

Tesis de Posgrado

Efecto del óxido nítrico sobre la fisiología de la adenohipófisis de la rata

Velardez, Miguel Omar

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Velardez, Miguel Omar. (2002). Efecto del óxido nítrico sobre la fisiología de la adenohipófisis de la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3471_Velardez.pdf

Cita tipo Chicago:

Velardez, Miguel Omar. "Efecto del óxido nítrico sobre la fisiología de la adenohipófisis de la rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3471_Velardez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales
Depto. de Ciencias Biológicas

Efecto del óxido nítrico sobre la fisiología de la adenohipófisis de rata

Tesis de Doctorado

Autor

Lic. Miguel Omar Velardez

Director

Dra. Beatriz Haydée Duvilanski

Consejero

Dra. Nora Ceballos

Nº 3471

Centro de Investigaciones en Reproducción
Facultad de Medicina, UBA
Agosto de 2002

A Todos.

Agradecimientos

A *Beatriz*, por todo.

A los chicos, *Jimena, Ariel y Cristian*.

A *Melina*, por estar compartiendo ya más de un tercio de nuestras vidas, por su apoyo incondicional, su amor, ternura y comprensión.

A toda la *gente* del Centro de Investigaciones en Reproducción.

“No sólo no hubiese sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo. Algunos siguen hasta hoy,

Gracias..... totales!” (*)

(*) Extracto de El último concierto “B”. Ceratti *et al.*, 1997.

Resumen

Antecedentes

La regulación de los distintos procesos fisiológicos de la adenohipófisis, tales como desarrollo, diferenciación, secreción hormonal y muerte celular, implica la acción de una variedad de factores provenientes tanto de tejidos periféricos como del sistema nervioso central o de las propias células adenohipofisarias. El óxido nítrico (NO) puede regular la secreción de hormonas hipofisarias. Previamente demostramos que el NO inhibe la secreción basal de prolactina afectando diferentes mecanismos intracelulares. Sin embargo la acción del NO sobre las vías de segundos mensajeros de origen lipídico necesita ser estudiada. Por otro lado, existen diversos estados fisiológicos como la terminación de la lactancia o patofisiológicos como los procesos inflamatorios que pueden inducir muerte celular en la adenohipófisis. A pesar de que la muerte celular parece ser un evento frecuente en la adenohipófisis, son pocos los estudios realizados hasta el momento sobre posibles factores intrahipofisarios inductores de apoptosis.

Objetivos

Evaluar la acción del NO sobre el metabolismo de mensajeros intracelulares de origen lipídico que afectan la secreción de prolactina adenohipofisaria.

Investigar el efecto del NO sobre la viabilidad celular adenohipofisaria.

Métodos

Se investigó el efecto del NO sobre la actividad de las lipooxigenasas (LOX) y de las ciclooxigenasas (COX) y su relación con la secreción de prolactina mediante la utilización de dadores de NO y sustratos e inhibidores de las NO sintasas (NOS) en adenohipófisis enteras. Se determinó la producción de metabolitos del ácido araquidónico (AA) por la técnica de radioconversión usando como precursor AA radioactivo.

También se estudió el efecto del NO sobre el metabolismo de fosfoinosítidos en células adenohipofisarias de rata y su relación con la secreción de prolactina. Se utilizaron dadores de NO e inhibidores de las NOS en cultivos primarios de adenohipófisis premarcados con inositol radioactivo como precursor de los distintos inositoles fosfato (IPs). Se cuantificó la producción de IPs por cromatografía de intercambio iónico.

En ambos casos se estudiaron los posibles mecanismos por los cuales el NO afectó la síntesis de dichos segundos mensajeros.

Para estudiar la acción del NO sobre la viabilidad celular adenohipofisaria, se examinó la actividad celular (ensayo de MTT) y la morfología nuclear de las células adenohipofisarias en cultivo, utilizando DETA/NO como un dador de acción prolongada. Se estudiaron diferentes mecanismos por los cuales el NO podría afectar la viabilidad celular (capacidad nitrosilante, acción de los peroxinitritos, activación de las caspasas). Además, mediante técnicas inmunocitoquímicas, se determinaron los tipos celulares afectados por el NO.

En todos los casos se cuantificó la liberación de prolactina por radioinmunoensayo.

Resultados

El NO inhibió la actividad de la LOX produciendo una disminución de la síntesis de 5-HETE y estimuló la actividad de la COX aumentando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Dado que el 5-HETE está involucrado en la estimulación de la secreción basal de prolactina, y que ésta es la única hormona adenohipofisaria con una liberación basal espontánea, es probable que la disminución de la actividad de la LOX inducida por el NO esté mediando en parte el efecto inhibitorio tónico del NO sobre la liberación basal de prolactina.

El NO inhibió la síntesis de IPs estimulada por AngII o TRH, sin afectar su síntesis basal. La inhibición de la actividad de la PLC por NO involucraría un mecanismo independiente de la vía guanilil ciclasa soluble / cGMP / PKG. El NO no tendría una acción directa sobre la PLC, sino que estaría modificando algún factor de la vía de transducción de señales localizado entre el receptor de membrana y la proteína G.

Con respecto al efecto del NO sobre la viabilidad celular, demostramos que el NO produce muerte celular con características propias de un proceso apoptótico. En este proceso participarían la caspasa-3 y la caspasa-9 pero no estarían involucrados mecanismos de nitrosilación o la acción de peroxinitritos. Asimismo, la acción proapoptótica del NO parece afectar preferencialmente a los lactotrofos.

Conclusión

El NO al afectar dos procesos fisiológicos fundamentales de la adenohipófisis como son la secreción hormonal y la muerte celular, puede ser considerado como un factor clave dentro los reguladores de la fisiología de la adenohipófisis.

Abstract

Background

The regulation of the physiological processes in anterior pituitary, such as development, differentiation, hormone secretion and cell death, involves a variety of factors coming from peripheral tissues, central nervous system and the pituitary itself. Nitric oxide (NO) is able to regulate anterior pituitary hormone release. Previously, we demonstrated that NO inhibits basal prolactin release by affecting several intracellular pathways. However, NO action on lipidic second messengers in anterior pituitary needs further investigation. On the other hand, there are some physiological -such as termination of lactation-, or pathophysiological states -such as inflammation-, which can induce cell death in the anterior pituitary gland. In spite of the fact that cell death is a frequent event in the anterior pituitary gland, there is little evidence about possible apoptosis inducing factors synthesized by anterior pituitary cells.

Objectives

To evaluate NO action on lipidic intracellular messengers that affect prolactin secretion.

To investigate the effect of NO on anterior pituitary cell viability.

Methods

NO action on lipooxygenase (LOX) and cyclooxygenase (COX) activities and their relation with prolactin release were investigated by using NO donors and NOS substrate and inhibitors in whole anterior pituitaries. Production of arachidonic acid (AA) metabolites was carried out by a radioconversion technique, using radiolabeled AA as a precursor.

Also the effect of NO on phosphoinositides metabolism in rat anterior pituitary cells was studied. We used NO donors and NOS substrate and inhibitors in primary cultures of anterior pituitary cells prelabeled with radioactive inositol as a precursor of inositol phosphates (IPs). Production of IPs was quantified by ionic exchange chromatography.

In all cases we studied the mechanisms of action by which NO affected the synthesis of those second messengers.

In order to study NO action on anterior pituitary cell viability, we investigated the changes in cellular activity (MTT assay) and nuclear morphology in primary cultures of anterior pituitary cells by using DETA/NO as a long term NO releaser. We studied different mechanisms by which NO could affect cell viability (nitrosylating activity, peroxynitrite

action, caspases activation). Besides, we determined the cell types affected by NO by immunocytochemistry.

In all cases prolactin release was quantified by radioimmunoassay.

Results

NO inhibited LOX activity producing a decrease in 5-HETE synthesis, and stimulated COX activity producing an increase of prostaglandins and thromboxanes. Since 5-HETE is involved in the stimulation of basal prolactin release and taking into account that prolactin is the only anterior pituitary hormone with an spontaneously high basal release, it is possible that the decrease in LOX activity induced by NO is mediating, at least in part, the tonic inhibitory effect of NO on prolactin release.

NO inhibited AngII- or TRH-stimulated IPs synthesis, without affecting basal synthesis. The inhibition of PLC activity may involve a soluble guanylyl cyclase/cGMP/PKG-independent mechanism. NO seems not to act on PLC, but it could be modifying some factor localized between membrane receptor and G protein.

Concerning NO effect on cell viability, we demonstrated that NO produces cell death with characteristics of apoptosis. In this effect, caspase-3 and caspase-9 but not nitrosylation events or peroxynitrites may be participating. Likewise, lactotrophs seem to be preferentially affected by the proapoptotic action of NO.

Conclusion

NO affected two relevant physiological processes in the anterior pituitary gland, hormonal secretion and cell death. Therefore, it could be considered as a key regulatory factor of the physiology of the rat anterior pituitary gland.

Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| AA | ácido araquidónico |
| Ab | anticuerpo |
| Abs | absorbancia |
| AC | actividad celular |
| ACTH | adrenocorticotrofina |
| AIF | factor inductor de apoptosis |
| AngII | angiotensina II |
| Apaf-1 | factor activador de apoptosis tipo 1 |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato |
| BH ₄ | tetrahidrobiopterina |
| BMP | proteína morfogenética de hueso |
| BSA | seroalbúmina bovina |
| cAMP | adenosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| cGMP | guanosina 3',5'-monofosfato cíclico |
| COX | ciclooxigenasa (PGH sintasa) |
| CRF | factor liberador de corticotrofina (CRH) |
| dATP | desoxiadenosina 5'-trifosfato |
| DETA | DETA NONOato decaído |
| DETA/NO | DETA NONOato |
| DIABLO | proteína que se une directamente a los IAP con bajo pl |
| DISC | complejo de señal inductor de muerte |
| DMEM | medio mínimo esencial de Dulbecco |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| EGF | factor de crecimiento epidérmico |
| eNOS | óxido nítrico sintasa endotelial |
| FAD | flavina adenina dinucleótido |
| FADD | factor asociado a dominios de muerte |
| FAS-L | ligando de FAS |
| FBS | suero fetal bovino |
| FITC | isotiocianato de fluoresceína |
| FMN | flavina mononucleótido |
| FSC | células folículo estrelladas |
| FSH | hormona estimulante de folículo |
| GABA | ácido γ aminobutírico |
| GAPDH | gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| GC | guanilil ciclasa |
| GH | hormona de crecimiento |
| GHRH | hormona liberadora de GH |
| GnRH | hormona liberadora de gonadotrofinas |
| gp | cobayo (guinea pig) |
| GTP | guanosina 5'-trifosfato |
| Hb | hemoglobina |
| HETE | ácido hidroxieicosatetraenoico |
| Hsp | proteína de shock térmico |
| IAP | inhibidor de apoptosis |

| | |
|--------------------|--|
| IGF-1 | factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 |
| IgG | inmunoglobulina G |
| IL | interleukina |
| INF | interferón γ |
| iNOS | óxido nítrico sintasa inducible |
| IP ₃ | inositol 1,4,5-trifosfato |
| IP ₃ -R | receptor para IP ₃ |
| kDa | kiloDalton |
| LH | hormona luteinizante |
| LIF | factor inhibidor de leucemia |
| LOX | lipooxigenasa |
| mAb | anticuerpo monoclonal |
| MAP kinasa | proteína kinasa activadora de mitógeno |
| mtNOS | óxido nítrico sintasa mitocondrial |
| NAC | N-acetil-cisteína |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida |
| NGF | factor de crecimiento nervioso |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| nNOS | óxido nítrico sintasa neuronal |
| NO ⁺ | catión nitrosonio |
| NO | óxido nítrico |
| NO ⁻ | anión nitroxilo |
| NP | nitroprusiato de sodio |
| ONOO ⁻ | peroxinitrito |
| PACAP | polipéptido activador de adenilil ciclase de hipófisis |
| PDE2 | fosfodiesterasa dependiente de cGMP específica para cAMP |
| PG | prostaglandina |
| PGH sintasa | prostaglandina H sintasa (COX) |
| PHI | péptido histidina-isoleucina |
| pI | punto isoeléctrico |
| PIP ₂ | fosfatidilinositol 4,5-bifosfato |
| PKA | proteína kinasa dependiente de cAMP |
| PKG | proteína kinasa dependiente de cGMP |
| PLA ₂ | fosfolipasa A ₂ |
| PLC | fosfolipasa C |
| PrRP | péptido liberador de prolactina |
| RIA | radioinmunoensayo |
| ROS | especies reactivas del oxígeno |
| Smac | segundo activador de caspasas derivado de mitocondria |
| SP | sustancia P |
| TGF | factor de crecimiento transformante |
| TNF | factor de necrosis tumoral |
| TRH | hormona liberadora de TSH |
| TSH | hormona estimulante de tiroides |
| TX | tromboxano |
| UV | ultravioleta |
| VGCC | canales de calcio dependientes de voltaje |
| VIP | péptido intestinal vasoactivo |

Indice

Introducción 1

- ◆ El óxido nítrico
 - *Biosíntesis del NO*
 - *Acciones del NO*
 - *Mecanismos de acción del NO*

- ◆ NO y muerte celular
 - *Muerte celular*
 - *Apoptosis*
 - *Mecanismos de acción del NO en el proceso de muerte celular*

- ◆ La adenohipófisis
 - *Regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias*
 - *Actividad secretoria del lactotrofo*
 - *Control de la población celular adenohipofisaria*

- ◆ Efectos del óxido nítrico sobre la adenohipófisis

Objetivos 32

Materiales y Métodos 33

- ◆ Reactivos

- ◆ Animales

- ◆ Incubación de las adenohipófisis para la medición de los derivados de ácido araquidónico

- ◆ Determinación de metabolitos del ácido araquidónico

- ◆ Cultivos primarios de células adenohipofisarias
 - *Incubaciones para la medición de inositol fosfato*
 - *Incubaciones para el estudio de viabilidad celular*
 - *Incubaciones para la medición de la síntesis de cGMP*

- ◆ Medición de inositoles fosfato en células adenohipofisarias intactas
- ◆ Medición de inositoles fosfato en células adenohipofisarias permeabilizadas
- ◆ Ensayo de actividad celular (ensayo de MTT)
- ◆ Inmunocitoquímica
- ◆ RIA de cGMP
- ◆ RIA de Prolactina
- ◆ Análisis estadístico

Resultados

47

- ◆ Papel del NO en el metabolismo del ácido araquidónico en la adenohipófisis de rata
 - *Efecto de los dadores de NO sobre la actividad de las LOX*
 - *Efecto del NO endógeno sobre la actividad de las LOX*
 - *Efecto de los dadores de NO sobre la actividad de las COX*
 - *Efecto del NO endógeno sobre la actividad de las COX*
- ◆ Efecto del NO sobre la producción de inositoles fosfato en la adenohipófisis de rata
 - *Efecto de los dadores de NO sobre la síntesis de IPs en condiciones basales y estimuladas.*
 - *Participación de la vía de la guanilil ciclasa/cGMP/PKG en el efecto del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII*
- ◆ Estudio del efecto del NO sobre la viabilidad de las células adenohipofisarias de rata
 - *Efecto del DETA/NO sobre la actividad celular adenohipofisaria*
 - *Análisis morfológico e identificación del tipo celular afectado por el NO*
 - *Participación de las caspasas en el efecto citotóxico del NO*
 - *Participación de los peroxinitritos y los eventos de nitrosilación en el efecto citotóxico del NO*

| | |
|---|-----|
| <u>Discusión</u> | 89 |
| <ul style="list-style-type: none">◆ El NO regula el metabolismo del ácido araquidónico en la adenohipófisis de rata◆ El NO inhibe la síntesis estimulada de IPs en células de adenohipófisis de rata◆ El NO induce muerte celular programada en células adenohipofisarias de rata | |
| <u>Conclusiones</u> | 111 |
| <u>Bibliografía</u> | 113 |

Introducción

La presencia de radicales libres en materiales biológicos fue descubierta hace aproximadamente 50 años (Commoner *et al.*, 1954). En 1956, Denham Harman describió a los radicales libres como una “caja de Pandora llena de demonios” que podía llevar al daño celular, la mutagénesis, el cáncer y a procesos degenerativos de envejecimiento biológico (Harman, 1956; Harman, 1981). Con el descubrimiento de acciones biológicas, tanto para el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por parte de Mittal y Murad (1977), como para el óxido nítrico (NO) por Ignarro y Kadowitz (1985) y por el grupo de Moncada (Radomski *et al.*, 1987), surgió una nueva visión sobre la acción de los radicales libres en los sistemas biológicos.

En la actualidad existe una innumerable cantidad de trabajos que demuestran no sólo la adaptación de los organismos a la vida en un entorno lleno de radicales libres, sino también el desarrollo de mecanismos para la utilización de éstos en diferentes funciones biológicas (Adler *et al.*, 1999; Allen & Tressini, 2000; Bauer *et al.*, 1999; Bowie *et al.*, 1997; Dalton *et al.*, 1999; Davies, 1999; Dröge, 2002; Flohe *et al.*, 1997; Griendling *et al.*, 2000a,b; Herrlich & Böhmer, 2000; Kamata & Hirata, 1999; Lambeth *et al.*, 2000; Lander *et al.*, 1996; Monteiro & Stern, 1996; Piette *et al.*, 1997; Schulze-Osthoff *et al.*, 1995; Semenza, 2000; Sen & Packer, 1996; Wolin *et al.*, 1999; Zhu & Bunn, 1999).

1. El óxido nítrico

El óxido de nitrógeno II, más conocido con el nombre óxido nítrico (NO), posee un electrón desapareado lo que lo convierte en un radical libre, aunque no posee la fuerte reactividad asociada normalmente a estos compuestos (Cotton &

Wilkinson, 1988; Ragsdale, 1973). Al ser una molécula pequeña y no polar es capaz de difundir libremente a través de las membranas biológicas.

En fase gaseosa, el NO puede reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) dando como resultado la formación de dióxido de nitrógeno; en cambio, en fase acuosa la reacción entre el NO y el O_2 genera cantidades iguales de nitritos y nitratos (Feelisch, 1991). En condiciones fisiológicas, el NO también puede reaccionar con una variedad de radicales libres como el anión superóxido, los grupos tioles y las aminas (Hrabie *et al.*, 1993; Huie & Padmaja, 1993; Pryor *et al.*, 1982). Dependiendo del microentorno, el NO puede ser convertido en otras especies reactivas tales como el catión nitroso (NO^+), el anión nitroxilo (NO^-) o el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Stamler *et al.*, 1992a).

Una de las reacciones del NO con mayores implicancias fisiológicas es su interacción con los metales y grupos hemo de las proteínas, como la guanilil ciclasa soluble, la lipooxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX) y las proteínas de la cadena respiratoria (Drapier, 1997; Gardner *et al.*, 1997). Asimismo, algunos de sus efectos fisiológicos pueden ser mediados por la formación de S-nitroso-cisteína y S-nitroso-glutation (Gow & Stamler, 1998).

Biosíntesis del NO

En los organismos superiores, el NO es producido por la oxidación de uno de los nitrógenos terminales de los grupos amino de la L-arginina (Palmer *et al.*, 1988). Este proceso es catalizado por la óxido nítrico sintasa (NOS; EC 1.14.13.39) de la cual existen tres isoformas: la NOS neuronal (nNOS o NOS I), la endotelial (eNOS o NOS III) y la inducible (iNOS o NOS II). Las distintas isoformas de NOS son codificadas por genes localizados en diferentes cromosomas y presentan diferencias en cuanto a forma de activación, actividad y localización subcelular.

