

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROENDÓCRINOS QUE
REGULAN LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO (GH) EN LOS LINFOCITOS B DE LA BOLSA DE
FABRICIO DE POLLO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Santiago Martín Pech Pool

Dirigido por:

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
JUNIO 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

“IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROENDÓCRINOS QUE REGULAN LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN LOS LINFOCITOS B DE LA BOLSA DE FABRICIO DE POLLO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

M. en C. Santiago Martín Pech Pool

Dirigido por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Dra. Maricela Luna Muñoz

SINODALES

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Firma

Dra. Maricela Luna Muñoz
Secretario

Firma

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Vocal

Firma

Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno
Suplente

Firma

Dr. Juan Carlos Solís Sainz
Suplente

Firma

Dra. Silvia Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
JUNIO 2020

México

Índice

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE | i |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| 1. ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 Síntesis y liberación de la hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria | 3 |
| 1.1.1 La GHRH y el GHRH-R | 3 |
| 1.1.2 La SST y los SST-Rs | 4 |
| 1.1.3 La grelina y el GHS-R1a | 5 |
| 1.1.4 La TRH y el TRH-R | 6 |
| 1.2 La GH en el sistema inmune | 7 |
| 1.2.1 La bolsa de Fabricio y la GH | 8 |
| 1.3 Comunicación cruzada entre el sistema nervioso, endócrino e inmune | 9 |
| 2 JUSTIFICACIÓN | 10 |
| 3. HIPÓTESIS | 11 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 11 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| 5.1 Cultivos primarios de linfocitos B | 12 |
| 5.2 Fijado de la BF, la hipófisis y los linfocitos B | 13 |
| 5.3 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de los receptores GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a, SST-R2, en la BF y linfocitos B. | 13 |
| 5.3.1 Inmunocitoquímica | 13 |
| 5.3.2 Inmunohistoquímica de GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SST-R2 | 15 |
| 5.4 Extracción del ARNm de la BF, Pit y BL | 15 |
| 5.5 Retro transcripción de ARNm | 16 |
| 5.6 Amplificación de ARNm de la GHRH, GHRH-R, TRH, TRH-R, grelina, GHS-R1a, SST, SST-Rs, GH y GH-R mediante PCR punto final | 16 |

| | |
|--|----|
| 5.7 Tratamientos con las hormonas | 18 |
| 5.7.1 Concentración de los medios de cultivo | 18 |
| 5.8 Determinación de fosforilación de CREBS-133 | 18 |
| 5.9 Ensayo de ELISA para la cuantificación de la GH | 20 |
| 5.10 Análisis estadístico | 21 |
| 6 PCR en tiempo real | 21 |
| 7 Evaluación del calcio intracelular en los linfocitos B de la BF | 22 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 22 |
| 6.1 Caracterización y viabilidad de los linfocitos B de la BF | 23 |
| 6.2 Expresión de GHRH/GHRH-R, TRH/TRH-R, grelina/GHS-R1a, SST/SSTRs y GH/GH-R en la BF y en los linfocitos B | 24 |
| 6.3 Expresión de GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR2 en la BF y en los linfocitos B | 25 |
| 6.4 Co-localización de la GH con GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR2 en la hipófisis y en los linfocitos B de la BF | 28 |
| 6.5 Expresión del ARNm de la GH después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST o la combinación de TRH con SST en los linfocitos B de la BF | 30 |
| 6.6 Cuantificación de la GH intracelular y en el medio de cultivo, después del estímulo con GHRH, TRH, grelina, SST o la combinación de TRH con SST en los linfocitos B de la BF | 31 |
| 6.7 Evaluación de las bandas inmunoreactivas a la GH después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST en los linfocitos B y en el medio de cultivo | 35 |
| 6.8 Evaluación del contenido de calcio intracelular después del estímulo con TRH y SST en los linfocitos B de la BF | 40 |
| 6.9 Evaluación de la fosforilación del factor CREB en la serina 133 después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST en los linfocitos B de la BF | 43 |
| 6.10 Expresión de BAFF después del estímulo con TRH y SST | 45 |
| 7 CONCLUSIONES | 46 |
| 8 REFERENCIAS | 48 |
| 9 ARTÍCULO CIENTÍFICO DERIVADO DE LA TESIS | 58 |

Agradecimientos

-A la Dra. Maricela Luna Muñoz y la Dra. Laura Berumen Segura por todo el asesoramiento y acompañamiento durante el desarrollo del doctorado.

-A los doctores, Guadalupe Alcocer, Carlos Martínez y Juan Carlos Solís por el apoyo durante el doctorado.

-Al posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la UAQ por todo el apoyo brindado.

-Al Instituto de Neurobiología de la UNAM por todo el apoyo brindado.

-A la maestra Martha Carranza por todo el apoyo técnico.

-Al Sr. Gerardo Courtois por todo el apoyo en el laboratorio.

-A todos mis compañeros del laboratorio D01.

-Al apoyo económico brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-DGAPA, IN201817, IN207018, IN208419) y CONACYT (285004 y 475619).

-A Pilgrims México por la donación de los embriones; a Nydia Hernández Ríos, Maarten Werdler, Ericka de los Ríos y Adriana González Gallardo por el apoyo técnico.

-Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por permitir la realización del trabajo experimental en el laboratorio D01 (Bioquímica de hormonas) en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

La hormona del crecimiento (GH) se expresa en las células inmunes, donde ejerce efectos inmunomoduladores. Sin embargo, los mecanismos de expresión y liberación de la GH en el sistema inmune no son claros. Dado que la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la somatostatina (SST), la grelina y la hormona liberadora de GH (GHRH) así como sus receptores (TRH-R, SSTRs, GHS-R1a y GHRH-R), se expresan en células B de varias especies, en este trabajo, analizamos el efecto de estas hormonas sobre la expresión del ARNm, la GH intracelular y liberada, así como la fosforilación de CREB (pCREB^{S-133}) y el contenido de Ca²⁺ intracelular en linfocitos B-bursales (BBLs) (*in vitro*). Se evaluó y observó la expresión de TRH / TRH-R, grelina / GHS-R1a y SST / SST-R (1-5) en linfocitos B-bursales por RT-PCR e IHQ o IHC. No se observó la presencia de GHRH/GHRH-R en estas células. Se cuantificó la expresión del ARNm de la GH, el contenido intracelular y la GH liberada al medio de cultivo, así como fosforilación de CREB^{S-133} y el contenido de calcio intracelular. Se encontró que la TRH aumentó significativamente la expresión del ARNm de GH y la fosforilación de CREB. Por el contrario, la SST disminuyó la expresión del ARNm de la GH. La coadición de estas hormonas disminuyó la expresión del ARNm de la GH inducida por TRH, pero no se observaron cambios en los niveles de pCREB^{S-133}. La TRH promovió la liberación de GH al medio de cultivo mientras que la SST aumentó el contenido intracelular de esta hormona. Curiosamente, la SST inhibió la liberación de GH inducida por la TRH de una manera dependiente de la dosis. Después de 10 minutos de incubación con TRH o SST, los niveles de calcio intracelular disminuyeron significativamente, pero a los 60 minutos con la SST, aumentaron. Sin embargo, el tratamiento combinado con ambos péptidos mantuvo los niveles de Ca²⁺ reducidos hasta 60 minutos de incubación. Por otro lado, la expresión del ARNm de la citocina BAFF aumentó significativamente por la administración de TRH. En conjunto, nuestros resultados sugieren que TRH y SST están implicadas en la regulación de la expresión y liberación de GH en cultivos de BBL, que también implican cambios en fosforilación de CREB^{S-133} y la concentración de Ca²⁺ intracelular. Es probable que TRH, SST y

GH ejerzan acciones inmunomoduladoras autocrinas / paracrinas y participen en la maduración de los BBL de pollo.

SUMMARY

It is known that growth hormone (GH) is expressed in immune cells, where it exerts immunomodulatory effects. However, the mechanisms of expression and release of GH in the immune system remain unclear. Since thyrotropin-releasing hormone (TRH) and somatostatin (SST) as well as their corresponding receptors (-R) are expressed in B-lymphocytes of several species, we analyzed the effect of TRH and SST upon GH mRNA expression, intracellular and released GH, Ser133-phosphorylation of CREB (pCREB^{S-133}), intracellular Ca²⁺ levels as well as B-cell activating factor (BAFF) mRNA expression in bursal B-lymphocytes (BBLs) cell cultures. The expression of TRH / TRH-R, ghrelin / GHS-R1a and SST / SST-R (1-5) was observed in BBLs by RT-PCR and ICC, whereas GHRH / GHRH-R were absent in these cells. We found that TRH treatment significantly increased local GH mRNA expression and CREB phosphorylation. Conversely, SST decreased GH mRNA expression. Also, when added together, SST prevented TRH-induced GH mRNA expression, but no changes were observed in pCREB^{S-133} levels. Furthermore, TRH stimulated GH release to the culture media while SST increased the intracellular content of this hormone. Interestingly, SST inhibited TRH-induced GH release in a dose-dependent manner. The coaddition of TRH and SST decreased the intracellular content of GH. After 10 min of incubation with either TRH or SST, intracellular calcium levels significantly decreased, but at 60 min they were increased. However, the combined treatment with both peptides maintained the Ca²⁺ levels reduced up to 60-min of incubation. On the other hand, BAFF cytokine mRNA expression was significantly increased by TRH administration. Altogether, our results suggest that TRH and SST are implicated in the regulation of GH expression and release in BBL cultures, which also involve changes in pCREB^{S-133} and intracellular Ca²⁺ concentration. It is likely that TRH, SST and GH exert autocrine / paracrine immunomodulatory actions and participate in the maturation of chicken BBLs.

1. ANTECEDENTES

1.1 Síntesis y liberación de la hormona del crecimiento (GH) hipofisiaria

La GH es una proteína de 191 aminoácidos y un peso de 22 kDa; esta hormona se sintetiza y libera principalmente de los somatotropos en la hipófisis anterior; sin embargo, se sabe que la GH también se sintetiza en otros órganos y tejidos como, por ejemplo: el sistema respiratorio, cardiovascular, esquelético, nervioso y sistema inmune (Harvey y Aramburo, 2017; Jameson y Grossman, 2015).

La síntesis y la liberación de la GH ocurre principalmente en las células somatotrópicas de la hipófisis anterior. Estos procesos son regulados por algunas hormonas hipotalámicas como por ejemplo; la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (por sus siglas en inglés, GHRH), la somatostatina (SST), la grelina y la hormona liberadora de tirotrópina (por sus siglas en inglés, TRH) (Stojilkovic, 2018). Estas hormonas ejercen sus efectos a través de la unión con sus receptores membranales acoplados a proteínas G; el receptor a GHRH (GHRH-R), los 5 receptores de SST (SST-R₁₋₅), el receptor de grelina (GHS-R1a) y el receptor de la TRH (TRH-R) (Eigler and Ben-Shlomo, 2014; Hattori, 2009; Weigent, 2013a).

1.1.1 La GHRH y el GHRH-R

La GHRH es una hormona hipotalámica que fue aislada por primera vez de pacientes con tumores pancreáticos. En humano, el gen que codifica para esta proteína se ubica en el cromosoma 20q11.2 y se expresa principalmente en el núcleo arqueado del hipotálamo, la proteína madura está estructurada por 44 aminoácidos y su principal función es estimular la síntesis y liberación de la GH en la hipófisis a través de la unión con su receptor (GHRH-R) (Qian et al., 2012). El GHRH-R pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), está estructurado por 423 aa, 7 α -hélices hidrofóbicas transmembranales, su dominio N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular (Martari and Salvatori, 2009).

La GHRH al unirse a su receptor activa la enzima adenilato ciclasa (AC), se cataliza la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP, posteriormente es activada la proteína cinasa A (PKA), quien a su vez fosforila al factor de transcripción CREB (elemento de respuesta a AMPc) que promueve la transcripción del factor hipofisario 1 (Pit1); éste es el principal factor que promueve la transcripción de la GH. Simultáneamente se abren canales de Na⁺ causando una despolarización de la membrana, como consecuencia se abren canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje permitiendo la entrada de este ion necesario para estimular la exocitosis de las vesículas que contienen a la GH (Harvey, 1995). Está bien establecido que en aves, específicamente en el pollo de engorda, la GHRH es un potente estimulador de la GH (Harvey et al., 2014; Kühn et al., 2005).

1.1.2 La SST y los SST-R₁₋₅

En el humano, el gen que codifica para la SST está ubicado en el cromosoma 3q28 y se expresa principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo; codifica para dos proteínas biológicamente activas, una de 14 y otra de 28 aminoácidos. Estas proteínas son la consecuencia de una modificación postranscripcional. La SST cumple funciones de neurotransmisión, proliferativas, y endócrinas, entre ellas la inhibición de múltiples hormonas entre las que se encuentra la GH (Ben-Shlomo and Melmed, 2010); la SST realiza sus funciones a través de sus receptores (SSRT₁₋₅) pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Gi) inhibitorias distribuidos en diferentes órganos y con afinidad diferencial para cada variante de los receptores de la SST.

Al unirse a sus receptores la SST activa a las proteínas G_i promoviendo la inactivación de la AC, por consecuencia se inhibe la vía de AMPc/PKA/p-CREB/PIT₁ y por último GH; paralelamente se hiperpolariza la membrana por la apertura de canales de K⁺ disminuyendo la concentración de Ca²⁺ y promoviendo la inhibición la exocitosis de la GH contenida en sus vesículas secretoras (Eigler and Ben-Shlomo, 2014).

En el pollo de engorda, los cinco receptores de somatostatina han sido reportados en tejidos como en el corazón, duodeno, riñones, hígado, pulmones, ovarios, testículos, hipófisis, páncreas y el bazo. Además, aplicaciones de SST de 28 aa y cortistatina de 14 aa en cultivos de células hipofisiarias de pollo; inhibieron la liberación y el contenido intracelular de la GH (Meng et al., 2014).

1.1.3 La grelina y el GHS-R1a

En humanos, el gen que codifica para esta proteína se ubica en el cromosoma 3p25-26 y su estructura consta de 5 exones y 4 intrones, puede tener una modificación postraduccional consecuencia de la enzima grelina acetil-transferasa y se genera una proteína madura con un ácido octanoico unido en la serina (grelina-acilada, AG), esta modificación le confiere a la grelina su capacidad funcional, esta hormona está estructurada por 28 aminoácidos y principalmente se produce en el estómago, sin embargo, se expresa en otros tejidos como el páncreas, sistema cardiovascular e hipotálamo, específicamente en el núcleo arqueado. Inicialmente, se sabía que la ghrelina estimulaba el apetito, sin embargo, ahora se sabe que modula otras funciones como el balance energético, metabolismo de la glucosa, secreción de insulina, sensibilidad y adaptación a las condiciones de ayuno y es un potente estimulador de la secreción de la GH (Darling et al., 2015; Kojima and Kangawa, 2008).

Se han identificado dos variantes conservadas evolutivamente del receptor GHS-R, que se expresan en diferentes tejidos. El primer transcrito (1a) se caracteriza por la escisión de su intrón y codifica para el receptor funcional, el segundo transcrito (1b) retiene su intrón y no es funcional. El receptor GHS-R1a es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, está estructurado por 366 aa y se expresa en múltiples tejidos como el hipotálamo, hipófisis y neuronas aferentes. La grelina activa la vía de señalización fosfolipasa C (PLC) / (inositol 1,4,5-trisfosfato) IP_3 /diacilglicerol (DAG)/proteína cinasa C (PKC); para promover la síntesis y secreción de la GH (Hattori et al., 2014).

Además, se ha reportado la expresión de la grelina y su receptor en pulmones, cerebelo, páncreas, riñones, corazón y el bazo de pollos de engorda (Kaiya et al., 2002). Finalmente, aplicaciones de grelina exógena *in vivo* e *in vitro* en pollos de engorda y cultivos primarios de células hipofisiarias respectivamente, aumentaron los niveles de la GH en plasma y en el medio de cultivo; incluso la grelina fue igual de potente que la GHRH (Baudet and Harvey, 2003).

1.1.4 La TRH y el TRH-R

Inicialmente, la TRH se aisló del hipotálamo de porcinos y actualmente se sabe que es un tripéptido estructurado por ácido glutámico, histidina y prolina, la principal función de esta hormona es estimular la síntesis de TSH (hormona estimuladora de tirotrópina) en los tirotrópos de la hipófisis anterior, sin embargo, la TRH es un potente estimulador de la síntesis y secreción de la GH (Joseph-Bravo et al., 2015; Nair et al., 1970).

En el caso del pollo y otras especies de aves, la TRH puede ser igual de potente que la GHRH con respecto a la estimulación de la síntesis y liberación de la GH, inclusive se ha visto que las neuronas productoras de TRH aparecen desde etapas tempranas del desarrollo embrionario de pollos (4-5 días) y al final del desarrollo del embrión, los niveles de TRH aumentan progresiva y significativamente (Kühn et al., 2005). En un trabajo realizado con pollos adultos (dos años de edad) en condiciones de ayuno por 7 días, se demostró que la administración de TRH (10 µg) incrementa las concentraciones de GH hasta diez veces más que en condiciones control, lo que sugiere que son más sensibles que los pollos alimentados normalmente (Kühn, et al., 1991).

El TRH-R es una proteína de 398 aa y pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas Gq con siete pasos transmembranales (Joseph- Bravo et al., 2015). Sin embargo, se han identificado y caracterizado dos subtipos de receptores (TRH-R1 y TRH-R2) en diferentes especies, inicialmente el TRH-R2 fue identificado en rata y posteriormente en otros mamíferos. La distribución diferencial de estos receptores sugiere distintas funciones, por ejemplo, el TRH-R1 está involucrado en

la regulación de funciones hormonales mientras que el TRH-R2 se expresa en diferentes áreas del cerebro mediando los efectos de diversos neurotransmisores (Deflorian et al., 2007).

Cuando la TRH se une a su receptor ocurre un cambio conformacional en el receptor, posteriormente se separa la subunidad $G_{q/11}$ y activa a la enzima fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$), esta enzima hidroliza al fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2), de cuya reacción se producen IP_3 y DAG ; por un lado el IP_3 viaja hasta el retículo endoplásmico en donde se une a sus receptores y promueve la liberación de Ca^{2+} intracelular, por otro lado, el DAG en conjunto con el Ca^{2+} activan a las proteínas cinasas C (PKC) quienes a su vez fosforilan a factores de transcripción, entre ellos $CREB$, quien promueve la expresión de la GH (Hinkle et al., 2012).

1.2 La GH en el sistema inmune

La principal función de la GH es promover el crecimiento y el desarrollo de tejidos blandos y esqueléticos, sin embargo, también ejerce funciones sobre el metabolismo de lípidos, proteínas, ejerce funciones diabetógenas, estimula la captación de aminoácidos en el músculo (Sperling, 2015); también se le ha asociado a efectos de proliferación y neuroprotección en el sistema nervioso central (Arámburo et al., 2014), en sistema reproductor ejerce efectos esteroideogénicos (Luna et al., 2014) y modula el sistema inmune (Saba et al., 2014; Luna et al., 2008).

Ahora se sabe que la GH se expresa en células del sistema inmune de diversas especies además del humano, como: en los linfocitos T, B, monocitos, macrófagos y células NK (por sus siglas en inglés "Natural Killer") (Weigent, 2011; Weigent, 2013b). Además, la GH ejerce diversos efectos en estos tipos celulares, por ejemplo, en neutrófilos humanos la GH (dosis: 250ng/ml) promueve el incremento significativo de anión superóxido en comparación con los grupos control (Fu et al., 1992). En monocitos humanos induce la producción de interferón gamma ($INF\gamma$) (Malarkey et al., 2002). La GH puede mimetizar el efecto de citocinas a través de su receptor GH-R; por un lado, activa la vía $PI3K/AKT/C_E$ (Ciclina E) y la vía $PI3K/AKT/C-MyC/C_A$ (Ciclina A) para promover la proliferación de linfocitos B y T.

Por otro lado, activa la vía JAK/NF- κ B/BCL-2/D₁/D₃ (Ciclinas D1 y 3) incrementando la supervivencia de los linfocitos (Jeay et al., 2002).

También se ha observado que la GH incrementó los niveles de las proteínas quimiotácticas CD4⁺ y CD8⁺ en linfocitos T de ratas deficientes de estas proteínas. Sugiriendo un papel quimiotáctico de la GH sobre los linfocitos T (Savino et al., 2012). En linfocitos B de humanos, la administración de la GH exógena, indujo la producción de las inmunoglobulinas IgE e IgG

las cuales disminuyeron cuando se inmunoneutralizó a la GH usando un anticuerpo específico (Kimata and Fujimoto, 1994).

1.2.1 La bolsa de Fabricio (BF) y la GH

La BF de pollo es un órgano linfoide primario exclusivo de las aves y juega un papel indispensable en la diferenciación y maduración de los linfocitos B. El desarrollo de este órgano inicia en períodos embrionarios y alcanza su mayor tamaño entre las semanas 8 y 10 de edad, que es cuando inicia su período de involución (hasta los 7-8 meses) para transformarse en un tejido fibroso y carente de funciones en el organismo (Cazaban et al., 2015).

Se ha determinado la presencia de la GH y se ha cuantificado en el timo, bazo y la BF de pollo durante su desarrollo mediante el método de ELISA y Western blot, encontrándose que cambia su concentración con respecto a la etapa de desarrollo y que se encuentran varias isoformas inmunorreactivas de diferentes pesos moleculares (~15 a 56kDa) (Luna et al., 2005). Por otro lado, en cortes de la BF de pollos de 4 semanas de edad se observó la presencia y distribución del ARNm de la GH en los linfocitos B de la médula folicular y en menor proporción; en los linfocitos B de la corteza folicular de la BF (Luna et al., 2008). Por otro lado, también se encontró que la GH se expresa tanto en linfocitos maduros como inmaduros y mantiene la viabilidad de estas células (Rodríguez-Méndez et al., 2010). En este sentido, se sugiere que la GH ejerce funciones antiapoptóticas y de supervivencia determinadas mediante azul de tripano y la técnica de TUNEL (Luna-Acosta et al.,

2015). Estos resultados fueron obtenidos mediante la utilización de cultivos primarios de linfocitos B de la BF de pollos de 4 semanas de edad, los cuales fueron tratados con 10 nM de GH recombinante observándose un incremento de la viabilidad celular, una disminución de los cuerpos apoptóticos, y la inhibición de la actividad de la caspasa-3, mediada por la fosforilación de AKT y la expresión de BCL-2. Estos efectos fueron corroborados bloqueando la vía PI3/AKT con 100nM Wortmanina e inmunoneutralizando a la GH con un anticuerpo policlonal, con lo cual se bloquea el efecto antiapoptótico y disminuye la viabilidad celular con respecto al control (Luna-Acosta et al., 2015).

Por todo lo anterior, se ha demostrado que la BF de pollo es un modelo ideal para el estudio del efecto de la GH en linfocitos B, tanto porque se expresa la GH localmente como porque en este tejido tenemos en su mayoría, linfocitos B; además, ahí se lleva a cabo la maduración de estas durante el desarrollo de este órgano.

1.3 Comunicación cruzada entre el sistema nervioso, endócrino e inmune

Múltiples trabajos (*in vivo* e *in vitro*) han demostrado la existencia de la comunicación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune, por ejemplo, la presencia de ligandos y receptores comunes en ambos sistemas como un lenguaje químico consecuente a funciones inmunomoduladoras y neuroinmunomoduladoras. La “Neuroinmunoendocrinología” es la vertiente que estudia la comunicación bioquímica bidireccional entre estos sistemas, ya que los productos provenientes del sistema nervioso central impactan en las funciones del sistema inmune y viceversa. Entre estos mensajeros se encuentran, hormonas, neurotransmisores y citocinas (Weigent, 2013b).

La expresión y función de hormonas hipotalámicas y sus receptores en el sistema inmune, también se ha descrito. Por ejemplo, los receptores para la hormona adenocorticotropina (ACTH) así como para endorfinas, han sido detectados en células del sistema inmune. En el caso de la ACTH, se ha propuesto que puede modular funciones en los macrófagos; a través de la activación de canales

dependientes de Ca^{2+} y K^+ . En el caso de la GHRH, se ha propuesto que promueve la proliferación de linfocitos B, inhibe la actividad de células NK, promueve un incremento de $\text{INF}\gamma$, y el GHRH-R ha sido encontrado en timocitos y esplenocitos de ratas (*in vitro*). La TRH y el TRH-R también han sido encontrados en linfocitos T en donde se ha reportado que promueven la producción de $\text{INF}\gamma$. Además, la TRH promueve la proliferación de esplenocitos y disminuye la producción de IL-10. Finalmente, la SST ha mostrado tener efectos inhibidores en el sistema inmune, ya que aplicaciones de la SST inhiben la proliferación de linfocitos B provenientes de las placas de Peyer, la liberación de $\text{INF}\gamma$ así como de las inmunoglobulinas IgA e IgM; además, agonistas de la SST disminuyeron la respuesta inflamatoria *in vivo* (Blalock et al., 2005; Kamath et al., 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

En el sistema inmune, se ha observado que la GH promueve el crecimiento de los órganos linfoides tanto primarios como secundarios, estimula la proliferación y activación de linfocitos, así como la producción de moléculas efectoras durante la respuesta inmune (interleucinas, inmunoglobulinas, interferones, etc.). En el caso del pollo, se ha caracterizado a la GH en la Bolsa de Fabricio (BF), este órgano linfoide primario es importante para el desarrollo de los linfocitos B y es un modelo enriquecido de este tipo celular. La GH modula funciones en el sistema inmune y recientemente se ha demostrado que se sintetiza de manera local, sugiriendo que la GH podría ejercer funciones autócrinas y parácrinas, sin embargo, no se conocen los mecanismos por los cuales esta GH es sintetizada localmente y es liberada. Está bien establecido que, a nivel hipofisiario, la GH se regula bajo diferentes factores neuroendocrinos entre los que destacan la GHRH, TRH, grelina y la SST. En los linfocitos B y otras células inmunes de varias especies, se ha reportado la presencia de los receptores de los principales reguladores clásicos de la GH. Con base en la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmune, nosotros proponemos que la GH producida en los linfocitos B podría regularse de manera similar que en la hipófisis. Por tal motivo, en este trabajo se utilizó a la GHRH, la TRH, la grelina y la SST para estimular a los linfocitos B *in vitro* de la BF.

Posteriormente al tratamiento, se cuantificó el contenido intracelular, la GH liberada al medio de cultivo, la movilización de calcio intracelular, la fosforilación de CREB. Así mismo se determinó la expresión y presencia de los receptores de las hormonas hipofisarias e hipotalámicas.

3. HIPÓTESIS. La GHRH, la grelina y la TRH promueven la expresión y la liberación de la GH, mientras que la SST disminuye estos procesos en los linfocitos B de la bolsa de Fabricio de pollo (*in vitro*).

4. OBJETIVO GENERAL. Determinar si la expresión y la liberación de la GH es mediada por el estímulo de la GHRH, la grelina, la TRH y la SST en cultivos primarios de linfocitos B de la bolsa de Fabricio de pollo.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Evaluar la presencia y la distribución de los receptores a la GHRH, la grelina, la TRH y SST en la BF y en linfocitos B de la BF.

2.- Cuantificar el ARNm de la GH después del estímulo con la GHRH, la grelina, la TRH y SST en los linfocitos B de la BF.

3.- Cuantificar el contenido intracelular y la GH liberada al medio de cultivo, después del estímulo con la GHRH, la grelina, la TRH y la SST en los linfocitos B de la BF.

4.- Evaluar la fosforilación del factor de transcripción CREB en la serina 133 después del estímulo con la GHRH, la grelina, la TRH y la SST en los linfocitos B de la BF.

5.- Evaluar el contenido de calcio intracelular después del estímulo con la GHRH, la grelina, la TRH y la SST en los linfocitos B de la BF.

6.- Evaluar la expresión de la citocina BAFF después del estímulo con la TRH y la SST

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivos primarios de linfocitos B

Se obtuvieron embriones de pollos de la línea Ross 308 de 18 días de incubación donados por Pilgrim's Pride de México y se mantuvieron en la incubadora con humedad 100 % a 38° C hasta su eclosión y posteriormente fueron mantenidos en el vivario del Instituto de Neurobiología Campus Juriquilla Querétaro, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con temperatura, humedad, ventilación adecuada, así como alimentación y agua *ad libitum* hasta cumplir 4 semanas de edad (número 038/19, Octubre, 2010).

Al cumplir las 4 semanas de edad, los pollos fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron las bolsas de Fabricio (BFs), una vez retiradas, se transportaron en tubos falcon de 15 ml con medio RPMI 1640 (1X, L-glutamine y 25mM HEPES, Gibco by Life Technologies). Posteriormente los tejidos fueron tratados y procesados en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad (limpieza con alcohol y benzal y lámpara de UV). Las bolsas de Fabricio fueron cortadas en trozos de un tamaño promedio de ½ mm (en medio RPMI 1640); una vez obtenidos los tamaños requeridos, se homogeneizaron mecánicamente con un homogeneizador vidrio/vidrio, y al terminar se filtró el homogenado para retirar excedentes de tejidos (filtro de 40 µm, FALCON) y se centrifugó en un tubo cónicos de 15 ml con 10 ml de RPMI 1640 por 5 minutos a 1800 rpm y temperatura ambiente (Centrifuga BECKMAN COULTER Avanti J-25); una vez centrifugada la muestra, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur, se aforó de nuevo a 10 ml con medio, se re-suspendió y filtró por segunda ocasión y se centrifugó nuevamente. Finalmente, se retiró el sobrenadante y la pastilla obtenida se aforó con medio RPMI 1640 a 10ml, y el conteo y la viabilidad celular se realizaron utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y azul de tripano.

5.2 Fijado de la BF, la hipófisis y los linfocitos B

Las BFs, las hipófisis (Pits) y los cultivos de linfocitos B (LB) fueron obtenidos de pollos de 4 semanas de edad sin ningún tratamiento. Las BFs y las Pits se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 48 horas (Rodríguez-Méndez et al., 2010). Seguidamente, los tejidos fueron deshidratados en etanol y embebidos en parafina. De ambos tejidos, se realizaron cortes de entre 4 y 8 μm y se montaron en portaobjetos cargados positivamente. Por otro lado, aproximadamente 200,000 linfocitos de obtenidos de cultivos de la BF fueron transferidos por centrifugación (5 min x 1000 rpm) a portaobjetos cargados positivamente (Shandon Cytoespin 4, Thermo Electron corporation); posteriormente, las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 minutos, se lavaron y se mantuvieron en PBS a 20 C para sus análisis posteriores.

