



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO (GH) EXÓGENA DESPUÉS DE UN DAÑO PROVOCADO POR
HIPOXIA EN CEREBELO DE EMBRIÓN DE POLLO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q.F.I. JANETH MORA ZENIL

TUTOR:

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MA. TERESA MORALES GUZMAN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. J. FERNANDO PEÑA ORTEGA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MÉXICO, Campus Juriquilla, Qro; agosto de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México, Campus Juriquilla, teniendo como jefe de grupo al Dr. Carlos Aramburo de la Hoz, y bajo la dirección de la Dra. Maricela Luna Muñoz.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGPA-PAPIIT-IN206813 e IN206115, además del apoyo económico del CONACYT No. 178335. El autor contó con beca del CONACYT no. 302253, periodo 2013-2015.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por permitirme incorporarme al laboratorio, por su asesoría, por aguantarme en todo momento, por la confianza y el apoyo brindados, y por todo el tiempo dedicado a mí en el microscopio confocal.

A la Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán y el Dr. J. Fernando Peña Ortega, que formaron parte de mi comité tutor, por la asesoría y los consejos dados para mejorar este proyecto, así como el apoyo brindado para mi formación profesional y académica.

Al Dr. Mauricio Días Muñoz, la Dra. Ma. de la Luz Navarro Angulo y Dra. Magdalena Giordano Noyola por sus comentarios, los cuales favorecieron el contenido de esta tesis.

A la M en C Martha Carranza Salas por la paciencia, el tiempo, por ir por los embriones, por aguantarme y resolverme todas mis dudas, por ayudarme en mi formación académica y enseñarme todo lo que sabe.

A Gerardo Curtois por el apoyo técnico brindado y aguantarme en todo momento.

A Nydia Hernández Ríos por el apoyo técnico brindado en el uso del microscopio apotom y confocal.

A la Bióloga María Eugenia Ramos Aguilar por el apoyo técnico brindado.

A la M en C Leonor Casanova por resolverme todas mis dudas, la amabilidad y el apoyo brindado en todos los trámites administrativos.

A mis compañeros de laboratorio José Luis, Maricelita, Pepe, Santiago, Rosario, Valeria, Nancy y Martha Elena por enseñarme lo que saben y por los buenos momentos brindados.

A la compañía Pilgrims Pride, Querétaro, la cual dono los embriones necesarios para este proyecto.

A los embriones que dieron su vida por este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanas por entender y aceptar mis decisiones aunque a veces sean difíciles de entender, por cuidarme y apoyarme a pesar de estar un poquito lejos.

A mi novio por siempre estar ahí en las buenas y malas, por los consejos, por buscar alegrarme cuando estoy deprimida, por confiar en mí y obligarme a hacer las cosas que no quiero solo por miedo.

A la familia de mi novio por el apoyo y cariño brindados durante este tiempo, y por invitarme siempre a seguir adelante.

A mi tía Rosa por apoyar a mi familia y a mí en momentos difíciles, principalmente por el apoyo a mis hermanas que a veces no les puedo dar.

A mis amigos Susana, Amhed, Edgar por el tiempo, el apoyo y la confianza brindados durante todo este tiempo.

A mi amiga Anaí por el apoyo brindado, incluso cuando no nos conocíamos mucho y por los buenos momentos que me hiciste pasar.

ÍNDICE TEMÁTICO

Índice temático	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Abreviaturas	v
Resumen	1
Abstract	3
Antecedentes	5
1) Encefalopatía hipóxico-isquémica (HI)	5
2) Hormona del crecimiento y su estructura	8
3) Receptor de la hormona del crecimiento y su estructura	9
4) Mecanismo de acción de la hormona del crecimiento	10
5) Hormona del crecimiento y el sistema nervioso central	11
6) Papel neuroprotector de la hormona del crecimiento	13
Justificación	16
Hipótesis	16
Objetivos	17
1) Objetivos generales	17
2) Objetivos específicos	17
Materiales y métodos	18
1) Materiales	18
2) Métodos	18
Distribución de GH en el SNC	19
Distribución de rcGH-Cy3	19
Integridad de GH-Cy3	20
Inmunohistoquímica para GHR	20
SDS-Western Blot de GH y Cy3	20
Determinación del efecto neuroprotector de GH	22
Evaluación de la expresión de HIF-1 α	22

Evaluación de apoptosis por el ensayo de TUNEL	22
Evaluación de la actividad de caspasa-3	23
Análisis estadístico	24
Resultados	25
1) Distribución de GH en el SNC	25
a) Controles	25
b) Cerebelo	27
c) Cerebro	30
2) Efecto neuroprotector de GH	34
a) Expresión de HIF-1 α	34
b) Actividad de caspasa-3	35
c) Evaluación de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL	36
Discusión	37
Conclusiones	42
Bibliografía	43

ÍNDICE DE TABLAS

1) Distribución de GH y su receptor a lo largo del SNC de diversas especies	12
2) Efecto neuroprotector posterior a la administración de GH	15
3) Condiciones para los diferentes grupos experimentales	18

ÍNDICE DE FIGURAS

1) Cascada de señalización producida por hipoxia-isquemia	6
2) Estructura de la GH	9
3) Mecanismo de acción de la GH	10
4) Diseño experimental	19
5) Imágenes representativas de GH-Cy3 en hígado	25
6) Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de hígado	26
7) Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en hígado	27
8) Imágenes representativas de GH-Cy3 en cerebelo	28
9) Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de cerebelo	29
10) Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en cerebelo	30
11) Imágenes representativas GH-Cy3 de cerebro	31
12) Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de cerebro	33
13) Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en cerebro	33
14) Proporción relativa de HIF 1 α en normoxia e hipoxia	35
15) Actividad de caspasa-3	35
16) Evaluación de TUNEL	36

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AIF	Factor inductor de apoptosis
ATP	Adenosín trifosfato
APV	Área periventricular
BBB	Barrera Hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CHAPS	3-[3-cloramidopropil)dimetilamonio]-1-propanilsulfonato
CORT	Corteza
CP	Células de Purkinje
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DI	Días de incubación
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eGr	Capa granular externa
EPO	Eritropoyetina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GH	Hormona del Crecimiento
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento
Gr	Capa granular interna
GLUT	Transportador de glucosa
H	Hipoxia
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanil sulfónico
HIF 1 α	Factor inducido por hipoxia 1 α
HI	Hipóxico-isquémico
HPC	Hipocampo
HPT	Hipotálamo
HRP	Peroxidasa de rábano
ICV	Intracerebroventricular
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulínico tipo 1

IP3K	Cinasa del fosfatidil-inositol trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
JAK2	Janus cinasa 2
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
Mo	Capa molecular
N	Normoxia
NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PBS	Buffer de fosfatos salino
PKC	Proteína cinasa C
PXC	Plexos coroideos
rcGH	Hormona del crecimiento recombinante
s.c.	Subcutánea
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
SS	Solución salina
TBS	Buffer Tris-salino
TPBS	Buffer de fosfatos salino con tritón
TTBS	Buffer Tris-salino con tritón o tween
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

El daño hipóxico-isquémico originado por asfixia tanto prenatal, como perinatal es una de las mayores causas de discapacidad y muerte en recién nacidos. Cuando se presenta un daño, como es el hipóxico-isquémico, el cerebro activa mecanismos neuroprotectores endógenos, uno de ellos es aumentar la producción de diversos factores neurotróficos en las áreas de daño cerebral tales como hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1), entre otros. Estudios previos del laboratorio han mostrado que la administración de GH durante un daño por hipoxia y baja glucosa, aumenta la viabilidad celular en cultivos primarios neuronales y organotípicos de cerebelo de embriones de pollo (Alba-Betancourt y cols, 2013; Córdoba, 2011). Por lo que en esta tesis se determinó el efecto neuroprotector de GH administrada *in vivo* en cerebelo de embriones de pollo de 15 días de incubación (15DI) después de ser sometidos a hipoxia.

Los resultados mostraron que después de la administración en la vena corioalantoidea de GH marcada con Cy3, ésta puede atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia y así ejercer sus efectos directamente en el SNC. Se pudo observar que GH pasa la BBB, localizándose en los plexos coroideos, corteza cerebral, áreas periventriculares, hipotálamo, hipocampo y cerebelo en ambas condiciones de oxigenación, pero en mayor proporción (2.81 ± 0.27 veces) en cerebelo de animales sometidos a hipoxia. Aunado a lo anterior se observó que GH-Cy3 co-localiza específicamente con su receptor en aquellas áreas donde el receptor está presente como plexos coroideos, cerebelo e hipotálamo en ambas condiciones de oxigenación. Por otra parte para señalar que la marca podía corresponder a GH-Cy3 y no Cy3 libre, mediante SDS-PAGE Western Blot contra Cy3 se determinó una banda de 26 KDa, peso de la GH en condiciones reductoras. Como control del modelo de hipoxia se cuantificó el factor de transcripción HIF-1 α y se corroboró que 24h de hipoxia incrementaron significativamente (2.44 ± 0.39 veces) este factor de transcripción.

Para evaluar el efecto antiapoptótico de la GH se realizó el ensayo de actividad de caspasa 3 y el ensayo de TUNEL. Los resultados mostraron que una sola dosis de GH disminuye la actividad de caspasa-3 a $87.13 \pm 7.38\%$ con respecto al grupo control sometido a hipoxia (100%), sin ser estadísticamente diferente con respecto a normoxia e hipoxia administrados con solución salina. En el caso del ensayo de TUNEL el grupo tratado con GH disminuyó significativamente a $61.56 \pm 6.30\%$ con respecto al grupo control mantenido en hipoxia (100%), pero no del mantenido en normoxia. En conclusión se observó que la GH puede atravesar la BBB encontrándose en plexos coroideos, corteza, áreas periventriculares, hipotálamo, hipocampo y cerebelo, incrementando su permeabilidad en cerebelo cuando los animales son sometidos a hipoxia. Se encontró un incremento significativo de HIF 1 α en el grupo sometido a hipoxia, lo que muestra que el modelo es funcional. Además se observó el efecto antiapoptótico de la GH bajo las condiciones aquí utilizadas mediante el ensayo de TUNEL.

ABSTRACT

Hypoxic injury in the developing brain results in major physical and cognitive disabilities, and even death in newborn infants. We know that after an insult to the brain there is an increase of neurotrophic factors in damaged brain areas, such as growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1, and others, as a neuroprotector strategy. We have shown that GH has a neuroprotective effect in cerebellar neurons and organotypic cultures after hypoxia and low glucose conditions (Alba-Betancourt y cols, 2013; Córdoba, 2011). Therefore we investigated the neuroprotective effect of the GH *in vivo* in the cerebellum of chicken embryos of 15 incubation days (15 ED) after hypoxic injury.

We evaluated whether the GH crosses the brain-blood barrier (BBB) in normoxic and hypoxic conditions, and so it may have direct effects in the CNS. We injected intravenously GH-Cy3 into the chorioallantoic vein of chicken embryos after hypoxia or normoxia. Two hours after administration of GH-Cy3 it was found in cells of the hippocampus, hypothalamus, choroid plexus, periventricular area, cortex and cerebellum (Purkinje cells, granular neurons and deep nucleus) in both conditions. The GH-Cy3 presence was significantly higher in cerebellum (2.81 ± 0.27 fold) of the hypoxic group with respect to the normoxia group. Furthermore, GH-Cy3 co-localized with its receptor and it was detected as a 26 KDa band by SDS-PAGE Western Blot, indicating that the observed signal is possibly GH-CY3. On the other hand, we determined the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF 1 α) as a control for our hypoxia model. We detected HIF 1 α as a 120 KDa band and it increased significantly in cerebellum (2.44 ± 0.39 fold) of chicken embryos under hypoxic with respect to normoxic conditions. To test the neuroprotective effect of GH we determined caspase-3 activity 24 h after GH administration. The treatment with GH decreased caspase-3 activity to $87.13 \pm 7.38\%$ with respect to the hypoxia group (100%), although it was not statistically significant of both controls. However, the treatment with GH significantly decreased the signal of TUNEL assay to $61.56 \pm 6.30\%$ with respect to the hypoxic group (100%). In conclusion, we observed that GH can cross the BBB, because we detected the signal in choroid plexus, cortex, periventricular areas, hypothalamus, hippocampus and cerebellum. An

increase in GH permeability in cerebellum was observed when animals are subjected to hypoxia. On the other hand, we observed a significant increase in HIF 1 α in the group subjected to hypoxia which shows that this model is functional. In addition an antiapoptotic effect of GH, measured by the TUNEL assay, was observed under the conditions used here.

ANTECEDENTES

1) Encefalopatía hipóxico- isquémica (HI)

El cerebro es un órgano vulnerable a diversos factores ambientales externos, uno de ellos es la hipoxia, la cual si se presenta durante ciertos periodos del desarrollo puede afectar procesos de maduración y diferenciación celular (Nyakas y cols, 1996). Ejemplo de ello es la encefalopatía hipóxico-isquémico que se presenta en aproximadamente 2 de cada 1000 recién nacidos, de los cuales se calcula que aproximadamente 10-15% de los neonatos mueren, 10-15% desarrollan parálisis cerebral y más del 40% tienen otro tipo de discapacidades como problemas visuales y auditivos, problemas cognitivos, de comportamiento, atención y para sociabilizar, así como discapacidades motoras, epilepsia y autismo (Goñi de Cerio y cols, 2013; Vannucci y Hagberg, 2004).

El mecanismo por el cual se genera el daño hipóxico-isquémico (HI) aún no está completamente comprendido. Se ha observado que posterior al daño ocurren dos fases de muerte celular: La fase aguda o inmediata y la fase crónica o tardía. La Figura 1 resume el mecanismo de daño generado por HI. Inicialmente la hipoxia aumenta el metabolismo anaerobio, produciendo acidosis metabólica y deprimiendo la función del miocardio, lo que provoca hipotensión e isquemia cerebral, y éstos a su vez provocan una falla energética. La falla energética afecta el funcionamiento de los sistemas de transporte dependientes de ATP; por ejemplo las bombas $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, cuya falla conduce a pérdida de la homeostasis iónica, despolarización celular, activación de sistemas enzimáticos como sintetizas de óxido nítrico (NOS), formación de edema y lisis celular. Otro mecanismo de daño que se produce es la excitotoxicidad glutamatergica provocada por la despolarización neuronal y la falla en la recaptura de glutamato por parte de la glía, lo que lleva a activación de los receptores NMDA con incremento del Ca^{2+} intracelular y la posterior activación de fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y producción de factores pro-oxidantes, los cuales dañarán la estructura de celular. Todo lo anterior lleva a necrosis si el daño es severo, pero sí es en menor grado se inicia el proceso de apoptosis (Mödersheim, 2006; Huang y Castillo, 2008; Beilharz y cols, 1995). En la fase crónica que ocurre de 6 a 100 h después del daño, el

cerebro es reoxigenado y existe una respuesta inflamatoria activada por la glía, lo que genera hiperexcitabilidad, acumulación de citotoxinas y una falla energética tardía que lleva a la activación de las NOS, producción de radicales libres, disfunción mitocondrial y finalmente apoptosis (Mödersheim, 2006; Goñi de Cerio y cols, 2013, Inder y Volpe, 2000).

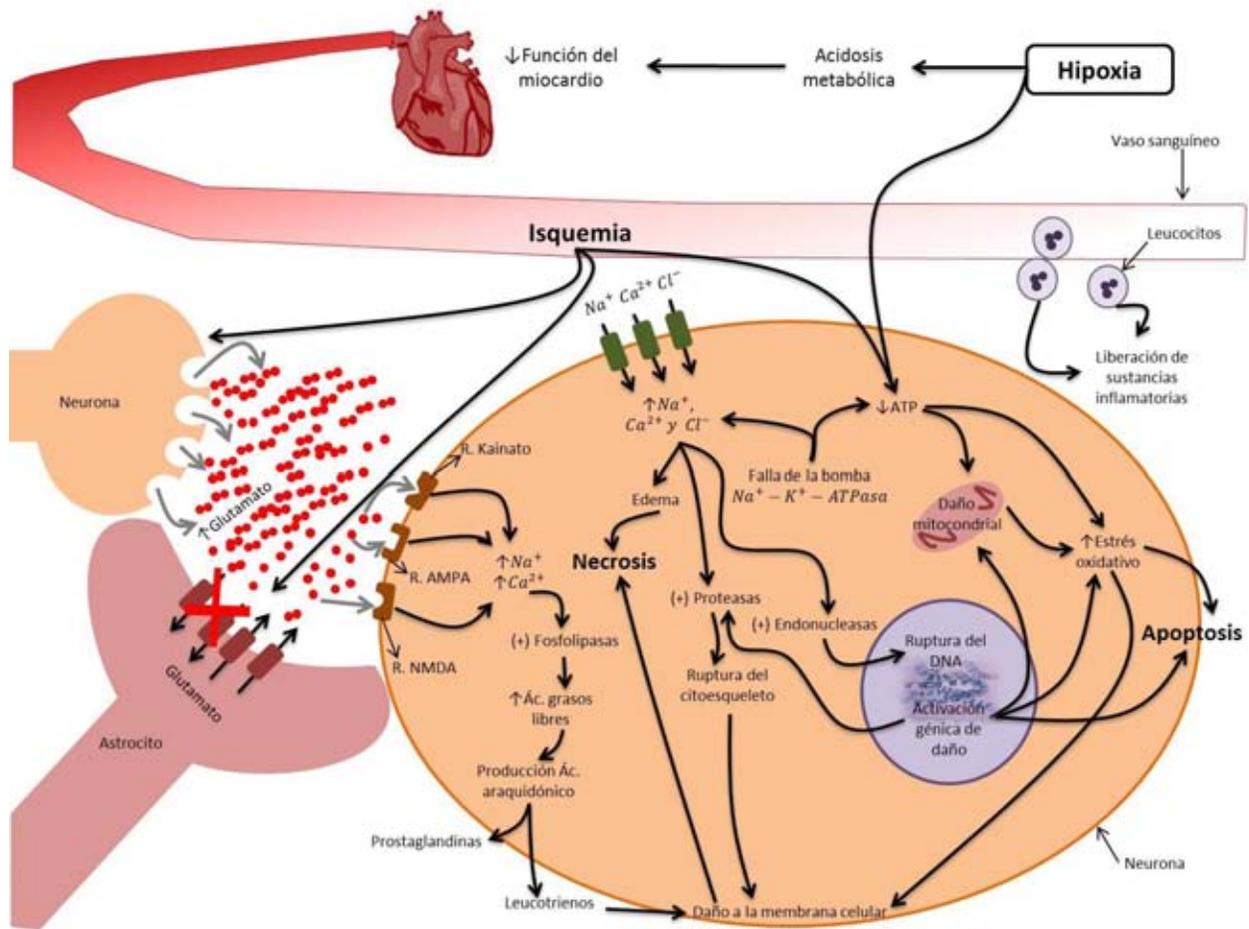


Figura 1.- Cascada de señalización producida por hipoxia-isquemia. Posterior a la hipoxia-isquemia ocurre una falla energética que genera disfunción en los sistemas dependientes de ATP que comprometen la homeostasis iónica, la polaridad neuronal y activa diferentes procesos que desembocan en muerte celular por necrosis y apoptosis.