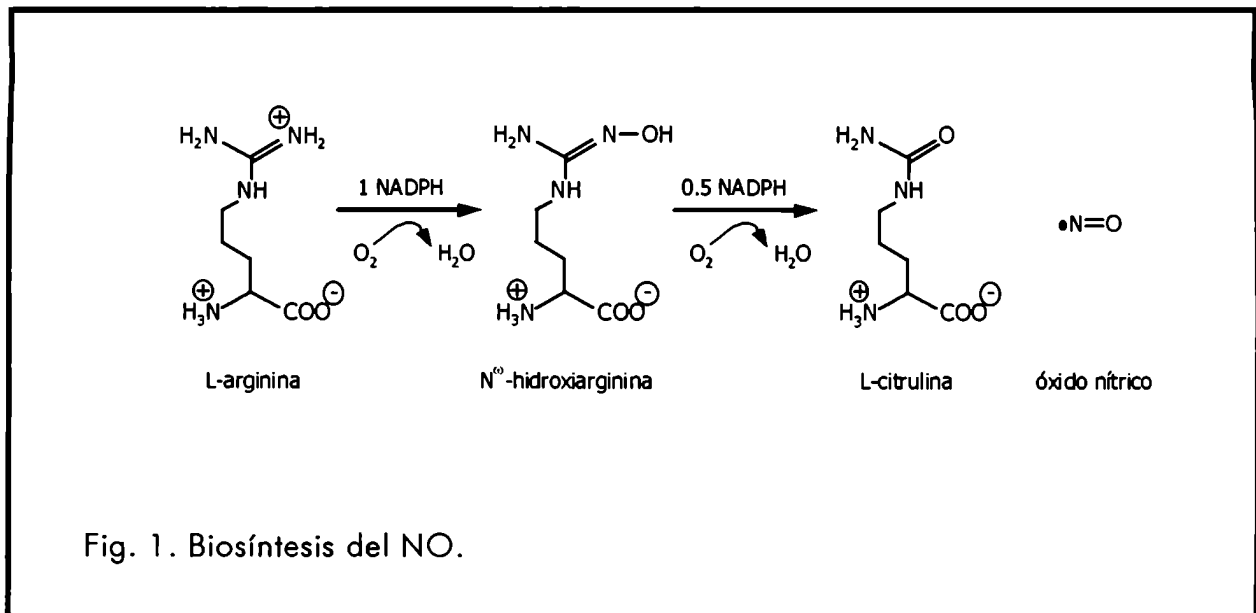
La nNOS, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 12, es una proteína que fue identificada por primera vez en neuronas. En este tipo celular, la nNOS se encuentra expresada constitutivamente, se localiza tanto en el citosol como

asociada a membrana y presenta una actividad dependiente de calcio-calmodulina. El gen de la eNOS se localiza en el cromosoma 7 y codifica para una proteína asociada a membranas que se identificó por primera vez en células endoteliales. La expresión de la eNOS es constitutiva y su actividad también es dependiente de calcio-calmodulina. Por último, la iNOS es una proteína identificada inicialmente en macrófagos cuyo gen reside en el cromosoma 17. Es una proteína citosólica que posee un dominio similar a la calmodulina y se caracteriza por poseer una actividad independiente de calcio (Bredt & Snyder, 1990; Bredt *et al.*, 1991; Garthwaite *et al.*, 1988; Ignarro *et al.*, 1987; Knowles *et al.*, 1989; Leone *et al.*, 1991; Lyons *et al.*, 1992; Palacios *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1987; Stuehr & Griffith, 1992; Tayeh & Marletta, 1989). Recientemente se ha caracterizado un nuevo miembro de la familia de las NOS llamada NOS mitocondrial (mtNOS) en base a que fue descubierta en mitocondrias de hígado de rata (Giulivi *et al.*, 1998; Tatoyan & Giulivi, 1998). Esta nueva isoforma de 130 kDa es reconocida por anticuerpos anti-iNOS pero a diferencia de esta última, su actividad es dependiente de calcio (Tatoyan & Giulivi, 1998).

A pesar de que en un principio parecía existir una expresión de las isoformas específica del tejido, en la actualidad está completamente demostrada la localización de más de una isoforma en un mismo tejido e incluso en un mismo tipo celular (Alderton *et al.*, 2001).

La NOS utiliza la L-arginina como sustrato produciendo cantidades equimolares de NO y L-citrulina. Esta reacción ocurre en presencia de NADPH, calmodulina y de cuatro cofactores/coenzimas: tetrahidrobiopterina (BH_4), FMN, FAD y hemo protoporfirina IX (Knowles *et al.*, 1989; Palacios *et al.*, 1989; Tayeh & Marletta, 1989). Se ha demostrado que el O_2 molecular es sustrato para la reacción de síntesis del NO, siendo incorporado tanto al NO como a la L-citrulina (Leone *et al.*, 1991) por medio de una reacción que se da en dos pasos de monooxigenación (Stuehr & Griffith, 1992) (Fig. 1). Una vez sintetizado, el NO difunde libremente con una vida media de 4 seg y una constante de difusión de $2300 \mu m^2/seg$. Estos valores dan como resultado una distancia de difusión

estimada en 90 μm aproximadamente, con lo cual puede decirse que el NO es capaz de ejercer sus acciones tanto sobre la célula generadora de NO como sobre las células vecinas (Kasai & Petersen, 1994).



Acciones del NO

En la actualidad, el volumen de las investigaciones relacionadas con el NO, aproximadamente 5000 trabajos por año, supera ampliamente la capacidad de lectura de un investigador. Sin embargo, y en base a las excelentes revisiones bibliográficas existentes, es posible tener una idea bastante clara de las acciones más importantes del NO a nivel molecular, bioquímico, celular y fisiológico. Entre las funciones biológicas más conocidas en las cuales está implicado el NO se encuentran: génesis y metabolismo de células musculares, respuesta inmune, inflamación, oncogénesis, angiogénesis, vasodilatación, regulación hormonal, apoptosis, y regulación de las funciones neuronal, renal, ósea, gastrointestinal, pancreática, uterina y del espermatozoide (Bogdan, 2001; Cameron & Campbell, 1998; Das, 2002; Herrero & Gagnon, 2001; Hintze, 2001; Jaiswal *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Moncada *et al.*, 1991; Pallone & Matson, 2002; Prast &

Philippu, 2001; Stamler & Meissner, 2001; Van't Hof & Ralston, 2001; Yago *et al.*, 2001; Ziche & Morbidelli, 2000). En los diferentes sistemas celulares, el NO puede ejercer sus efectos a través de la modificación de un gran número de componentes tanto orgánicos como inorgánicos, ya sea en la propia célula como en el medio extracelular, lo cual denota una gran variedad de mecanismos de acción.

Mecanismos de acción del NO

Las vías de señales intracelulares por las cuales el NO afecta las diferentes funciones de una célula son extremadamente complejas, lo cual dificulta el estudio y la identificación de una vía específica como mediadora de una respuesta biológica determinada ante un estímulo con NO. En principio, las acciones del NO son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición al NO, así como también del microentorno subcelular y del estado de óxido-reducción (redox) de la célula. Básicamente, existen dos formas de acción del NO en los sistemas biológicos: una acción directa del NO sobre distintas biomoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y una acción indirecta, en la cual el NO reacciona con otras especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno, para dar lugar a nuevas especies reactivas que a su vez actuarán directamente sobre los distintos componentes celulares (Fig 2).

Entre las reacciones NO-proteína, quizás la más relevante en cuanto a implicancias fisiológicas en distintos tejidos sea la activación de la guanilil ciclasa soluble (Ignarro, 1989, 1992). La guanilil ciclasa soluble es una enzima heterodimérica que cataliza la síntesis de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) utilizando como sustrato la guanosina 5'-trifosfato (GTP) (Drewett & Garbers, 1994). El NO, en concentraciones submicromolares, puede activar la guanilil ciclasa soluble actuando directamente sobre el grupo hemo de la enzima (Ignarro, 1991). Dicha activación produce un fuerte aumento de la concentración intracelular de cGMP el que a su vez es capaz de inducir la activación o inhibición de un amplio número de proteínas como las proteínas kinasas dependientes de

cGMP (PKG) tipos I y II (Smolenski *et al.*, 1988), las fosfodiesterasas (PDE) reguladas por nucleótidos cíclicos (Beavo, 1995) y los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (Yau, 1994; Zagotta & Siegelbaum, 1996).

Asimismo, el NO puede modificar la actividad de otras proteínas que contengan grupos hemo tales como las propias NOS, las ciclooxigenasas (COX), la indolamina 2,3-dioxigenasa, la catalasa, las peroxidasa y las citocromo P-450 (Cooper, 1999; Goodwin *et al.*, 1999; Nathan, 1992; Santolini *et al.*, 2001; Tsai, 1994). Las prostaglandina H sintasas, clásicamente llamadas ciclooxigenasas (COX, PGH sintasa) son una familia de proteínas integrada por dos isoformas las cuales contienen un grupo hemo necesario para su actividad enzimática. Estas enzimas catalizan la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina H (PGH₂) y este proceso ocurre debido a las dos actividades enzimáticas que poseen las PGH sintasas, una actividad ciclooxigenasa y una actividad peroxidasa (Smith *et al.*, 1996). A partir de la PGH₂ pueden ser sintetizados hasta 32 prostanoides diferentes en donde están incluídas las prostaglandinas, las prostaciclina y los tromboxanos. El paso limitante para la síntesis de los diferentes prostanoides es, justamente, la conversión de ácido araquidónico a PGH₂ por parte de las COX (Smith *et al.*, 1996; Thuresson *et al.*, 2001).

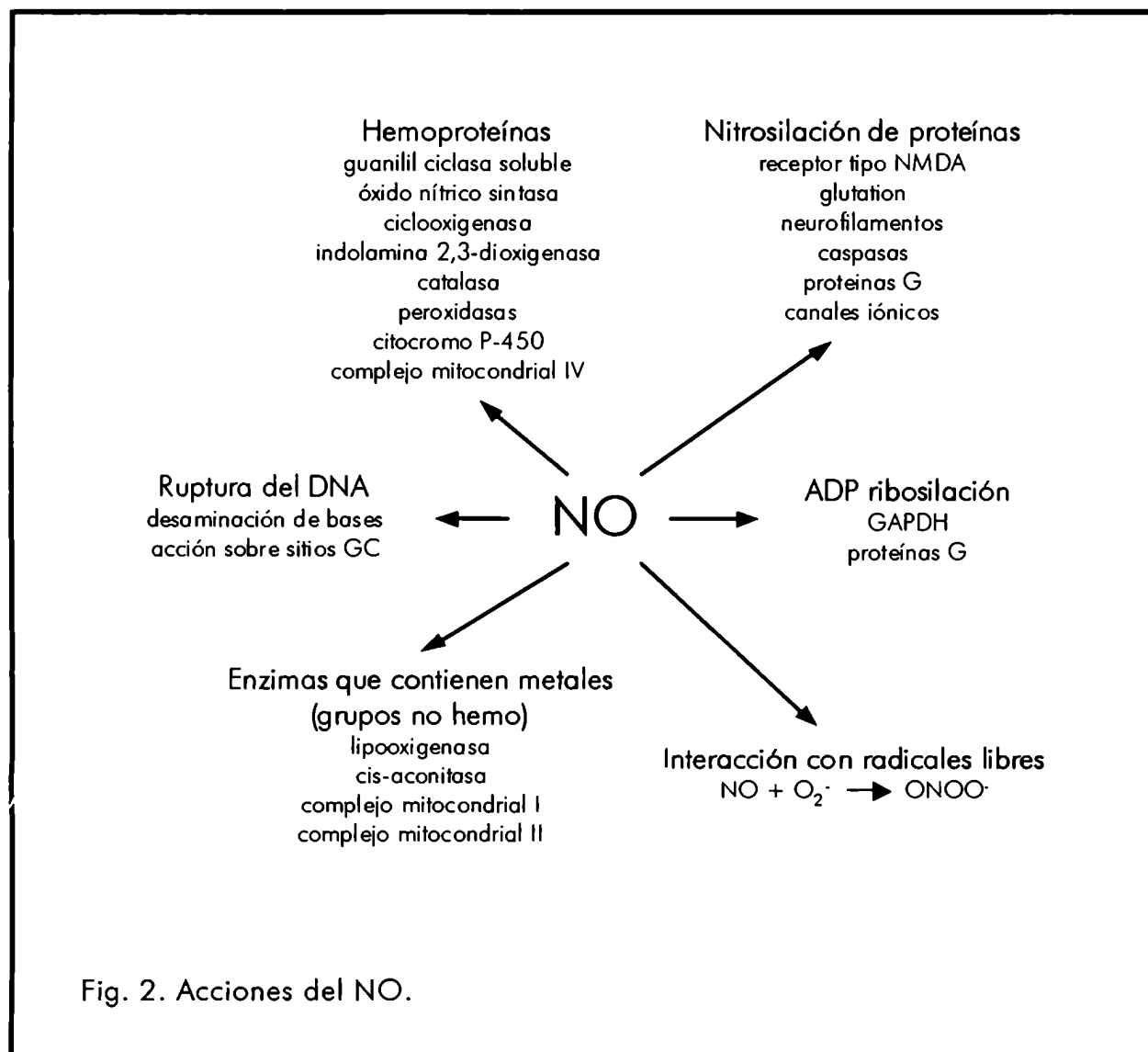
El NO puede interactuar de varias maneras con las COX, bien formando un complejo Fe-nitrosilo, modificando el radical tirosilo del sitio activo de la enzima o interrumpiendo la formación de radicales lipídicos, lo cual deriva en una inhibición de la enzima; o bien actuando como un sustrato reductor de peroxidasa, lo que lleva a una activación de la misma (Curtis *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1998; Gunther *et al.*, 1997; O'Donnell & Freeman, 2001; Tsai *et al.*, 1994). Aunque existe cierta evidencia indicando que la PGH sintasa purificada puede ser inhibida por el NO (Curtis *et al.*, 1996), la mayor parte de los trabajos proponen un efecto estimulador del NO sobre esta enzima, tanto en sistemas libres de células como en cultivos celulares (Davidge *et al.*, 1995; Maccarrone *et al.*, 1997; Salvemini *et al.*, 1993 y 1996).

El NO puede modificar también la actividad de proteínas que contengan átomos de hierro (no hemo) como las lipooxigenasas (LOX) o complejos con Cu^{2+} como la cis-aconitasa y los complejos mitocondriales I y II (Cooper, 1999; Nathan, 1992; Nicholls & Budd, 2000; O'Donnell & Freeman, 2001). Las LOX forman una familia de proteínas que contienen un átomo de hierro -no hemo- en su sitio activo y comprende tres isoformas: la 5-, la 12- y la 15-LOX (Kühn & Thiele, 1995; Peters-Golden, 1998; Radmark, 2000; Yoshimoto & Yamamoto, 1995). Estas enzimas catalizan la dioxigenación de ácidos grasos poliénoicos a sus correspondientes compuestos hidropoxidados (Kühn & Thiele, 1995; Samuelsson *et al.*, 1987). Ha sido demostrado que el NO puede inhibir la LOX de soja (Maccarrone *et al.*, 1996), la 15-LOX de conejo y humano (Holzhütter *et al.*, 1997; O'Donnell *et al.*, 1999), así como también la 12-LOX de plaquetas humanas (Nakatsuka & Osawa, 1994). Se ha postulado que la inhibición de la LOX por el NO sería el resultado de la formación de un complejo Fe-nitrosilo con la enzima en estado ferroso. Sin embargo, la reacción con el centro metálico solamente puede ocurrir a concentraciones muy altas de NO, lo cual parece improbable en condiciones fisiológicas (Galpin *et al.*, 1978; Nelson, 1987; Rubbo *et al.*, 1995; Salerno & Siedow, 1979). Por otro lado, se ha sugerido que la inhibición de las LOX por el NO sería el resultado de una reacción entre el NO y el radical lipídico peroxidado unido a la enzima, evento que tendría lugar a concentraciones nanomolares de NO (O'Donnell *et al.*, 1999).

Además de la acción del NO sobre los metales necesarios para la funcionalidad de diversas enzimas, este radical también puede interactuar directamente sobre ciertos aminoácidos de las proteínas, produciendo eventos de nitrosilación y, de esta manera, modificar la actividad biológica de numerosas proteínas (Stamler *et al.*, 1992 b; Stamler, 1994).

Por otro lado, el NO puede reaccionar directamente con el DNA produciendo desaminaciones (De Rojas-Walkers *et al.*, 1995) o ataques a secuencias GC (Sugiura & Matsumoto, 1995), lo cual conlleva a la ruptura de las cadenas de DNA.

Por último, el NO puede interaccionar con otros radicales libres como el anión superóxido, generando otras formas de especies reactivas del nitrógeno como los peroxinitritos y de esta manera indirecta producir modificaciones en las proteínas, los lípidos y el DNA (Dröge, 2002).



2. NO y muerte celular

Existen diversos estímulos del proceso de muerte celular programada entre los que se encuentran la falta de factores de crecimiento, la exposición a radiaciones UV, factores proteicos extracelulares que activan receptores de muerte y los radicales libres. Entre los radicales libres, el NO ha sido extensivamente estudiado dado que las enzimas que intervienen en su síntesis están ampliamente distribuidas en numerosos tejidos y a que el NO es generado en altas concentraciones en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tales como los procesos inflamatorios, la respuesta a agentes tóxicos, la muerte celular y el cáncer (Dimmeler & Zeiher, 2000).

Muerte celular

En los organismos unicelulares, el "suicidio" celular puede ser usado como un mecanismo de defensa para la preservación de las poblaciones celulares frente a diferentes agresiones del entorno tales como patógenos virales o insuficiencia de nutrientes, asegurando de esta manera la supervivencia de unas pocas células con el fin de propagar el genoma (Engelberg-Kulka & Glaser, 1999; Fröhlich & Madeo, 2000; Matsuyama *et al.*, 1999). En los organismos multicelulares complejos, el suicidio celular es usado en forma generalizada en procesos de desarrollo, reproducción y defensa contra patógenos. Por ejemplo, las plantas poseen mecanismos de suicidio celular que participan en procesos tales como la respuesta a patógenos, la senescencia de hojas, la elongación de raíces y la germinación (Beers, 1997). Del mismo modo, en el reino animal el suicidio celular es utilizado para numerosos procesos tales como la metamorfosis de insectos y anfibios, la formación de los dedos en las extremidades durante el desarrollo de mamíferos y la eliminación de los linfocitos autorreactivos durante la maduración del sistema inmune (Ellis *et al.*, 1991; Miller & Marx, 1998). El suicidio celular, denominado generalmente apoptosis, muerte celular programada o fisiológica, también juega un papel fundamental durante el desarrollo y el

recambio de células en los tejidos y en la prevención de procesos proliferativos descontrolados (Miller & Marx, 1998). Sin embargo, una inducción excesiva de muerte celular también puede contribuir en el desarrollo de varios desórdenes patofisiológicos como la enfermedad de Parkinson (Miller & Marx, 1998; Przedborski *et al.*, 1996).

Apoptosis

Desde un punto de vista clásico, la muerte celular puede ser clasificada en dos tipos de procesos, el necrótico y el apoptótico. La necrosis está caracterizada por la ruptura de la homeostasis celular, la depleción energética, la hinchazón de las organelas y el desencadenamiento de procesos catalíticos aleatorios (Buja *et al.*, 1993). Estos eventos culminan con la disgregación de las membranas celulares y la liberación del contenido celular al entorno, lo cual desencadena procesos inflamatorios (Buja *et al.*, 1993).

La apoptosis, en cambio, es una forma activa de muerte celular caracterizada por un conjunto de cambios morfológicos y ultraestructurales que incluyen: una disminución del volumen celular, la formación de ampollas de membrana plasmática, la condensación cromatínica, la fragmentación del DNA, y la disgregación de la célula en pequeños fragmentos rodeados de membrana plasmática llamados cuerpos apoptóticos. La fagocitosis subsiguiente de estos últimos por las células adyacentes evita que se desencadene una respuesta inflamatoria local (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Gracias en buena parte a los estudios genéticos realizados en el nematode *Caenorabditis elegans*, se han develado gran parte de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a dichos cambios morfológicos y ultraestructurales en eucariotas (Fig. 3) (Vaux & Korsmeyer, 1999). En la actualidad se acepta que los diversos estímulos proapoptóticos convergen en una vía apoptótica común que consta básicamente de un conjunto de proteínas efectoras llamadas caspasas (Thornberry & Lazebnik, 1998). Las caspasas forman una familia de proteínas altamente conservada que hasta el momento, en

mamíferos, cuenta con 13 miembros conocidos (Thornberry & Lazebnik, 1998). Estas cisteína proteasas (30-50 kDa) se caracterizan por estar presentes en las células en forma de proenzimas inactivas que deben ser procesadas proteolíticamente para pasar al estado activo. Las caspasas activas están formadas por heterodímeros y dos de estos heterodímeros se unen entre sí para trabajar en forma de tetrámeros, presentando dos sitios catalíticos que parecen actuar en forma independiente (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994).

Frente a una señal proteica proapoptótica extracelular, como por ejemplo Fas-L, la activación del receptor de muerte específico (Fas/APO-1/CD95) promueve el reclutamiento de un conjunto de factores proteicos que conformarán el complejo de señal inductor de muerte (DISC). Dentro de este complejo se encuentran factores que contienen los llamados dominios de muerte los que a su vez reclutan procaspasa-8 que, según el “modelo de proximidad”, al encontrarse en alta concentración local se autoprocasan y autoactivan. La caspasa-8 activada, por su parte cliva a la procaspasa-3, la cual se comporta como molécula efectora, desencadenando los cambios morfológicos y ultraestructurales propios de la muerte celular programada (Thornberry & Lazebnik, 1998; Wajant, 2002).

Además de las proteínas efectoras, la vía apoptótica consta de moléculas adaptadoras como el factor activador de apoptosis-1 (Apaf-1) y moléculas reguladoras como las proteínas pro o antiapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, los inhibidores de apoptosis (IAPs), el factor inductor de apoptosis (AIF), el citocromo c y la proteína Smac/DIABLO (Adams & Cory, 1998; Du *et al.*, 2000; Green & Reed, 1998; Salvesen & Duckett, 2002; Verhagen *et al.*, 2000). En este intrincado pero bien organizado sistema, la mitocondria puede comportarse como un integrador de la maquinaria de muerte celular. En respuesta a múltiples señales apoptóticas, la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa aumenta, liberándose al citosol varios factores que cumplen un papel importante en la activación de proteínas efectoras del proceso apoptótico (Brenner & Kroemer, 2000; Green & Reed, 1998; Finkel, 2001).

