



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**“EFECTO DE LA HIPOXIA EN LA CONCENTRACIÓN DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO EN CEREBRO DE EMBRIONES
DE POLLO”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DANIELA ÁVILA GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. 1115034-7

No. Título _____

Clas 15

636.50885

1958e

Esta tesis fue realizada en el laboratorio "Bioquímica de Hormonas" del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro, del 2008 al 2009. La tesis se llevó a cabo con ayuda de becas y apoyos otorgados por CONACYT 0102037, CONACYT C60296 y PAPIIT IN 210209.

*si vas a intentarlo, ve hasta el
final.
de lo contrario, no empieces siquiera.*

*si vas a intentarlo, ve hasta el
final. esto podría significar perder novios,
parejas, parientes, empleos y
quizás tu mente.*

*ve hasta el final.
podría significar no comer por 3 o
4 días.
podría significar congelarte sobre
el banco de un parque.
podría significar la cárcel,
podría significar la humillación,
burlas,
soledad.
la soledad es el regalo,
todo lo demás es para poner a prueba tu
resistencia, de
cuánto realmente quieres
hacerlo.
y lo harás
a pesar del rechazo y de las
ínfimas probabilidades
y será mejor que
cualquier cosa
que podrías imaginar.*

*si vas a intentarlo,
ve hasta el final
no hay otro sentimiento como
ése.
estarás a solas con los
dioses
y las noches resplandecerán con
el fuego.*

*hazlo, hazlo, hazlo,
hazlo.*

*hasta el final
hasta el final.
llevarás las riendas de la vida hacia
la risa perfecta,
es la única lucha
que vale la pena.*

Charles Bukowski (Roll the dice)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por permitirme realizar el Servicio Social y la Tesis en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas.

A la **Dra. Maricela Luna Muñoz** por ser mi tutora para el Servicio Social y Directora de Tesis y ayudarme en la elaboración de la misma.

A **Clarita** gracias por haberme iniciado en el aprendizaje de las técnicas y uso de materiales del laboratorio, por haberme ayudado con el transporte y cuidado de los embriones de pollo y por preocuparse en llevarme a mi casa cuando ya era tarde.

A **Martha** gracias por pesarme la GH (indispensable para todos los experimentos), por llamarme la atención en cuanto al uso de los materiales del laboratorio y por haberme transportado en su auto directo a mi casa a altas horas de la noche.

A **Pepe** y a **Adriana** gracias por haberme llevado a sus parrandas (viajes incluidos) de vez en cuando para la distracción, diversión, compañerismo y por llevarme a mi casa después de terminada la fiesta a altas horas de la madrugada.

A **Maryselita** gracias por ser tan consciente y por ende cuidarme los embriones cuando le tocaba a ella los fines de semana (y por querer llevarse en ocasiones la carga de preocupaciones de los demás o interesarse por mis problemillas).

A **Gerardo** gracias por cuidarme los embriones y la incubadora, por limpiar el material de laboratorio indispensable para mis experimentos y por traerme hielo seco.

A **JLA** gracias por dejarse ser molestado por mis ocurrencias (aunque ya no se deja últimamente), por escuchar mis lecturas, por enseñarme mucho de historia, por darme sus opiniones respecto a filosofía absurda, por llevarme a mi casa y por haber hecho dos que tres TUNEL's para mí (aunque mal hechos).

A **Mr. Brown**, alias **Carlos Guillermo** (a pesar de que se moleste por mencionarlo), por hacer que el tiempo transcurrido dentro del laboratorio haya sido más llevadero y divertido por sus ideas, sarcasmo y cinismo.

A **mis padres** por haberme mantenido durante estos años mientras estudiaba en la universidad. A **mi hermano** por haber aguantado estar en la misma casa conmigo y por no hacer preguntas cuando regresaba a la casa hasta dos días después.

RESUMEN

El efecto de la hipoxia y de la anoxia sobre la respuesta fisiológica en un sistema vivo no se ha comprendido del todo, ya que en algunos estudios la hipoxia puede inducir una disminución de los niveles de factores neuroendócrinos, así como suprimir el crecimiento corporal mientras que en otros trabajos no se reportan cambios. Se sabe que la hormona de crecimiento (GH) juega un papel importante en el crecimiento corporal, así como en diversas funciones metabólicas. Por ello fue interesante estudiar los niveles de la GH después de una exposición a un daño por la hipoxia o anoxia. En este trabajo se analizó el efecto que produce la anoxia o hipoxia sobre el porcentaje de eclosión, el peso del embrión y los niveles de la hormona de crecimiento (GH) en el cerebro de embriones de pollos de 15 y de 18 días de desarrollo embrionario (DE). Para ello se determinó la tasa de eclosión de los grupos experimentales, se cuantificó la concentración de la GH por medio del método del ELISA y se analizó si la anoxia o hipoxia induce muerte por apoptosis en tejido cerebral a través de la técnica de TUNEL. Los resultados mostraron que la anoxia redujo el porcentaje de eclosión tanto en 15 como de 18 DE, mientras que la hipoxia sólo disminuyó la tasa de eclosión en 18 DE. Los niveles de GH en el cerebro fueron cuantificados 24 horas después del tratamiento y mostraron un incremento después de un daño producido por anoxia o hipoxia en embriones de 15 DE mientras que en los de 18 DE sólo hubo un aumento de la GH en el grupo sometido a hipoxia. En cuanto a los niveles de GH cuantificados hasta el momento de la eclosión, se mostró un aumento significativo de la GH tanto en el grupo 15 y en el 18 DE en las dos condiciones de daño. Referente a los resultados de TUNEL, un daño por hipoxia tanto a los 15 DE como a los 18 DE mostró el mayor porcentaje de apoptosis por área relativa, a diferencia de un daño por anoxia, mientras que en el grupo control prácticamente no mostró apoptosis. Estos datos, aún preliminares, nos permiten proponer que los niveles de la GH podrían estar relacionados con los mecanismos de neuroprotección previamente señalados en otros modelos de daño cerebral y que dependerá de la etapa de desarrollo y de la temporalidad del daño el tipo de efectos que se pueden producir.

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
Estructura de la hormona de crecimiento (GH)	2
Gen de la GH	5
Efectos de la GH	7
Heterogeneidad de la GH	8
Receptor a GH	9
Mecanismo de acción de la GH	10
Traducción, almacenamiento y liberación de la GH	12
Regulación de la síntesis y liberación de la GH	14
Mecanismo de acción de los factores reguladores	17
GH extrahipofisiaria	19
Expresión de GH en el Sistema Nervioso Central	19
Acción de la GH en el Sistema Nervioso Central	21
La hipoxia en el Sistema Nervioso Central	23
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	26
VI. METODOLOGÍA	
VI.1. Modelo experimental	27
VI.2. Extracción de proteínas	28
VI.3. Cuantificación de proteínas	28
VI.4. Cuantificación de la GH	29
VI.5. Técnica de TUNEL	30
VII. RESULTADOS	32

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	43
IX. BIBLIOGRAFÍA	49
X. ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura primaria de la GH porcina.	2
2	Estructura tridimensional de la molécula de GH.	3
3	Sitio de unión al receptor de la GH.	4
4	Mecanismo de acción de la GH.	12
5	Regulación de la secreción de la GH en humanos.	18
6	Modelo de transducción para la expresión del gen de la GH en los somatotropos.	19
7	Cadena de sucesos que determinan la muerte celular ante un daño por hipoxia	
8A	Tasa de eclosión de los pollos sometidos a anoxia a los 15 días de desarrollo embrionario (DE).	29
8B	Tasa de eclosión de los pollos sometidos a hipoxia a los 15 DE.	29
9A	Tasa de eclosión de los pollos sometidos a anoxia a los 18 DE.	34
9B	Tasa de eclosión de los pollos sometidos a hipoxia a los 18 DE.	34
10	Concentración de GH en cerebro de embriones de 15 DE sometidos a 1 h de anoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro.	35
11	Concentración de GH en cerebro de embriones de 15 DE sometidos a 24 h de hipoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro	36
12	Concentración de GH evaluada en cerebros de embriones expuestos a anoxia e hipoxia a los 15 DE regresados a normoxia hasta su eclosión y sacrificados 1 día después.	37
13	Concentración de GH en cerebro de embriones de 18 DE sometidos a 1 hora de anoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro.	37

14	Concentración de GH en cerebro de embriones de 18 DE sometidos a 24 horas de hipoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro.	38
15	Concentración de GH evaluada en cerebros de embriones expuestos a anoxia e hipoxia a los 18 DE regresados a normoxia hasta su eclosión y sacrificados 1 día después.	38
16	Cortes histológicos de cerebro de embriones de pollo de 15 DE sometidos a anoxia o hipoxia.	39
17	Cortes histológicos de cerebro de embriones de pollo de 18 DE sometidos a anoxia o hipoxia	40
18	Área relativa de la señal de TUNEL en cortes histológicos de cerebro de pollo de 15 DE inducidos a anoxia o hipoxia	41
19	Área relativa de la señal de TUNEL en cortes histológicos de cerebro de pollo de 18 DE inducidos a anoxia o hipoxia	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Peso Total de los pollos eclosionados sometidos a anoxia a los 15 días de desarrollo	33
2	Peso Total de pollos eclosionados sometidos a anoxia a los 15 días de desarrollo	33
3	Peso de los cerebros de pollos eclosionados sometidos a hipoxia en el día 15 de desarrollo embrionario	35
4	Peso de los cerebros de pollos eclosionados sometidos a hipoxia en el día 18 de desarrollo embrionario	35

I. INTRODUCCIÓN

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína que es sintetizada y liberada principalmente en los somatotopos del lóbulo anterior de la hipófisis (Inzucchi & Robbins, 1993). Esta hormona desempeña funciones sobre la diferenciación y la proliferación celular en los tejidos y posee una amplia gama de bioactividades en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y sales minerales. Se sabe que prácticamente todos los órganos son blanco de la GH, y que los efectos de esta hormona pueden producirse de manera directa o bien estar mediados a través de otros mensajeros como el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-1) (Isaksson et al., 1985). Aunque se considera a la GH como un factor endócrino que tiene efectos sobre tejidos localizados lejanos al sitio de síntesis que es la hipófisis, en la actualidad se ha propuesto que la GH es también capaz de actuar de manera autócrina y/o parácrina en diferentes tejidos (Harvey et al., 1998). Un ejemplo se ve en tejidos embrionarios, donde la GH se sintetiza en células no hipofisarias, antes de la diferenciación funcional de los somatotopos hipofisarios (Harvey et al., 2001a). Resultados obtenidos en el laboratorio han mostrado la presencia de GH y su expresión en tejidos del sistema inmunológico (timo, bolsa de Fabricio y bazo) durante el desarrollo, en tejidos del aparato reproductor de machos y hembras (Luna et al., 2004, 2005) y en el sistema nervioso central de pollo (Alba C., 2006). La importancia de estudiar a la GH producida de manera local en tejidos extrahipofisarios es para caracterizar posibles nuevas bioactividades de la GH así como el conocer su diversidad de efectos biológicos. Un ejemplo de esto es su posible efecto neuroprotector durante el daño cerebral inducido por la hipoxia isquémica en rata. (Scheepens et al., 2001). Aunque el mecanismo de neuroprotección por parte de la GH no se ha dilucidado por completo, se apoya la hipótesis de que sea a causa de la inhibición de las actividades de la caspasas (Mitsunaka et al., 2001). En este trabajo se estudiará el efecto de la hipoxia en la expresión local de la GH en el cerebro de embriones de pollos. Se determinará si la hormona de crecimiento secretada en las etapas embrionarias tiene un origen local y se evaluará si en respuesta a un daño inducido por hipoxia la expresión de ésta se modifica.

II. ANTECEDENTES

Estructura de la Hormona de crecimiento

La estructura primaria de la GH contiene alrededor de 191 aminoácidos (aunque existen variaciones en el número de residuos de especie a especie) y posee una masa molecular de aproximadamente 22 kDa. Presenta 4 α -hélices así como dos puentes disulfuro que para el caso de la GH porcina se encuentran localizados en los residuos de cisteínas 53 - 164 y 181 - 189 (Fig. 1) y en la GH humana se encuentran en las cisteínas 35 - 165 y 182 - 189 que forman respectivamente un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal, tiene un punto isoeléctrico que varía entre 5.1 – 8.4 dependiendo de la especie (Arámburo et al., 1993; Scanes & Campbell, 1995). Por medio de mutagénesis se ha demostrado que el asa grande es la requerida para la actividad biológica de la GH. (Chen et al., 1990). El núcleo central de la GH se compone de aproximadamente 20 aminoácidos hidrofóbicos (Abdel-Meguid et al., 1987).

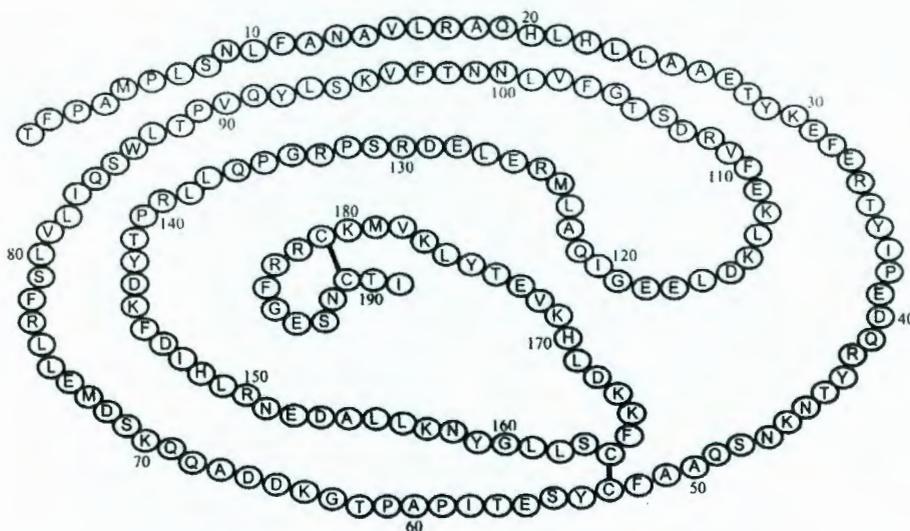


Fig.1. Estructura primaria de la GH porcina (Tresguerres, 1999).

La estructura tridimensional de la GH humana obtenida por cristalografía de rayos X, (de Vos et al., 1992) está constituida en 50% por α -hélices distribuidas en 4 α -hélices anti-paralelas que se ubican en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-

183 (Fig. 2), cada una tiene diferente carácter hidrofóbicas, la número 4 es la más hidrofóbica de todas (Abdel-Meguid et al., 1987; Scanes & Campbell, 1995).