Es importante mencionar que la extensión y gravedad del daño depende de muchos factores, entre ellos la edad gestacional, el nivel de maduración, el estado metabólico, la temperatura, la severidad del daño y la duración. Por mencionar un ejemplo, se sabe que la proporción de necrosis y apoptosis varía según la severidad del daño. La necrosis predomina en HI severas, mientras la apoptosis se presenta HI leves (Inder y Volpe, 2000; Ming-Chi y San-Nan, 2010).

Con respecto al nivel de maduración el cerebro inmaduro tiene ciertas características diferenciales con respecto al cerebro maduro, lo que les proporciona cierta resistencia y a su vez vulnerabilidad contra el daño HI. Con relación a esto se sabe que en el cerebro inmaduro:

- 1) La demanda energética es menor dependiendo del nivel de diferenciación neuronal y la actividad sináptica, lo que le proporciona cierta resistencia (Nyakas y cols, 1996; Vannucci y Hagberg, 2004).
- 2) El consumo de glucosa es solo el 10% del consumo de animales adultos, además el cerebro inmaduro puede utilizar otras fuentes de energía como el lactato y los cuerpos cetónicos y estos parecen ser suficientes para mantener el metabolismo cerebral, lo que favorece la supervivencia neuronal (Nyakas y cols, 1996; Vannucci y Hagberg, 2004).
- 3) Tiene una alta concentración de ácidos grasos insaturados, disponibilidad de hierro libre y pobre capacidad antioxidante, lo que favorece el daño oxidativo (Kleman y cols, 2010).
- 4) En cerebros inmaduros existen grupos neuronales más vulnerables debido a una mayor expresión de receptores a glutamato tipo NMDA que potencian el ataque por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Se ha observado en modelos de hipoxia/isquemia unilateral en ratas que las áreas dañadas se encuentran principalmente en la corteza cerebral, materia blanca subcortical y periventricular, tálamo, ganglios basales, hipocampo y cerebelo (Goñi de Cerio y cols, 2013; Vannucci y Haberg, 2004; Inage y cols, 1998).
- 5) La caspasa-3 se encuentra en mayores niveles en el cerebro inmaduro, lo que lleva a pensar que la apoptosis tiene un papel más importante en la muerte celular de los mismos (Goñi de Cerio y cols, 2013).

Un mecanismo endógeno de protección frente a diferentes tipos de daño en el SNC es la producción de factores de transcripción y neurotrofinas o factores de crecimiento, como por ejemplo el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF 1 α) que prepara al sistema para que responda frente a este insulto, y otros tipos de neurotrofinas como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el factor de crecimiento neural (NGF) y

hormonas entre las que se encuentra la GH, la cual aumenta la sobrevivencia celular y promueve la neurogénesis (Alba-Betancourt y cols, 2013; Regalado y cols, 2012).

2) Hormona del crecimiento y su estructura.

El término GH se usa para designar a un conjunto de péptidos sintetizados principalmente por las células somatotropas de la adenohipófisis. La variante de 22 KDa es la principal isoforma constituida por 191 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro, como se observa en la Figura 2A. En la Figura 2B se observa que este péptido está conformado por 4 α hélices donde dos son paralelas entre sí, pero antiparalelas en relación con las otras dos, conectadas a través de loops (Regalado y cols, 2012; Fernández-Tresguerres, 2010; Harvey y cols, 1994). Entre sus principales funciones están la estimulación del crecimiento somático y la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Regalado y cols, 2012). Se sintetiza principalmente en la adenohipófisis, sin embargo, diversos estudios han mostrado su expresión extrahipofisiaria, así su mensajero se ha observado en el tejido neuronal, inmune, reproductivo, muscular, tegumentario y cardiovascular, donde puede tener otras funciones además del crecimiento, desarrollo y metabolismo (Alba-Betancourt y cols, 2013).

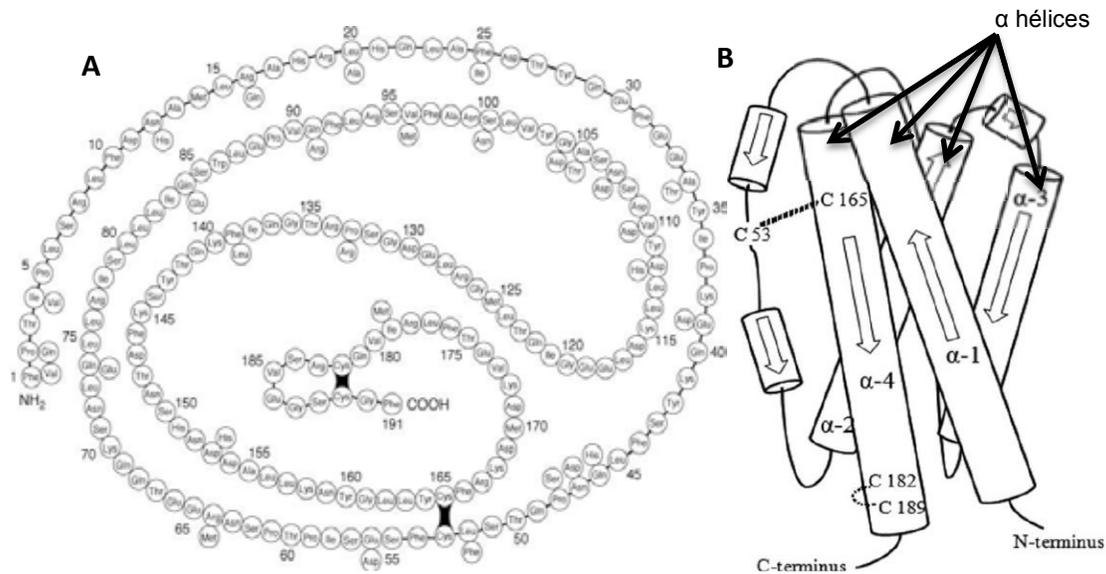


Figura 2.- Estructura de la GH. En la figura 2A se muestra la secuencia de aminoácidos, así como los dos puentes disulfuro formados entre las cisteínas 53-182 y 165-189; mientras que en la figura 2B se muestra la estructura terciaria de la GH (Tomado de Ganong; 2006 y Kaabi; 2012).

3) Receptor de la hormona del crecimiento y su estructura.

La GH puede ejercer sus efectos a través de su receptor (GHR). Este es una proteína transmembranal de la superfamilia de receptores de citosinas clase I. Como puede observarse en la figura 3 consiste de una cadena de 620 aminoácidos (aa), con una región transmembranal de 24 aa que une el dominio extracelular con el dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático de 350 aa tiene dos regiones denominadas box 1 y 2, donde se ancla a las Janus cinasa 2 (JAK2), necesarias para la transducción de la señal, mientras el dominio extracelular consiste en una cadena de 246 aa, que consta de dos subdominios, uno que interactúa con la hormona y el otro que puede asociarse con un segundo receptor para formar un dímero y ejercer así sus efectos. El GHR también presenta variantes moleculares, una de ellas es la escisión enzimática del dominio extracelular, lo que da lugar a la proteína de unión de la GH (GHPB), la cual puede modificar el tiempo de vida media de la GH secuestrándola y evitando que se una a su receptor por competencia (Nyberg, 2000; Regalado y cols, 2012; Alba-Betancourt, 2011; Mödersheim, 2006).

4) Mecanismo de acción de la hormona del crecimiento.

Para ejercer sus efectos la GH debe interactuar con su receptor en el primer subdominio, formando el complejo hormona-receptor, y posteriormente un enlace de este complejo con un segundo receptor por medio del segundo subdominio para formar un dímero como se muestra en la Figura 3. La formación de este complejo produce un cambio conformacional de la región extramembranal y transmembranal, lo que lleva a la activación de cinasas como las JAK2 y Src. Estas enzimas están asociadas al dominio intracelular del receptor y su activación resulta en la fosforilación de múltiples residuos de tirosinas, lo que lleva al reclutamiento de proteínas citoplasmáticas involucradas en diversas cascadas de señalización. Entre estas cascadas se encuentran las que involucran a: las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la activación de ERK1/2, la activación de las STAT (1,3, 5) que activan la transcripción; además de la vía de la cinasa del fosfatidil-inositol trifosfato (IP3K) y la activación de la proteína cinasa C (PKC) como se ejemplifica en la figura 3 (Nyberg, 2000; Regalado y cols, 2012; Herington, 2012).

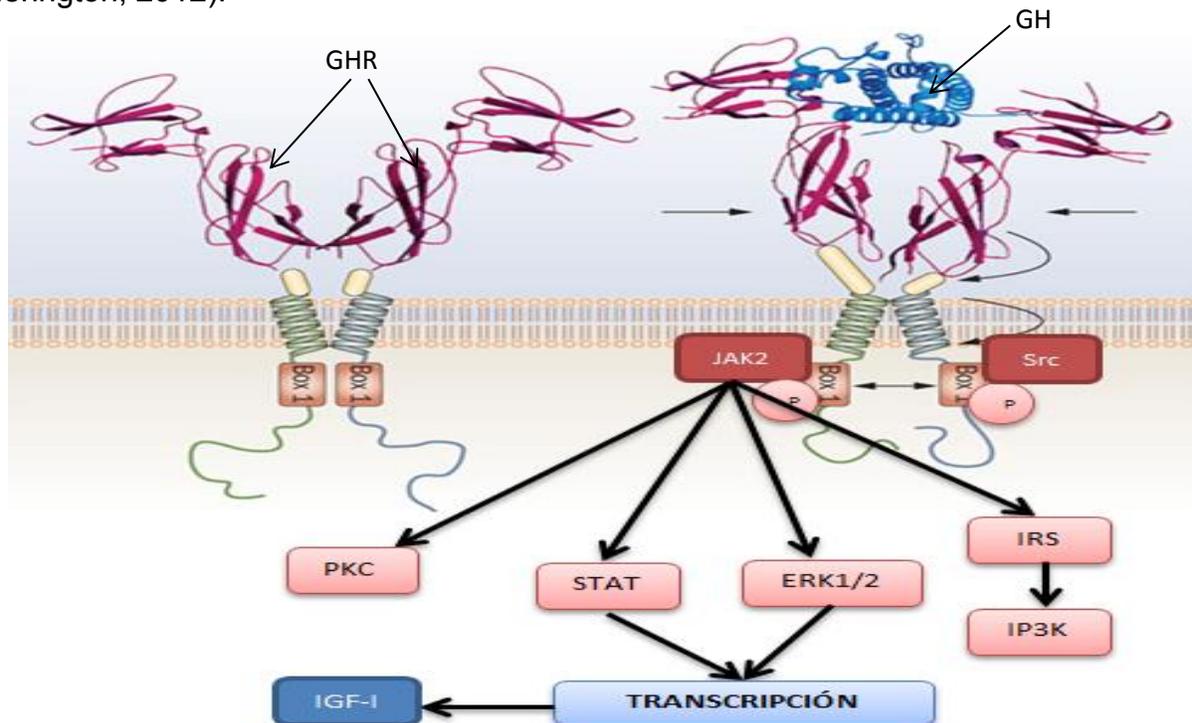


Figura 3.- Mecanismo de acción de la GH. Se observa que por una molécula de GH se une a dos moléculas de su receptor y activa la producción de IGF-1, así como varias vías de señalización como: MAPK, IP-3K, STAT y PKC.

Modificado de Brooks y Waters, 2010.

5) GH y el sistema nervioso central (SCN)

Como se mencionó anteriormente la GH se le relaciona principalmente con la estimulación del crecimiento somático y sus efectos sobre el metabolismo de carbohidratos (induce resistencia a la insulina), lípidos (estimula la lipólisis) y proteínas (estimula la síntesis proteica); sin embargo en estudios recientes su mensajero se ha encontrado en tejidos de diferentes sistemas como el: inmune, integumentario, respiratorio, renal, cardiovascular, reproductor, neuroendocrino y SNC, donde además de sus efectos endocrinos clásicos, puede tener una función autocrino-paracrina participando en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de diferentes tipos celulares (Fernández-Tresguerres, 2010; Alba-Betancourt, 2013; Regalado y cols, 2012). En el SNC de diferentes especies como: rata, mono y pollo se ha encontrado a la GH y su receptor ampliamente distribuidos. Lobie y cols. (1993) encontraron inmunoreactividad para el GHR en diferentes estructuras de cerebro de rata como: el lóbulo frontal, tálamo, cerebelo, entre otras como se muestra en la Tabla 1; y en diferentes tipos celulares como: neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglia y ependimocitos. Una distribución similar se obtuvo cuando se realizó hibridación *in situ* (Hojvat y cols, 1982; Alba-Betancourt y cols, 2011; Harvey y cols. 2003).

Tabla 1. Distribución de GH y su receptor a lo largo del SNC de diversas especies.

INMUNOREACTIVIDAD	GHR	GH
Intensa	Lóbulo frontal, tálamo, cerebelo, tronco cerebral, retina y plexo coroideo.	Amígdala, hipotálamo, núcleo caudado, tálamo, hipocampo, corteza, cerebelo, globo pálido, putamen, bulbo olfatorio, eminencia media, médula espinal, vesicular ópticas y óticas y retina.
Alta	Hipocampo, amígdala, hipotálamo, bulbo olfatorio, colículo inferior, médula espinal, lóbulo frontal, retina y tronco cerebral.	
Moderada-baja	Cerebelo, tálamo, lóbulo frontal, hipocampo, bulbo olfatorio, colículos superior e inferior, médula espinal, hipotálamo, tronco cerebral y retina.	

Estructuras del SNC de rata y pollo, donde se encontró inmunoreactividad para GH o su receptor, clasificadas según la intensidad de la tinción. Modificado de Lobie y cols, 1993; Hojvat y cols, 1982; Alba-Betancourt y cols, 2011; Harvey y cols, 2003.

Además de la GH extra-hipofisaria también la GH hipofisaria puede estar presente en el SNC ejerciendo sus funciones; sin embargo aún existe controversia acerca de si esta hormona puede atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). Las evidencias a favor son el aumento en la concentración de GH en el líquido cefalorraquídeo posterior a una dosis sistémica, así como el aumento de la radioactividad en homogenados de cerebro posterior a la administración intravenosa de 125 -GH (Coculescu, 1999; Burman y cols, 1996; Pan y cols, 2005; Stern y cols, 1975). En este contexto se ha propuesto diferentes mecanismos por los cuales la GH llega al SNC, entre ellos: la generación de fragmentos por proteólisis enzimática a fragmentos bioactivos que puedan atravesar la BBB (Nyberg, 2000). El paso de la GH por la BBB por medio de los órganos circunventriculares a través de la eminencia media del hipotálamo por ejemplo (Hallberg y Nyberg, 2012). La translocación de la GH mediante la internalización de su receptor en el endotelio vascular a través del plexo coroideo (Aberg y cols, 2006) o el paso por la BBB a través de transporte activo; en este sentido Pan y cols. (2005) mencionan que el transporte de GH al SNC no se trata de un sistema de transporte activo, sino posiblemente de difusión pasiva, ya que estos autores no encontraron saturación del

transporte al administrar GH en exceso. Por otro lado la GH puede ejercer sus efectos en el SNC por medio de la liberación de mediadores secundarios como es el caso de IGF-1, el cual sí puede cruzar la BBB.