5.3 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de los receptores GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a, SST-R2, en la BF y linfocitos B.

Los cultivos de linfocitos B de la BF se caracterizaron por medio de inmunocitoquímica. Se utilizaron anticuerpos para determinar la población total de linfocitos α -BU-1a (Southern Biotech: 8365-02), linfocitos maduros α -IgG (Zymed: GI-3100) e inmaduros α -IgM (Rockland: 603-102-007). Además, se utilizaron los siguientes anticuerpos para los receptores a las hormonas hipotalámicas antes mencionadas, GHRH-R (Abcam: ab28692), TRH-R (Abcam: ab72179), SST-R2 (Sta Cruz Biotechnology: sc-25676), GHS-R1a (Sta Cruz Biotechnology: sc-20748). Finalmente, se utilizó un anticuerpo para la GH (Washington Biotech: gp-sha-1). Se realizaron tres cultivos primarios de tres diferentes animales, se utilizaron 3 portaobjetos por cada animal. Todos los anticuerpos utilizados se encuentran en la tabla número 1.

5.3.1 Inmunocitoquímica

Los frotis de linfocitos B se lavaron en tres ocasiones en TBS (Tris 1.2, NaCl 9g, pH 7.6) (10 min). Posteriormente, se incubaron en amortiguador de citratos (2.94 g citrato de sodio, pH 6, Tritón al 0.05%) por 30 min. Después, las laminillas se lavaron

en tres ocasiones en TBS (10 min). El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con leche baja en grasa (Bio-Rad) al 1% en TBS por una hora. Después del bloqueo,

Tabla 1 . Anticuerpos

| Blanco | Tipo | Dilución | Marca | No. Cat. |
|--|----------------------------|-----------|-------------------------|-----------------|
| cGH | conejo/policlonal | 1:100,000 | NHPP | AFP-551-11-1-86 |
| cGH | Cerdo de guinea/policlonal | 1:2000 | Washington Biotech. | GP-SHA-1 |
| GHRH-R | conejo/policlonal | 1:300 | Abcam | ab28692 |
| TRH-R | conejo/policlonal | 1:300 | Abcam | ab72179 |
| SST-R2 | conejo/policlonal | 1:300 | Sta Cruz Biotechnology | sc-25676 |
| GHS-R1a | conejo/monoclonal | 1:300 | Sta Cruz Biotechnology | sc-20748 |
| p ^{S133} -CREB | Conejo/monoclonal | 1:5000 | Abcam | ab32096 |
| chicken/Turkey IgG | conejo/policlonal | 1:100 | Zymed | GI-3100 |
| chicken Bu-1a-FITC | ratón/monoclonal | 1:500 | Southern Biotech | 8365-02 |
| chicken-IgM Antibody-FITC | cabra/policlonal | 1:500 | Rockland | 603-102-007 |
| β-actin | ratón/monoclonal | 1:1000 | Sta Cruz Biotechnology | SC-47778 |
| Alexa Fluor® 594 anti-Rabbit-IgG | cabra/policlonal | 1:2000 | Invitrogen | A11012 |
| Alexa 488 anti-Rabbit-IgG | cabra/policlonal | 1:2000 | Invitrogen | A11078 |
| Alexa 488 anti-guinea pig IgG | cabra/policlonal | 1:2000 | Invitrogen | A-11073 |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody | cabra/policlonal | 1:5000 | ThermoFisher scientific | G-21234 |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP | cabra/policlonal | 1:5000 | ThermoFisher scientific | G-21040 |

las muestras se lavaron en tres ocasiones con TTBS 1X (0.1% de Tritón X-100 en TBS) y se dejaron incubando durante toda la noche (o al menos 12 horas) con los anticuerpos para α-BU-1a, α-IgG, α-IgM, α-GHRH-R, α-TRH-R, α-SST-R2, α-GHS-R1a o α-GH en TTBS y 1% de leche.

Después de la incubación, las laminillas se lavaron en tres ocasiones con TTBS y se dejaron incubando por dos horas con los anticuerpos secundarios correspondientes; Alexa Fluor® 594 anti-Rabbit-IgG (Invitrogen: A11012), Alexa Fluor® 488 anti-Rabbit-IgG (Invitrogen: A11078), Alexa Fluor® 594 anti-guinea pig-IgG (Invitrogen:) en TTBS y leche al 1%. Seguidamente, las laminillas se lavaron en tres ocasiones con TBS y se incubaron con 500 ng/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 30 min. Finalmente, las laminillas se lavaron y se montaron en medio de

montaje para fluorescencia Vectashield (VECTASHIELD® mounting medium for fluorescence by Vector Laboratories, Inc).

5.3.2 Inmunohistoquímica de GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SST-R2

Cortes histológicos de las Pits y las BFs se desparafinaron en Citrisolv (Thermo Fisher Scientific Inc.) en tres ocasiones por 5 min. Posteriormente, los cortes fueron rehidratados en las siguientes concentraciones de alcohol, 95%, 70%, 60% y 50%. Después, los cortes fueron incubados en solución de Lugol y tiosulfato de sodio por 2 min y 4 min respectivamente. Los cortes fueron permeabilizados con amortiguador de citratos por 30 min a 80 °C. Después, se bloquearon con leche baja en grasa (Bio-Rad) al 5% durante una hora. Después del bloqueo, se lavaron en tres ocasiones con TTBS 1X. Las laminillas se dejaron incubando con los anticuerpos primarios α -GHRH-R, α -TRH-R, α -SST-R2, α -GHS-R1a en TTBS 1X con 1% de leche.

Después de 12-24 horas de incubación, las laminillas se lavaron tres veces con TTBS, seguidamente, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes; Alexa Fluor® 594 anti-Rabbit-IgG (Invitrogen: A11012), Alexa Fluor® 488 anti-Rabbit-IgG (Invitrogen: A11078) durante dos horas. Finalmente, las laminillas se lavaron con TBS 1X en tres ocasiones y se incubaron durante 30 min con 500 ng/mL de DAPI. Todas las laminillas se montaron en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (VECTASHIELD® mounting medium for fluorescence by Vector Laboratories, Inc).

5.4 Extracción del ARNm de la BF, Pit y BL.

Se extrajo el ARN total de los linfocitos B, las BF y las Pit por medio del método de trizol. A cada tubo con linfocitos B, BF o Pit, se agregó 500 μ l de Trizol Reagent® y se homogeneizó mecánicamente con jeringas de 5 ml, el homogenado se aforó a 1ml con 400 μ l de Trizol® Reagent y se dejó incubar por 5 minutos, después, a cada tubo se le adicionó 200 μ l de cloroformo 99% de Sigma®, se agitó y dejó incubar por 5 minutos para después centrifugar por 15 minutos a 12,000 RPM (Sorvall® RMC 14 Dupont); de esta mezcla se obtuvieron tres fases, una lipídica, una

hidrofílica y una acuosa, retiramos un mínimo 400 µl de la fase acuosa y a este sobrenadante se le agregó 500 µl de etanol al 70%, se agitó y dejó incubar por 2 minutos, después, se tomaron 700 µl de la mezcla y se adicionaron a columnas de sílice (On-column PureLink™ DNase Treatment), se centrifugaron por 15 segundos y después se adicionó el faltante de la muestra, se centrifugaron una vez más y se realizó un primer lavado con 350 µl del “Wash Buffer” 1 (Ambion by life technologies®), centrifugamos por 15 segundos y adicionamos 80 µl de una mezcla de reacción de Buffer con DNAsa, se dejó incubando por 15 minutos y se lavó con 350 µl del “Wash Buffer 1”. Finalmente, dos lavados de 500 µl del “Wash Buffer 2” y colectamos el ARN en 50 µl de agua estéril. La cuantificación del ARNm se realizó mediante el Nanodrop (Thermo Scientific 1000 spectrophotometer).

5.5 Retrotranscripción del ARNm

Se partió de 1µg de cada muestra (BL, BF y Pit) a los que se les adicionó las siguientes mezclas: a)mezcla 1 constó de 4.5 µl de Oligos dT (Invitrogen® .5µg/µl), 4.5 µl de Hexámeros (Invitrogen®), 4.5 µl de dNTP's (Invitrogen®) y se dejaron en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2,400) por 5 minutos a 65 °C, b) después se le adicionó la mezcla 2, que contuvo 36 µl de Buffer (5X First Stand Buffer 0.1 M de Invitrogen®), 18 µl de DTT (Invitrogen®) y 4.5 µl de RNAsa out (Recombinant Ribonuclease Inibitor Invitrogen®) se dejaron en el termociclador por 2 minutos a 45 °C , c) por último se les adicionó 1 µl de Superscript y se dejó en el termociclador por 50 minutos a 42 °C.

5.6 Amplificación de ARNm de la GHRH, GHRH-R, TRH, TRH-R, grelina, GHS-R1a, SST, SST-Rs, GH y GH-R mediante PCR punto final.

Los oligonucleótidos que se usaron fueron diseñados con el software “Oligo-7” a partir de las secuencias del ARNm de GHRH-R, TRH-R, GHS-R, SSTR₁₋₅, GH, ghrelina, TRH, SST, GHRH y GH-R de pollo obtenidas en la base de datos del NCBI (Tabla 2).

La amplificación de los genes se realizó durante 30 ciclos. Se utilizó una mezcla con un volumen final de 40 µl; esta mezcla contuvo, amortiguador para PCR 5X, MgCL₂

a 2 mM, mezcla de dNTPs (10mM), ADN Taq polimerasa (5U/μl) y 0.1 mM de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 2). Las amplificaciones consistieron de un ciclo de desnaturalización (95 °C por 30 segundos), alineamiento (58 °C por 30 segundos) y extensión (72 °C por un minuto) (35 veces). Las mezclas solo con agua estéril en lugar de ADNc se utilizaron como control negativo. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE, y bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en cámaras Bio-Rad a 150 voltios durante 30 min.

Tabla 2. Oligonucleotidos

| Blanco | Dirección | Secuencias (5' - 3') | Tamaño del producto | # de acceso |
|---------|------------|--|---------------------|------------------------------------|
| | | Ligandos | | |
| cGHRH | Fwd Rev | TAC CTG AGT GGG AGC TGA TC CAT CAG TCT CCA GCT GGT CA | 704 | >NM_001040464.1 |
| cTRH | Fwd Rev | ATT AAA CAT GCC TCT GCC ACA AAA CAA TTA CTT TCT CAT TCC TCT G | 600 | >XM_025154454.1 |
| cGrelin | Fwd Rev | CATACAGCAACAAAAGGATAC TGTGGTTGTCCTTCAGCT | 272 | >NM_001001131.1 |
| cSST | Fwd Rev | CACCTGTCTCCCATCCAC CGGAGTGCATGTCACGCAAG | 232 | >NM_205336.1 |
| cGH | Fwd Rev | CGCACATATTCCGGAGGAG GGCAGCTCCATGTGTACT | 128 | >NM_204359.2 |
| cBAFF | Fwd Rev | GATCTCAGCTGGTGACATTAT TTAGCTCTCTTCTGTGTATTG | 140 | >NM_204327.2 |
| | | Receptores | | |
| cGHRH-R | Fwd Rev | GCTGTCTCAAGCCATTCCCTT AGGTAGCCTCCTGAATGCCA | 177 | >NM_001037834.2 |
| cTRH-R | Fwd Rev | ATGCCCTATCGAACACTGGT ATGGCAGTTGCAGAGTTTCTT | 177 | >NM_204930.1 |
| cGHSR | Fwd Rev | TGGCCTCTCCGACCTGCT TGGCAGTACCCTCCAC | 180 | >NM_204394.1 |
| cSSTR-1 | Fwd Rev | CCGTGGCTAAGATGGTCAACT GCAGCAAGAAGCCATCAGGA | 189 | >NM_001153167.1 |
| cSSTR-2 | Fwd Rev | GGCACCGGATGATAGGGAGTC ATCGTCTGCCACATGGG | 191 | >XM_015279869.2 |
| cSSTR-3 | Fwd Rev | GGCACCGGATGATAGGGAGTC ATCGTCTGCCACATGGG | 172 | >XM_015280025.2 |
| cSSTR-4 | Fwd Rev | GGCACCGGATGATAGGGAGTC ATCGTCTGCCACATGGG | 181 | >XM_015283378.2 |
| cSSTR-5 | Fwd Rev | GCCGTGGAAGAGTGCCGGA CCGCTACCTGCCAGTAGTTCA | 156 | >XM_015284286.2 |
| cGHR | Fwd Rev | TTGCAGGTGTGAAAGTCTCTC ACTTCACCATGGACAATGCCTA | 181 | >NM_001001293.1 |
| | | Genes de referencia | | |
| cGAPDH | Fwd Rev | TGTGGAGAGATGGCAGAG GTCAGGTCAACACAGAGAC | 154 | >NM_204305.1 |
| c18S | Fwd Rev | CTCTTCTCGATTCCGTGGGT TTAGCATGCCAGAGTCTCGT | 100 | >XR_003078044.1 |

5.7 Tratamientos con las hormonas

Se utilizaron 10 millones de células de los cultivos celulares descritos en la sección 5.1, los cuales fueron tratadas con 1, 10 y 100 nM de GHRH, TRH, ghrelina y SST, más un control solo con medio RPMI 1640 (volumen final 500 μ l por cada tratamiento). También se utilizaron co-tratamientos con la TRH y la SST (TRH: 10 nM con 10 y 100 nM de SST). Se dejaron incubar durante 1 hora con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Después, se separaron las células de los medios de cultivo mediante centrifugación y se guardaron para sus análisis posteriores.

5.7.1 Concentración y diálisis de los medios de cultivo

Los medios de cultivo resultantes de cada tratamiento fueron dializados con el doble de volumen de agua. La centrifugación se realizó durante 50 minutos a 6,000 rpm hasta conseguir un volumen final de aproximadamente 50 μ l. Alícuotas de dichos concentrados sirvieron para evaluar la GH por medio de SDS-PAGE/WB y ELISA.

5.8 Determinación de fosforilación de CREB^{S-133}

Todas las muestras se homogenizaron con 100 μ l de amortiguador de lisado RIPA (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers MA, EUA) preparado con el inhibidor de proteasas complete. Posteriormente, los tejidos se sonicaron durante 1 min en frío y se agitaron durante 1 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 15 min a 4 °C, se aisló el sobrenadante y se mantuvo a 4 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y se tomaron alícuotas 80 μ g de proteína total. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes y reductoras, por lo que cada muestra fue estabilizada agregándole el volumen correspondiente de solución amortiguadora (1.0 ml TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.8 ml glicerol, 1.6 ml SDS 10 %, 0.2 ml azul de bromofenol 0.05 %, 4 ml agua destilada) para un volumen total de 20 μ l, y se colocaron en baño María durante 5 min.

Para la electroforesis se realizaron geles de poliacrilamida al 12.5 % de 10 carriles. Como marcador de peso molecular se empleó el estándar de 10 - 250 kD, Precision Plus Protein Kaleidoscope (BIO-RAD; CA, EUA). Una vez que el gel estuvo cargado

con el marcador y las muestras, a la cámara de electroforesis se le agregó la solución amortiguadora de corrida (15 g/l TRIS-base 0.025 M, 72 g/l glicina, 5 g/l SDS, pH 8.3) y se corrió a 100 V durante 1 h y 30 min aproximadamente.

Una vez terminada la electroforesis, se equilibraron los geles y las membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD; CA, EUA) con amortiguador de transferencia (25 mM TRIS, 192 mM glicina, 20 % metanol, pH 8.3) durante 10 min. Al mismo tiempo, se hidrataron las fibras y el papel filtro en el amortiguador de transferencia. Se colocó un refrigerante y un agitador magnético dentro de la cámara de transferencia y se dejó correr a 200 mA durante 1 h. Al terminar, la membrana se colocó en TBS 1X (100 nM TRIS, 2.5 M NaCl, pH 7.5) y durante 10 min con agitación. Posteriormente, se bloqueó con leche en polvo baja en grasa (BIO-RAD) al 5 % en TBS durante 1 h en agitación al término, la membrana se lavó con TTBS 1X (TBS + Tween al 20 %) tres veces durante 10 min, en agitación.

Para la detección de la GH se utilizó el antisuero CAP-1 mientras que para la detección de CREB se utilizó el anticuerpo policlonal p^{s133}-CREB (Abcam: ab32096). Como control de carga, se utilizó el anticuerpo para actina (Santa Cruz Biotechnology: SC-47778). Todos los anticuerpos se prepararon, por separado, en una solución con TTBS 1X y solución bloqueadora al 1 %, diluidos de la siguiente manera: 1:10,000 para la GH, 1:5000 para el p^{s133}-CREB y 1:1000 para la actina. La incubación de la membrana con correspondiente anticuerpo se realizó durante toda una noche en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TTBS 1X, por 10 min.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron: el anti IgG de conejo y ratón hechos en cabra y conjugados con peroxidasa de rábano (ThermoFisher: 65-6120; Invitrogen: G-21040), a una dilución de 1:3000 en TTBS y solución bloqueadora al 1 %. La incubación de la membrana con el anticuerpo secundario fue de 2 h en agitación constante, a temperatura ambiente. Posteriormente, se le hicieron 3 lavados con TTBS 1X y 3 con TBS 1X, por 10 min.

Para revelar se utilizó ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham; Buckinghamshire, UK), mezclando las soluciones 1 y 2 en una proporción 1:1. Se colocaron las membranas en una bolsa de plástico y la solución de la mezcla por 5 min evitando la formación de burbujas sobre la membrana. La membrana se expuso a la placa radiográfica Hyperfilm ECL (Amersham; Buckinghamshire, UK) en un casset de amplificación y posteriormente fueron revelados con las soluciones reveladora y fijadora (Kodak), según lo indican los fabricante, todo en un cuarto oscuro. El tiempo de exposición varió de acuerdo, a la dilución del primer anticuerpo utilizado: 5-10 min para la detección de GH, 10 min para la detección de pCREB^{S-133} y 5 min para la detección de actina. Finalmente, la placa se dejó secar y se analizó por densitometría, utilizando el programa Image Lab de BIO-RAD.

5.9 Ensayo de ELISA para la cuantificación de la GH

La inmunoreactividad de la GH se cuantificó en extractos de proteínas obtenidas de BBLs (80 µg) y en 25 µl de medio de cultivo concentrado (volumen final de 50 µl obtenido de 1 ml de medio de cultivo dializado y concentrado en filtros Amicon Ultra 4 ml [Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Carringtonwohill, Co.Cork, IRL] en una centrífuga Avanti J-25 [Beckman Coulter, Inc. Palo Alto, CA.]), utilizando un ensayo inmunoabsorbente indirecto ligado a enzimas (ELISA) (Luna et al., 2004; Martínez-Coria et al., 2003; Martínez-Moreno et al., 2014a). Inicialmente las placas de microtitulación de 96 pocillos (Immulon 2HB, placas de microtitulación de fondo plano de Thermo Scientific) se revistieron durante la noche con 12 ng de rcGH / por pocillo en 100 µl de amortiguador de carbonatos (1 M), pH 10.3, a 4°C. Después del recubrimiento con el antígeno, las placas se lavaron con TPBS (fosfato sódico 0,01 M, NaCl 0,15 mM, Tween 20 al 0,05% v / v, pH 7) usando un lavador manual de microplacas (ENE, lowboy, Nalgene; Nunc-Immuno Wash 12, InterMed Nunc). Este procedimiento se realizó después de cada paso de incubación. Las muestras y las diluciones seriadas de la rcGH (0.5-1250 ng / ml) diluidas en TPBS se incubaron durante 16 h con 100 µl de anticuerpo primario (α-cGH, AFP-551-11-1-86-National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) diluido 1: 100,000 con TPBS y 1%

p / v de leche descremada en polvo. Luego se agregaron las muestras problema (100 μ l) a los pocillos recubiertos y se incubaron durante 2 ha temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió el anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa de rábano picante-IgG anti-conejo) diluido 1: 5000 con TPBS y 1% p / v de leche en polvo descremada e incubó durante 2 ha temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se generó utilizando 2,2-azino-di- (3-etilbenzotiazolina sulfonato) como sustrato (Sigma, Saint Louis, MO, EE. UU.), y las placas se leyeron en un lector de microplacas ELISA (Bio-Rad), a una longitud de onda de 405 nm.

5.10 Análisis estadístico

En todos los experimentos, los valores se expresan como media \pm error estándar (SEM). Las diferencias significativas entre grupos o tratamientos se determinaron mediante la prueba t de Student o un análisis ANOVA de una vía, seguido de pruebas post-hoc paramétricas (Šidák, Dunnet, Tukey) o no paramétricas (Dunns). Se determinó que los valores de p inferiores a 0,05 eran estadísticamente diferentes (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,001).

6. PCR en tiempo real

El ARN mensajero de la GH se cuantificó en el termociclador StepOne (Applied Biosystems Foster, CA, USA). Se utilizó una dilución 1:3 del ADNc de cada tratamiento. Se utilizó la mezcla de PCR "Maxima SYBER Green Master Mix" (ThermoFisher scientific). La reacción final fue de 10 μ l y constó de: 3 μ l de ADNc y 7 μ l de la mezcla Maxima syber (dentro de la mezcla se adicionó .5 μ M de cada oligonucleótido específico). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 10 min, 45 ciclos de amplificación con 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 30 s a 60 °C, después, 30 s a 75 °C. Se determinó la expresión del ARN mensajero de la GH utilizando el método de qPCR relativo de Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), en el que se usaron grupos calibradores correspondientes a la GH y BAFF. El valor de Ct del control se obtuvo de la media geométrica entre los Cts del 18S (Δ Ct), en donde se obtuvo la resta el Ct del gen blanco menos el Ct. El $\Delta\Delta$ Ct se obtuvo de restar el Δ Ct del calibrador al Δ Ct de los grupos experimentales.

6.1 Evaluación del calcio intracelular en los linfocitos B de la BF

Se colectaron los linfocitos B después de 5, 10, 15 y 60 min de incubación. Estos linfocitos se lisaron con amortiguador RIPA. Seguidamente, los lisados fueron centrifugados por 15 min a 10,000 g, se colectaron los sobrenadantes y se conservaron a 4 °C. Para la determinación de calcio, se utilizaron los kits de abcam (ab102505) y sigma (MAK022); ambos funcionan debido a la formación del complejo cromogénico entre el calcio y el quelante o-cresolphthaleina. La formación de estos complejos fue medida a 575 nm y el contenido de calcio fue directamente proporcional al color obtenido.

Primero se preparó una curva estándar en una placa de 96 pozos, iniciando desde un punto cero (0 µg/pozo) hasta un punto máximo de 2.0 µg de Ca²⁺ por pozo. Para este ensayo, se utilizaron 25 µl de sobrenadante de cada muestra tratada. Seguidamente se agregaron 90 µl del reactivo cromogénico tanto a la curva como a las muestras problema. Después, se adicionó 60 µl del amortiguador para el ensayo de calcio; se agitó y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 10 min. La lectura de la placa se realizó en el varioskan a 575 nm.

Dado que se utilizaron datos provenientes de dos kits, se decidió normalizar los valores tomando como 100% el tiempo 0, mismo que no tuvo ningún tratamiento.

6. Resultados y discusión

La comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune depende de múltiples mensajeros químicos (moléculas paracrinas, autocrinas o endocrinas), así como de sus receptores, para desencadenar efectos pleiotrópicos en cada sistema (Veiga-Fernandes and Mucida, 2016). La GH y el GH-R son parte del eje hipotálamo-hipófisis (Rohrbasser et al., 2018). Sin embargo, ahora se sabe que la GH y el GH-R se expresan y ejercen efectos inmunomoduladores en el sistema inmune de varias especies (Hattori, 2009); incluyendo la BF de pollo (Luna et al., 2013). De hecho, en este estudio, observamos que la GH y su receptor (GH-R) se expresan en las células B-bursales de este órgano. La BF, es un órgano linfoide primario en donde los linfocitos B se producen y maduran (Ko et al., 2018). Además,

la BF se ha utilizado ampliamente para estudiar y comprender patologías en aves de corral; por ejemplo, el estudio de la enfermedad infecciosa de la BF (Dulwich et al., 2018).

6.1 Caracterización y viabilidad de los linfocitos B de la BF

Nuestro primer objetivo fue determinar la viabilidad de los linfocitos B de la BF, así como las diferentes subpoblaciones de linfocitos B dentro del cultivo celular primario. La viabilidad de los linfocitos B se determinó a lo largo de 120 minutos de incubación con medio de cultivo RPMI 1640. La viabilidad en el tiempo cero fue de 87.01%, y disminuyó progresivamente con respecto al tiempo ya que a los 30 min, fue de 84.12%, a los 60 min, 79.76%, y finalmente, 71.21% después de 120 min (Fig. 1-H). Para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos B se utilizaron anticuerpos para detectar la población total de células B (α -Bu-1a), así como la distribución de linfocitos B maduros (α -IgG) e inmaduros (α -IgM). Como se muestra en la Fig. 1-A, las células inmunorreactivas al α -Bu-1a representaron el 74.17% (Fig. 1-G), las células inmunorreactivas al α -IgG (Fig. 1-B) y al α -IgM (Fig.1-C) representaron 58.05% y 27.37% respectivamente (Fig. 1-G). Estos resultados son similares a los previamente publicado por Luna-Acosta et al., (2015); en donde obtuvieron cultivos enriquecidos de linfocitos B, con una distribución similar de las subpoblaciones inmunorreactivas a IgG+ e IgM+.

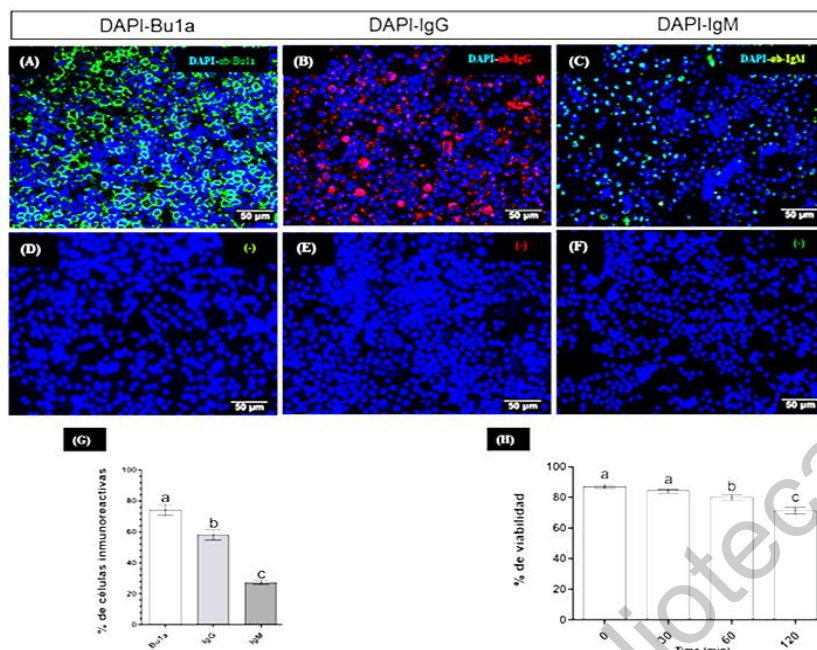


Figura 1. Las subpoblaciones de linfocitos B se estimaron utilizando anticuerpos primarios para detectar el total de células B (ab-Bu1a) (Fig. 1A), células B maduras (ab-IgG) (Fig. 1B) y células B inmaduras (ab-IgM) (Fig. 1C). Se usó DAPI para detectar los núcleos celulares. Se utilizaron controles negativos sin anticuerpos primarios (Fig. 1D, E, F). La proporción de linfocitos B se calculó contando el número de células inmunoreactivas para cada anticuerpo, entre el número total de células reactivas DAPI (Fig. 1 G). La viabilidad celular de los linfocitos B se determinó a lo largo de 120 minutos (Fig. 1H). Los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.001$) al usar un ANOVA de una vía y la prueba pos hoc de Dunnett. Cada barra representa las medias \pm error estándar de la media, los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

6.2 Expresión de GHRH/GHRH-R, TRH/TRH-R, ghrelina/GHS-R1a, SST/SSTRs y GH/GH-R en la BF y en los linfocitos

Evaluamos la presencia de las hormonas hipotálamicas y sus receptores en la BF y en linfocitos B, así como en hipófisis, hipotálamo e hígado que se utilizaron como controles de expresión. Como se muestra en la Fig. 2-A, el GHRH-R se expresó en la hipófisis, pero no en los linfocitos B ni en la BF. Además, la GHRH también se expresó en el hipotálamo, pero no en la BF ni en los linfocitos B (Fig. 2-K). La TRH y el TRH-R se expresaron en la hipófisis, el hipotálamo, así como en la BF y en los linfocitos B (Fig. 2-B, L). La grelina y su receptor también se expresaron en los controles positivos, la BF y en los linfocitos B (Fig. 2-C, M). La SST y sus cinco receptores (SST-R1-5) se expresaron en el hipotálamo, la hipófisis, así como en la BF y en los linfocitos B (Fig. 2-D, E, F, G, H, I, N). Por último, se observó la expresión de la GH y el GH-R en la hipófisis, el hígado, los linfocitos B y en la BF (Fig. 2-I, P).

