-I no fue capaz de abrogar los efectos de supervivencia y antiapoptóticos de la GH, indicando que esta acción de la GH es directa y no se encuentra mediada por IGF-I.

Hay evidencia de que la GH o IGF-1 son capaces de promover la diferenciación de algunas células, proliferación de otras y la supervivencia en otras poblaciones en la médula ósea y el timo, por tanto el potencial de estas hormonas para promover la supervivencia de células puede ser relevante, ya que un incremento en la longevidad puede tener efectos significativos en células mieloides a corto plazo y para responder a retos específicos (Dorskind and Horseman, 2000). Se ha postulado que la GH puede prevenir la apoptosis de linfocitos y promover la supervivencia de células T de memoria (Welniak et al., 2002). También se ha mostrado que el IGF-I ejerce efectos anti-apoptóticos (Kelley et al., 1998, 2007; Minshall et al., 1996). Ambos, la GH y el IGF-I fueron capaces de inhibir parcialmente la apoptosis inducida por dexametasona en células T CD4+ (Dobashi et al., 2001). Los efectos anti-apoptóticos de la GH se han reportado también en otros tejidos. Por ejemplo, estudios *in vitro* mostraron que el tratamiento de células de la retina neurales (RGCs) con GH recombinante redujeron significativamente la incidencia de células apoptóticas, mientras que la microinyección ocular *in vivo* de anticuerpos específicos contra GH en el día embrionario dos (DE2) incrementó claramente la muerte celular en el día embrionario seis (DE6), proveyendo evidencia que la inmunoneutralización de la GH producida localmente en células ganglionares de retina promueve la apoptosis (Sanders et al., 2005). Más aún, el tratamiento de la línea de células de retina neural de embrión de codorniz con siRNA de GH para disminuir la expresión local de GH, correlacionó con un incremento del cuerpos apoptóticos, lo que apoya la noción de que la GH producida endógenamente en las células de retina neurales puede estar involucrada en la regulación de la supervivencia celular a través de mecanismos autócrinos o parácrinos (Sanders et

al., 2010). La microinyección de siRNA para GH en el globo ocular de embriones de pollo en desarrollo fue capaz de disminuir tanto el ARNm de la hormona de crecimiento como los niveles de ARNm de IGF-I en la retina *in vivo*, y de elevar el número de células apostólicas en la retina, después de seis horas de tratamiento; dichos efectos persistieron por al menos 24 horas (Sanders et al., 2011). En otro estudio se observó que las acciones anti-apoptóticas de la GH en la neurogénesis de la retina de pollo puede estar mediadas por una vía de señalización dependiente (a través del decremento en la expresión de caspasa 3) o independiente (por la disminución de la expresión del factor inductor de apoptosis, AIF-1) de la familia de caspasas (Harvey et al., 2006). También se ha demostrado en experimentos *in vivo* que la GH puede incrementar la proporción de proliferación/apoptosis en el oviducto del pollo y que la expresión de caspasa 2 y 3 disminuyó en gallinas tratadas con GH (Hrabia et al., 2014).

En este estudio nosotros encontramos evidencias de que la vía de señalización PI3K/Akt puede estar involucrada en el efecto anti-apoptótico inducido por GH, ya que la wortmanina, un inhibidor específico de PI3K, pudo revertir significativamente los efectos de la GH al incrementar la viabilidad de las células B, disminuir la actividad de caspasa 3 y la presencia de cuerpos apoptóticos en los cultivos celulares de la bolsa de Fabricio. De hecho, el efecto inhibitorio mostrado por la wortmanina fue similar al observado por la inmunoneutralización de la GH. También encontramos que la fosforilación de Akt se indujo rápidamente cuando los cultivos celulares de la bolsa de Fabricio se trataron con GH, incrementándose hasta tres veces en comparación con el control, después de una hora de incubación. En contraste, dicho efecto fue abolido cuando la hormona fue co-incubada con wortmanina, obteniéndose un resultado similar al observado cuando se inmunoneutralizó con el anticuerpo contra GH. Experimentos posteriores también mostraron que el tratamiento con GH fue capaz de incrementar significativamente la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (hasta 7 veces). En conjunto, estos datos indican que los efectos de GH sobre la inhibición de la apoptosis en las células de la BF involucran la activación de la vía PI3K/Akt y la participación de Bcl-2. Estos resultados concuerdan con otros reportados en la literatura (Jeay et al., 2002). Se ha generado evidencia que la GH puede rescatar tanto a linfocitos humanos CEM/C7 como IM-9 de la apoptosis inducida por fas, al incrementar la expresión de Bcl-2 e inhibir la expresión de caspasa 3 y su activación (Mitsunaka et al., 2001). De igual manera, el tratamiento con GH a linfocitos de sangre periférica humana irradiados *in vitro* previno la muerte celular y restauró sus capacidades secretoras, al mismo tiempo que incrementó la expresión de la proteína apoptótica Bcl-2 (Lempereur et al., 2003). Se ha descrito que la GH endógena fue capaz de inhibir la apoptosis inducida por el metilmetanosulfonato (MMS) en la células T de linfoma que sobre-expresan GH, sugiriendo la existencia de un mecanismo intrácrico y/o autócrino que disminuye la fragmentación de DNA, así como las actividades de las caspasas 2, 3, 6, 8 y 9, mientras que la proteína Bcl-2 se incrementó significativamente en comparación con el control (Arnold and Weigent, 2004). También se ha demostrado que la neuroprotección inducida por el tratamiento con GH en RGCs se asoció con un incremento en la fosforilación de Akt, y ese efecto fue bloqueado de manera significativa al añadir wortmanina o un anticuerpo anti-GH, con lo cual se indujo la apoptosis y la activación de caspasa 3 (Sanders et al.,