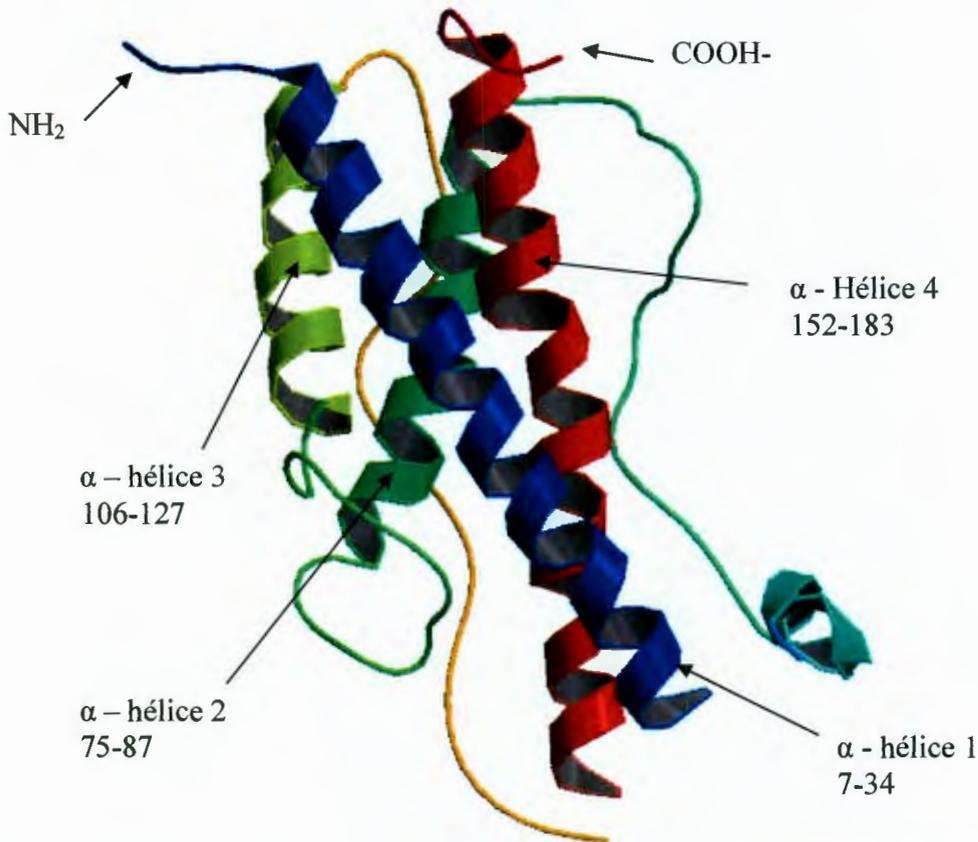


Fig. 2. Estructura tridimensional de la molécula de GH humana. NH₂ corresponde al extremo amino; COOH, extremo carboxilo. La hélice 1 se encuentra coloreada en color azul; la hélice 2, color verde; a hélice 3, color amarillo; hélice 4, color rojo (Chantalat et al., 1995).

Estos segmentos contienen 4 dominios (A_{GH}, B_{GH}, C_{GH} y D_{GH}) altamente conservados en la escala filogenética, siendo el segmento 164-187 el más conservado. Los cuatro dominios se han identificado en todos los vertebrados, corresponden a las posiciones 13-33, 54-94, 113-132 y 157-187, y se encuentran separados por dominios variables o deleciones. Los dominios A_{GH}, B_{GH} y C_{GH} corresponden a α-hélices con un arreglo hacia el exterior de la molécula de GH, mientras que el dominio D_{GH} se encuentra localizado en el interior de la molécula.

Este arreglo se ha observado en todas las GHs estudiadas hasta ahora (Scanes & Campbell., 1995).

La estructura tridimensional del complejo de la hGH y el dominio extracelular de su receptor (GHR) ha sido determinado por cristalografía de rayos-X (de Vos et al., 1992). El complejo se compone de una molécula de GH y de dos moléculas de GHR. Hay de hecho dos sitios distintos en los que se puede unir el receptor de GH a la molécula de la hormona (Fig. 3). El sitio 1 incluye la hélice 4 desde su región central a la C-terminal y los residuos del asa (54-74), que forman enlaces de hidrógeno y puentes salinos entre Lys-41, Gln-46, Pro-61, Lys-168, Asp-171, Thr-175, Arg-178 y el GHR. El segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1, con puentes no covalentes entre los residuos Asn-12, Arg-16, Arg-19 y el GHR (Scanes & Campbell, 1995; Juárez et al, 1999).

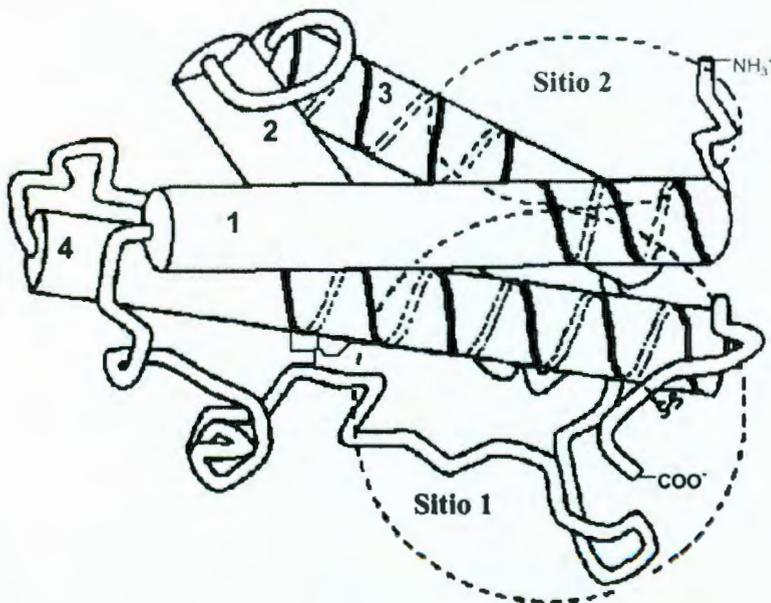


Fig. 3. Sitios de unión al receptor de GH (modificado de Cunningham, 1991)

Gen de la Hormona de crecimiento

La GH pertenece a una familia de hormonas proteínicas relacionadas entre si que incluye a la prolactina (PRL), el lactógeno placentario, la proliferina y la somatolactina. Si bien estas proteínas comparten similitudes estructurales poseen funciones diversas (Seeburg, 1985). Con base en la homología interna que hay entre la secuencia de la GH y de la PRL, se ha propuesto que estas hormonas provienen de un pequeño péptido ancestral, posiblemente de 25-50 aminoácidos, que tuvo duplicaciones sucesivas de sus exones hasta llegar a una estructura polipeptídica intermedia entre GH y PRL (Niall et al., 1971). El gen para la GH se encuentra localizado en el cromosoma 17 en humanos (hGH), 10 en la rata, 11 en el ratón y 27 en el pollo, mientras que el de la PRL en el 6 en humanos, 17 en la rata, 13 en el ratón y 2 en el pollo. El hGH es de aproximadamente 3000 nucleótidos y forma parte de un conjunto de cinco genes que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17. Este grupo de genes abarca 66,500 bases y se compone del *GH-N* (de la hormona de crecimiento), del gen de la somatomotropina coriónica (CS-L), el gen de la A- somatomotropina coriónica (CS-A), el gen de la *GH-V* (la variante de la hormona de crecimiento) y el gen de la somatomotropina coriónica-B (CS-B). En los seres humanos, estos cinco genes poseen alrededor del 92% de homología en su secuencia de nucleótidos (Paladini et al., 1983; Miller et al., 1983).

El gen hGH-N se expresa en los somatotropos de la hipófisis. El gen *hGH-N*, que está contenido dentro de un fragmento de DNA de 2.6 kbp, se compone de cinco exones y cuatro intrones y las regiones no traducidas 3' y 5' (incluyendo una región promotora de 500 bp). El exón I codifica para 3 a 9 aminoácidos del péptido señal, mientras que el exón II codifica para el resto del péptido señal y los primeros 28 a 35 aminoácidos (aa) de la hormona madura; los exones III, IV y V codifican para los aa 36-40, 52-60 y 63-69, respectivamente (Harvey, 1995). Este gen es similar en estructura a otros genes de GH en mamíferos, pero es más pequeño que el de pollo (3.5 kbp), el cual contiene secuencias de intrones expandidas. La transcripción del gen de GH se realiza por la ARN polimerasa II, que inicia la síntesis en el codón de origen en el extremo 5' después de haberse

Efectos de la GH

Para la GH se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular, la conservación de la glucosa y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente directos y mediados por el factor de crecimiento insulinoide. Entre los primeros se incluyen: estimular la lipólisis, incorporación de algunos aminoácidos a las células (disminución en su concentración sanguínea), aumento de la síntesis (transcripción) de ARN mensajero y ribosomal y aumento de la traducción de ARN mensajero para aumentar en forma general la producción de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabotogénico) y participación en la regulación tubular de algunos iones. Por otra parte, estimula el crecimiento lineal del esqueleto participando en la diferenciación de los precondrocitos, y promueve la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y otras variedades de tejidos como la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo, 1993). Las acciones de la GH sobre sus órganos blanco se llevan a cabo tanto directa como indirectamente, mediante la participación de somatomedinas –término con el que se refiere a péptidos que desempeñan una actividad mediadora-. Se propuso la existencia de las somatomedinas por el hallazgo de que el crecimiento y actividad mitótica del cartílago era dependiente de GH *in vivo*, pero la adición directa de GH *in vitro* no era capaz de ejercer tales acciones, mientras que el suero de ratas normales sí estimulaba la proliferación del cartílago. Dicho factor plasmático responsable, diferente pero dependiente de GH, no se encontraba en el plasma de animales hipofisectomizados pero reaparecía cuando éstos eran tratados con GH exógena. (Thorner et al, 1998)

En la actualidad se sabe que las somatomedinas son en realidad péptidos estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se propuso el término de “factor de crecimiento insulinoide” (IGF por sus siglas en inglés -*Insulin like Growth Factor*. IGF-I o somatomedina C). Se sugiere que el IGF-I es el mediador importante de la acción de GH, y el hecho de que IGF-I inhiba la

secreción de GH apoya esta hipótesis. Las acciones de IGF-I pueden ser locales o sistémicas participando como hormona. Se ha establecido una hipótesis dual, basada en estudios con preadipocitos, en la que la GH estimula primero a las células precursoras para diferenciarse, y las somatomedinas actúan después como mitógenos para estimular la expansión clonal de las células diferenciadas. Cabe mencionar que la administración de IGF-I no promueve el crecimiento tal como lo hace la GH. (Thorner et al., 1998; Devesa et al., 1992).

Heterogeneidad molecular de la GH

Actualmente se sabe que la GH hipofisiaria constituye una familia de proteínas homólogas, que a través de diferentes mecanismos como la duplicación génica, empalmes alternativos o por modificaciones postraduccionales del producto de expresión (como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación) da origen a diversas variantes moleculares que pueden explicar, al menos parcialmente, la amplia diversidad funcional de esta hormona (Kopchick & Andry, 2000).

En los últimos años, se ha generado información que apoya la noción de que las variantes moleculares de la GH desempeñan un papel relevante en la expresión de la amplia bioactividad característica de esta hormona y que, por ende, deben incorporarse en los esquemas para entender la compleja fisiología de esta proteína. Empleando como modelo experimental al pollo, se ha descrito que las variantes moleculares de esta hormona existen en la hipófisis (Arámburo et al., 1989a), principalmente originadas por modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Arámburo et al., 1991; Berumen et al., 2004), la fosforilación (Arámburo et al., 1990a; 1992), la formación de oligómeros y el procesamiento proteolítico (Arámburo et al., 2001). Asimismo, que las variantes moleculares sintetizadas en la adenohipófisis son liberadas a la circulación y que existe una regulación diferencial para la secreción de dichas variantes por parte de secretagogos como el GHRH (Martínez-Coria et al., 2002). Otras evidencias han mostrado que la proporción relativa de las variantes de masa de la GH se modifica a lo largo de la ontogenia en la hipófisis del pollo (Arámburo et al., 2000) y además

libres estimula la síntesis de GH con el acoplamiento de aminoácidos de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del ARNm de GH. Se sintetiza primero una pre-hormona de aproximadamente 225 aminoácidos (216 en el pollo) que después se procesa para dar origen a la proteína de secreción, al escindir aminoácidos del extremo amino terminal correspondientes al péptido señal, secuencia que dirige al complejo ribosoma-ARNm para adherirse al retículo endoplásmico (RE) y facilita la translocación de la proteína en el espacio intracisternal del RE para su procesamiento y almacenamiento. Es por ello que las cisternas se vuelven más prominentes en somatotropos activos en síntesis y el número de polisomas libres y unidos a membrana se incrementa. Los 20 a 30 aminoácidos, del péptido señal se escinden por procesamiento proteolítico en el RE, en donde también la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro. El procesamiento de la hormona puede continuar en su paso por el complejo de Golgi, al cual se transloca por un proceso dependiente de energía. La estimulación de la función del Golgi se acompaña por su agrandamiento y ocupación de una gran área del somatotropo y la producción de numerosos cuerpos multivesiculares que se agregan en la región del Golgi. Además del procesamiento, también se lleva a cabo la selección y empaquetamiento de moléculas de GH en las vesículas de secreción; el transporte de GH a estas vesículas se puede facilitar por proteínas de unión. Se puede procesar aún más la hormona dentro de los compartimentos de almacén de los somatotropos. Aunque los gránulos recientemente sintetizados u hormona citoplásmica puede liberarse sin almacenamiento previo, la mayoría de la GH sintetizada se mantiene en los gránulos de secreción de la célula. La cantidad de GH almacenada dentro de los somatotropos parece participar en la regulación de la expresión del gen de GH, que está inversamente relacionado al grado de granulación del somatotropo. La cantidad de GH sintetizada en los somatotropos es del 10 al 20% de toda la proteína celular bajo condiciones basales, aunque esta proporción se incrementa por los secretagogos de GH. En contraste, la GH representa menos del 1% de la proteína sintetizada en células tumorales de hipófisis de rata (Harvey, 1995).

Regulación de la síntesis y liberación de la GH

La secreción de la GH (GH) por la hipófisis anterior es el resultado de la interacción de dos péptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH, *Growth Hormone Releasing Hormone*) y la somatostatina (SRIF *Somatotropin Release Inhibiting Factor*). La interacción recíproca entre ambos sobre los somatotropos determina la pulsatilidad de la secreción de GH. La GH se secreta con un patrón ultradiano de secreción espontánea, con episodios de brusca liberación de amplitud variable, que en el ser humano aparecen entre cuatro y ocho veces cada 24 horas. Este ritmo secretor endógeno tienen las amplitudes máximas durante la primera fase del sueño o fase de ondas lentas (Müller, 1987).

El factor liberador de hormona de crecimiento (GHRH) es un péptido, secretado por el núcleo arcuato del hipotálamo, que pertenece a la familia de los secretores de glucagón. Las proyecciones axonales de las neuronas hipotalámicas de ese núcleo liberan al péptido en el plexo primario del sistema vascular portal hipofisiario y ejercen su acción sobre los somatotropos. La función principal del factor liberador de GH es regular la frecuencia y amplitud de los pulsos de GH. El factor inhibidor de la liberación de hormona de crecimiento o somatostatina (SRIF) se encuentra principalmente en el núcleo periventricular hipotalámico, pero también se ha aislado del tracto gastrointestinal entre otros tejidos. Esta última es una hormona cuyo efecto es principalmente inhibitorio, no sólo de la secreción de GH, sino también de tirotrófina, insulina y glucagón. Se sabe que su secreción tónica produce niveles basales que pueden variar en un mismo individuo y de un individuo a otro. Sobre este tono basal de somatostatina ejerce su efecto el factor liberador de GH, lo que determina la frecuencia y amplitud de los pulsos de GH. (Frohman et al., 1990). Esta interacción entre los péptidos parece ser la responsable de la secreción episódica de la GH.

Sin embargo, estos factores hipotalámicos están sujetos a modulación por otros péptidos hipotalámicos y por una compleja red de neurotransmisores que

funcionan como intermediarios entre las influencias metabólicas, neuroendocrinas, neuronales e inmunológicas, y la liberación de GH (Harvey, 1995).

La noradrenalina, acetilcolina, dopamina, histamina, serotonina y algunos neuropéptidos, como los péptidos opioides, la galanina y el neuropéptido Y participan en la liberación de GH a través de la regulación del efecto de los factores hipofisiotrópicos (Fig. 5).

La propia GH juega un importante papel regulador de su propia secreción. El mecanismo sería del tipo de retroalimentación negativa de asa corta, mediante una combinación de incremento de síntesis y liberación de SRIF y disminución de liberación de GHRH. La retroalimentación a nivel periférico está mediada por diferentes hormonas y metabolitos activados por estímulo de la GH, por ejemplo IGF-I e IGF-II. Estas somatomedinas, sintetizadas principalmente en el hígado por estímulo directo de GH, participan en la regulación negativa de asa larga durante la secreción de GH. En cambio, las hormonas tiroideas (HT) incrementan la transcripción y con ello los niveles de ARNm de GH (Force & Spindler, 1994) a través de los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) distribuidos a lo largo del gen de GH, aunque su efecto es diferencial de acuerdo a su ubicación, siendo estimulantes de la transcripción si se localizan hacia el extremo 3', mientras que son represores hacia el extremo 5' (Devesa et al., 1992; Reiprich et al., 1995).