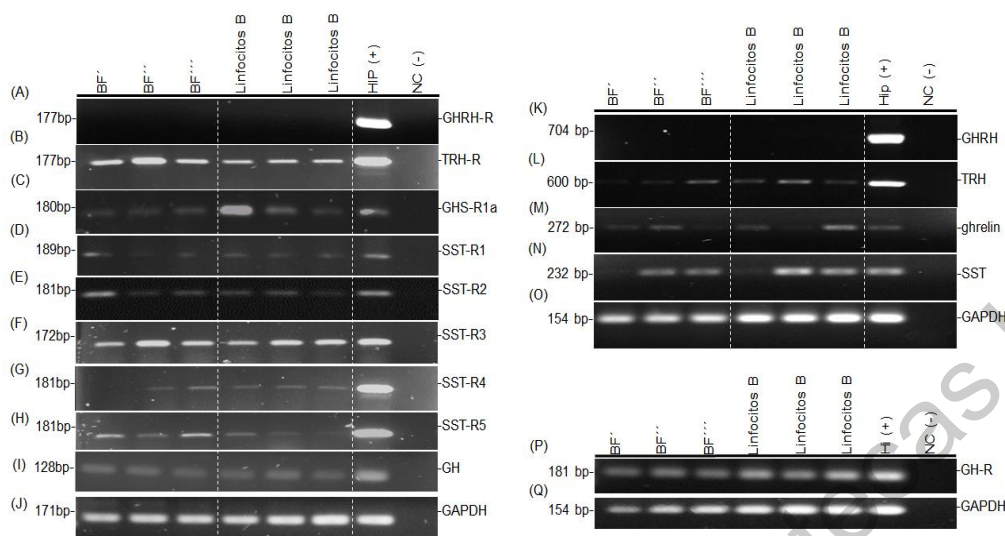


Figura 2. Expresión del GHRH-R (A), TRH-R (B), GHS-R1a (C), SSTR₍₁₋₅₎ (D, E, F, G, H), GHRH (K), TRH (L), grelina (M), SST (N), GH (I) y el GH-R (P); en linfocitos B y en la BF. Se usaron linfocitos B obtenidos de tres cultivos independientes, así como tres BFs de diferentes animales. En todos los casos se usó GAPDH como gen de referencia (J, O, Q). Pares de bases (bp), negativo (NC-) hipotálamo (Hip), Hipófisis (Hip), hígado (Hi).

En cuanto a la GHRH, TRH, grelina y SST, se ha reportado que se expresan en múltiples células inmunes de varias especies, incluido el hipotálamo del pollo (Hattori, 2009; Piórkowska et al., 2018; Quintanar and Guzmán-Soto, 2013; Weigent, 2013a).

6.3 Expresión de GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR2 en la BF y en los linfocitos B

Los receptores de GHRH, TRH, grelina y SST pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G con 7 pasos transmembranales (Schrage et al., 2016); y ahora se sabe que estos receptores se expresan en la hipófisis de mamíferos (Albarran-Zeckler et al., 2013; Anderson and Scanes, 2015; Jones et al., 1996; Kiseljak-Vassiliades et al., 2015; Miller et al., 1999) y pollos (Anderson and Scanes, 2015; De Groef et al., 2003; Meng et al., 2014; Richards et al., 2006; Wang et al., 2006).

En este estudio, corroboramos la presencia de los receptores GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR₂ en la BF y en los linfocitos B. De izquierda a derecha, en el panel 1 de la Figura 3, se observan células inmunoreactivas a GHRH-R en la hipófisis, pero no en la BF o en los linfocitos B. Similar a nuestros resultados sobre la

expresión del ARNm evaluado por PCR punto final y la proteína por IHC, en otros trabajos la GHRH-R también se ha observado en la hipófisis de pollos de engorda (Porter et al., 2006; Toogood et al., 2006; Wang et al., 2006). Además, la presencia de GHRH-R en otros tipos celulares como timocitos y esplenocitos de ratas (Guarcello et al., 1991; Weigent, 2013a), peces (Chan et al., 1998) así como en linfocitos T humanos (Khandelwal et al., 2015), sugiere la participación local de la GHRH. Sin embargo, la expresión de GHRH-R en tejidos inmunes de aves, específicamente en linfocitos B-bursales aun no se ha detectado. En mamíferos y pollos, la GHRH a través de GHRH-R promueve la expresión y liberación de la GH (Kiaris et al., 2011; Harvey et al., 2014). Sin embargo, en este estudio, no observó la presencia de GHRH y GHRH-R en las células B-bursales. Además se probó esta hormona en los cultivos de linfocitos B y no modificó los niveles de la GH (ARNm y proteína), CREB o calcio, lo que sugiere que la GHRH y GHRH-R no participan en la regulación de la GH en linfocitos B-bursales. Estos resultados coinciden con estudios previos del grupo del Dr. Wang quien reportó la ausencia de GHRH-R en tejidos inmunes de pollo (Wang et al., 2006, 2010).

En el panel 2, se observan células inmunoreactivas al TRH-R tanto en la hipófisis, la BF y en los linfocitos B. Otros autores también han reportado la expresión de este receptor en la hipófisis del mismo modelo experimental (De Groef et al., 2003; Sun et al., 1998). Sin embargo, en tejidos inmunes de pollo aun no se ha explorado la expresión de TRH-R por lo que éste es el primer informe sobre la expresión de éste receptor en linfocitos B de pollo y corrobora estudios realizados en otras especies como peces, ratas y humanos, donde se observó la expresión de TRH-R en timo, médula ósea, ganglios linfáticos y extractos de bazo (Fukusumi et al., 1995; Kamath et al., 2009; Raiden et al., 1995; Saito et al., 2011). En pollos, este receptor ha sido clonado de la hipófisis y mostró una alta homología con mamíferos (Sun et al., 1998). Además, sus funciones relacionadas a la estimulación de la expresión y liberación de la GH podrían estar conservadas en ambas especies.

En el panel 3, observamos inmunoreactividad positiva para el SSTR₂ en la hipófisis, en la BF y en los linfocitos B. Previos estudios también han mostrado la expresión

de los receptores de SST en hipófisis de ratones (Ramírez et al., 2002), peces (Cardenas et al., 2000), humanos (Kiseljak-Vassiliades et al., 2015) y de manera similar a este estudio, en el bazo pollos (Bossis and Porter, 2001; Meng et al., 2014). Por otro lado, la expresión de estos receptores ha sido reportada en células hipofisiarias de pollo, y en este modelo se ha determinado que la SST inhibe la liberación de la GH a través del SST-R₂ (Bossis and Porter, 2001). Por lo que la expresión de estos receptores en la BF y en los linfocitos B podría sugerir su participación en la inhibición de la expresión y liberación de la GH.

El receptor de grelina también se observó en la hipófisis, en la BF y en los linfocitos B (Fig. 3, panel 4). De manera similar, la expresión de GHS-R1a también se ha observado, además de la hipófisis (Kaiya et al., 2002), en tejidos inmunes de pollo como el timo y el bazo (Tanaka et al., 2003) y la BF (Yu et al., 2018). La expresión de grelina y la localización conjunta de GHS-R1a con la GH en linfocitos B-bursales podrían sugerir la participación de grelina en la regulación de GH. Sin embargo, dado que no observamos el efecto de la grelina sobre la expresión del ARNm de la GH y su proteína; o su efecto sobre la activación de CREB y niveles de calcio, existe la posibilidad de que la grelina pueda participar y promover otros efectos inmunomoduladores (Hattori et al., 2001), en lugar de su participación en la regulación de la GH en los linfocitos B-bursales..

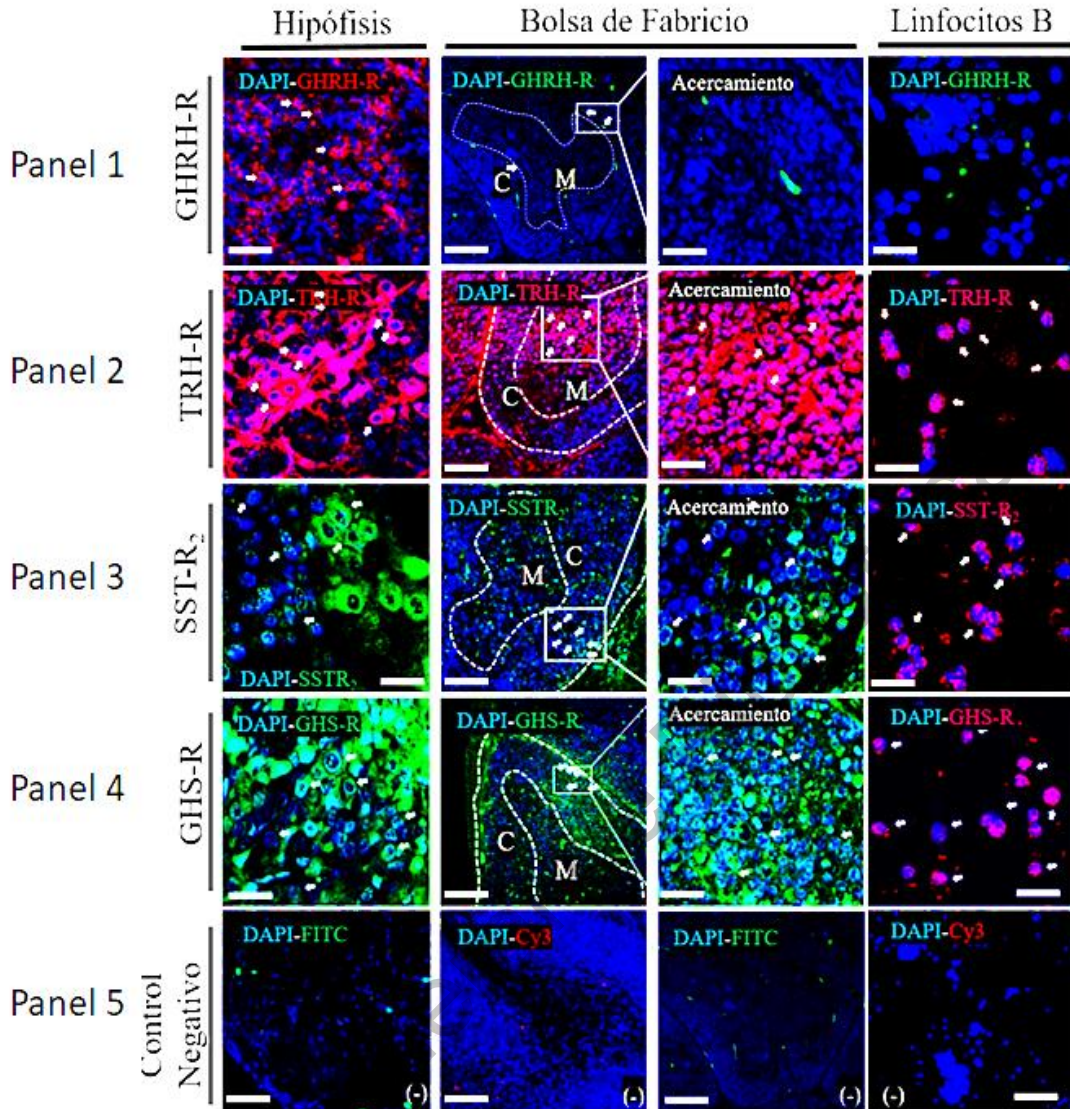


Figura 3. Micrografías representativas de las inmunohistoquímicas para el GHRH-R (Panel 1), TRH-R (Panel 2), SST-R₍₁₋₅₎ (Panel 3) y GHS-R1a (Panel 4); en secciones de hipófisis de pollo y en linfocitos B. En el panel 5 se observan los controles negativos usando solo los anticuerpos secundarios correspondientes. Las flechas indican células inmunoreactivas a alguno de los receptores correspondientes. Corteza ©, medula (M). DAPI en azul, se utilizó para marcar los núcleos celulares.

6.4 Co-localización de la GH con GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR2 en la hipófisis y en los linfocitos B de la BF

Para corroborar la presencia de la GH con los receptores de sus principales reguladores. Se realizó una tinción conjunta para verificar la colocalización de la GH con el GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a y SSTR2, en la hipófisis y en los linfocitos B de la BF, utilizando solo el ab-GH y DAPI en hipófisis de pollo. Como se muestra en la

Fig. 4-A, se observaron células inmunoreactivas a la GH en una zona localizada de la hipófisis, sugiriendo el lóbulo caudal de esta glándula.

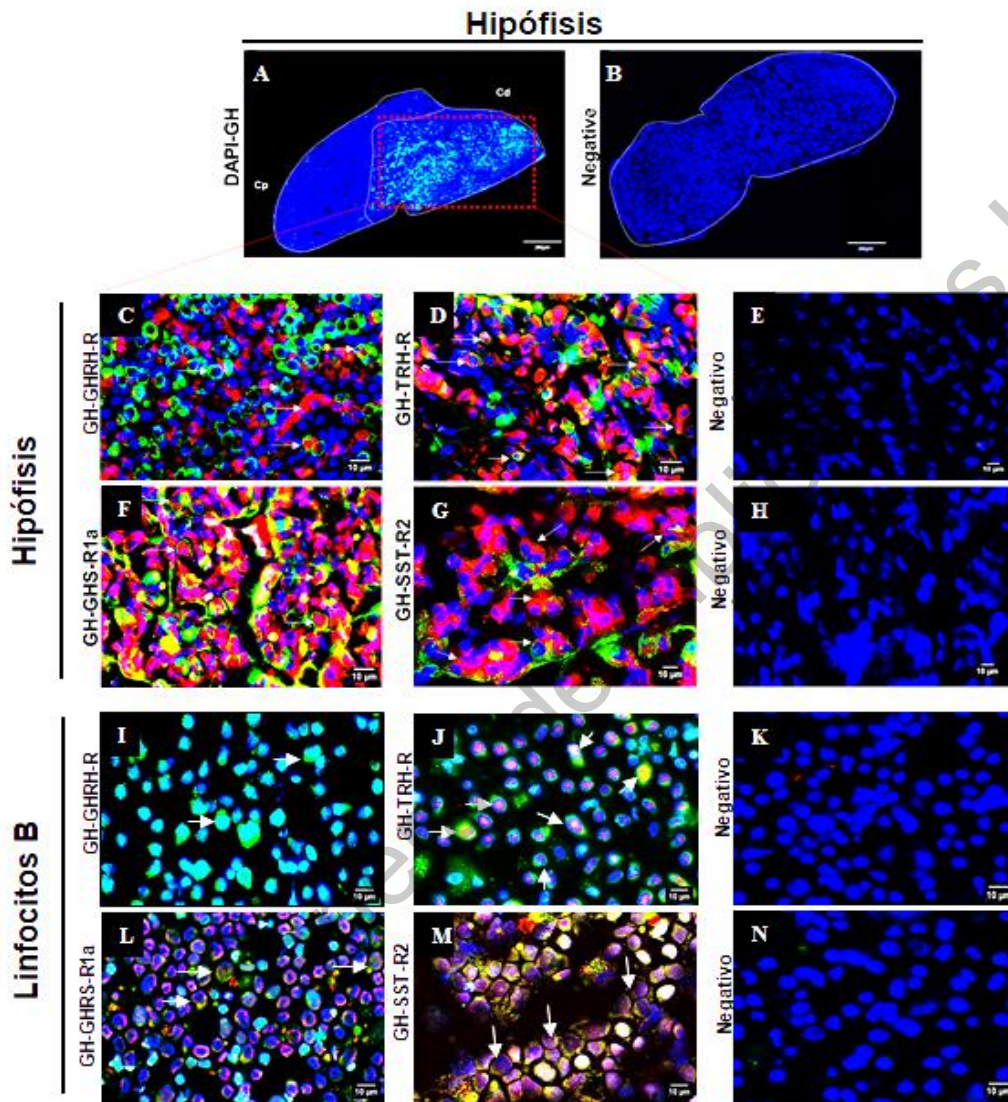


Figura 4. Micrografías correspondientes a inmunohistoquímicas para la GH (A) y su co-localización con el GHRH-R (C, I), TRH-R (D, J), SST-R₍₂₎ (G, M) y GHS-R1a (F, L), en hipófisis y en linfocitos B. Se usaron solo los anticuerpos secundarios correspondientes como controles negativos (B, E, H, K, N). Se usó DAPI para marcar los núcleos celulares (en azul). Las flechas indican células inmunoreactivas a los receptores correspondientes.

Todas las micrografías que se obtuvieron fueron tomadas en las zonas hipofisarias inmunoreactivas a la GH (zona caudal). En la Fig. 4-C, se observan células inmunoreactivas a la GH, al GHRH-R, e incluso la co-localización de ambas señales. Por otro lado, en los linfocitos B solo se observó inmunoreactividad positiva a la GH (Fig. 4-I). En el caso del TRH-R, se observó co-localización de la GH con este receptor, en la hipófisis y en los linfocitos B (Fig. 4-D, J). Finalmente, se observó co-

localización de la GH con el GHS-R1a (Fig. 4-F, L) y el SST-R2 (Fig. 4-G, M), en la hipófisis y en los linfocitos B. La co-localización de la GH con estos receptores sugiere que en estas células podrían participar en varios procesos como la regulación de la GH local.

6.5 Expresión del ARNm de la GH después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST o la combinación de TRH con SST en los linfocitos B de la BF

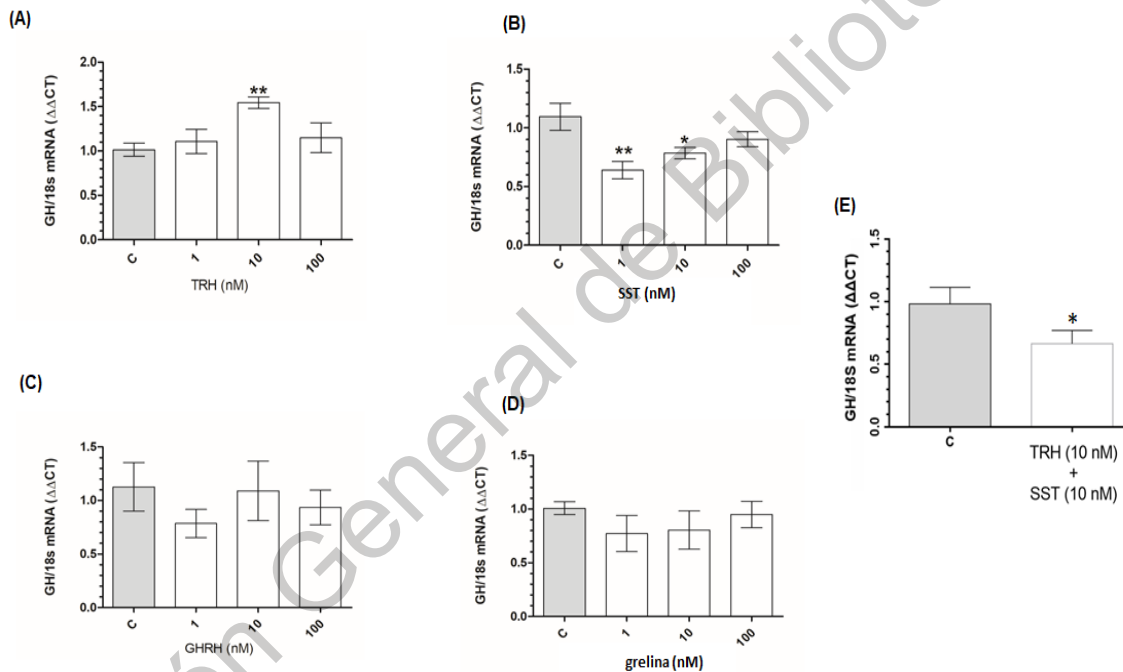
Se evaluó la expresión de la GH después de los tratamientos con la GHRH, la TRH, la grelina, la SST y la combinación de la TRH con la SST. Como se observa en la Fig. 5-A, la TRH a 10 nM, incrementó significativamente ($p < 0.01$) la expresión de la GH (control: 1.013 ± 0.07410 vs 10nM GH: 1.545 ± 0.06581). Similar a nuestros resultados, en hipófisis de pollo de engorda también se ha observado que la TRH incrementó el ARNm de la GH después de 60 min de incubación (Van As et al., 2004). Sin embargo, en células inmunes, el efecto de la TRH sobre la regulación de la GH aun no estaba estudiada, lo que hace importante nuestros resultados debido a que ahora podemos señalar que la presencia del TRH-R y permitir proponer un efecto de TRH sobre la expresión y liberación de la GH en linfocitos B bursales.

Por otro lado, la SST disminuyó significativamente ($p < 0.01$; $p < 0.05$) la expresión de la GH (control: 1.095 ± 0.1157 vs 1 nM SST: 0.6400 ± 0.07375 y 10 nM SST: 0.7850 ± 0.04781) (Fig. 5-B). En el caso del sistema inmune el efecto de la SST sobre la expresión de GH aun no se ha determinado. Sin embargo, a nivel hipofisiario se sabe que la SST inhibe la expresión del ARNm de la GH; por lo que la presencia del SST-R2 y la SST en los linfocitos B de la BF, sugieren un efecto inhibitorio sobre la expresión de la GH. En cuanto la GHRH y la grelina, no modificaron la expresión de la GH (Fig. 5 C-D).

Finalmente, dado que observamos cambios en la expresión de la GH con 10 nM de TRH y SST; evaluamos la expresión de la GH después del estímulo con la combinación de estas hormonas (ambas a 10 nM). Interesantemente, la expresión de la GH disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (control: 0.9821 ± 0.1322 vs TRH + SST: 0.6646 ± 0.1055) (Fig. 5-E). Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se ha observado

que la combinación de la SST con otros factores y hormonas puede inhibir mecanismos intracelulares y la síntesis de proteínas; por ejemplo, la SST inhibe la producción de AMPc inducido por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y GHRH; Además, la SST inhibió el efecto de la forskolina en la producción de AMPc, la activación de PKA, la fosforilación de CREB y la potencia de transcripción (Eigler y Ben-Shlomo., 2014).

Figura 5. El ARNm de la GH fue evaluado por medio de qPCR, después de los tratamientos con TRH (A), SST (B), GHRH (C), grelina (D) y la combinación de TRH con SST (E). Se utilizaron las concentraciones, 1, 10 y 100 nM. Los datos fueron obtenidos por 3 experimentos independientes y medidos por duplicado. Las barras representan la media \pm el error estándar. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$) en comparación con los grupos control; se utilizó una ANOVA de una vía con comparación múltiple y prueba post hoc Tukey. En el caso de la combinación, se usó una prueba T pareada.



6.6 Efecto de GHRH, TRH, grelina, SST o la combinación de TRH con SST en el contenido y liberación de GH en los linfocitos B de la BF

El tratamiento con la TRH no mostró ningún efecto sobre el contenido intracelular de la GH (Figura 6-A). No obstante, el tratamiento con 10 nM de TRH incrementó significativamente ($P < 0.05$) la GH liberada al medio de cultivo (control 15.03 ± 4.405

ng/mL vs 10nM: 45.69 ± 17.23 ng/mL) (Figura 6-B). En células inmunes de pollo, este es el primer reporte de un posible efecto regulador de la TRH sobre la liberación de la GH. Sin embargo, otros estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en peces y en el pollo de engorda, sobre la liberación de GH mostraron que después de 30 min o 3 hr de exposición con la TRH, mostraron una liberación regulada de los niveles de la GH (Hall et al., 1985; Harvey et al., 1978; Harvey and Lea, 1992; Lin et al., 1993; Scanes, 1984).

Por otra parte, el tratamiento con 100 nM de SST incrementó significativamente ($P < 0.05$) el contenido intracelular de la GH (control: 35.21 ± 0.7860 ng/ μ g vs 100 nM SST: 47.76 ± 5.322 ng/ μ g) (Figura 6-C). Sin embargo, la aplicación de SST no mostró cambios significativos en la cantidad de GH liberada al medio de cultivo (Figura 6-D). El incremento de la GH intracelular después del tratamiento con la SST podría deberse a un mecanismo relacionado al aumento del calcio que también fue modificado después del tratamiento con esta hormona. Esto comparado con estudios sobre la producción de IL-2 en linfocitos T (Koga et al, 2012) o IL-1 Ojima et al., 1989) en donde se ha asociado a cambios de calcio y su capacidad de activar a las proteínas calmodulinas (Clapham, 2007), o activar proteínas como las cinasas II y IV. Además, en células GH3, el Ca^{2+} estimuló síntesis de la prolactina y su ARNm (White et al., 1989), por lo que un mecanismo similar podría ocurrir en los linfocitos B de la BF y la producción de GH.

Finalmente, a nivel hipofisiario se sabe que la SST inhibe la liberación de la GH. En el caso del sistema inmune es el primer estudio sobre su efecto en linfocitos B de pollo, pero también nuestros resultados concuerdan con los observados en linfocitos B de humanos en donde la SST y su análogo "SMS 201-995" tampoco modificaron la liberación de la GH *in vitro* (Hattori et al., 1990, 1994).

En el caso del tratamiento con la grelina, esta hormona no mostró cambios significativos en la GH intracelular (Figura 6-E), ni en el medio de cultivo (Figura 6-F). De manera similar, el tratamiento con la GHRH no cambió los niveles de la GH en los linfocitos B (Figura 6-G) ni en el medio de cultivo (Figura 6-H).

Por otra parte, se evaluó el posible efecto inhibitorio de la SST sobre la liberación inducida de la GH al medio de cultivo, por el efecto de la TRH. Para lo cual, se incubaron a los linfocitos B con SST y TRH simultáneamente y se midió la cantidad de la GH intracelular y en el medio de cultivo. Se encontró que el tratamiento combinado con 10 nM de TRH y 100 nM de SST disminuyó significativamente a la GH intracelular con respecto al grupo control ($P < 0.05$; control: $100 \pm 10.43 \%$ vs TRH 10 nM + SST 100 nM: $56.89 \pm 2.554 \%$) (Figura 6-I); y con respecto al grupo tratado con 10 nM de TRH y 10 nM de SST no hubo diferencias significativas ($P < 0.01$; TRH 10 nM + SST 100 nM: $56.89 \pm 2.554 \%$ vs TRH 10 nM + SST 10 nM $114.3 \pm 6.635 \%$). Como se mencionó anteriormente, se sabe que la combinación de la SST con otras hormonas promueve o acentúa el efecto inhibitorio de la misma. Por lo que, en este trabajo, se puede sugerir que la SST inhibe el efecto estimulador de la TRH en los linfocitos B de la BF a concentraciones altas.

Por otra parte, la GH liberada en el medio de cultivo incrementó significativamente ($P < 0.05$) con el tratamiento de 10 nM de TRH y 10 nM de SST con respecto al control (control: $100 \pm 13.46 \%$ vs TRH 10 nM + SST 10 nM: $156.5 \pm 11.66 \%$) (Figura 6 J), replicando el efecto observado con el tratamiento con 10 nM de TRH de manera individual. Sin embargo, observamos que el tratamiento con 10 nM de TRH y 100 nM de SST, inhibió significativamente la liberación de GH al medio de cultivo respecto al grupo control ($P < 0.05$; control: $100 \pm 13.46 \%$ vs TRH 10 nM + SST 100 nM: $39.09 \pm 7.710 \%$) y con respecto al grupo tratado con 10 nM de TRH y 10 nM de SST ($P < 0.001$; TRH 10 nM + SST 10 nM: $156.5 \pm 11.66 \%$ vs TRH 10 nM + SST 100 nM: $39.09 \pm 7.710 \%$). Como se mencionó anteriormente, se sabe que la combinación de la SST con otras hormonas promueve o acentúa el efecto inhibitorio de la misma. Por lo que, en este trabajo, se podría sugerir que la SST inhibe el efecto estimulador de la TRH en los linfocitos B de la BF.

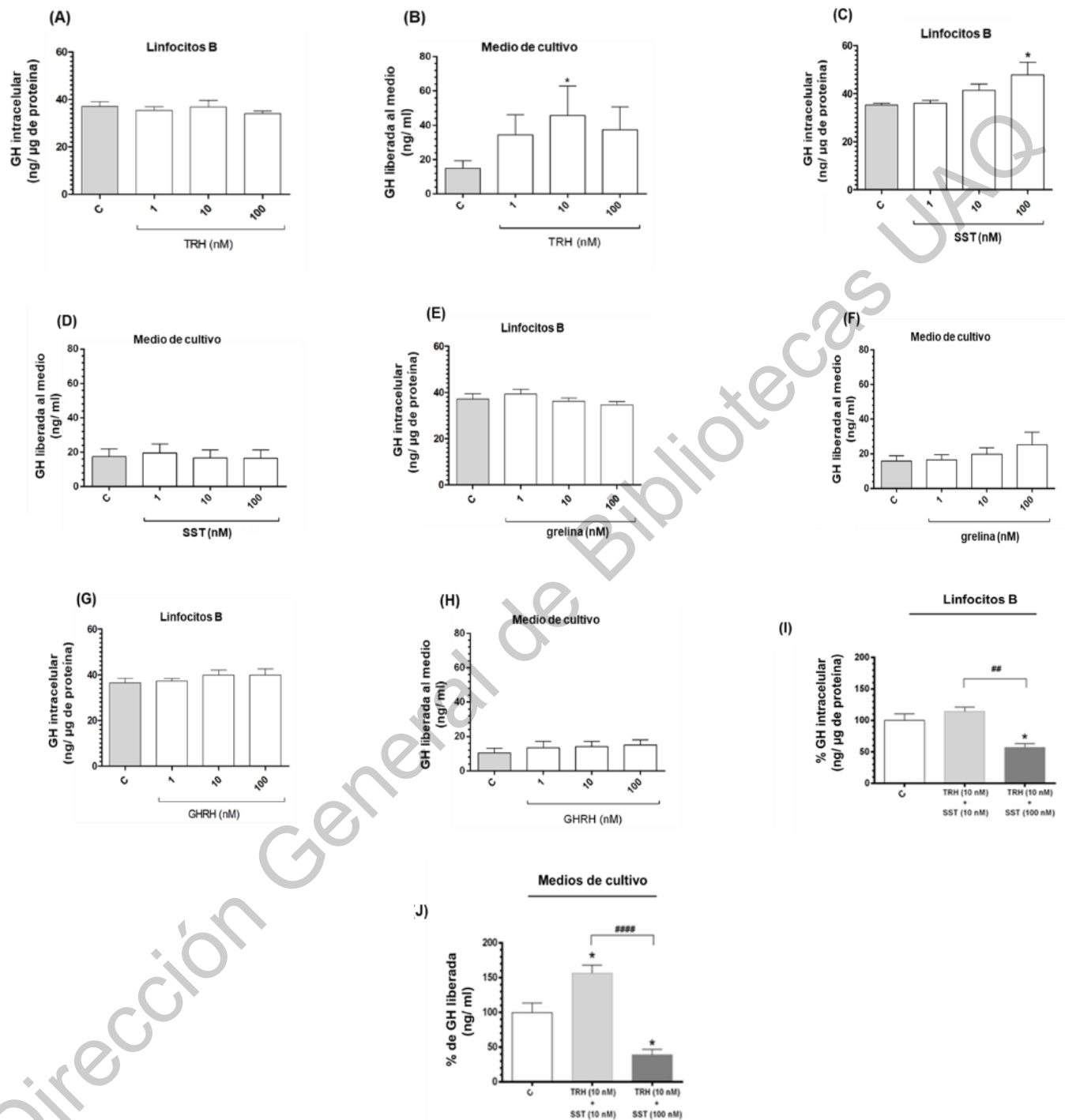


Figura 6. El mensajero de la GH fue evaluado por medio de qPCR, después de los tratamientos con TRH (A), SST (B), GHRH (C), grelina (D) y la combinación de TRH con SST (E). Se utilizaron las concentraciones, 1, 10 y 100 nM. Los datos fueron obtenidos por 3 experimentos independientes y medidos por duplicado. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. Los asteriscos representan diferencias estadísticas en comparación con los grupos control; se utilizó una ANOVA de una vía con comparación múltiple y prueba post hoc Tukey. En el caso de la combinación, se usó una prueba T pareada.