La presencia de GH ya sea hipofisaria o extra-hipofisaria en el SNC sugiere que esta puede tener funciones directas sobre este sistema. Por ejemplo, se ha observado que en el cerebro en desarrollo esta hormona participa en la regulación de la diferenciación, proliferación y supervivencia neuronal, el crecimiento axonal, proliferación y diferenciación astrocítica, síntesis de mielina y arborización dendrítica. Los animales knockout del receptor o deficientes en GH muestran menor peso del cerebro y la médula espinal, por reducción de la neurogénesis, sinaptogénesis e hipomielinización (Arce y cols, 2013; Mödersheim, 2006). En el cerebro adulto la GH tiene efectos sobre la neurotransmisión, la memoria y el aprendizaje, el apetito, la actividad motora, efectos sobre el ciclo sueño/vigilia y provee cierto grado de neuroprotección (Regalado y cols, 2012; Harvey y cols, 1994; Nyberg, 2000; Arámbulo, 2013). En un estudio realizado por Webb y cols. (2012) observaron que los niños con deficiencia de GH obtuvieron una menor puntuación en pruebas de habilidades motoras y cognitivas (como IQ, comprensión verbal, velocidad de procesamiento, pero no en pruebas de memoria y atención) comparados con niños con baja estatura idiopática, además encontraron una disminución en el volumen del esplenio del cuerpo calloso, el globo pálido, el hipocampo derecho y el tálamo izquierdo, así como una menor integridad de la materia blanca en el tracto corticoespinal y cuerpo calloso.

6) Papel neuroprotector de la GH.

Los estudios que se han realizado en ratas sometidas a hipoxia-isquemia observaron un incremento de la expresión de GH y su receptor en las áreas dañadas y la periferia, cuya consecuencia se piensa sería la activación de rutas antiapoptóticas en una primera fase y la facilitación de la neurogénesis y migración hacia el área afectada en una segunda fase (Regalado y cols, 2012; Scheepens y cols, 2001). Por otra parte, algunos estudios han mostrado que la administración de GH posterior a una lesión por trauma por ejemplo, acelera la recuperación de algunas funciones neuronales y podría desempeñar un papel en la reparación cerebral (Arce y cols, 2013; Devesa y cols, 2013)

ya sea directamente o a través de otros factores neurotróficos conocidos como el BDNF, VEGF e IGF-I. Con respecto a este punto, se ha observado que la administración de GH mejora el aprendizaje y la memoria en ratas con daño en los núcleos basales de Meynert, provocado por ácido iboténico (Doulah y cols, 2009), mejora la actividad motora en ratas con ablación de la corteza motora y aumenta la inmunoreactividad a nestina en la corteza contralateral (Heredia y cols, 2013). La GH también aumenta la supervivencia de las células del hipocampo, contrarresta el efecto inhibitor de la privación prolongada del sueño sobre la proliferación celular (García-García y cols, 2011) y puede aumentar el número de células progenitoras en la zona sub-ventricular del hipocampo (Aberg y cols, 2009; Blackmore y cols, 2012). De manera similar estudios de Devesa y cols, (2011) *in vivo* en rata mostraron que la administración de GH durante 4 días posterior a una la lesión inducida por ácido kaínico potencia la respuesta proliferativa en el giro dentado del hipocampo.

Con respecto al efecto neuroprotector de GH frente a daño generado por hipoxia-isquemia experimentos *in vitro* mostraron que la concentración de GH aumenta un 17% y 91% en cultivos primarios y organotípicos, respectivamente, de cerebelo sometidos a hipoxia y baja glucosa (Alba-Betancourt y cols, 2013; Córdoba, 2011). *In vivo* se ha observado un aumento de la concentración e inmunoreactividad de GH entre 16% a 74% en diferentes tipos celulares de animales sometidos a este tipo de insulto (Sheepens y cols. 2001). Además de lo anterior existen evidencias de que la administración de GH tiene un efecto protector tanto *in vivo* como *in vitro*; en la Tabla 2 se muestran diferentes ejemplos realizados con animales sometidos a hipoxia-isquemia, tratados con GH y en los que se observó un efecto neuroprotector.

Tabla 2. Efecto neuroprotector posterior a la administración de GH.

Autores	Realizado en:	Adm.	Dosificación	Resultados
Córdoba M. C., 2011	Cultivos organotípicos de cerebelo	Previa	1 o 10 nM durante el daño	Disminución de la actividad de caspasa-3 con el tratamiento 1nM y de la proporción Bax/Bcl2 24 h después del daño.
Alba Betancourt y cols., 2013	Cultivos neuronales de cerebelo	Previa	1 nM durante	Aumento de la viabilidad, de la expresión de Bcl2 y disminución de la actividad de caspasa-3 24 h después del daño.
Shin D. H. y cols., 2004	Ratas de 7 días	Previa	50 mg/kg antes, 12 y 36 h. s.c.	Disminución en la inmunoreactividad de Bax, Bad, iNOS y eNOS.
Han R. T y cols, 2007	Ratas de 7 días	Previa	10 mg/kg, i.p. 10 µl, i.c.v. o i.c.v.-i.p	Disminución de la relación lípidos/N-metil aspartato y apoptosis.
Gustafson K. y cols., 1999	Ratas de 7 días	Posterior	5 mg/kg por 14 d, 50 o 100 mg/Kg por 7d. s.c.	Moderada neuroprotección por una disminución del porcentaje de reducción de peso del hemisferio dañado a 50 y 100 mg/Kg.
Scheepens A. y cols., 2001.	Ratas de 21 días	Posterior	20 µg, i.c.v.	Reducción de la pérdida neuronal en la corteza frontoparietal, hipocampo y tálamo 3 días después del daño.

Breve resumen de los resultados obtenidos por diferentes grupos, los cuales administraron GH y observaron un efecto neuroprotector. d: días, s.c: subcutánea, i.c.v: intracerebroventricular, i.p: intraperitoneal.

JUSTIFICACIÓN

La encefalopatía hipóxico-isquémica es una de las causas principales de muerte y discapacidad en recién nacidos, que resulta frecuentemente en parálisis cerebral, retraso mental, problemas de aprendizaje y epilepsia (Han T. R. y cols: 2007). Cuando esto ocurre se producen diferentes factores neurotróficos, entre ellos la GH, que pueden funcionar como agentes neuroprotectores endógenos. A pesar de esto existe un daño importante por lo que cabe la pregunta de si la adición de GH puede favorecer aún más la sobrevivencia neuronal. En relación con esto, estudios previos del laboratorio realizados *in vitro* han mostrado que la adición de GH a cultivos primarios de neuronas de cerebelo o cultivos organotípicos de cerebelo de embriones de pollo, durante un daño producido por hipoxia y baja glucosa aumenta la supervivencia neuronal e inhibe la apoptosis, por lo que es importante determinar si esto también sucede *in vivo* cuando la GH es administrada posterior al daño.

HIPÓTESIS

La administración sistémica de rcGH posterior a un daño por hipoxia en embriones de pollo de 15 días de incubación (DI) tendrá un efecto neuroprotector.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

- 1) Determinar si la rcGH puede pasar la barrera hematoencefálica de embriones de pollo de 15 DI sometidos a condiciones de hipoxia o normoxia.
- 2) Evaluar si la administración sistémica de rcGH posterior a un daño por hipoxia en embriones de pollo de 15 DI tiene un efecto neuroprotector.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.a) Administrar en la vena corioalantoidea rcGH marcada con Cy3 y establecer la distribución de la misma en cerebro y cerebelo de embriones de pollo de 15 DI.
- 1.b) Determinar la integridad de la rcGH-Cy3 por medio de inmunohistoquímica para GHR y SDS-Western Blot para Cy3.

- 2.a) Cuantificar el factor de transcripción HIF-1 α en cerebelo de embriones de pollo de 15 DI sometidos a condiciones de hipoxia y normoxia.
- 2.b) Determinar el efecto neuroprotector de la rcGH exógena en cerebelo de embriones de pollo de 15 DI sometidos a condiciones de hipoxia mediante la evaluación de apoptosis usando el ensayo de TUNEL y la cuantificación de la actividad de caspasa-3.

MATERIALES Y METODOS

Materiales:

- **Material biológico:**

Se utilizaron huevos fértiles libres de patógenos (*Gallus gallus*) donados por Pilgrims Pride, Querétaro, los cuales fueron mantenidos en una incubadora con movimiento a 37°C en condiciones de humedad.

Metodología:

Los embriones se distribuyeron en 6 grupos diferentes, como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3.- Condiciones para los diferentes grupos utilizados.

Grupo	Condiciones de aereación	Tratamiento	Concentración µg/g
1	Normoxia	SS	-----
2	Normoxia	rcGH-Cy3	0.15
3	Normoxia	rcGH	0.15
4	Hipoxia	SS	-----
5	Hipoxia	rcGH-Cy3	0.15
6	Hipoxia	rcGH	0.15

Se muestra las diferentes condiciones experimentales para cada grupo. SS: Solución salina.

El diseño experimental se muestra en la Figura 4. Embriones de 15 días de incubación (15DI) se distribuyeron aleatoriamente y fueron sometidos a hipoxia o normoxia. Se sacaron todos los embriones de la incubadora y con ayuda de una lámpara en un cuarto oscuro se buscó la vena corioalantoidea, se delimitó y se limpió el área del cascarón con una torunda con tintura de yodo. Posteriormente se cortó una ventana con ayuda de una broca dremel y los animales correspondientes a hipoxia se envolvieron con una capa de polivinilo, envolviendo la mitad del embrión cuidando de cubrir la mitad de la cámara de aire. Posteriormente se incubaron junto con los del grupo de normoxia durante 24 h a 37°C. Concluido este periodo se desarrollaron y algunos animales se

sacrificaron por decapitación para cuantificar el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF 1 α). A los animales restantes se les retiró la ventana con ayuda de unas pinzas teniendo cuidado de no romper la membrana del cascaron y se adicionó una gota de aceite mineral para poder observar la vena corioalantoidea. Se administraron 100 μ L de la solución correspondiente: solución salina (SS) como control; hormona del crecimiento recombinante de pollo (rcGH de American Cyanamid AC 4797-100, EUA) o rcGH marcada con Cy3 (rcGH-Cy3) con una aguja de 30 G con dirección al saco de aire (Palmer y cols, 2011). Dos horas después de la administración se sacrificaron los embriones por decapitación para ver la distribución de rcGH-Cy3 o 24 h para cuantificar la actividad de caspasa-3 o TUNEL.

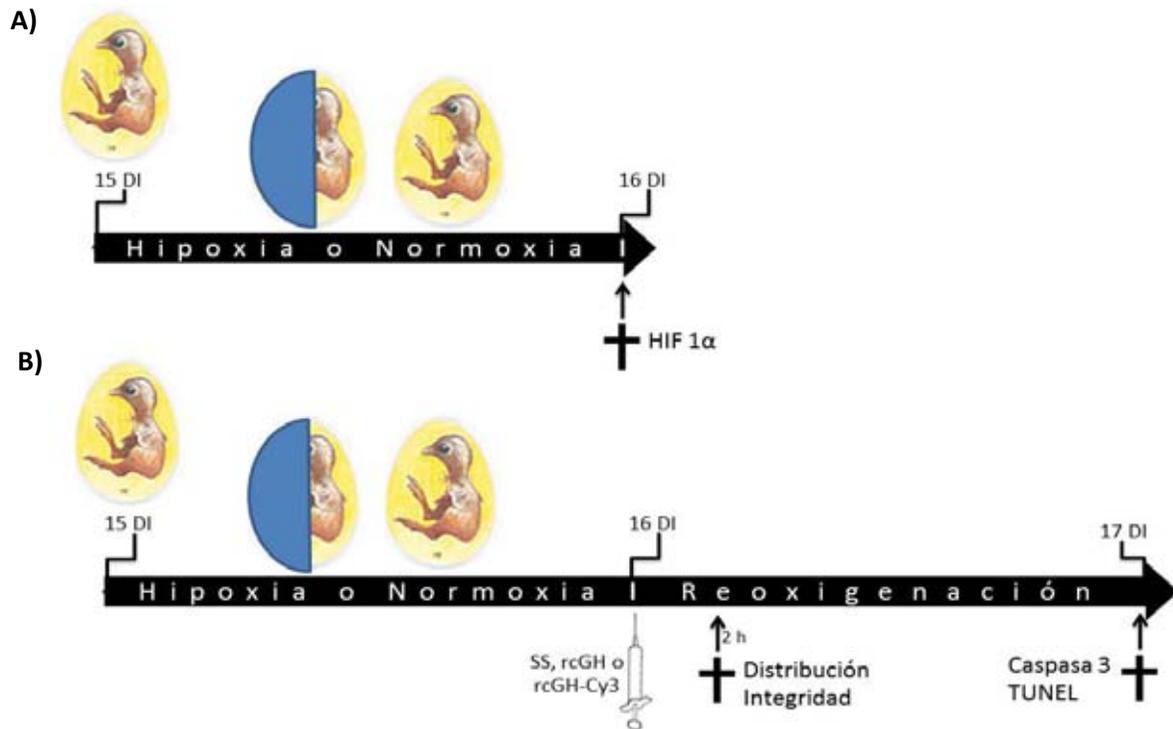


Figura 4.- Diseño experimental. Embriones de 15DI se sometieron a hipoxia o normoxia y 24 h después fueron sacrificados para cuantificar HIF 1 α (A) o se trataron con SS, rcGH O rcGH-Cy3 intravenosa y se sacrificaron 2h o 24 h después de la administración para ver distribución e integridad de rcGH-Cy3 o actividad de caspasa 3 y TUNEL respectivamente (B).

Distribución de GH en el SNC

○ Distribución de rcGH-Cy3

Los embriones se anestesiaron en hielo durante 10 min, se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron cerebro, cerebelo e hígado, el último como testigo positivo. Los tejidos se fijaron en solución de Zamboni (paraformaldehído 4%, ácido picrico 1.5% en PBS 0.02M) durante 24 h a 4°C y se crioprotegieron con sacarosa al 20% a 4°C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 30 µm por congelación utilizando un microtomo (SM2000R de Leica Microsystem; Alemania) y se guardaron a -20°C con solución crioprotectora (polietilenglicol, sacarosa 30% en PBS 1X).

Los cortes se montaron y se dejaron fijando toda la noche a 37°C en oscuridad. Para contrastar los núcleos se incubaron con una solución de 500 ng/ml de DAPI (D9542 de Sigma Aldrich, EUA) por 30 min en oscuridad, se lavaron por 30 min con TBS 1X y se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield H-1000 de Vector, EUA). Después se observaron en el microscopio confocal (LSM 780 de Carl Zeiss; Alemania) para determinar distribución de rcGH-Cy3 en los diferentes tejidos.

○ Integridad de GH-Cy3

Inmunohistoquímica de GHR

Los cortes se montaron y se dejaron fijando toda la noche a 37°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron con TBS 1X (TRIS 10 mM, NaCL 234 mM, pH 7.6) por 30 min y se incubaron con leche al 5% en TBS 1X por 2 h. Terminado este periodo se lavaron los tejidos con TTBS 1X (Triton X-100 0.1% en TBS 1X) por 30 min y se incubaron toda la noche en cámara húmeda con el anticuerpo hecho en ratón anti-GHR (MA1-82444 de Thermo Scientific Pierce Antibodies, EUA) en leche al 1% en TTBS, a una dilución 1:200. Posteriormente se lavaron con TTBS 1X por 30 min, se incubaron 2 h con el anticuerpo IgG-FITC anti-ratón hecho en conejo (81-6711 de Invitrogen, EUA) en leche al 1% en TTBS, a una dilución 1:200 y se lavaron con TBS 1X durante 30 min. Se contratiñeron los núcleos con DAPI y se observaron en el microscopio confocal.

SDS-Western Blot de Cy3 y GH

Los embriones se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron el cerebro, cerebelo e hígado, los cuales fueron congelados en hielo seco y almacenados a -80°C . Para realizar la técnica de SDS-Western Blot los tejidos fueron homogenizados con RIPA (50 mM TRISa pH 7.4, 0.5% NP40, 100 mM NaCl e inhibidores de proteasas, Complete Mini, EDTA-free de Roche, EUA) con ayuda de un pistilo de plástico, se incubaron 10 min en hielo, se centrifugaron a 12,000 RPM por 20 min a 4°C , se recolectó el sobrenadante y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford (500-0006 de Bio-Rad, EUA).

Se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 12%, con una carga de 80 μg de proteína total por pozo. Concluida la electroforesis el gel se equilibró con amortiguador de transferencia (TRIS 25 mM, Gly 192 mM, Metanol 20% , pH 8.3) 15 min, al igual que las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EUA), el papel filtro, las fibras y el sándwich. Se transfirieron los geles de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa a 200mA durante 1h con agitación constante. Posteriormente se lavaron con TBS 1X (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) por 10 min y se bloquearon las membranas con leche semidescremada al 5% (Bio-Rad, EUA) en TBS 1X por 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavaron con TTBS 1X (TBS 1X+ Tween 20 0.05%) 30 min e incubaron con el anticuerpo hecho en ratón anti-Cy3 (ab52060 de abcam, Canadá) o anticuerpo hecho en conejo anti-GH (CAP2, México), en TTBS 1X con leche al 1%, diluido 1:1000 o 1:10000 respectivamente toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X 30 min e incubaron con el anticuerpo anti-IgG de raton hecho en conejo (616520 de Invitrogen, EUA) o anti IgG de conejo hecho en cabra (656120 de Invitrogen, EUA) conjugados con HRP, en TTBS 1X con leche al 1%, diluido 1:1000 o 1:3000 respectivamente) por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X 30 min y TBS 1X 30 min, y se revelaron con ECL (sustrato quimioluminiscente de Amersham/Pharmacia, UK) en películas Kodak Biomax ML film.