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) no sólo regula la secreción de TSH hipofisiaria sino también la liberación de GH en la mayoría de los grupos de vertebrados. Además de estimular directamente la liberación de GH, el TRH puede regular esta actividad incrementando los niveles séricos de GHRH. Sin embargo, mientras el TRH estimula la actividad liberadora de GH del hipotálamo aviar, parece estimular el control inhibitorio hipotalámico en mamíferos. Aunque la respuesta somatotrópica se ha considerado paradójica, el TRH es un regulador fisiológico de la secreción de GH en aves y posiblemente en mamíferos. Esta

posibilidad tiene apoyo en la supresión de secreción de GH en ratas inmunizadas contra TRH (Harvey, 1995).

La serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) estimulan la secreción de GH en los somatotropos. La norepinefrina reduce la actividad de las neuronas de SRIF y estimula la secreción de GHRH vía receptores adrenérgicos α_2 . El N-metil-D-aspartato (NMDA), la leptina y la galanina estimulan la secreción de GHRH, mientras que el neuropéptido Y estimula tanto la secreción de GHRH como de SRIF. La dopamina estimula la secreción de SRIF vía receptores D1 e inhibe la secreción de GH de los somatotropos vía receptores D2. Así, muchos factores neuroendocrinos regulan la secreción de GH alterando la secreción de GHRH y/o de SRIF como se había mencionado, o actuando independientemente sobre los somatotropos para coordinar su secreción (McMahon et al, 2001). En particular la ghrelina, un péptido estomacal recientemente encontrado que se une al receptor para los secretagogos de GH como el hexapéptido GHRP-6, estimula la secreción de GH directamente en los somatotropos, y su secreción también está regulada por GHRH (Malagon et al, 2003; Kamegai et al, 2004).

Los glucocorticoides intervienen en el control de la transcripción del gen de la GH teniendo un efecto estimulador. En estudios *in vitro* se ha mostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de GH es dependiente de HT. También afectan la expresión de gen del receptor de GHRH incrementando el ARNm, mientras se observa una disminución en los niveles de ARNm del receptor de SRIF. No obstante, una exposición demasiado prolongada a glucocorticoides produce el efecto contrario en la expresión de dichos receptores (Devesa et al., 1992).

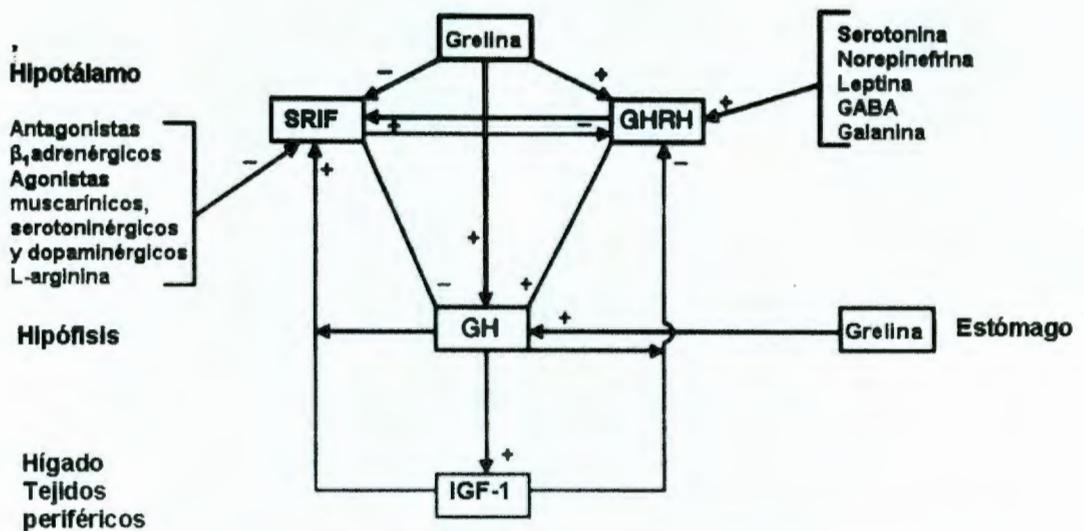


Fig. 5. Regulación de la secreción de GH en humanos (modificado de Root W. & Root MJ, 2002)

Mecanismo de acción de los factores reguladores

La GHRH y la SRIF tienen un efecto antagónico sobre los niveles intracelulares del AMPc a través de la activación de proteínas Gs y Gi respectivamente. La activación de Gs permite la disociación de la subunidad alfa y, en consecuencia, la estimulación de la adenilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de ATP a adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc estimula a la cinasa de proteína A (PKA), permitiendo la disociación de la subunidad catalítica que se transloca al núcleo y fosforila el factor de transcripción CREB (elemento de respuesta al AMPc), el cual activa la transcripción de los genes *c-fos* y *pit-1*. Este último activa la transcripción de los genes de GH y del receptor de GHRH (Bertherat, 1995, ver Figura 6). Además se ha observado que el efecto de la GHRH sobre la proliferación de los somatotropos es vía la activación de las MAP cinasas a través de las subunidades de $\beta\gamma$ de una proteína Gs y es independiente de la vía de la adenilato ciclasa (Harvey, 1995).

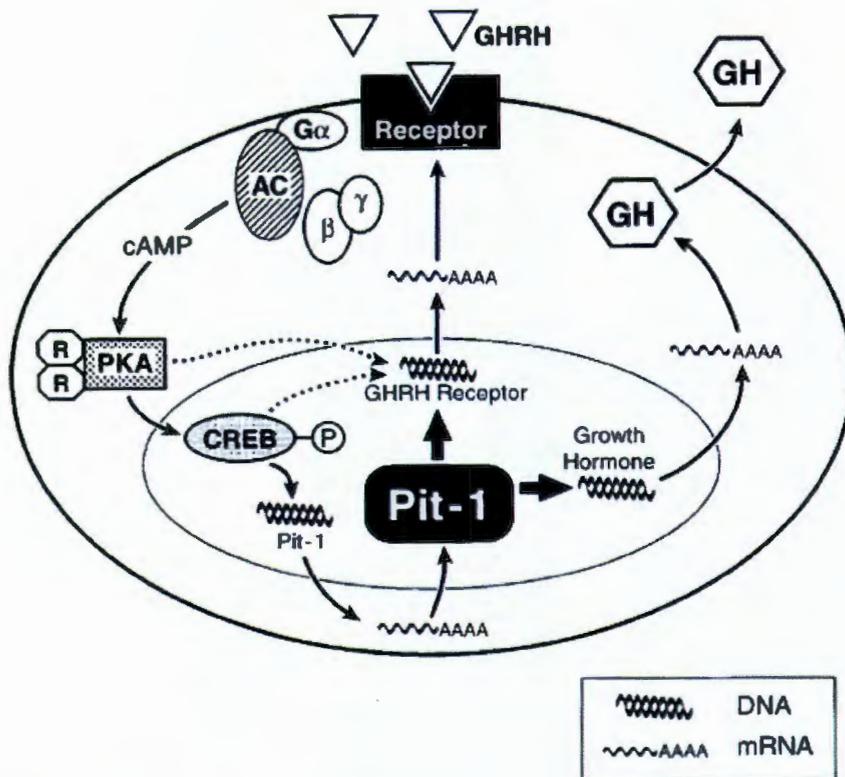


Fig. 6. Modelo de transducción para la expresión del gen de GH en los somatotropos (modificado de Mayo et al., 1995).

GHRH = Hormona liberadora de la hormona de crecimiento, Receptor = Receptor para GHRH; $G\alpha$, β y γ = subunidades de una proteína G, AC = adenilato ciclasa, PKA = proteína cinasa A, R = subunidad catalítica de PKA, CREB = proteína que se une a elementos de respuesta a AMPc.

Durante la regulación de la secreción de la GH se activa la vía de la adenilato ciclasa que vía el AMPc fosforila y activa a la cinasa de proteína A; en consecuencia, se producen prearreglos en el citoesqueleto que permiten la fusión de las vesículas de secreción. Como efecto de la apertura de los canales de Na^+ se despolariza la membrana y se abren canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que permite la entrada de Ca^{2+} indispensable para la liberación de GH. Posteriormente se activa la ATPasa de Ca^{2+} que restaura los niveles de Ca^{2+} intracelular. Además de esta vía que se ha observado en los somatotropos la activación de la fosfolipasa A, en respuesta a la GHRH, en consecuencia se produce la movilización de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplásmico a

través de la apertura de los canales de Ca^{2+} por la unión del inositol trifosfato (IP3) y la fusión de vesículas secretoras por la activación de la proteína cinasa C activada por di-acilglicerol (DAG) y el ácido araquidónico. La inhibición de este proceso está dado principalmente por SRIF a través de la unión al receptor. La SRIF es capaz de inhibir mediante una proteína G_i la formación de AMPc y la entrada de Ca^{2+} y, como consecuencia, la secreción de GH (Harvey, 1995).

Hormona de Crecimiento Extrahipofisiaria

En años recientes se ha descrito la presencia de la GH y la de su ARN mensajero en muchos tejidos extrahipofisarios. Se ha determinado en: tejido neural (Yoshizato et al., 1998; Harvey et al., 2001a), en el sistema inmune (Recher et al., 2001), en el tejido intergumentario (Slominski et al., 2000), en el sistema esquelético (Harvey et al., 2001b), en el sistema respiratorio (Allen et al., 2000), en el sistema digestivo (Tresguerres et al., 1999), en el sistema cardiovascular (Recher et al., 2001) y en tejidos ortodónticos (Zhang et al., 1997) de varias especies. En el pollo se ha identificado el ARNm de GH en cerebro (Render et al., 1995a), en el bazo, timo y bursa (Render et al., 1995b; Luna et al., 2005), y en ojo de embriones y adultos (Baudet et al., 2003). Así mismo, se ha reportado la presencia de proteínas parecidas a GH y su ARNm en algunos tejidos del aparato reproductor de machos (Luna et al., 2004).

Expresión de GH en el Sistema Nervioso Central

Para ejercer sus efectos sobre el desarrollo y las funciones del cerebro se ha planteado que la GH y el IGF-1 pueden cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) por un mecanismo que aún no está completamente dilucidado, o bien se ha propuesto otras vías diferentes para que lleven a cabo sus efectos como son: a) la GH puede liberar mediadores secundarios en tejidos periféricos, los cuales pueden cruzar la BHE y producir efectos en el SNC (Coculescu et al., 1999); b) la GH puede ser degradada enzimáticamente en fragmentos bioactivos, que pueden alcanzar el SNC y actuar en receptores peptidérgicos (Silberring et al., 1989); c) que la GH inmunorreactiva presente en el cerebro podría tener un origen

hipofisiario, utilizando un transporte retrógrado a través de los vasos sanguíneos portahipofisarios (Bergland et al., 1979), en donde las concentraciones de GH son menores a las encontradas en el plasma periférico; d) Se ha sugerido que la GH alcanza sus sitios respectivos de unión en el cerebro mediante la internalización de su receptor en los endotelios vasculares (Nyberg et al., 2000); e) Otra posibilidad es que la GH puede ser producida localmente en el cerebro y que actúe por mecanismos parácrinos y/o autócrinos (Hojvat et al., 1982). Aunque aun no están claros los principios de transporte y señalización celular del sistema autócrino de la GH y de sus receptor (van den Eijnden & Strous, 2007).

En humanos se ha determinado la presencia de receptores a GH en el cerebro, como en el plexo coroideo, hipocampo, putamen, tálamo e hipotálamo (Nyberg, 2000), además de la propia hipófisis. También en el cerebro humano se ha detectado el ARNm del GHR en la corteza parietal y temporal aunque no se ha encontrado la presencia del ARNm de la GH (Castro et al., 2000).

En el cerebro de rata se ha establecido la presencia de proteínas parecidas a GH específicamente en el mesencéfalo, corteza, hipocampo, estriado, bulbos olfatorios, y cerebelo tanto de ratas machos como de hembras (Mustafa et al., 1994). En ratas con edades de 10 a 12 días, la localización del ARNm y la GH-IR es más pronunciada en neuronas corticales, hipotalámicas y del hipocampo. También se ha encontrado en células de Purkinje del cerebelo, astrocitos y oligodendrocitos en el cíngulo, plexo coroideo, células de la glía y en la pia madre (Lobie et al., 1993). En cuanto al GHR, en cerebro de rata se presenta en el núcleo periventricular, neuronas de la corteza, células de la glía, plexo coroideo, y células hipocámpales del giro dentado (Fujikawa et al., 2000). Recientes estudios han demostrado que el ARNm de la GHR se expresa en neuronas del tallo cerebral (puente de Varolio, bulbos raquídeos) y de la médula espinal (Kastrup et al., 2005), esta distribución espacial no cambia con la edad.

En el caso del pollo la presencia del GHR en el cerebro es más alta en etapas fetales y juveniles, declinando con la edad (Harvey et al., 2002). A partir de los 3 días de desarrollo embrionario la GH-IR se encuentra ampliamente distribuida en el telencéfalo, diencefalo, mesencefalo, metencefalo y mielencefalo. Además, se ha determinado que en el día 14 al 21 de embriogénesis la GH-IR está presente en diferentes tipos celulares como neuronas, glía y oligodendrocitos, particularmente cerebelo y corteza cerebral (Harvey et al., 2001a; 2003a) así como en el sistema nervioso periférico (en el nervio trigémino, en el nervio vago, el nervio extensor del primordio de extremidad, en el nervio etmoidal) y en la retina neural (Murphy & Harvey et al., 2001; Harvey et al., 2003b). En cerebro de palomas y pavos, GH-IR fue detectada en pericarias y fibras del hipocampo, en los núcleos hipotalámicos infundibular, inferior, paraventricular y periventricular, en el área septal lateral y medial, y en la eminencia media (Ramesh et al., 2000). En el cerebro de pollo adulto se ha determinado la presencia de GH-IR en hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo, y se ha visto que la concentración cambia con respecto a la edad, así como el tipo de variante molecular de la hormona (Alba C., 2006).

Acción de la GH en el Sistema Nervioso Central

En los últimos años se ha planteado que la GH puede ejercer una función importante sobre el sistema nervioso central (SNC). Esto incluye efectos sobre el apetito, funciones cognitivas, memoria, estados de ánimo, neuroprotección, sueño, crecimiento, diferenciación neuronal y de glías, neurogénesis y plasticidad (Scheepens et al., 2005). La GH también puede alterar los niveles de varios neuropéptidos y aminoácidos del líquido cefalorraquídeo (Nyberg, 2000). Hay evidencia de que la GH promueve la proliferación y diferenciación de neuronas cerebro-corticales en embriones de rata y que esta función está regulada por la activación de la vía MAP cinasas y de las ERK's (Ajo et al., 2001). Se ha planteado que la GH puede actuar de manera local autócrina/paracrina en diferentes tejidos extrahipofisarios, y posiblemente este efecto local pueda ser relevante en el crecimiento de embriones en etapas tempranas de desarrollo, ya

que existen estudios donde se ha encontrado que la GH y su receptor son expresados en la mayoría de los tejidos del embrión antes de la diferenciación de los somatotropos de la hipófisis (Hull et al., 2005; Harvey et al., 1998). Por ejemplo, en el suero de embriones de pollo los niveles de la GH no son detectados hasta después del día 17 de incubación y la diferenciación de las células somatotrópicas no inicia hasta el día 16 (Porter et al., 2005), sin embargo, se ha detectado GH neural desde el 3er día de incubación (Harvey et al., 2001a).