6.7 Efecto de GHRH, TRH, grelina y SST en la liberación de variantes moleculares de la GH de cultivos de linfocitos B.

Por medio de SDS/PAGE y WB, se analizaron las bandas inmunoreactivas a la GH (GH-IR) después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST en los linfocitos B y en el medio de cultivo. En la Fig. 7-A se observa el luminograma representativo de la GH liberada al medio de cultivo, después de los tratamientos con TRH y SST. Debajo de cada luminograma, se muestran los diferentes pesos moleculares aparentes de la GH.

En el caso de la TRH, 100 nM de esta hormona disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la variante GH-IR con un peso aparente de 17 kDa, en comparación con las condiciones control (C: 1 vs 100 nM: $0.61 \pm .060$ veces de cambio) (Fig. 7-B). Así mismo, las concentraciones de 1, 10 y 100 nM de la TRH, disminuyeron significativamente ($p < 0.05$; $p < 0.01$) la bandas inmunoreactivas de 26 kDa y 29 kDa de la GH (C:1 vs 1 nM: 0.49 ± 0.092 ; 10 nM: 0.46 ± 0.13 ; 100 nM: 0.49 ± 0.12 veces de cambio); (C:1 vs 1 nM: 0.53 ± 0.068 ; 10nM: 0.45 ± 0.10 ; 100 nM: 0.63 ± 0.16 veces de cambio) (Fig. 7 C-D). La TRH a 10 y 100 nM, también disminuyeron significativamente la liberación de la banda inmunoreactiva de 32 kDa de la GH (C:1 vs 10 nM: 0.61 ± 0.06 ; 100 nM: 0.62 ± 0.09 veces de cambio) (Figura 7-E). Además, la TRH no mostró cambios significativos en las otras bandas inmunoreactivas a la GH (Fig. 7-F-G-H); finalmente, la SST tampoco modificó los niveles de alguna de las bandas inmunoreactivas a las GH (Fig. 7 I-J-K-L-M-N-O).

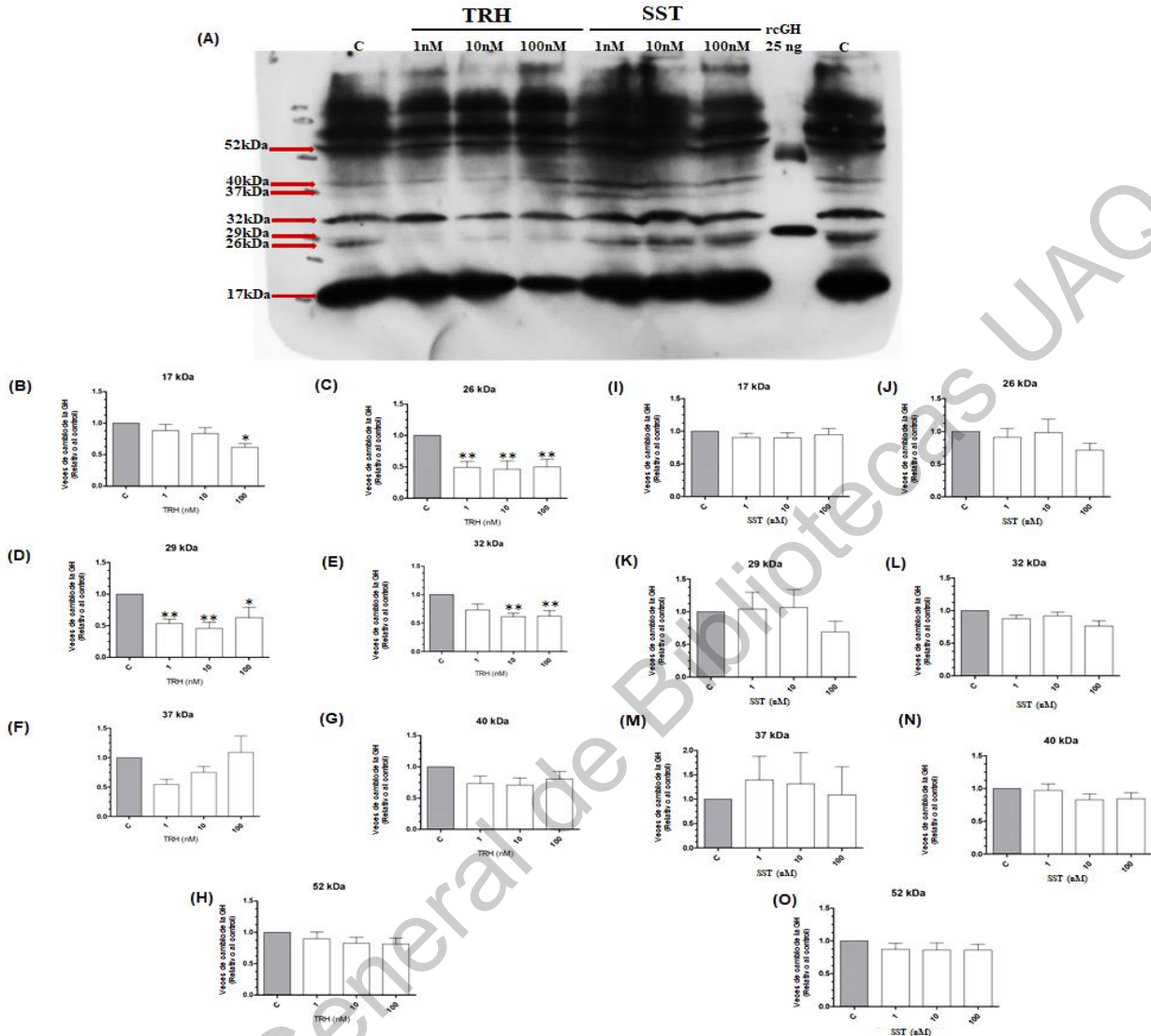


Figura 7. En la parte de arriba (A), se muestra un luminograma representativo de la GH liberada al medio de cultivo después del estímulo con la TRH y la SST (1, 10 y 100 nM). Como control positivo se utilizaron 25 ng de GH recombinante de pollo (rcGH: 25ng). En la parte de abajo se muestran las densitometrías de las bandas inmunoreactivas a la GH; después del estímulo con la TRH (B, C, D, E, F, G, H) y la SST (I, J, K, L, M, N, O). Los datos para las densitometrías fueron tomados de 6 experimentos individuales de la TRH y 6 experimentos individuales para la SST. Los datos fueron normalizados a 1 tomando como referencia el valor control. Las barras representan la media \pm el error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía con comparación múltiple de medias y Dunnet como *post hoc*.

Como se muestra en la Fig. 8, ninguna de las bandas inmunoreactivas a la GH intracelular se modificaron después de los tratamientos con la TRH y la SST. Por otro lado, los tratamientos con GHRH y grelina tampoco modificaron las bandas inmunoreactivas de la GH liberada al medio de cultivo, así como el contenido intracelular.

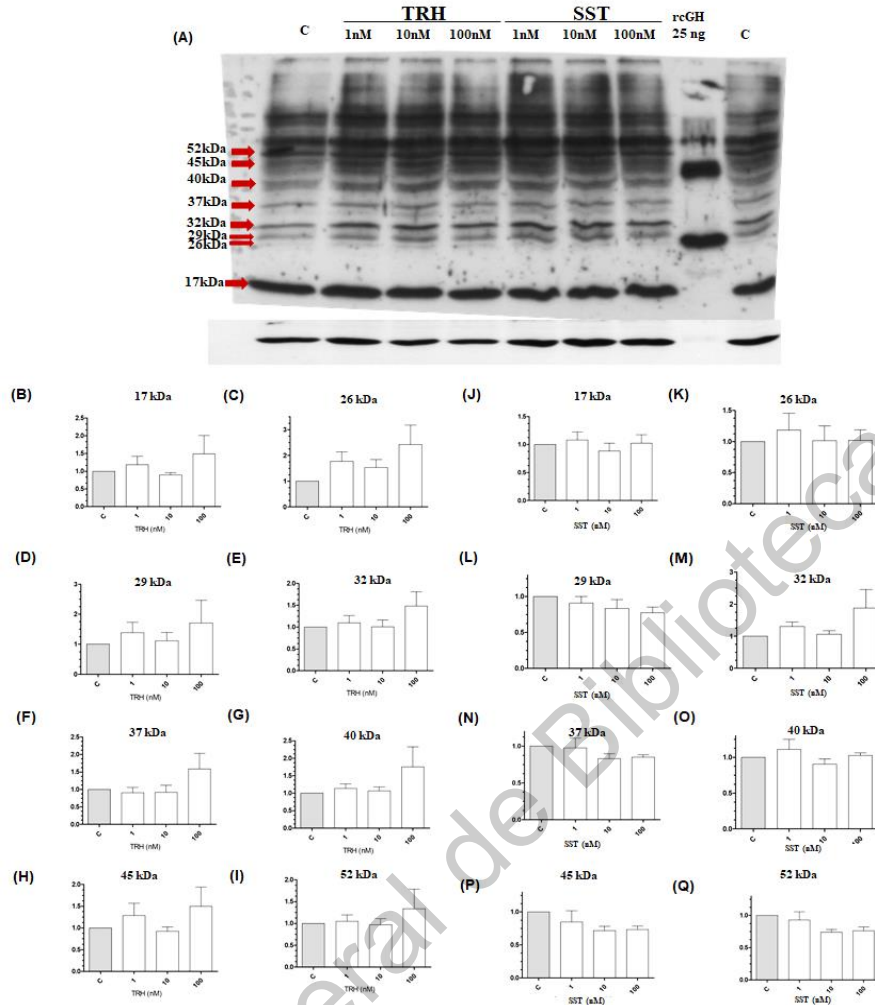


Figura 8. En la parte de arriba (A), se muestra un luminograma representativo de la GH intracelular después del estímulo con la TRH y la SST (1, 10 y 100 nM). Como control positivo se utilizaron 25 ng de GH recombinante de pollo (rcGH: 25ng). Se utilizó β actina como control de carga. En la parte de abajo se muestran las densitometrías de las bandas inmunoreactivas a la GH; después del estímulo con la TRH (B, C, D, E, F, G, H, I) y la SST (J, K, L, M, N, O, P, Q). Los datos para las densitometrías fueron tomados de 6 experimentos individuales de la TRH y 6 experimentos individuales para la SST. Los datos fueron normalizados a 1 tomando como referencia el valor control. Las barras representan la media \pm el error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía con comparación múltiple de medias y Dunnet como *pos hoc*.

Nuestros resultados de WB mostraron una disminución de la GH al medio de cultivo. Este efecto aparentemente inhibitorio de la TRH sobre la GH no se ha reportado en células inmunes y los mecanismos intracelulares no se conocen; pero son similares con los resultados de Maeda (1976), que observó que después de una infusión de 150 min de TRH en humanos, los niveles plasmáticos de la GH disminuyeron aproximadamente un 80%. En otro estudio realizado en caballos también la TRH inhibió los niveles plasmáticos de la GH inducida por el ejercicio (Pruett et al., 2003);

es posible que la TRH tenga efectos diferenciales sobre la liberación de la GH en este tipo celular.

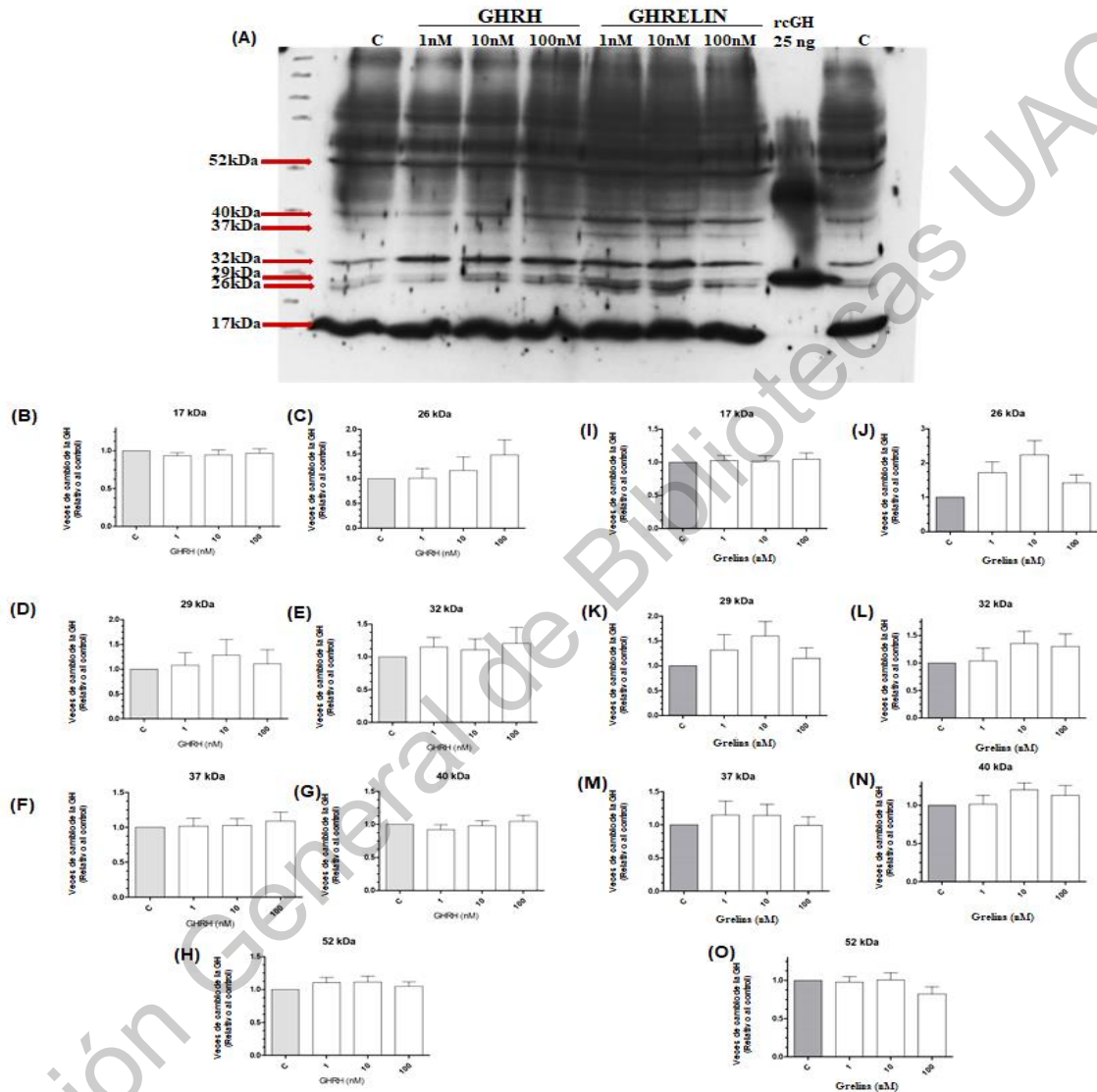


Figura 9. En la parte de arriba (A), se muestra un luminograma representativo de la GH liberada al medio de cultivo después del estímulo con la GHRH y la grelina (1, 10 y 100 nM). Como control positivo se utilizaron 25 ng de GH recombinante de pollo (rcGH: 25ng). En la parte de abajo se muestran las densitometrías de las bandas inmunoreactivas a la GH; después del estímulo con la GHRH (B, C, D, E, F, G, H) y grelina (I, J, K, L, M, N, O). Los datos para las densitometrías fueron tomados de 6 experimentos individuales para la GHRH y 6 experimentos individuales para la grelina. Los datos fueron normalizados a 1 tomando como referencia el valor control. Las barras representan la media \pm el error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía con comparación múltiple de medias y Dunnet como *pos hoc*.

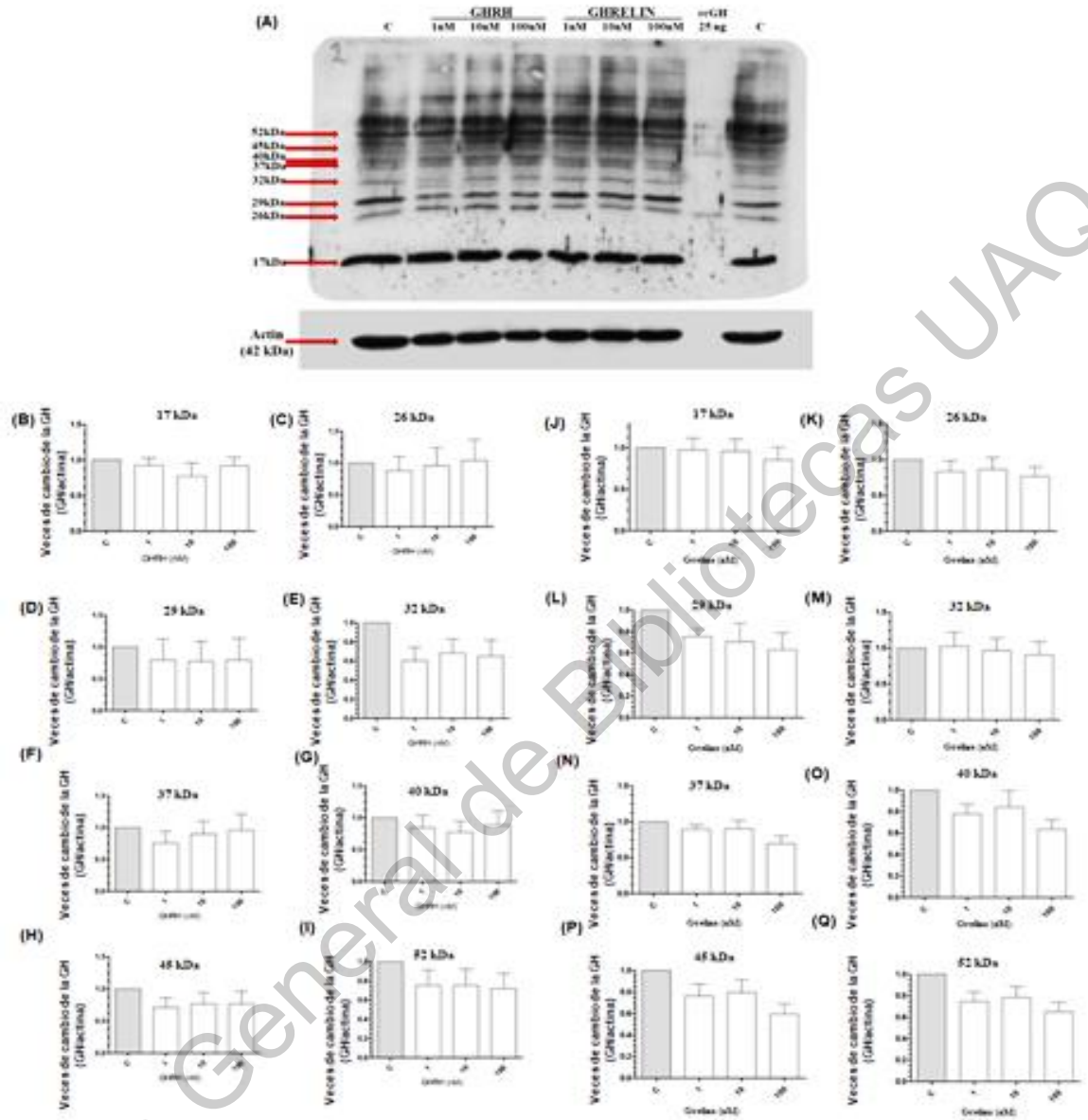


Figura 10. En la parte de arriba (A), se muestra un luminograma representativo de la GH intracelular después del estímulo con la GHRH y la grelina (1, 10 y 100 nM). Como control positivo se utilizaron 25 ng de GH recombinante de pollo (rcGH: 25ng). Se utilizó β actina como control de carga. En la parte de abajo se muestran las densitometrías de las bandas inmunoreactivas a la GH; después del estímulo con la GHRH (B, C, D, E, F, G, H, I) y la grelina (J, K, L, M, N, O, P, Q). Los datos para las densitometrías fueron tomados de 6 experimentos individuales de la TRH y 6 experimentos individuales para la SST. Los datos fueron normalizados a 1 tomando como referencia el valor control. Las barras representan la media \pm el error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía con comparación múltiple de medias y Dunnet como *pos hoc*.

6.8 Evaluación del contenido de calcio intracelular después del estímulo con TRH y SST en los linfocitos B de la BF

Los efectos de la TRH, la SST, o su combinación, sobre los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} en cultivos de linfocitos B de la BF fueron evaluados después de 0, 5, 10 y 60 minutos de incubación. El tratamiento con 10 nM TRH disminuyó significativamente el contenido intracelular de Ca^{2+} después de 10 minutos de incubación (una reducción de $-32.45 \pm 6.74 \Delta\%$, $P < 0.0004$) en comparación con el control no tratado, mientras que después de 60 minutos de incubación, el contenido intracelular de Ca^{2+} mostró una tendencia a aumentar (hasta $35.96 \pm 38.12 \Delta\%$) pero no fue significativamente diferente con respecto a los tiempos anteriores (Fig. 11 A). Asimismo, el tratamiento con SST (100 nM) disminuyó significativamente el contenido intracelular de Ca^{2+} después de 10 minutos de incubación (una reducción de $-52.37 \pm 7.32 \Delta\%$, $P < 0.0001$) en comparación con 0 min (grupo control) (Fig. 11 B); mientras que después de 60 minutos de incubación con SST (100 nM) el contenido intracelular de Ca^{2+} aumentó significativamente (hasta $55.3 \pm 21.48 \Delta\%$), en relación con los niveles observados después de 5 min ($-13.65 \pm 6.84 \Delta\%$, $P < 0.029$) o 10 min ($-52.37 \pm 7.32 \Delta\%$, $P < 0.003$) de tratamiento pero no en comparación con el grupo control (Fig. 11 B). Por otro lado, la combinación de TRH (10 nM) + SST (10 nM) significativamente disminuyó el contenido intracelular de Ca^{2+} en los linfocitos B de la BF solo después de 10 minutos de incubación (una reducción de $-26.32 \pm 3.44 \Delta\%$, $p < 0.006$) en comparación con control (0 min) (Fig. 11 C). Finalmente, el tratamiento con TRH (10 nM) + SST (100 nM) significativamente disminuyó el contenido intracelular de Ca^{2+} en los linfocitos después de 60 min de incubación (una reducción de $-39.51 \pm 6.03 \Delta\%$, $p < 0.0001$) en comparación con el control (0 min) (Fig. 11 D).

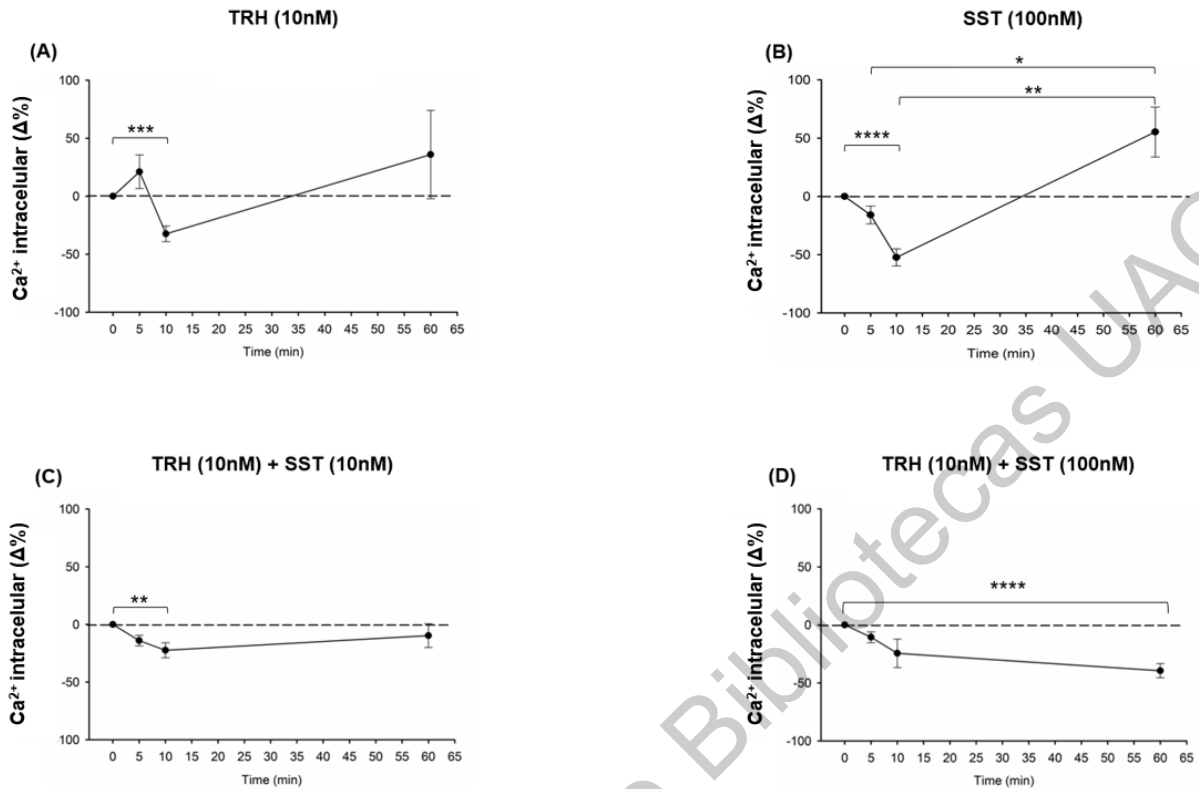


Figura 11. Intracelular de calcio se midió en células B-bursales durante 5, 10 y 60 min. Utilizamos TRH a 10 nM (A), SST a 100 nM (B), o la combinación de estas hormonas [TRH 10 nM + SST 10 nM (C) y TRH 10 nM + SST 100 nM (D)]. Solo se usó RPMI 1640 sin GH como control negativo (0 min). Los datos se obtuvieron de 4 experimentos independientes para los casos de TRH + SST; Por otro lado, se utilizaron 3 experimentos independientes en la combinación de TRH + SST. Cada punto representa la media \pm SEM. Las unidades se expresan como porcentaje (%). Los asteriscos indican diferencias entre los grupos experimentales (* $p < 0.5$; ** $p < 0.1$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

En la hipófisis, la TRH y la SST son capaces de movilizar los niveles intracelulares de Ca^{2+} para promover o inhibir la exocitosis de las vesículas que contienen hormonas (Eigler y Ben-Shlomo, 2014; Joseph-Bravo et al., 2015). Por lo tanto, en este trabajo, exploramos si la TRH y la SST también modificaban los niveles de Ca^{2+} en los linfocitos B de la BF y si estos cambios, podrían estar relacionados con la liberación de la GH en este tipo celular; ya que, hasta ahora, no hay informes sobre el efecto de estas hormonas sobre los niveles de Ca^{2+} en células inmunes y mucho menos en nuestro modelo.

En las células hipofisiarias, la TRH se une a su receptor acoplado a la proteína Gq y activa la enzima PLC, que a su vez hidroliza el bifosfato de fosfatidilinositol (4,5) para producir segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol (1, 4, 5)

trifosfato (IP3). IP3 luego moviliza y aumenta el Ca^{2+} intracelular del retículo endoplásmico, lo que lleva a la liberación de hormonas (Hinkle., 2012). Por otro lado, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de las hormonas de la hipófisis anterior por la SST se producen por hiperpolarización de la membrana a través de la apertura de los canales de K^+ , lo que lleva a la disminución del Ca^{2+} (Eigler y Ben-Shlomo, 2014).

En este estudio, los niveles intracelulares del Ca^{2+} disminuyeron después de 10 minutos del tratamiento con la TRH (10 nM), aunque en las células hipofisarias, se ha demostrado que el Ca^{2+} intracelular aumenta significativamente durante ~ 300 s (5 minutos) de estimulación con la TRH (1-100 nM) (Ritchie, 1987; Carew y Manson, 1995; Lorsignol et al., 1997). Interesantemente, observamos una tendencia al aumento después de 5 minutos de estimulación con la TRH, pero no fue significativa. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte en el que la evaluación del Ca^{2+} intracelular se extendió después de 1 hora en células inmunes. Esta disminución que observamos en los niveles de Ca^{2+} podría explicarse por la salida de este ion hacia el exterior de la célula, ya que se ha reportado que la TRH (1 μM) puede promover la salida del Ca^{2+} en la línea celular GH3 de rata después de aproximadamente 20 minutos de incubación (Nelson y Hinkle, 1994; Rebecchi et al. 1982). Además, las bombas membranales del Ca^{2+} bombean continuamente este ion hacia el exterior en células cancerígenas (Kania et al., 2015), y el TRH-R está relacionado con la activación de estas bombas Ca^{2+} en células de mamíferos (Berridge et al., 2003). Similar al efecto de la TRH, la SST (100 nM) disminuyó (50%) los niveles intracelulares de Ca^{2+} después de 10 minutos de incubación. Este efecto inhibitor de la SST (10 M o 10 nM) se ha señalado previamente *in vitro* en células hipofisarias de porcino, peces y rata, donde los niveles intracelulares de Ca^{2+} disminuyeron (~ 40-60%) en 150 - 1500 s (Cervia., et al., 2002; Yu., et al., 2010; Ramírez et al., 2002). Además, observamos que los niveles de Ca^{2+} aumentaron (50%) después de 60 minutos de incubación, relacionándose con el aumento que observamos en la GH intracelular en las mismas condiciones. Este efecto estimulante se ha reportado en la línea celular de linfoblastos B humanos en la que los niveles intracelulares de Ca^{2+} aumentaron (~ 50%) con 100 nM de SST, es

importante mencionar que este efecto se observó durante 20 s de incubación (Roskopf et al., 2003). En otros modelos *in vitro*, como en neuronas hipocampales de ratas y de la línea celular CHO-KO1, la estimulación con SST (10^{-4} - 10^{-9} M) también aumentó (~ 200%) los niveles intracelulares de Ca^{2+} durante 30 segundos o después de 6 minutos de incubación (Nunn et al., 2004).