2006). También se ha reportado que los efectos protectores inducidos por GH en RGCs embrionarias, que contribuyen a la regulación de las olas apoptóticas durante su diferenciación, adicionalmente involucran la reducción de la degradación de caspasa 9 y la activación de las cinasas de tirosina citosólica (Trks) y las cinasas relacionadas a señales extracelulares (Erks), además de la vía de Akt (Sanders et al., 2008). La hormona de crecimiento ha demostrado ejercer efectos neuroprotectores, tanto *in vivo* como *in vitro*, en el cerebelo de pollo embrionario sujeto a lesiones de hipoxia- isquemia, lo cual está relacionado también a un incremento en la viabilidad celular, un decremento en la muerte celular por apoptosis (reflejado por una disminución de la actividad de caspasa 3 y de los cuerpos celulares positivos a TUNEL), y un incremento en la fosforilación de Akt y en la expresión de Bcl-2. Estos efectos fueron bloqueados cuando se utilizó un anticuerpo específico contra GH o cuando se usó el inhibidor wortmanina. Estos datos indican que la vía de señalización PI3K/Akt está involucrada en el efecto anti-apoptótico de GH en ese modelo (Alba-Betancourt et al., 2013).

También existe evidencia de que la ruta de señalización PI3K/Akt está involucrada en la expresión de varios de los efectos de IGF-I (Castillo et al., 2006). Se ha mostrado que en el sistema inmune IGF-I incrementa la linfopoyesis y la supervivencia de las células T y B del timo y el bazo en ratas tratadas con dexametasona (Hinton et al., 1998), y que fue capaz de prevenir la apoptosis inducida por la carencia de factores de crecimiento, como IL-3 (Rodríguez-Tarduchy et al., 1992). En células PC2 expuestas a hipoxia y deprivación de glucosa, IGF-I mostró un papel antiapoptótico, el cual fue suprimido por una inhibición química de las vías de PI3K, MAPK o PKA (Chung et al., 2007).

Fue de interés determinar si la GH era capaz de ejercer sus efectos anti-apoptóticos de una manera directa o, alternativamente, por intermediación de IGF-I. El hecho de que la adición del anticuerpo contra IGF-I en células tratadas con GH en cultivos de la bolsa de Fabricio no fuera capaz de inhibir el papel antiapoptótico de la GH indica que los efectos protectores observados de la hormona de crecimiento no están mediados a través IGF-I, sino que son directos. Esto fue confirmado por el ensayo de caspasa 3 y el ensayo de TUNEL, así como por la determinación de la viabilidad celular. La adición del anticuerpo anti-IGF-I, por otro lado, claramente bloqueó los efectos antiapoptóticos del tratamiento de IGF-I en los cultivos bursales, mostrando respuestas similares a las obtenidas en mioblastos C2C12_{GHR} cultivados en medio libre de suero, cuando IGF-I fue inmunoneutralizada, con el mismo anticuerpo usado en este estudio, y la aparición de cuerpos apoptóticos se incrementó (Segard et al., 2002). Más aún, nuestros resultados mostraron que la expresión de IGF-I en los cultivos de linfocitos de bolsa de Fabricio no fue dependientes de GH. Aunque la presencia de IGF-I fue detectada por western blot y ELISA en las células B y en el medio de cultivo, sus niveles se modificaron de manera significativa por el tratamiento con GH. Éstos resultados contradicen aquellos descritos en otros modelos, los cuales han determinado que el IGF-I es producido en respuesta a GH, en altas concentraciones en el hígado y en menores concentraciones en una variedad de otros órganos, aunque en tejidos no hepáticos la expresión del gen de IGF-I puede ser regulada por otros factores, tejido-específicos, en adición a la hormona de crecimiento (Welniak et al., 2002). Por ejemplo en tilapia se ha descrito que los tejidos linfoides (bazo y timo, entre otros)