En estudios recientes se ha señalado que la GH está involucrada en la neuroprotección durante los daños cerebrales inducidos por la hipoxia isquémica (Scheepens et al., 2001). Aunque el mecanismo de neuroprotección de la GH no ha sido completamente explicado, se apoya la hipótesis de que sea a causa de la inhibición de la activación de caspasas, impidiendo que las células entren en un estado de apoptosis (Mitsunaka et al., 2001; Tamatani et al., 1998). La administración de GH exógena vía subcutánea después de una inducción de hipoxia-isquémica en el cerebro de ratas adultas, disminuye el número de células apoptóticas y se observa un aumento de los niveles de Bcl-2, una proteína involucrada en la prevención de apoptosis y una disminución de los niveles de proteínas promotoras de la apoptosis, Bad y Bax (Shin et al., 2004).

Estudios realizados sobre el efecto de la GH en el SNC demostraron un aumento en la fosforilación de Akt (un miembro de la familia serina treonina quinasa, importante para la sobrevivencia de varias líneas celulares) en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de rata sugiriendo que la activación de los mecanismos intracelulares que involucran a Akt pudieran ser activados por GH además de que también se observó un aumento en la expresión de IGF-1 y de los niveles de Bcl-2. En cambio, la GH aumenta la fosforilación de Bad con su consecuente inactivación tanto en el hipocampo como en el cerebelo (Frago et al., 2002).

La hipoxia en el Sistema Nervioso Central

Durante el desarrollo embrionario el proceso de crecimiento rápido implica una alta tasa metabólica y de extracción de oxígeno, por lo que el cerebro es menos resistente a condiciones dañinas como lo es la hipoxia o la anoxia. El mecanismo exacto por el cual la hipoxia cerebral induce daño en el desarrollo embrionario no ha sido del todo claro, aunque las evidencias indican que la hipoxia induce la muerte neuronal por medio de las vías de la apoptosis y de la necrosis. La plasticidad del cerebro en desarrollo se basa en gran medida en procesos apoptóticos controlados, lo que predispone al predominio de factores pro-apoptóticos tras situaciones de daño cerebral. La Fig. 7 resume los sucesos que determinan la muerte celular ante un daño como la hipoxia isquémica. El acontecimiento determinante de lesión cerebral es la depleción energética, la cual ocurre en dos fases: una inmediata, seguida de un periodo de aparente recuperación; y otra tardía. La depleción energética induce a la disfunción de las bombas iónicas para el Na^+ , K^+ , H^+ y Ca^{++} , dependientes de ATP, comprometiendo la polaridad de la membrana y permitiendo la acumulación intracelular de cationes (especialmente Na^+ y Ca^{++}) que causan edema citotóxico y una activación de sistemas enzimáticos como sintetasa de óxido nítrico (NO) y ciclo del ácido tricarbóxico. Asimismo, se produce una acumulación de purinas derivadas del metabolismo anaeróbico del ATP que serán el sustrato responsable de la generación de radicales libres durante la fase de reoxigenación. Los cambios metabólicos que acontecen durante la hipoxia-isquemia son complejos. Los periodos de hipoxia provocan cambios celulares específicos que afectan a la actividad enzimática, la función mitocondrial, la estructura citoesquelética, el transporte transmembrana y las defensas antioxidantes. Todo este conjunto de cambios va a predisponer a los tejidos a una amplificación del daño durante la fase de reoxigenación. Sin embargo, también durante la hipoxia hay un incremento de la producción de radicales libres de oxígeno, atribuido a cambios en el funcionamiento de los componentes que integran la cadena respiratoria, especialmente el complejo citocromo oxidasa. A ello se une la inhibición de la actividad de la superoxidodismutasa que impide la neutralización del anión

superóxido, el radical libre más común. Todos estos procesos conducen a una alteración de la polaridad de la membrana neuronal provocando la liberación y acumulación de aminoácidos excitotóxicos como glutamato. El glutamato estimula la síntesis de TNF α e induce la expresión de la sintetasa inducible de NO (iNOS). La acumulación intracelular de calcio determina la activación de varias enzimas (fosfolipasas, endonucleasas, proteasas y caspasas) que inducen daño estructural, agravan el déficit energético, aumentan el estrés oxidativo y participan en mecanismos de apoptosis. Otro evento importante es la producción masiva de NO por la inducción de la actividad de la NOS neuronal (nNOS) y especialmente la iNOS. Diversos factores, como citoquinas, glutamato o el exceso de calcio, inducen la producción excesiva de NO; en estas circunstancias, si existen concentraciones elevadas de anión superóxido, como ocurre en la reperfusión, su asociación con el NO genera un potente radical libre, el peroxinitrito. Además, el NO en cantidades masivas agrava el fallo energético, bloqueando la cadena mitocondrial de manera irreversible, por consumir el glutatión, y lesionar el DNA. Los astrositos acumulan glucógeno, garantizando la disponibilidad de una fuente de energía para las neuronas; sintetizan y liberan factores neurotróficos; y, finalmente, ayudan a reducir la acumulación perineuronal de NO y otros oxidantes, y de citoquinas, y son los principales responsables de evitar la acumulación de glutamato. Tras un episodio hipóxico-isquémico, los astrocitos sufren muerte inmediata o inician procesos de apoptosis (Martínez et al., 2006).

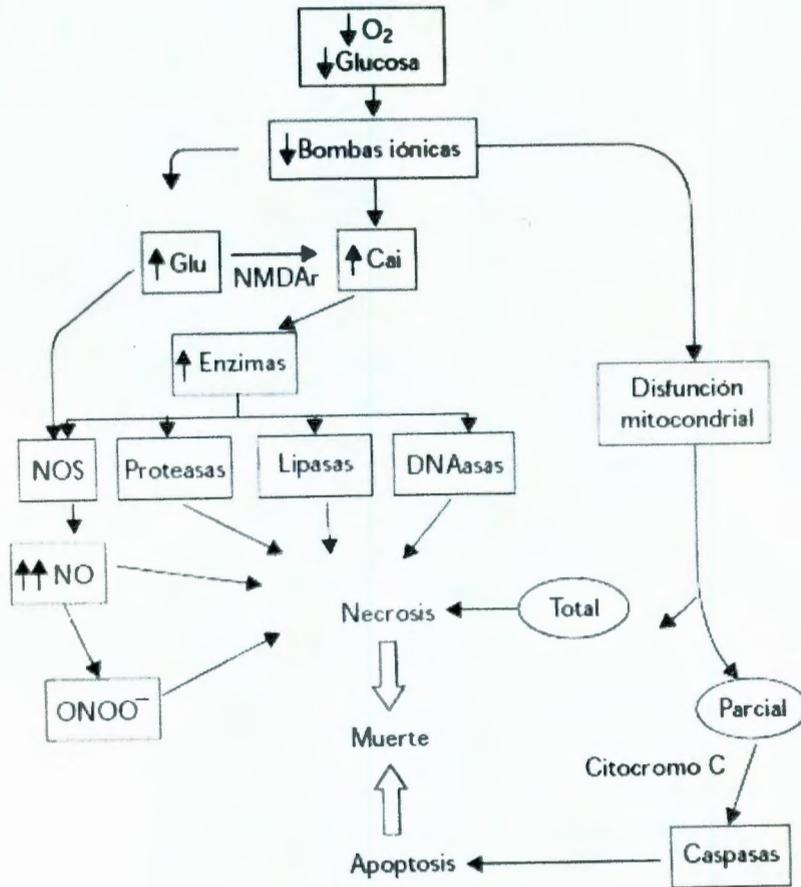


Fig. 7. Cadena de sucesos que determinan la muerte celular ante un daño por hipoxia. Glu = Glutamato, Nadar = receptor para N-metil D-aspartato, NO = óxido nítrico, NOS = NO sintetasa, ONOO = peroxinitrito (Martínez et al., 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos sobre efectos producidos por hipoxia en el cerebro se han realizado con ratas neonatales y adultas, sin embargo, no se han hecho estudios sobre el efecto que produce la hipoxia y la relación con los niveles de la hormona de crecimiento utilizando como modelo experimental los embriones de pollo. Las ventajas de usar este modelo de experimentación se debe a que el pollo es una especie precocial que puede manejarse independientemente durante la etapa embrionaria y se puede controlar el intercambio gaseoso sin la influencia materna como se realiza en animales placentados.

El efecto de la hipoxia y de la anoxia sobre la respuesta fisiológica en un sistema vivo no se ha comprendido del todo, ya que en algunos estudios la hipoxia puede inducir una disminución de los niveles de los factores neuroendócrinos, así como suprimir el crecimiento corporal mientras que en otros trabajos no se reportan cambios. La importancia de estudiar los niveles de GH extrahipofisiaria después de una exposición a un daño como lo es la hipoxia y la anoxia nos permitirá en parte caracterizar una nueva actividad de la GH, como lo es la neuroprotección.

IV. HIPÓTESIS

La anoxia o hipoxia induce cambios en los niveles de la hormona de crecimiento en el cerebro de embriones de pollo.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

- Analizar el efecto que produce la anoxia o hipoxia sobre la concentración de la hormona de crecimiento (GH) en el cerebro de embriones de pollos.

V.2. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la anoxia o hipoxia en la tasa de eclosión de los embriones de pollo
2. Cuantificar la concentración de la GH en los cerebros de pollo después de un daño producido por la anoxia o hipoxia.

3. Determinar si la hipoxia y/o la anoxia inducen muerte por apoptosis en tejido cerebral.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Modelo experimental

Huevos fértiles de pollo se incubaron a 37°C y 60% de humedad por 21 días (que corresponde al total de días en que dura su fase de desarrollo embrionario). A los 15 y 18 días de incubación (15DE y 18 DE respectivamente), los embriones se sometieron a:

- a) Anoxia mediante la envoltura de los huevos fértiles completo con una película de polivinil, con el objetivo de evitar el intercambio gaseoso e inducir la falta de oxígeno.
- b) Hipoxia mediante la envoltura de la mitad del huevo con una película de polivinil con el objetivo de evitar el intercambio gaseoso e induciendo la falta de intercambio de oxígeno.
- c) Grupo control con un intercambio de oxígeno normal.

Se establecieron ocho grupos experimentales y un grupo control. Los ocho grupos experimentales corresponden a:

1. Embriones de 15 DE a los que se les indujo anoxia por 1 h y se sacrificaron 24 horas después del daño.
2. Embriones de 15 DE a los que se les indujo anoxia por 1h y se incubaron hasta la eclosión.
3. Embriones de 15 DE a los que se les indujo hipoxia por 24 h y se sacrificaron 24 horas después del daño.
4. Embriones de 15 DE a los que se les indujo hipoxia por 24 h y se incubaron hasta la eclosión.
5. Embriones de 18 DE a los que se les indujo anoxia por 1 h y se sacrificaron 24 horas después del daño
6. Embriones de 18 DE a los que se les indujo anoxia por 1h y se incubaron hasta la eclosión.

7. Embriones de 18 DE a los que se les indujo hipoxia por 24 h y se sacrificaron 24 horas después del daño.
8. Embriones de 18 DE a los que se les indujo hipoxia por 24 h y se incubaron hasta la eclosión.
9. Embriones con un desarrollo normal, grupo control

Después de los tratamientos los pollos se pesaron y posteriormente se sacrificaron mediante dislocación cervical y se obtuvieron los cerebros completos, que fueron congelados de inmediato y mantenidos a -70°C hasta su utilización. Para determinar el efecto de la anoxia e hipoxia en la tasa de eclosión se compararon el número de pollos nacidos y el peso de los cerebros entre los diferentes grupos experimentales. Para la cuantificación de la GH se hizo la extracción y cuantificación del total de proteínas y mediante la técnica del ELISA (Enzyme Liked Immune Sorbent Assay) se cuantificó la hormona.

VI.2. Extracción de proteínas

Los cerebros se homogeneizaron con un homogenizador de aspas (politrón) en amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 9.0 (200 mg de tejido por cada ml de Tris-HCl) adicionado con mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina, pefabloc, pepstatina, fosforamidón) (mini Complete, Roche) y PMSF 0.1 mM. El homogeneizado se agitó durante 2 horas a 4°C para extraer a la GH y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se colectó en alícuotas de 1,000 μl y se cuantificó la concentración total de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

VI.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se preparó la curva patrón por duplicado con una proteína estándar (albúmina sérica bovina); se utilizaron 5 concentraciones de proteína (1- 20 μg) en un volumen de 800 μl de agua desionizada (H_2O DD) y se les adicionaron 200 μl del reactivo de Bradford. La curva estándar se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se leyó a 595 nm y los valores obtenidos se

graficaron para interpolar los valores de las muestras (Anexos). Después de la cuantificación de las proteínas totales se tomaron 100 µg de proteína total de cada muestra para cuantificar la cantidad de GH por ELISA.

VI.4. Cuantificación de la GH

La cuantificación de GH en los cerebros de embriones de pollos se realizó mediante un ELISA homólogo indirecto por competencia (Martínez-Coria et. al 2002). Detalles en Anexos.

1. Se utilizaron microplacas de poliestireno (Inmulon 2 HB de Dynex Technologies), con 96 pozos, que fueron recubiertos con 12 ng de hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH) en 100 µL/pozo de amortiguador de carbonatos, 0.1 M, pH 10.3. La hormona se pegó a las paredes de la placa mediante una incubación de la placa durante 16 horas a 4°C.
2. Al mismo tiempo, se incubaron las muestras y la curva patrón con diluciones seriadas (de 1024 ng hasta 0.25 ng de GH recombinante) con el 1er anticuerpo. Se utilizó un anticuerpo (Ac) específico contra GH de pollo (CAP-1) a una dilución final de 1:100,000 en amortiguador salino de fosfatos con Tween (TPBS: 0.01 M de fosfatos, 0.15 M de NaCl + 0.05% Tween-20) + 1% de leche descremada. La incubación fue de 16 horas a 4°C.
3. Las placas se lavaron con TPBS durante 5 veces (lavador automático de *Bio-Rad*, modelo 1250) y se bloquearon con leche descremada al 3% en PBS (0.01 M de fosfatos, 0.15 M de NaCl) durante 1 hora.
4. Las placas se lavaron con TPBS durante 5 veces y se les adicionaron a los pozos las diluciones para la curva patrón y las muestras.
5. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
6. Después de cinco lavados con TPBS se añadió un segundo anticuerpo, anti IgG de conejo producido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (gota anti-rabbit alfa-IgG-HRP *Bio-Rad*), diluido a 1:3,000, en TPBS + 1% de leche. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.

7. Se enjuagaron las placas con TPBS 5 veces y se les adicionó la solución de ABTS (amortiguador 1:10; sustrato para HRP 2.19 mh/ml) (*Roche*). Se incubó por 20 min a temperatura ambiente.
8. Se midió la absorbencia a 405 nm en un lector de microplacas (*Bio-Rad*) Microplate Reader modelo 3550-UV (Martínez – Coria et. al., 2002).

