

# DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN EL CEREBELO DE POLLO.

Ávila González D.<sup>(1)</sup>; Alba Bentacour C.<sup>(2)</sup>; Arámburo de la Hoz C.<sup>(2)</sup>, Luna Muñoz M.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Naturales,  
Universidad Autónoma de Querétaro.

<sup>(2)</sup> Instituto de Neurobiología; Universidad Nacional Autónoma de México

## RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína secretada por la hipófisis que participa en múltiples funciones biológicas. Si embargo la GH y su ARNm han sido detectados en varios tejidos extrahipofisarios, como es el caso del cerebro en el cual se han establecido varias acciones de la GH (como crecimiento, neurogénesis, mielinización, etc). En este trabajo se determinó la expresión del gen de la hormona de crecimiento en el cerebelo de pollo. Se llevó a cabo la extracción de ARN total de cerebelos y cerebro completo de pollos de 1 semana de edad post eclosión; se obtuvo el ADN complementario a partir del ARN total extraído utilizando la técnica de retro-transcripción (RT-PCR), se utilizaron los oligonucleótidos específicos CRE1 5'-3' y CRE2 3'-5' en un PCR y GH1 y GH2 en un PCR anidado ya que delimitan la secuencia correspondiente al marco de lectura de la GH y se obtuvo la banda correspondiente a la GH. Con esto se puede señalar la presencia de GH en el cerebelo de pollo apoyando la propuesta de que la GH producida localmente pueda tener un efecto autócrino y/o parácrino.

## INTRODUCCIÓN

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona polipeptídica que pertenece a una familia de hormonas que son producidas principalmente en células especializadas llamadas somatotropos presentes en la hipófisis de todos los vertebrados, que además de los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos, interviene en el metabolismo de proteínas, carbohidratos ácidos nucleicos y lípidos y tiene efectos importantes sobre la diferenciación y proliferación celular, así como sobre la estimulación enzimática, el transporte de aminoácidos, la estimulación de la eritropoyesis y la secreción de otros factores hormonales (Isaksson et al., 1985).

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

**GH en el sistema nervioso central.** En el sistema nervioso central, la GH promueve el crecimiento cerebral, la mielinización, arborización neuronal, diferenciación neuronal y las funciones cognitivas. Diversos estudios han mostrado la presencia de inmunorreactividad a GH (GH-IR) en varias áreas del sistema nervioso del humano y la rata (Hojvat et al., 1982; Gossard et al., 1987). En el cerebro de pollo adulto se ha determinado la presencia de GH-IR en hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelo, y se ha visto que la concentración de la misma cambia con la edad (Alba C., 2006).

## **HIPÓTESIS.**

La hormona de crecimiento (GH) se expresa de manera local en el cerebelo de pollos de una semana posteclosión.

## **OBJETIVOS.**

1. Realizar la extracción de ARN total de cerebro completo y cerebelo de pollos de 1 semana de edad posteclosión.
2. Obtención del ADN complementario a partir del ARN total extraído utilizando la técnica de retro-transcripción (RT-CR).
3. Utilización de oligonucleótidos específicos que delimitan la secuencia correspondiente al marco de lectura de la GH hipofisiaria para comparar la banda correspondiente al mismo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

**Extracción de ARN total.** Los pollos de una semana post-eclosión fueron sacrificados por dislocación cervical y se les disectó el cerebro completo, cerebelo, e hipófisis. 100mg de tejido fueron homogenizados con 1ml de Trizol en un politrón. A cada muestra se le añadió 200µl de cloroformo, se mezcló manualmente por 30s y se incubó a temperatura ambiente por 3min. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 15min a 4°C, la fase acuosa se transfirió posteriormente a tubos libres de ARNasas y ADNasas y se le agregó 500µl de fenol-cloroformo, se agitó por 2 min en “vórtex” y se centrifugó a 12,000 rpm por 5min, 4 °C. La fase acuosa se transfirió a tubos Eppendorf y se les adicionó 500µl de isopropanol; se agitaron manualmente y se incubaron a temperatura ambiente por 10min, se centrifugó a 12,000 rpm por 10min a 4 °C; El precipitado se lavó 2 veces con etanol frío al 75 %, se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 100µl de agua estéril tratada con dietilpirocarbonato al 0.1 % (H<sub>2</sub>O – DEPC). Para determinar la pureza del ARN una alícuota de 5µl de ARN de cada muestra se adiciona a 995µl de H<sub>2</sub>O – DEPC. Se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm y 280 nm para determinar su índice de pureza (260/280 nm) que deber ser lo más cercano a 2 indicando el grado de pureza de los ácidos nucleicos. La concentración del ARN se obtuvo aplicando la fórmula [ARN µg/µl] =Factor de dilución \* 40µg/ µl\*DO a 260nm, (Sambrook y Russell, 2001). Para analizar la integridad del ARN se hizo electroforesis con geles de agarosa al 1.2% en TAE 1x, a voltaje constante de 80V en cámaras electroforéticas (Bio-Rad).