Cabe señalar que la aplicación conjunta de la TRH (10 nM) con SST (10 nM) disminuyó (26%) los niveles de Ca^{2+} intracelular después de 10 minutos de incubación y este efecto se acentuó (39%) con una mayor concentración de la SST (100 nM); esta misma combinación también disminuyó tanto la GH intracelular como la liberada. Similar a nuestros hallazgos, en cultivos de células hipofisarias de rata, la combinación de la TRH (10 nM) con la SST (1 nM) disminuyó (~ 60%) el efecto estimulante de TRH sobre los niveles de Ca^{2+} después de 15 minutos de incubación (Roussel et al., 1997). Este efecto inhibitorio sobre los niveles de Ca^{2+} también se ha reportado después de la aplicación conjunta de la GHRH (10 nM) y la SST (1 nM) (Holl et al., 1988). Nuestros resultados sugieren que la TRH y la SST tienen efectos sobre los niveles de GH y podrían estar relacionados con cambios en los niveles del Ca^{2+} en los linfocitos B de la BF. Sin embargo, se necesita más investigación para conocer cuáles son los mecanismos intracelulares específicos involucrados en la señalización del Ca^{2+} en las células inmunes.

6.9 Evaluación de la fosforilación del factor CREB en la serina 133 después del estímulo con GHRH, TRH, grelina y SST en los linfocitos B de la BF.

Para evaluar si la expresión de la GH está relacionada a la fosforilación de CREB en los linfocitos B; se determinó la fosforilación de este factor en la serina 133, después del estímulo con la TRH, grelina, GHRH, SST, y la combinación de esta última con la TRH. Como se observa en la Fig. 12-B, la TRH incrementó significativamente ($p < .05$) la fosforilación de CREB después de 60 min de incubación (C: 100 ± 16.47 vs 10: 201.1 ± 54.26 %). Sin embargo, cuando se incubó solo 30 min no se modificaron los niveles de este factor (Fig. 12-A).

En contraste, después de 60 min de incubación con la grelina, la fosforilación de CREB disminuyó significativamente ($p < .05$) (C: 100 ± 12.08 vs 10: 57.77 ± 7.16

). No así después de 30 min de incubación con esta hormona (Fig. 12-D). En cuanto a los tratamientos con la GHRH, SST o la combinación de esta última con la TRH; no mostró cambios significativos en la fosforilación de CREB (Fig. E, F, G, H, I).

En las células inmunes, la relación entre la expresión de GH y la activación de CREB sigue poder ser definida. Sin embargo, en este trabajo podemos señalar que la TRH aumentó la fosforilación de pCREB^{s-133}, así como la expresión del ARNm de la GH. Por el contrario, SST disminuyó la expresión del ARNm de la GH y no se observaron cambios en pCREB^{s-133}. Estos resultados sugieren que la expresión del ARNm de la GH en linfocitos B-bursales podría estar mediada por la activación de pCREB^{s-133} debido al estímulo de la TRH. Sin embargo, dado que la SST disminuyó la expresión del ARNm de la GH sin mostrar cambios en pCREB^{s-133}, es posible que otros factores de transcripción estén implicados en estos procesos.

Además, como se mencionó anteriormente, la SST inhibe la producción de AMPc inducido por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y GHR y la activación de PKA, la fosforilación de CREB y la potencia de transcripción (Eigler y Ben-Shlomo., 2014). Del mismo modo, en este trabajo, observamos que la combinación de la TRH con la SST mantuvo los niveles de pCREB^{s-133} similares a las condiciones de control. Nuestros resultados sugieren que la SST podría estar inhibiendo el efecto de la TRH sobre la activación de pCREB^{s-133}.

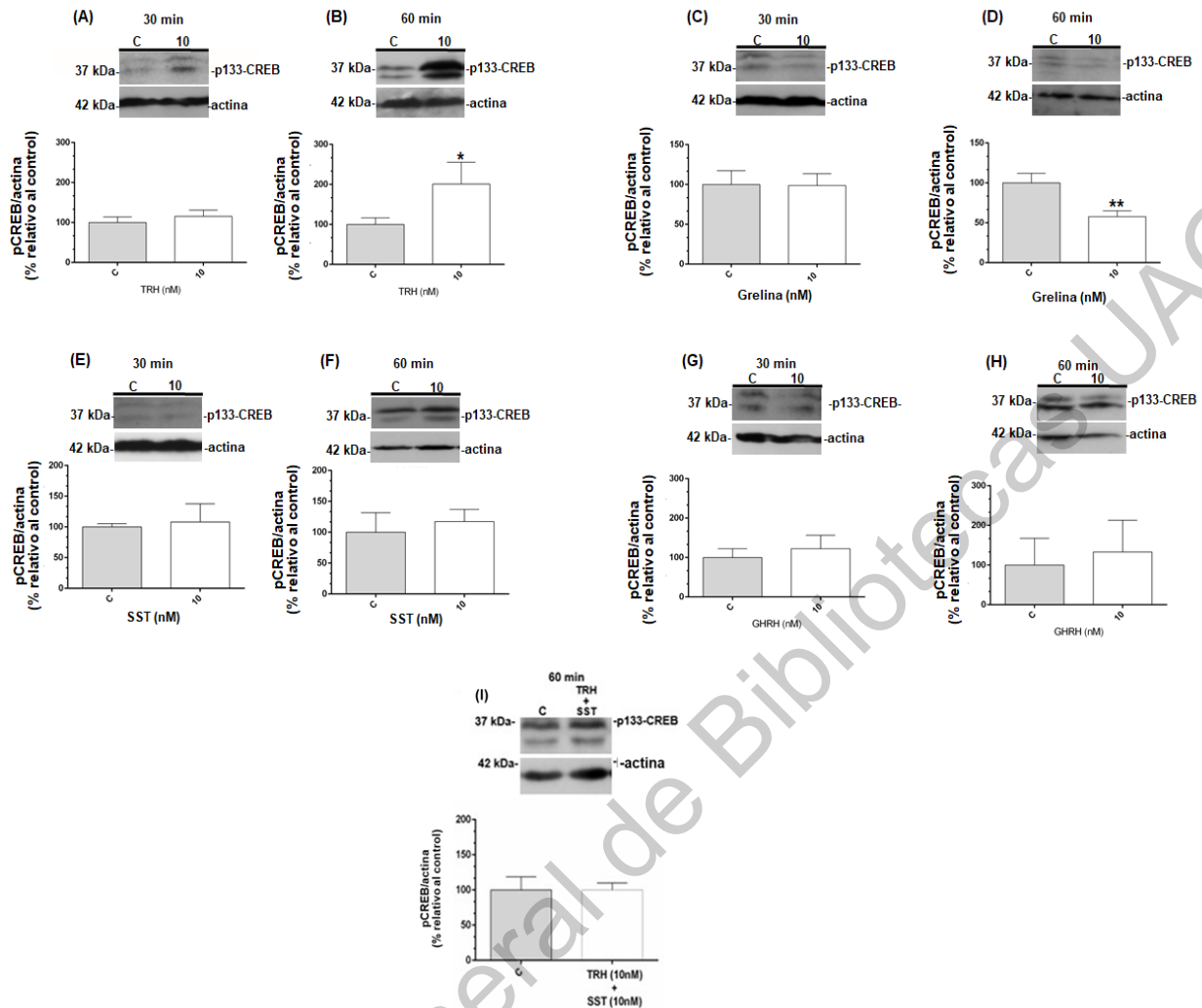


Figura 12. En la parte de arriba (A, B, C, D, E, F, G, H, I), se muestran los luminogramas representativos de p-133-CREB evaluado después de 30 o 60 min. Se utilizó 10 nM de cada hormona. Se utilizó β actina como control de carga. En la parte de abajo (A, B, C, D, E, F, G, H, I), se muestran las densitometrías de las bandas inmunoreactivas a p-133-CREB. Los datos para las densitometrías fueron tomados de 3 experimentos individuales para cada hormona. Los datos fueron normalizados en valor de porcentaje tomando como referencia el valor de los controles. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a los grupos control ($p < .05$; *; $p < .01$: **). Las barras representan la media \pm el error estándar. Se realizaron pruebas t pareadas para cada condición.

6.10 Expresión de BAFF después del estímulo con TRH y SST

Las incubaciones de TRH (10 Nm) y SST (1 y 10 Nm) durante 1 h se realizaron para determinar los cambios en la expresión de la expresión del ARNm de BAFF. TRH incrementó significativamente ($P < 0.05$) de los niveles de expresión del ARNm de

BAFF (1.43 veces) (Fig. 9A). No se observaron cambios después de incubaciones con tratamientos SST (1 y 10 nM) (Fig. 9B). El incremento de BAFF que observamos después de la exposición con la TRH, sugiere que esta hormona podría estar implicada en regular la expresión de otras moléculas que puedan estar involucradas con la respuesta inmune como se ha mostrado en otros estudios realizados tanto *in vivo* e *in vitro* como es la producción de citocinas como la IL-1, IL-6, IL-10, el TNF α o el INF α o γ (Kamath et al., 2009). Además, se ha reportado que el tratamiento con el BAFF en pollos infectados con la IBDV, mejoraron su respuesta inmune humoral (Chen et al., 2009). Finalmente, el incremento de BAFF en linfocitos B, se ha asociado con la regulación de la selección negativa en este tipo celular (Mackay and Browning, 2002). Dado que en la bolsa de Fabricio se llevan a cabo procesos de selección, maduración y activación de los linfocitos B; la TRH, además de promover la expresión de la GH, podría participar indirectamente en alguno de estos procesos inmunomoduladores, a través de la estimulación de otras citocinas como BAFF.

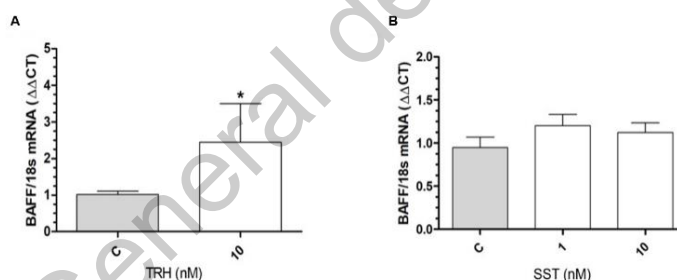


Fig. 13. Expresión relativa del ARNm de BAFF en linfocitos B después de una hora de tratamiento con TRH (10 nM) (A) y SST (1 y 10 nM) (B). Cada barra representa medias \pm EEM. La expresión relativa de ARNm se corrigió mediante el ciclo de umbral (CT) y utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT. Se usó ARN ribosómico 18S como gen de referencia. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes analizados por duplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con los grupos de control (*: $P < 0.05$) según lo determinado por la prueba t no apareada.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados mostraron que la GHRH y el GHRH-R no se expresan en linfocitos B-bursales. La presencia de las otras hormonas hipotalámicas (TRH, SST, grelina) y sus receptores en los linfocitos B-bursales podría sugerir su participación en la regulación de otras hormonas o factores

inmunes. Además, este podría ser el primer informe en el que se muestra la presencia de estas hormonas hipotalámicas en los linfocitos B-bursales de pollo. Curiosamente, en estas células, parece que la TRH y la SST podrían estar actuando como reguladores de la expresión y la liberación de la GH (in vitro); esto debido a que observamos cambios en la expresión y liberación de la GH, la activación de CREB, así como la modificación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} después de la exposición con estas hormonas. Además, el incremento de BAFF sugiere que la TRH puede participar en procesos inmunomoduladores. Sin embargo, los mecanismos intracelulares siguen sin estar claros.

Una de las principales limitaciones de este trabajo podría ser el tiempo vida de los linfocitos B-bursales en cultivo; ya que después de 60 min (solo con medio RPMI 1640), la viabilidad disminuye significativamente. En ese sentido, una perspectiva a futuro podría ser la implementación un protocolo para extender la viabilidad de estas células por más tiempo; esto permitiría explorar otros mecanismos celulares incluso una posible respuesta inmune después de la exposición con algún antígeno. Es importante mencionar que la BF es indispensable para la respuesta inmune en aves. Por tal motivo, conocer los mecanismos celulares en los linfocitos B de la BF podrían aportar información para abordar enfermedades como la “Enfermedad infecciosa bursal”, que impacta sobre la productividad en las granjas avícolas. Por último, conocer los mecanismos de regulación de la GH en estas células, podrían aportar conocimiento en el área de la neuroinmuendocrinología.

8. REFERENCIAS

- Albarran-Zeckler, R.G., Brantley, A.F., Smith, R.G., 2013. Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) knockout mice exhibit improved spatial memory and deficits in contextual memory. *Endocr. Dev.* 232, 5–15. <https://doi.org/10.1159/000346042>
- Anderson, L.L., Scanes, C.G., 2015. Minireview Nanobiology and physiology of growth hormone secretion. *Experimental Biology and Medicine.* 237 (2). 126–142.
- Arámburo, C., Alba-betancourt, C., Luna, M., Harvey, S., 2014. Expression and function of growth hormone in the nervous system : A brief review. *General and Comparative Endocrinology.* 203. 35–42.
- Baudet, M.-L., Harvey, S., 2003. Ghrelin-induced GH secretion in domestic fowl in vivo and in vitro. *J. Endocrinol.* 179, 97–105.
- Ben-Shlomo, A., Melmed, S., 2010. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 123–33. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.003>
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Blalock, D. A. W. and J. E., 2005. Neuroimmunoendocrinology. *Princ. Immunopharmacol.* 149–159. https://doi.org/10.1007/3-7643-7408-x_10
- Bossis, I., Porter, T.E., 2001. Identification of the somatostatin receptor subtypes involved in regulation of growth hormone secretion in chickens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 182, 203–13.
- Cardenas, R., Lin, X., Chavez, M., Aramburo, C., Peter, R.E., 2000. Characterization and Distribution of Somatostatin Binding Sites in Goldfish Brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 117–128. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7396>
- Cazaban, C., Masferrer, N.M., Pascual, R.D., Espadamala, M.N., Costa, T., Gardin, Y., 2015. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. *Poult Sci.* 94 (4). 2088–2093.
- Cervia, D., Petrucci, C., Bluet-Pajot, M.T., Epelbaum, J., Bagnoli, P., 2001. Inhibitory control of growth hormone secretion by somatostatin in rat pituitary GC cells: sst2 but not sst1 receptors are coupled to inhibition of single-cell intracellular free calcium concentrations. *Neuroendocrinology* 76, 99–110. <https://doi.org/10.1159/000064424>
- Chan, K.W., Yu, K.L., Rivier, J., Chow, B.K.C., 1998. Identification and characterization of a receptor from goldfish specific for a teleost growth

hormone-releasing hormone-like peptide. *Neuroendocrinology* 68, 44–56.
<https://doi.org/10.1159/000054349>

Chen, L., Ran, M. J., Shan, X. X., Cao, M., Cao, P., Yang, X. M., & Zhang, S. Q. 2009. BAFF enhances B-cell-mediated immune response and vaccine-protection against a very virulent IBDV in chickens. *Vaccine*, 27(9), 1393–1399. doi:10.1016/j.vaccine.2008.12.040

Clapham, D. E. 2007. Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028

Carew MA., Mason WT. 1995. Control of Ca²⁺ entry into rat lactotrophs by thyrotrophin-releasing hormone. *Journal of Physiology*. 486 (2): 349-360.

Darling, J.E., Zhao, F., Loftus, R.J., Patton, L.M., Gibbs, R. a., Hougland, J.L., 2015. Structure–Activity Analysis of Human Ghrelin O -Acyltransferase Reveals Chemical Determinants of Ghrelin Selectivity and Acyl Group Recognition. *Biochemistry* 54, 1100–1110. <https://doi.org/10.1021/bi5010359>

De Groef, B., Geris, K.L., Manzano, J., Bernal, J., Millar, R.P., Abou-Samra, A.B., Porter, T.E., Iwasawa, A., Kühn, E.R., Darras, V.M., 2003. Involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor, somatostatin receptor subtype 2 and corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in the control of chicken thyrotropin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 203, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00120-5)

Deflorian, F., Engel, S., Colson, A., Raaka, B.M., Gershengorn, M.C., Costanzi, S., 2007. Understanding the structural and functional differences between mouse thyrotropin-releasing hormone receptors 1 and 2. *Proteins*. 71 (2). 783–794. <https://doi.org/10.1002/prot.21763>

Dulwich, K.L., Asfor, A.S., Gray, A.G., Nair, V., Broadbent, A.J., 2018. An Ex Vivo Chicken Primary Bursal-cell Culture Model to Study Infectious Bursal Disease Virus Pathogenesis. *J. Vis. Exp.* 3–8. <https://doi.org/10.3791/58489>

Eigler, T., Ben-Shlomo, a., 2014. Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J. Mol. Endocrinol.* 53, R1–R19. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0034>

Fu, Y.K., Arkins, S., Fuh, G., Cunningham, B.C., Wells, J. a, Fong, S., Cronin, M.J., Dantzer, R., Kelley, K.W., 1992. Growth hormone augments superoxide anion secretion of human neutrophils by binding to the prolactin receptor. *J. Clin. Invest.* 89, 451–7. <https://doi.org/10.1172/JCI115605>

Fukusumi, S., Ogi, K., Onda, H., Hinuma, S., 1995. Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat peripheral tissues. *Regul. Pept.* 57, 115–121. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00026-8](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00026-8)

Guarcello, V., Weigent, D.A., Blalock, J.E., 1991. Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell. Immunol.* 136, 291–302. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90353-D](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90353-D)

- Hall, T.R., Lam, S.K., Harvey, S., 1985. Calcium control of growth hormone release from chicken pituitary glands in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 70–74. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(85\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90294-1)
- Harvey S., Scanes CG., Chadwick A., B.N., 1978. The effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and Somatostatin (GHRH) on Growth Hormone and Prolactin Secretion in vitro and in vivo in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Neuroendocrinology* 26, 249-260. <https://doi.org/10.1159/000122831>
- Harvey, S., Aramburo, C., 2017. Growth Hormone : Not Just a Pituitary Endocrine. *J. Endocr. Disord.* 4, 2–4.
- Harvey, S., Gineste, C., Gaylinn, B.D., 2014. Growth hormone (GH)-releasing activity of chicken GH-releasing hormone (GHRH) in chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.007>
- Harvey, S., Lea, R.W., 1992. Thyrotrophin-releasing hormone-induced growth hormone secretion in domestic fowl: Concomitant stimulation of dopamine turnover in the medial basal hypothalamus. *J. Endocrinol.* 138, 225–232. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1380225>
- Harvey, S.C.G.S.W.H.D., 1995. GROWTH HORMONE, 1st ed. florida.
- Hattori, N.; Ikekubo, K.; Ishihara, T.; Moridera, K.; Hino, M.; Kurahachi, H. 1994. Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-releasing hormone and somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1678–1680. Doi: 10.1210/jcem.79.6.7989474
- Hattori, N.; Shimatsu, A.; Sugita, M.; Kumagai, S.; Imura, H. 1990. Immunoreactive growth hormone (GH) secretion by human lymphocytes: Augmented release by exogenous GH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 396–401. Doi:10.1016/0006-291x(90)92334-v.
- Hattori, N.; Saito, T.; Yagy, T.; Jiang, B.H.; Kitagawa, K.; Inagaki, C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and Ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4284–4291. Doi: 10.1210/jcem.86.9.7866.
- Hattori, N., 2009. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.* 19, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2008.12.001>.
- Hattori, N., Saito, T., Yagy, T., Jiang, B., Kitagawa, K., 2014. Ghrelin Expression in Human T Cells , B Cells , and Neutrophils 86, 4284–4291.
- Hinkle, P.M., Gehret, A.U., Jones, B.W., 2012. Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front. Neurosci.* 6, 180. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00180>.
- Holl, R.W., Thorner, M.O., Leong, D.A., 1988. Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: Effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 122, 2927–2932.

<https://doi.org/10.1210/endo-122-6-2927>.

Jameson, J., De Groot, L., de Krester, D., Giudice, L., Grossman A., Melmed, S., Potts, J. & Weir, G. (2015). ENDOCRINOLOGY: ADULT & PEDIATRIC (7th EDITION). Philadelphia: El sevier saunders.

Jeay, S., Sonenshein, G.E., Postel-Vinay, M.C., Kelly, P. a, Baixeras, E., 2002. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00014-X)

Jones, K. E., Brubaker, J. H., & Chin, W.W., 1996. An alternative splice variant of the mouse TRH receptor mRNA is the major form expressed in the mouse of Human. *J Mol Endocrinol.* 16, 197–204. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0160197>

Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., María Uribe, R., Charli, J.-L., 2015. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary–thyroid axis. *J. Endocrinol.* 226, T85–T100. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0124>

Kiaris, H., Chatzistamou, I., Papavassiliou, A. G., & Schally, A. V. 2011. Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(8), 311–317. doi:10.1016/j.tem.2011.03.006

Kaiya, H., van der Geyten, S., Kojima, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Geelissen, S., Darras, V.M., Kangawa, K., 2002. Chicken Ghrelin: Purification, cDNA Cloning, and Biological Activity. *Endocrinology* 143, 3454–3463. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220255>

Kamath, J., Yarbrough, G.G., Prange, A.J., Winokur, A., 2009. The thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immune system homeostatic hypothesis. *Pharmacol. Ther.* 121, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.004>

Kania, E., Pająk, B., Orzechowski, A., 2015. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/352794>

Khandelwal, N., Breinig, M., Speck, T., Michels, T., Kreutzer, C., Sorrentino, A., Sharma, A.K., Umansky, L., Conrad, H., Poschke, I., Offringa, R., König, R., Bernhard, H., Machlenkin, A., Boutros, M., Beckhove, P., 2015. A high-throughput RNA i screen for detection of immune-checkpoint molecules that mediate tumor resistance to cytotoxic T lymphocytes . *EMBO Mol. Med.* 7, 450–463. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404414>

Kimata, B.H., Fujimoto, M., 1994. Growth Hormone and Insulln-like Growth Factor I Induce Immunoglobulin (Ig)E and IgG4 Production by Human B Cells 180, 727–732.

Kiseljak-Vassiliades, K., Xu, M., Mills, T.S., Smith, E.E., Silveira, L.J., Lillehei, K.O., Kerr, J.M., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Wierman, M.E., 2015. Differential somatostatin receptor (SSTR) 1-5 expression and downstream effectors in

- histologic subtypes of growth hormone pituitary tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 417, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.016>
- Ko, K.H., Lee, I.K., Kim, G., Gu, M.J., Kim, H.Y., Park, B.C., Park, T.S., Han, S.H., Yun, C.H., 2018. Changes in bursal B cells in chicken during embryonic development and early life after hatching. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34897-4>
- Kojima, M., Kangawa, K., 2008. Structure and function of Ghrelin. *Results Probl. Cell Differ.* 46, 89–115. https://doi.org/10.1007/400_2007_049
- Kühn, E.R., Geelissen, S.M.E., Van der Geyten, S., Darras, V.M., 2005. The release of growth hormone (GH): Relation to the thyrotropic- and corticotropic axis in the chicken. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.022>
- Kühn, E.R., Herremans M., Dewil E., Vaderporten A., Rudas P., Bartha T., Verheyen G., Berghman, Dcuypere E. 1991. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is not thyrotropic but somatotropic in fed and starved adult chickens. *Reprod Nutr Dev.* 31. 431-439. DOI:[10.1051/rnd:19910409](https://doi.org/10.1051/rnd:19910409)
- Koga, T., Ichinose, K., Mizui, M., Crispin, J. C., & Tsokos, G. C. (2012). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Suppresses IL-2 Production and Regulatory T Cell Activity in Lupus. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3490–3496. doi:10.4049/jimmunol.1201785
- Lorsignol A., Taupignon A., Horvath G., Dufy B. 1997. Intracellular calcium concentration and hormone secretion are controlled differently by TRH in rat neonatal lactotrophs and somatotrophs. *Journal of Endocrinology.* 154: 483-494.
- Lin, X.W., Lin, H.R., Peter, R.E., 1993. The regulatory effects of thyrotropin-releasing hormone on growth hormone secretion from the pituitary of common carp in vitro. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 71–6. <https://doi.org/10.1007/BF00004552>
- Luna-Acosta, J.L., Alba-Betancourt, C., Martínez-Moreno, C.G., Ramírez, C., Carranza, M., Luna, M., Arámburo, C., 2015. Direct Antiapoptotic Effects of Growth Hormone are Mediated by PI3K/AKT Pathway in the Chicken Bursa of Fabricius. *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.07.010>
- Luna, M.; Huerta, L.; Berumen, L.; Martínez-Coria H.; Harvey, S.; Arámburo C. 2004. Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 37-49. Doi: 10.1016/j.ygcen.2004.02.005.
- Luna, M., Barraza, N., Berumen, L., Carranza, M., Pedernera, E., Harvey, S., Arámburo, C., 2005. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.04.007>

- Luna, M., Rodríguez-Méndez, a J., Berumen, L., Carranza, M., Riesgo-Escovar, J., Baudet, M.-L., Harvey, S., Arámburo, C., 2008. Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1313–1325. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.04.008>
- Luna, M., Rodríguez-Méndez, A.J., Luna-Acosta, J.L., Carranza, M., Arámburo, C., 2013. Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.04.036>
- Malarkey, W.B., Wang, J., Cheney, C., Glaser, R., Nagaraja, H., 2002. Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. *J. Neuroimmunol.* 123, 180–7. <https://doi.org/S0165572801004891> [pii]
- Martari, M., Salvatori, R., 2009. Chapter 3 Diseases Associated with Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor (GHRHR) Mutations Volume 88, 57–84. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(09\)88003-4](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(09)88003-4)
- Meng, F., Huang, G., Gao, S., Li, J., Yan, Z., Wang, Y., 2014. Identification of the receptors for somatostatin (SST) and cortistatin (CST) in chickens and investigation of the roles of cSST28, cSST14, and cCST14 in inhibiting cGHRH1-27NH2-induced growth hormone secretion in cultured chicken pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 384, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.001>
- Maeda, K., Kato, Y., Chihara, K., Ohgos S., Iwasaki, Y., Abe, H., & Imura, A. 1976. Suppression by Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) of Growth Hormone Release Induced by Arginine and Insulin-Induced Hypoglycemia in Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 43(2), 453–456. doi:10.1210/jcem-43-2-453
- Miller, T.L., Godfrey, P. a, Dealmeida, V.I., Mayo, K.E., 1999. The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* 140, 4152–65. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6977>
- Mackay, F., & Browning, J. L. 2002. BAFF: A fundamental survival factor for B cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(7), 465–475. doi:10.1038/nri844
- Martínez-Coria, H.; López-Rosales, L.J.; Carranza, M.; Berumen, L.; Luna, M.; Arámburo, C. 2003. Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation *in vitro*. *Endocrine*.17: 91–102. Doi: 10.1385/endo:17:2:91.
- Nair, R.M., Barrett, J.F., Bowers, C.Y., Schally, a V, 1970. Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry* 9, 1103–1106.
- Nelson, E.J., Hinkle, P.M., 1994. Thyrotropin-releasing hormone activates Ca²⁺efflux. Evidence suggesting that a plasma membrane Ca²⁺pump is an effector for a G-protein-coupled Ca²⁺-mobilizing receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 30854–30860.

- Nunn, C., Cervia, D., Langenegger, D., Tenailon, L., Bouhelal, R., Hoyer, D., 2004. Comparison of functional profiles at human recombinant somatostatin sst 2 receptor: Simultaneous determination of intracellular Ca²⁺ and luciferase expression in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* 142, 150–160. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705735>
- Ojima, Y., Ito, A., Nagase, H., Mori, Y., 1989. Calmodulin regulates the interleukin 1-induced procollagenase production in human uterine cervical fibroblasts. *BBA - Mol. Cell Res.* 1011, 61–66. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(89\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0167-4889(89)90079-7)
- Piórkowska, K., Zukowski, K., Poltowicz, K., Nowak, J., Wojtysiak, D., Derebecka, N., Wesoly, J., Ropka-Molik, K., 2018. Transcriptomic changes in broiler chicken hypothalamus during growth and development. *Int. J. Genomics* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6049469>
- Porter, T.E., Ellestad, L.E., Fay, A., Stewart, J.L., Bossis, I., 2006. Identification of the Chicken Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor (GHRH-R) mRNA and Gene: Regulation of Anterior Pituitary GHRH-R mRNA Levels by Homologous and Heterologous Hormones. *Endocrinology* 147, 2535–2543. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1534>
- Pruett, H.E., Thompson, D.L., Cartmill, J.A., Williams, C.C., Gentry, L.R., 2003. Thyrotropin releasing hormone interactions with growth hormone secretion in horses. *J. Anim. Sci.* 81, 2343–2351. <https://doi.org/10.2527/2003.8192343x>
- Qian, Y., Yan, A., Lin, H., Li, W., 2012. Molecular characterization of the GHRH/GHRH-R and its effect on GH synthesis and release in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 163, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.06.004>
- Quintanar, J.L., Guzmán-Soto, I., 2013. Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Front. Integr. Neurosci.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00056>
- Rebecchi MJ., Gerry RH., Gershengorn MC. 1982. Thyrotropin-releasing Hormone Causes Loss of Cellular Calcium, without Calcium Uptake by Rat Pituitary Cells in Culture. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 257 (6): 2751-2753.
- Raiden, S., Polack, E., Nahmod, V., Labeur, M., Holsboer, F., Arzt, E., 1995. TRH receptor on immune cells: In vitro and in vivo stimulation of human lymphocyte and rat splenocyte DNA synthesis by TRH. *J. Clin. Immunol.* 15, 242–249. <https://doi.org/10.1007/BF01540881>
- Ramírez, J.L., Gracia-Navarro, F., García-Navarro, S., Torronteras, R., Malagón, M.M., Castaño, J.P., 2002. Somatostatin stimulates GH secretion in two porcine somatotrope subpopulations through a cAMP-dependent pathway. *Endocrinology* 143, 889–897. <https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8685>
- Richards, M.P., Poch, S.M., McMurtry, J.P., 2006. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 298–310.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2005.09.013>

Rodríguez-Méndez, A.J., Luna-Acosta, J.L., Carranza, M., Harvey, S., Arámburo, C., Luna, M., 2010. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships? *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2010.03.019>

Rohrbasser, L.J., Alsaffar, H., Blair, J., 2018. The Hypothalamus–Pituitary Axis. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_12

Roussel, J.P., Grazzini, E., Astier, H., 1997. Somatostatin blocks the potentiation of TRH-induced TSH secretion from perfused pituitary fragments and the change in intracellular calcium concentrations from dispersed pituitary cells elicited by prepro-TRH (PS4) or by tri-iodothyronine. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 87–97. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0190087>

Roskopf, D; Schurks, M.; Manthey I.; Joisten, M.; Busch, S.; Siffert, W. 2003. Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts. *Physiology-Cell Physiology.* 284: C179-C190. Doi: 10.1152/ajpcell.00160.2001

Ritchie, A. 1987. Thyrotropin-releasing hormone stimulates calcium m-activated potassium current in a Rat anterior pituitary cell. *J Physiol.* 385: 611-625. Doi: [10.1113/jphysiol.1987.sp016510](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016510)

Saba, G.Y.C., 2014. HORMONES IN THE IMMUNE SYSTEM AND THEIR POSSIBLE ROLE . A CRITICAL REVIEW. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 61, 241–260. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.1>

Saito, Y., Mekuchi, M., Kobayashi, N., Kimura, M., Aoki, Y., Masuda, T., Azuma, T., Fukami, M., Iigo, M., Yanagisawa, T., 2011. Molecular cloning, molecular evolution and gene expression of cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes in a teleost, the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2011.07.011>

Savino, W., Smaniotto, S., Mendes-da-Cruz, D.A., Dardenne, M., 2012. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1261, 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06637.x>

Scanes, G., 1984. Stimulation of Growth Hormone Secretion by Human Pancreatic Growth-Hormone-Releasing Factor and Thyrotrophin-Releasing Hormone in Anaesthetized Chickens. *Gen Comp Endocrinol.* 203, 198–203.