VI.5. Técnica de TUNEL

Con el fin de determinar las diferencias en la proporción de apoptosis en el cerebro se utilizaron cortes histológicos del cerebro de pollo y se analizaron mediante el ensayo TUNEL. Para esto los grupos experimentales fueron sacrificados 24 horas después de la inducción de la hipoxia y/o anoxia y se les extrajo el cerebro completo, los cuales fueron tratados de la siguiente manera:

Los cerebros se fijaron en sol. de Carnoy (60 % de etanol, 30 % de cloroformo y 10 % de ácido acético) por 24 horas y posteriormente se lavaron con agua corriente para eliminar el fijador. Los cerebros se incluyeron en bloques de parafina. De cada cerebro se obtuvieron cortes longitudinales de 7-8 micrómetros con el microtomo, los cuales se montaron en portaobjetos de cristal (Fisher Superfrost No. Cat. 12-550-15). Los cortes fueron desparafinados con solución de citrisol y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (Absoluto, 95%, 70%, 50%) y agua destilada por periodos de 5 minutos en cada solución, lugol, tiosulfato de sodio al 5% y agua destilada (2 minutos en cada solución). Los tejidos ya rehidratados se lavaron tres veces con PBS1X (solución PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8) e inmediatamente se incubaron con proteinasa K (solución de trabajo 10 µg/ml en 10mM de Tris/HCl pH 7.4) por 15 minutos a temperatura ambiente (37°C) en una cámara húmeda para permeabilizarlos. Se lavaron tres veces con PBS1x. Después se procedió con el ensayo de TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-dependent polymerization of labeled nucleotides to free 3'-OH DNA end in a template-independent manner/ Polimerización de extremos 3'-OH libres marcados por transferasa deoxinucleotidil terminal de manera independiente a un templado], el cual consiste en incorporar las bases análogas dUTPs (deoxynucleotidyl uracil triphosphate/ deoxinucleotidil

uracilo trifosfato) marcadas con fluoresceína a las partes terminales 3'-OH del ÁDN. Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó el estuche para detección de muerte celular POD *in situ* (Roche) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor: a cada corte se le agregaron 50 µl de la mezcla de TUNEL (50µl de la solución con TdT en 450µl de la solución con los dUTPs) y se cubrieron con cuadros de parafilm de 1cm². Los cortes se incubaron por 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Después de la incubación, los cortes se lavaron con PBS1x tres veces y se procedió a teñirlos con DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole). Para esto a los portaobjetos se les agregó 1ml de la solución de DAPI (1mg/ml DAPI en H₂O desionizada) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos. Después de este tiempo los portaobjetos se montaron usando medio para montaje fluorescente DakoCytomation.

Los cortes de los portaobjetos se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y se calculó la proporción del área relativa de la señal de TUNEL a través de la herramienta de conteo y determinación de área del software Image Pro Plus en 6 campos. El programa detecta una intensidad dentro del intervalo de intensidad como positiva y de cada corte se cuantificó el área. Posteriormente las áreas se sumaron y se dividieron entre el área total del campo para obtener una proporción.

VII. RESULTADOS

Determinar el efecto de la anoxia o hipoxia en la tasa de eclosión de los embriones de pollo

La tasa de eclosión del grupo experimental sometido a anoxia comparado con el grupo control mostró que a los 15 DE con 1 hora de anoxia induce una disminución con respecto al control con una significancia de $P < 0.01$ (Fig. 8A), mientras que en grupo sometido a una hipoxia de 24 h la eclosión no difiere significativamente con respecto al grupo control como se muestra en la Fig. 8B.

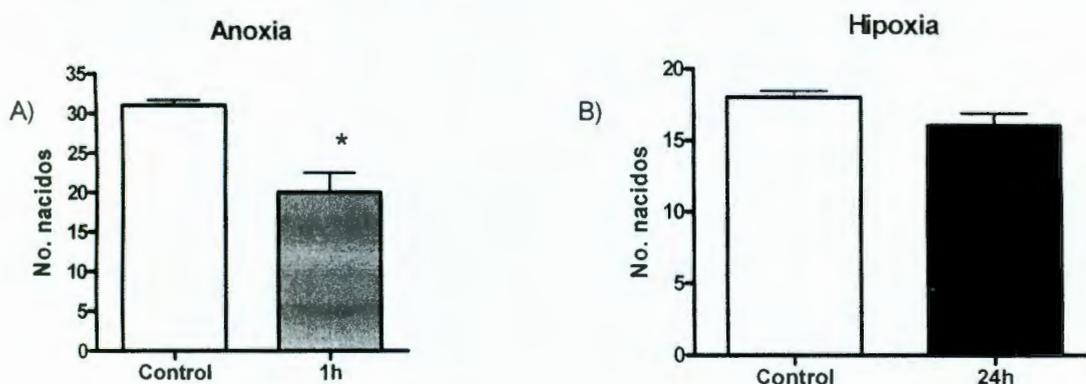


Fig. 8 Tasa de eclosión de los pollos sometidos a anoxia o hipoxia a los 15 días de desarrollo embrionario (DE). El número de embriones que completaron su desarrollo y eclosionaron en el grupo control fue significativamente diferente ($P < 0.05$) con respecto al grupo experimental de 15 DE con 1h de anoxia (A) y no hubo diferencia con respecto al de hipoxia por 24h (B). Cada barra representa la media y el error estándar ($n = 35$ para anoxia, $n = 20$ para hipoxia).

Con respecto al peso corporal y del cerebro los resultados se muestran en el cuadro 1 y 2 en donde se observa que hay una diferencia significativa en el peso total de los animales sometidos a la anoxia y no se observaron diferencias significativas en el peso del cerebro. En el caso de los embriones mantenidos en hipoxia no se observaron diferencias, ni en el peso corporal ni en el peso del cerebro (datos no mostrados).

Cuadro 1. Peso Total de los pollos eclosionados sometidos a anoxia a los 15 días de desarrollo. El asterisco significa una diferencia significativa, $P < 0.05$

Peso Total			
	Media (g)	SD	n
Control	36,2	2,7	26
E15/1h	34,0*	1,5	19

Cuadro 2. Peso de los cerebros de pollos eclosionados sometidos a anoxia en el día 15 de desarrollo embrionario. No hubo diferencias significativas con respecto al grupo control

	Peso completo	cerebro	
	Media (g)	SD	N
Control	0,76	0,0561	12
E15/1h	0,78	0,0415	12

En la Fig. 9A se muestra el número de individuos nacidos 18 DE con 1 h de anoxia, observándose una disminución de la tasa de eclosión con respecto al control con una significancia de $P < 0.001$. En la Fig. 9B se muestra la cantidad de pollos que eclosionaron después de someterlos a hipoxia por 24 horas a los 18 días de desarrollo embrionario con respecto al control, con una diferencia significativa de $P < 0.05$.

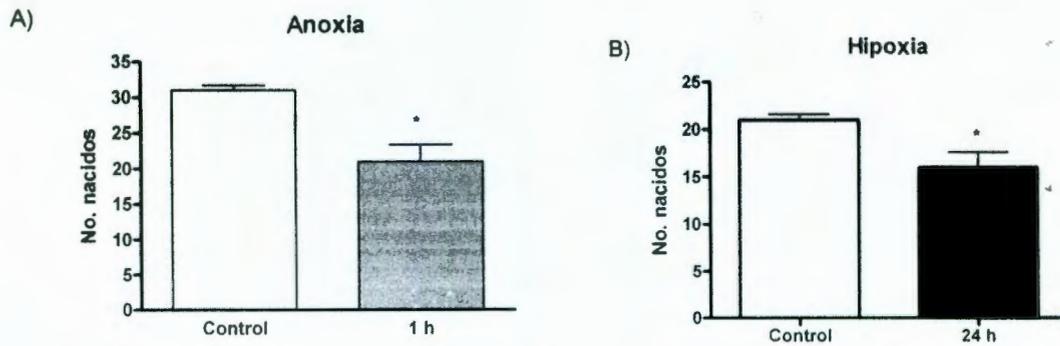


Fig. 9 Tasa de eclosión de los pollos sometidos a anoxia o a hipoxia a los 18 DE. A) En el grupo experimental de Anoxia o B) en el grupo experimental de Hipoxia. Fueron significativamente diferentes comparando con su grupo control con una $P < 0.001$ y $P < 0.05$ respectivamente. Cada barra representa la media y el error estándar, $n = 35$ para los de anoxia y de $n = 24$ para los de hipoxia.

Con respecto al peso corporal y del cerebro los resultados se muestran en el cuadro 3 y 4 en donde se observa que hay una diferencia significativa en el peso total de los animales sometidos a la anoxia a los 18 días de DE y no se observaron diferencias significativas en el peso del cerebro como fue el caso del embrión de 15 días de DE. En el caso de los embriones mantenidos en hipoxia no se observaron diferencias, ni en el peso corporal ni en el peso del cerebro (datos no mostrados).

Cuadro 3. Peso Total de pollos eclosionados sometidos a anoxia a los 18 días de desarrollo. Hay diferencia significativa, $P < 0.05$.

Peso Total			
	Media (g)	SD	N
Control	36,2	2,7	26
E18/1h	34.0*	2,4	25

Cuadro 4. Peso de los cerebros de pollos eclosionados sometidos a anoxia en el día 18 de desarrollo embrionario. No hubo diferencias significativas con respecto al grupo control.

Peso cerebro completo			
	Media (g)	SD	N
Control	0,76	0,0561	12
E18/1h	0,759	0,0537	10

Cuantificación de la concentración de la GH en los cerebros de pollo después de un daño producido por anoxia o hipoxia.

Los resultados correspondientes al efecto de anoxia sobre la concentración de GH en el cerebro de embriones de 15 días de incubación se muestran en la Fig. 10.

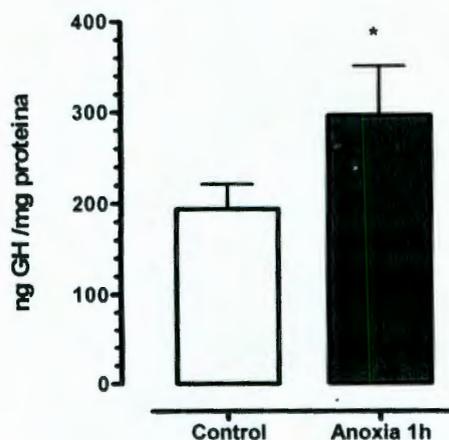


Fig. 10 Concentración de GH en cerebro de embriones de 15 DE sometidos a 1 h de anoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro. Cada barra representa la media y el error estándar ($n = 5$). * $P < 0.05$ comparando con el grupo control.

Se observó un incremento significativo en la concentración de GH en el cerebro completo de los animales con privación de oxígeno durante una hora y sacrificados a las 24 horas después de haberlos colocado en normoxia. En el caso de los animales sometidos a hipoxia por 24 horas mediante la reducción del intercambio gaseoso a la mitad con una película de polivinilo, mostraron no tener diferencias significativas aunque hay una tendencia a subir como se observa en la Fig. 11.

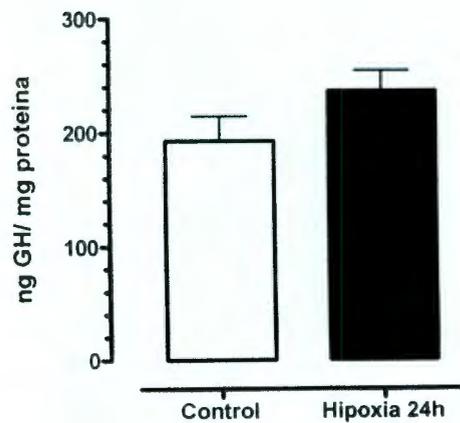


Fig.11 Concentración de GH en cerebro de embriones de 15 DE sometidos a 24 h de hipoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro. Cada barra representa la media y el error estándar (n= 6).

En la Fig. 12 se muestran los datos correspondientes a la concentración de GH evaluada en los cerebros de embriones expuestos a anoxia e hipoxia y regresados a normoxia hasta su eclosión. Estos fueron sacrificados 1 día después de eclosionar. Los datos muestran que en ambos caso (anoxia e hipoxia) hay un incremento significativo de la concentración de GH en el cerebro.

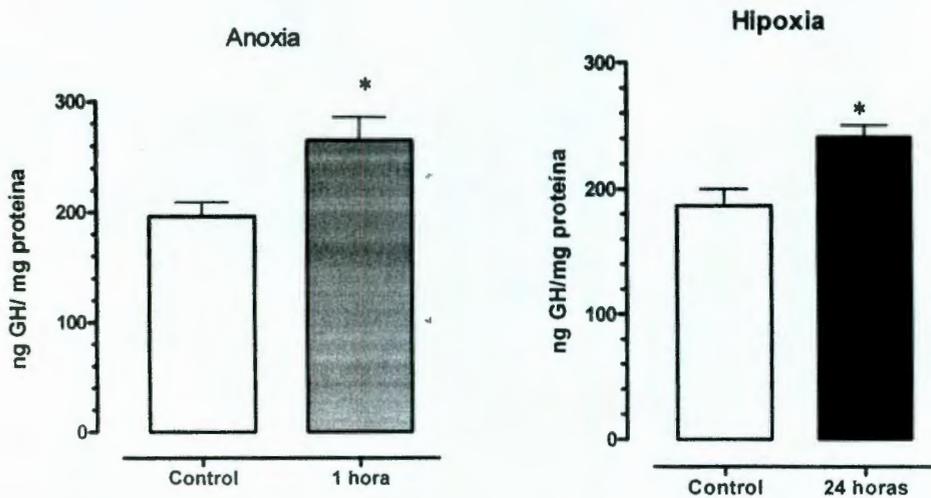


Fig. 12. Concentración de GH evaluada en cerebros de embriones expuestos a anoxia e hipoxia a los 15 DE regresados a normoxia hasta su eclosión y sacrificados 1 día después. Cada barra representa la media y el error estándar. Grupo control, (n = 14); grupo anoxia 1h, (n = 16); grupo hipoxia 24h, (n = 6). * P < 0.05

En el grupo experimental de embriones de 18 DE sometido a anoxia 1 hora y sacrificados a las 24 horas del daño los resultados se muestran en la Fig. 13, en donde se puede observar que la concentración de la GH no se modifica significativamente.

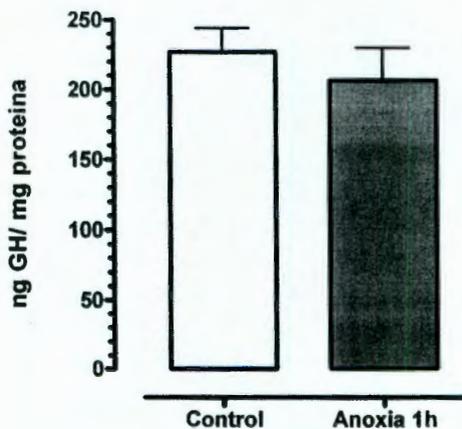


Fig. 13. Concentración de GH en cerebro de embriones de 18 DE sometidos a 1 h de anoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro. Cada barra representa la media y el error estándar, (n= 9).

En el caso del grupo experimental sometido a hipoxia por 24h y sacrificado 24 horas después, la concentración de la hormona se incremento significativa en respuesta al daño como se observa en la Fig. 14.

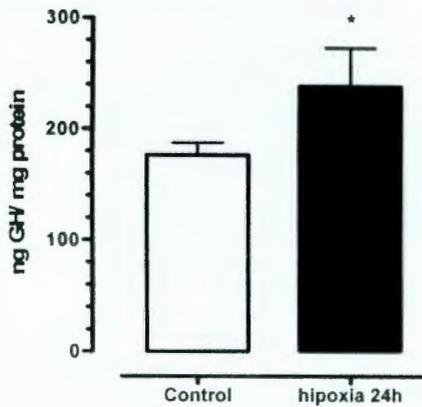


Fig. 14. Concentración de GH en cerebro de embriones de 18 DE sometidos a 24 h de hipoxia y sacrificados 24 h después para obtener el cerebro. Cada barra representa la media y el error estándar, (n= 7). * P < 0.05

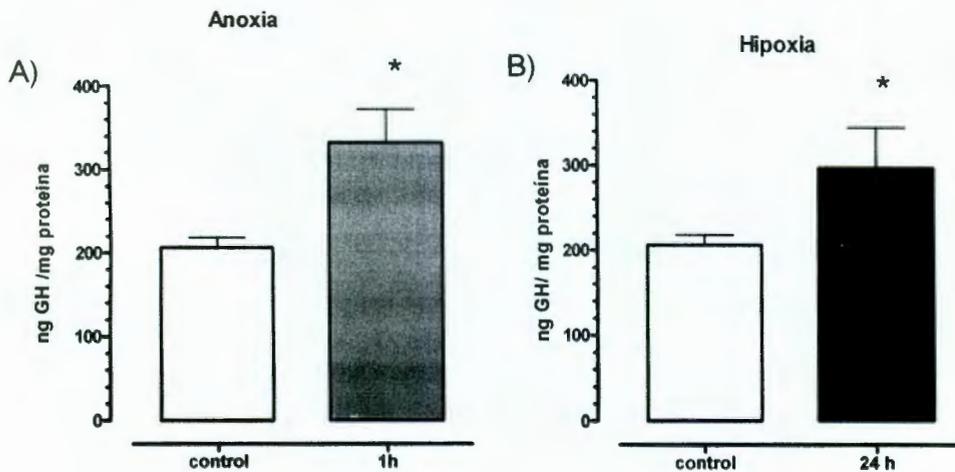


Fig. 15. Concentración de GH evaluada en cerebros de embriones expuestos a anoxia e hipoxia a los 18 DE regresados a normoxia hasta su eclosión y sacrificados 1 día después. A) Control (n= 12) y grupo sometido a anoxia por 1 h (n= 16). B) Control y grupo sometidos a hipoxia por 24 h (n= 5). Cada barra representa la media y el error estándar. Diferencias significativas * P< 0.05 comparados con el grupo Control.