expresan GH e IGF-1, sugiriendo un papel parácrino en el sistema inmune (Yada et al., 2002). Más aún, el tratamiento con GH estimuló de manera positiva los niveles de ARNm de IGF-I en el riñón y el bazo, aún más que el IGF-I hepático (Shved et al., 2011). También se ha demostrado que las células de bazo cultivadas por 24 horas en presencia de GH generan un incremento significativo de IGF-I, el cual fue inhibido por la co-incubación con anticuerpo contra GH. También, en leucocitos humanos y de rata se produce IGF-I después de la estimulación con GH *in vitro*, observándose que las células mieloides, más que las células linfoides, fueron la principal fuente de IGF-I (Arkins et al., 1993; Baxter et al., 1991; Geffner et al., 1990). También se ha demostrado que el IGF-I producido por las células estromales de médula ósea juega un papel importante en la función de la regulación de la linfopoyesis de células B (Landreth et al., 1992). La presencia de ARNm de IGF-I y su proteína fue encontrada principalmente en macrófagos y células dendríticas foliculares en los nódulos linfáticos, lo cual indica un papel particular de IGF-I en el sistema inmune (Oberlin et al., 2009). La síntesis de IGF-I en macrófagos se encontró que está regulada por el factor de necrosis tumoral alfa (Noble et al., 1993; Fournier et al., 1995), por factores estimulantes de formación de colonias (Arkins et al., 1995a), y por el interferon-gamma (Arkins et al., 1995b). De manera interesante, en linfocitos B de nódulos linfáticos humanos no se detectó IGF-I (Oberlin et al., 2009). Recientemente se ha descrito la localización de IGF-I en líneas celulares tumorales provenientes del linaje de linfocitos B, lo que ha sugerido que la expresión local de IGF-I podría ejercer un papel anti-apoptótico protector (Eppler et al., 2015). Por otro lado, se encontró que las células epiteliales tímicas (TEC) proliferaron de manera significativa y liberaron más IGF-I en comparación con el control, después de una incubación por 18 horas con GH. Se ha sugerido que podrían estar involucrados dos mecanismos en la proliferación de células TEC: una siendo una inducción directa por la hormona de crecimiento y otra por la inducción directa a través de IGF-I liberado por las células TEC estimuladas con GH (Tsuji et al., 1994).

En otros estudios, se obtuvo un marcado incremento en la timopoyesis y en el número de células T CD4⁺ en adultos infectados con HIV-1 tratados con GH, y se observó que dichos efectos fueron más pronunciados en aquellos individuos con incrementos mayores en la concentración de IGF-I circulante (Napolitano et al., 2002; 2008). Sin embargo, hubo un incremento en la densidad tímica independiente del incremento de IGF-I, lo cual puede indicar que la GH puede ejercer efectos directos en el timo o que su actividad tímica está mediada por IGF-I de manera parácrina (Napolitano et al., 2008). También se ha demostrado que los timocitos humanos sintetizan y secretan GH e IGF-I, y que la GH ejerce sus funciones de manera autócrina/parácrina en el timo humano a través de IGF-I (Sabharwal and Varma, 1996). Por otro lado, algunos datos indican que podría haber una respuesta específica de cada tejido para regular la expresión del ARNm de IGF-1 en respuesta a GH. Por ejemplo, en tilapia del Nilo transgénica, que sobre expresa GH, se encontró que ambos el IGF-I y el IGF-II se incrementaron en las branquias, hígado, riñón, intestino, corazón, testículo, músculo esquelético y cerebro, pero no así en la hipófisis; en el bazo, sorprendentemente, hubo un decremento de ARNm tanto de IGF-I y II, donde IGF-I disminuyó hasta 19 veces (Eppler et al., 2010).

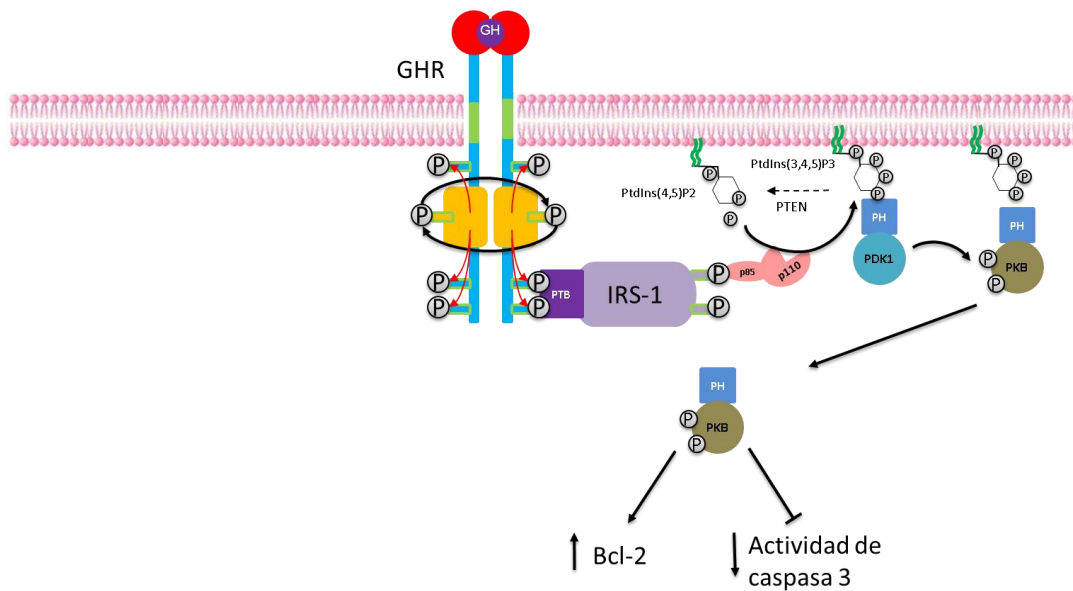
Por otro lado, y más en acuerdo con los resultados en nuestro presente estudio, se demostró que algunos de los efectos neuroprotectores de la GH en el cerebro de rata sometido a hipoxia son ejercidos directamente a través del receptor a GH (Scheepens et al., 2001). De igual manera, la GH ejerce de manera directa sus efectos antiapoptóticos en cultivos primarios de osteoblastos (DiGirolamo et al., 2007). Más aún, la GH promueve la proliferación de células osteoblásticas *in vitro* y la formación de hueso trabecular en ratones deficientes de IGF-I tratados con GH, sugiriendo con ello que expresa efectos independientes de IGF-I (Bikle et al., 2001; Gan et al., 2010). También se ha demostrado en algunos tipos celulares que el IGF-I no es dependiente de GH. Por ejemplo, en macrófagos de rata derivados de médula ósea el TNF-alfa estimuló de manera directa los niveles de ARNm de IGF-1 y su proteína. Además, la inducción de IGF-I fue dependiente de la producción endógena de TNF-alfa, pues la síntesis de IGF-I se inhibió en presencia de antisuero de TNF-alfa (Noble et al., 1993). En ese modelo se demostró que la estimulación de la expresión de IGF-I por la activación del receptor CD44 a través de hialuronato estuvo mediada por mecanismos dependientes de TNF-alfa (Noble et al., 1993). Por otra parte, no se puede descartar que la falta de estimulación de la producción de IGF-I por la GH en cultivos celulares de la bolsa de Fabricio observados en este trabajo pueda ser explicado por las condiciones utilizadas: una exposición a corto plazo, de sólo dos horas, a la hormona de crecimiento; la dosis empleada; o las condiciones de cultivo (RPMI 1640 sin suero fetal), y esto debe seguir siendo estudiado.