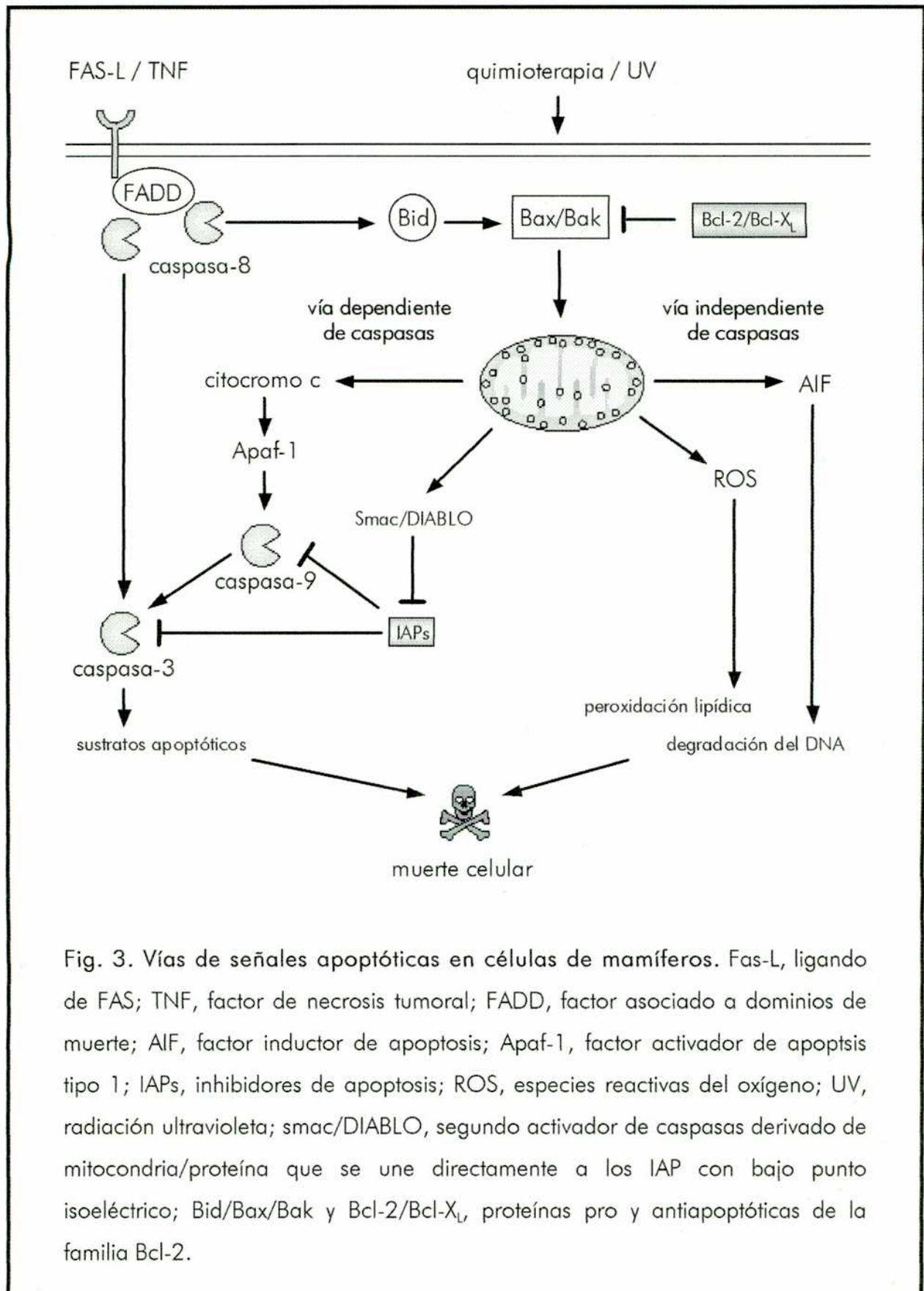


Fig. 3. Vías de señales apoptóticas en células de mamíferos. Fas-L, ligando de FAS; TNF, factor de necrosis tumoral; FADD, factor asociado a dominios de muerte; AIF, factor inductor de apoptosis; Apaf-1, factor activador de apoptosis tipo 1; IAPs, inhibidores de apoptosis; ROS, especies reactivas del oxígeno; UV, radiación ultravioleta; smac/DIABLO, segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína que se une directamente a los IAP con bajo punto isoelectrico; Bid/Bax/Bak y Bcl-2/Bcl-X_L, proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2.

La familia Bcl-2 consta de al menos 15 miembros con características pro y antiapoptóticas. Ambos tipos de miembros tienen la capacidad de formar heterodímeros y de esta manera los estímulos pro y antiapoptóticos parecen contrabalancearse, sugiriendo que la concentración relativa de ambos grupos estaría determinando la vida o la muerte de la célula (Adams & Cory, 1998). Cuando un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 como las proteínas Bax o Bak se transloca a la mitocondria, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente liberación de citocromo c y otros factores mitocondriales localizados normalmente en el espacio intermembranoso (Finkel, 2001). Una vez en el citosol, el citocromo c se puede unir al Apaf-1, que en presencia de dATP o ATP forma una estructura oligomérica denominada "apoptosoma". El apoptosoma tiene la capacidad de reclutar y activar a la procaspasa-9, la cual a su vez puede clivar y activar a caspasas efectoras como la caspasa-3 (Thornberry & Lazebnik, 1998).

A pesar del papel esencial de las caspasas en la ejecución final de la apoptosis, los ratones deficientes en una o varias caspasas muestran alteraciones sólo en algunos tejidos y no son letales tempranos como se hubiese esperado (Zheng *et al.*, 1999). En estos ratones, la falta de actividad de un tipo de caspasa podría ser compensada por la actividad de otro miembro de la familia. Otra explicación posible es la existencia de vías apoptóticas alternativas independientes de caspasas. En este sentido, hace pocos años el grupo de Kromer identificó la proteína mitocondrial llamada AIF que es capaz de inducir fragmentación del DNA, condensación nuclear, disipación del potencial transmembrana mitocondrial y exposición de fosfatidilserinas hacia la cara externa de la membrana plasmática, cuya acción no es modificada por inhibidores de caspasas (Susin *et al.*, 1999).

En la actualidad, es posible tener una visión bastante integral del cuadro del proceso apoptótico en mamíferos. Sin embargo, dada la cantidad de factores involucrados y que no siempre existe una misma secuencia temporal de activación de las cascadas de señales en los distintos tipos celulares, resulta difícil predecir la

participación de una vía apoptótica en un tipo celular no caracterizado con anterioridad. Más aún, la ausencia en algunos casos de uno o más de los eventos característicos descritos en el proceso de muerte celular programada, demuestra que ninguno de los procesos conocidos hasta el momento logra definir completamente el proceso apoptótico. En las investigaciones actuales, una vez demostrada la existencia de muerte celular con características morfológicas propias de la apoptosis, queda por determinar la participación (o no) de alguna de las vías descritas, sin poder afirmar *a priori* cual de ellas estará involucrada.

Mecanismos de acción del NO en el proceso de muerte celular

La importancia de la citotoxicidad mediada por el NO ha sido tenida en cuenta desde el mismo momento en que la vía L-arginina/NO_x fuera descrita en macrófagos (Hibbs *et al.*, 1987). La capacidad del NO para inducir apoptosis fue descrita por primera vez por Albina *et al.* en 1993, quienes demostraron que el NO provocaba muerte celular programada en macrófagos. En trabajos subsiguientes, se observó que existían varios tipos celulares especialmente sensibles a la acción del NO, tales como los timocitos, las células de los islotes pancreáticos y ciertas neuronas (Fehsel *et al.*, 1995; Heneka *et al.*, 1998; McDaniel *et al.*, 1997).

Después de los primeros trabajos en los que se demostrara su acción citotóxica, el NO fue aceptado como un potente inductor de la apoptosis. Sin embargo en 1994, Mannik *et al.* demostraron que la exposición a bajas concentraciones de NO inhibía la apoptosis de linfocitos B humanos. A partir de este trabajo, se describieron acciones antiapoptóticas del NO en diversos tipos celulares tales como eosinófilos, hepatocitos y células endoteliales (Dimmeler *et al.*, 1997a; Hebestreit *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1997).

Actualmente, los mecanismos por los cuales el NO ejerce sus efectos, ya sea pro o antiapoptótico, no están del todo esclarecidos y su comprensión se dificulta aun más si se observa que dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición, el NO puede pasar de tener un efecto citoprotector a uno

citotóxico en el mismo tipo celular (Beltram *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1998).

A pesar de que el NO ejerce muchos de sus efectos a través de la activación de la guanilil ciclasa soluble, esta vía parece no estar involucrada en el proceso de muerte celular programada (Brüne *et al.*, 1996). El NO puede ejercer su efecto proapoptótico estimulando las vías de señales apoptóticas a distintos niveles. Puede provocar la fosforilación y acumulación de la proteína p53, bien por la vía de las kinasas activadas por DNA dañado, por inhibición de proteasomas o bien a través de MAP kinasas (Messmer & Brüne, 1996; Moriya *et al.*, 2000). La manera en que el p53 puede inducir apoptosis no está del todo clara, pero involucra mecanismos dependientes e independientes de la transcripción. En el primer caso, la p53 puede inducir la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Noxa). La vía independiente de la transcripción, involucra la relocalización de p53 en la mitocondria o la activación de caspasa-8 por un mecanismo independiente del factor asociado a los dominios de muerte (FADD) (Ding *et al.*, 2000; Moll & Zaika, 2001). Asimismo, el NO es capaz de inducir la transcripción de la proteína proapoptótica Bax y la represión de la antiapoptótica Bcl-2 (Messmer *et al.*, 1996; Nishio and Watanabe, 1998). En el mismo sentido, la p38 MAP kinasa parece estar mediando el efecto citotóxico del NO en neuronas al inducir la translocación de la proteína Bax a la membrana mitocondrial (Ghatan *et al.*, 2000). Además, el NO puede provocar daños en el DNA bien por su acción directa o a través de los peroxinitritos (Burney *et al.*, 1998; De Rojas-Walkers *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1992; Sugiura & Matsumoto, 1995).

En varios estudios se demostró que el NO puede inducir citotoxicidad produciendo un aumento de la permeabilidad de transición de la membrana mitocondrial (Balakirev *et al.*, 1997; Borutaite *et al.*, 2000; Hortelano *et al.*, 1997). Dicho aumento de la permeabilidad de transición disipa la fuerza protón motriz, produciendo el desacople de la fosforilación oxidativa y la reversión de la actividad de la ATP sintasa, la cual en estas condiciones puede hidrolizar ATP.

Además, el aumento de la permeabilidad de transición de la membrana mitocondrial produce un rápido aumento del volumen mitocondrial con la consiguiente potencial ruptura de la membrana mitocondrial externa y liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos mitocondriales como AIF o Smac/DIABLO (Chai *et al.*, 2000; Daugas *et al.*, 2000). De manera general, el NO parece inducir el aumento de la permeabilidad de transición de la membrana mitocondrial indirectamente a través de peroxinitritos, S-nitrosotioles, NO₂ y/o N₂O₃ y este efecto puede ser bloqueado por ciclosporina A, un inhibidor del poro de transición de la permeabilidad de membrana mitocondrial (Borutaite *et al.*, 2000; Bosca & Hortelano, 1999; Moriya *et al.*, 2000; Yabuli *et al.*, 1999).

Por otro lado, el NO posee efectos antiapoptóticos que pueden ser llevados a cabo tanto por una acción a nivel de inducción e inhibición génica como a nivel postranscripcional. Ha sido demostrado que el NO induce la transcripción de proteínas antiapoptóticas tales como la proteína de shock térmico (Hsp70) y Bcl-2 en varios tipos celulares (Genaro *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997). El NO puede aumentar la expresión de proteínas que tienen un papel citoprotector como la hemoproteína-1 y la ferritina (Juckett *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Motterlini *et al.*, 1996). Se ha sugerido que dependiendo del tipo celular, el efecto antiapoptótico del NO puede llevarse a cabo de forma dependiente (Genaro *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997) o independiente de la guanilil ciclasa soluble (Dimmeler *et al.*, 1997a,b y 1998; Mannick *et al.*, 1994 y 1997).

Además, se ha demostrado que el NO inhibe la activación de caspasas inducida por distintos estímulos tales como el factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α), la activación del receptor de Fas, la falta de factores de crecimiento, las especies reactivas del oxígeno o la angiotensina II (Dimmeler *et al.*, 1997a,b; Haendeler *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 1997; Melino *et al.*, 1997). Esta inhibición resulta de la S-nitrosilación por parte del NO de la cisteína del sitio activo de las caspasas (Dimmeler *et al.*, 1997a y 1998; Haendeler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Mannik *et al.*, 1997).

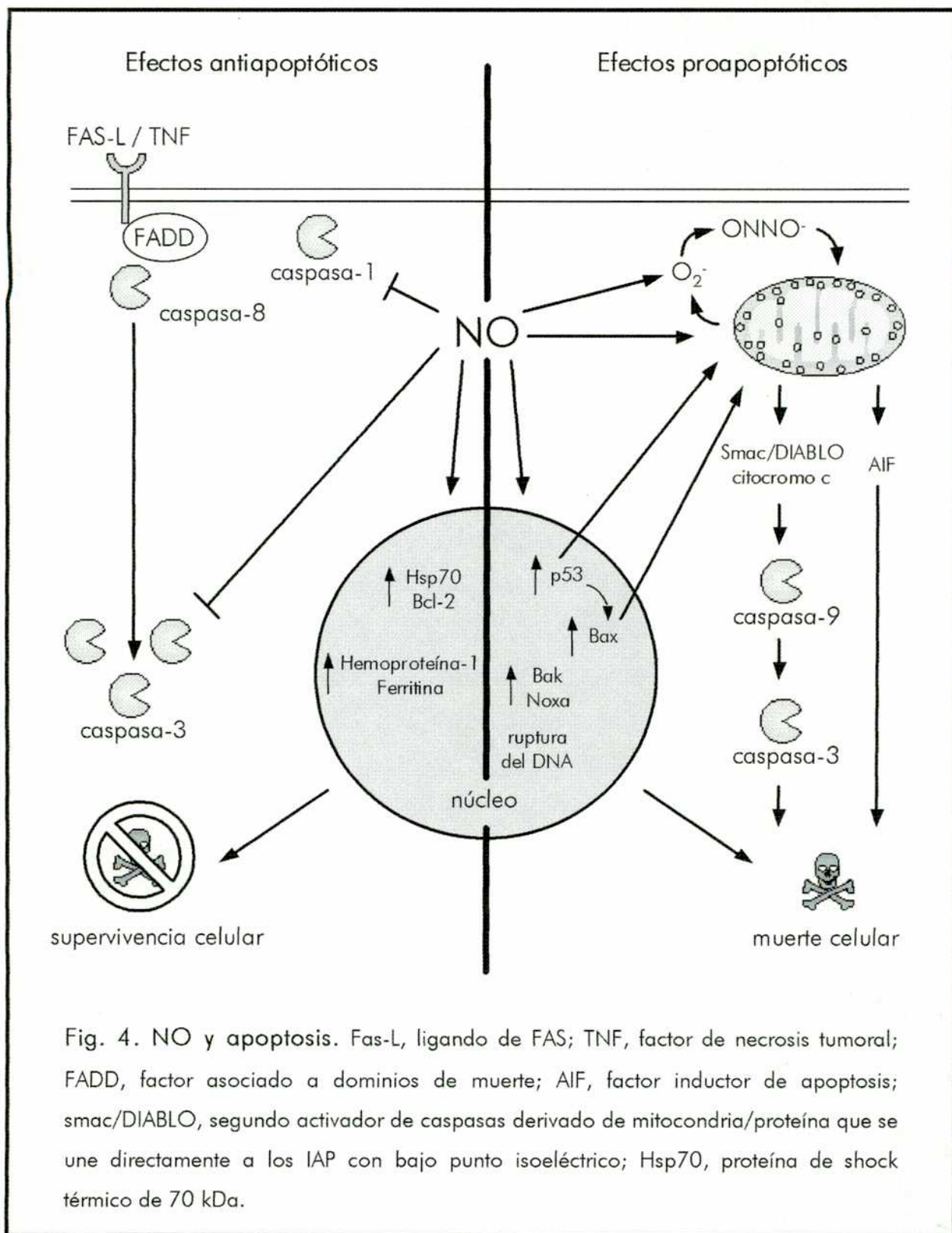


Fig. 4. NO y apoptosis. Fas-L, ligando de FAS; TNF, factor de necrosis tumoral; FADD, factor asociado a dominios de muerte; AIF, factor inductor de apoptosis; smac/DIABLO, segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína que se une directamente a los IAP con bajo punto isoeléctrico; Hsp70, proteína de shock térmico de 70 kDa.

3. La adenohipófisis

La adenohipófisis es una glándula situada bajo el piso del diencéfalo, que se encuentra en íntima relación con el hipotálamo (Page, 1994). En su conjunto, la adenohipófisis presenta una composición celular heterogénea en la que se pueden identificar varios tipos de células epiteliales que pueden ser clasificadas en células secretoras y no secretoras. En la adenohipófisis existen cinco tipos de células secretoras caracterizadas de acuerdo al tipo de hormona almacenada en sus gránulos de secreción, los lactotrofos (prolactina), los somatotrofos (hormona de crecimiento, GH), los gonadotrofos (hormona estimulante de folículo, FSH y hormona luteinizante, LH), los corticotrofos (adrenocorticotrofina, ACTH) y los tirotrofos (hormona estimulante de la tiroides, TSH). Además, esta glándula posee un tipo celular no secretor llamado célula folículo estrellada (FSC, inmunoreactiva para la proteína S100) que posee uniones comunicantes con las células secretoras (Page, 1994).

Aunque muchos autores han dado a conocer la proporción de los distintos tipos de células adenohipofisarias de la rata por métodos inmunohistoquímicos (Childs *et al.*, 1981; Dada *et al.*, 1984; Oishi *et al.*, 1993; Phelps, 1986), los trabajos más completos en los cuales se hace una evaluación de todos los tipos celulares son los de Dada *et al.* y Oishi *et al.* En ambos trabajos los autores coinciden en el porcentaje de los distintos tipos celulares presentes en ratas machos adultos jóvenes y en hembras.

En ratas machos, los porcentajes de células inmunopositivas para las diferentes hormonas son, para prolactina: 50%, GH: 23%, LH: 5%, FSH: 4%, ACTH: 3%, TSH: 2%, y para células inmunonegativas (INC): 17%; y en hembras, para prolactina: 52%, GH: 20%, LH: 6%, FSH: 4%, ACTH: 3%, TSH: 2%, y para INC: 16% (Dada *et al.*, 1984). Estos valores porcentuales para cada tipo celular pueden variar en relación con la edad, el sexo y el estado fisiológico del animal (Ahlbom *et al.*, 1998; Hymer *et al.*, 1970; Jahn *et al.*, 1984; Kunert-Radek & Pawlikowski, 1975; Oishi *et al.*, 1993; Steipen *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*,

1984; Takahashi, 1995). Asimismo, se ha demostrado que algunos tipos de células secretoras adenohipofisarias pueden interconvertirse durante eventos tales como la preñez o el comienzo o terminación del periodo de lactación (Boockfor *et al.*, 1986; Porter *et al.*, 1990).

Regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias

El proceso de secreción hormonal en la adenohipófisis ha sido ampliamente estudiado desde principios del siglo pasado. De los cinco tipos de células endocrinas que integran la adenohipófisis, cuatro de ellos responden a un factor liberador específico proveniente del hipotálamo que actúa como secretagogo y a la vez como factor trófico. La hormona liberadora de GH (GHRH) es el regulador más importante de la fisiología de los somatotropos (Mayo *et al.*, 2000), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) lo es para los gonadotropos (Conn *et al.*, 1987), la hormona liberadora de TSH (TRH) ejerce el mismo efecto sobre los tirotropos (Gershengorn, 1986) y el factor liberador de corticotrofina (CRF) sobre los corticotropos (Turnbull & Rivier, 1997). Por el contrario, los lactotropos son el único tipo celular adenohipofisario que no posee un factor hipotalámico específico que se comporte como estimulador de la secreción de prolactina y a la vez como factor trófico (Freeman *et al.*, 2000).

Actividad secretoria del lactotrofo

Cuando se evalúa la liberación de prolactina a nivel del lactotrofo aislado, el patrón de secreción hormonal muestra dimorfismo sexual. En general, más de la mitad de los lactotropos provenientes de ratas hembras secretan prolactina de manera continua, mientras que los provenientes de ratas machos secretan prolactina de forma discontinua o intermitente (Castaño & Frawley, 1995). Estos patrones de secreción espontáneos que se manifiestan en el lactotrofo aislado sufren modificaciones debido a factores estimulatorios e inhibitorios provenientes de los demás tipos celulares adenohipofisarios (Lamberts & MacLeod, 1990; Schwartz, 2000), del hipotálamo (Ben-Jonathan, 1985), de

los tejidos periféricos (Neill, 1970; Neill *et al.*, 1971; Terkel *et al.*, 1972), así como también a factores circadianos y ambientales (Bethea & Neill, 1980).

La visión más general y mejor aceptada en la actualidad es que los lactotopos poseen una actividad secretoria espontánea alta y que dicha secreción se encuentra bajo un control tónico predominantemente inhibitorio ejercido por el hipotálamo. Este concepto se basa en que la desconexión quirúrgica de la adenohipófisis y el hipotálamo medio basal conlleva a un aumento paulatino de los niveles de prolactina plasmática, los cuales llegan a un plateau aproximadamente una semana después de la cirugía (Arimura *et al.*, 1972; Bishop *et al.*, 1972; Kanematsu & Sawyer, 1973; Langer *et al.*, 1973). Además se ha observado que la tasa de secreción de prolactina es alta y espontánea en la adenohipófisis transplantada a un sitio sin conexión neural o vascular directa con el hipotálamo (bajo la cápsula renal) (Everett, 1954, 1956) o en las células adenohipofisarias en cultivo (Neill, 1980; Shaar & Clemens, 1974).