Los resultados correspondientes a la concentración de GH cuantificado después de un día posteclosión de los grupos experimentales, mostraron que en ambas condiciones tanto en anoxia (Fig.15A) como en hipoxia por 24 horas (Fig. 15B) la

concentración de la hormona se incrementa y se mantiene significativamente elevada hasta un día post-eclosión.

Determinar si la hipoxia induce muerte por apoptosis en tejido cerebral.

Se realizó la técnica de TUNEL para evaluar la presencia de células en apoptosis en cortes de cerebros de animales sometidos tanto a anoxia como hipoxia a los 15DE y los resultados se muestran en la Fig. 16.

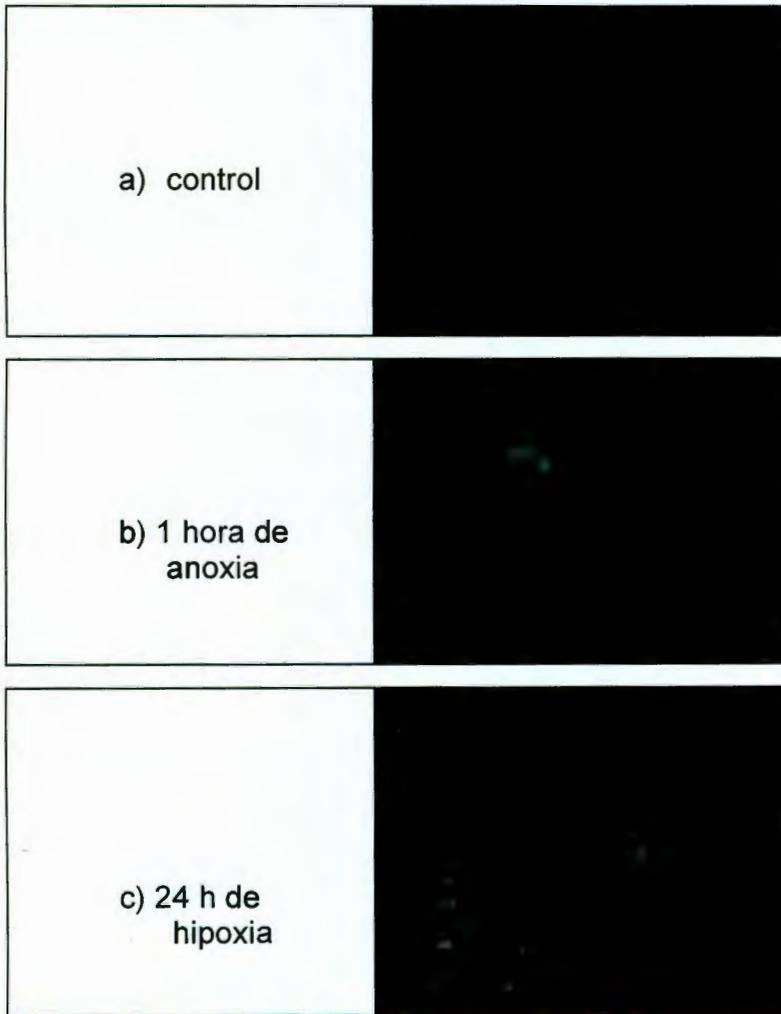


Fig.16. Micrografías de cortes histológicos de cerebro de embriones de pollo de 15 DE, sometidos a anoxia o hipoxia. Se evaluó la presencia de células en apoptosis mediante el ensayo de TUNEL. a) cortes de cerebro de 15DE; b) Cortes de cerebro de 15ED sometido a 1 h de anoxia y c) cortes de cerebros de15 DE sometido a 24 h de hipoxia a una magnificación (20x)

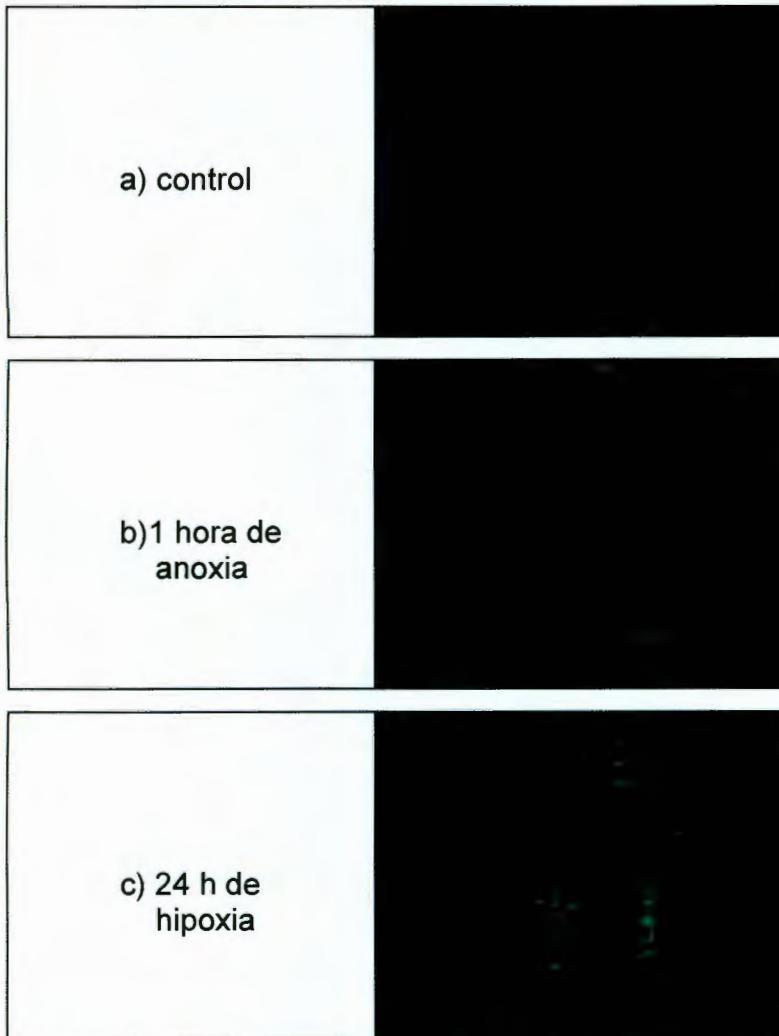


Fig. 17. Micrografías de cortes histológicos de cerebro de embriones de pollo de 18 DE, sometidos a anoxia o hipoxia. Se evaluó la presencia de células en apoptosis mediante el ensayo de TUNEL. a) corte de cerebro de 18DE; b) Cortes de cerebro de 18ED sometido a 1 h de anoxia y c) cortes de cerebros de 15 DE sometido a 24 h de hipoxia a una magnificación (20x)

Se realizó la técnica de TUNEL para evaluar la presencia de células en apoptosis en cortes de cerebros de animales sometidos tanto a anoxia como hipoxia a los 18DE y los resultados se muestran en la Fig. 17 en donde se observó que la mayor proporción de células con apoptosis en la región de la corteza cerebral fue en los animales sometidos a hipoxia por 24 horas.

Mediante el programa Image Pro Plus se evaluó la proporción relativa de apoptosis y se observó que la proporción fue mayor en los animales con hipoxia por 24 horas con respecto a anoxia 1 hora y normoxia Fig. 18.

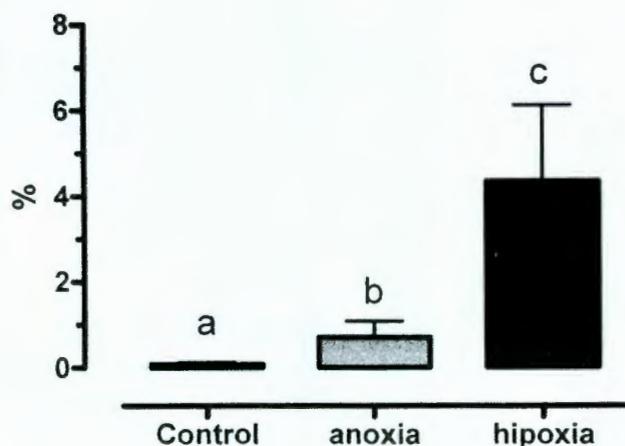


Fig. 18. Área relativa de la señal de TUNEL en cortes histológicos de cerebro de pollo de edad embrionaria de 15 días inducidos a 1 h de anoxia y 24 h de hipoxia. Cada barra representa la media y el error estándar, (n=5). $P < 0.05$.

Para la Fig.17 la cuantificación de la proporción del área relativa de la señal de TUNEL como marca fluorescente en embriones de 15 días mostraron una porción de 0.078% para el grupo Control, 0.70% para el grupo sometido a 1 horas de anoxia y 4.32% para el grupo sometido a 24 horas de hipoxia. Los datos mostraron diferencias significativas, lo que nos indica que tanto el daño agudo por anoxia como el de hipoxia hay un aumento de señal de células apoptóticas, siendo el grupo de hipoxia 24 horas el que tiene la tasa más alta.

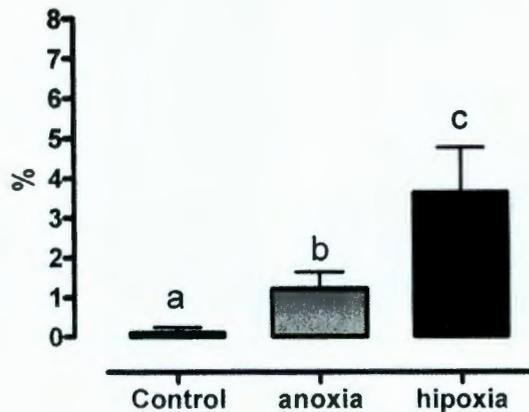


Fig. 19. Área relativa de la señal de TUNEL en cortes histológicos de cerebro de pollo de edad embrionaria de 18 días inducidos a 1 h de anoxia y 24 h de hipoxia, n=5. $P < 0.05$.

Para la Fig.19, los resultados de la cuantificación de la proporción del área relativa de la señal de TUNEL en embriones de 18 días mostraron una porción 0.09% para el grupo control, 1.2 % para el grupo sometido a 1 hora de anoxia y 3.60 % para el grupo sometido a 24 horas de hipoxia. Existen diferencias significativas entre el control y los diferentes grupos experimentales, lo que nos indica que durante un daño ya sea por anoxia o hipoxia hay un aumento de señal de células apoptóticas, siendo en el daño de 24 horas de hipoxia la tasa más alta.

Al cuantificar la señal de apoptosis en los tejidos de los grupos que eclosionaron, tanto en los tratamientos de hipoxia y anoxia a los 15 DE Y 18 DE no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control (datos no mostrados).

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó el efecto de la anoxia o hipoxia prenatal en la concentración de GH, así su correlación con el porcentaje de eclosión de embriones incubados a los 15 y 18 días. Los datos mostraron que la anoxia por 1 hora en los embriones tanto de 15 como 18 DE fue suficiente para inducir una disminución significativa en el número de pollos que eclosionaron al compararlos con su respectivo grupo control. En cambio, cuando fueron sometidos por 24 horas a hipoxia, sólo los embriones de 18 DE mostraron una disminución significativa con respecto a su grupo control. Previos reportes han señalado que hay una mayor susceptibilidad en los embriones cercanos al término de su desarrollo embrionario debido a que la hipoxia puede inducir anomalías en la estructura y funcionalidad del sistema cardiovascular (Rouwet et al., 2002).

Por otra parte, en este trabajo se reportaron cambios significativos en el peso total de los embriones de pollo que fueron sometidos a anoxia (privación de oxígeno) tanto a los 15 DE como a los 18 DE, este decremento en el peso fue evaluado al día siguiente de la eclosión. Estos resultados se pueden comparar en parte, con estudios en donde la exposición a una hipoxia crónica a lo largo del desarrollo embrionario reportaron un decremento significativo en el peso de los embriones durante una exposición a 14-15% O₂ Burton y Palmer (1992) y Rouwet et al. (2002). Existen otros estudios en los cuales utilizando otras condiciones de hipoxia como los mostrados por Chan y Burggren (2005) donde indujeron la hipoxia con 15% O₂ del día 12 al 18 de incubación el peso de los embriones no mostraron diferencias significativas.

Se determinó el efecto de la anoxia o hipoxia en el peso del cerebro y se observó que no hubo cambios en el peso del cerebro de ninguna de las edades analizadas, así como de los tratamientos a los que fueron sometidos. Estos resultados son similares a los estudios de Asson-Batres (1989) y Chan & Burggren (2005) quienes no encontraron cambios en el peso del cerebro, en tanto que Stock y

Metcalfe (1987) mostraron un retardo en el desarrollo cerebral; sin embargo no son significativos los decrementos en el peso del cerebro de embriones de pollo en respuesta a hipoxia. Las posibles diferencias en los resultados entre varios trabajos puede ser debido a la exposición de hipoxia a diferentes niveles (ejemplo, 10% versus 15%) así como diferentes períodos de exposición (desde horas a días) o bien a la etapa de desarrollo en la que se llevo al cabo el tratamiento.

Al parecer los embriones que logran eclosionar pueden llevar a cabo mecanismos de recuperación del daño producidos por hipoxia, a lo largo de unos cuantos días (3-6 días) hasta su posterior eclosión, ya que no hay diferencias en el peso total o del cerebro en comparación con los embriones control. Estas observaciones podrían explicarse porque se sabe que después de un daño por estrés oxidativo hay una compensación neurotrófica a lo largo del desarrollo embrionario dependiendo de la severidad, ya que en hipoxia moderada se ha reportado neurogénesis (Bossenmeyer-Pourie C. et al, 2002). Aunque en este estudio encontramos que la apoptosis se incrementa cuando se evalúa a las 24 h, este proceso ya no se observa cuando se determina en embriones que se mantienen hasta la eclosión.

El efecto de la hipoxia sobre la respuesta neuroendócrina y sus mecanismos regulatorios ha sido poco comprendido. En estudios previos, la hipoxia isquémica activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) mediante la estimulación de la liberación de CRF, incrementando los niveles de la hormona adrenocorticotrófica y de corticosterona en el suero. La hipoxia también puede inhibir la respuesta inmune así como suprimir la reproducción. La hipoxia induce cambios fisiológicos como es el aumentar los niveles de corticosterona, tiroxina y triyodotironina. Se sabe que la GH juega un papel importante en el crecimiento corporal así como diversas funciones metabólicas. Por ende sería interesante estudiar el eje somatotrófico GHRH-GH-IGF-I después de una exposición a un daño como la hipoxia o anoxia.