Schrage, R., De Min, A., Hochheiser, K., Kostenis, E., Mohr, K., 2016. Superagonism at G protein-coupled receptors and beyond. *Br. J. Pharmacol.* 173, 3018–3027. <https://doi.org/10.1111/bph.13278>

Sperling, M.A., 2015. Traditional and novel aspects of the metabolic actions of growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research.* 28: 69-75.

- Stojilkovic, S.S., 2018. Molecular and Cellular Endocrinology Signaling pathways regulating pituitary functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 463, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.018>
- Sun, Y.M., Millar, R.P., Ho, H., Gershengorn, M.C., Illing, N., 1998. Cloning and characterization of the chicken thyrotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* 139, 3390–3398. <https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6133>
- Tanaka, M., Miyazaki, T., Yamamoto, I., Nakai, N., Ohta, Y., Tsushima, N., Wakita, M., Shimada, K., 2003. Molecular characterization of chicken growth hormone secretagogue receptor gene. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 198–202. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00247-8)
- Toogood, A. a., Harvey, S., Thorner, M.O., Gaylinn, B.D., 2006. Cloning of the Chicken Pituitary Receptor for Growth Hormone-Releasing Hormone. *Endocrinology* 147, 1838–1846. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0930>
- Van As, P., Careghi, C., Bruggeman, V., Onagbesan, O.M., Van Der Geyten, S., Darras, V.M., Decuyper, E., 2004. Regulation of growth hormone expression by thyrotropin-releasing hormone through the pituitary-specific transcription factor Pit-1 in chicken pituitary. *Acta Vet. Hung.* 52, 389–402. <https://doi.org/10.1556/AVet.52.2004.4.2>
- Veiga-Fernandes, H., Mucida, D., 2016. Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces. *Cell.* 165, 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.041>
- White, B. A, Power, E., Fay F.S. Calcium Regulation of prolactin gene expression: Opposing Effects of Extracellular CaCl_2 and Ca^{2+} inophores. 1989. *Molecular Endocrinology.* 3 (11). 1757-1764.
- Wang, C.Y., Wang, Y., Li, J., Leung, F.C., 2006. Expression profiles of growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone receptor during chicken embryonic pituitary development. *Poult. Sci.* 85, 569–576. <https://doi.org/10.1093/ps/85.3.569>
- Wang, Y., Li, J., Wang, C.Y., Kwok, A.Y., Zhang, X., Leung, F.C., 2010. Characterization of the receptors for chicken GHRH and GHRH-related peptides: Identification of a novel receptor for GHRH and the receptor for GHRH-LP (PRP). *Domest. Anim. Endocrinol.* 38, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.07.008>
- Weigent, D. a., 2013a. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell. Immunol.* 285, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.10.003>
- Weigent, D. a., 2013b. Expression of lymphocyte-derived growth hormone (GH) and GH-releasing hormone receptors in aging rats. *Cell. Immunol.* 282, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.04.009>
- Weigent, D. a., 2011. High molecular weight isoforms of growth hormone in cells of the immune system. *Cell. Immunol.* 271, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.06.001>

Yu, Y., Chang, J.P., 2010. Involvement of protein kinase C and intracellular Ca²⁺ in goldfish brain somatostatin-28 inhibitory action on growth hormone release in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.04.008>

Yu, Y.; Zhang, Y.H.; Xu, Z.Y.; Liu, T.Y.; Wang, Q.X.; Ou, C.B.; Ma, J.Y. 2018. Effects of IBDV infection on expression of ghrelin and ghrelin-related genes in chicken. *Poult. Sci.* 98, 119–127.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Article

Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) and Somatostatin (SST), but not Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) nor Ghrelin (GHRL), Regulate Expression and Release of Immune Growth Hormone (GH) from Chicken Bursal B-Lymphocyte Cultures

Santiago Pech-Pool ^{1,2}, Laura C. Berumen ² , Carlos G. Martínez-Moreno ¹,
Guadalupe García-Alcocer ², Martha Carranza ¹, Maricela Luna ^{1,3,*} and Carlos Arámburo ^{1,3,*}

¹ Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, Mexico; agronomiapech@hotmail.com (S.P.-P.); cgmartin@comunidad.unam.mx (C.G.M.-M); macasa@unam.mx (M.C.)

² Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro 76010, Mexico; lcbsq@yahoo.com (L.C.B.); guadalugar@yahoo.com.mx (G.G.-A.)

³ Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico

* Correspondence: lunam@unam.mx (M.L.); aramburo@unam.mx (C.A.);
Tel.: +52-(55)-5623-4066 (M.L.); +52-(55)-5623-4065 (C.A.); Fax: +52-(55)-5623-4005 (M.L. & C.A.)

Abstract: It is known that growth hormone (GH) is expressed in immune cells, where it exerts immunomodulatory effects. However, the mechanisms of expression and release of GH in the immune system remain unclear. We analyzed the effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH), thyrotropin-releasing hormone (TRH), ghrelin (GHRL), and somatostatin (SST) upon GH mRNA expression, intracellular and released GH, Ser133-phosphorylation of CREB (pCREB^{S133}), intracellular Ca²⁺ levels, as well as B-cell activating factor (BAFF) mRNA expression in bursal B-lymphocytes (BBLs) cell cultures since several GH secretagogues, as well as their corresponding receptors (-R), are expressed in B-lymphocytes of several species. The expression of TRH/TRH-R, ghrelin/GHS-R1a, and SST/SST-Rs (Subtypes 1 to 5) was observed in BBLs by RT-PCR and immunocytochemistry (ICC), whereas GHRH/GHRH-R were absent in these cells. We found that TRH treatment significantly increased local GH mRNA expression and CREB phosphorylation. Conversely, SST decreased GH mRNA expression. Additionally, when added together, SST prevented TRH-induced GH mRNA expression, but no changes were observed in pCREB^{S133} levels. Furthermore, TRH stimulated GH release to the culture media, while SST increased the intracellular content of this hormone. Interestingly, SST inhibited TRH-induced GH release in a dose-dependent manner. The coaddition of TRH and SST decreased the intracellular content of GH. After 10 min. of incubation with either TRH or SST, the intracellular calcium levels significantly decreased, but they were increased at 60 min. However, the combined treatment with both peptides maintained the Ca²⁺ levels reduced up to 60-min. of incubation. On the other hand, BAFF cytokine mRNA expression was significantly increased by TRH administration. Altogether, our results suggest that TRH and SST are implicated in the regulation of GH expression and release in BBL cultures, which also involve changes in pCREB^{S133} and intracellular Ca²⁺ concentration. It is likely that TRH, SST, and GH exert autocrine/paracrine immunomodulatory actions and participate in the maturation of chicken BBLs.

Keywords: bursa of fabricius; growth hormone; bursal B-lymphocytes; TRH; somatostatin; GHRH

1. Introduction

The expression and release of growth hormone (GH) from the pituitary somatotrophs are regulated by several hypothalamic neuropeptides, such as growth hormone releasing hormone (GHRH), ghrelin (GhRL), thyrotropin-releasing hormone (TRH), and somatostatin (SST) [1–3]. After binding with their respective receptors in the somatotrophs, these hormones promote or inhibit the activation of other intracellular messengers and transcription factors, such as Ca^{2+} levels and the cAMP response element-binding (CREB), which are required for regulating GH expression and release [4]. The endocrine functions of GH include tissue growth, metabolic regulation, and homeostasis; its actions can be exerted directly, by GH receptor (GH-R) activation, or indirectly, through its classical mediator insulin-like growth factor 1 (IGF-1) [5]. In addition to the pituitary gland, it is now accepted that GH and GH-R are ubiquitously expressed in a diversity of tissues within the nervous, reproductive, and immune systems, among others, suggesting that GH has autocrine and/or paracrine effects in these extrapituitary expression sites [5,6].

In the immune system, GH stimulates the growth of primary and secondary lymphoid organs [7,8], where it induces lymphocyte proliferation and the production of cytokines and other immune factors [9,10]. In addition, GH also acts as a cytokine [11] and stimulates the innate and adaptive immune responses [12]. Moreover, GH is expressed in immune cells of various species, such as canine lymph nodes [13], human peripheral blood lymphocytes [14], rat, mouse, and bovine splenocytes [15,16], as well as in several immune cell lines (H-9 T cells and IM-9 B cells) [17].

In the chicken immune system, the expression and presence of GH mRNA and protein have both been detected in the spleen, thymus, and in bursa of Fabricius (BF) [18,19]. The BF is a primary lymphoid organ, exclusive of avian species, where bursal B-lymphocytes (BBLs) mature and develop, and after maturation they migrate to secondary lymphoid organs [20]. It has been described that GH mRNA is mainly expressed in lymphocyte progenitor cells in the bursal cortex, whereas the GH protein is more abundant in BBLs located in the medulla of BF [21], suggesting that GH could participate in BF development and function [18]. Furthermore, it was shown that, during embryogenesis, bursal GH-IR colocalized considerably with IgM-expressing cells but scarcely with IgG-producing lymphocytes, whereas the opposite was found after hatching, indicating that autocrine/paracrine actions of GH might be involved during the differentiation and proliferation of BBLs in BF [22]. It is also documented that GH content changes during the different stages of this organ and is related with the apoptotic waves that occur during BF development and involution, implying stage specific functions during ontogeny [22,23]. In addition, the administration of GH to BBL cultures (in vitro) increased cell viability, and decreased both caspase-3 activity and number of apoptotic cells, through the involvement of PI3K/Akt and Bcl-2 signaling pathways [24].

The expression of GH in immune cells suggests its participation as immunomodulator. However, the mechanisms that regulate the expression and release of GH in the immune system are poorly understood. It has also been reported that TRH and SST, as well as their receptors (TRH-R and SST-Rs), are expressed in the immune cells of various species [25,26]. TRH and SST can both influence the expression of several immune factors, thus indicating that they may play a role as immunomodulatory peptides [26,27]. In this work, we analyzed the participation of TRH and SST in the regulation of bursal GH expression and release in cultured BBLs from chicken BF, as well as their effect in the activation of CREB, the modulation of intracellular Ca^{2+} levels, and the expression of B-cell activating factor (BAFF) cytokine, which are important in several processes that are related to B-cell proliferation and survival [28]. Our results indicate that TRH and SST, and their receptors, are locally expressed in BBLs, and are involved in the regulation of immune GH synthesis and release in these bursal cells, implying paracrine and/or autocrine mechanisms participating in its immunomodulatory functions.

Understanding the basic processes that are involved in GH regulation in avian B-lymphocytes and its involvement in the modulation of the immune response could eventually have some applications in the poultry breeding industry.

2. Results

2.1. Characterization and Viability of BBLs Cultures

The cell viability of BBL cultures incubated in RPMI 1640 media alone was determined by the trypan blue exclusion method, along several incubation times (0–120 min.). BBLs viability decreased in a time-dependent fashion, as shown in Figure 1A: $87.01 \pm 1.25\%$ at time 0, $84.12 \pm 1.21\%$ after 30 min., $79.76 \pm 1.82\%$ after 60 min., and $71.21 \pm 2.21\%$ after 120 min. Specific markers for total B-cells (Bu-1a), as well as mature (IgG) and immature (IgM) B-lymphocytes were determined by immunocytochemistry (ICC) to characterize the proportion of BBLs subpopulations in the cultures. Figure 1B shows that, at 60 min. of incubation, 74.17% of the cultured cells were immunoreactive to Bu-1a, while 58.05% and 27.37% presented IgG-IR and IgM-IR, respectively. These data indicated that the bursal primary cell cultures contained an enriched B lymphocyte population. Figure 1C–E show representative micrographs with immunoreactive cells to antibodies against Bu-1a (α -Bu-1a), anti-IgG, or anti-IgM.

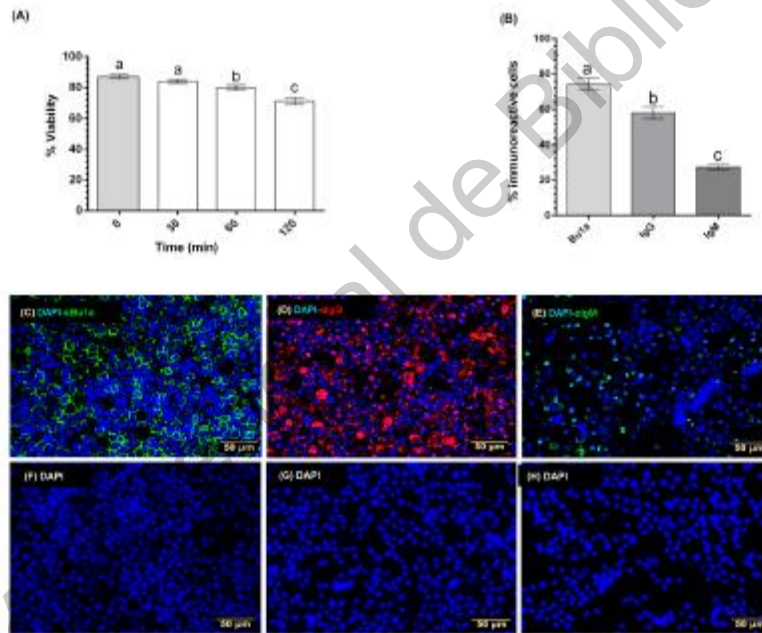


Figure 1. Characterization of bursal B-lymphocyte (BBL) cultures. Cell viability of BBLs was determined by the trypan blue exclusion method over 120 min. (A). Each bar represents mean \pm SEM, $n = 3$. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.0001$) by using one-way ANOVA and Dunnett's *post-hoc* test. Cell subpopulations were characterized by ICC using primary antibodies to detect whole B cells (α -Bu1a) (C), mature B cells (α -IgG) (D), and immature B-cells (α -IgM) (E). DAPI staining was used to detect cell nuclei. Negative controls were prepared in the absence of primary antibodies (F–H). The proportion of BBLs subpopulations was calculated dividing the number of immunoreactive cells to each antibody between total number of DAPI reactive cells (B). Each bar represents mean \pm SEM, $n = 3$. Groups with different letters are significantly different ($p < 0.001$) by using one-way ANOVA and Dunnett's *post-hoc* test.

2.2. Expression of GHRH, TRH, Ghrelin, SST, GH, and Their Receptors in BBLs

RT-PCR determined the presence of the corresponding mRNAs for GHRH, TRH, ghrelin, SST, GH, as well as their receptors in BBLs cultures. Pituitary gland (Pit +) was used as the positive control for the expression of receptors and GH mRNAs; hypothalamus (Hypo +) as positive control for the expression of the mRNAs coding for the secretagogues; and liver (Li +) for GH-R mRNA expression. GAPDH was used as house-keeping gene in all cases. As expected, GHRH and GHRH-R mRNA expression was observed in hypothalamus and pituitary, respectively, but, interestingly, not in B-bursal cells (Figure 2A,L). In contrast, the expression of TRH and TRH-R mRNAs (Figure 2B,M), ghrelin and GHS-R1a mRNAs (Figure 2C,N), as well as SST and SST-R receptors (1–5) mRNAs (Figure 2D–H,O), were found in BBLs cultures, and also in the corresponding positive controls. Likewise, GH mRNA was expressed in BBLs and pituitary, and GH-R mRNA in BBLs and liver, respectively (Figure 2Q,J).

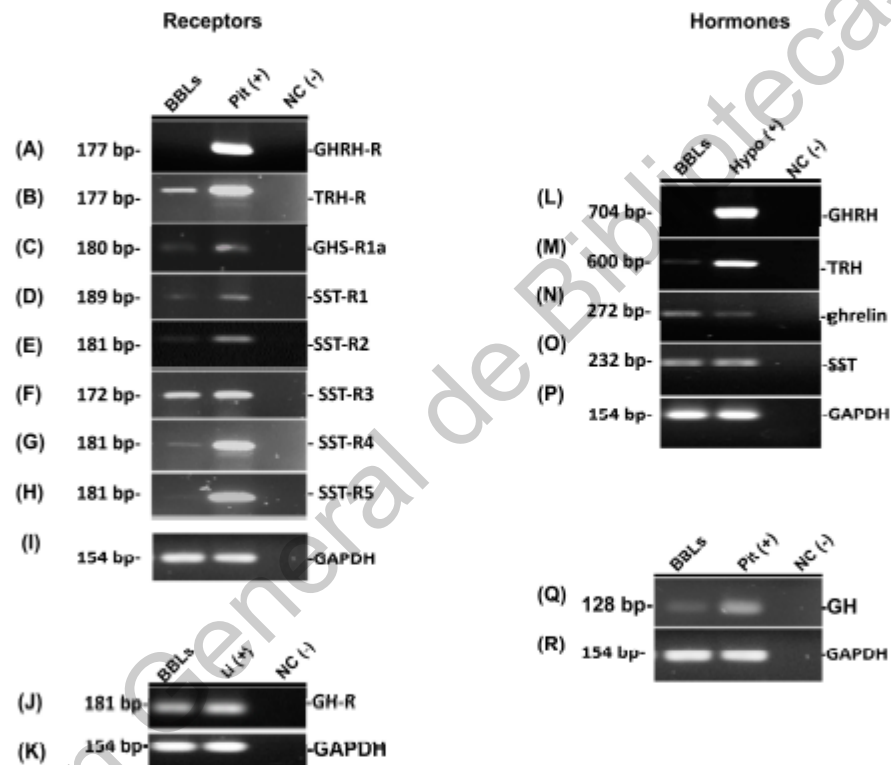


Figure 2. Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) (L) and its receptor, GHRH-R (A), thyrotropin-releasing hormone (TRH) (M) and TRH-R (B), ghrelin (N) and GHS-R1a (C), SST (O) and SST-R(1–5) (D–H), GH (Q) and GH-R (J) mRNAs were evaluated in BBLs by RT-PCR and electrophoresis in agarose gels. Pituitary (Pit +), hypothalamus (Hypo +) and liver (Li +) were used as positive controls. GAPDH was used as reference gene in all cases (I,K,R). Base pair (bp). Negative controls (in the absence of the corresponding specific template) were included in all cases. Representative figure of 3 independent experiments.

2.3. Co-Localization of GH with GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a, and SST-R₂ in BBLs

Four-week-old chicken pituitaries were used as the positive control in IHC to detect GH-immunoreactivity. GH-IR cells (green) were predominantly located in the pituitary caudal lobe

(Cd), as shown in Figure 3A. In the absence of primary antibody, no signal was observed in the negative control (Figure 3B).

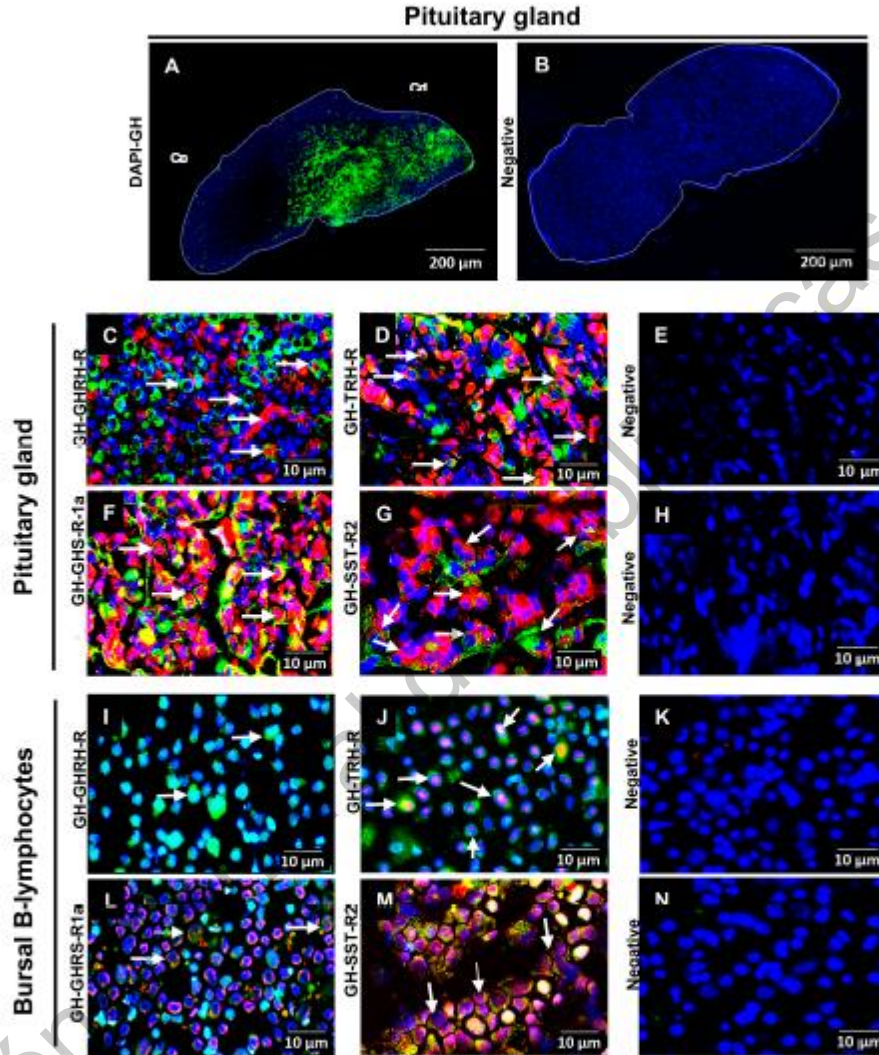


Figure 3. Co-localization of growth hormone (GH) and several secretagogue receptors in pituitary and BBL cultures. (A) As a positive control, sagittal slices of a four-week old chicken pituitary were used. Most GH-immunoreactivity (GH-IR) was located in the somatotroph cells of the caudal lobe (Cd) (green), and scarcely in the cephalic lobe (Cp). Negative controls were obtained using only Alexa 594 and Alexa 488 for both, pituitary gland and isolated BBLs (B,E,H,K,N). The localization of GH immunoreactivity was observed in green. On the other hand, distribution of GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a, and SST-R₂ immunoreactivities were observed in red; in pituitary (C,D,F,G) and BBLs (I,J,L,M). Nuclei were visualized with DAPI (blue). Arrows show immunoreactive cells to one or co-localization of both antibodies. Representative micrographs of $n = 3$ independent experiments.

In the chicken pituitary, GH-IR co-localized in cells that also showed GHRH-R, TRH-R, GHS-R1a, and SST-R₂ immunoreactivities (Figure 3C,D,E,G). GH immunoreactivity was also observed in BBLs (Figure 3I,J,L,M). On the other hand, and consistent with GHRH-R mRNA absence, GHRH-R immunoreactivity was not found in BBLs (Figure 3I). However, positive immunofluorescence for TRH-R, GHS-R1a, and SST-R₂ was clearly present in BBLs and the co-localization with GH-IR was observed for these receptors (Figure 3J,L,M). Interestingly, while GH-IR was mainly distributed in the cytoplasm, where it co-localized with GHS-R1a-IR and SST-R₂-IR, TRH-R-IR was mainly located around the cell nuclei.

2.4. Effect of TRH, Ghrelin and SST Upon GH mRNA Expression in BBLs

qPCR evaluated the effect of short incubation (1 h) with TRH, ghrelin, GHRH, and/or SST treatments upon GH mRNA expression in BBLs cultures. 10 nM TRH significantly increased ($p < 0.01$) GH mRNA expression by 1.54 ± 0.06 -fold in comparison with the control, as shown in Figure 4A. Conversely, the treatments with 1 and 10 nM SST significantly decreased GH mRNA expression in comparison to the control group (0.64 ± 0.07 and 0.78 ± 0.04 -fold; $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Figure 4B). In contrast, ghrelin and GHRH treatments showed no significant effects upon GH mRNA expression (Figure 4D,E). On the other hand, SST was capable of significantly inhibiting ($p < 0.05$) the TRH-induced stimulatory GH mRNA expression response (Figure 4C).

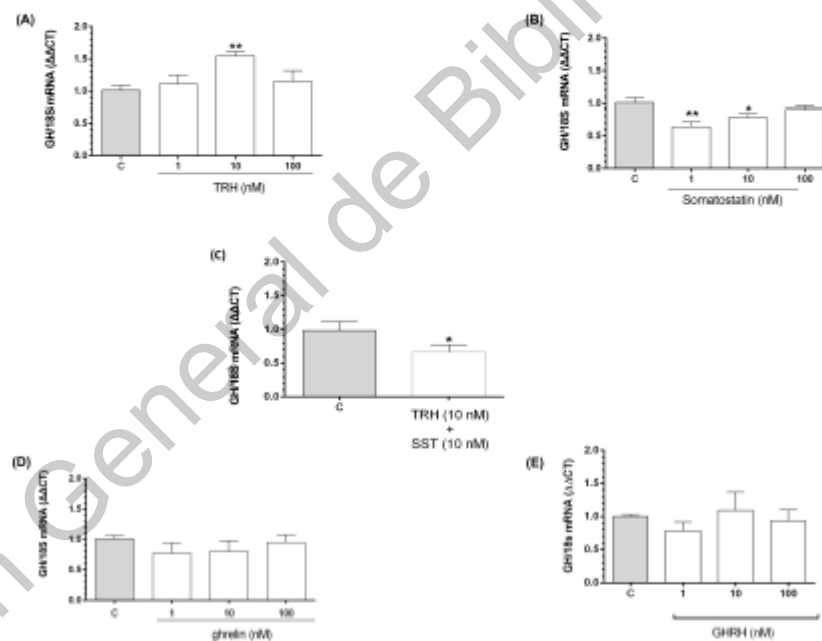


Figure 4. TRH, ghrelin, GHRH, and somatostatin (SST) effects upon GH mRNA expression in BBLs. After one-hour treatment with 1, 10 and 100 nM of either TRH (A), SST (B), ghrelin (D), GHRH (E), or the combination of 10 nM of both TRH and SST (C), the relative GH mRNA expression was determined by qPCR and corrected by the threshold cycle (CT) using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [29,30]. Ribosomal 18S RNA was used as reference gene. Each bar represents mean \pm SEM. Data were obtained from three independent experiments analyzed by duplicate. Asterisks indicate significant differences compared with control groups (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$), by using one-way ANOVA for multiple comparisons and Sidák as *post-hoc* test. A paired t test was used to evaluate the effect of TRH in combination with SST (* $p < 0.05$).

2.5. Effect of TRH and SST Upon GH Content and Release in BBLs Cultures

ELISA quantified the intracellular GH content in BBLs and its release to the culture media after treatments with the secretagogues for 60 min. Incubations with 10 nM TRH significantly increased ($p < 0.05$) the release of GH (up to 45.69 ± 17.23 ng/mL) to the culture media (Figure 5A) in comparison to the control group (15.03 ± 4.40 ng/mL); however, no changes were observed in the intracellular GH content after TRH treatment (Figure 5B). Interestingly, GHRH had no effect on GH release or intracellular content (Figure 5C,D). On the other hand, while GH release was not changed in the culture media after SST treatment (Figure 5E) at any of the doses tested, SST (100 nM) significantly increased ($p < 0.05$, up to 47.76 ± 5.32 ng/ μ g) the intracellular content of GH as compared with the untreated control (35.21 ± 0.78 ng/ μ g of protein) and treated with 1nM ($p < 0.05$, (Figure 5F).