Durante los últimos años se ha hecho gran hincapié en el estudio de los factores que regulan la secreción de prolactina provenientes tanto desde el hipotálamo como de las propias células adenohipofisarias. Asimismo, se ha profundizado el estudio de los mecanismos intracelulares activados por los distintos factores, tanto estimulatorios como inhibitorios, y su relación con los procesos de excitación hormonal y la homeostasis del calcio intracelular en células adenohipofisarias (Freeman *et al.* 2000).

Existe una gran variedad de factores estimulatorios de la secreción de prolactina que actúan directamente sobre las células adenohipofisarias, los cuales son sintetizados a nivel del hipotálamo, en la hipófisis misma o en tejidos periféricos. Entre los más estudiados podemos destacar: los estrógenos, TRH, oxitocina, vasopresina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), polipéptido activador de la adenilil ciclasa de hipófisis (PACAP), péptido histidina-isoleucina (PHI), angiotensina II (AngII), sustancia P (SP), neurokinina A, neurotensina y péptido liberador de prolactina (PrRP) (Freeman *et al.*, 2000; Kawamata *et al.*, 2000). Los lactotopos expresan receptores específicos para estos factores estimulatorios, los

cuales están acoplados a distintas vías de segundos mensajeros que llevarán en última instancia a un aumento de la concentración intracelular de calcio y de la secreción de prolactina (Freeman *et al.*, 2000).

La secreción de prolactina es un proceso dependiente de calcio. Existe una serie de segundos mensajeros intracelulares que producen un aumento de la concentración intracelular de este ión en los lactotropos, entre los que podemos encontrar la adenosina 3',5'-monofosfo cíclico (cAMP), el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el ácido araquidónico y sus derivados (Fig 5) (Freeman *et al.*, 2000).

El cAMP es uno de los principales segundos mensajeros involucrados en el efecto de los factores estimuladores de la secreción de prolactina (Gourdji *et al.*, 1979; Sawangjaroen & Curlewis, 1994). Los niveles intracelulares de cAMP están determinados por la velocidad de síntesis, a cargo de las adenilil ciclasas, y por la de degradación, a cargo de la fosfodiesterasas (Beavo, 1995). Los factores que estimulan la secreción de prolactina a través del cAMP, como el VIP y el PACAP, activan sus receptores específicos de membrana plasmática acoplados a proteínas G estimuladoras, las cuales inducen un aumento de la actividad de la adenilil ciclasa (Rawlings & Hezareh, 1996).

Existen también segundos mensajeros que se generan a partir de precursores lipídicos presentes en la membrana plasmática como el ácido araquidónico y el IP₃, los cuales estimulan fuertemente la secreción de prolactina en la adenohipófisis (Canónico & MacLeod, 1986; Conte *et al.*, 1986; Koike *et al.*, 1985; Roudbaraki *et al.*, 1995). Entre los factores estimuladores de la liberación de prolactina que inducen un aumento en la producción de estos mensajeros podemos encontrar a la AngII, la TRH, la neurotensina y la sustancia P (Canónico & MacLeod, 1986; Mau *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1988; Vijayan & McCann, 1979).

El ácido araquidónico es generado por la acción de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) las cuales se activan frente a un aumento del calcio intracelular y la acción de las MAP kinasas (Clark *et al.*, 1991; Leslie, 1997; Lin *et al.*, 1993; Murakami

et al., 1999). Este ácido graso polinsaturado puede ser metabolizado principalmente por tres familias de enzimas: las PGH sintasas, las LOX y las citocromo P-450. Las PGH sintasas sintetizan las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos; las LOX producen los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) y leucotrienos; y las citocromo P-450 generan los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) (Chacos *et al.*, 1982; Kühn & Thiele, 1995; Peters-Golden, 1998; Radmark, 2000; Smith *et al.*, 1996; Thuresson *et al.*, 2001; Yoshimoto & Yamamoto, 1995). El ácido araquidónico es un potente estimulador de la secreción de prolactina que ejerce su efecto fundamentalmente a través de metabolitos de la vía de las LOX (Conte *et al.*, 1986; Judd *et al.*, 1988; Koike *et al.*, 1985), siendo el 5-HETE su principal mediador (Koike *et al.*, 1985). Ha sido demostrado que tanto el ácido araquidónico como el 5-HETE producen un aumento de la concentración intracelular de calcio en células GH₃ (somatolactotropos) que se correlaciona con una mayor actividad secretoria de las mismas (Camoratto & Grandison, 1985; Vacher *et al.*, 1992).

El IP₃ es producido a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por la acción de las fosfolipasas C (PLC) y dicha reacción produce, además, cantidades equimolares de diacilglicerol (Woodcock, 1997). En la adenohipófisis, los factores que inducen un aumento en la producción de IP₃ como la AngII, la TRH y la sustancia P activan receptores de membrana acoplados a proteínas G del tipo q/11 las cuales estimulan a la PLC del tipo β (Exton, 1994). El IP₃ liberado al citosol se puede unir a sus receptores localizados en la membrana del retículo endoplásmico produciendo la liberación de calcio desde dicho depósito intracelular (Woodcock, 1997; Taylor, 1998). El aumento de la concentración intracelular de calcio inducido por el IP₃ y la producción de diacilglicerol desde la membrana plasmática son un fuerte estímulo para la actividad de la proteína quinasa C (Woodcock, 1997). Esta enzima fosforila canales de calcio dependientes de voltaje que produce un aumento de la entrada de calcio desde el medio extracelular, contribuyendo de esta manera al proceso de secreción de prolactina (Fomina & Levitan, 1995).

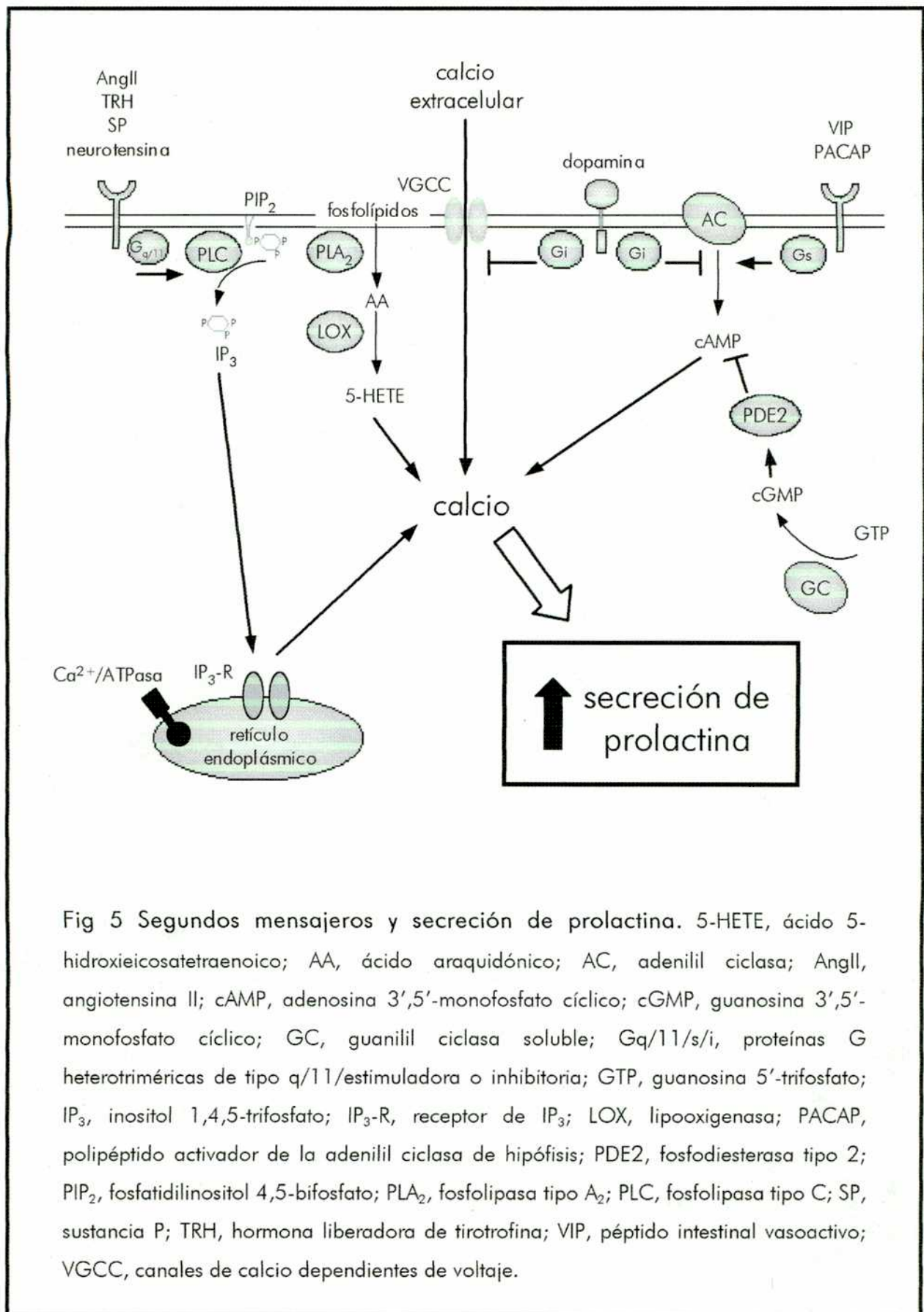


Fig 5 Segundos mensajeros y secreción de prolactina. 5-HETE, ácido 5-hidroieicosatetraenoico; AA, ácido araquidónico; AC, adenilil ciclasa; Angll, angiotensina II; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico; GC, guanilil ciclasa soluble; Gq/11/s/i, proteínas G heterotriméricas de tipo q/11/estimuladora o inhibitoria; GTP, guanosina 5'-trifosfato; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; IP₃-R, receptor de IP₃; LOX, lipooxigenasa; PACAP, polipéptido activador de la adenilil ciclasa de hipófisis; PDE2, fosfodiesterasa tipo 2; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLA₂, fosfolipasa tipo A₂; PLC, fosfolipasa tipo C; SP, sustancia P; TRH, hormona liberadora de tirotrófina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; VGCC, canales de calcio dependientes de voltaje.

Por otro lado, entre los factores inhibitorios más importantes de la secreción de prolactina podemos encontrar a la dopamina, el ácido γ aminobutírico (GABA), la propia prolactina, la acetilcolina, la somatostatina y el NO (Freeman *et al.*, 2000). La dopamina producida por las neuronas hipotalámicas es el principal factor inhibitorio que ejerce su acción directamente a nivel del lactotrofo a través de la activación de su receptor específico del tipo D2 (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Dicho receptor está acoplado a una proteína G inhibitoria que produce una disminución de la actividad de la adenilil ciclasa, de la PLC e induce hiperpolarización, lo que conlleva a una disminución de los niveles intracelulares de cAMP, de IP_3 , de calcio y, por consiguiente, de la secreción de prolactina (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). No todo el efecto tónico inhibitorio del hipotálamo sobre la secreción de prolactina es ejercido por la dopamina, sino que el GABA también se comporta como otro componente importante de dicho efecto (Matsushita *et al.*, 1983; Racagni *et al.*, 1979). El mecanismo de acción del GABA parece involucrar a dos tipos de receptores, $GABA_A$ y $GABA_B$, los cuales están acoplados a distintas vías de segundos mensajeros (Apud *et al.*, 1989; Lux-Lantos *et al.*, 1992).

Control de la población celular adenohipofisaria

En la adenohipófisis de la rata adulta, los distintos tipos celulares diferenciados se comportan como poblaciones celulares dinámicas. Al contrario de lo que había descrito Hunt en 1943, la adenohipófisis parece tener una actividad mitótica alta. Teniendo en cuenta este hecho, esta glándula puede ser considerada como una población celular en expansión (Mastro *et al.*, 1969). En condiciones normales, la adenohipófisis mantiene una renovación continua de células y por ende un volumen constante, excepto durante la etapa de crecimiento (Carbajo-Pérez & Watanabe, 1990; Nouët & Kujas, 1975; Sakuma *et al.*, 1984; Shirasawa & Yoshimura, 1982). En base a estudios más recientes se pudo demostrar que cada célula adenohipofisaria debe sufrir mitosis o morir una vez cada 63 días, lo cual indica que se produce la renovación del 1.58% de la

población celular adenohipofisaria cada día (Nolan *et al.*, 1998). Por lo tanto, el equilibrio de la población celular adenohipofisaria es un reflejo del balance entre los procesos de división celular, diferenciación, arresto del ciclo y apoptosis (Candolfi *et al.*, 2002, en prensa; Nolan *et al.*, 1998, Pagotto *et al.*, 1999). Las células adenohipofisarias poseen una velocidad de proliferación variable y esta variación está relacionada principalmente con el estado hormonal del animal (Haggi *et al.*, 1986; Nolan *et al.*, 1998, Oishi *et al.*, 1993; Yin & Arita, 2000).

Está ampliamente aceptado que el mantenimiento/proliferación de cada tipo celular en la adenohipófisis se encuentra bajo la acción de factores hipotalámicos, sistémicos e intrahipofisarios (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001; Childs *et al.*, 1991; Gertz *et al.*, 1987; Mayo *et al.*, 2000; Ruvkun, 1992; Sakai *et al.*, 1988; Wiklund *et al.*, 1981). Se ha demostrado que el estímulo más importante para la proliferación de los lactotopos tanto *in vivo* como *in vitro* son los estrógenos (Hashi *et al.*, 1996; Lieberman *et al.*, 1982; Sarkar *et al.*, 1982; Song *et al.*, 1989; Wiklund *et al.*, 1981). Dicha estimulación parece depender de varios factores intrahipofisarios tales como la galanina y la Angll (Shinkai & Ooka, 1995; Wynick *et al.*, 1993). En el mismo sentido, la hormona tiroidea parece ser esencial para la proliferación y diferenciación de los lactotopos (Stahl *et al.*, 1999). También factores hipotalámicos, como la TRH y el VIP, estimulan la proliferación de los lactotopos (Hayashi & Sato, 1976; Prysor-Jones *et al.*, 1989; Stratmann *et al.*, 1973). Por último, existe una serie de factores intrahipofisarios relacionados con los factores de crecimiento que pueden modular la proliferación de los lactotopos, entre los que se encuentran: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a insulina del tipo 1 (IGF-1), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento transformante tipos alfa y beta (TGF α y β) y las moléculas de adhesión (N-CAM) junto con los componentes de la matriz extracelular (Borrelli *et al.*, 1992; Geary *et al.*, 1989; Hayashi & Sato, 1976; Hentges *et al.*, 2000; McAndrew *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1995; Paez-Pereda *et al.*, 2000; Tilemans *et al.*, 1993; Yajima Y & Saito, 1984). En cambio, la dopamina y su agonista -bromocriptina- inhiben la

proliferación tanto de los lactotopos normales como de prolactinomas, ya sea en animales experimentales o en humanos (Arita *et al.*, 1998; Bevan *et al.*, 1992; Lloyd *et al.*, 1975; MacLeod & Lehmeyer, 1973).

Los somatotopos se encuentran principalmente bajo la estimulación proliferativa de la GHRH, la cual actúa por un mecanismo que involucra una activación de la vía cAMP/PKA y las MAP kinasas (Mayo *et al.*, 2000; Pombo *et al.*, 2000; Ruvkun, 1992; Zeitler & Siriwardana, 2000). El EGF también parece comportarse como un estimulador de la proliferación de los somatotopos, mientras que la somatostatina y la activina A actuarían como factores inhibidores (Billestrup *et al.*, 1990; Roh *et al.*, 2001). La GnRH es la principal neurohormona hipotalámica estimuladora de la proliferación de los gonadotropos (Childs & Unabia, 2001; Sakai *et al.*, 1988). La activina A y el EGF también actúan como estimuladores de la proliferación de este tipo celular (Childs & Unabia, 2001; Katayama *et al.*, 1990), mientras que los estrógenos parecen actuar como inhibidores (Inoue & Kurosumi, 1981). Los corticotropos se encuentran principalmente bajo la acción del CRF, el cual se comporta como un estimulador de la proliferación de este tipo celular (Asa *et al.*, 1992; Gulyas *et al.*, 1991). Asimismo, la proliferación de los corticotropos puede ser estimulada por el EGF (Childs *et al.*, 1995). Por otro lado la TRH y la proteína morfogenética de hueso (BMP) inducen la proliferación de los tirotopos (Ericson *et al.*, 1998; Quintanar-Stephano & Valverde, 1997). El PACAP, además, estimula la proliferación de las células foliculo estrelladas (Matsumoto *et al.*, 1993). Por último, las citokinas ejercen un fuerte papel modulador de la proliferación celular en la adenohipófisis (Ray & Melmed, 1997). Tanto el factor inhibidor de leucemia (LIF) como el TNF- α , la interleukina (IL)-2 y la IL-6 inhiben la proliferación de las células adenohipofisarias, (Arzt *et al.*, 1993; Stefana *et al.*, 1996; Theas *et al.*, 2000).

Por otro lado, existen algunas evidencias sobre los factores que pueden llegar a causar muerte celular en la adenohipófisis. Ha sido demostrado que la terminación del periodo de lactación produce apoptosis en células adenohipofisarias (Ahlbom *et al.*, 1998; Haggi *et al.*, 1986), aunque no se ha/n

caracterizado el/los factor/es involucrado/s en dicho proceso a nivel de glándula. Se ha demostrado que la bromocriptina provoca apoptosis en la línea GH₃ por un mecanismo que involucra la activación de p38 MAP kinasa y la disminución de la expresión de Bcl-2 (Kanasaki *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 1999). Además, un dominante negativo del receptor de estrógenos induce apoptosis en la línea celular productora de prolactina GH₄ (Lee *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el TNF- α actúa como un desencadenante del proceso apoptótico y participa en la renovación celular adenohipofisaria durante el ciclo estral de la rata (Candolfi *et al.*, 2002, en prensa). Por último, se ha postulado que un nuevo factor de transcripción aislado de cDNA de corticotropos, llamado Zac1, podría ser un activador de apoptosis en la adenohipófisis (Pagotto *et al.*, 1999).

Si bien existe una gran cantidad de información concerniente a los factores que regulan la proliferación celular, poco se conoce acerca del proceso de muerte celular programada en la adenohipófisis. Las investigaciones tendientes a caracterizar cuáles son los factores que desencadenan el proceso apoptótico y su relación con el control de la población adenohipofisaria necesitan ser profundizadas.

4. Efectos del óxido nítrico sobre la adenohipófisis

Mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*, se ha demostrado la existencia de los tres tipos de NOS en la glándula hipófisis. La nNOS es la isoforma predominante y está localizada en gonadotropos y FSC (Ceccatelli *et al.*, 1993; Sagar & Ferreiro, 1987; Vincent & Kimura, 1992). La eNOS se localiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la glándula (Okere *et al.*, 1998). También se ha demostrado que las FSC, en condiciones de estimulación por citocinas, poseen la capacidad de expresar iNOS (Vankelecom *et al.*, 1997a).

Si bien en algunos sistemas, como el nervioso, el vascular y el muscular, los efectos del NO han sido ampliamente estudiados, las acciones directas del NO sobre los distintos tipos celulares de la adenohipófisis no están todavía del todo dilucidadas (Brann *et al.*, 1997).

El NO se comporta como un regulador de la secreción de varias hormonas adenohipofisarias y su efecto regulatorio parece depender de las condiciones de experimentación y el sistema en estudio (*in vivo*, glándula intacta, cultivos primarios, líneas celulares). Entre los trabajos en los que se relevó la respuesta secretoria de las células adenohipofisarias *in vitro*, Ceccatelli *et al.* (1993) sugieren un efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de LH estimulada por GnRH. Con respecto a la secreción de GH, existen trabajos con resultados opuestos que indican un efecto inhibitorio (Kato, 1992) o estimulador (Tena-Sempere *et al.*, 1996) del NO sobre el aumento de la secreción de GH inducido por GHRH. En relación a la secreción de ACTH, no se observaron modificaciones en la secreción de esta hormona por acción del NO en células adenohipofisarias en cultivo (Hashimoto *et al.*, 1995).

Por último y como antecedentes directos del presente trabajo, existen varios estudios que le otorgan al NO la capacidad de estimular (Brunetti *et al.*, 1995) o de inhibir (Duvilanski *et al.*, 1995, 1996, 1998; Pu *et al.*, 1999; Theas *et al.*, 2001; Vankelecom *et al.*, 1997a; Velardez *et al.*, 2000) la secreción basal de prolactina *in vitro*. En 1995, Duvilanski *et al.* demuestran por primera vez un efecto inhibitorio específico del NO sobre la liberación basal de prolactina, sin afectar la liberación basal de LH. Dicho efecto inhibitorio sería el resultado de la acción paracrina del NO, dado que los lactotopos no expresan ninguna de las isoformas de la NOS (Vincent & Kimura, 1992; Ceccatelli *et al.*, 1993; Sagar & Ferreiro, 1987). Además, en el mismo trabajo se muestra que el NO estaría mediando parcialmente el efecto inhibitorio de la dopamina y el GABA sobre la liberación de prolactina.