El mecanismo exacto por el cual la hipoxia cerebral induce daño en el desarrollo embrionario no ha sido del todo claro, aunque las evidencias indican que la hipoxia induce la muerte neuronal por medio de las vías de la apoptosis y de la necrosis. El mecanismo por el cual la hipoxia o anoxia induce la apoptosis neuronal puede explicarse en parte porque se ha demostrado que ante un período de hipoxia hay un aumento en la producción de radicales libres como lo es el óxido nítrico (Guo et al., 1997) el cual es considerado como uno de los efectores de la apoptosis, por medio de la activación de la proteína p53 (Brüne et al., 1999). Por otro lado, las cinasas serina/treonina, tal como Akt/proteín cinasa B, son reguladores claves de la muerte neuronal y la supervivencia después de una hipoxia cerebral (Noshita et al., 2003). Akt funciona como el principal blanco de la cinasa fosfatidil inositol 3 (PI3-K), y después de su fosforilación, procede a fosforilar algunos substratos en los residuos de serina o treonina, incluyendo Bad, el cual, al ser fosforilado se inactiva inhibiendo la liberación del citocromo c, ya que se evita la formación del poro con Bax en la membrana mitocondrial (Noshita et al., 2003). En un estudio realizado con estimulación de GH en el sistema nervioso central se demostró un aumento en la fosforilación de Akt en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo, sugiriendo que la activación de los mecanismos intracelulares que involucran a Akt pudieran ser activados por GH. También se observó un aumento en la fosforilación de Bad con su consecuente inactivación tanto en el hipotálamo como en el cerebelo, que pudiera ser también otro mecanismo por el cual se previene la muerte celular (Frago et al., 2002).

Antes esas evidencia, la GH, además de participar en el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso central, también puede inhibir la muerte neuronal debida a un daño de hipoxia-isquemia cuando es administrada antes y después del daño, sugiriendo un efecto neuroprotector (Scheepens et al., 2001; Shin et al., 2004). En el laboratorio se han hecho estudios referentes a la presencia de la GH neural (endógena) en la que podría participar en prevenir la muerte neuronal o la apoptosis ante la privación de oxígeno-glucosa.

Los resultados de este trabajo mostraron que en el grupo 15 DE hay un aumento de los niveles de GH cuando los embriones son sometidos a 1 hora de anoxia, los niveles altos se mantuvieron tanto 24 horas después de la aplicación de la anoxia como hasta el primer día post-eclosión (Fig. 11). En el grupo de 15 DE que fue sometido a una hipoxia de 24 horas y se regresó a normoxia por otras 24 horas antes del sacrificio, no registró una diferencia significativa respecto a los niveles de GH comparándolos con el control, a pesar de que se ve una tendencia a aumentar. Sin embargo, el grupo de 15 DE con el mismo tratamiento de 24 horas de hipoxia que fue sacrificado hasta 1 día después de la eclosión sí mostró un incremento significativo en los niveles de GH con respecto al control.

A pesar de que se sabe que la diferenciación de los somatotropos, y por consiguiente, la producción y liberación de la GH hipofisaria ocurre hasta el día 16 de desarrollo (Porter et al., 1995), los niveles de GH detectados en los cerebros de 15 DE podrían ser explicados por una expresión y producción local de esta hormona en tejidos extrahipofisarios, como es el caso del tejido nervioso. Además el aumento en estos niveles de GH puede ser en respuesta a la anoxia.

En el caso de los embriones de 18 días, los niveles de GH medidos 24 horas después de la anoxia y restablecidos en normoxia por 24 horas no se modifican en comparación con el control, en tanto que con el tratamiento con hipoxia sí se muestra un aumento significativo de los niveles de GH. En los grupos que eclosionaron con los mismos tratamientos de anoxia e hipoxia también se observó un incremento significativo. Estos incrementos de la GH podrían estar relacionados con el efecto neuroprotector que se ha planteado que tiene esta hormona en otros modelos de daño neuronal (Scheepens, et al., 2001) o bien con una participación en la aceleración de la división de las células glía y la mielinogénesis, así como la neurogénesis (Bossenmeyer-Pourie C. et al, 2002). Sin embargo en este modelo aún no se ha caracterizado el tipo celular que estaría produciendo a la GH localmente.

En este trabajo datos preliminares sobre la evaluación de la proporción de apoptosis por el método de TUNEL nos permitieron obtener resultados que señalan diferencias entre los grupos sometidos a anoxia o bien a hipoxia. Los resultados mostraron que los grupos sometidos a hipoxia (por 24 horas) de embriones de 15DE tuvieron el mayor porcentaje de apoptosis por área relativa (4.32%) a diferencia de los grupos de anoxia en los cuales se observó un porcentaje mucho más bajo de apoptosis (0.7%); en cambio, en los grupos control no se observó mas que un 0.078% de proporción relativa de área. En el caso de los embriones de 18 días también en hipoxia hay mayor proporción de apoptosis (3.60%) que en el grupo anoxia (1.2%) y control (0.09%). A pesar de que los resultados muestran que una hipoxia de 24 horas produce el suficiente daño en el cerebro como para inducir en las neuronas una mayor proporción de apoptosis, el daño inducido por anoxia no se ve reflejado en éstos resultados; esto podría explicarse dado que las células pueden sufrir necrosis independiente al proceso de apoptosis. La necrosis puede predominar ante un daño severo o agudo, mientras que la apoptosis sucede en un daño lento como lo es la hipoxia crónica. Además resultados mostrados en este trabajo señalan que la anoxia por una hora induce una menor proporción de animales eclosionados con respecto a los expuestos al daño por hipoxia, así mismo como respecto al peso del individuo se mostró una disminución significativa en el caso de la anoxia para las dos edades analizadas. Todos estos datos podrían reflejar un proceso de daño mediado ya sea por apoptosis o por necrosis dependiendo de la severidad del factor de estresante que se ve claramente su efecto no solo en el crecimiento corporal sino también en la sobrevivencia del individuo. Falta hacer estudios sobre la cantidad de necrosis que podría presentarse ante un daño por anoxia y por hipoxia.

Al cuantificar la señal de apoptosis en los tejidos de los grupos que eclosionaron, tanto en los tratamientos de hipoxia y anoxia a los 15 DE Y 18 DE no hubo diferencias significativas con respecto al grupo control (datos no mostrados). Esto nos podría indicar que la GH no tiene un efecto inmediato, porque en el grupo que fue expuesto a anoxia a los 18 DE, no hubo un incremento de la hormona cuando

se midió (24 horas después del tratamiento). Sin embargo, los niveles de la GH se mostraron elevados cuando se midieron hasta un día después de la eclosión.

Estos datos aún preliminares nos permiten proponer que los niveles de la hormona de crecimiento podrían estar relacionados con los mecanismos de neuroprotección previamente señalados en otros modelos de daño cerebral y que dependerá de la etapa de desarrollo y la temporalidad del daño el tipo de efectos que pueden producirse.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN & Bentle LA. **1987**. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Pro. Natl. Acad. Sci. Usa.* 84:6434-6437.
- Alba Bentacour C. **2006**. Caracterización y localización de la hormona de crecimiento en el cerebro de pollo. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro.
- Ajo R, Cacicedo L, González B & Sánchez-Franco F. **2001**. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of embryonic brain cells via MAP/ERK signaling pathways. *Programan and Abstracts 83rd Annual Meeting at the Endocrine Society*. Denver, Colorado, pp 1-128.
- Allen JT, Bloor CA, Kedia RK, Knight RA & Spiteri MA. **2000**. Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung. *Neuropeptides*. 34 (2); 98-107.
- Arámburo C, Carranza M, Sánchez R & Perera G. **1989a**. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *General and Comparative Endocrinology*, 76: 330-339.
- Arámburo C, Campbell RM & Scanes CG. **1989b**. Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life Sciences*, 45: 2201-2207.
- Arámburo C, Donoghue D, Montiel JL, Berghman LR & Scanes CG. **1990a**. Phosphorylation of chicken growth hormone. *Life Sciences*, 47: 945-952.
- Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S & Sánchez R. **1990b**. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. *General and Comparative Endocrinology*, 80: 59-67.

- Arámburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R & Berghman LR. **1991**. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH). Evidence of G-cGH isoforms. *General and Comparative Endocrinology*, 84: 135-146.
- Arámburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR & Scanes CG. **1992**. Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *Journal of Molecular Endocrinology*, 8: 183-191.
- Arámburo C, Montiel JL, Sánchez R, Perera G, Navarrete S, Carranza M, García-Moreno J & Fenton B. **1993**. La hormona de crecimiento del pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. Memorias del Congreso conmemorativo de jubileo del Instituto de Investigación Biomédicas de la UNAM, t I. México, UNAM, pp.483 – 499.
- Arámburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martínez-Coria H & Scanes CS. **2000**. Growth hormone size variants: Changes in the pituitary during development of chicken. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 223: 67-74.
- Arámburo C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L & Scanes CS. **2001**. Characterization of bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15: 231-440.
- Asson-Batres MA, Stock MK, Hare JF & Metcalfe J. **1989**. O₂ effect on composition of chick embryonic heart and brain. *Respir. Physiol.* 77 (1): 101-109.
- Baudet ML, Sanders EJ & Harvey S. **2003**. Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology*. 144 (12); 5459-5468.
- Bergland RM & Page RB. **1979**. Pituitary-brain vascular relations: a new paradigm. *Science*. 204:18-24.
- Bertherat J, Blue-Pajot MT & Epelbaum. **1995**. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur. J. Endocrinol.* 132:12-24.
- Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martínez-Coria H, Cárabez A & Arámburo C. **2004**. Chicken growth hormone: further characterization and

ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology* 139: 113-123.

- Bossenmeyer-Pourie C, Lièvre V, Grojean S, Koziel V, Pillot T & Daval JL. **2002**. Sequential expression patterns of apoptosis and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience*. 114: 869-882.
- Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7: 248-254.
- Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA & Waters MJ. **2008**. Growth hormone receptor; mechanism of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40:1984-1989.
- 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.
- Brüne B, von Knethen A & Sandau K. **1999**. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell death and differentiation*. 6: 969 – 975.
- Burton GJ & Palmer ME. **1992**. Development of the chick chorioallantoic capillary plexus under normoxic and normobaric hypoxic and hyperoxic conditions: a morphometric study. *J. Exp. Zool.* 262: 291-298.
- Carter-Su, Schwartz J & Smith LS. **1996**. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology*. 58; 180-207.
- Carter-Su C, Rui L, & Stofega MR. **2000**. SHS-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone. *Recent. Prog. Horm. Res.* 55:293-311.
- Chan T & Burggren W. **2005**. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 145: 251-263.

- Chantalat L, Jones ND, Korber F, Navaza J & Pavlovsky AG. **1995**. The crystal-structure of wild-type growth-hormone at 2.5 angstrom resolution. *Protein Pept.Lett.* 2: 333-340.
- Castro JR, Costoya JA, Gallego R, Prieto A, Arce VM & Señaris R. **2000**. Expression of growth hormone receptor in the human brain. *Neurosci. Lett.* 281: 147-150.
- Chen WY, Wight DC, Wagner TE & Kopchick JJ. **1990**. Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5061–5065.
- Coculescu M. **1999**. Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 12 (2); 113-124.
- Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR & Wells JA. **1991**. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science.* 254: 821-825.
- de Vos AM, Ultsch M & Kossiakoff AA. **1992**. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science* 255:306–312.
- Devesa J, Lima L & Tresguerres AF. **1992**. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Meta.* 3: 175-183.
- Force WR & Spindler SR. **1994**. 3,5,3'-L-triiodothyronine (thyroid hormone)-induced protein-DNA interactions in the thyroid hormone response elements and cell type-specific elements of the rat growth hormone gene revealed by *in vivo* dimethyl sulfate footprinting. *J. Biol. Chem.* 269: 9682-9686.
- Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J & Chowen JA. **2002**. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology.* 143: 4113–4122.
- Frohman LA, Downs TR & Chomczynski P. **1990**. Growth hormone releasing hormone: structure, gene expression and molecular heterogeneity. *Acta Paediatr. Scand.*, (suppl) 367: 81-86.

- Fujikawa T, Soya H, Fukuoka H, Alam KS, Yoshizato H, McEwen BS, & Nakashima K. **2000**. A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain Res.* 874: 186–193.
- Gent J, van 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.
- Gould J, Arámburo C, Capdevielle M & Scanes CG. **1995**. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sciences* 56: 587-594.
- Guo Y, Ward ME, Beasjours S, Mori M & Hussain SNA. **1997**. Regulation of cerebral nitric oxide production in response to prolonged in vivo hypoxia. *Neurosci. Res.*, 49: 89-97.
- Harvey S. Growth Hormone Synthesis. **1995**. Growth Hormone Metabolism. Growth Hormone Release: Integrative Hypothalamic Control. In: GROWTH HORMONE. (Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH., Eds.), Florida, CRC Press Inc., pp 55-72, 138, 285-297.
- Harvey S, Johnson CDM., Sharma P, Sanders JE. & Hull KL. **1998**. Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development?. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C: 305-315.
- Harvey S, Johnson CDM & Sanders EJ. **2001a**. Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *J. Endocrinol.* 169: 487-498.
- Harvey S, Lavelin L & Pines M. **2001b**. Growth Hormone (GH) action in early embryogenesis: expression of a GH-response gene in sites of GH production and action. *Anat Embryol.* 204: 503-510.
- Harvey S, Lavelin I & Pines M. **2002**. Growth hormone (GH) action in the brain: neural expression of a GH-response gene. *J. Mol Neurosci*, 18: 89–95.

- Harvey S & Hull K. **2003a**. Neural growth hormone: an Update. *J. Mol. Neurosci.* 20:1-13.
- Harvey S, Kakebeeke M, Murphy AE & Sanders EJ. **2003b**. Growth hormone in the nervous system: Autocrine/paracrine roles in retinal function?. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81:371-384.
- Hojvat S, Emanuele N, Baker G, Connick E, Kirsteins L & Lawrence AM. **1982**. Growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH)-like peptides in the rodent brain: non-parallel ontogenetic development with pituitary counterparts. *Brain Res.* 256 (4): 427-434.
- Hull KL, Luna M, Harvey S. & Arámburo C. Growth hormone: a pituitary and extrapituitary chameleon during development. *Functional Avian Endocrinology*, A Dawson & PJ Sharp (Eds). Copyright © **2005** Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Inzucchi SE & Robbins RJ. **1993**. Clinical review 61: Effects of growth hormone on human bone biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:691-694.
- Isaksson OG, Eden S & Jansson JO. **1985**. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 483-499.
- Juárez E, Castro F, Guerra N, Reséndez D, Martínez H, Barrera H & Kuri W. **1999**. Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *J. Cell. Sci.* 112:3127-3135.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S & Kineman RD. **2004**. The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology.* 145: 3731-3738.
- Kastrup Y, Le Greves M, Nyberg F & Blomqvist A. **2005**. Distribution of growth hormone receptor mRNA in the brain stem and spinal cord of the Rat. *Neuroscience.* 130: 419–425.

- Kopchick J & Andry J. **2000**. Growth Hormone (GH), GH receptor and signal transduction. *Mol. Gen. and Met.* 71: 293-314..
- Lobie PE, García-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ. **1993**. Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 2:225-233.
- Luna M, Huerta L, Berumen L, Martínez-Coria H, Harvey S & Aramburo C. **2004**. Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137(1): 37-49.
- Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S & Aramburo C. **2005**. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144(1): 28-37.
- Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, García-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F & Castaño JP. **2003**. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinol.*, 144: 5372-5380.
- Martínez-Coria H, López-Rosales J, Carranza M, Berumen L, Luna M & Aramburo C. **2002**. Differential Secretion of Chicken Growth Hormone Variants After Growth Hormone-Releasing Hormone Stimulation In Vitro. *Endocrine*, 17(2): 91-102.
- Martínez J, Vento M, Jimeno S, Escrig R, Sáenz P, Izquierdo I. **2006**. Prevención del daño cerebral hipóxico-isquémico: viejos problemas, nuevas esperanzas. *Rev Mex Pediatr*, 73(4); 184-191.
- Mayo KE, Godfrey PA, Suhr ST, Kulik D & Rahal JO. **1995**. Growth hormone-releasing: hormone synthesis and signalling. *Rec. Prog. Horm. Res.* 50: 35-73.
- McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ & Tucker HA. **2001**. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20:65-87.