Se realizó stripping a las membranas de Cy3 para determinar actina como control de carga. Se lavaron con TBS 1X 45 min e incubaron con buffer para stripping (TRIS-

HCl/SDS/Mercaptoetanol) 40 min entre 70 y 80°C en baño maría con agitación constante. Se lavaron con TBS 1X hasta eliminar el olor del mercaptoetanol. Posteriormente se bloquearon con leche semidescremada al 5%, se lavaron con TTBS 1X 45 min e incubaron con el anticuerpo Anti-Actina hecho en ratón (sc-58673 de Santa Cruz Biotechnology, EUA) en TTBS 1X con leche al 1%, dilución 1:3000 toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X 45 min e incubaron con el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con HRP, en TTBS 1X con leche al 1%, diluido 1:1000 por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X 45 min y TBS 1X 30 min y se reveló con ECL en películas Kodak Biomax ML film. Se determinó el peso molecular y se calculó la densidad de pixeles con ayuda del software Image Lab 3.0 de Bio-Rad (EUA). Se hizo la relación con respecto a actina y se normalizaron los datos considerando como 1 el promedio de los animales tratados con GH-Cy3 y mantenidos en normoxia por cada membrana.

Determinación del efecto neuroprotector de GH:

○ Cuantificación de HIF 1 α

Para la cuantificación de HIF 1 α se obtuvo cerebelo, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C. Para la cuantificación de la expresión de HIF-1 α mediante SDS-Western blot los tejidos se homogenizaron como se mencionó en el apartado de SDS-Western Blot Cy3 y GH, y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford.

Se realizó un SDS-PAGE con condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 10%, con una carga de 80 μ g de proteína total por pozo. Posteriormente se transfirieron los geles y se bloquearon las membranas como se mencionó anteriormente. Se lavaron las membranas con TTBS 1X e incubaron con el anticuerpo Anti-HIF-1 α (3716S de Cell Signaling, EUA) en TTBS 1X con leche al 1%, diluido 1:1000 toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X e incubaron con el anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con HRP, en TTBS 1X con leche al 1%, diluido 1:3000 por 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron con TTBS 1X, posteriormente con TBS 1X y se revelaron con ECL en películas Kodak Biomax ML film.

Se realizó stripping para actina y se cuantificó la densidad de píxeles con ayuda del software Image Lab 3.0, se hizo la relación con respecto a actina y se calculó la proporción relativa considerando como 1 el promedio de los controles por cada membrana.

- **Evaluación de apoptosis por el ensayo de TUNEL**

Los embriones se sacrificaron por decapitación, se obtuvo cerebelo, se fijó con solución de Zamboni, se crioprotegió con sacarosa al 20% y se realizaron cortes de 30 μm por congelación en un microtomo. Los cortes se montaron, se dejaron fijando toda la noche a 37°C y se lavaron con PBS 1X por 30 min. Se expusieron los epitopes con buffer de citrato (citrato de sodio 10mM, pH 6.0 y triton 1%) a 80°C por 30 min. Se lavaron por 20 min con PBS 1X. Terminado este periodo se incubaron con una solución de 2 $\mu\text{g/ml}$, en 10 mM de TRIS/HCl pH 7.4, de proteinasa K (Thermo Scientific, EUA) por 10 min a 37°C en condiciones de humedad para permeabilizar, se lavaron con PBS 1X por 10 min. Posteriormente se eliminó la autofluorescencia incubando por 30 min con negro de Sudán 0.1%-etanol 70% y lavando por 30 min con PBS 1X. Para realizar el ensayo TUNEL (por sus siglas en inglés, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) se utilizó el kit para detección de muerte celular POD *in situ* (No. de Cat. 11684795910 de ROCHE, EUA) siguiendo las instrucciones indicadas en el manual. A cada corte se le adicionaron 50 μL de la mezcla de reacción de TUNEL (50 μL de la solución con TdT a 450 μL de solución con los dUTPs) e incubaron 1.5 h a 37°C en atmósfera húmeda y oscuridad. Finalizada la incubación se lavaron con PBS 1X por 30min, se contratiñieron los núcleos con DAPI, se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia y se observaron en el microscopio ApoTom (Carl Zeiss, Alemania). Se cuantificó el área correspondiente a la señal de TUNEL y DAPI con ayuda del software Image J (National Institutes of Health, EUA), se hizo la relación área TUNEL/área DAPI y posteriormente los datos se normalizaron considerando el promedio del grupo control sometido a hipoxia como el 100%.

- **Evaluación de la actividad de caspasa-3**

Los embriones se sacrificaron por decapitación y se obtuvo el cerebelo, se congeló en hielo seco y almacenó a -80°C . Se homogenizó en 250 μL de amortiguador de lisis (HEPES/NaOH 10mM pH 7.4, EDTA 2 mM, DTT 1 Mm, CHAPS 0.1%) con un pistilo de plástico, se incubó por 10 min y se centrifugó a 12000 RPM por 20 min a 4°C , se recolectó el sobrenadante y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford.

La cuantificación de la actividad de caspasa-3 se realizó con ayuda de un ensayo colorimétrico comercial específico para esta caspasa (Caspase-3 Colorimetric Assay Kit De Assay Designs Inc, No. de Cat. 907-013, EUA). Siguiendo las instrucciones del fabricante en una placa de 96 pozos se colocaron 50 μL de buffer activo de reacción de caspasa 3 (buffer de reacción de caspasa-3 y dithiothreitol) en los pozos blanco. En dos pozos se adicionaron 125 μL de calibrador de p-nitroanilina (p-nitroanilina 50 μM en amortiguador de reacción de caspasa-3). Para realizar la curva estandar se reconstituyó el vial del estandar de caspasa-3 con el amortiguador de reacción activo de caspasa-3 (tubo 1) y se realizaron diluciones seriadas 1:2 con amortiguador de reacción activo de caspasa-3 hasta el tubo 5. Se adicionaron 50 μL de los estándares o las muestras (20 μg de proteína) a los pozos por duplicado y 75 μL del sustrato de caspasa a todos los pozos excepto los que contenían p-nitroanilina, se mezclaron suavemente e incubaron 3 h a 37°C . Para detener la reacción se adicionaron 10 μL de solución de bloqueo y se leyó en el lector de ELISA (Bio-Rad 3550-UV, EUA) a 405 nm. Se hicieron los cálculos para obtener la curva de calibración considerando que la densidad óptica del calibrador equivale a 34.72 unidades de caspasa-3 activa cuando ésta reacciona con su sustrato y posteriormente se obtuvieron las unidades de caspasa-3 activa/ μg de proteína.

Análisis estadístico

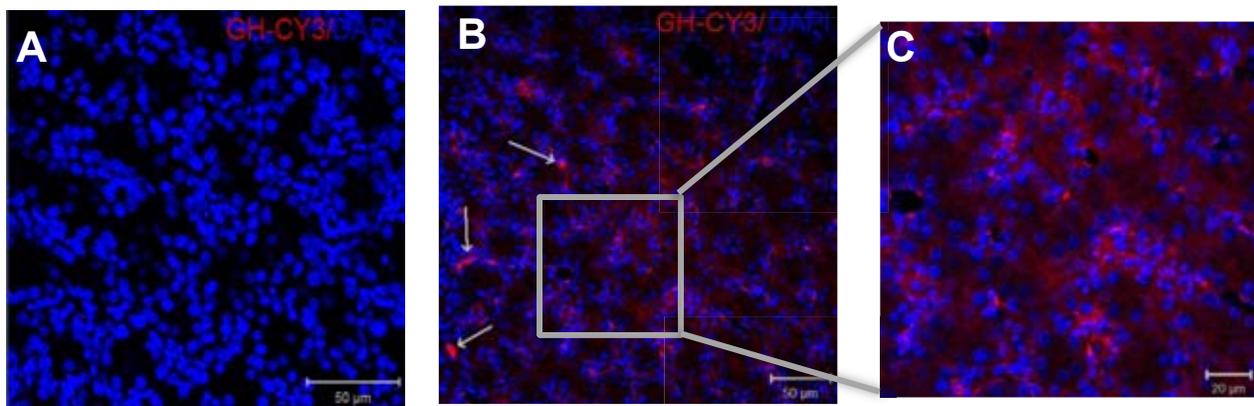
Los datos se graficaron como media \pm error estándar de cada grupo. El análisis estadístico utilizado fue una t de Student. Para el caso de TUNEL se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) unifactorial seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Esto se realizó con ayuda del software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).

RESULTADOS

Distribución de GH en el SNC

a) Controles

Inicialmente se practicó la administración en la vena corioalantoidea utilizando una solución de azul de Evans al 1%. Los animales a los que se les administró azul de Evans mostraron todos los órganos internos teñidos de azul excepto cerebro y cerebelo, donde en una vista macroscópica y cortes de 30 μm el azul solo fue detectable en los ventrículos laterales y sus paredes independientemente de la condición de oxigenación. Una vez que la administración de azul de Evans se realizó correctamente, se procedió a administrar GH-Cy3, tomándose el hígado como control positivo debido a que es un órgano altamente irrigado y con una alta cantidad de GHR. En la Figura 5 se muestran imágenes representativas de cortes de hígado de animales mantenidos en normoxia e hipoxia con o sin tratamiento con GH-Cy3, en las que se observa que la señal correspondiente a GH-Cy3 (roja) está ausente en animales control. En animales tratados con GH-Cy3, ésta se ubicó sobre todo en la periferia de los hepatocitos como puede observarse en las Figuras 5B y D (señalados con flechas), en lo que pueden ser vasos sanguíneos y en menor grado dentro de los hepatocitos, Figuras 5C y E.



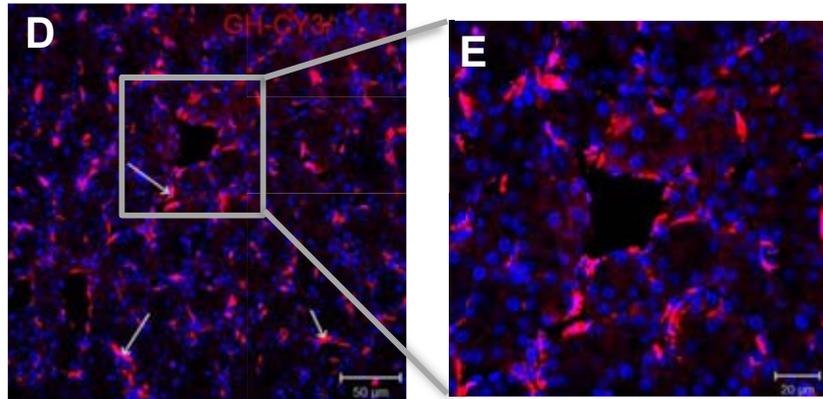


Figura 5.- Imágenes representativas de GH-Cy3 en hígado. Las imágenes corresponden a: animales a los que se les administró solución salina sometidos a normoxia (A), animales sometidos a normoxia con GH-Cy3 (B y C) y animales sometidos a hipoxia con GH-Cy3 (D y E). Las flechas señalan posibles vasos sanguíneos donde se ubicó la hormona marcada.

Con respecto a las diferentes condiciones de aireación las Figuras 5B-C y 5D-E que corresponden a animales mantenidos en normoxia e hipoxia respectivamente, parece que la cantidad de hormona es mayor en hipoxia. Al realizar la densitometría para GH-Cy3 ésta aumentó 1.6 ± 0.3 veces con respecto al control; sin embargo como puede verse en la Figura 6A este aumento no fue significativo.

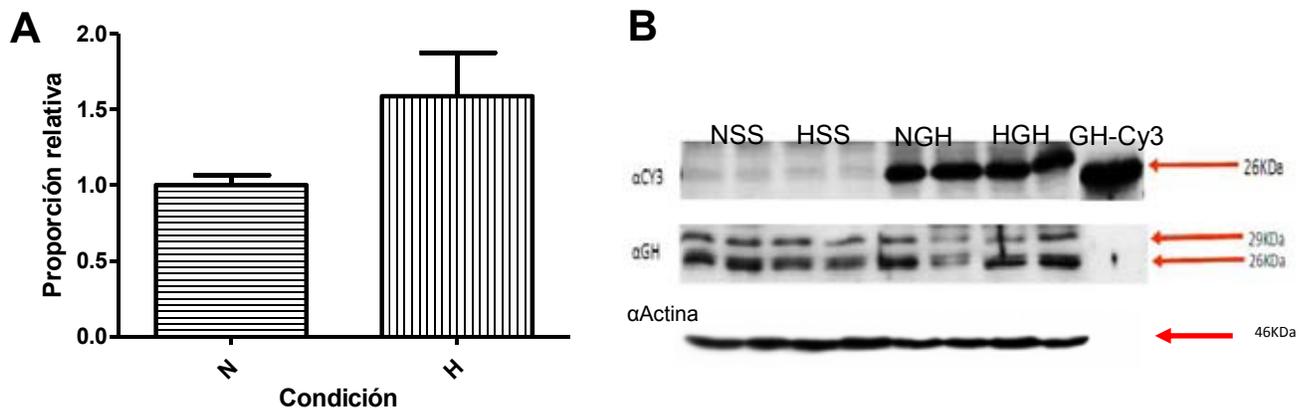


Figura 6.- Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de hígado. La Figura A corresponde a la proporción relativa de GH-Cy3 en condiciones de normoxia e hipoxia. Cada barra corresponde a media \pm ES ($t=1.996$, $gl=10$). En la Figura B se muestra la banda obtenida con el anticuerpo contra Cy3, la cual sale a la altura del control (GH) con un peso aproximado de 26 kDa y que está ausente en animales tratados con solución salina. Esta banda también se observó con el anticuerpo contra GH. NSS: Normoxia+SS ($n=3$), HSS: Hipoxia+SS ($n=3$), NGH: Normoxia+GH ($n=6$) y HGH: Hipoxia+GH ($n=6$).

Para saber si la señal roja observada en la Figura 5 corresponde a GH y no a Cy3 libre se realizó SDS-Western Blot para Cy3 y GH, así como inmunomarcaje para el receptor de GH (GHR). En la Figura 6B se muestra el inmunoblot obtenido para Cy3 en el cual

se obtuvo una banda a la altura del control (GH-Cy3) a un peso molecular de 26kDa, peso molecular de la GH y que está ausente en los animales tratados con solución salina. En el caso del inmunoblot para GH nuevamente se encontró la banda de 26 kDa (Figura 6B), lo que nos indica que existe GH-Cy3 integra en los homogenados. Con respecto a el inmunomarcaje contra el GHR se observó una amplia distribución del mismo en condiciones de normoxia, además de una alta co-localización con la hormona (Figuras 7C). En hipoxia (Figuras 7F) se encontraron varias células en las que se observa la colocolización de la hormona y su receptor, aunque en la periferia de los hepatocitos la colocolización disminuyó.