**Obtención del ADN complementario (ADNc).** Se hizo una retrotranscripción reversa con 1 – 5 µg de ARN total de cada muestra. Usamos a la hipófisis como control positivo para GH, cerebelo y cerebro completo. A la muestra se le agregó 1µl de oligo-dT (50µg/µl), 1µl de mezcla dNTP (deoxinucleótidos 1.25mM) y H<sub>2</sub>O DEPC 0.1% v/v en agua suficiente para un volumen total de 12µl; esta solución se incubó por 5min a 65°C en el termociclador (Perkin Elmer) y se colocó en hielo. Se adicionó 7µl de mezcla de reacción (amortiguador de reacción 5X y DTT 0.1M, RNaseOUT) y se incubó por 2min a 42°C. Después se adicionó 1µl de enzima transcriptasa reversa (Superscript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase, 200U/µl) y se incubaron durante 50min a 42°C y la reacción se inactivó a 70°C por 15min.

### **Amplificación del ADNc para la GH (Reacción de PCR).**

Una alícuota de 5µl del ADNc obtenido por RT (de hipófisis, cerebelo y cerebro completo) se amplificó utilizando oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura del gen de la GH hipofisiaria CRE1 y CRE2 y otro par más internos, GH1 y GH2 para un PCR anidado. La mezcla de reacción contenía 5µl de amortiguador PCR 5x, 8µl de dNTP's 1.25 mM, 0.5 µl de oligonucleótidos 25 pM/µl y 0.5 µl de taq ADN polimerasa, 5U/µl (Render et al., 1995b). La

mezcla de reacción y el ADNc se incubó a 94 °C por 3 min, después se adicionó 3µl MgCl<sub>2</sub> 50mM y los tubos se corrieron 35 ciclos de 94 °C por 1.5 min, 55°C 1 min, 72°C 1min., se paro la reacción 72°C 10 min y a 4°C 10 min. Los controles negativos se hicieron mezclando la muestra más la mezcla de reacción pero sin la Taq ADN polimerasa.

Al término del PCR, el producto se analizó por electroforesis a voltaje de 80V en geles de agarosa al 1.2% en TAE 1X (Invitrogen), en cámaras electroforéticas (Bio-rad). Las muestras se prepararon con alícuotas de 5µl del producto más 1µl de bromuro de etidio (Gibco BRL) 0.5µg/µl más 1µl de amortiguador de muestra Blue Juice 5 X (Invitrogen). El tamaño de la banda esperada es de 690pb.

**RESULTADOS:**

Para evaluar las condiciones del ARN total se verificó por dos métodos: uno corriendo un gel para observar el estado de purificación y la integridad del ARN extraído (Fig.1), en donde se muestra un gel representativo de una extracción y se pudo observar a las dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales (18S y 5S) para los tejidos que señalan su integridad.

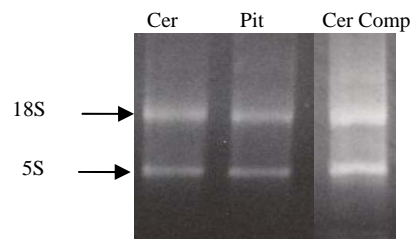


Figura 1. Composición de fotografías representativas de las bandas obtenidas de la purificación de ARN total. Puede observarse las fracciones de los ARN ribosomales. Abreviaturas: Cer, Cerebelo; Pit, Hipófisis; Cer Com, Cerebro completo.

Otro método para corroborar la integridad de RNA fue hacer un PCR para amplificar un gen constitutivo de pollo, en este caso fue el gen de la glicerol fosfato deshidrogenada (GAPDH) el cual genera un ADNc de 500 pares de bases (Fig.2).

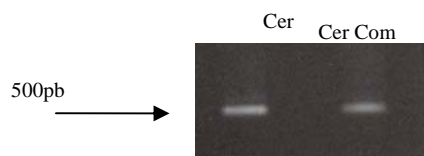


Figura 2. Fotografía representativa de las bandas obtenidas de la amplificación del gen de la GAPDH de pollo que corresponde a 500 pares de bases (pb). Abreviaturas: Cer, Cerebelo; Cer Com, Cerebro completo.

Posteriormente se hizo la amplificación del gen de la GH utilizando los oligonucleótidos CRE1 y CRE2, que delimitan los extremos del marco de lectura de la GH, los resultados sólo fueron positivos en el caso de la hipófisis.