En resumen, en este estudio nosotros encontramos que la hormona de crecimiento ejerce directamente un papel anti-apoptico en los linfocitos cultivados de la bolsa de Fabricio, donde la vía PI3K/Akt y Bcl-2 están claramente involucrados. Se requiere realizar estudios adicionales para elucidar los mecanismos autócrinos y/o parácrinos que pueden estar regulando la producción local y la acción de GH en la bolsa de Fabricio sobre la supervivencia de células B, y así poder comprender mejor el papel funcional de esta hormona en el sistema inmune.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se determinó que la GH e IGF-I son capaces de inhibir la apoptosis en los linfocitos de la bolsa de Fabricio de pollo. El efecto antiapoptótico de la GH no fue mediado por la expresión y liberación de IGF-I sino fue ejercido de manera directa por GH. También GH puede activar la vía de señalización PI3K/Akt y la inhibición de la apoptosis por GH es ejercida a través de ese mecanismo. Además GH induce la expresión de la proteína antiapoptótico Bcl-2. Dado que la expresión de la GH cambia a través del desarrollo de la bolsa de Fabricio los resultados obtenidos proveen evidencia substancial del papel de esta hormona es la ontogenia de este tejido y su función en el sistema inmune así como los mecanismos que pueden mediar esta función.

La evidencia de que la GH puede activar diferentes vías de transducción de señales (MAPK, JAK/STAT, PKA por mencionar algunas) y que estos mecanismos median los efectos sobre la proliferación, muerte celular, metabolismo energético nos permite realizar la pregunta si GH puede activar más de una vía de señalización al mismo tiempo en los linfocitos y si estas vías median otros procesos de la fisiología celular al mismo tiempo, más aun, dado que PI3K/Akt tiene incidencia sobre funciones tan relevantes y diversas como la captación de glucosa, la iniciación de síntesis de proteínas, o el estrés oxidativo queda abierta la pregunta si la activación de un mecanismo intracelular puede ejercer diversos papeles en la fisiología de un solo tipo celular al mismo tiempo. Todas estas preguntas son relevantes para entender el papel de la GH en los diversos procesos biológicos y deberán explorarse.



Esquema 4. Mecanismo que media los efectos de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en los linfocitos de la bursa

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahumada-Solórzano SM, Carranza ME, Pedernera E, Rodríguez-Méndez, AJ, Luna M, Arámburo C, 2012, Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 297-310.
2. Alba-Betancourt C, Luna-Acosta JL, Ramírez-Martínez CE, Ávila-González D, Granados-Avalos E, Carranza M, Martínez-Coria H, Arámburo C, Luna, M, 2013, Neuro-protective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 183,17-31.
3. Arámburo C, Campbell RM, Scanes CG, 1989, Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants, *life sciences* 45:2201-2207.
4. Arámburo C, Carranza M, Martínez – Coria H, Reyes M, Berumen L, López J, Pascacio H, Huerta L, Luna M, 2001, Molecular and functional heterogeneity of Growth hormone. *Avian Endocrinology A Dawson and C M Chaturvedi (Eds). Narosa publishing house, New Delhi, India* 273-286.
5. Arámburo C, Sánchez R, Fenton B, Perera C, Valverde-Rodríguez C, 1989, Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de la hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Vet. Mex.* 20, 397-405.

6. Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW, 1993, Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology* 133, 2334-2343.
7. Arkins S, Rebeiz N, Brunke-Reese DL, Biragyn A, Kelley KW, 1995, Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Mol. Endocrinol.* 9, 350-360.
8. Arkins S, Rebeiz N, Brunke-Reese DL, Minshall C, Kelley KW, 1995, The colony-stimulating factors induce expression of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid during hematopoiesis. *Endocrinology* 136, 1153-1160.
9. Arnold RE, Weigent DA, 2004, The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmunomodulation* 11(3):149-59.
10. Arnold RE, Weigent DA, 2004, The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmunomodulation* 11, 149-159.
11. Baroni CD, 1967, Mouse thymus in hereditary pituitary dwarfism. *Acta Anat* 68:361–373.
12. Baroni CD, 1967, Thymus, peripheral lymphoid tissues and immunological responsiveness of the pituitary dwarf mouse *Experientia* 23:282–283.
13. Baroni CD, Fabris N, Bertoli G., 1967, Age dependency of the primary immune response in the hereditary pituitary dwarf and normal Snell/Bagg mouse. *Experientia* 23:1059–1060.
14. Baumann G, 1991, Growth Hormone Heterogeneity: Genes, Isohormones, Variants, and Binding Proteins. *Endocrinol. Rev.*, 4:424-449.
15. Baxter JB, Blalock JE, Weigent DA, 1991, Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor-I from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology* 129, 1727-1734.
16. Bikle D, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, Nauman E, Leary C, Halloran B, 2001, The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2320-2329.
17. Brooks A.J, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ, 2008, Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int. J. Biochem Cell. Biol.* 40, 1984-1989.
18. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ, 2007, Growth hormone receptor; mechanism of action. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* doi:10.1016/j.biocel.2007.07.008, article in press.
19. Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, 2005, Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(9):814–821.
20. Buul-Offersa SC, Kooijman R, 1998, The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1083–1094.
21. Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, Navarro I, and Gutierrez J, 2006, IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: 1683–1690.
22. Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, Navarro I, Gutierrez J 2006, IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 290, 1683–1690.

23. Chung H, Seo S, Moon M, Park S, 2007, IGF-I inhibition of apoptosis is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *J. Endocrinol.* 194, 77-85.
24. Clark R, 1997, The somatogenic hormones and insulin like growth factor-I: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 18,157-179.
25. Compton M, Waldrip HM, 1998, Endogenous Activation of Apoptosis in Bursal Lymphocytes: Inhibition by Phorbol Esters and Protein Synthesis Inhibitors. *Cellular Immunology* 184:143-152.
26. Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM, Chin HS, Barton CL, Boyle GM, Parsons PG, Jans DA, Waters MJ, 2007, Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 13331-13336.
27. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Señaris R, Devesa J and Arce VM, 1999 Activation of Growth Hormone Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal: Evidence for a Role of AKT in this Pathway. *Endocrinology* 140(12):5937-5943.
28. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Señaris R, Devesa J, Arce VM, 1999, Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of AKT in this pathway. *Endocrinol.* 140, 5937-5943.
29. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M and Diederich M, 2003, An introduction to the Molecular Mechanism of Apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010:1-8.
30. DiGirolamo DJ, Mukherjee A, Fulzele K, Gan Y, Cao X, Frank SJ, Clemens TL, 2007, Mode of growth hormone action in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 282, 31666-31674.
31. Dobashi H, Sato M, Tanaka T, Tokuda M, Ishida T, 2001, Growth hormone restores glucocorticoid-induced T cell suppression. *FASEB J.* 15, 1861-1863.
32. Dorshkind K, Horseman ND, 2000, The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr. Rev.* 21, 292–312.
33. Ekino S, Riwar B, Kroese FG, Schwander EH, Koch G, Nieuwenhuis P, 1995, Role of environmental antigen in the development of IgG+ cells in the bursa of fabricius *The Journal of Immunology*, 155(10):4551-4558
34. Eppler E, Berishvili G, Mazel P, Caelers A, Hwnag G, Maclean N, Reinecke M, 2010, Distinct organ-specific up- and down-regulation of IGF-I and IGF-II mRNA in various organs of a GH-overexpressing transgenic Nile tilapia. *Transgenic Res.* 19, 231-240.
35. Eppler E, Janas E, Link K, Weidmann L, Bischofberger H, Wenger M, Tinguely M, Schraml P, Moch H, Felbaum C, 2015, Insulin-like growth factor I is expressed in classical and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma tumour and microenvironmental cells. *Cell Tissue Res* 359, 841-851.
36. Fournier T, Riches DW, Winston BW, Rose DM, Young SK, Noble PW, Lake FR, Henson PM, 1995, Divergence in macrophage insulin-like growth factor-