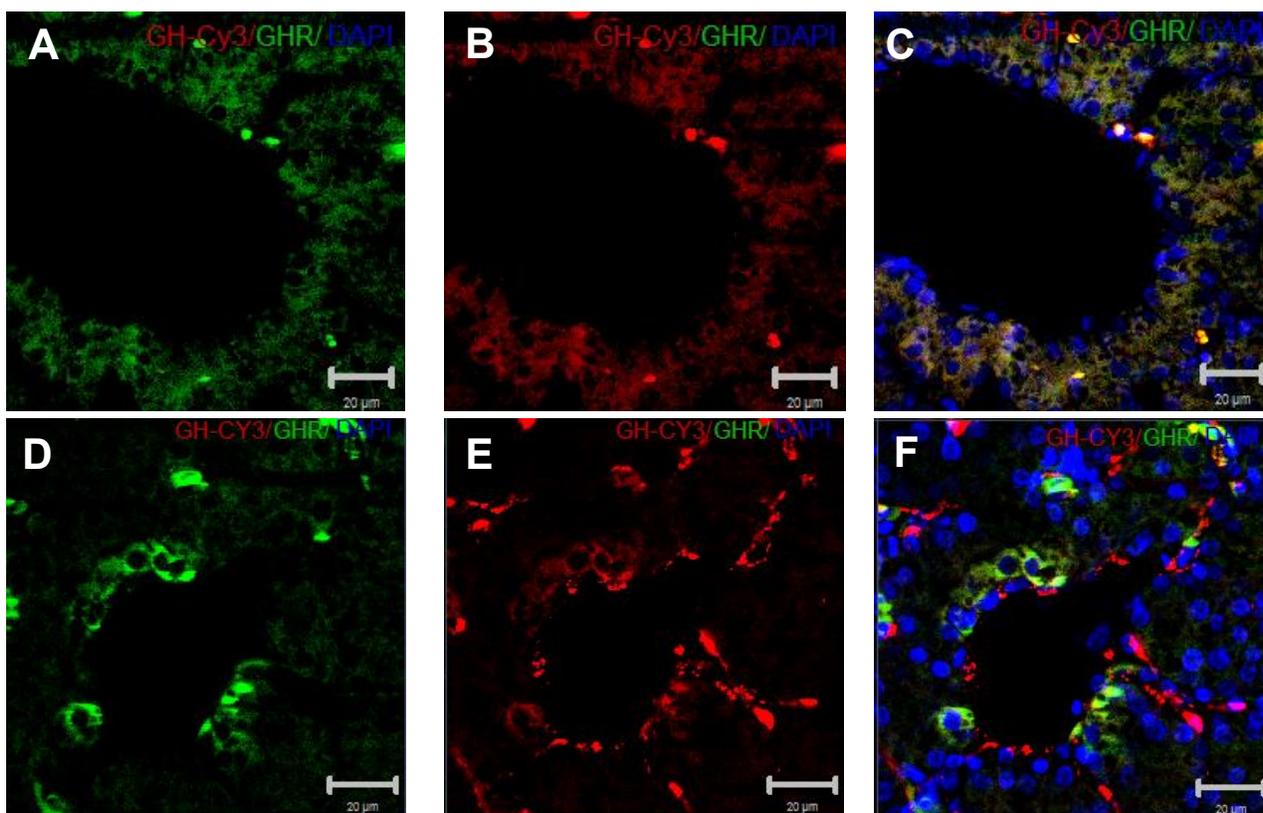
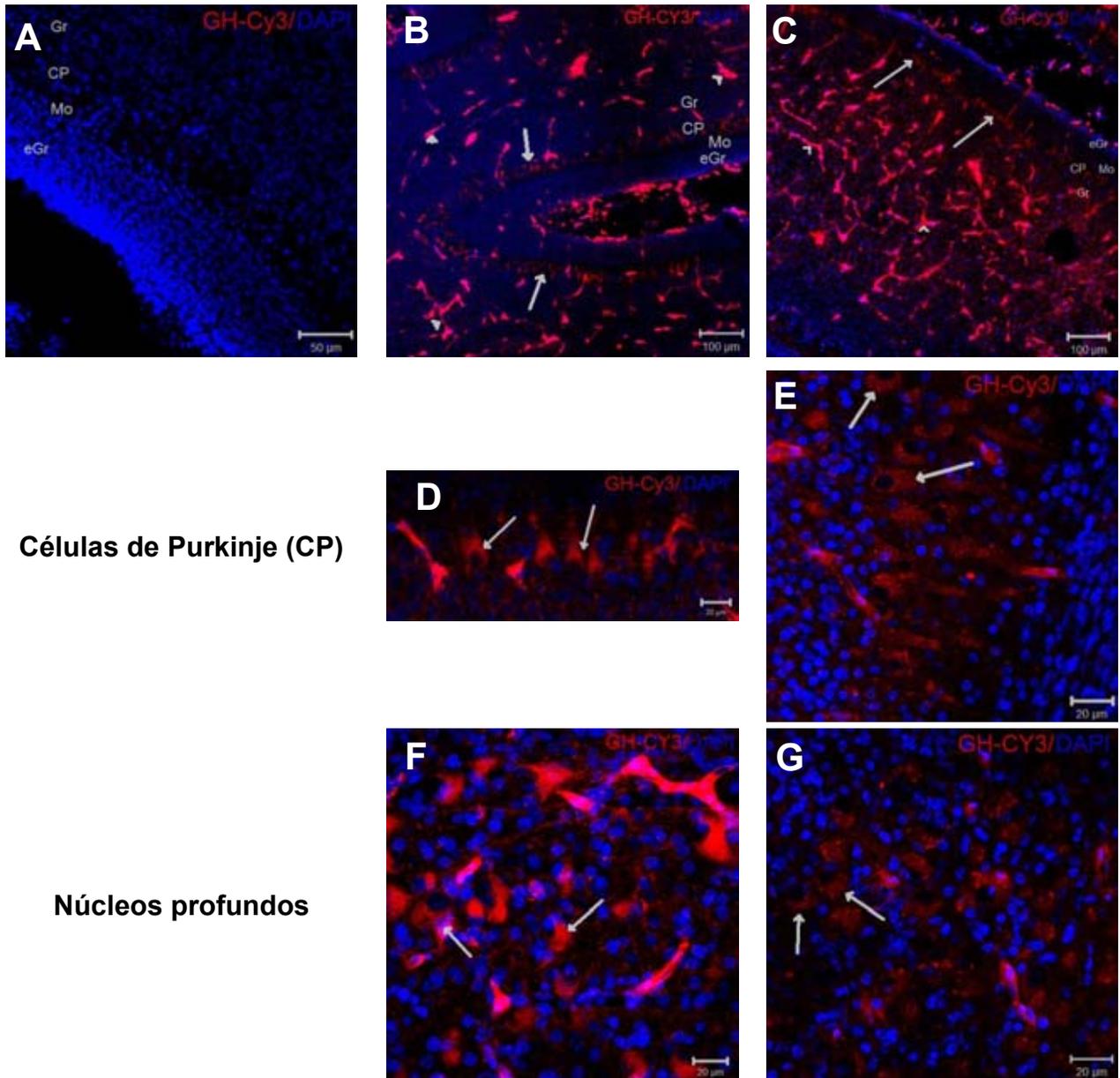


Figura 7.- Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en hígado. Las imágenes corresponden a: animales administrados con GH-Cy3 en condiciones de normoxia (A-C) e hipoxia (D-F) separado en los diferentes canales: A a la izquierda para el GHR, en medio para GH-Cy3 y a la derecha para GHR+GH-Cy3+DAPI. Las regiones amarillas son zonas donde la hormona co-localiza con su receptor.

b) Cerebelo

Se realizaron cortes transversales para ver la distribución de GH-Cy3 en cerebelo. La señal de GH-Cy3 estuvo ausente en animales a los que se les administró solución salina como se observa en la Figura 8A, mientras que en animales a los que se les administró hormona marcada ésta se encontró ampliamente distribuida en el cerebelo

como puede observarse en la Figura 8, encontrándose principalmente en los vasos sanguíneos (Figuras 8B y C, indicados por cabezas de flechas) y en el citoplasma de células de Purkinje (Figuras 8B-E indicadas por flechas), en menor grado en el citoplasma de células de los núcleos profundos (Figuras 8F y G, indicadas por flechas) y con una señal aún más débil en el citoplasma de células de la capa granular (Figuras 8H e I, indicadas por flechas) tanto en normoxia como en hipoxia.



Capa granular interna (Gr)

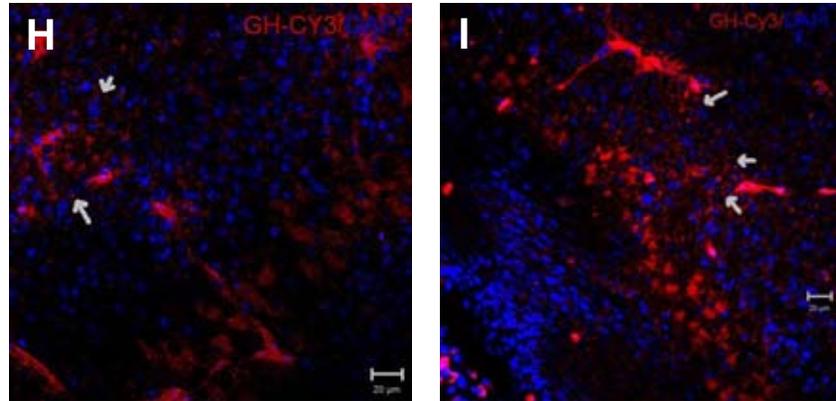


Figura 8.- Imágenes representativas de GH-Cy3 en cerebelo. Las imágenes corresponden a: animales a los que se les administró solución salina (A), animales mantenidos en normoxia con GH-CY3 (B, D, F y H), animales sometidos a hipoxia con GH-Cy3 (C, E, G e I). Las flechas indican células donde está presente GH-Cy3, mientras las cabezas de flecha indican vasos donde se encuentra a hormona. Mo: Capa molecular, CP: Células de Purkinje, Gr: Capa granular y eGr: Capa granular externa.

Cuando los animales fueron sometidos a hipoxia la señal de GH parece aumentar comparado con los de normoxia, como puede observarse al comparar las figuras 8B, C, H e I. Resultados similares se obtuvieron al realizar la densitometría para GH-Cy3, donde la hormona aumento significativamente 2.8 ± 0.3 veces en los animales sometidos a hipoxia con respecto a los mantenidos en normoxia (Figura 9A).

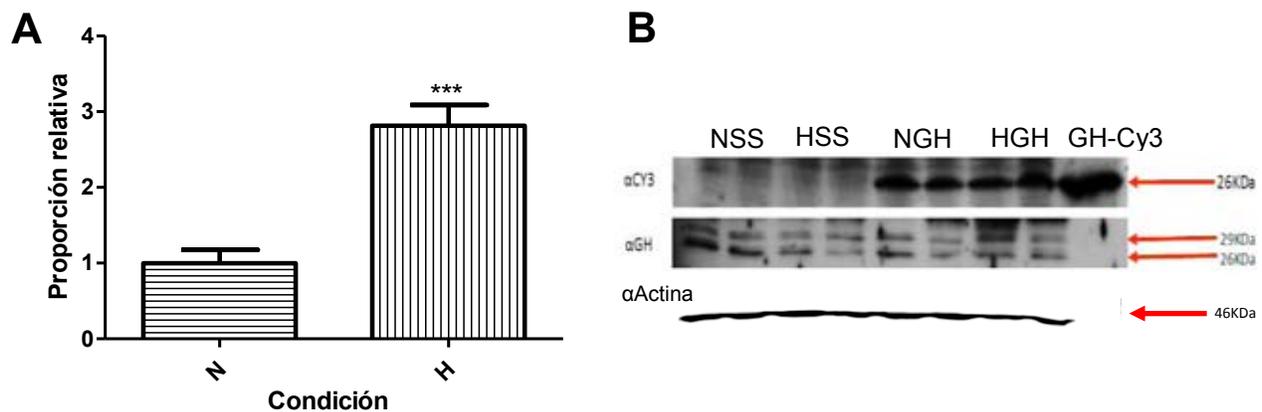


Figura 9.- Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de cerebelo. La Figura A corresponde a la proporción relativa de GH-Cy3 en condiciones de normoxia e hipoxia. Cada barra corresponde a media \pm ES, donde ***= $P < 0.001$ ($t = 5.845$, $gl = 7$). En la Figura B se muestra la banda obtenida con el anticuerpo contra Cy3, la cual sale a la altura del control (GH) con un peso aproximado de 26 KDa y que está ausente en animales tratados con solución salina. Esta banda también se observó con el anticuerpo contra GH. NSS: Normoxia+SS ($n = 3$), HSS: Hipoxia+SS ($n = 3$) y NGH: Normoxia+GH ($n = 5$) y HGH: Hipoxia+GH ($n = 4$).

Con respecto al inmunomarcaje para GHR y SDS-Western Blot para Cy3 y GH, la Figura 10 corresponde a inmunomarcaje para GHR en normoxia (10A-D) e hipoxia (10E)

y F), donde se observa que al similar a la hormona el receptor está ampliamente distribuido, encontrándose en las células de Purkinje, los núcleos profundos y la capa granular co-localizando con la hormona marcada. En el caso del SDS-Western Blot para Cy3 se obtuvo una banda a la altura del control a un peso molecular de 26kDa, peso molecular de la GH, y está ausente en los animales tratados con solución salina (Figura 9B). En el caso de GH entre las diferentes bandas se encontró la de 26 kDa (Figura 9B).

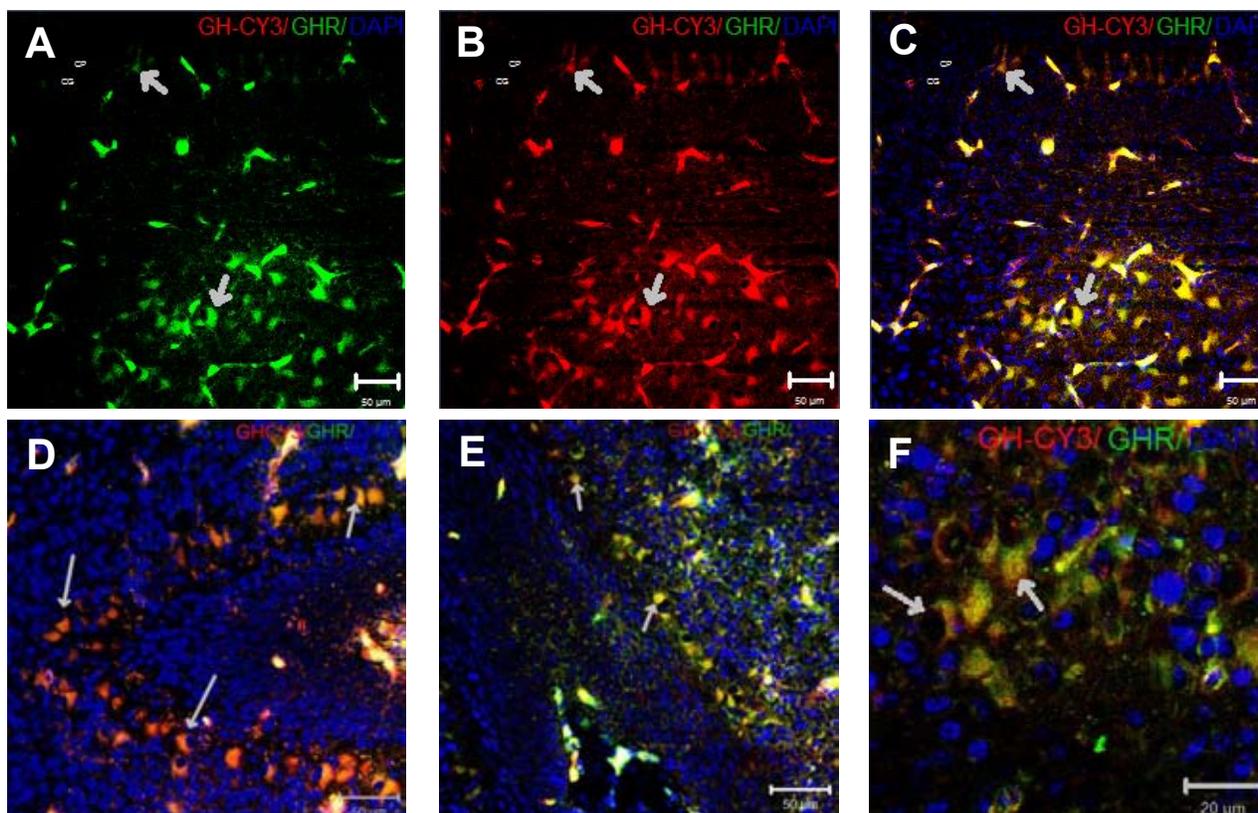
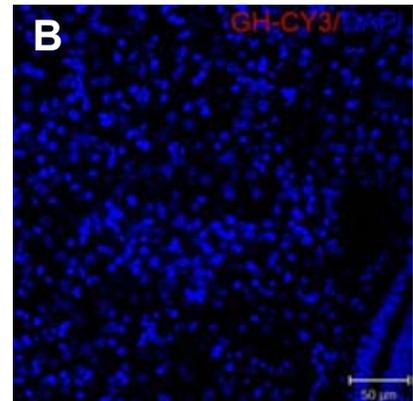
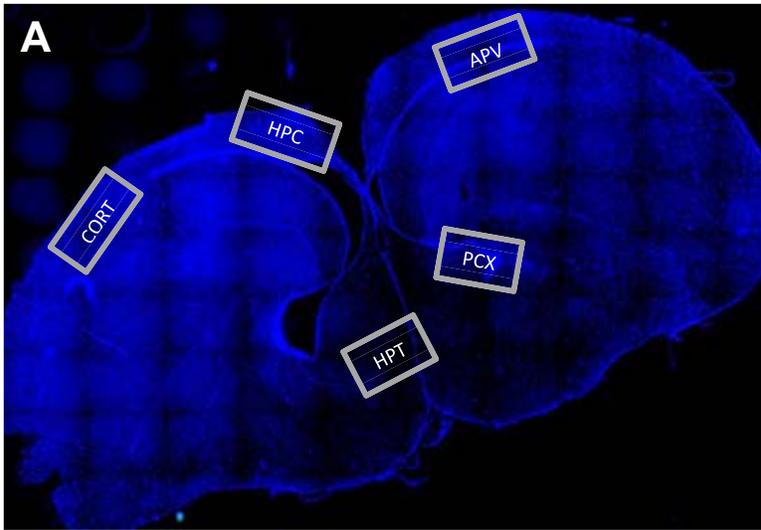


Figura 10.- Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en cerebelo. Las imágenes corresponden a: núcleos profundos (A-C, separado en los diferentes canales: A para GHR, B para GH-Cy3 y C para la mezcla de ambos canales) y células de Purkinje (D) de animales a los que se les administró GH-Cy3 en condiciones de normoxia y células de Purkinje (E y F) en condiciones de hipoxia. Las regiones amarillas, indicadas por flechas, son zonas donde la hormona co-localiza con su receptor.