La acción del NO en la adenohipófisis involucra la estimulación de la guanilil ciclasa soluble con el consiguiente aumento de la concentración

intracelular de cGMP, siendo este segundo mensajero uno de los principales mediadores del efecto inhibitorio del NO sobre la secreción basal de prolactina (Duvilanski *et al.*, 1996). En el mismo sentido, en un trabajo previo demostramos que el aumento de cGMP inducido por el NO es capaz de estimular la fosfodiesterasa tipo 2 (PDE2, fosfodiesterasa activada por cGMP que hidroliza específicamente cAMP) produciendo una disminución de la concentración intracelular de cAMP. En el mismo trabajo se sugiere también la participación de la PKG en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción basal de prolactina (Velardez *et al.*, 2000). Reforzando la visión de un efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de esta hormona y teniendo en cuenta que dicho proceso de secreción es un efecto dependiente de calcio, ha sido demostrado que el NO produce una disminución de la concentración intracelular de calcio en células adenohipofisarias tanto en condiciones basales como estimuladas por despolarización (Duvilanski *et al.*, 1998).

Por otro lado se ha sugerido que el NO participa en la regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias inducida por la leptina, el TNF- α y el interferón tipo γ (INF- γ) (Theas *et al.*, 2001; Vankelecom *et al.*, 1997a; Yu *et al.*, 1997).

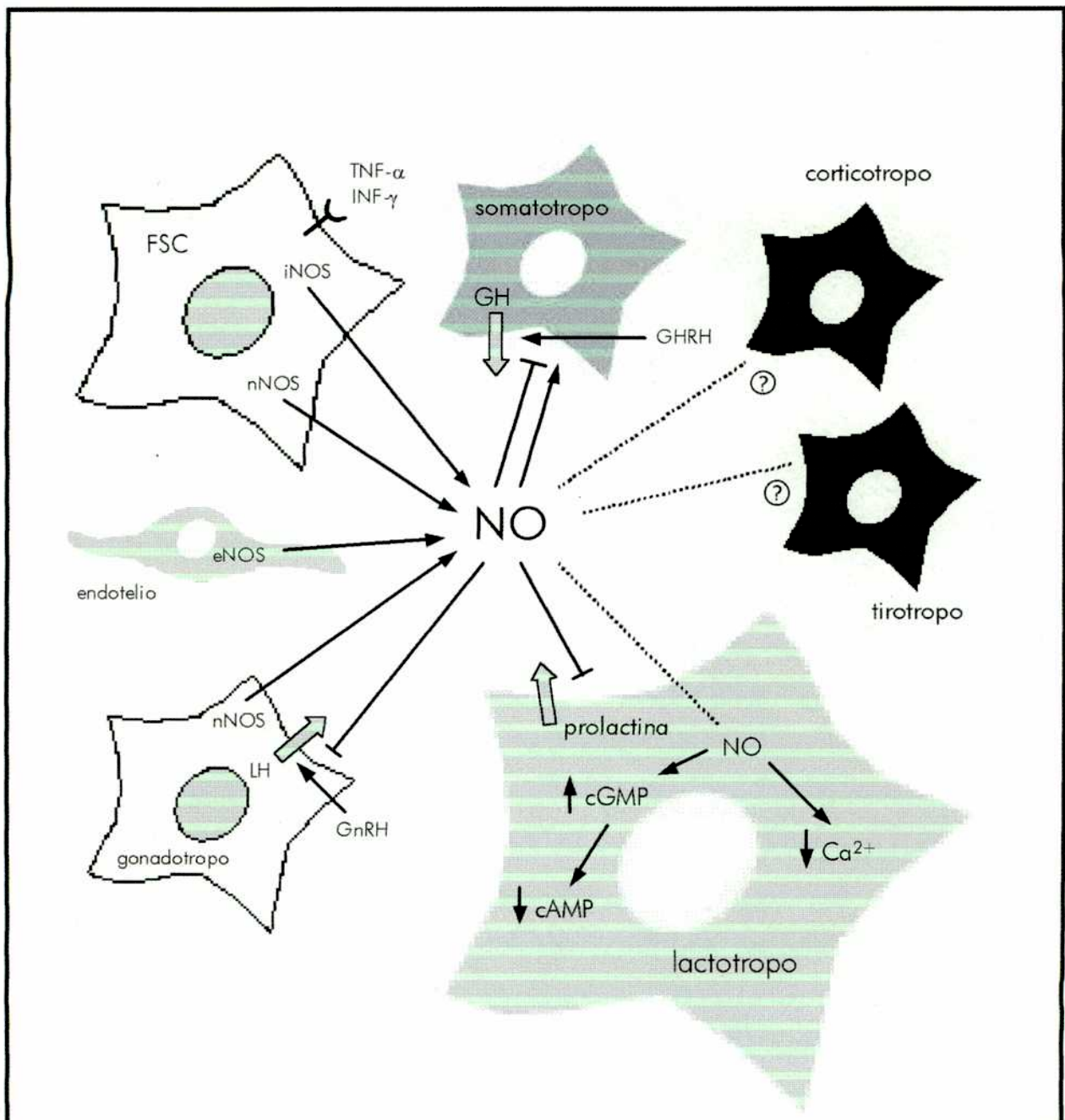


Fig 6 Acciones del NO sobre las células de adenohipófisis de rata. TNF- α , factor de necrosis tumoral tipo α ; INF- γ , interferón tipo γ ; e/n/iNOS, óxido nítrico sintasa tipos endotelial, neuronal e inducible; FSC, células foliculo estrelladas; GH, hormona de crecimiento; GHRH, hormona liberadora de GH; LH, hormona luteinizante; GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico.

La adenohipófisis ha sido desde su descubrimiento y hasta la actualidad un sistema tan complejo como fascinante. Ya sea por la delicadeza de su arquitectura, la heterogeneidad de su composición celular, la complejidad de su biología celular o por el hecho de ser el punto de conexión entre el sistema nervioso central y el endocrino, esta glándula representa un sistema único para el investigador. Este debe echar mano a las numerosas técnicas a su alcance con el propósito de responder algunas de las tantas preguntas que aún permanecen sin respuestas en relación a la fisiología hipofisaria. Una de estas preguntas es cómo se lleva a cabo la regulación específica de la secreción de las diferentes hormonas adenohipofisarias, en especial, la de prolactina, dado que el lactotrofo presenta un modo de regulación único entre los tipos celulares de la adenohipófisis. Otra pregunta es cómo se controla el número de los distintos tipos celulares adenohipofisarios, dado que los diferentes estados fisiológicos pueden modificar rápidamente los procesos proliferativos y de muerte celular en esta glándula. Una aproximación a la respuesta para estas cuestiones fue lo que se intentó llevar a cabo en la realización del presente trabajo, en donde se estudió la acción del NO sobre algunos mensajeros intracelulares involucrados en la regulación de la secreción de prolactina y el papel del NO en el proceso de muerte celular programada en las células adenohipofisarias de rata.

Objetivos

En base a los trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros, podemos sugerir que el NO participa en diversos eventos celulares relacionados con el control de la secreción hormonal y del ciclo celular en la adenohipófisis de rata.

Hasta el momento, no se han llevado a cabo trabajos que evalúen el papel del NO sobre mensajeros intracelulares de origen lipídico en células adenohipofisarias. Por otro lado, no existen trabajos que otorguen al NO un papel citoprotector o citotóxico a nivel de adenohipófisis de rata. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue:

Investigar el papel del NO como regulador integral de la fisiología adenohipofisaria de la rata.

Para ello se evaluó:

-La acción del NO sobre el metabolismo de mensajeros intracelulares de origen lipídico que afectan la secreción de prolactina adenohipofisaria.

-El efecto del NO sobre la viabilidad celular adenohipofisaria.

Materiales y Métodos

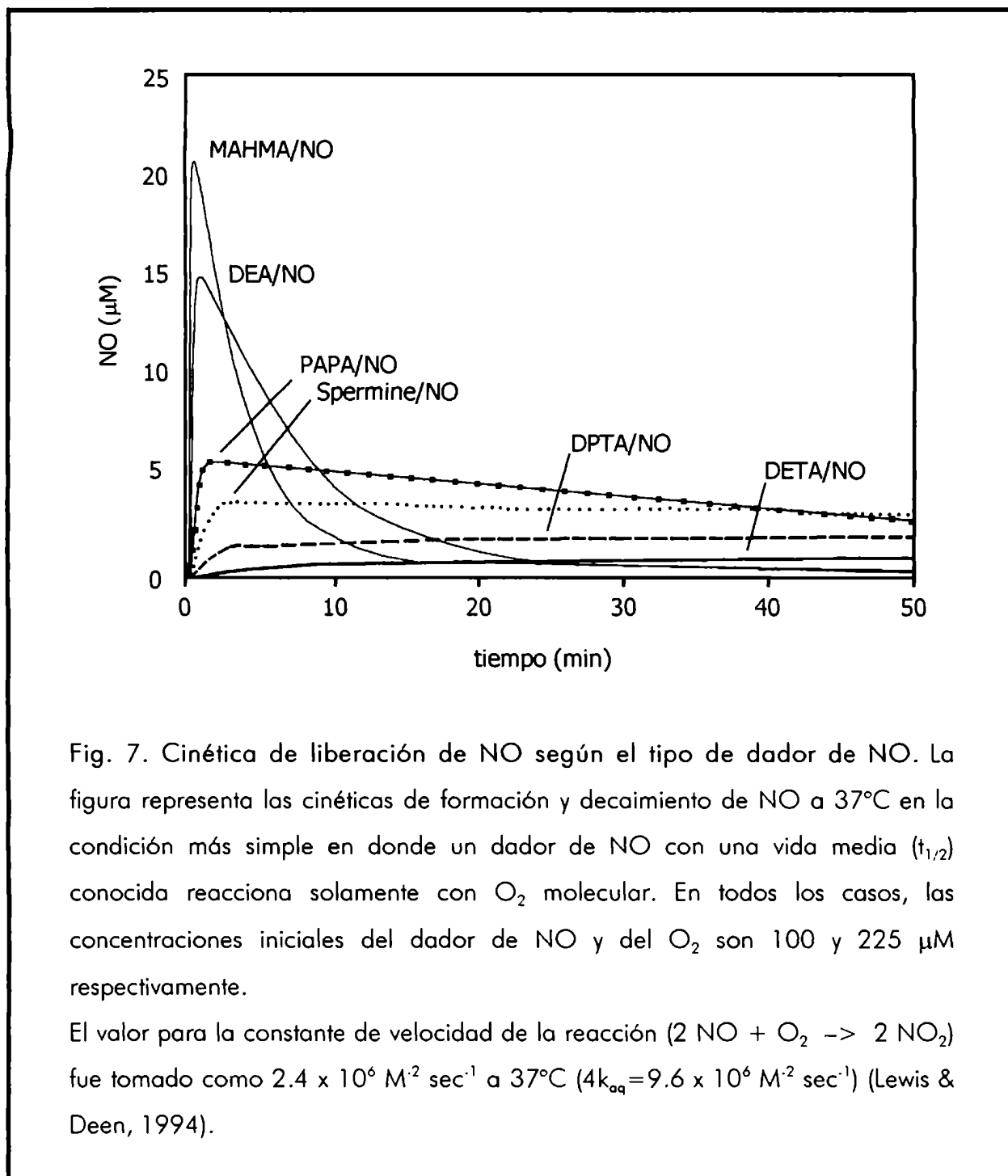
Reactivos

DETA NONOato, LY-83583, Ac-LEHD-CHO, Ac-DEVD-CHO, guanosina 5'-O-(3-tiotrifosfato) sal de tetralitio, angiotensina II, N-acetil-cisteína, Trolox[®], fueron provistos por Alexis (San Diego, CA, USA); MEM-aa (GIBCO); nitroprusiato de sodio, mio-inositol, hemoglobina, Medio mínimo esencial de Dulbecco, anfotericina B, gentamicina, DMSO, DABKO, DAPI (Sigma, St Louis, MO, USA); seroalbúmina bovina, HEPES, (U.S. Biological); Sp-8-pCPT-cGMPS trietilamina y Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina (RBI, Natick, MA, USA); ácido 5-hidroxi-5,8,11,14-eicosatetraenoico (5-HETE) y 12-HETE (Paesel, Frankfurt, Alemania); [2-³H(N)]-mio-inositol y [¹⁴C]-ácido araquidónico (New England, Buenos Aires, Argentina); resina AG 1-X8 forma formiato (Bio-Rad Laboratories, Buenos Aires, Argentina); anticuerpo anti-cGMP (Chemicon, USA); líquido de centelleo Optiphase HiSafe 3 (Wallac, ETC, Buenos Aires, Argentina); [¹²⁵I]cGMP acetilado (gentilmente marcado por el Dr. Pignataro, IBYME, CONICET); BAY 41-2272 (gentilmente provisto por el Dr. Andreas Knorr de BAYER AG Pharma Research); transcutool (gentilmente provisto por Pharmacia, Argentina) y suero fetal bovino (Nutrientes Celulares S.A., Buenos Aires, Argentina).

Las hormonas estándares y los anticuerpos utilizados en la determinación de las hormonas adenohipofisarias por radioinmunoensayos específicos así como también en los estudios inmunocitoquímicos, fueron gentilmente cedidos por el Dr. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, USA.

Como dadores de NO se utilizaron nitroprusiato de sodio (NP) y DETA NONOato (DETA/NO). En soluciones acuosas, los diferentes dadores de NO poseen cinéticas de liberación de NO características de cada compuesto y estas

cinéticas dependen de la concentración del dador utilizada, del pH de la solución y de la temperatura (Fig. 7).



Teniendo en cuenta estas variables, se realizaron mediciones de la cinética de liberación de NO tanto del NP como del DETA/NO en las soluciones utilizadas en el presente trabajo a 37°C en condiciones de gaseo con 5% de CO₂ con un electrodo de NO (World Precision Instruments, Sarasota, FL) (gentileza del Dr. Poderoso, Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires, Argentina). El NP posee una cinética rápida de liberación de NO, alcanzando un pico de concentración de NO a los 20 min de preparada la solución y luego esta concentración disminuye con un tiempo de vida media de 30 min (Fig. 1 y datos en "Discusión"), por lo cual dicho dador fue preparado inmediatamente antes del comienzo de los experimentos. En cambio el DETA/NO posee una cinética lenta, alcanzando el valor máximo de concentración de NO después de 30 min de preparada la solución (datos no mostrados), manteniéndose constante por varias horas con un tiempo de vida media de 20 h (Keefer *et al.*, 1996). Por lo tanto, el DETA/NO fue preparado en el medio correspondiente una hora antes de la aplicación en los distintos protocolos de trabajo para permitir que la concentración efectiva de NO alcance un nivel constante.

Debido a la insolubilidad en agua del LY-83583, éste fue preparado en etanol a una concentración de 10⁻² M y una vez solubilizado fue diluído en el medio correspondiente hasta alcanzar una concentración de 10⁻⁶ M. La concentración máxima de etanol utilizada (0.01% v/v) no modificó los valores de IPs obtenidos en los controles sin etanol realizados paralelamente. Del mismo modo, dicha concentración de etanol tampoco modificó la viabilidad de las células adenohipofisarias (ensayo de MTT) aún en incubaciones de 48 horas (datos no mostrados). El BAY 41-2272 se preparó en transcutol a una concentración de 10⁻² M y una vez solubilizado fue diluído en el medio correspondiente hasta alcanzar una concentración máxima de 10⁻⁵ M. La concentración máxima de transcutol utilizada (0.1% v/v) no modificó los valores de IPs obtenidos en los controles sin transcutol realizados paralelamente. Del mismo modo, dicha concentración de transcutol tampoco modificó la viabilidad

de las células adenohipofisarias (ensayo de MTT) aún en incubaciones de 24 horas (datos no mostrados). Los inhibidores de caspasas fueron preparados en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10^{-2} M y una vez solubilizados fueron diluidos en el medio correspondiente hasta alcanzar una concentración máxima de 10^{-5} M. La concentración máxima de DMSO utilizada (0.1% v/v) no modificó los valores de viabilidad celular (ensayo de MTT) ni la morfología celular, comparados con los controles sin DMSO realizados paralelamente (datos no mostrados). El DMSO en la concentración utilizada no modifica la liberación de prolactina (Duvilanski *et al.*, 1996).

Animales

Se utilizaron ratas machos y hembras (en periodos aleatorios del ciclo estral) adultas de la cepa Wistar de 200-250 g de peso mantenidas a 21-24°C con una fotofase de 12 horas (07:00-19:00), con libre acceso a agua y alimento balanceado. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). Los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis rápidamente removidas y colocadas en recipientes estériles. Las adenohipófisis fueron utilizadas enteras en los experimentos diseñados para el estudio del metabolismo del ácido araquidónico, o dispersadas para la obtención de cultivos primarios en los experimentos diseñados para los estudios del metabolismo de los fosfoinosítidos y de viabilidad celular según se indica en las secciones siguientes.

Incubación de las adenohipófisis para la medición de los derivados de ácido araquidónico

Las adenohipófisis fueron inmediatamente colocadas en buffer Krebs Ringer bicarbonato, pH 7.4 conteniendo glucosa 10 mM, Hepes 25 mM, bacitracina 0.1 mM y seroalbúmina bovina (BSA) 0.1% m/vol, (buffer KRB). Se utilizaron dos adenohipófisis por tubo, las cuales fueron preincubadas durante 45 min en 2 mL de buffer KRB en una atmósfera controlada de 95% de O₂ y 5% de CO₂, con agitación constante de 60 ciclos por minuto, a 37°C. Luego, los tejidos fueron incubados durante 60 min en 2 mL de buffer KRB fresco conteniendo las distintas drogas en estudio en presencia de 2 µL de [³H]-ácido araquidónico (55mCi/mmol). En los experimentos en los cuales se utilizaron hemoglobina o inhibidores de las NOS, los compuestos estuvieron presentes en los medios tanto de preincubación como de incubación (tiempo total: 105 min). Al finalizar las incubaciones, se separó una alícuota de 50 µL para la determinación de la concentración de prolactina. El resto del medio fue inmediatamente procesado para la determinación de metabolitos del ácido araquidónico (extracción lipídica). Los tejidos fueron sonicados en dH₂O en un solo ciclo de 30 seg a una potencia de 60 Watts (Ultrasonic Inc., Plainview, LI, NY, USA). El sonication fue utilizado para la determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Determinación de metabolitos del ácido araquidónico

Los metabolitos del ácido araquidónico fueron determinados como fuera previamente descrito por Franchi *et al.* (1994). Los productos de la vía de las LOX fueron extraídos del medio con 2 mL de acetato de etilo (tres veces). El conjunto de los tres extractos fue secado bajo nitrógeno. El residuo fue resuspendido en 0.2 mL de cloroformo/etanol (2:1 vol/vol) y sembrado en una placa de sílica gel para cromatografía en capa delgada (TLC). Las placas se

corrieron en un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo/isooctano/ácido acético/agua (76:67:20:100 vol/vol/vol/vol). En paralelo se corrieron patrones estándares de 5-HETE y 12-HETE. Los sitios de corrida de los distintos eicosanoides fueron revelados con vapor de yodo y luego se procedió a cortar los sitios correspondientes a los diferentes lípidos. Los valores de R_f promedio para 5-HETE, ácido araquidónico y 12-HETE fueron 0.70, 0.85 y 0.92, respectivamente. Este método no permite la discriminación entre 15-HETE y ácido araquidónico dado que estos lípidos tienen un R_f similar. En nuestras condiciones experimentales no se detectaron productos de la 12-LOX.

Después de la extracción de los productos de la LOX, se acidificó el medio remanente hasta un pH 3 con HCl 1 N en 1 vol de acetato de etilo y el medio se sometió a una extracción similar a la realizada para los productos de las LOX. Los extractos de acetato de etilo fueron mezclados y secados en nitrógeno. Los residuos se resuspendieron en cloroformo/metanol y se sembraron en placas de sílica gel para TLC. Las placas se corrieron en un sistema de solventes compuesto por benceno/dioxano/ácido acético glaciar (60:30:3 vol/vol/vol) y en paralelo se corrieron patrones estándares de los prostanoïdes estudiados. Los sitios de los distintos productos de las COX fueron revelados por el rociado de las placas secas con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol seguido de una incubación a 110°C durante 10 min. Los valores promedio de los R_f para 6-ceto-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGE₂, TXB₂ y ácido araquidónico fueron de 0.30, 0.35, 0.47, 0.57 y 0.80, respectivamente. La radioactividad contenida en los fragmentos de las placas fue medida en un contador de centelleo líquido y los resultados fueron expresados como cpm por μ g de proteína.

Cultivos primarios de células adenohipofisarias

Las adenohipófisis fueron colocadas en un tubo estéril de 50 mL conteniendo medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM), suplementado con L-glutamina 1%, MEM-aa esenciales 1%, gentamicina 0.26% m/vol, anfotericina B

0.56% m/vol, pH 7.35-7.40 (DMEM-S) conteniendo BSA 0.3%. Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y cortadas en trozos de 1mm^3 aproximadamente. Los fragmentos obtenidos fueron sucesivamente tratados con tripsina 0.25% durante 20 min a 37°C sin agitación en condiciones de gaseo con CO_2 al 5%, desoxirribonucleasa del tipo II 0.1% 5 min, e inhibidor de tripsina 0.1% 10 min. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados sucesivamente con buffer KRB libre de Ca^{++} y de Mg^{++} pH 7.35-7.40, conteniendo EDTA 2 mM o EDTA 1 mM o sin EDTA (tres veces), centrifugando tres minutos a $800 \times g$ en cada paso. Las células fueron dispersadas de manera mecánica por el pasaje de los fragmentos a través de una pipeta Pasteur siliconada hasta que los mismos no fuesen visibles. Las células monodispersas fueron lavadas dos veces con DMEM-S-BSA 0.3% y luego resuspendidas en DMEM-S con 10% suero fetal bovino (FBS) antes de ser sembradas en las placas de cultivo correspondientes.