- I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J. Immunol.* 155, 2123-2133.
37. Frago L M, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente JS, Chowen JA, 2002 Growth Hormone (GH) and GH-Releasing Peptide-6 Increase Brain Insulin-Like Growth Factor-I Expression and Activate Intracellular Signaling Pathways Involved in Neuroprotection. *Endocrinology* 143(10):4113–4122.
 38. Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente JS, 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. *Endocrinol.* 143, 4113–4122.
 39. Fryburg DA, 1994, Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol.* 267, 331-6.
 40. Gan Y, Zhang Y, DiGirolamo DJ, Jiang J, Wang X, Cao X, Zinn KR, Carbone DP, Clemens TL, Frank SJ, 2010, Deletion of IGF-I receptor (IGF-IR) in primary osteoblasts reduces GH.-induced STAT5 signaling. *Mol. Endocrinol.* 24, 644-656.
 41. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, 1992, Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493-501.
 42. Geffner ME, Bersch N, Lippe BM, Rosenfeld RG, Hintz RL, Golde DW, 1990, Growth hormone mediates the growth of T-lymphoblast cell lines via locally generated insulin-like growth factor-I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 464-469.
 43. Gelato MC, 1993, Growth hormone-insulin like growth factor I and immune function. *Trends. Endocrinol. Metab.* 4, 106-110.
 44. Gent J, Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ, 2002, Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(15):9858–9863.
 45. González-Juanatey J R, Piñeiro R, Iglesias M J, Gualillo O, Kelly P A, Diéguez C, Lago F, 2004, GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured *in vitro* through a calcineurin-dependent mechanism. *Journal of Endocrinology* 180:325–335.
 46. Harvey S, Baudet ML, Sanders EJ, 2006, Growth hormone and cell survival in the neural retina: caspase dependence and independence. *NeuroReport* 17, 1715-1718.
 47. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH, 1995, Growth hormone action: Carbohydrate metabolism in Growth hormone, CRC press, 20:371-377.
 48. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH, 1995a, Growth in Growth hormone, CRC press, 19:351-369.
 49. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH, 1995b, Carbohydrate metabolism in Growth hormone, CRC press, 20:371-377.
 50. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH, 1995c, Reproductive function in Growth hormone, CRC press, 23:393-406.
 51. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH, 1995d, Lipid metabolism in Growth hormone, CRC press, 21:379-387.

52. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, and Inagaki C, 2001, GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(9):4284–4291.
53. Hattori N, Shinomura K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Ikekubo K, and Kurahachi H, 1993, Growth Hormone (GH) Secretion from Human Lymphocytes Is Up-Regulated by GH, but not Affected by Insulin-Like Growth Factor-I. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76(4) 937-939.
54. Hinton PS, Peterson CA, Dahly EM, Ney DM, 1998, IGF-I alters lymphocyte survival and regeneration in thymus and spleen after dexamethasone treatment. *Am. J. Physiol.* 274, 912-920.
55. Hrabia A, Lesniak-Walentyn A, Sechman A, Gertler A, 2014, Chicken oviduct—the target tissue for growth hormone action: effect on cell proliferation and apoptosis and on the gene expression of some oviduct-specific proteins. *Cell Tissue Res.* 357, 363-372.
56. Hull KL, Thiagarajah, Harvey S, 1996, Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res.* 286:69-80.
57. Hull KL, Thiagarajah, Harvey S, 1996, Cellular Localization of Growth Hormone receptors/Binding Proteins in Immune Tissues. *Cell Tissue Res* 286:69-80.
58. Igyártó BZ, Nagy N, Magyar A, Oláh I, 2008, Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poult. Sci.* 87, 351-355.
59. Ihle JN, Gilliland DG, 2007, Jak2: Normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 17(1):8–14.
60. Inzucchi SE, Robbins RJ, 1993, Effects of growth hormone on human bone biology. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79:691-694.
61. Jeay S, Gail ES, Paul AK, Postel-Vinay MC, Baixeras E, 2001, Growth Hormone Exerts Antiapoptotic and Proliferative Effects through Two Different Pathways Involving Nuclear Factor- κ B and Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Endocrinology* 142(1):147-156.
62. Jeay S, Gail ES, Paul AK, Postel-Vinay MC, Baixeras E, 2001, Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor- κ B and phosphatidylinositol 3-Kinase. *Endocrinology* 142, 147-156.
63. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, and Baixeras E, 2000, Growth Hormone Prevents Apoptosis through Activation of Nuclear Factor- κ B in Interleukin-3-Dependent Ba/F3 Cell Line. *Molecular Endocrinology* 14(5): 650–661.
64. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Baixeras E, 2002, Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol. Cell Endocrinol.* 188, 1-7.
65. Jensen J, Galsgaard ED, Karlsen AE, Lee YC, Nielsen JH, 2005, STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin- 1β , interferon- γ and tumour necrosis factor α induced apoptosis independent of nitric oxide production. *J. Endocrinol.* 187, 25–36.