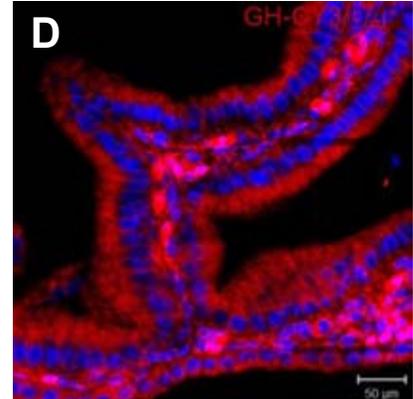
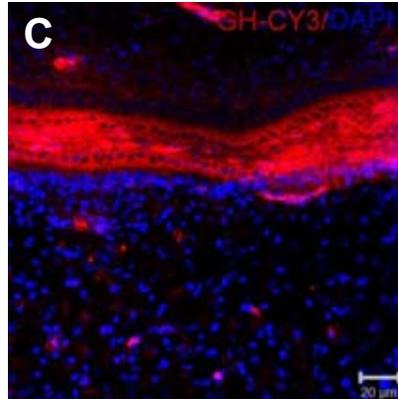
c) Cerebro

Se realizaron cortes coronales de cerebro para observar la distribución de GH-Cy3. La señal de GH-Cy3 estuvo ausente en animales a los que se les administró solución salina como previamente se había mencionado para hígado y cerebelo (Figura 11B). En la Figura 11A se muestra una imagen panorámica de un corte coronal de cerebro de pollo, donde se encuentran señaladas las áreas en las que se buscó señal

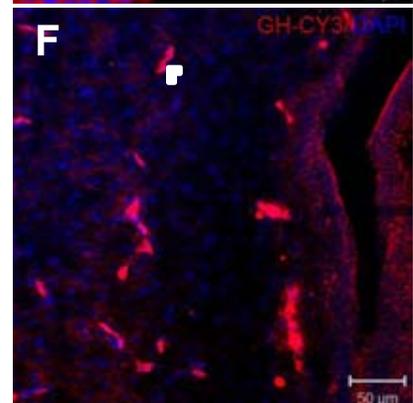
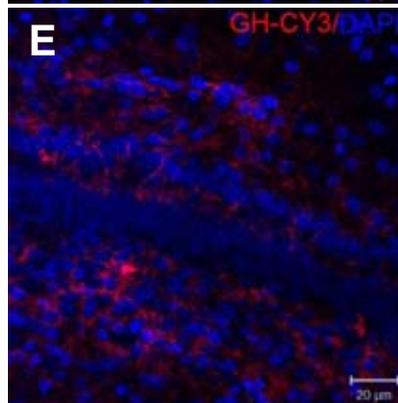
correspondiente a la hormona. En animales a los que se les administró hormona marcada, ésta se encontró ampliamente distribuida en el cerebro, encontrándose principalmente en los vasos sanguíneos (Figura 11F-J y L, indicados por cabezas de flechas), plexos coroideos (Figura 11C y D) y áreas periventriculares (Figura 11E y F), en menor grado en hipotálamo (Figura 11G y H, indicadas por flechas), hipocampo (Figura 11I y J, indicadas por flechas) y con una señal aún más débil en la corteza (Figura 11K y L, indicadas por flechas) tanto en normoxia como en hipoxia.



Plexos coroideos (PXC)



Área periventricular (APV)



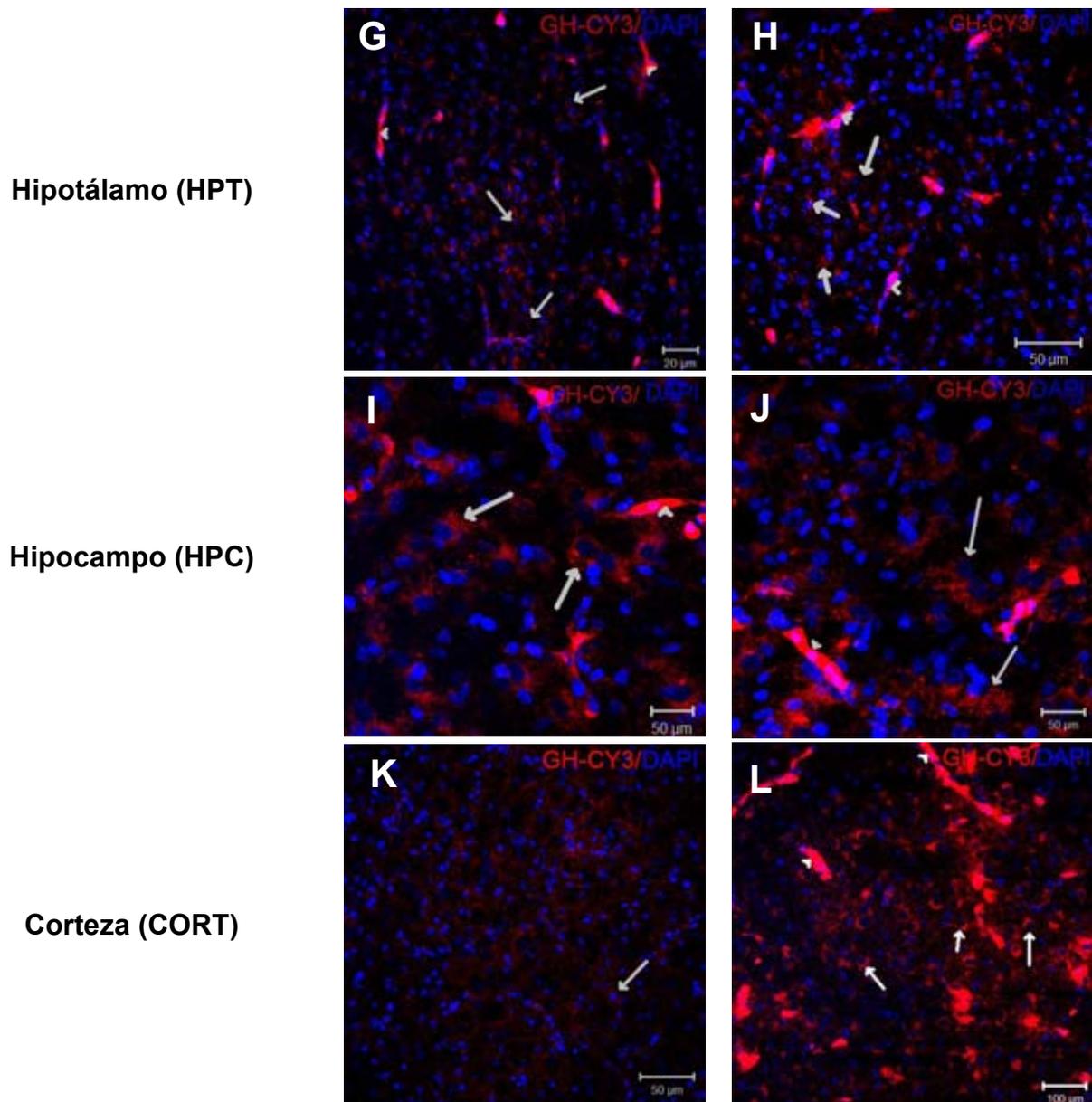


Figura 11.- Imágenes representativas GH-Cy3 de cerebro. Las imágenes corresponden a: vista panorámica del cerebro donde se señalan las diferentes áreas mostradas en las demás figuras (A), animales a los que se les administró solución salina (B), plexos coroideos (C y D), áreas periventriculares (E y F), hipotálamo (G y H), hipocampo (I y J) y corteza (K y L) de animales a los que se les administró GH-CY3 y sometidos a normoxia (C, E, G, I y K) e hipoxia (D, F, H, J y L). Las flechas indican células donde está presente GH-Cy3, mientras las cabezas de flecha indican vasos donde se encuentra a hormona.

En los animales que fueron sometidos a hipoxia la señal de GH parece aumentar en los plexos coroideos y corteza comparado con los de normoxia, como puede observarse en la Figura 11C, D, E y F. Al realizar la densitometría para GH-Cy3 de homogenados de cerebro completo se observó un ligero aumento de 1.7 ± 0.6 veces; sin embargo este no fue significativo (Figura 12A).

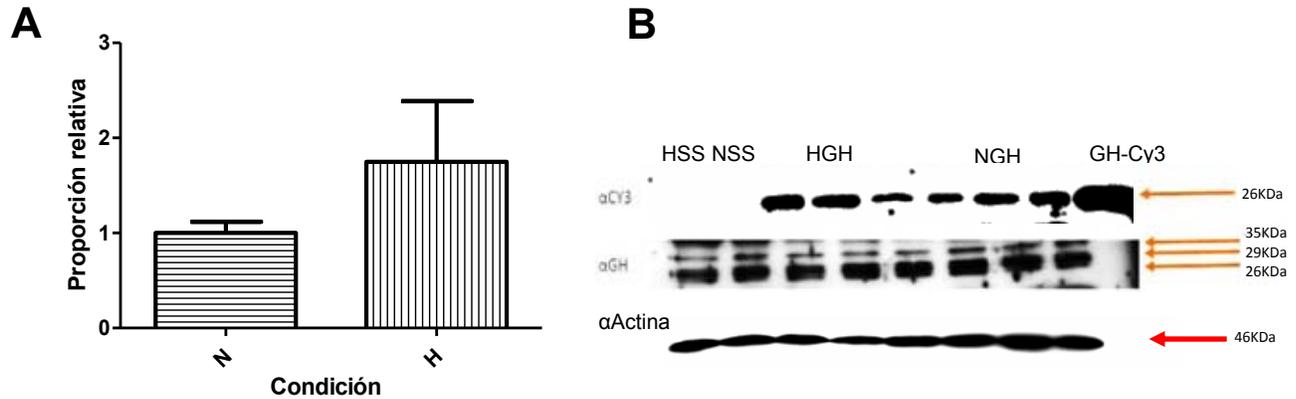
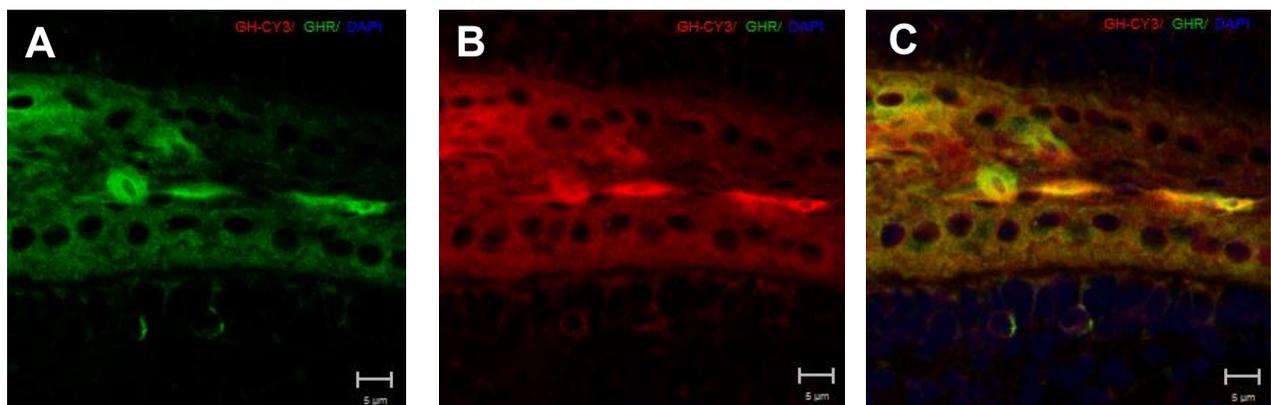


Figura 12.- Análisis densitométrico e inmunoblot contra Cy3 en homogenados de cerebro. La figura A corresponde a la proporción relativa de GH-Cy3 en condiciones de normoxia e hipoxia. Cada barra corresponde a media \pm ES ($t=1.153$, $gl=10$). En la figura B se muestra la banda obtenida con el anticuerpo contra Cy3, la cual sale a la altura del control (GH) con un peso aproximado de 26 KDa y que está ausente en animales tratados con solución salina. Esta banda también se observó con el anticuerpo contra GH. NSS: Normoxia+SS ($n=3$), HSS: Hipoxia+SS ($n=3$), NGH: Normoxia+GH ($n=6$) y HGH: Hipoxia+GH ($n=6$).

Al realizar inmunomarcaje para GHR y SDS-Western Blot para Cy3 y GH. El GHR se encontró en todas las áreas previamente mencionadas con una distribución similar a la de GH. La Figura 13 corresponde a inmunomarcaje para GHR en normoxia (13A-D) e hipoxia (13E y F) respectivamente, donde se observan varias células donde la hormona co-localiza con su receptor. En el SDS-Western Blot para Cy3 se obtuvo una banda a la altura del control a un peso molecular de 26kDa, peso molecular de la GH, y está ausente en los animales tratados con solución salina (Figura 12B). En el caso de SDS-Western Blot para GH entre las diferentes bandas se encontró la banda de 26 kDa (Figura 12B).



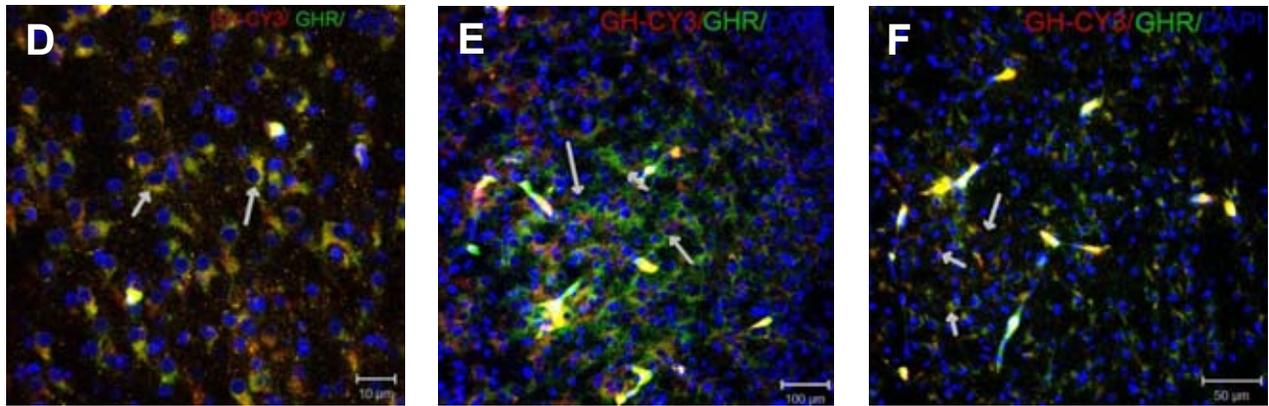


Figura 13.- Imágenes representativas de inmunohistoquímica para GHR en cerebro. Las imágenes corresponden a: plexos coroideos (A-C, separado en los diferentes canales: A para GHR, B para GH-Cy3 y C para la mezcla de ambos canales) e hipotálamo (D) de animales a los que se les administró GH-Cy3 en condiciones de normoxia, e hipocampo (E) e hipotálamo (F) en condiciones de hipoxia. Las regiones amarillas, indicadas por flechas, son zonas donde la hormona co-localiza con su receptor.

Efecto neuroprotector de GH

a) Expresión de HIF 1 α

Se evaluó la expresión del factor inducido por hipoxia 1 α (HIF 1 α) por medio de SDS-Western Blot. Este factor de transcripción se tomó como un control del modelo de hipoxia porque es sensible a la concentración de O₂, degradándose continuamente a concentraciones normales de O₂, pero a bajas concentraciones de O₂ se estabiliza, se transloca al núcleo donde forma un complejo que incrementará la transcripción de diversos genes que ayudan al organismo a adaptarse a la hipoxia, promoviendo el metabolismo anaerobio y el transporte de oxígeno, entre otras funciones.

En la Figura 14B se muestra el inmunoblot obtenido de muestras de cerebelo, donde se observan las bandas correspondientes a HIF 1 α (~120 kDa) y actina (~46 kDa). Se observó un aumento en la cantidad de HIF 1 α cuando los animales fueron sometidos a hipoxia. Al realizar la densitometría se encontraron resultados similares, incrementando la cantidad de HIF 1 α 2.4 \pm 0.4 veces en hipoxia con respecto a normoxia, siendo éste un aumento significativo (P<0.01) como se observa en la Figura 14A.