El número de células obtenidas en cada dispersión se determinó por recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad por el método de exclusión utilizando azul de Trypan. La viabilidad de las células utilizadas en los cultivos primarios fue siempre mayor al 95%.

Incubaciones para la medición de inositoles fosfato

En los experimentos diseñados para la cuantificación de inositoles fosfato, las células monodispersas fueron sembradas en placas de cultivo de 6 wells (2.5×10^6 células/well) y cultivadas durante tres días en 4 mL de DMEM-S-10% FBS (37°C , 5% CO_2 en aire) para permitir su estabilización. Al cabo de este periodo, las células fueron lavadas dos veces y el medio fue reemplazado por DMEM-S sin FBS (1.4 mL/well) conteniendo 2 μL de $[2\text{-}^3\text{H(N)}]\text{-mio-inositol}$ (22 Ci/mmol). Las células fueron incubadas en este medio durante 20-24 h para permitir la incorporación del inositol radioactivo a las membranas celulares. Se utilizó un protocolo similar para los experimentos diseñados para la cuantificación de la liberación de prolactina con células sembradas en placas de cultivo de 96

wells (0.1×10^6 células/well). En estos experimentos no se agregó el inositol radioactivo. La incubación de las células adenohipofisarias durante 24 h sin FBS no afectó la viabilidad celular (determinada por el ensayo de MTT, dato no mostrado).

Incubaciones para el estudio de viabilidad celular

En los experimentos diseñados para la medición de actividad celular, las células monodispersas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 wells (0.1×10^6 células/well) y cultivadas durante tres días en 0.2 mL de DMEM-S-10% FBS (37°C , 5% CO_2 en aire) para permitir su estabilización. Al cabo de este periodo, los medios fueron reemplazados por medio fresco conteniendo las diferentes drogas en estudio durante los tiempos correspondientes (ver "Resultados" página 73). Al término de las incubaciones, los medios fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 mL, centrifugados para la eliminación de células no adheridas y los sobrenadantes fueron conservados a -20°C hasta la determinación del contenido hormonal. El medio remanente en los wells fue aspirado e inmediatamente se procedió a la realización del protocolo de medición de actividad celular (ensayo de MTT).

Para el estudio morfológico de los núcleos y la determinación del tipo celular por inmunocitoquímica, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (Fisherbrand 12 mm, Fisher Scientific, USA), colocados dentro de placas de cultivo de 24 wells (0.1×10^6 células/cubreobjeto) y cultivadas durante tres días en 0.5 mL de DMEM-S-10% FBS. Luego las células se incubaron como en los experimentos diseñados para la medición de la actividad celular.

Incubaciones para la medición de la síntesis de cGMP

En los experimentos diseñados para la medición de la actividad de guanilil ciclasa, las células monodispersas fueron sembradas en placas de cultivo de 24 wells (1×10^6 células/well) y cultivadas durante tres días en 1 mL de DMEM-S-10% FBS (37°C , 5% CO_2 en aire) para permitir su estabilización. Al

cabo de este periodo, los medios fueron reemplazados por 0.5 mL de buffer KRB pH 7.35 y las células fueron preincubadas durante 30 min (37°C, 5% CO₂ en aire). Después de la preincubación, se renovó el medio con buffer KRB y las células fueron incubadas durante 60 min en presencia de los dadores de NO o de concentraciones crecientes de BAY 41-2272 en buffer KRB. Al término de las incubaciones, los medios fueron aspirados y las células incubadas en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 6.2 a 100°C durante 5 min. Luego las células fueron sonicadas durante 15 seg y las muestras se almacenaron junto con los medios correspondientes a -70°C hasta la medición de cGMP por radioinmunoensayo.

Medición de inositoles fosfato en células adenohipofisarias intactas

Al finalizar el periodo de marcación de las membranas celulares con el mio-inositol radioactivo, las células fueron lavadas dos veces con 2 mL de DMEM y preincubadas en DMEM-S sin FBS conteniendo 10 mM de LiCl durante 30 min (37°C, 5% CO₂ en aire). El LiCl se utiliza como inhibidor de las fosfatasas intracelulares, dando como resultado la acumulación de las distintas especies de inositoles fosfato y la posibilidad de cuantificarlas. Después de la preincubación, el medio fue renovado con 2 mL del mismo medio conteniendo las diferentes drogas en estudio y las células fueron incubadas durante otros 30 min en las mismas condiciones. En los experimentos en que se utilizó Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina, LY-83583 o BAY 41-2272, estos compuestos estuvieron presentes en el medio desde el periodo de preincubación. Finalizadas las incubaciones, las placas fueron colocadas en hielo y luego de retirar el medio, inmediatamente se agregaron 0.5 mL de ácido perclórico (PCA) 0.5 M frío en cada well. Las células fueron levantadas con un rastrillo de teflón y transferidas a tubos de polipropileno de 5 mL. Los wells fueron lavados con 0.7 mL de PCA frío el cual se juntó con el extracto anterior. Los extractos se neutralizaron con 0.6 mL de una solución de KOH/KHCO₃ (0.72 M / 0.6 M) y se mantuvieron durante 30 min en hielo. El

sobrenadante fue separado del KClO_4 precipitado junto con el remanente de membranas celulares por centrifugación ($1000 \times g$ durante 20 min a 4°C). Cada sobrenadante fue mezclado con 0.5 mL de mio-inositol 100 mM y el volumen ajustado a 5 mL con dH_2O , y sometido a cromatografía de intercambio iónico en columnas de 0.5×4.0 cm de DOWEX (AG 1-X8 trama de 200-400 forma formiato) de acuerdo al método descrito por Ascoli *et al.* (1989). Las columnas se prelavaron con 10 mL de mio-inositol 10 mM. Después de la aplicación de la muestra, las columnas se eluyeron secuencialmente con 15 mL de mio-inositol 10 mM para lavar el $[2\text{-}^3\text{H(N)}]$ -mio-inositol residual, 5 mL de una solución de borato de sodio 5 mM / formiato de sodio 60 mM para eluir glicerofosfoinositoles, 5 mL de una solución de ácido fórmico 0.1 M / formiato de amonio 0.2 M para eluir inositoles monofosfato (IP_1), 5 mL de una solución de ácido fórmico 0.1 M / formiato de amonio 0.4 M para eluir inositoles difosfato (IP_2) y 5 mL de una solución de ácido fórmico 0.1 M / formiato de amonio 1.0 M para eluir IP_3 . Después se tomaron 2 mL de cada eluido, se mezclaron con 5 mL de líquido de centelleo y la radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la radioactividad total incorporada.

Medición de inositoles fosfato en células adenohipofisarias permeabilizadas

Las células adenohipofisarias fueron permeabilizadas según se describió en el trabajo de Koshiyama y Tashjian (1991) con pocas modificaciones. En forma resumida, al final del periodo de marcación de las membranas celulares, las células fueron lavadas dos veces con 2 mL de la solución buffer salina A que contenía en mM: NaCl 118, KCl 4.6, CaCl_2 1, glucosa 10 y HEPES 20. Luego las células fueron lavadas dos veces con 2 mL de solución buffer salina B que contenía en mM: KCl 125, KH_2PO_4 2, CaCl_2 0.5, MgCl_2 2.5, LiCl 10, glucosa 10, EGTA 1, HEPES 25 y BSA al 0.1%. Después de los lavados, las células fueron

incubadas con digitonina 5 mM durante 7 min a temperatura ambiente, rápidamente lavadas dos veces con solución buffer salina B y preincubadas en esta solución durante 15 min (37°C, 5% CO₂ en aire). Luego se reemplazó el medio por 1.8 mL del mismo medio (solución buffer salina B) conteniendo las diferentes drogas en estudio y las células fueron incubadas durante 30 min (37°C, 5% CO₂ en aire). Al final del periodo de incubación, las placas fueron colocadas en hielo y el medio de cada well fue transferido rápidamente a tubos de polipropileno conteniendo 0.2 mL de PCA 5 M frío. Las células fueron levantadas con PCA en frío de manera similar a lo realizado con las células intactas y transferidas a los mismos tubos que contenían el medio. Los pasos subsiguientes se realizaron como se describió en "Medición de inosítoles fosfato en células adenohipofisarias intactas".

Ensayo de actividad celular (ensayo de MTT)

Inmediatamente después de la aspiración del medio remanente en los wells, se agregaron 110 µL de una solución de MTT 5 mg/11 mL de buffer KRB en cada well y las placas se incubaron durante 4 h (37°C, 5% CO₂ en aire) para permitir la formación de los cristales de formazán. Al término del periodo de incubación, se retiraron cuidadosamente 90 µL de la solución de MTT y se agregaron 100 µL de HCl 0.04 N en isopropanol. Se agitaron las placas durante al menos 3 min hasta la solubilización total de los cristales de formazán obtenidos al cabo de las cuatro horas de incubación con la solución de MTT. Una vez desarrollado el color, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

Inmunocitoquímica

Al término de las incubaciones, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas por inmersión en PBS una sola vez e inmediatamente fijadas en

metanol/ácido acético glacial (1:3 vol/vol) durante 10 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS a 4°C, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.1% en PBS durante 10 min a 4°C, incubadas en solución de bloqueo (5% de suero normal de la especie del segundo anticuerpo, 2% de BSA, 0.1% de Tritón X-100 en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y lavadas tres veces con PBS a 4°C. Luego las células se incubaron con el primer anticuerpo específico para cada una de las hormonas adenohipofisarias estudiadas durante 60 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS a 4°C. Seguidamente las células se incubaron con el anticuerpo conjugado a fluoresceína durante 40 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS a 4°C. Los anticuerpos fueron utilizados en las siguientes diluciones: Ab_(gp)αPRL (1:2500), Ab_(gp)αLH (1:2500), Ab_(gp)αGH (1:2000), Ab_(gp)αTSH (1:2000), FITC-Ab_(rabbit)αIgG(gp) (1:200), mAb-αS100 (1:50) y FITC-Ab_(gp)αIgG(mouse) (1:200).

Al término de la inmunocitoquímica se colorearon los núcleos celulares con una solución de yoduro de propidio (PI) 0.6 µg/mL durante 10 min a temperatura ambiente. Después, las células fueron sometidas a dos lavados por inmersión y con agitación suave en PBS durante 15 seg, un lavado en una solución de CaCl₂ 0.5% durante 20 seg, un lavado en dH₂O durante 5 seg y un lavado en PBS durante 5 seg.

Con el fin de diferenciar células apoptóticas de células necróticas, las células fueron teñidas con una solución de naranja de acridina/bromuro de etidio (10 µg/mL cada uno, en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y sometidas a la misma serie de lavados descrita para yoduro de propidio en el párrafo anterior. Al finalizar las tinciones, los cubreobjetos fueron invertidos sobre un portaobjetos que contenía una gota de solución estabilizadora de la fluorescencia (antifade, DABKO 2.33% m/vol, Tris HCl 20 mM, Glicerol 90% vol/vol en dH₂O) y seguidamente se procedió a la observación y fotografía de las células en un microscopio de fluorescencia Axiophot D-7082 (Carl Zeiss, Alemania) utilizando un rollo KODAK EKTA-Chrome de 400 ASA. El recuento

celular y de núcleos con morfología apoptótica se realizó en muestras por duplicado o triplicado, contando al menos 500 células en campos elegidos al azar y de al menos tres experimentos independientes. Los conteos fueron llevados a cabo por tres observadores. Los datos fueron expresados como número de núcleos apoptóticos x 100 / número de núcleos totales, o número de células inmunopositivas para un tipo de hormona que presentan núcleos apoptóticos x 100 / número de núcleos apoptóticos totales.

RIA de cGMP

Antes del ensayo, las muestras fueron acetiladas por el agregado de 10 μL de una mezcla de trietilamina (TEA) y anhídrido acético (AAc) en una proporción 2:1 (vol/vol) agitando durante 5 min, intermitentemente, en frío. El cGMP estándar sufrió el mismo proceso que las muestras (calentamiento a 100°C y acetilación con TEA + AAc). Las muestras del estándar acetilado fueron alicuotadas y utilizadas como control intra e interensayo.

Como diluyente se utilizó buffer acetato de sodio 50 mM pH 6.2. El volumen final del ensayo fue de 150 μL en donde se colocaron 100 μL de muestra, 25 μL de anticuerpo (dilución final 1/300) y 25 μL de [^{125}I]cGMP acetilado (20000 cpm). Esta mezcla fue mantenida durante 18-20 horas a 4°C y la reacción fue detenida mediante el agregado de 100 μL de BSA al 10% en dH_2O y 2 mL de etanol 96% frío (4°C). Después de agitar y dejar en reposo durante 30 min, los tubos fueron centrifugados durante 20 min a 2500 rpm. El sobrenadante fue aspirado y la radioactividad del pellet cuantificada en un contador gamma (Wallac Oy, Finland). Las variaciones intra e interensayo fueron menores al 10%.

RIA de Prolactina

Como diluyente de las muestras, el estándar y la PRL radioactiva se utilizó PBS pH 7.6 conteniendo BSA al 1%. Como diluyente para el primer anticuerpo se

utilizó PBS-EDTA 25 mM conteniendo suero normal de conejo (NRS) al 1%. El volumen final del ensayo fue 400 μ L donde se colocaron 100 μ L de muestra, 100 μ L de primer anticuerpo (dilución final 1/462000), 100 μ L de PBS y 100 μ L de hormona marcada (12000 cpm). Esta mezcla fue mantenida durante 72 horas a 4°C y la reacción fue detenida mediante el agregado de 100 μ L de una solución de suero ovino anti-gammaglobulina de conejo (1/20) en PBS (60 min a temperatura ambiente). Las muestras fueron coprecipitadas con 1 mL de una solución al 6% de polietilenglicol (PEG, peso molecular promedio: 4000) durante 60 min a 4°C y centrifugadas durante 20 min a 2500 rpm. La radioactividad del pellet fue cuantificada en un contador gamma. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores al 10%.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) y evaluados por la prueba "t" de Student para muestras no apareadas o mediante un análisis de la varianza de uno o dos factores (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para diseños no balanceados o por la prueba de Dunnett según el diseño experimental.

Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas si $p < 0.05$ (Sokal & Rohlf, 1995). Los datos fueron confirmados mediante la realización de por lo menos tres experimentos independientes.

Las distintas pruebas estadísticas fueron realizadas mediante software Graphpad InStat y Statistica for Windows 4.3 B (1993).

Resultados

1. Papel del NO en el metabolismo del ácido araquidónico en la adenohipófisis de rata

El ácido araquidónico es un estimulador de la secreción de hormonas adenohipofisarias y dicho efecto depende mayoritariamente de su metabolización a través de la vía de la LOX (Ben Menahem et al., 1994; Canonico et al., 1984; Conte et al., 1986; Cowell et al., 1991; Roudbaraki et al., 1996). El NO regula las actividades de las LOX y las COX en diversos tejidos actuando directamente sobre el sitio activo de dichas enzimas (Goodwin et al., 1999; Maccarrone et al., 1996). Dependiendo del tipo celular y la concentración, el NO puede estimular o inhibir la actividad de las LOX y de las COX. Hasta el momento, el papel del NO sobre el metabolismo del ácido araquidónico en la adenohipófisis de la rata no ha sido estudiado, por lo tanto nuestro objetivo fue:

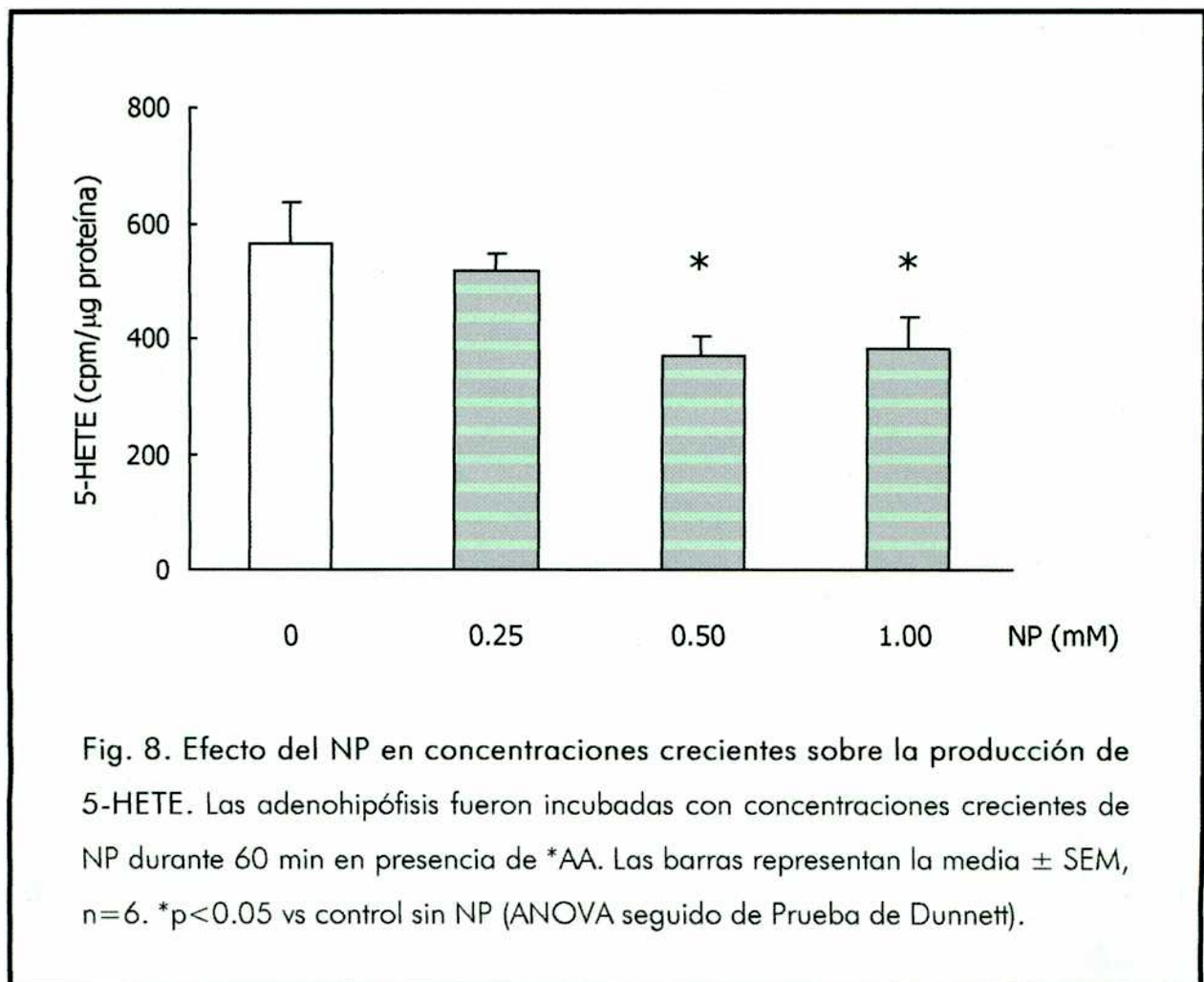
Investigar el efecto del NO sobre la actividad de las LOX y de las COX en la adenohipófisis de la rata y su relación con la secreción de prolactina.

En estos estudios, analizamos el efecto del NO exógeno mediante el uso de dadores de NO y del NO endógeno a través de la estimulación y la inhibición de la actividad de las NOS.