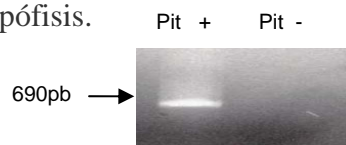


Figura 3. Fotografía representativa de la banda obtenida de la amplificación del gen de la GH de pollo (690pb). Abreviaturas: Pit, Hipófisis.

Para una mejor amplificación de las muestras de cerebelo y cerebro completo se procedió a la realización de un PCR anidado utilizando el producto obtenido del PCR con los oligonucleótidos CRE1/CRE2 y unos nuevos oligonucleótidos (GH1/GH2) que genera un ADN complementario más pequeño de 615 pb.( Fig.4).

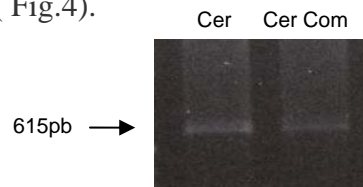


Figura 4. Fotografía representativa de la banda obtenida de la amplificación del gen de la GH de pollo utilizando PCR anidado, primero con los oligos CRE1/CRE2 y posteriormente con los oligos GH1/GH2 los cuales mostraron la presencia de una banda de 615pb. Abreviaturas: Cer, Cerebelo; Cer Com, Cerebro completo.

## CONCLUSIONES

A pesar de que datos previos del laboratorio mostraron que la concentración de GH en el cerebro es 1000 veces menor que en la hipófisis en este trabajo se pudo mostrar la presencia del gen de GH tanto en cerebro completo como en cerebelo de pollos de 1 semana. Por el tamaño del fragmento cDNA obtenido se puede señalar que puede ser igual al hipofisiario.

Estos datos aunque preliminares y otros en los que se ha mostrado la presencia de RNAm para el receptor apoyan la propuesta de que la GH producida localmente, lleve a cabo sus efectos a nivel autócrino y/o parácrino en el sistema nervioso de pollo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba Bentacour C. “Caracterización y localización de la hormona de crecimiento en el cerebro de pollo”. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, **2006**.
- Allen JT., Bloor CA., Kedia RK., Knight RA., Spiteri MA. “Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung”. Neuropeptides. 34 (2); 98-107, **2000**
- Baudet ML., Sanders EJ., Harvey S. “Retinal growth hormone in the chick embryo”. Endocrinology. 144 (12); 5459-5468, **2003**.
- Gossard F., Dihl F., Pelletier G., Dubois PM., Morel G. “In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA”. Neurosci. Lett. 79; 251-256, **1987**
- Harvey S., Johnson CDM., Sanders EJ. “Growth hormone in neural tissues of the chick embryo”. Journal of Endocrinology. 169; 487-498, **2001**.
- Harvey S., Lavelin L., Pines M. “Growth Hormone (GH) action in early embryogenesis: expression of a GH-response gene in sites of GH production and action”. Anat Embryol. 204; 503-510, **2001**.
- Harvey S., Baudet ML., Murphy A., Luna M., Hull KL., Arámburo C. “Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes”. Gen Comp Endocrinol. 139 (2); 158-167, **2004**.
- Hojvat S., Emanuele N., Baker G., Connick E., Kirsteins L., Lawrence AM. “Growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH)-like peptides in the rodent brain: non-parallel ontogenetic development with pituitary counterparts”. Brain Res. 256 (4); 427-434, **1982**.

- Isaksson OG., Eden S., Jansson JO. "Mode of action of pituitary growth hormone on target cells". *Ann. Rev. Physiol.* 47; 483-499, **1985**.
- Luna M., Huerta L., Berumen L., Martinez-Coria H., Harvey S., Aramburo C. "Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation". *Gen Comp Endocrinol.* 137 (1); 37-49, **2004**.
- Luna M., Barraza N., Berumen L., Carranza M., Pedernera E., Harvey S., Aramburo C. "Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl". *Gen Comp Endocrinol.* 144 (1); 28-37, **2005**.
- Recher S., Raccurt M., Lambert A., Lobie PE., Mertani HC., Morel G. "Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs". *J Histochem Cytochem.* 49 (3); 347-354, **2001**.
- Render CL., Hull KL., Harvey S. "Neural expression of the pituitary GH gen. *Journal of Endocrinology*". 147; 413-422, **1995**.
- Render CL., Hull KL., Havey S. "Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine*". 3; 729-735, **1995**.
- Sambrook J. y Russell D.W. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3<sup>rd</sup> ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**.
- Slominski A., Malarkey WB., Wortsman J., Asa SL., Carlson A. "Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene". *J. Lab. Clin. Med.* 136 (6); 476-481, **2000**.
- Tresguerres JAF. "Fisiología humana". Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de Madrid, España, **1999**.
- Yoshizato H., Fujikawa T., Soya H., Tanaka M., and Nakashima K. "The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress". *Endocrinology* 139; 2545-2551, **1998**.