66. Jensen J., Galsgaard ED, Karlsen AE, Lee YC, Nielsen JH, 2005, STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1 β , interferon- γ and tumour necrosis factor α induced apoptosis independent of nitric oxide production. *Journal of Endocrinology* 187: 25–36.7.
67. Kelley KW, Meier WA, Minsahl C, Schacher DH, Liu Q, VanHoy R, Burgess W, Dantzer R, 1998, Insulin growth-factor I inhibits apoptosis in hematopoietic progenitor cells. Implications in thymic aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840, 518-524.
68. Kelly KW, Weigent DA, Kooijman R, 2007, Protein hormones and immunity. *Brain. Behav. Immun.* 21, 384-392.
69. Kelly PA, Djiane J, Postel Vinay MC, Ederly M, 1991, The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family. *Endocr Rev* 12:235-251.
70. Khansari DN, Gustad T, 1991, Effects of long-term, low-dose growth hormone therapy on immune function and life expectancy of mice. *Mech. Ageing Dev.* 57, 87-100.
71. Kooijman R, 2006, Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cyt. Grow. Fac. Rev.* 17, 305-323.
72. Kooijman R, Van Buul-Offers SC, Scholtens L E, Reijnen-Gresnigt RG, Zegers B J, 1997, T and B cell development in pituitary deficient insulin-like growth factor-II transgenic dwarf mice. *J. Endocrinol.* 155, 165-170.
73. Kopchick JJ, 2003, History and Future of Growth Hormone Research. *Horm. Res.* 60(3):103-112.
74. Kuhn H, Liebers U, Gessner C, Schumacher A, Witt C, Schauer J, Kovszidiz I, Wolff G, 2002, Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer in nonsmall-cell lung cancer induces cell growth arrest and apoptosis. *Eur. Respir. J.* 20: 703–709.
75. Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
76. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K, 1992, Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 80, 1207-1212.
77. Lanning NJ, Carter-Su C, 2006, Recent advances in growth hormone signaling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7, 225–235.
78. Lempereur L, Brambilla D, Scoto GM, D'Alcamo M, Goffin V, Crosta L, Palmucci T, Rampello L, Bernardini R, Cantarella G, 2003, Growth hormone protects human lymphocytes from irradiation-induced cell death. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1411-1416.
79. Lempereur L, Brambilla D, Scoto GM, D'Alcamo M, Goffin V, Crosta L, Palmucci T, Rampello L, Bernardini R, Cantarella G, 2003, Growth hormone protects human lymphocytes from irradiation-induced cell death. *Br J Pharmacol* 138(8):1411-6.

80. Lewis UJ, 1984, Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications *Annu. Rev. Physiol*, 46:33–42
81. Lieberthal W, Triaca V, Koh JS, Pagano PJ, Levine JS, 1998, Role of superoxide in apoptosis induced by growth factor withdrawal. *The American Physiological Society*. 98:0363-6127.
82. Luna M, Armenta ME, Granados E, Alba-Betancourt C, Carranza M, Arámburo C, 2015, Anti-apoptotic effects of growth hormone (GH) and IGF-I in chicken cerebellar cell cultures during the hypoxia injury. *Abst. 84, 3rd biennial meeting of the North American Society for Comparative Endocrinology*. Ottawa, Ca.
83. Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C, 2005, Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144:28–37.
84. Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C, 2005, Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 28-37.
85. Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C, 2008, Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius 32(11):1313-25.
86. Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C, 2008, Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1313-1325.
87. Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta J.L., Carranza M, Arámburo C, 2013, Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 182-187.
88. Luna M., Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C, 2005, Heterogeneity of Growth Hormone Immunoreactivity in Lymphoid Tissues and Changes During Ontogeny in Domestic Fowl. *General and Comparative Endocrinology* 144:28–37.
89. Luna-Acosta JL, 2008, Efecto de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en células de la bolsa de Fabricio. Tesis que para obtener el de maestría en ciencias (Neurobiología) INB-UNAM.
90. Luna-Acosta JL, 2008, Efecto de la hormona de crecimiento sobre la apoptosis en cultivos primarios de la bolsa de Fabricio, tesis de maestría.
91. Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Furukawa V, Ikeda S, and Muto T, 1998, Growth hormone inhibits apoptosis and up-regulates reactive oxygen intermediates production by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 22: 6, 368-374.
92. Millar WL, Eberhardt NL, 1983, Structure and Evolution of Growth Hormone Gene Family. *Endocr Rev* 4:97-130
93. Minshall C, Arkins S, Freund GG, Kelley KW, 1996, Requirement for phosphatidylinositol 3'-kinase to protect hemopoietic progenitors against apoptosis depends upon the extracellular survival factor. *J. Immunol.* 156, 939-947.

94. Mitsunaka H, Dobashi H, Sato M, Tanaka T, Kitanaka A, Yamaoka G, Tokuda M, Matoba K, Hiraishi T, Ishida T, 2001, Growth hormone prevents Fas-induced apoptosis in lymphocytes through modulation of Bcl-2 and caspase-3. *Neuroimmunomodulation*. 9, 259-262.
95. Napolitano LA, Lo JC, Gotway MB, Mulligan K, Barbour JD, Schmidt D, Grant RM, Halvorsen RA, Schambelan M, McCune JM, 2002, Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS*, 16, 1103-1111.
96. Napolitano LA, Schmidt D, Gotway MB, Ameli N, Filbert EL, Ng MM, Clor JL, Epling L, Sinclair E, Baum PD, Li K, Killian ML, Bacchetti P, McCune JM, 2008, Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J. Clin. Invest.* 118, 1085-1098.
97. Neiman PE, Thomas SJ, Loring G, 1991, Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 5857-5861.
98. Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DWH, 1993, Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha dependent mechanism in murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 91, 2368-2377.
99. Oberlin D, Fellbaum C, Eppler E, 2009, Insulin-like growth factor I messenger RNA and protein are expressed in the human lymph node and distinctly confined to subtypes of macrophages, antigen-presenting cells, lymphocytes and endothelial cells. *Immunology* 128, 342-350.
100. Postel-Vinay MC, Coelho VM, Gagnerault MC, Dardenne M, 1997, Growth hormone stimulates proliferation of activated mouse T lymphocytes. *Endocrinol.* 138, 1816-1820.
101. Render CL, Hull KL, Harvey S, 1995, Neural expression of the pituitary GH gene. *J. Endocrinol.* 147, 413-22.
102. Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Harvey S, Arámburo C, Luna M, 2010, Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships? *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 297-307.
103. Rodríguez-Tarduchy G, Collins MK, García I, López-Rivas A, 1992, Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3 dependent hemopoietic cells. *J. Immunol.* 149, 535-540.
104. Sabharwal P, Varma S, 1996, Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor 1 as an autocrine and paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2663-2669.
105. Sanders E.J, Lin WY, Parker E, Harvey S, 2011, Growth hormone promotes the survival of retinal cells in vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 140-150
106. Sanders EJ, Lin WY, Parker E, Harvey S, 2010, Growth hormone expression and neuroprotective activity in a quail neural retina cell line. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 111-119.