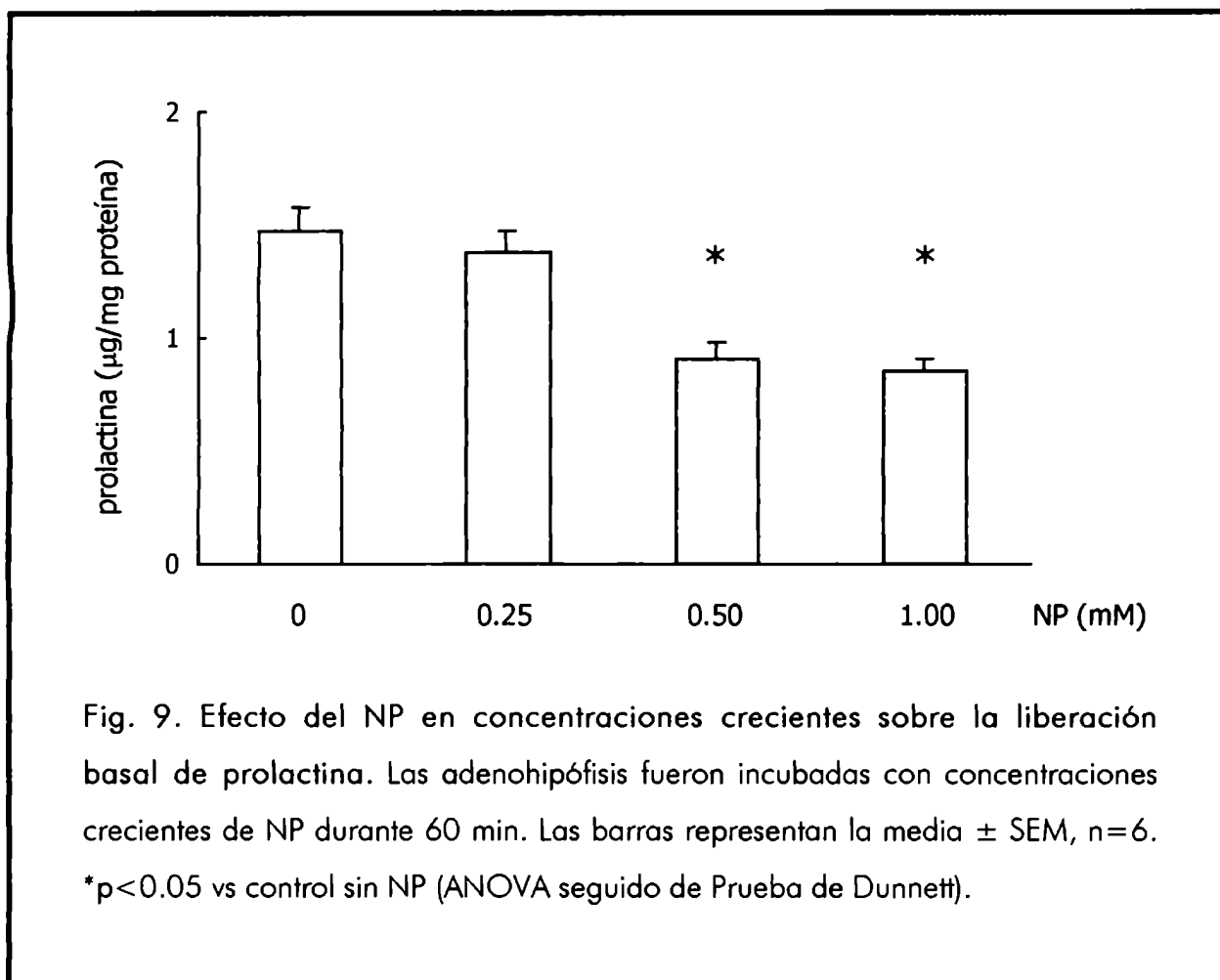
Efecto de los dadores de NO sobre la actividad de las LOX

Con el objeto de investigar el efecto del NO sobre la actividad de las LOX en la adenohipófisis de rata y teniendo en cuenta que el 5-HETE es el producto de esta vía con mayor actividad estimuladora de la liberación de prolactina (Koike et al., 1985), se examinó el efecto de diferentes dadores de NO sobre la síntesis de 5-HETE, utilizando [¹⁴C]-ácido araquidónico (*AA) como sustrato. El nitroprusiato de sodio (NP), un dador de NO, disminuyó

significativamente la producción de 5-HETE a concentraciones entre 0.5 y 1.0 mM, mientras que una concentración menor (0.25 mM) no tuvo efecto (Fig. 8). El DETA/NO 1 mM, otro dador de NO, también disminuyó significativamente la producción de 5-HETE (Control: 918 ± 33 cpm/ μ g proteína, DETA/NO: 752 ± 57 , $n=6$; $p<0.05$, Prueba "t" de Student).



En concordancia con trabajos anteriores (Duvilanski et al., 1995, 1996; Velardez et al., 2000), el NP, en las mismas concentraciones en las que produjo una disminución los niveles de 5-HETE, inhibió la liberación basal de prolactina (Fig. 9). DETA/NO (1 mM) también inhibió la liberación basal de prolactina (dato no mostrado).



Una de las estrategias utilizadas para estudiar el efecto del NO sobre alguna función biológica consiste en el uso de moléculas sequestradoras de NO como la hemoglobina, la mioglobina o el carboxi-PTIO para revertir el efecto paracrino del NO generado por el tejido en estudio. Dado que estos compuestos no atraviesan las membranas biológicas, se considera que actúan como quelantes del NO extracelular. Del mismo modo, las moléculas sequestradoras se utilizan para verificar si el efecto observado de un dador de NO es específico del NO o es un efecto propio de la molécula dadora.

En el presente estudio se utilizó hemoglobina para descartar cualquier efecto propio de la molécula dadora de NO. La hemoglobina (Hb, 2 μ M) por sí

misma no afectó la síntesis basal de 5-HETE, pero revirtió completamente el efecto inhibitorio tanto del NP (Fig. 10) como del DETA/NO (dato no mostrado).

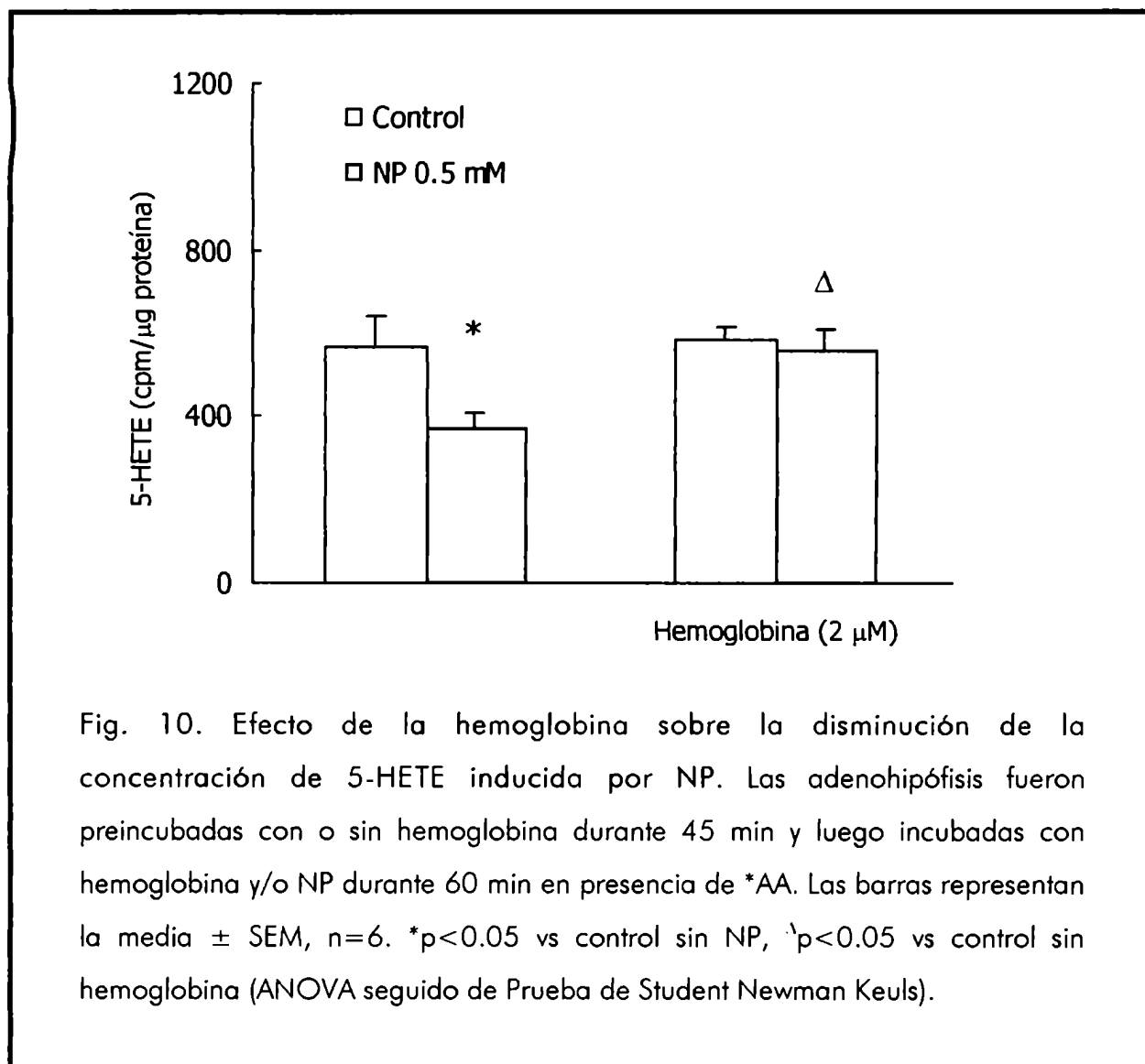
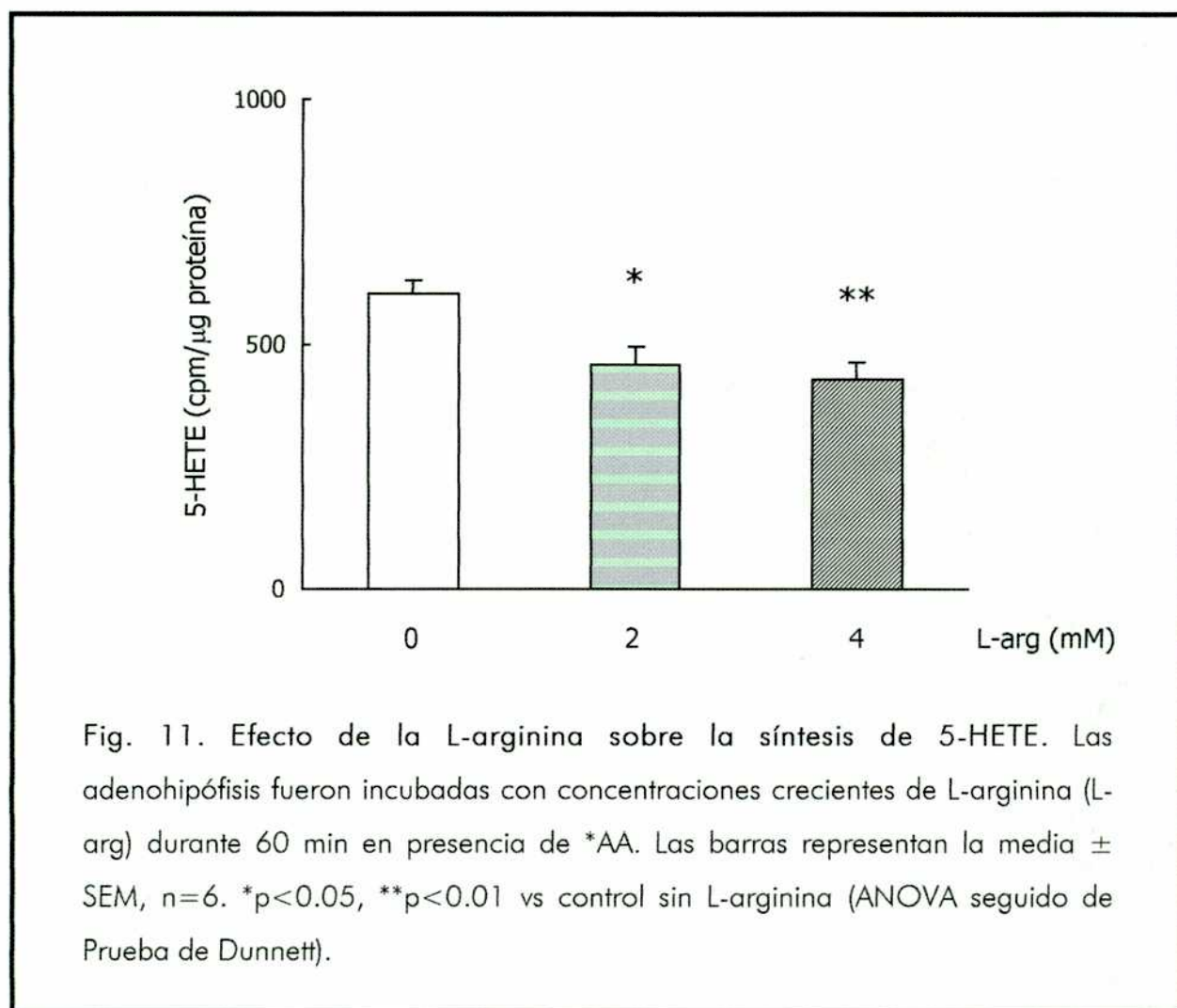


Fig. 10. Efecto de la hemoglobina sobre la disminución de la concentración de 5-HETE inducida por NP. Las adenohipófisis fueron preincubadas con o sin hemoglobina durante 45 min y luego incubadas con hemoglobina y/o NP durante 60 min en presencia de *AA. Las barras representan la media \pm SEM, $n=6$. * $p<0.05$ vs control sin NP, $^{\Delta}p<0.05$ vs control sin hemoglobina (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

Efecto del NO endógeno sobre la actividad de las LOX

Otra de las estrategias utilizadas para estudiar el efecto del NO endógeno es la utilización de inhibidores de las NOS. Dado que el NO es generado por algunas células adenohipofisarias, se evaluó la participación del NO endógeno sobre la síntesis de 5-HETE. Se utilizó L-arginina como estimulador

de la actividad de síntesis de NO ya que este aminoácido es el sustrato natural de la NOS y se emplearon L-NAME y aminoguanidina como inhibidores de las NOS. La L-arginina, a concentraciones de 2 y 4 mM, disminuyó la producción de 5-HETE de manera similar a lo observado con los dadores de NO (Fig. 11) y este efecto inhibitorio de la L-arginina fue revertido completamente por la hemoglobina (2 μ M) (Control: 707 ± 35 cpm/mg de proteína, L-arginina: 558 ± 50 , L-arginina + Hb: 790 ± 62 , $n=6$; $p<0.05$, Prueba de Dunnett). De manera opuesta, tanto el L-NAME (0.5 mM) como la aminoguanidina (0.5 mM) aumentaron la producción de 5-HETE (Fig. 12).



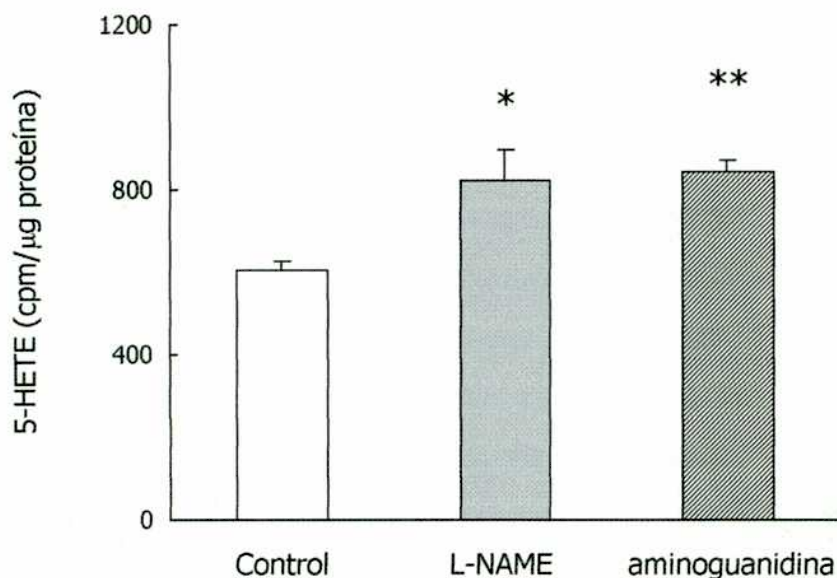


Fig. 12. Efecto de los inhibidores de NOS sobre la producción de 5-HETE. Las adenohipófisis fueron preincubadas con L-NAME 0.5 mM o aminoguanidina 0.5 mM durante 45 min y luego incubadas durante 60 min en las mismas condiciones en presencia de *AA. Las barras representan la media \pm SEM, $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs control sin inhibidores de NOS (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

Efecto de los dadores de NO sobre la actividad de las COX

En los experimentos diseñados para el estudio del efecto del NO sobre la actividad de las COX, se cuantificó la producción de los siguientes prostanooides: 6-ceto-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGE₂ y TXB₂. En la tabla 1 se puede observar que el NP 1 mM estimuló significativamente la síntesis de PGF_{2 α} y produjo un aumento no significativo de todos los demás prostanooides estudiados. El NP a menores concentraciones no modificó la síntesis de PGs y TXs. El DETA/NO, en cambio indujo un aumento significativo de la síntesis de todos los prostanooides estudiados y dicho efecto fue revertido completamente por la hemoglobina (2 μ M) (Fig. 13). La hemoglobina no tuvo un efecto propio sobre la producción de PGs y TXs (Fig. 13).

Tabla 1. Efecto del NP en concentraciones crecientes sobre la producción de prostanooides.

| | Control | NP (mM) | | |
|--------------------------|------------|----------|----------|-------------|
| | | 0.25 | 0.50 | 1.00 |
| 6-ceto PGF _{1α} | 631 ± 58 | 574 ± 57 | 552 ± 30 | 712 ± 32 |
| PGF _{2α} | 800 ± 84 | 733 ± 42 | 933 ± 43 | 1136 ± 69 * |
| PGE ₂ | 1078 ± 127 | 902 ± 90 | 909 ± 44 | 1144 ± 69 |
| TXB ₂ | 340 ± 55 | 352 ± 24 | 311 ± 31 | 412 ± 42 |

Las adenohipófisis fueron incubadas con concentraciones crecientes de NP durante 60 min en presencia de *AA. Los valores representan la media ± SEM (cpm/μg proteína), n=6. *p<0.05 vs control sin NP (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

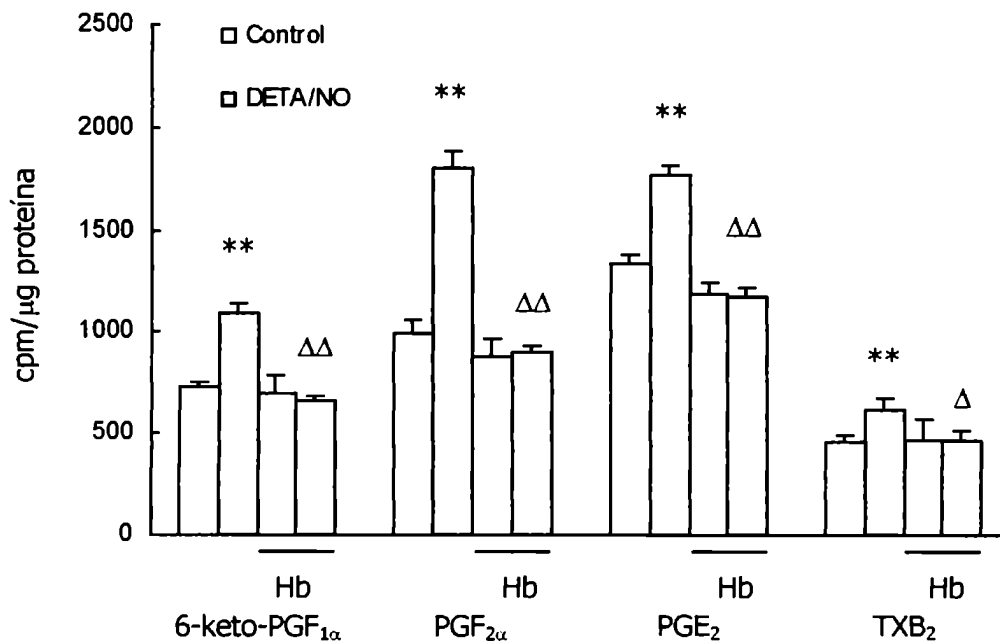


Fig. 13. Efecto del DETA/NO y la hemoglobina sobre la actividad de las COX. Las adenohipófisis fueron preincubadas con o sin hemoglobina 2 μM (Hb) durante 45 min y luego incubadas con Hb y/o DETA/NO 1 mM durante 60 min en presencia de *AA. Las barras representan la media ± SEM, n=6. **p<0.01 vs control respectivo sin DETA/NO, Δp<0.05, ΔΔp<0.01 vs control respectivo sin Hb (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

Efecto del NO endógeno sobre la actividad de las COX

Frente a una estimulación de la síntesis de NO con L-arginina se observó solamente un aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y un aumento no significativo de los demás metabolitos de la vía de las COX (Tabla 2), efecto similar al obtenido con NP 1 mM. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de NO por L-NAME 0.5 mM o aminoguanidina 0.5 mM no modificó los niveles de los prostanoïdes estudiados (Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de la L-arginina sobre la producción de PGs y tromboxano.

| | Control | L-arg 2 mM | L-arg 4 mM |
|-------------------------------|----------|------------|------------|
| 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ | 597 ± 39 | 819 ± 35 | 684 ± 98 |
| $\text{PGF}_{2\alpha}$ | 719 ± 28 | 966 ± 85 * | 955 ± 73 * |
| PGE_2 | 989 ± 40 | 1285 ± 84 | 1197 ± 112 |
| TXB_2 | 247 ± 7 | 270 ± 31 | 311 ± 34 |

Las adenohipófisis fueron incubadas con concentraciones crecientes de L-arginina (L-arg) durante 60 min en presencia de *AA. Los valores representan la media ± SEM (cpm/ μg proteína), n=6. *p<0.05 vs control sin L-arginina (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

Estos resultados en conjunto indican que el NO disminuye la actividad de las LOX en la adenohipófisis de la rata. Asimismo, el NO estaría ejerciendo su efecto inhibitorio de manera tónica dado que el bloqueo de la síntesis de NO endógeno indujo una mayor producción de 5-HETE. Por otro lado, el NO parece tener un efecto estimulador sobre la actividad de las COX, aunque es probable que sea necesario un aumento persistente de NO para observar una estimulación

marcada de esta enzima. Por último, dado que la prolactina es la única hormona adenohipofisaria con una alta tasa de liberación basal, se podría sugerir que la vía de las LOX podría estar involucrada en el efecto inhibitorio tónico del NO sobre la liberación de esta hormona.