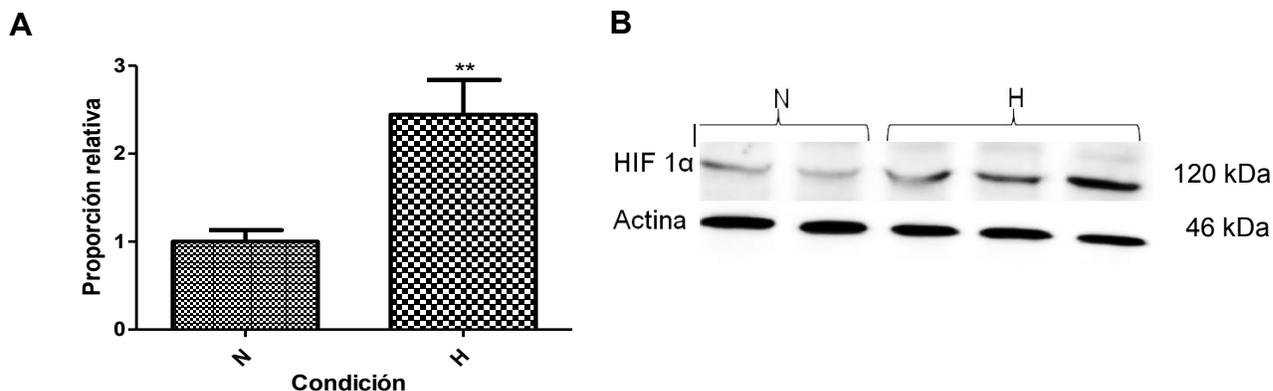


Figura 14.- Proporción relativa de HIF 1α en normoxia e hipoxia. A) Proporción relativa de HIF-1α en cerebelo de animales sometidos a normoxia e hipoxia. Cada barra representa media \pm SEM, donde **= $P < 0.01$ ($t=3.472$, $gl=8$). B) Inmunoblot de HIF 1α y actina en cerebelo. Se obtuvieron bandas cercanas a los 120 kDa para HIF 1α y 46 kDa para actina. N: Normoxia ($n=5$), H: Hipoxia ($n=5$).

b) Actividad de caspasa-3

Para evaluar si la administración de GH posterior al daño puede tener un efecto neuroprotector se evaluó la muerte celular por medio de la actividad enzimática de caspasa-3, una técnica muy sensible y específica para muerte celular por apoptosis, 24 h después de la administración de los tratamientos.

En la Figura 15 se muestra el porcentaje de actividad de caspasa-3 en homogenados de cerebelo, considerando la media del grupo control sometido a hipoxia como el 100%. Se observó una actividad basal de caspasa-3 de 76.4 ± 1.2 % en el grupo control mantenido en normoxia, la cual aumenta significativamente a 100.0 ± 7.0 % cuando los animales son sometidos a hipoxia. En el caso de los animales mantenidos en hipoxia y tratados con GH la actividad de caspasa 3 disminuyó a 87.1 ± 7.4 % sin ser significativamente diferente de los grupos control mantenidos en normoxia o hipoxia.

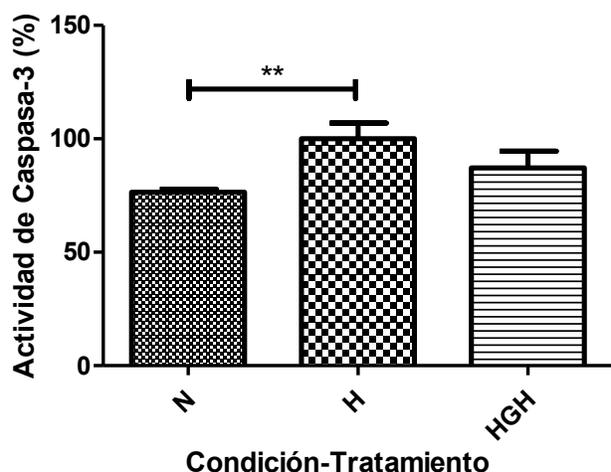


Figura 15.- Actividad de caspasa-3 en porcentaje determinada en homogenados de cerebelo. Cada barra representa media \pm ES, donde *= $P < 0.05$ ($t=1.230-3.327$, $gl=16-19$). N: Normoxia ($n=9$), H: Hipoxia ($n=9$), HGH: Hipoxia+GH ($n=12$).

c) Ensayo de TUNEL

Aunado a la evaluación de la actividad de caspasa-3 se realizó el ensayo de TUNEL para evaluar muerte celular por apoptosis. Se realizó una relación con respecto a la media del grupo control sometido a hipoxia, el cual se consideró como el 100%. Mediante esta técnica se encontró un incremento significativo de $33.9 \pm 5.1\%$ en normoxia a $100.0 \pm 9.9\%$ como puede observarse en las Figuras 16A, B y D. Similar a los resultados obtenidos en actividad de caspasa 3 la proporción relativa del área de TUNEL en los animales tratados con disminuyó a $61.6 \pm 6.3\%$, siendo significativamente diferente de los grupos controles como puede verse en las Figuras 16C y D.

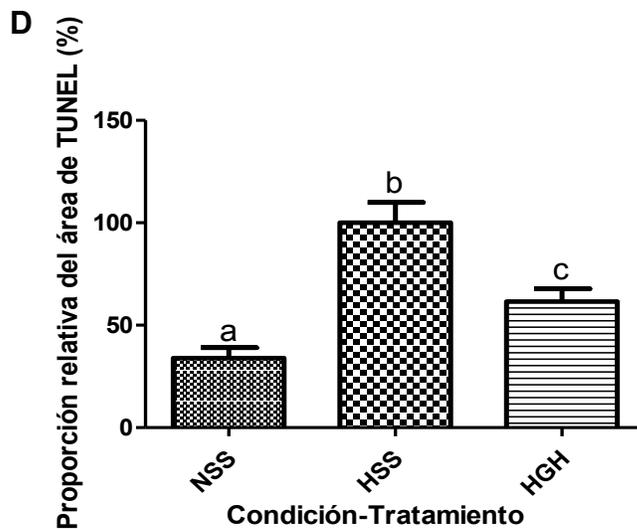
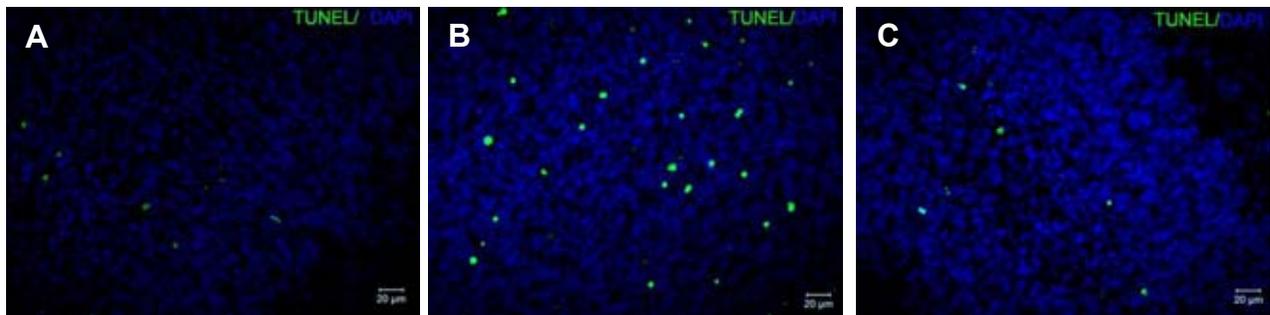


Figura 16.- Evaluación de TUNEL. Fotografías representativas de TUNEL en condiciones de normoxia (A), hipoxia (B) e hipoxia tratados con GH (C). D) Fracción de área de TUNEL en % para cada condición, donde $a \neq b \neq c$, $P < 0.05$ (Análisis estadístico ANDEVA unifactorial seguida de una prueba post hoc Bonferroni. $F_{2,177} = 20.08$, $P < 0.0001$).

N: Normoxia (n=3), H: Hipoxia (n=3), HGH: Hipoxia+GH (n=3).

DISCUSIÓN

La GH es una hormona clásicamente relacionada con el crecimiento somático y el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Actualmente se sabe que también puede tener funciones sobre diferentes sistemas como el SNC, donde puede ejercer sus efectos de manera directa por GH generada en el SNC o indirecta por IGF-1. Además de la GH extra-hipofisaria se piensa que también la GH hipofisaria podría atravesar la BBB y ejercer sus efectos en el SNC; sin embargo éste es aún un tema controversial.

En este trabajo se evaluó esta posibilidad mediante la administración intravenosa de GH-Cy3 en embriones de pollo de 15 DI sometidos a normoxia o hipoxia. Después de 2h de la administración de la hormona ésta se localizó en cortes de hígado, el cual se utilizó como tejido control para saber que la hormona pasó de la circulación a los tejidos; en el cerebro, principalmente se observó en los vasos sanguíneos, plexos coroideos, áreas periventriculares y cerebelo; y con menor intensidad en hipotálamo, hipocampo y corteza. En el caso del cerebelo la distribución se observó principalmente en los vasos sanguíneos, células de Purkinje y células de los núcleos profundos, así como con menor intensidad en células de la capa granular. Estos resultados concuerdan con trabajos previos donde después de 10 o 30 min de la administración periférica de I^{125} -GH encontraron radiactividad en homogenados de cerebro completo o de telencéfalo, diencefalo, telencéfalo, puente y cerebelo (Stern y cols, 1975; Pan y cols, 2005). El mecanismo de cómo atraviesa la hormona la BBB aún no se conoce; sin embargo éste puede ser similar al mecanismo de otras hormonas de peso molecular similar como la prolactina, la cual llega a SNC a través de su unión con su receptor en los plexos coroideos o por medio de un transporte saturable independiente de su receptor (Walsh y cols, 1987; Brown y cols, 2013). En contraste Pan y cols. (2005) no encontraron un sistema de transporte saturable al administrar 1 μ g GH/ratón de la hormona sin marcar, por lo que proponen que la GH atraviesa por medio de difusión pasiva más que por un transporte activo. En el caso de la prolactina Brown y cols. (2013) mencionan que fue necesario hasta 1 mg de prolactina/ratón para bloquear su transporte, por lo que son importantes más estudios utilizando diferentes concentraciones de GH, quizás similares a las que utilizaron Brown y cols. (2013). Otros estudios realizados por Hojva y cols. (1982), mostraron resultados diferentes ya que después de la administración de I^{125} -GH i.v. (30 min) encontraron niveles muy bajos de radiactividad en homogenados de amígdala y tálamo comparados con los detectados en el riñón, hígado e hipófisis, por lo que ellos mencionan que la GH probablemente no atraviesa la BBB, aunque se sabe que cuando se administra GH de forma periférica la mayor cantidad de ésta se almacena en tejidos periféricos como hígado, diafragma y riñón, en comparación a la encontrada en el SNC (Stern y cols, 1975).

Para saber si la GH realmente atraviesa la BBB en embriones de pollo de 15 DI o bien si se encuentra en el SNC por que la BBB aún no está completamente formada a esta edad se administró azul de Evans y se observó que se tiñeron de azul la piel y todos los tejidos internos excepto cerebelo. En cerebro este colorante sólo se observó en los ventrículos, así como en sus paredes tanto en cortes como macroscópicamente, lo que sugiere que a los 15 DI en el pollo ya está formada la BBB. Lo anterior coincide con Wakai y Hirokawa (1978), quienes observaron que al administrar peroxidasa de rábano i.v. al 15 DI en embriones de pollo, ésta solo se ubicaba en el lumen intravascular y en vesículas endoteliales tanto en médula como en cerebelo, lo que indica la presencia de la BBB. Aunado a lo anterior Grange-Messent y cols. (1996) por medio de microscopía electrónica observaron la presencia de las uniones estrechas como una red de filamentos interconectados en los lóbulos ópticos de pollo de 15 DI, lo que es característico de este tipo de uniones maduras. Todo lo anterior sugiere que a los 15 DI en el pollo ya está formada la BBB.

Con respecto a la distribución de GH-Cy3, la mayor señal se encontró en vasos sanguíneos, células de Purkinje, neuronas de los núcleos profundos del cerebelo, plexos coroideos y áreas periventriculares, y en menor intensidad en células de la capa granular del cerebelo, hipotálamo, hipocampo y corteza. Este patrón de distribución es similar al observado por Lobie y cols. (1993) para el GHR. Ellos mediante inmunohistoquímica demostraron la presencia del receptor en cerebro de rata, principalmente en áreas como cerebelo, hipocampo, hipotálamo, plexo coroideo y áreas periventriculares, con una intensa inmunoreactividad en las células de Purkinje, en los plexos coroideos y en la línea ventricular. Una fuerte inmunoreactividad en el hipocampo e hipotálamo y una moderada a débil inmunoreactividad en la capa granular externa e interna del cerebelo. Resultados similares fueron obtenidos por Alba-Betancourt y cols. (2011) quienes encontraron la mayor inmunoreactividad tanto para la GH como para su receptor en las células de Purkinje y en menor grado en células granulares y procesos de la capa molecular de cerebelo de pollo de 4 semanas mediante inmunohistoquímica. En este trabajo se corroboraron esos resultados y además los resultados mostraron que la señal inmunoreactiva co-localizaba con la señal de GH-Cy3 en todas las áreas, lo cual nos permite proponer que la hormona puede atravesar la BBB y unirse a su receptor para ejercer sus efectos de manera directa en el SNC.

También se determinó si la distribución de la hormona cambiaba dependiendo de las condiciones de oxigenación entre normoxia e hipoxia. Los resultados mostraron un incremento de la concentración de GH en hígado, cerebro y cerebelo (siendo en este último significativo) cuando los animales eran sometidos a hipoxia. Este incremento de GH en los animales sometidos a hipoxia puede deberse a que la BBB se daña o modifica bajo esta condición. En modelos *in vivo* de hipoxia-isquemia en rata se ha

observado un incremento de la permeabilidad tanto para moléculas de alto como bajo peso molecular, lo que está asociado con alteraciones en la expresión de proteínas de unión estrecha de la BBB y de las células endoteliales (Kaur & Ling, 2008; Ek y cols, 2015). En relación con este punto, Mustafa y cols. (1995) observaron un incremento de la permeabilidad a GH en la médula espinal, corteza y cerebelo 2 h después de inducir un daño en la médula espinal a nivel de T9-T12. Este incremento fue inhibido por la administración de un antioxidante (H 290/51), el cual disminuye la peroxidación de lípidos. Por otra parte, estudios del grupo de Scheepens y cols. (1999) observaron un incremento de la inmunoreactividad del GHR y/o GHBP (proteína de enlace a GH) en los vasos sanguíneos de la corteza frontoparietal y somatosensorial así como de los plexos coroideos una hora después de un daño hipóxico-isquémico en rata. Una de las propuestas de como la GH atraviesa la BBB es la translocación de ésta mediante la internalización de su receptor en el endotelio vascular a través del plexo coroideo (Aberg y cols, 2006) o el paso por la BBB a través de transporte activo; por lo que Scheepens y cols. (1999) sugieren que este incremento del GHR podría facilitar el transporte de GH a través de la BBB. En este modelo no se observaron diferencias con respecto a la distribución macroscópica del azul de Evans en cortes de cerebro y cerebelo entre ambas condiciones de oxigenación; sin embargo es necesario realizar la cuantificación de este colorante o realizar otra prueba más específica para poder saber si el aumento en la concentración de GH en cerebelo se debe a un mayor transporte de la misma o a que la BBB se encuentra dañada.

En trabajos previos del laboratorio se ha observado que la administración de GH en cultivos primarios neuronales y organotípicos de cerebelo de embrión de pollo durante un daño por hipoxia y baja glucosa tiene un efecto neuroprotector aumentando la sobrevivencia celular y disminuyendo la apoptosis a través de la inhibición de la actividad de caspasa 3. En estos estudios se observó un incremento de Bcl2 y disminución de Bax, dando como resultado una disminución de la relación Bax/Bcl-2, lo que puede estar dando como resultado la inhibición de caspasa 3 (Córdoba, 2011; Alba-Betancourt y cols, 2013). Por lo tanto en este trabajo fue de gran interés probar el efecto antiapoptótico de GH administrada en embriones de pollo de 15 DI después de ser sometidos a hipoxia. Como un control de que éste modelo de hipoxia funciona se cuantificó el factor de transcripción HIF 1 α en ambas condiciones de oxigenación. Bajo estas condiciones se encontró que este factor aumenta significativamente cuando los animales son sometidos a hipoxia, lo que coincide con lo reportado en diferentes trabajos donde al someter ratones o embriones de pollo a hipoxia normobárica observaron un incremento en la expresión de este factor (Stroka y cols, 2001; Giusti & Fiszer de Plazas, 2012). Estos resultados fueron los esperados, ya que se sabe que este es un factor de transcripción importante para adaptar al organismo a un ambiente hipóxico incrementando la transcripción de diferentes genes como VEGF, EPO, GLUT 1,3, LDHA, entre otros (Hong y cols; 2004).

Por otra parte se sabe que cuando existe un daño por hipoxia o hipoxia-isquemia ocurre muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis. En el modelo de hipoxia utilizado en este trabajo se encontró un incremento significativo de la apoptosis a las 24 h de reoxigenación, evaluada por la actividad de caspasa 3 y TUNEL. Esto concuerda con estudios previos del laboratorio, donde bajo el mismo protocolo se encontró un incremento significativo de la proporción relativa de la señal de TUNEL en cerebro de animales sometidos a hipoxia (Ávila; 2009) y en estudios realizados en modelos de hipoxia-isquemia unilateral en ratas de 7 días postnatales donde se observa el mayor pico actividad de caspasa 3 y señal de TUNEL 24 h después de ser sometidas al daño (Wang y cols, 2001; Zhu y cols, 2000). En cuanto a la distribución la principal señal de TUNEL se observó en la capa granular interna y en mucho menor grado en la capa granular externa, lo que coincide con diferentes reportes en donde la mayoría de la muerte por apoptosis se observa en estas capas, mientras las células de Purkinje parecen morir principalmente por necrosis (Yue y cols, 1997).