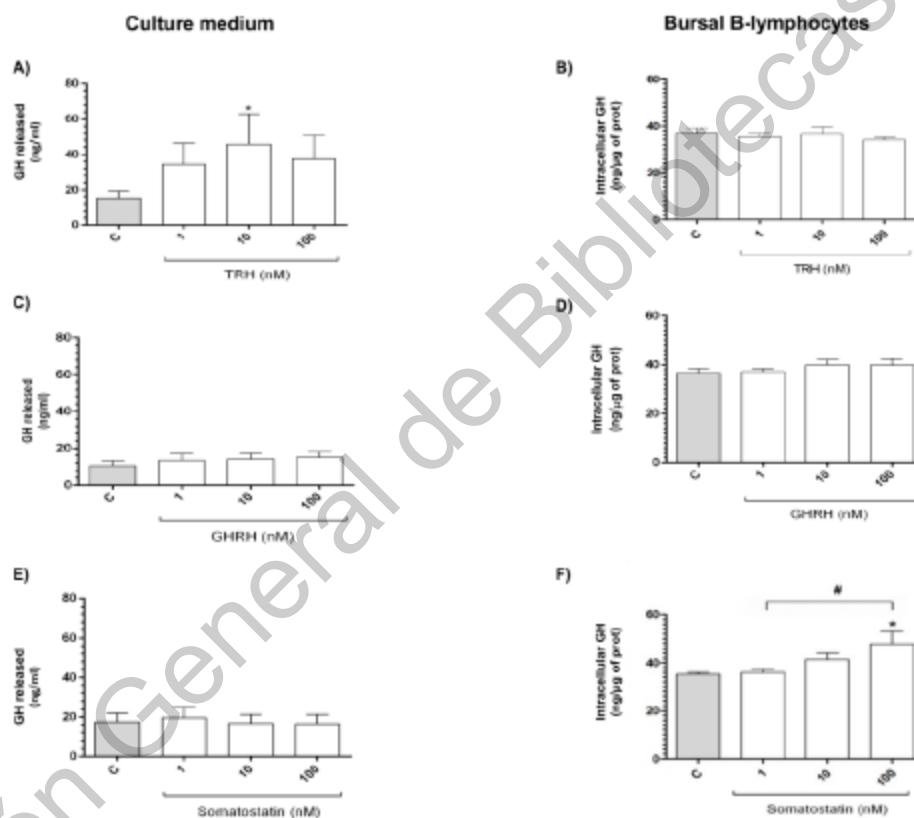


Figure 5. TRH, GHRH, and SST effects upon GH synthesis and release in BBLs. Intracellular (B,D,F) and released (A,C,E) GH were determined by ELISA in B-bursal lymphocyte cultures in response to TRH, GHRH, and SST (1, 10, and 100 nM). Each bar represents means \pm SEM. Data was obtained from seven independent experiments for cellular fraction and five independent experiments for culture media. Asterisks represent significant differences between control group ($* p < 0.05$) using one-way ANOVA for multiple comparisons and non-parametric Dunn's *post-hoc* test for TRH and parametric Šidák *post-hoc* test for SST. Number sign represents the differences between experimental groups ($\# p < 0.05$).

2.6. Inhibitory Effect of SST Upon TRH-Induced GH Release in BBLs

The effect of simultaneous administration of both TRH and SST upon intracellular GH content and release was also studied in the BBLs cultures. TRH significantly stimulated GH release ($258 \pm 54.2\%$) in comparison to the control ($100 \pm 13\%$), whereas SST alone had no effect ($118.5 \pm 16.4\%$), as shown in Figure 6A. However, when co-incubated together, SST was able to prevent TRH-induced GH release in a dose-dependent fashion, reducing GH release to $156 \pm 11.6\%$ (10 nM) and $39.1 \pm 7.7\%$ (100 nM) when compared to the untreated control. On the other hand, incubation with TRH or SST, and the co-incubation with 10 nM TRH and 10 nM SST, had no effect upon intracellular GH content. Interestingly, when 100 nM SST was co-administered with 10 nM TRH, the intracellular GH content was significantly decreased (a reduction to $56.8 \pm 2.5\%$, $p < 0.001$, Figure 6B) in relation to the control (100%).

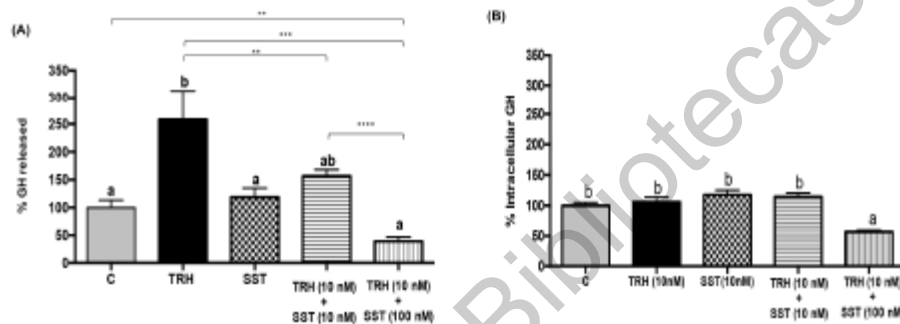


Figure 6. Inhibitory effect of SST upon TRH-induced GH release in BBLs. GH was determined by ELISA in either culture media (A) or intracellular content (B) in response to incubation with 10 nM TRH, 10 nM SST, or the combination of TRH (10 nM) with SST (10 or 100 nM), after one-hour treatment. Each bar represents mean \pm SEM. The data were obtained from three independent experiments and expressed as percentage (%). Group with different letters are significantly different as compared with control conditions. We used one-way ANOVA with multiple comparison test and Tukey as *post-hoc* test, ($p < 0.001$). Asterisks indicate differences between experimental groups as determined by unpaired *t* test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

2.7. Effect of TRH and/or SST Upon Intracellular Ca^{2+} in BBLs Cultures

The effects of TRH, SST, or its combination, upon changes in the intracellular Ca^{2+} concentration in BBLs cultures, were evaluated after 0, 5, 10, and 60 min. of incubation. Treatment with 10 nM TRH significantly decreased the intracellular Ca^{2+} content after 10 min. of incubation (a reduction of $-32.45 \pm 6.74 \Delta\%$, $p < 0.001$ in comparison with the untreated control, whereas after 60 min. of incubation, the intracellular Ca^{2+} content showed a tendency to increase (up to $35.96 \pm 38.12\Delta\%$) but was not significantly different with respect to the previous times (Figure 7A). Likewise, the treatment with SST (100 nM) significantly decreased the intracellular Ca^{2+} content after 10 min. incubation (a reduction of $-52.37 \pm 7.32 \Delta\%$, $p < 0.0001$) as compared with 0 min. (control group) (Figure 7B); whereas after 60 min. of incubation with SST (100 nM) the intracellular Ca^{2+} content significantly increased (up to $55.3 \pm 21.48 \Delta\%$), in relation to the levels that were observed after 5 min. ($-13.65 \pm 6.84 \Delta\%$, $p < 0.029$) or 10 min. ($-52.37 \pm 7.32 \Delta\%$, $p < 0.003$) of treatment but not in comparison to the control group (Figure 7B). On the other hand, the combination of TRH (10 nM) + SST (10 nM) significantly ($p < 0.006$) decreased the intracellular Ca^{2+} content in BBLs after only 10 min. of incubation (a reduction of $-26.32 \pm 3.44 \Delta\%$) in comparison with control (0 min.) (Figure 7C). Finally, the treatment with TRH (10 nM) + SST (100 nM) significantly ($p < 0.0001$) decreased the intracellular Ca^{2+} content in BBLs after 60 min. of incubation (a reduction of $-39.51 \pm 6.03 \Delta\%$) in comparison with control (0 min.) (Figure 7D).

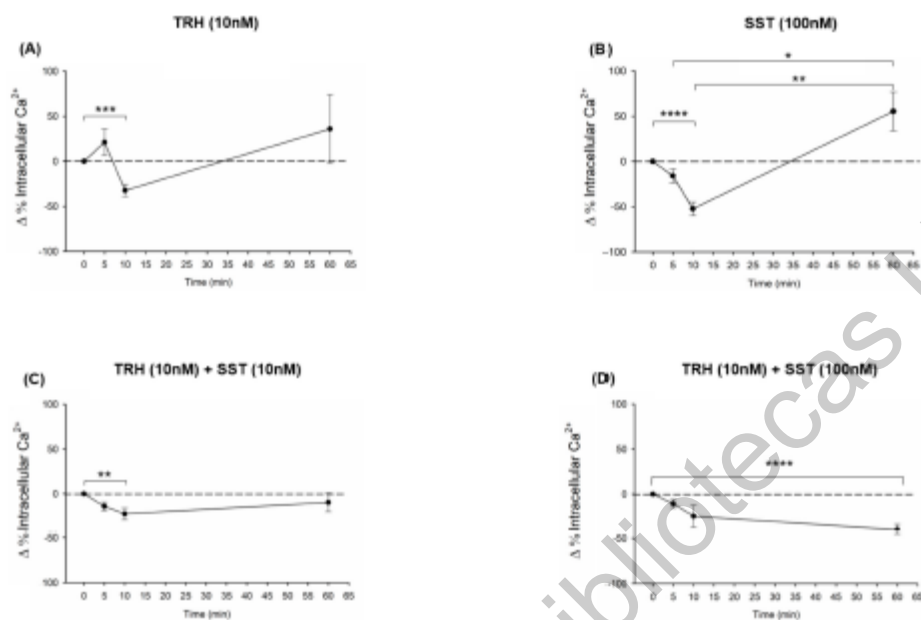


Figure 7. TRH and SST effects upon intracellular Ca^{2+} levels. Intracellular calcium concentrations were measured in B-bursal cells over 5, 10, and 60 min., with the following treatments: 10 nM TRH (A), 100 nM SST (B), or the combination of both hormones [TRH 10 nM + SST 10 nM (C) and TRH 10 nM + SST 100 nM (D)]. RPMI 1640 medium was used as control (0 min.). Each point represents mean \pm SEM. Data was obtained from four independent experiments for the cases of TRH or SST; on the other hand, three independent experiments were used in the combination of TRH + SST. Units are expressed as a delta proportion ($\Delta\%$) in relation to the control. Asterisks indicate differences between experimental groups, as determined by paired t test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

2.8. Effect of TRH and SST on CREB Phosphorylation at Ser133

Figure 8A shows that pCREB^{S133} significantly increased (up to $254.37 \pm 53.9\%$, $p < 0.05$) after 60 min. of incubation with 10 nM TRH in relation to the control group ($100 \pm 16.47\%$). In contrast, no changes were observed in pCREB^{S133} after SST treatment (Figure 8B). Interestingly, when co-incubated together at the same doses, SST was capable of blocking the TRH-induced effect upon pCREB^{S133} and no difference was observed with the untreated control (Figure 8C).

2.9. Effect of TRH and SST upon BAFF mRNA Expression in BBLs Cultures

The incubation with 10 nM TRH induced a significant increase (1.43-fold, $p < 0.05$) in BAFF mRNA expression levels, whereas no changes were observed after incubation with either 1 nM or 10 nM SST, in comparison to the controls (Figure 9B), as shown in Figure 9A.

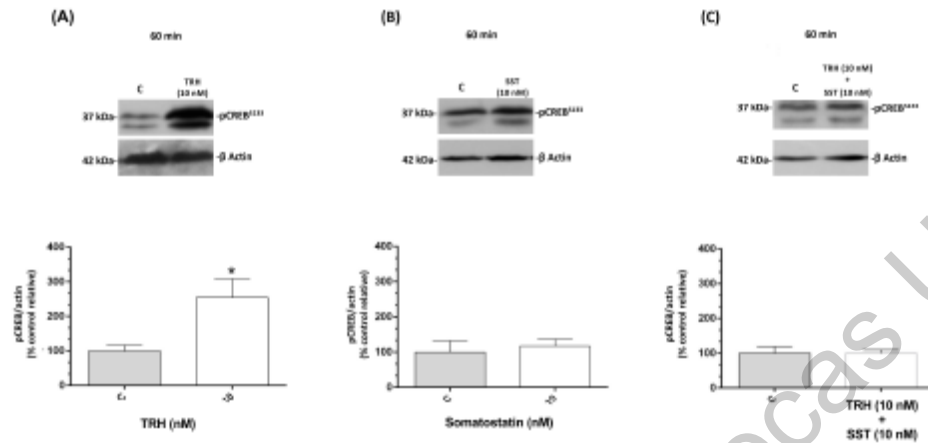


Figure 8. Effects of TRH and SST upon pCREB. Phosphorylation of CREB in serine-133 was analyzed after one-hour treatment with TRH (A), SST (B), or the combination of both hormones (C) in B-lymphocytes. Representative immunoblots show the immunoreactive bands to pCREB^{S133} (37 kDa), as determined by SDS-PAGE followed by Western blot and densitometry. β Actin was used as loading and normalizing control in all cases (42 kDa). Each bar represents mean \pm SEM. Data was obtained from three independent experiments and expressed as relative percentage in relation with the control group (%). The groups with asterisks are significantly different ($* p < 0.05$), as determined by paired t test.

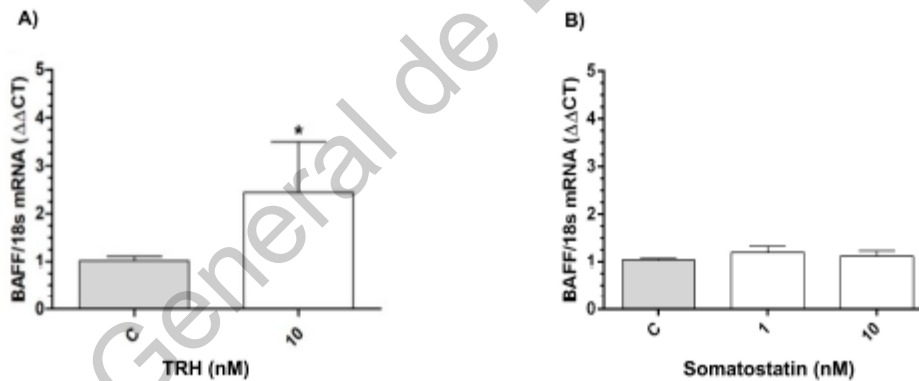


Figure 9. Effect of TRH and SST upon B-cell activating factor (BAFF) mRNA expression. Relative BAFF mRNA expression in BBLs after one-hour treatment with TRH (10 nM) (A) and SST (1 and 10 nM) (B) as determined by qPCR. The relative mRNA expression was corrected by the threshold cycle (CT) and using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [29,30]. Ribosomal 18S RNA was used as reference gene. Each bar represents means fold \pm SEM. Data were obtained from three independent experiments analyzed by duplicate. Asterisks indicate significant differences when compared with control groups ($* p < 0.05$), as determined by unpaired t test.

3. Discussion

The complex communication among the neuroimmune-endocrine system involves an intricate network of common chemical messengers, and their receptors, which interact through a combination of endocrine, paracrine, and/or autocrine mechanisms to exert pleiotropic effects that contribute to homeostasis [31]. Some members of the somatotrophic axis, including GH, are among those

chicken BBLs, in accordance with previous findings, where the absence of GHRH and GHRH-R in the chicken spleen was reported [41,54]. Additionally, the incubation of BBLs with GHRH (1–100 nM) had no effect upon either GH release or GH mRNA expression. These results open an intriguing question regarding the reasons why GHRH-R is not expressed in the immune system of the chicken, which deserves to be further explored.

Ghrelin and its canonical receptor GHS-R1a have a ubiquitous distribution that includes gastroenteric, nervous, reproductive, and immune systems [55]. Ghrelin and GHS-R expression were both reported in human B-cells, T-cells, and neutrophils, as well as in several human leukemic cell lines [56]. GHS-R1a expression has been previously reported in chicken immune tissues, such as thymus [57], spleen [40,57], and in the BF [58]. In this work, we found co-expression and co-localization of GHS-R1a and GH in BBLs, suggesting the participation of ghrelin and GHS-R1a upon immune GH regulation. However, we did not observe any effect of ghrelin upon GH mRNA expression at the doses tested, or upon the release of GH to the culture media (data not shown). Thus, it is possible that ghrelin/GHS-R exerts other GH-independent immunomodulatory effects [56] in these cells.

In chickens, TRH is a potent and effective GH secretagogue that affects the release of this hormone from pituitary cells [59,60]. Here, we showed that TRH (10 nM) was able to significantly increase both the expression of GH mRNA and GH release to the culture media in BBLs, suggesting that it could act as a local GH secretagogue in these cells. These results were analogous to those that were reported in neuroretinal cells, where TRH stimulated GH release to the culture media and significantly reduced the intracellular GH content after short-term (15 min.) experiments, while the content of GH increased in the cell as well as in the media after long-term (48 h) incubation, although at a higher dose (1 μ M) than in the present study [47]. In contrast, the intracellular content of GH in BBLs was not significantly different under the conditions that were employed here.

Hypothalamic somatostatin is well recognized as the main inhibitory regulator of both basal and stimulated pituitary GH secretion in vertebrates [61,62]. Furthermore, SST is known to be widely distributed in cells from the endocrine, neuroendocrine, neural, gastrointestinal, vascular, and immune systems, where it exerts inhibitory action on numerous physiological functions, including the secretion of several hormones, neuropeptides, and cytokines, among others [61]. In chicken pituitary cells, it is well established that SST inhibits GH release through the SST-R2 [63]. In this work, we corroborated the mRNA expression of SST and its five receptor subtypes (SST-R1 to SST-R5) in BBLs, and specifically co-localized the presence of SST-R2 and GH in both chicken pituitary and BBLs. Likewise, the expression of SST-Rs has also been reported in other chicken tissues, including the spleen [34]. We found that, similar to what happens in chicken somatotrophs when co-incubated with TRH [64], SST significantly decreased TRH-induced GH release in a dose-dependent manner, and considerably diminished the intracellular content of GH in BBL cultures, although only at the highest dose tested (100 nM). However, when administered alone, SST had no effect on basal GH release at any dose, similar to the results that were observed in human B-lymphocytes (in vitro), where SST and its analogue "SMS 201-995" did not have any effect on the release of GH to the culture media [65,66]. Additionally, by itself, SST significantly increased basal intracellular GH content in BBLs. Interestingly, our experiments demonstrated that, when administered alone at low doses, SST was able to significantly inhibit basal GH mRNA expression in BBL cultures. Furthermore, when co-incubated together, SST also considerably blocked TRH-induced GH mRNA expression in these cells, which probably explains the reduction of intracellular GH content that is mentioned above. These results indicate that, in these immune cells, SST might be directly involved in inhibiting GH mRNA transcription, and not only GH release as has been traditionally described in somatotrophs. There are reports where SST (or its analog, octeotride) has been shown to reduce GH mRNA expression, and this might be mediated by SST-R2 in GH-secreting GC cells [67]; by reducing the steady state levels of GHRH [68] in rats; or, by interfering with GHRH-induced GH gene transcription at the level of adenylate cyclase through inhibitory G protein in MtT/S cell line [69]. The mechanisms that are involved in SST-induced reduction of GH mRNA expression in B-lymphocytes deserve further research.

The inhibitory role of somatostatin upon secretagogue actions has been extensively documented in pituitary cells [70]. In the pituitary, TRH binds to TRH-R (Gq protein associated receptor) and then activates phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC); in turn, PKC phosphorylates transcription factors, such as CREB [71]. The phosphorylation of CREB (in Ser 133) strongly promotes GH transcription [4]. On the other hand, SST can promote the inhibition of PKC and PKA [72].

In immune cells, GH expression due to CREB activation remains unclear. In this work, we observed that TRH significantly increased pCREB^{S133} as well as GH mRNA expression. Conversely, SST decreased both basal and TRH-induced GH mRNA expression, and blocked TRH-stimulated phosphorylation of CREB, but no changes were observed upon pCREB^{S133} when applied alone. These results suggest that GH mRNA expression in BBLs could be mediated by TRH-induced pCREB^{S133} and that SST inhibits this stimulatory effect by interfering with CREB phosphorylation. However, it is possible that other transcription factors involved in the SST signaling pathway could be activated in order to decrease GH expression since SST by itself also decreased GH mRNA expression without changes in pCREB^{S133}. In other studies, it has been shown that SST inhibits cAMP production that is induced by corticotropin-releasing hormone (CRH) and GHRH in primary pituitary cell cultures [73]. Furthermore, SST inhibits the effect of forskolin on cAMP production, PKA activation, CREB phosphorylation, and transcription [74].

Intracellular Ca²⁺ is a second messenger involved in multiple processes such as cell metabolism, endo- and exocytosis, vesicular transport, neurotransmission, growth, and homeostasis [75]. The complex and fine-tuned Ca²⁺ dynamics occur in variable timeframes (from milliseconds to minutes), in which effector or/and inhibitory molecules are activated, blocked, and biotransformed to control a wide variety of physiological functions. In the pituitary, Ca²⁺ has a pivotal role in hormonal synthesis and secretion, in which hypothalamic hormones, such as GHRH, GnRH, TRH, CRH, and SST, are involved in an intricate system that includes transport and well-orchestrated changes between different cellular compartments [38]. Our study shows, for the first time, that TRH and SST exert actions upon intracellular Ca²⁺ levels in BBLs. We found that BBLs that are treated with either TRH or SST showed a specific response pattern that includes an initial decrease of Ca²⁺ concentration at 5–10 min. after treatment, followed by an increase at 60 min. post-treatment for both peptides. Interestingly, this late Ca²⁺ upregulation that occurs after the initial decrease was completely abolished by TRH + SST co-treatment, which positively correlates with the simultaneous inhibitory effect that was observed upon GH mRNA expression and secretion induced by TRH + SST at 60 min. after treatment. The associated changes of intracellular Ca²⁺ distribution/concentration and its correlation with endocrine GH production and secretion have been characterized only in shorter times [76–79] in comparison with our experimental protocol despite the evidence about TRH and SST as potent GH synthesis and release regulators in the pituitary. Additionally, in human B-lymphoblast cells, SST treatment resulted in a fast and short Ca²⁺ increase at 20 s. [80]. These results indicate that Ca²⁺ is involved during the inhibitory effect of SST and the stimulatory effect of TRH upon GH mRNA expression and protein release in BBLs, but understanding of the intimate mechanisms involved requires further investigation.

BAFF, which is an important immune cytokine, activates humoral responses in chickens infested with the infectious bursal diseases virus (IBDV) [81] and it is involved in the negative selection of B-lymphocytes [82]. We found a stimulatory effect of TRH on BAFF mRNA expression in BBLs, suggesting an immunomodulatory function for the TRH-GH mini-axis. In that way, TRH could promote BAFF mRNA expression to modulate immune and inflammatory responses, since it has been reported that TRH can promote (in vivo and in vitro) interleukin production, such as IL-1, IL-6, IL-10, and TNF α or INF α / γ [26]. Local actions for TRH and GH in immune cells suggest a complex network of cellular and molecular interactions that represent an emerging field for research.

In summary, the presence of TRH and SST and their corresponding receptors in BBLs suggest their involvement in the regulation of local GH expression and a role in immunomodulatory responses. According to our results, TRH and SST are involved as regulatory factors in the expression and release

(in vitro) of GH, in pCREB^{S133} involving specific and time related intracellular Ca²⁺ changes. As TRH increased GH and BAFF mRNA expression, it is likely to have immunomodulatory actions. This work provides evidence about the existence of a complex interaction between somatotrophic regulatory elements in the immune system that involves autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms, which may have important participation in the modulation of the immune response in vertebrates. It also contributes to shedding light regarding the intricate cross-talk between common peptide messengers of the neuroimmune-endocrine system.

4. Material and Methods

4.1. Animals and Tissues

Pilgrim's México donated all chickens used in this study. Broiler chickens were kept on a 12L:12D photoperiod with ad libitum access to commercial food (Caporina[®]Initiator-Api-Aba [1–14 days of age]; Caporina[®]Growth-Api-Aba-Premium [15–28 days of age], MaltaCleyton-ADM, Mexico), and water in the vivarium at the Institute of Neurobiology of the National Autonomous University of México (UNAM). The birds were killed by decapitation following the protocol that the Institute's Bioethics Committee approved (number 038/19 October 2010), and the organs used in this study (bursa of Fabricius [BF], pituitary, brain, and liver) were collected from four-week old chickens. The hypothalamus was dissected out from the brain while using as reference marks the third ventricle, the optic chiasm (rostrally), and the mammillary bodies (caudally).

4.2. Hormones and Antibodies

The following peptides were employed in the preparation of treatments: TRH (pGlu-His-Pro-Amide, P-2161-SIGMA, St. Louis, MO, USA), ghrelin-acylated (Human-G-3902-SIGMA), SST (SRIF-S-9129-SIGMA), and growth hormone-releasing factor (G-8895-Lot41K49501-SIGMA). The recombinant chicken growth hormone (rcGH) was used in ELISA standard curve (American Cynamid, Princeton, NJ, USA). Table 1 describes the primary and secondary antibodies used in this study.

Table 1. Antibodies.

| Target | Host/Type | Dilution | Source | Cat. No. |
|--|-----------------------|-----------|-------------------------|-----------------|
| cGH | rabbit/polyclonal | 1:100,000 | NHPP | AFP-551-11-1-86 |
| cGH | guinea pig/polyclonal | 1:2000 | Washington Biotech | GP-SHA-1 |
| GHRH-R | rabbit/polyclonal | 1:300 | Abcam | ab28692 |
| TRH-R | rabbit/polyclonal | 1:300 | Abcam | ab72179 |
| SST-R2 | rabbit/polyclonal | 1:300 | Sta Cruz Biotechnology | sc-25676 |
| GHS-R1a | rabbit/monoclonal | 1:300 | Sta Cruz Biotechnology | sc-20748 |
| p ^{S133} -CREB | Rabbit monoclonal | 1:5000 | Abcam | ab32096 |
| chicken/Turkey IgG | rabbit/polyclonal | 1:100 | Zymed | GI-3100 |
| chicken Bu-1a-FITC | mouse/monoclonal | 1:500 | Southern Biotech | 8365-02 |
| chicken-IgM-Antibody-FITC | goat/polyclonal | 1:500 | Rockland | 603-102-007 |
| β-actin | mouse/monoclonal | 1:1000 | Sta Cruz Biotechnology | SC-47778 |
| Alexa Fluor 594 anti-Rabbit-IgG | goat/polyclonal | 1:2000 | Invitrogen | A11012 |
| Alexa 488 anti-Rabbit-IgG | goat/polyclonal | 1:2000 | Invitrogen | A11078 |
| Alexa 488 anti-guinea pig IgG | goat/polyclonal | 1:2000 | Invitrogen | A-11073 |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) | | | | |
| Cross-Adsorbed Secondary Antibody | goat/polyclonal | 1:5000 | ThermoFisher scientific | G-21234 |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) | | | | |
| Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP | goat/polyclonal | 1:5000 | ThermoFisher scientific | G-21040 |

4.3. Primary B- Bursal Lymphocytes (BBLs) Cultures

BFs were aseptically removed, as described elsewhere [22,24]. Immediately, the BFs were minced in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and dispersed while using a glass homogenizer. Cell suspension was filtered through 100 μM nylon mesh (twice) and then centrifuged

at 1800 rpm for 5 min. The cell suspensions were resuspended in RPMI 1640, and cell number and viability were determined while using a hemacytometer and trypan blue [83]. Each BBL culture was obtained from at least 10 BFs. Cells (4×10^6 BBLs) were placed in Eppendorf tubes as cell suspension in 500 μ L of RPMI 1640 at 37 °C in a humidified chamber with 95% air and 5% CO₂ atmosphere, and then incubated for 60 min.

4.4. Treatments

For treatments, the secretagogues GHRH, TRH, SST, and ghrelin-acylated were diluted in RPMI 1640. BBL cultures were treated with either RPMI 1640 medium as control; ghrelin; TRH; SST; or, a combination of TRH + SST. For all of the treatments, we performed dose-response curves while using 1, 10, and 100 nM of each peptide, while, for combinations, the following were used: 10 nM TRH + 10 nM SST or 10 nM TRH + 100 nM SST. The BBL cultures were incubated with the corresponding treatments for 60 min. at 37 °C in a humidified chamber with 5% CO₂. After incubation with the treatments, BBLs were separated from culture media by centrifugation (1800 rpm for 5 min. at 4 °C). The intracellular calcium concentration changes were determined after 0, 5, 10, and 60 min. of incubation, as described below.

4.5. Immunohistochemistry and Immunocytochemistry

BFs and pituitaries (as GH-positive controls) were fixed with the Bouin-Hollande sublimate [22] for 24 h, dehydrated in ethanol, and then embedded in paraffin wax. Tissue sections of 4–8 μ m were then cut while using a rotatory microtome (Leica, RM2135 model, D-35578 Wetzlar, Germany) and mounted onto charged glass slides (Superfrost/Plus, Fisher, Pittsburgh, PA, USA). On the other hand, BBLs (3×10^5) were deposited on charged slides by cytospin (Thermo Scientific 4 Cytocentrifuge, Millersburg, OH, USA) centrifugation (1000 rpm) and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min., and then the slides were washed and stored in Tris-buffered saline (TBS) buffer.

Serial tissue sections of BFs and pituitaries were cleared in xylene (Fisher Scientific, Millersburg, OH, USA) 3 \times 5 min., rehydrated in a graded series of ethanol (absolute alcohol, 95%, 70% and 50% alcohol), then soaked for 2 min. in lugol, followed by 4 min. in thiosulphate and finally rinsed in distilled water [22]. Tissues and BBLs slides were washed in TBS (3 \times 10 min.) and permeated with citrate buffer at 80 °C for 30 min., then free binding sites were blocked with 5% non-fat dry milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h. After blocking, the slides were washed with TTBS (0.1% Triton X-100 in TBS) 3 times, and the tissues and BBLs slides were incubated overnight with the respective primary antibodies (Table 1). All of the slides were washed (3 \times 10 min.) and incubated with the secondary antibodies (Table 1) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) to label cell nuclei. All of the slides were mounted with vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) and images were captured with a Zeiss LSM 780 DUO (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) confocal microscope. Image processing was performed while using ImageJ software (developed by NIH, freeware).

4.6. RNA Isolation and cDNA Synthesis

The total RNA was extracted from BBLs, pituitaries, hypothalamus, and liver with Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kit, according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by reverse-transcription while using 1 μ g of total RNA in a final volume of 40 μ L. Reverse transcriptase (M-MLV Reverse transcriptase, Promega, 200 U/ μ L) reaction was performed following previous reports [84].