107. Sanders EJ, Parker E, Arámburo C, Harvey S, 2005, Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation. *Exp. Eye Res.* 81, 551-560.
108. Sanders EJ, Parker E, Harvey S, 2006, Retinal ganglion cell survival in development: Mechanisms of retinal growth hormone action. *Exp. Eye Res.* 83, 1205-1214.
109. Sanders EJ, Parker E, Harvey S, 2008, Growth hormone -mediated survival of embryonic retinal ganglion cells: Signaling mechanisms. *General and Comparative Endocrinology* 156 (2008) 613–621
110. Sanders EJ, Parker E, Harvey S, 2008, Growth hormone-mediated survival of embryonic retinal ganglion cells: signaling mechanisms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 613-621.
111. Scheepens A, Sirimanne ES, Breier BH, Clark RG, Gluckman PD, and Williams, C.E. 2001. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience* 104, 677-687.
112. Schmitz GG, Seibl WR, Kessler, 1991, Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192: 222-231.
113. Segard HB, Moulin S, Boumard S, Augier de Crémiers C, Kelly PA, Finidori J, 2003, Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. *Cellular Signalling* 15, 615-623.
114. Shved N, Berishvili G, Mazel P, Baroiller JF, Eppler E, 2011, Growth hormone (GH) treatment acts on the endocrine and autocrine/paracrine GH/IGF-axis and on TNF-alpha expression in bony fish pituitary and immune organs. *Fish Selfish Immunol.* 31, 944-952.
115. Sirotkin AV, Makarevich AV, 1999 GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of cAMP/protein kinase A system. *Journal of Endocrinology* 163:317-327.
116. Smith P, 1930, The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anat Rec* 47:119–143
117. Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA, 2009, Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur. Respir. J.* 34: 721–730.
118. Sumita K, Hattori N, Inagaki C, 2005, Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors, *J. Pharmacol. Sci.* 97, 408-416.
119. Susan LF, Brad TC, 2005, Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73:1907–1916.
120. Tennant JR, 1964, Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2, 685-694.
121. Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E, Kovacs K, 1998, The anterior pituitary. In: WILLIAMS TEXTBOOK OF ENY. 9th edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR EDS) 9: 249-250.

122. Tsuji Y, Kinoshita Y, Hato f, Tominaga K, Yoshida K, 1994, The in vitro proliferation of thymus epithelial cells stimulated with growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 40, 1135-1142.
123. Villanua MA, Szary A, Bartke A, Esquifino A I, 1992, Changes in lymphoid organs of Ames dwarf mice after treatment with growth hormone, prolactin or ectopic pituitary transplants. *J. Endocrinol Invest.* 15, 587-595.
124. Ward JE, Harris T, Bamford T, Mast A, Pain MCF, Robertson C, Smallwood D, Tran T, Wilson J, Stewart AG, 2008, Proliferation is not increased in airway myofibroblasts isolated from asthmatics. *Eur. Respir. J.* 32: 362–371
125. Waters MJ, Hoang HN, Fairlie D P, Pelekanos RA, Brown RJ, 2006, New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.*, 36(1): 1–7.
126. Weigent DA, 2011, High molecular weight isoforms of growth hormone in cells of the immune system. *Cell. Immunol.* 271, 44-52.
127. Weigent DA, 2013, Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell. Immunol.* 285, 118-32.
128. Welniak LA, Sun R, Murphy WJ, 2002, The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J. Leukocyte Biol.* 71, 381-387.
129. Winston LA, Bertics PJ, 1992, Growth hormone stimulates the tyrosyl phosphorylation of 42- and 45-kDa ERK-related proteins. *J Biol Chem*; 267:4747–51.
130. Yada T, Uchida K, Kajimura S, Azuma T, Hirano T, Grau EG, 2002, Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 173, 483-492.
131. Zermeño C, Guzmán-Morales J, Macotella Y, Nava G, López-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, De la Escalera GM, Clapp C, 2006, Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J. Endocrinol.* 189, 1-8.
132. Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE, 2001, Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13:599–616.
133. Zhu T, Ling L, Lobie PE, 2002, Identification of a JAK2- independent pathway regulating growth hormone (GH)-stimulated p44/42 mitogen-activated protein kinase activity. GH activation of Ral and phospholipase D is Src-dependent. *J. Biol. Chem.*, 277(47):45592–45603.