- Miller WL & Eberhardt NL. **1983**. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4:97–130.
- Müller EE. **1987**. Neural control of somatotropic function. *Physiology Rev.* 67:962-1053.
- Mitsunaka H, Dobashi H, Sato M, Tanaka T, Kitanaka A, Yamaoka G, Tokuda M, Matoba K, Hiraishi T & Ishida T. **2001**. Growth hormone prevents Fas-induced apoptosis in lymphocytes through modulation of Bcl-2 and caspase-3. *Neuroimmunomodulation*, 9: 256-62.
- Murphy AE & Harvey S. **2001**. Extrapituitary beta TSH and GH in early chick embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185: 161-171.
- Mustafa A, Adem A, Roos P & Nyberg F. **1994**. Sex differences in binding of human growth hormone to rat brain. *Neurosci. Res.* 19:93-99.
- Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY & Greenwood FC. **1971**. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 866-869.
- Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, Lewen A, Omar G, Chan PH. **2002**. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*, **22**; 7923–7930.
- Nyberg F. **2000**. Growth hormone in the brain: Characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front. Neuroendocrinol.* 21; 330-348.
- Paladini AC, Pena C & Poskus E. **1983**. Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 15:25–56.
- Porter T, Couger G & Hargis B. **1995**. Ontogeny of Growth Hormone (GH)-Secreting Cells during Chicken Embryonic Development: Initial Somatotrophs Are Responsive to GH-Releasing Hormone. *Endocrinol.* 136(5);1850-1856.

- Ramesh R, Kuenzel WJ, Buntin JD, Proudman JA. **2000**. Identification of growth hormone and prolactin containing neurons within the avian brain. *Cell Tissue Res.* 299:371-383.
- Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC & Morel G. **2001**. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem.* 49(3); 347-354.
- Reiprich K, Muhlbauer E, Decuypere E & Grossmann R. **1995**. Characterization of growth hormone gene expression in the pituitary and plasma growth hormone concentrations during posthatch development in the chicken. *J. Endocrinol.* 145: 343-353.
- Render CL, Hull KL. & Harvey S. **1995a**. Neural expression of the pituitary GH gen. *J. Endocrinol.* 147; 413-422.
- Render CL, Hull KL & Havey S. **1995b**. Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine.* 3; 729-735.
- Root AW & Root MJ. **2002**. Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets.* 2,27-52.
- Rouwet EV, Tintu AN, Schellings MW, van Bilsen M, Lutgens E, Hofstra L, Slaaf DW, Ramsay G & Le Noble FA. **2002**. Hypoxia induces aortic hypertrophic growth, left ventricular dysfunction, and, sympathetic hyperinnervation of peripheral arteries in the chick embryo. *Circulation.* 105: 2791-2796.
- Scanes CG, Arámburo C & Campbell RM. **1990**. Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor. In: *Endocrinology of Birds –Molecular to Behavioral-* (M. Wada, S. Ishii and C.G. Scanes, Eds.) Japan Scientific Societies Press- Springer – Verlag, pp. 93-110
- Scanes CG & Campbell RM. **1995**. Growth Hormone Chemistry. In: *GROWTH HORMONE.* (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds.), Florida, CRC Press Inc., pp 18-19.

- Scheepens A., Sirimanne ES, Breier BH, Clark RG, Gluckman PD & Williams CE. **2001**. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*. 104: 677-87.
- Scheepens A, Mödersheim T & Gluckman P. **2005**. The role of growth hormone in neural development. *Horm. Res.* 64 (suppl 3): 66-72.
- Seeburg PH. **1985**. The human growth hormone locus: the genes and their products. In: BIOGENETICS OF NEUROHORMONAL PEPTIDES (R. Hakanson & J. Thorell, Eds.) Academic Press, London, pp 83-92.
- Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae S & Chang YP. **2004**. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia– ischemia in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters*, 354: 64-68.
- Silberring J, Lyrenas S & Nyberg F. **1989**. Application of HPLC combined with diode-array detection for analysis of proteins and peptides un human cerebrospinal fluid. *Biomed. Chromatogr.* 3:203-208.
- Slominski A., Malarkey WB., Wortsman J., Asa SL. & Carlson A. **2000**. Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. *J. Lab. Clin. Med.* 136 (6): 476-481.
- Stock MK & Metcalfe J. **1987**. Modulation of growth and metabolism of the chick embryo by a brief (72h) change in oxygen availability. *J.Exp.Zool.Suppl.* 1:351-356.
- Tamatani M, Ogawa S & Tohyama M. **1998**. Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Mol. Brain Res.* 58:27-39.
- Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E & Kovacs K. **1998**. The anterior pituitary. In: Williams Textbook of Endocrinology. 9th edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR EDS) 9: 249-250.
- Tresguéres JAF. **1999**. Fisiología humana. Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de Madrid, España.

- van den Eijnden MJ. & Strous GJ. **2007**. Autocrine Growth Hormone: Effects on Growth Hormone Receptor Trafficking and Signaling. *Mol. Endocrinol.* 21(11): 2832-2846.
- Yoshizato H, Fujikawa T, Soya H., Tanaka M., & Nakashima K. **1998**. The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinol.* 139: 2545-2551.
- Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C & Waters MJ. **1997**. Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors*, 14:131-143.

X. ANEXO

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El ensayo de cuantificación de proteínas de Bio-Rad, en base al método de Bradford (1976), es un simple y exacto procedimiento para determinar la concentración de proteínas solubilizadas. Involucra la adición de un colorante ácido (el reactivo empleado contiene azul brillante de Coomassie G250, ácido fosfórico y metanol) a una solución de proteína, y después medir a 595 nm con un espectrofotómetro. La comparación con una curva estándar (la proteína es una albúmina sérica bovina, BSA) da una relativa medida de la concentración de proteína. El ensayo de proteína Bio-Rad es un método que se basa en el cambio de color de un colorante, dependiendo de las diferentes concentraciones de proteína. La absorbancia máxima para una solución ácida de azul brillante de Coomassie (G-250) va desde 465 nm hasta 595 nm cuando se une a proteínas.

Procedimiento:

Se preparan 5 diluciones de una proteína estándar, en este caso, la albúmina sérica bovina (BSA), representativa de la solución de proteína que iba a ser examinada. El rango ideal del ensayo para la BSA es de 1.2 a 10 µg/ml en un volumen final de 800 µl con agua destilada. Las soluciones de proteínas se ensayan comúnmente en duplicados o triplicados.

A cada tubo se le agregan 200 µl del reactivo de Bradford y se agita. Los tubos se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mide la absorbancia a 595 nm

Preparación de la solución stock para la curva:

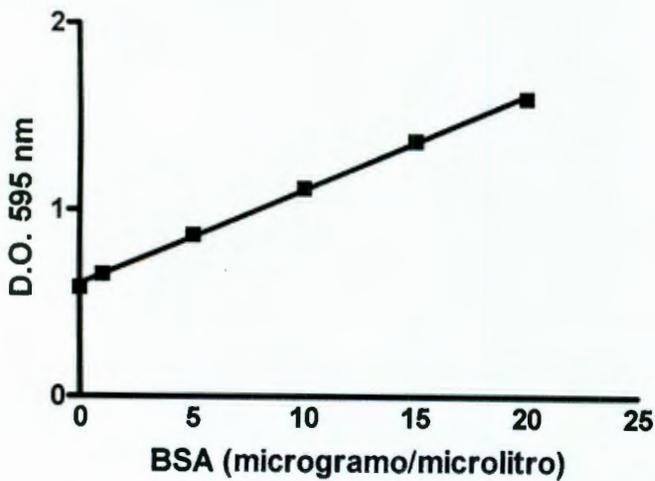
Solución requerida: 0.1 microg/microlitro

Se colocan 93 ml de la solución patrón de BSA (1.29mg/ml) en 1,197 µl de H₂O DD.

Tubo	Concentración de BSA (mg/ml)	Volumen de la solución de BSA (ml)	H2O DD (ml)	Reactivo de Bradford
1	--	--	800	200
2	1	10	790	200
3	5	50	750	200
4	10	100	700	200
5	15	150	650	200
6	20	200	600	200

Incubar a 15 minutos a temperatura ambiente

Calcular la regresión lineal para interpolar los valores de absorbancia de las muestras en la curva.



$$R^2 = 0.997$$

ELISA INDIRECTO PARA LA DETERMINACIÓN DE cGH TOTAL. ENSAYO POR DESPLAZAMIENTO (COMPETENCIA)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Amortiguador de fosfatos de sodio (PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8)

- Solución A: PBS 0.5 M pH 7.8

Fosfato de sodio monobásico (PM 138) 0.5 M 3.45 g en 50 ml

Fosfato de sodio dibásico (PM 142) 0.5 M 14.2 g en 200 ml

Se disuelve el fosfato dibásico en aprox. 100 ml con DDH₂O y se ajusta a pH 7.8 con la solución de fosfato monobásico. Al final se afora a 200 ml.

- Solución B: PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8

Se toman 20 ml de la solución A, se agregan 8.76 g de NaCl y se afora a 1000 ml con DDH₂O.

- Solución TPBS 0.01M, NaCl 0.15M, Tween 20 0.05% pH 7.8

A 1000 ml de PBS se añaden 500 µl de tween 20 y se agita.

- Solución para bloquear y de incubación con anticuerpo TPBS + leche descremada 3%

Se solubilizan 3 g de leche descremada en 100 ml de TPBS

La solución del primer anticuerpo –antisuero policlonal generado en conejo contra cGH- se utiliza 1:5000 (para que la dilución final sea 1:100 000); la solución del segundo anticuerpo –anti IgG de cabra contra conejo acoplado a peroxidasa de rábano GAR-HRP- se utiliza 1:3000.

Amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 10.3

Carbonato de sodio (PM 105.99) 0.1M 1.06g en 100 ml

Bicarbonato de sodio (PM 64.01) 0.035M 0.224 g en 100 ml

El pH resulta cercano a 10.3

Solución stock de rGH (1µg de rGH/1µg de H₂O, pH 9.0)

Para cada placa con una curva patrón por cuadruplicado se requieren alrededor de 15 µg de hormona en 15 µl de H₂O, pH 9.0 (1µg/µl)

Solución para forrar la placa con rcGH (12ng/100ml)

1.2 µl de la solución stock de rcGH en 10 ml de solución de carbonatos

Solución para la curva patrón (1024 ng/1000 µl). Primera dilución.

Se prepara una curva patrón por cuadruplicado haciendo una dilución doble seriada. Se preparan 500 µl de volumen inicial para la primera dilución, es decir, 10.24 µl de la sol. stock y 489.76 µl de PBS = 500 µl

Solución para el control A (1024 ng de rcGH/1000 µl)

Este control contiene la misma concentración final de rcGH que la primera dilución de la curva. Se agregan 5.12 µl de la sol. stock + 244.88 µl de PBS + 250 µl de TPBS con 1% de leche descremada.

Solución para el control B (1° anticuerpo 1:100 000/1000 µl)

Este control contiene la misma concentración final de anticuerpo policlonal específico contra cGH que el resto de la curva patrón. Se agregan 250 µl de la solución del 1er anticuerpo + 250 µl de PBS.

Primer anticuerpo (1:50 000).

Antisuero policlonal, generado en conejo, contra la cGH. Se encuentra diluido 1:10 en PBS a -70 °C. Para cada ensayo se descongela una alícuota nueva. Se agregan 2 µl del anticuerpo 1:10 y se diluyen en 10 ml de la sol. de TPBS + 1% leche descremada y queda una dilución inicial de 1:5000.

Segundo anticuerpo (1:3000).

Anticuerpo anti-IgG de conejo, generado en cabra, y acoplado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, Bio Rad). Se emplea a una concentración de 1:3000 en TPBS + 1% de leche descremada.

Solución de revelado

Para el revelado de la placa se utiliza como sustrato una solución comercial de ABTS: Diluir aproximadamente 0.84 g de polvo amortiguador en 50 ml H₂O DD y adicionar una tableta de ABTS según indicaciones del fabricante.

PROCEDIMIENTO

1. Se preparan las soluciones amortiguadoras y de la hormona (stock, 1^a dilución de la curva y control A). Estas últimas se mantienen en hielo (4° C) todo el tiempo.
2. Se toma una placa nueva de inmunoanálisis (Dynatech-immulon de 96 pozos), una gradilla con tubos eppendorf (1.5 ml) nuevos y marcados, se almacena 1 litro de amortiguador TPBS 0.01 M, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.8 en un recipiente limpio y este se conecta con el sistema para lavar placas (Bio-Rad).
3. Se agregan 100 µl de la solución para forrar a cada pozo, para esto se emplea una pipeta de 8 canales (Octapette 8-channel pipetter) de 100 µl. Se tapa la placa con cinta adhesiva y se permite el pegado de la hormona a las paredes del pozo durante 16 h a 4°C.
4. Se preparan la curva patrón y las muestras problema.
Curva patrón: para un análisis por cuadruplicado, se preparan 1000 µl de la primera dilución (1024ng/1000 µl) = Tubo 1. Para preparar la siguiente concentración de proteína se toman 500 µl de la solución del tubo 1 (la mitad de su volumen total) y se mezclan con 500 µl de PBS y así sucesivamente hasta llegar a 0,5 ng/1000 µl = Tubo 12 (ver siguiente cuadro).

Curva patrón y mezcla de soluciones (µl)

# de tubo	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	B
(ng/pozo)	A	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	B
PBS	244.88	489.76	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Sol. rcGH	5.12	10.24	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	0
1er Ac.	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Vol. Total	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

A continuación se agrega el 1er anticuerpo (1:5000) en amortiguador de TPBS y 1% de leche descremada, en cada uno de los tubos de la curva patrón. Para tener una concentración final de anticuerpo de 1:100 000 se agregan 250 µl de sol. de anticuerpo en cada tubo ependorff. El anticuerpo se añade a todos los tubos a excepción del tubo de control A. Se incuban todos los tubos a 4°C durante 16 h.

Muestras problema: en tubos ependorff se agrega la cantidad de muestra requerida para el número de repeticiones y se agrega el 1er anticuerpo. Se agregaron 165 µl de muestra (diluida en PBS si es necesario) y 165 µl de solución de 1er anticuerpo (1: 5000 en amortiguador de TPBS y 1% de leche descremada) para tener un volumen final de 330 µl para agregar 100 µl de mezcla/pozo por triplicado. Se dejan incubando 16 h a 4°C.

5. Los pozos se lavan 5 veces con amortiguador TPBS, al final de los lavados, los pozos se secan con varios golpes firmes sobre papeles absorbentes.

6. Se añaden 100 µl de PBS + 3% de leche descremada para bloquear la unión inespecífica. Esta solución se agrega a todos los pozos, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

7. Se lava 5 veces la placa con TPBS.

8. Se añaden 100 µl l por pozo de las diferentes concentraciones de la curva patrón de cGH y de las muestras problema. Se incuba la placa durante 2 h a temperatura ambiente.

9. Se lava la placa 5 veces con TPBS.

10. Se añade a cada pozo 100 µl l de la solución del segundo anticuerpo a una concentración de 1:3000, se sella la placa con cinta adhesiva y se deja incubando durante 2 h a temperatura ambiente.

11. Se lava la placa 5 veces con TPBS.

12. Se prepara la solución de revelado: Se agregan 100 µl de esta solución a cada pozo, se sella la placa con cinta adhesiva y se deja incubar durante a 1 h a temperatura ambiente.

13. Al final de la incubación se leen las placas en el lector de microplacas (Bio-Rad) a 405 nm.

14. De los resultados se obtiene el valor porcentual de cada valor con respecto a los valores del control B (sin hormona) que se considera como el 100% de unión restando previamente el promedio de la lectura para la solución A.

$$B = (D.O./Bo) 100$$

Donde B = % de unión D.O. = densidad óptica obtenida

Bo = D.O. obtenida en el control B

Después se obtiene la media y desviación estándar de los valores porcentuales. Estos últimos datos se grafica contra las diferentes concentraciones de hormona por pozo.