4.7. RT-PCR

Amplification was performed from 1 μ g of cDNA and thermocycling conditions as follows: 35 cycles (denaturation: 95 °C for 30 s; annealing: 58 °C for 30 s; extension: 72 °C for 1 min.; and, final extension step: 72 °C for 7 min.) in a thermocycler (2400 Perkin-Elmer thermocycler, Foster City, CA, USA). We used the following mix to a final volume of 40 μ L containing: 5X PCR buffer, 2

mM MgCl₂, 10 mM dNTPs mix, 5 U/μL Taq DNA polymerase, and 0.1 mM specific oligonucleotide primers (Table 2). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a reference gene. The negative controls were carried without cDNA templates. PCR products were resolved by constant voltage electrophoresis at 100 V in 1% (*w/v*) agarose gels with 1X TAE buffer while using Bio-Rad electrophoresis chambers (Hercules, CA, USA) and they were visualized by ethidium bromide staining

Table 2. Oligonucleotides.

| Target | Primer | Sequence (5'-3') | Product Size | Accession Number |
|------------------------|--------|-----------------------------------|--------------|------------------|
| Ligands | | | | |
| cGHRH | Fwd | TAC CTG AGT GGG AGC TGA TC | 704 | >NM_001040464.1 |
| | Rev | CAT CAG TCT CCA GCT GGT CA | | |
| cTRH | Fwd | ATT AAA CAT GCC TCT GCC ACA | 600 | >XM_025154454.1 |
| | Rev | AAA CAA TTA CTT TCT CAT TCC TCT G | | |
| cGhrelin | Fwd | CA TA CAGCAA CAAAAGGATAC | 272 | >NM_001001131.1 |
| | Rev | TG TGGT TGTCC T T CAGCT | | |
| cSST | Fwd | CACCTGTCC TCCCA TCCAC | 232 | >NM_205336.1 |
| | Rev | CGGAGTGCATGT CACGCAAG | | |
| cGH | Fwd | CGCACCTATAT TCCGGAGGAC | 128 | >NM_204359.2 |
| | Rev | GGCAGCTCCA TGTCTGACT | | |
| cBAFF | Fwd | GATCTCAGCT TGGT GACAT TAT | 140 | NM_204327.2 |
| | Rev | TTAGCTCTCT C TCG TGGTAT TG | | |
| Receptors | | | | |
| cGHRH-R | Fwd | GTGGT CAGAGCCA T TCCCT T | 177 | >NM_001037834.2 |
| | Rev | AGCGTAGCC TCTGAATGCCA | | |
| cTRH-R | Fwd | ATGCCCTATCGAACAC TGGT | 177 | >NM_204930.1 |
| | Rev | ATGGCAGT TGCAGAG T T TCC T | | |
| cGHS-R | Fwd | TGGCCTCT CCGACC T GCT | 180 | >NM_204394.1 |
| | Rev | TGGCGACGTA CCGCTCCAC | | |
| cSSTR-1 | Fwd | CCGTGGCTAAGATGG TCAACCT | 189 | >NM_001113167.1 |
| | Rev | GCAGCAAGAAGCCCA T CAGGA | | |
| cSSTR-2 | Fwd | GGCACCGGTATGTAGGGAG T C | 191 | >XM_015279869.2 |
| | Rev | ATGCCGTGCTGCCACA T GGG | | |
| cSSTR-3 | Fwd | GGCACCGGTATGTAGGGAG T C | 172 | >XM_015286025.2 |
| | Rev | ATGCCGTGCTGCCACA T GGG | | |
| cSSTR-4 | Fwd | GGCCATGT TCG T TGTCTGCT | 181 | >XM_015283378.2 |
| | Rev | GCCGTGAAAGAG T GCCGGA | | |
| cSSTR-5 | Fwd | CCGCTACCTGGCAG T AGT TCA | 156 | >XM_015294246.2 |
| | Rev | T TGCAGG TGTGAAA G T C TCC | | |
| cGH-R | Fwd | ACTTCACCATGGACAATGCC T A | 181 | >NM_001001293.1 |
| | Rev | GGGGT TCTGCCAT T TGAAGCT C | | |
| Reference genes | | | | |
| cGAPDH | Fwd | TGTGGAGAGATGGCAGAG | 154 | >NM_204305.1 |
| | Rev | GT CAGG TCAACAACAGAGAC | | |
| c18S | Fwd | CTCTTCTCGAT TCCGTGGGT | 100 | >XR_003078044.1 |
| | Rev | TTAGCATGCCAGAG TCTCGT | | |

4.8. Quantitative PCR (qPCR)

GH mRNA expression was measured by real time PCR (qPCR) in a StepOne Thermocycler Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), while using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a final volume of 10 μL containing: 3 μL cDNA (1:10 dilution) and 0.5 μM of each specific primer (Table 2). The reactions were performed under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min., followed by 45 cycles of

95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 75 °C for 30 s. The relative content of GH and BAFF mRNAs were calculated with the comparative threshold cycle (Ct) method and while using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [29], where gene expressions were relative to the geometric mean of 18s mRNA [30].

4.9. SDS-PAGE/Western Blot of pCREB^{S133}

BBLs (4×10^6) were homogenized by sonication (Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors 44347, GE-130PB, Vernon Hills, IL, USA) in a protease inhibitor cocktail (Mini-complete, Roche, Basel, Switzerland) that was diluted in 0.05 M HCl-Tris, pH 9.0. The total proteins were determined by the Bradford micro-method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

The samples (containing 80 µg protein) were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 1.0 mm thick, 6 cm long, 12.5% gels, while using the buffer system of Laemmli, 1970 in a mini-Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [85]. Samples were electrophoresed under reducing conditions (in presence of 5% (*w/v*) 2-mercaptoethanol). After electrophoresis, the gels were equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (*v/v*) methanol, pH 8.3, for 30–60 min.), and then electrotransferred (at 200 mA for 60 min.) to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Later, the membranes were washed with TBS (30 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7.5) and then blocked with 5% (*w/v*) non-fat dried milk (Bio-Rad) in TBS for 1 h at room temperature. After blocking, the membranes were washed with TTBS (TBS containing 0.05% (*v/v*) Tween 20) and incubated overnight at 4 °C temperature with anti-pCREB antibody (1:5000 dilution). Subsequently, the membranes were rinsed in TTBS and incubated for 2 h with the secondary antibody (goat anti-rabbit-HRP), and then diluted 1:5000 in TTBS. pCREB-immunoreactive (IR) bands were developed by incubating the membranes in ECL chemiluminescent reagent (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) for 30 min., and then exposed to Kodak Biomax ML film. Luminograms were analyzed by densitometry while using Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The stripping method that was described by Negritto and Manthey, 2016 [86] was used when pCREB immunoreactivity was normalized with β -actin-IR.

4.10. GH ELISA

GH immunoreactivity was quantified in BBLs protein extracts (80 µg) and in 25 µL of culture media concentrate (final volume of 50 µL obtained from 1 mL dialyzed and concentrated culture media in Amicon Ultra 4 mL Centrifugal Filters [Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Carrington Hill, Co. Cork, IRL] in an Avanti J-25 centrifuge [Beckman Coulter, Inc. Palo Alto, CA, I]), while using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [87,88]. Briefly, 96-well microtiter plates (Immulon 2HB, Flat Bottom Microtiter Plates by Thermo Scientific) were coated overnight with 12 ng rcGH/per well in 100 µL carbonate buffer (1 M), pH 10.3, at 4 °C. After antigen coating, the plates were washed with TPBS (0.01 M sodium phosphate, 0.15 mM NaCl, 0.05% *v/v* Tween 20, pH 7) while using a manual microplate immune-washer (ENE, lowboy, Nalgene; Nunc-Immuno Wash 12, InterMed Nunc). This procedure was performed after each incubation step. The samples and serial dilutions of rcGH (0.5–1250 ng/mL) diluted in TPBS were then incubated for 16 h with 100 µL of primary antibody (α -cGH, AFP-551-11-1-86-National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) diluted 1:100,000 with TPBS and 1% *w/v* nonfat dried milk. The samples and standards (100 µL) were then added to coated wells and incubated for 2 h at room temperature. After incubation, secondary antibody (horse-radish peroxidase-anti-rabbit IgG conjugate) diluted 1:5000 with TPBS and 1% *w/v* nonfat dried milk was added and incubated for 2 h at room temperature. The colorimetric reaction was generated while using 2,2-amino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulfonate) as substrate (Sigma, Saint Louis, MO, USA), and the plates were read in an ELISA microplate Reader (Bio-Rad), at a wavelength of 405 nm.

4.11. Quantification of Intracellular Ca²⁺

BBLs (4×10^6) were collected at 0, 5, 10, and 60 min. after treatments and homogenized by sonication (Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors 44347, GE-130PB, Vernon Hills, IL, USA) in

100 μ L of lysis buffer (100 mM Tris, pH 7.5) in order to quantify the intracellular Ca^{2+} concentration. The homogenates were centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min. at 4 °C (Sorvall Legend micro 21R Centrifuge, Thermo Scientific). The supernatant was collected and stored on ice; all of the samples were analyzed in the same day while using a Ca^{2+} Colorimetric Assay Kit (Sigma, MAK022, St. Louis, MO, USA and Abcam, ab102505, Cambridge, UK), following the manufacturer's instructions.

4.12. Statistical Analysis

In all of the experiments, the values are expressed as mean \pm standard error (SEM). Significant differences between groups or treatments were determined by either Student's t test or one-way ANOVA analysis, followed by parametric (Šidák, Dunnet, Tukey) or non-parametric (Dunn's) *post-hoc* tests. *p*-values less than 0.05 were determined to be statistically different (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; **** *p* < 0.0001).

5. Conclusions

This work shows that GH, TRH, ghrelin, SST and their corresponding receptors are expressed in bursal B-lymphocytes. TRH increased GH mRNA expression and GH release, and also stimulated BAFF mRNA expression and phosphorylation of CREB. On the other hand, SST decreased GH mRNA expression and increased intracellular GH content. In addition, SST significantly prevented TRH-induced GH mRNA expression and GH release in BBL cultures. Interestingly, GHRH and GHRH-R were not expressed in bursal B-lymphocytes, and GHRH did not stimulate GH mRNA expression or GH release in these cultures. Both TRH and SST provoked changes in intracellular Ca^{2+} levels. Our results suggest that TRH and SST are implicated in the regulation of GH expression and release in BBL cultures; and it is likely that these peptides exert autocrine/paracrine immunomodulatory actions involved in the maturation of B-lymphocytes.

Author Contributions: Conceptualization, S.P.-P., M.L., L.C.B., and C.A.; Methodology S.P.-P., M.C., M.L.; Supervision, M.L., L.C.B., G.G.-A., C.G.M.-M.; Validation, M.L., L.C.B., S.P.-P., M.C.; Writing—original draft, S.P.-P., M.L., L.C.B., G.G.-A., C.G.M.-M., and C.A.; Writing—review & editing, C.A., C.G.M.-M., M.L., and S.P.-P.; Resources and Funding, C.A., C.G.M.-M., and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-DGAPA) (IN201817, IN207018, IN208419), and UNAM grant 1130-202-002 to C.A., Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; México City, México), as well as by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México City, México, grant 285004) and PhD scholarship (475619) to SMPP.

Acknowledgments: The authors thank Pilgrim's Pride, Querétaro, México, who donated fertilized broiler eggs used during this research. We also thank Gerardo Courtois (lab assistant), Nydia Hernández Rios (confocal microscopy), Maarten Werdler and Ericka de los Rios (histology) at the INB-UNAM Microscopy Unit, and Adriana González Gallardo at the INB-UNAM Proteogenomic Unit.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lu, M.; Flanagan, J.U.; Langley, R.J.; Hay, M.P.; Perry, J.K. Targeting growth hormone function: Strategies and therapeutic applications. *Sig. Transduct. Target Ther.* **2019**, *4*. [CrossRef]
2. Seoane, L.M.; Tovar, S.; Dieguez, C. Physiology of the hypothalamus pituitary unit. In *Hypothalamic-Pituitary Diseases*, 1st ed.; Casanueva, F., Ghigo, E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 1–33. [CrossRef]
3. Stojilkovic, S.S. Signaling pathways regulating pituitary functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *463*, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
4. Mayo, K.E.; Godfrey, P.A.; Suhr, S.T.; Kulik, D.J.; Rahal, J.O. Growth hormone-releasing hormone: Synthesis and signaling. *Proc. Laurent. Horm. Conf.* **1995**. [CrossRef]
5. Harvey, S.; Arámburo, C. Growth hormone: Not just a pituitary endocrine. *J. Endocr. Disord.* **2017**, *4*, 2–4.

6. Harvey, S.; Baudet, M.L. Extrapituitary growth hormone and growth? *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *205*, 55–61. [\[CrossRef\]](#)
7. Marsh, J.A.; Johnson, B.E.; Lillehoj, H.S.; Scanes, C.G. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune thyroiditis (obese) strain chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1992**, *199*, 114–122. [\[CrossRef\]](#)
8. Villanua, M.A.; Szary, A.; Bartke, A.; Esquifino, A.I. Changes in lymphoid organs of Ames dwarf mice after treatment with growth hormone, prolactin or ectopic pituitary transplants. *J. Endocrinol. Invest.* **1992**, *15*, 587–595. [\[CrossRef\]](#)
9. Murphy, W.J.; Durum, S.K.; Longo, D.L. Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function. *J. Exp. Med.* **1993**, *178*, 231–236. [\[CrossRef\]](#)
10. Yoshida, A.; Ishioka, C.; Kimata, H.; Mikawa, H. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free medium. *Acta Endocrinol.* **1992**, *126*, 524–529. [\[CrossRef\]](#)
11. Jeay, S.; Sonenshein, G.E.; Postel-Vinay, M.C.; Kelly, P.A.; Baixeras, E. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: New insights into signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *188*. [\[CrossRef\]](#)
12. Bodart, G.; Farhat, K.; Charlet-Renard, C.; Salvatori, R.; Geenen, V.; Martens, H. The somatotrope growth hormone-releasing hormone/growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in immunoregulation and immunosenescence. *Front. Horm. Res.* **2017**, *48*, 147–159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Zandvliet, M. Canine lymphoma: A review. *Vet. Q.* **2016**, *36*, 76–104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Hattori, N.; Kitagawa, K.; Inagaki, C. Human lymphocytes express hGH-N gene transcripts of 22 kDa, 20 kDa and minor forms of GH, but not hGH-V gene. *Eur. J. Endocrinol.* **1999**, *141*, 413–418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Chen, H.T.; Schuler, L.; Schultz, R.D. Growth hormone and Pit-1 expression in bovine fetal lymphoid cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* **1997**, *14*, 399–407. [\[CrossRef\]](#)
16. Rohn, W.M.; Weigent, D.A. Cloning and nucleotide sequencing of rat lymphocyte growth hormone cDNA. *Neuroimmunomodulation* **1995**, *2*, 108–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Weigent, D.A. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell. Immunol.* **2013**, *285*, 118–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Luna, M.; Barraza, N.; Berumen, L.; Carranza, M.; Pedernera, E.; Harvey, S.; Arámburo, C. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *144*, 28–37. [\[CrossRef\]](#)
19. Render, C.L.; Hull, K.L.; Harvey, S. Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine* **1995**, *3*, 729–735. [\[CrossRef\]](#)
20. Nera, K.P.; Kyläniemi, M.K.; Lassila, O. Bursa of Fabricius. *ELS* **2015**. [\[CrossRef\]](#)
21. Luna, M.; Rodríguez-Méndez, A.J.; Berumen, L.; Carranza, M.; Riesgo-Escovar, J.; Baudet, M.-L.; Harvey, S.; Arámburo, C. Immune growth hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, *32*, 1313–1325. [\[CrossRef\]](#)
22. Rodríguez-Méndez, A.J.; Luna-Acosta, J.L.; Carranza, M.; Harvey, S.; Arámburo, C.; Luna, M. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: Causal relationships? *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, *167*, 297–307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Luna, M.; Rodríguez-Méndez, A.J.; Luna-Acosta, J.L.; Carranza, M.; Arámburo, C. Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2013**, *190*, 182–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Luna-Acosta, J.L.; Alba-Betancourt, C.; Martínez-Moreno, C.G.; Ramírez, C.; Carranza, M.; Luna, M.; Arámburo, C. Direct antiapoptotic effects of growth hormone are mediated by PI3K/AKT pathway in the chicken bursa of Fabricius. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2015**, *224*, 148–159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ferone, D.; Van Hagen, P.M.; Semino, C.; Dalm, V.A.; Barreca, A.; Colao, A.; Lamberts, S.W.; Minuto, F.; Hofland, L.J. Somatostatin receptor distribution and function in immune system. *Dig. Liver Dis.* **2004**, *36*, 68–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Kamath, J.; Yarbrough, G.G.; Winokur, A.J.P., Jr. The thyrotropin-releasing hormone (TRH) immune system homeostatic hypothesis. *Pharmacol. Ther.* **2009**, *121*, 20–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Tang, W.E.; Wang, Y.G.; Zhu, L.; Wan, M.H.; Chen, G.Y.; Xia, Q.; Huang, X. Effect of somatostatin on immune inflammatory response in patients with severe acute pancreatitis. *J. Dig. Dis.* **2007**, *8*, 96–102. [\[CrossRef\]](#)

28. Schneider, K.; Kothlow, S.; Schneider, P.; Tardivel, A.; Göbel, T.; Kaspers, B.; Staeheli, P. Chicken BAFF-A highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *Int. Immunol.* **2004**, *16*, 139–148. [CrossRef]
29. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef]
30. Vandemospele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *7*. [CrossRef]
31. Veiga-Fernandes, H.; Mucida, D. Neuro-immune interactions at barrier surfaces. *Cell* **2016**, *165*, 801–811. [CrossRef]
32. Rohrbasser, L.J.; Alsaffar, H.; Blair, J. The Hypothalamus–Pituitary Axis. In *Principles of Endocrinology and Hormone Action*; Belfiore, A., LeRoith, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 154–196. [CrossRef]
33. Arámburo, C.; Alba-Betancourt, C.; Luna, M.; Harvey, S. Expression and function of growth hormone in the nervous system: A brief review. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *203*, 35–42. [CrossRef] [PubMed]
34. Hattori, N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.* **2009**, *19*, 187–197. [CrossRef]
35. Ko, K.H.; Lee, L.K.; Kim, G.; Gu, M.J.; Kim, H.Y.; Park, B.C.; Park, T.S.; Han, S.H.; Yun, C.H. Changes in bursal B cells in chicken during embryonic development and early life after hatching. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
36. Quintanar, J.L.; Guzmán-Soto, I. Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Front. Integr. Neurosci.* **2013**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
37. Piórkowska, K.; Zukowski, K.; Poltowicz, K.; Nowak, J.; Wojtysiak, D.; Derebecka, N.; Wesoly, J.; Ropka-Molik, K. Transcriptomic changes in broiler chicken hypothalamus during growth and development. *Int. J. Genom.* **2018**, *2018*, 6049469. [CrossRef] [PubMed]
38. Anderson, L.L.; Scanes, C.G. Minireview: Nanobiology and physiology of growth hormone secretion. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *237*, 126–142. [CrossRef]
39. De Groef, B.; Geris, K.L.; Manzano, J.; Bernal, J.; Millar, R.P.; Abou-Samra, A.B.; Porter, T.E.; Iwasawa, A.; Kühn, E.R.; Darras, V.M. Involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor, somatostatin receptor subtype 2 and corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in the control of chicken thyrotropin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2003**, *203*, 33–39. [CrossRef]
40. Richards, M.P.; Poch, S.M.; McMurtry, J.P. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2006**, *145*, 298–310. [CrossRef]
41. Wang, Y.; Li, J.; Wang, C.Y.; Kwok, A.Y.; Zhang, X.; Leung, E.C. Characterization of the receptors for chicken GHRH and GHRH-related peptides: Identification of a novel receptor for GHRH and the receptor for GHRH-LP (PRP). *Domest. Anim. Endocrinol.* **2010**, *38*, 13–31. [CrossRef]
42. Meng, F.; Huang, G.; Gao, S.; Li, J.; Yan, Z.; Wang, Y. Identification of the receptors for somatostatin (SST) and cortistatin (CST) in chickens and investigation of the roles of cSST28, cSST14, and cCST14 in inhibiting cGHRH1-27NH₂-induced growth hormone secretion in cultured chicken pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *384*, 83–95. [CrossRef]
43. Csaba, G. Hormones in the immune system and their possible role. A critical review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2014**, *61*, 241–260. [CrossRef] [PubMed]
44. Saito, Y.; Mekuchi, M.; Kobayashi, N.; Kimura, M.; Aoki, Y.; Masuda, T.; Azuma, T.; Fukami, M.; Iigo, M.; Yanagisawa, T. Molecular cloning, molecular evolution and gene expression of cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes in a teleost, the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2011**, *174*, 80–88. [CrossRef] [PubMed]
45. Fukusumi, S.; Ogi, K.; Onda, H.; Hinuma, S. Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat peripheral tissues. *Regul. Pept.* **1995**, *57*, 115–121. [CrossRef]
46. Raiden, S.; Polack, E.; Nahmod, V.; Labeur, M.; Holsboer, E.; Arzt, E. TRH receptor on immune cells: In vitro and in vivo stimulation of human lymphocyte and rat splenocyte DNA synthesis by TRH. *J. Clin. Immunol.* **1995**, *15*, 242–249. [CrossRef] [PubMed]
47. Frohman, L.A.; Kineman, R.D. Growth hormone-releasing hormone: Discovery, regulation, and actions. In *Handbook of Physiology: Hormonal Control of Growth*; Kostyo, J., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1999; pp. 189–221.

48. Martínez-Moreno, C.G.; López-Marín, L.M.; Carranza, M.; Giterman, D.; Harvey, S.; Arámburo, C.; Luna, M. Growth hormone (GH) and GH-releasing hormone (GHRH): Co-localization and action in the chicken testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *199*, 38–45. [CrossRef] [PubMed]
49. Martínez-Moreno, C.G.; Giterman, D.; Henderson, D.; Harvey, S. Secretagogue induction of GH release in QNR/D cells: Prevention of cell death. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *203*, 274–280. [CrossRef] [PubMed]
50. Guarcello, V.; Weigent, D.A.; Blalock, J.E. Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell. Immunol.* **1991**, *136*, 291–302. [CrossRef]
51. Weigent, D.A. Expression of lymphocyte-derived growth hormone (GH) and GH-releasing hormone receptors in aging rats. *Cell. Immunol.* **2013**, *282*, 71–78. [CrossRef]
52. Chan, K.W.; Yu, K.L.; Rivier, J.; Chow, B.K.C. Identification and characterization of a receptor from goldfish specific for a teleost growth hormone-releasing hormone-like peptide. *Neuroendocrinology* **1998**, *68*, 44–56. [CrossRef]
53. Khandelwal, N.; Breinig, M.; Speck, T.; Michels, T.; Kreutzer, C.; Sorrentino, A.; Sharma, A.K.; Umansky, L.; Conrad, H.; Poschke, I.; et al. A high-throughput RNAi screen for detection of immune-checkpoint molecules that mediate tumor resistance to cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 450–463. [CrossRef]
54. Wang, C.Y.; Wang, Y.; Li, J.; Leung, F.C. Expression profiles of growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone receptor during chicken embryonic pituitary development. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 569–576. [CrossRef] [PubMed]
55. Gnanapavan, S.; Kola, B.; Bustin, S.A.; Morris, D.G.; McGee, P.; Fairclough, P.; Korbonits, M. The tissue distribution of the mRNA of Ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *JCEM* **2002**, *87*, 2988–2991. [CrossRef] [PubMed]
56. Hattori, N.; Saito, T.; Yagyu, T.; Jiang, B.H.; Kitagawa, K.; Inagaki, C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and Ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 4284–4291. [CrossRef] [PubMed]
57. Tanaka, M.; Miyazaki, T.; Yamamoto, I.; Nakai, N.; Ohta, Y.; Tsushima, N.; Wakita, M.; Shimada, K. Molecular characterization of chicken growth hormone secretagogue receptor gene. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *134*, 198–202. [CrossRef]
58. Yu, Y.; Zhang, Y.H.; Xu, Z.Y.; Liu, T.Y.; Wang, Q.X.; Ou, C.B.; Ma, J.Y. Effects of IBDV infection on expression of ghrelin and ghrelin-related genes in chicken. *Poult. Sci.* **2018**, *98*, 119–127. [CrossRef] [PubMed]
59. Harvey, S.; Baidwan, J.S. Thyroidal inhibition of growth hormone secretion in fowl: Tri-iodothyronine-induced down-regulation of thyrotrophin-releasing hormone-binding sites on pituitary membranes. *J. Mol. Endocrinol.* **1990**, *4*, 127–134. [CrossRef] [PubMed]
60. Harvey, S. Thyrotrophin-releasing hormone: A growth hormone-releasing factor. *J. Endocrinol.* **1990**, *3*, 345–358. [CrossRef]
61. Pintér, E.; Helyes, Z.; Szolcsányi, J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Therap.* **2006**, *112*, 440–456. [CrossRef]
62. Gahete, M.D.; Durán-Prado, M.; Luque, R.M.; Martínez-Fuentes, A.J.; Quintero, A.; Gutiérrez-Pascual, E.; Córdoba-Chacón, J.; Malagón, M.M.; Gracia-Navarro, F.; Castaño, J.P. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes. Lessons from comparative endocrinology. *Trends Comp. Endocrinol. Neurobiol.* **2009**, *1163*, 137–153. [CrossRef]
63. Bossis, I.; Porter, T.E. Identification of the somatostatin receptor subtypes involved in regulation of growth hormone secretion in chickens. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2001**, *182*, 203–213. [CrossRef]
64. Harvey, S.; Scanes, C.G.; Chadwick, A. The effect of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and somatostatin (GHRH) on growth hormone and prolactin secretion in vitro and in vivo in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Neuroendocrinology* **1978**, *26*, 249–260. [CrossRef] [PubMed]
65. Hattori, N.; Shimatsu, A.; Sugita, M.; Kumagai, S.; Imura, H. Immunoreactive growth hormone (GH) secretion by human lymphocytes: Augmented release by exogenous GH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 396–401. [CrossRef]

66. Hattori, N.; Ikekubo, K.; Ishihara, T.; Moridera, K.; Hino, M.; Kurahachi, H. Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-releasing hormone and somatostatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1994**, *79*, 1678–1680. [CrossRef]
67. Ben-Shlomo, A.; Pichurin, O.; Khalafi, R.; Zhou, C.; Chesnokova, V.; Ren, S.-G.; Liu, N.-A.; Melmed, S. Constitutive somatostatin receptor subtype 2 activity attenuates GH synthesis. *Endocrinology* **2013**, *154*, 2399–2409. [CrossRef] [PubMed]
68. Sugihara, H.; Minami, S.; Okada, K.; Kamegai, J.; Hasegawa, O. Somatostatin reduces transcription of the growth hormone gene in rats. *Endocrinology* **1993**, *132*, 1225–1229. [CrossRef] [PubMed]
69. Morishita, M.; Iwasaki, Y.; Onishi, A.; Asai, M.; Mutsuga, N.; Yoshida, M.; Oiso, Y.; Inoue, K.; Murohara, T. The effects of GH-releasing hormone/somatostatin on the 5'-promoter activity of the GH gene in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, *31*, 441–448. [CrossRef]
70. Ben-Shlomo, A.; Melmed, S. Hypothalamic regulation of anterior pituitary function. In *The Pituitary*, 4th ed.; Ben-Shlomo, A., Ed.; Elsevier: London, UK, 2017; pp. 23–45. [CrossRef]
71. Xia, T.; Zhang, Q.; Xiao, Y.; Wang, C.; Yu, J.; Liu, H.; Liu, B.; Zhang, Y.; Chen, S.; Liu, Y.; et al. CREB/TRH pathway in the central nervous system regulates energy expenditure in response to deprivation of an essential amino acid. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 105–113. [CrossRef]
72. Ben-Shlomo, A.; Melmed, S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 123–133. [CrossRef]
73. Heisler, S.; Reisine, T.D.; Hook, V.Y.H.; Axelrod, J. Somatostatin inhibits multireceptor stimulation of cyclic AMP formation and corticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6502–6506. [CrossRef]
74. Eigler, T.; Ben-Shlomo, A. Somatostatin system: Molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, R1–R19. [CrossRef]
75. Trebak, M.; Kinet, J.P. Calcium signaling in T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 154–159. [CrossRef] [PubMed]
76. Ritchie, A.K. Thyrotropin releasing hormones stimulates calcium activated potassium current in a rat anterior pituitary cell line. *J. Physiol.* **1987**, *385*, 611–625. [CrossRef]
77. Carew, M.A.; Mason, W.T. Control of Ca²⁺ entry into rat lactotrophs by thyrotropin-releasing hormone. *J. Physiol.* **1995**, *486*, 349–360. [CrossRef] [PubMed]
78. Lorsignol, A.; Taupignon, A.; Horvath, G.; Dufy, B. Intracellular calcium concentration and hormone secretion are controlled differently by TRH in rat neonatal lactotrophs and somatotrophs. *J. Endocrinol.* **1997**, *154*, 483–494. [CrossRef] [PubMed]
79. Cervia, D.; Petrucci, C.; Bluet-Pajot, M.T.; Epelbaum, J.; Bagnoli, P. Inhibitory control of growth hormone secretion by somatostatin in rat pituitary GC cells: sst2 but not sst1 receptors are coupled to inhibition of single-cell intracellular free calcium concentrations. *Neuroendocrinology* **2001**, *76*, 99–110. [CrossRef] [PubMed]
80. Roskopf, D.; Schucks, M.; Manthey, L.; Joisten, M.; Busch, S.; Siffert, W. Signal transduction of somatostatin in human B lymphoblasts. *Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *284*, C179–C190. [CrossRef] [PubMed]
81. Chen, L.; Ran, M.J.; Shan, X.X.; Cao, M.; Cao, P.; Yang, X.M.; Zhang, S.Q. BAFF enhances B-cell-mediated immune response and vaccine-protection against a very virulent IBDV in chickens. *Vaccine* **2009**, *27*, 1393–1399. [CrossRef]
82. Mackay, F.; Browning, J.L. BAFF: A fundamental survival factor for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 465–475. [CrossRef]
83. Tennat, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* **1964**, *2*, 685–694. [CrossRef]
84. Martínez-Moreno, C.G.; Ávila-Mendoza, W.Y.; Arellanes-Licea, E.C.; Louie, M.; Luna, M.; Arámburo, C.; Harvey, S. Neuroprotection by GH against excitotoxic-induced cell death in the retinal ganglion cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2016**, *234*, 68–80. [CrossRef]
85. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [CrossRef] [PubMed]

86. Negritto, M.C.; Manthey, G.M. Overview of blotting. *Curr. Protoc.* **2016**, *13*, 8.1.1–8.1.22. [CrossRef]
87. Luna, M.; Huerta, L.; Berumen, L.; Martínez-Coria, H.; Harvey, S.; Arámburo, C. Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: Heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2004**, *137*, 37–49. [CrossRef] [PubMed]
88. Martínez-Coria, H.; López-Rosales, L.J.; Carranza, M.; Berumen, L.; Luna, M.; Arámburo, C. Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* **2003**, *17*, 91–102. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Dirección General de Bibliotecas UAQ