Con respecto al tratamiento de GH posterior al daño se observó que con una dosis de 150 µg/kg i.v., tomada de los trabajos de Devesa en los cuales ha observado un efecto neuroprotector o neuroreparador, la apoptosis evaluada por la actividad de caspasa 3 mostró una tendencia a disminuir aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo sometido a hipoxia, pero tampoco fue diferente al mantenido en normoxia. Sin embargo cuando se evaluó la apoptosis mediante el ensayo de TUNEL la proporción relativa del mismo si disminuye significativamente con respecto al grupo sometido a hipoxia. Con respecto a los resultados obtenidos con el ensayo de TUNEL estos concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio en cultivos neuronales primarios y organotípicos (Alba-Betancourt y cols, 2013; Córdoba, 2011) y con estudios *in vivo* en modelos de hipoxia-isquemia en ratas (Shin y cols, 2004; Han y cols, 2006).

En el caso de caspasa 3 los resultados no concuerdan con los trabajos previos del laboratorio, ni con otros estudios *in vivo* (Alba-Betancourt y cols, 2013; Córdoba, 2011; Han y cols, 2006), en los cuales observaron una disminución significativa de esta caspasa tanto por inmunohistoquímica como por ensayo enzimático. Esta posible discrepancia entre nuestros resultados se puede deber a que la actividad de caspasa 3 fue inicialmente muy alta en el grupo mantenido en normoxia y la hormona no pudo reducir el daño. Otra posibilidad es el tipo de sistema utilizado (*in vitro* vs *in vivo*), o el tipo de daño (hipoxia vs hipoxia-isquemia), en los cuales la apoptosis dependiente de caspasa 3 puede tener una menor participación en el daño y/o que exista la presencia de apoptosis independiente de caspasas, como la inducida por el factor inductor de la apoptosis (AIF), lo cual ha sido reportado previamente por Zhu y cols. (2003). En relación a este punto como una posible explicación del efecto neuroprotector de GH observado mediante el ensayo de TUNEL en este trabajo Harvey y cols. (2006)

encontraron que el tratamiento con GH disminuye significativamente el número de células positivas a TUNEL en cultivos de explantes de retina de embrión de pollo por medio de la disminución del mensajero de caspasa 3 a 6 y 8 DI y de AIF a 8 DI. Similares resultados obtuvieron Kireev y cols. (2013), encontrando que 10 semanas de tratamiento con GH disminuye significativamente el mensajero de AIF en el giro dentado de ratas viejas, por lo que sería importante cuantificar este factor y ver si en el modelo utilizado en este trabajo sucede lo mismo. Por otra parte, los estudios realizados por Frago y cols. (2002), Heredia y cols. (2013), Li y cols. (2011) y Shin y cols. (2004) hacen más de una administración de la hormona, por lo que sería interesante saber si bajo este régimen de dosificación se puede obtener una mayor recuperación del daño o una menor proporción de células apoptóticas.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La GH puede atravesar la BBB encontrándose en plexos coroideos, corteza, áreas periventriculares, hipotálamo, hipocampo y cerebelo en ambas condiciones de oxigenación.
- Existe un aumento de la permeabilidad GH en cerebelo cuando los animales son sometidos a hipoxia.
- Se encontró un incremento significativo de HIF 1 α en el grupo sometido a hipoxia, lo que muestra que el modelo es funcional.
- Se observó el efecto antiapoptótico de la GH bajo las condiciones aquí utilizadas mediante el ensayo de TUNEL. Con respecto a la actividad de caspasa 3, esta disminuyó cuando los animales fueron tratados con GH, aunque la diferencia con respecto a las otras condiciones experimentales no fue significativamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aberg, D. N., Brywe, K. G., & Isgaard, J. (2006). Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *Scientific World Journal*, Vol. 6, Pp 53-80.
2. Alba-Betancourt, C., Luna-Acosta, J. L., Ramírez-Martínez, C. E., Ávila-González, D., Granados-Ávalos, E., Carranza, M., Martínez-Coria H., Arámbulo C. & Luna M. (2013). Neuro-protective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 183. Pp 17-31.
3. Alba-Betancourt, C., Arámburo, C., Ávila-Mendoza, J., Ahumada-Solórzano, S.M., Carranza, M., Rodríguez-Méndez, A.J., Harvey, S. & Luna, M. (2011). Expression, cellular distribution, and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 170, No. 3. Pp 528-540.
4. Arámbulo, C., Alba-Betancourt, C., Luna, M., & Harvey, S. (2014). Expression and function of neural growth hormone: A brief review. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 203. Pp 35-42.
5. Arce, V.M., Devesa, P. & Devesa, J. (2013). Role of growth hormone (GH) in the treatment on neural diseases: From neuroprotection to neural repair. *Neurosci Res*. Vol. 76, No. 4. Pp 179-186.
6. Ávila G. D. (2009). Efecto de la hipoxia en la concentración de la hormona de crecimiento en cerebro de embriones de pollo. Tesis de maestría. Instituto de neurobiología de la UNAM, México. Pp 67.
7. Blackmore, D.G., Vukovic, J., Waters, M.J. & Bartlett, P.F. (2012). GH mediates exercise- dependent activation of SVZ neural precursor cells in aged mice. *PLoS One*. Vol. 7, No. 11. Pp 1-7.
8. Beilharz E.J., Williams C.E., Dragunow M., Sirimanne E.S. & Gluckman P.D. (1995). Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res*. Vol. 29, No. 1. Pp 1-14.

9. Brooks A. J. & Waters M. J. (2010). The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Activation and Clinical Implications. *Nat Rev Endocrinol*. Vol. 6, No. 9. Pp 515-525.
10. Brown, R. S., Banks, W. A., Binart, N., & Grattan, D. R. (2013). Saturable transport of prolactin across the blood-brain barrier is independent of the prolactin receptor. *Hypothalamus-Pituitary Development & Biology*. MON-135.
11. Burman P, Hetta J, Wide L, Mansson JE, Ekman R & Karlsson FA (1996) Growth hormone treatment affects brain neurotransmitters and thyroxine. *Clin Endocrinol*. Vol 44. No 3. Pp 319-324.
12. Coculescu M (1999). Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J Pediatr Endocrinol* . Vol. 12. No. 2. Pp 113-24.
13. Córdoba M. C. (2011). Efecto neuro-protector de la hormona de crecimiento (GH) en cultivos organotípicos de cerebelo de pollo. Tesis de maestría. Instituto de neurobiología de la UNAM, México. Pp 56.
14. Devesa, P., Reimunde, P., Gallego, R., Devesa, J. & Arce, V.M. (2011). Growth hormone (GH) treatment may cooperate with locally-produced GH in increasing the proliferative response of hippocampal progenitors to kainate-induced injury. *Brain Inj*. Vol. 25, No. 5. Pp 503-513.
15. Devesa J., Reimunde P., Devesa P., Barbera M. & Arce V. (2013). Growth hormone (GH) and brain trauma. *Horm. Behav*. Vol. 63, No. 2. Pp 331-344.
16. Doulah, A. H., Rohani, A. H., Khaksari Haddad, M., Motamedi, F., Farbood, Y., Badavi, M., Malek M. & Sarkaki A. (2009). The effect of peripheral administration of growth hormone on AD-like cognitive deficiency in NBM-lesioned rats. *Neurosci Lett*, Vol. 466, No. 1. Pp 47-51.
17. Ek, C. J., D'Angelo, B., Baburamani, A. A., Lehner, C., Leverin, A. L., Smith, P. L. & Mallard, C. (2015). Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Vol. 35. Pp 818-827.
18. Fernandez-Tresguerres, H. J. (2010). Fisiología humana. Ed. McGraw-Hill. 4 Edición. Pp 1254.
19. Frago, L. M., Pañeda, C., Dickson, S. L., Hewson, A. K., Argente, J., & Chowen, J. A. (2002). Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain

- insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*. Vol. 143, No. 10. Pp 4113-4122.
20. García-García, F., De la Herrán-Arita, A.K., Juárez-Aguilar, E., Regalado-Santiago, C., Millán-Aldaco, D., Blanco-Centurión, C. & Drucker-Colín, R. (2011). Growth hormone improves hippocampal adult cell survival and counteracts the inhibitory effect of prolonged sleep deprivation on cell proliferation. *Brain Res Bull*. Vol 84, No. 3. Pp 252-257.
21. Ganong, W. F. (2006). Fisiología médica. Manual Moderno. Pp. 917.
22. Giusti, S., & Fiszer de Plazas, S. (2012). Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 in a prenatal model of acute hypoxia. *J Neurosci Res*. Vol. 90, No. 2. Pp 468-478.
23. Gluckman P. D., Pinal C. S. & Gunn A. J. (2001). Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. *Semin in Neonatol*. Vol. 6, No. 2. Pp 109–120.
24. Grange-Messent, V., Raison, D. and Bouchaud, C. (1996). Astrocyte-endothelial cell relationships during the establishment of the blood-brain barrier in the chick embryo. *Biology of the Cell*. Vol. 86. No. 1. Pp 45–51.
25. Goñi de Cerio, F., Lara-Celador, I., Alvarez, A., & Hilario, E. (2013). Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci*. Vol. 3, No. 1. Pp 191-214.
26. Gustafson, K., Hagberg, H., Bengtsson, B.-A., Brantsing, C., & Isgaard, J. (1999). Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in rats. *Pediatr Res*, Vol. 45, No. 3. Pp 318-323.
27. Halberg M & Nyberg F. (2012). Growth hormone receptors in the brain and their potential as therapeutic targets in central nervous system disorders. *The open Endocrinology Journal*. Vol. 6. Pp 27-33.
28. Han, T. R., Chun, M. H., Jang, H. D., Kim, K.-S., Lim, H. K., & Cho, H. J. (2007). Neuroprotective effects of growth hormone against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: H magnetic resonance spectroscopy study. *J Korean Med Sci*, Vol. 22, No. 1. Pp 122-126.

29. Harvey, S., Scanes, C. G., & Daughaday, W. H. (1994). Growth hormone. Estados Unidos de América: CRC Press. Pp 523.
30. Harvey, S. & Hull, K. (2003). Neural growth hormone: an update. *J Mol Neurosci*. Vol. 20, No. 1. Pp 1-13.
31. Harvey, S., Baudet, M. L., & Sanders, E. J. (2006). Growth hormone and cell survival in the neural retina: caspase dependence and independence. *Neuroreport*. Vol. 17. No. 16. Pp 1715-1718.
32. Heredia, M., Fuente, A., Criado, J., Yajeya, J., Devesa, J., & Riobos, A. S. (2013). Early growth hormone (GH) treatment promotes relevant motor functional improvement after severe frontal cortex lesion in adult rats. *Behav Brain Res*. Vol. 247. Pp 48-58.
33. Herington, A. C., & Lobie, P. E. (2012). Signal transduction mechanisms underlying growth hormone receptor action. *The open Endocrinology Journal*, Vol. 6, No. 1. Pp 13-21.
34. Hojvat S, Baker G, Kirsteins L. & Lawrence A M (1982) Growth hormone (GH), immunoreactivity in the rodent and primate CNS: Distribution, characterization and presence posthipophysectomy. *Brain Res*. Vol. 239, No. 2. Pp 543-557.
35. Hong, S. S., Lee, H., & Kim, K. W. (2004). HIF-1 α : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat*. Vol. 36. No. 6. Pp 343-353.
36. Huang B. Y. & Castillo M. (2008). Hypoxic-ischemic brain injury: imaging findings from birth to adulthood. *RadioGraphics*, Vol. 28, No. 2. Pp 417-439.
37. Inage Y. W., Itoh M, Wada K. & Takashima S. (1998). Expression of two glutamate transporters, GLAST and EAAT4, in the human cerebellum: their correlation in development and neonatal hypoxic-ischemic damage. *J Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 57, No. 6. Pp 554-562.
38. Inder T. E. & Volpe J. J. (2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*. Vol. 5, No. 1. Pp 3–16.
39. Kaabi, Y. A. (2012). Growth hormone and its receptor: A molecular insight. *Saudi Journal for Health Sciences*, Vol. 1, No. 2. Pp 61-68.
40. Kaur, C., & Ling, E. A. (2008). Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res*. Vol. 5. No. 1. Pp 71-81.

41. Kireev, R. A., Vara, E., & Tresguerres, J. A. F. (2013). Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. *Biogerontology*. Vol. 14, No. 4. Pp 431-442.
42. Kleman N. W., Sun D. & Cengiz P, (2010). Mechanism underlying neonatal hypoxia ischemia. *The open Drug Discovery Journal*. Vol. 2. Pp 129-137.
43. Li, R. C., Guo, S. Z., Raccurt, M., Moudilou, E., Morel, G., Brittan, K. R., & otros. (2011). Exogenous growth hormone attenuates cognitive deficits induced by intermittent hypoxia in rats. *Neuroscience*, Vol. 196. Pp 237-250.
44. Lobie, P. E., García-Aragón, J., Lincoln, D. T., Barnard, R., Wilcox, J. N., & Waters, M. J. (1993). Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Developmental Brain Research*, Vol. 74. Pp 225-233.
45. Ming-Chi L. & San-Nan Y. (2010). Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Pp. 1-6.
46. Mödersheim T. A. E., (2006). Protection and recovery of the injured brain: the significance of the cerebral growth hormone and prolactin axes. Tesis de doctorado, Universidad de Auckland, Nueva Zelanda. Pp 212.
47. Mustafa, A., Sharma, H. S., Olsson, Y., Gordh, T., Thoren, P., Sjöquist, P. O., & Nyberg, F. (1995). Vascular permeability to growth hormone in the rat central nervous system after focal spinal cord injury. Influence of a new anti-oxidant H 290/51 and age. *Neuroscience research*. Vol. 23. No. 2. Pp 185-194.
48. Nyakas C., Buwalda B. & Luiten P. G. M. (1996). Hypoxia and brain development. *Progress in Neurobiology*. Vol. 49. Pp 1-51.
49. Nyberg, F. (2000). Growth hormone in the brain: Characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Frontiers in neuroendocrinology*, Vol. 21. Pp 330-348.
50. Palmer, T. D., Lewis, J., & Zijlstra, A. (2011). Quantitative analysis of cancer metastasis using an avian embryo model. *Journal of visualized experiments*, Vol. 51. Pp 1-7.

51. Pan, W., Yu, Y., Cain, C. M., Nyberg, F., Couraud, P. O., & Kastin, A. J. (2005). Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology*, Vol. 146, No. 11. Pp 4898-4904.
52. Regalado, S. C., López, M. M., & Juárez, A. E. (2012). La hormona de crecimiento en el sistema nervioso central. *Rev Med UV*, Vol. especial. Pp 29-35.
53. Scheepens, A., Sirimanne, E., Beilharz, E., Breier, B. H., Waters, M. J., Gluckman, P. D., & Williams, C. E. (1999). Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. *Molecular brain research*. Vol. 68.No. 1. Pp 88-100.
54. Scheepens, A., Sirimanne, E. S., Breier, B. H., Clark, R. G., Gluckman, P. D., & Williams, C. E. (2001). Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience*, Vol. 104, no. 3. Pp 677-687.
55. Shin, D. H., Lee, E., Kim, J.-W., Kwon, B.-S., Kyung, J. M., Jee, Y. H., & otros. (2004). Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters*, Vol. 354. Pp 64-68.
56. Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C. & Candinas, D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal*. Vol. 15. No. 13. Pp 2445-2453.
57. Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *Journal of experimental Biology*, Vol. 207. Pp 3149-3154.
58. Stern W. C., Miller M., Resnick O. & Morgane P. J. (1975). Distribution of ¹²⁵I-labeled rat growth hormone in regional brain areas and peripheral tissue of the rat. *American Journal of Anatomy*. Vol. 144, No. 4. Pp 503-507.
59. Wakai, S., & Hirokawa, N. (1978). Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell and tissue research*. Vol. 195. No. 2. Pp 195-203.

60. Walsh, R. J., Slaby, F. J., & Posner, B. L. (1987). A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology*. Vol. 120. No. 5. Pp 1846-1850.
61. Wang, X. I. A. O. Y. A. N. G., Karlsson, J. O., Zhu, C., Bahr, B. A., Hagberg, H., & Blomgren, K. (2001). Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biology of the Neonate*. Vol. 79. No. 3. Pp 172-179.
62. Webb E. A., O'Reilly M. A. , Clayden J. D., Seunarine K. K., Chong W. K., Dale N., Salt A., Clark C. A. & Dattani M. T. (2012). Effect of growth hormone deficiency on brain structure, motor function and cognition. *Brain a Journal of Neurology*. Vol. 135, No. 1. Pp. 216–227.
63. Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., Cooper, C., Cady, E., Wyatt, J. S. & Squier, M. V. (1997). Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia–ischaemia. *Neuropathology and applied neurobiology*, Vol. 23. No. 1. Pp 16-25.
64. Zhu, C., Wang, X., Hagberg, H., & Blomgren, K. (2000). Correlation Between Caspase-3 Activation and Three Different Markers of DNA Damage in Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia. *Journal of neurochemistry*. Vol 75. No. 2. Pp 819-829.
65. Zhu, C., Qiu, L., Wang, X., Hallin, U., Candé, C., Kroemer, G. & Blomgren, K. (2003). Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Journal of neurochemistry*, Vol. 86. No. 2. Pp 306-317.