Tabla 3. Efecto de los inhibidores de las NOS sobre la producción de PGs y tromboxano.

| | Control | L-NAME | aminoguanidina |
|--------------------------|----------|-----------|----------------|
| 6-ceto PGF _{1α} | 695 ± 38 | 727 ± 35 | 564 ± 98 |
| PGF _{2α} | 618 ± 37 | 769 ± 61 | 635 ± 75 |
| PGE ₂ | 881 ± 70 | 1017 ± 91 | 788 ± 76 |
| TXB ₂ | 225 ± 11 | 247 ± 42 | 245 ± 18 |

Las adenohipófisis fueron preincubadas con L-NAME (0.5 mM) o aminoguanidina (0.5 mM) durante 45 min y luego incubadas en las mismas condiciones durante 60 min en presencia de *AA. Los valores representan la media ± SEM (cpm/μg proteína), n=6. (ANOVA).

2. Efecto del NO sobre la producción de inositoles fosfato en la adenohipófisis de rata

El IP_3 , producto de la actividad de las PLC sobre el PIP_2 que integra las membranas biológicas, estimula la secreción de hormonas adenohipofisarias (Canónico & MacLeod, 1986; Bilezikjian et al., 1987; Brenner-Gati & Gershengorn, 1986; Mau et al., 1995; Naor, 1990). El mecanismo de acción del IP_3 involucra la activación de sus receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico, con la consiguiente liberación de calcio desde dicha organela hacia el citosol (Taylor, 1998; Woodcock, 1997). Varios estudios muestran que el NO, a través de la activación de la PKG es capaz de modular el metabolismo de los fosfoinosítidos (Clementi et al., 1995; Xia et al., 2001) y la actividad del receptor de IP_3 (Haug et al., 1999; Komalavilas & Lincoln, 1996). Sin embargo, el mecanismo de acción del NO sobre la producción de inositoles fosfato en la adenohipófisis de rata no ha sido investigado. Por lo tanto, el objetivo fue:

Estudiar el efecto del NO sobre el metabolismo de fosfoinosítidos en células adenohipofisarias de rata y su relación con la secreción de prolactina.

Al igual que en los experimentos con ácido araquidónico, en el presente estudio se analizó el efecto de dadores de NO e inhibidores de las NOS y además se investigó la participación de la vía del cGMP/PKG en el potencial efecto del NO sobre la producción de inositoles fosfato (IPs).

Efecto de los dadores de NO sobre la síntesis de IPs en condiciones basales y estimuladas

En primer lugar, para investigar la acción del NO sobre la actividad de la PLC, se examinó el efecto de dadores de NO sobre la síntesis basal de IPs en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata premarcadas con [2-³H(N)]-mio-inositol (*inositol). En estas condiciones ni el DETA/NO (Fig. 14), ni el NP (0.1-2.0 mM, dato no mostrado) modificaron la producción basal de IPs.

En base a estos resultados, se procedió a estudiar el efecto de los dadores de NO en condiciones de estimulación de la síntesis de IPs. Para ello se utilizaron angiotensina II (AngII) y TRH dado que ambos péptidos incrementan la liberación de prolactina por un mecanismo que involucra la estimulación de la actividad de PLC (Schramme & Denef, 1983; Tashjian et al., 1971). En presencia de AngII 10^{-8} M se observó un marcado aumento de la síntesis de IPs y este efecto fue parcialmente revertido por el DETA/NO (1 y 2 mM) (Fig. 14). También se observó que el DETA 0.1 mM fue capaz de revertir parcialmente la estimulación de la síntesis de IP₃ inducida por AngII (Fig. 14). El NP también disminuyó la síntesis de IPs estimulada por AngII (datos de IP₃, como % de la radioactividad incorporada; AngII 10^{-8} M: 3.07 ± 0.07 , AngII + NP 1 mM: $2.32 \pm 0.04^*$, n=6; *p<0.05, Prueba "t" de Student). Se obtuvieron resultados similares con ambos dadores de NO cuando la síntesis de IPs fue estimulada con TRH 10^{-7} M (Fig. 15). Con el fin de determinar la especificidad de la acción del NO y descartar posibles efectos inespecíficos de las moléculas dadoras de NO, se utilizó tanto hemoglobina como DETA NONOato sin capacidad de liberar NO (DETA NONOato decaído). El DETA NONOato decaído (DETA) fue obtenido mediante la incubación de DETA NONOato (a la concentración deseada) durante al menos 48 horas en el medio correspondiente a 37°C en un recipiente con posibilidad de intercambio gaseoso. Este tratamiento permite la liberación completa de todo el NO por parte de la molécula dadora, la cual queda en la solución sin actividad residual para liberar NO.

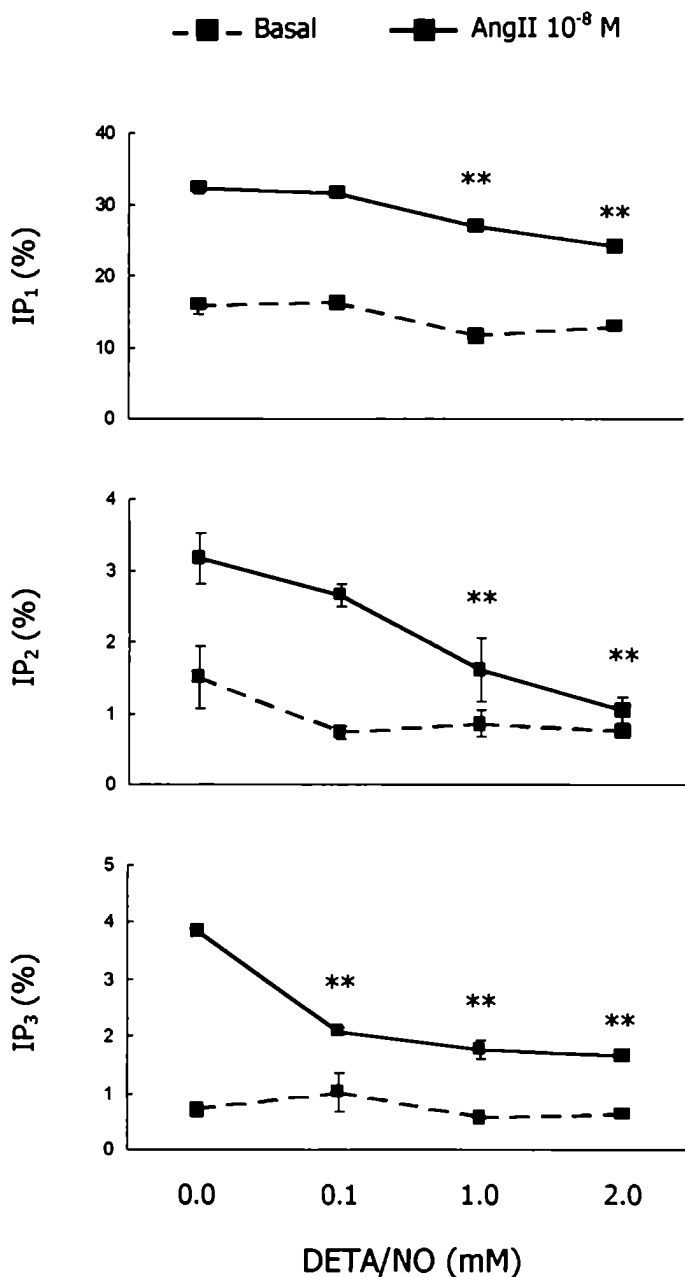


Fig. 14. Efecto del DETA/NO sobre la producción de IPs. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron incubadas con (líneas sólidas) o sin (líneas punteadas) angiotensina II (AngII 10⁻⁸ M) en presencia de DETA/NO en concentraciones crecientes durante 30 min. Los puntos representan la media ± SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. **p<0.01 vs control sin DETA/NO, (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

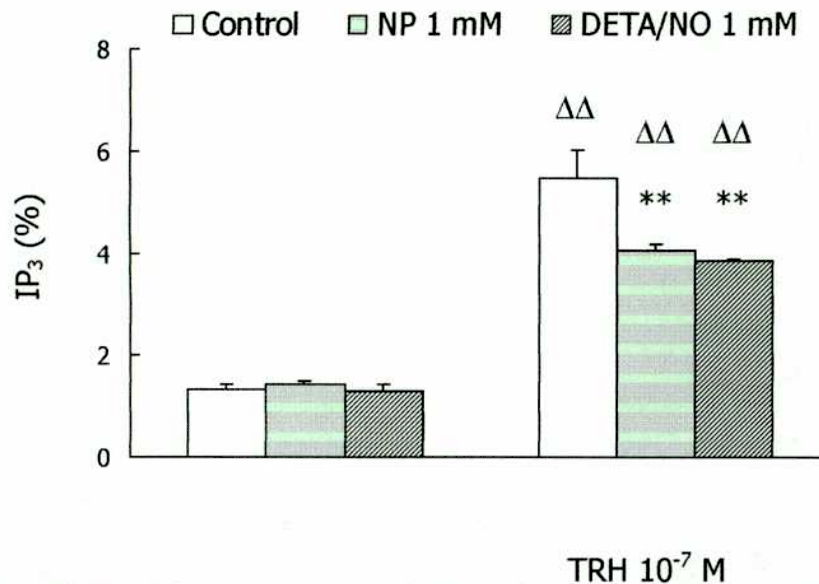


Fig. 15. Efecto del DETA/NO y el NP sobre la producción de IP₃ basal y estimulada por TRH. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron incubadas con o sin TRH 10⁻⁷ M en presencia de DETA/NO o NP durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. **p<0.01 vs control respectivo sin dador de NO, ^{ΔΔ}p<0.01 vs control respectivo sin TRH (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

Mientras que el DETA/NO disminuyó la síntesis de IPs estimulada por AngII 10⁻⁸ M, el DETA 1 mM no la modificó, demostrando la especificidad de acción del NO (Fig. 16). Se obtuvieron resultados similares cuando las células fueron estimuladas con TRH en presencia de DETA/NO y DETA (Fig. 17).

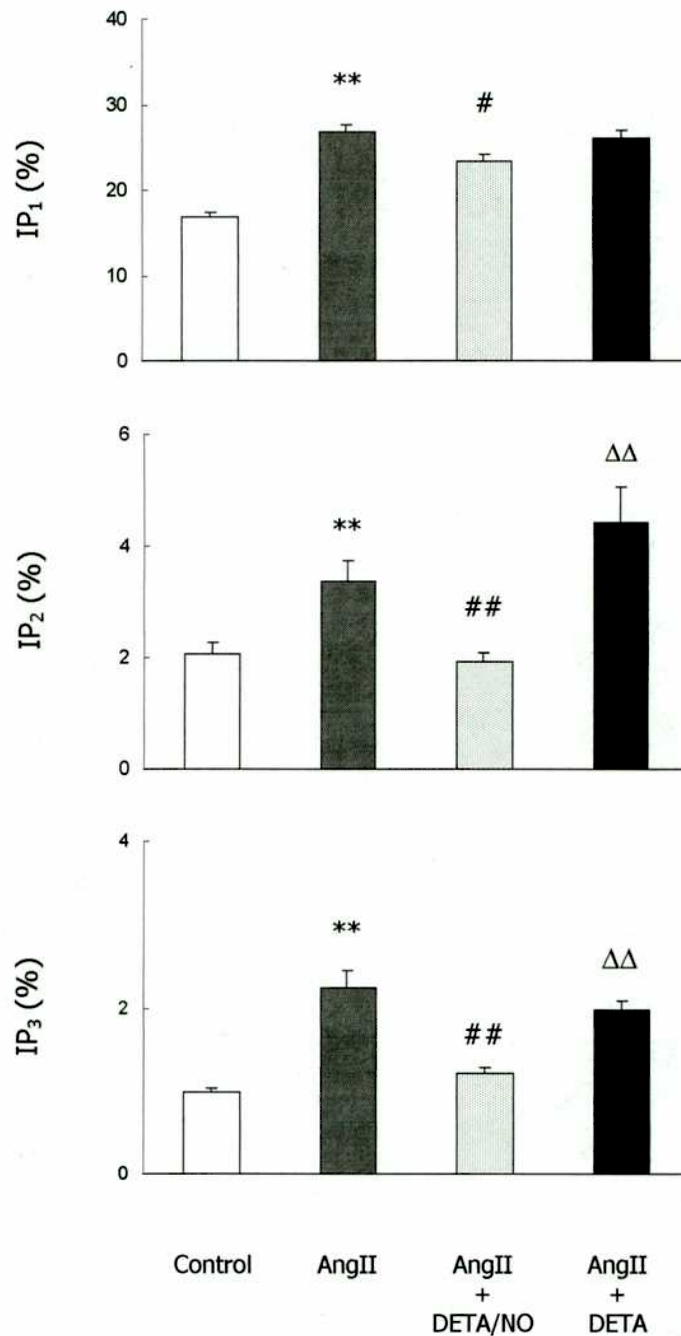


Fig. 16. El DETA NONOato decaído (incapaz de liberar NO) no afecta la síntesis de IPs estimulada por AngII. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron incubadas con AngII 10^{-8} M en presencia de DETA/NO 1 mM o DETA NONOato decaído 1 mM (DETA) durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. **p<0.01 vs control sin AngII, #p<0.05, ##p<0.01 vs AngII $\Delta\Delta$ p<0.01 vs AngII + DETA/NO (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

En otra serie de experimentos se utilizó hemoglobina como secuestrador de NO y se observó que la hemoglobina 2 μM bloqueó completamente el efecto inhibitorio del DETA/NO 1 mM sobre la síntesis de IP_3 estimulada por AngII (Fig. 18). Se obtuvieron resultados similares en condiciones de estimulación con TRH 10^{-7} M (datos no mostrados).

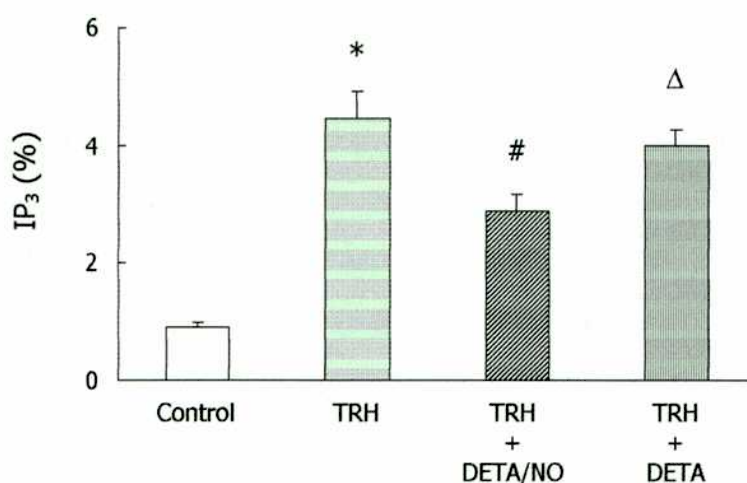


Fig. 17. El DETA NONOato decaído (incapaz de liberar NO) no afecta la síntesis de IP_3 estimulada por TRH. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron incubadas con TRH 10^{-7} M en presencia de DETA/NO 1 mM o DETA NONOato decaído 1 mM (DETA) durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), $n=6$; * $p<0.05$ vs respectivo control sin TRH, # $p<0.05$ vs respectivo control sin DETA/NO, $\Delta p<0.05$ vs TRH + DETA/NO, ANOVA seguido de la Prueba de Student Newman Keuls)

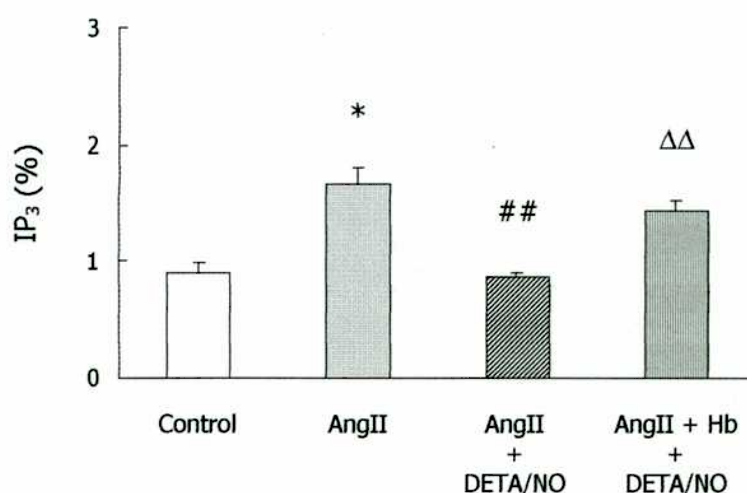


Fig. 18. Efecto de la hemoglobina sobre la disminución de la producción de IP₃ inducida por el DETA/NO. Las células adenohipofisarias premarcadas con ³H-inositol fueron incubadas con AngII 10⁻⁸ M en presencia de DETA/NO +/- hemoglobina 2 μM (Hb) durante 30 min. Las barras representan la media ± SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6; *p<0.05 vs respectivo control sin AngII, ##p<0.01 vs respectivo control sin DETA/NO, ΔΔp<0.01 vs AngII + DETA/NO, ANOVA seguido de la Prueba de Student Newman Keuls)

Asimismo, se evaluó el efecto de los dadores de NO sobre la liberación de prolactina en condiciones estimuladas. En condiciones estimuladas, tanto el DETA/NO (0.5-2.0 mM) como el NP (0.5 y 1.0 mM) revirtieron parcialmente la estimulación de la liberación de prolactina inducida por AngII 10⁻⁸ M (Tabla 4). Ninguno de los dos dadores de NO modificaron la liberación de prolactina a la concentración de 0.1 mM (Tabla 4). Como fuera demostrado en trabajos previos (Duvilanski et al., 1995, 1996; Velardez et al., 2000) y en los resultados obtenidos en la primer parte del presente trabajo para adenohipófisis enteras (Fig. 9), tanto el DETA/NO (1.0 y 2.0 mM) como el NP (0.5 y 1.0 mM) inhibieron la liberación basal de prolactina en células adenohipofisarias en cultivo (datos no mostrados y Fig. 24B).

Tabla 4. Efecto de los dadores de NO sobre la liberación de prolactina estimulada por AngII.

| | Prolactina ($\mu\text{g}/\text{well}$) |
|------------------------------------|--|
| Control | 0.316 ± 0.051 |
| AngII 10^{-8} M | $1.235 \pm 0.147^{\Delta\Delta}$ |
| AngII 10^{-8} M + DETA/NO 0.1 mM | 1.270 ± 0.095 |
| AngII 10^{-8} M + DETA/NO 0.5 mM | $0.576 \pm 0.093^{**}$ |
| AngII 10^{-8} M + DETA/NO 1.0 mM | $0.655 \pm 0.196^{**}$ |
| AngII 10^{-8} M + DETA/NO 2.0 mM | $0.690 \pm 0.057^{**}$ |
| AngII 10^{-8} M + NP 0.1 mM | 0.874 ± 0.240 |
| AngII 10^{-8} M + NP 0.5 mM | $0.533 \pm 0.132^*$ |
| AngII 10^{-8} M + NP 1.0 mM | $0.539 \pm 0.186^*$ |

Las células adenohipofisarias fueron incubadas con AngII 10^{-8} M en presencia de concentraciones crecientes de DETA/NO o NP durante 30 min. Los datos representan la media \pm SEM, n=8. $\Delta\Delta p < 0.01$ vs control respectivo sin AngII, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs control respectivo sin DETA/NO o NP (ANOVA seguido Prueba de Student Newman Keuls).

Participación de la vía de la guanilil ciclasa/cGMP/PKG en el efecto del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII

Uno de los principales mecanismos de acción del NO involucra la estimulación de la guanilil ciclasa soluble. Como consecuencia de la activación de esta enzima se produce un aumento de la concentración intracelular de cGMP generado a partir del GTP, con la consiguiente potencial activación de la PKG y otras proteínas reguladas por cGMP. Teniendo en cuenta varios trabajos que muestran una inhibición de la actividad de la PLC por parte de la PKG (Clementi et al., 1995; Xia et al., 2001), se decidió investigar la participación de la vía de la

guanilil ciclasa soluble/cGMP/PKG en el efecto del NO sobre la síntesis de IPs en condiciones estimuladas.

Como inhibidor específico de la guanilil ciclasa soluble se utilizó LY-83583. Este inhibidor, a una concentración que no modificó la síntesis de IPs tanto en condiciones basales como estimuladas (1 μ M), revirtió completamente el efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII (Fig. 19). Este resultado sugiere que la activación de dicha enzima es esencial para la manifestación del efecto del NO sobre la producción de IPs en condiciones estimuladas.

Teniendo en cuenta este resultado, se postuló que al menos el cGMP y quizás la PKG deberían estar involucrados en el efecto del NO y por lo tanto el tratamiento de las células con cGMP o con un estimulador de la PKG deberían producir un resultado similar al observado en los tratamientos con los dadores de NO. Sin embargo, cuando se utilizó 8-Br-cGMP, un análogo permeable del cGMP más resistente a la acción de las fosfodiesterasas que el cGMP, el cual mimetiza los efectos intracelulares del cGMP, o cuando se utilizó el Sp-8-pCPT-cGMPS trietilamina, un estimulador de la PKG, no se observaron modificaciones en la síntesis de IPs estimulada por AngII 10^{-8} M (Fig. 20). Reforzando estos resultados el Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina (Rp-8, 10^{-7} M), un inhibidor de la PKG, no produjo la reversión esperada del efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IP₃ en condiciones estimuladas por AngII (Fig. 21).

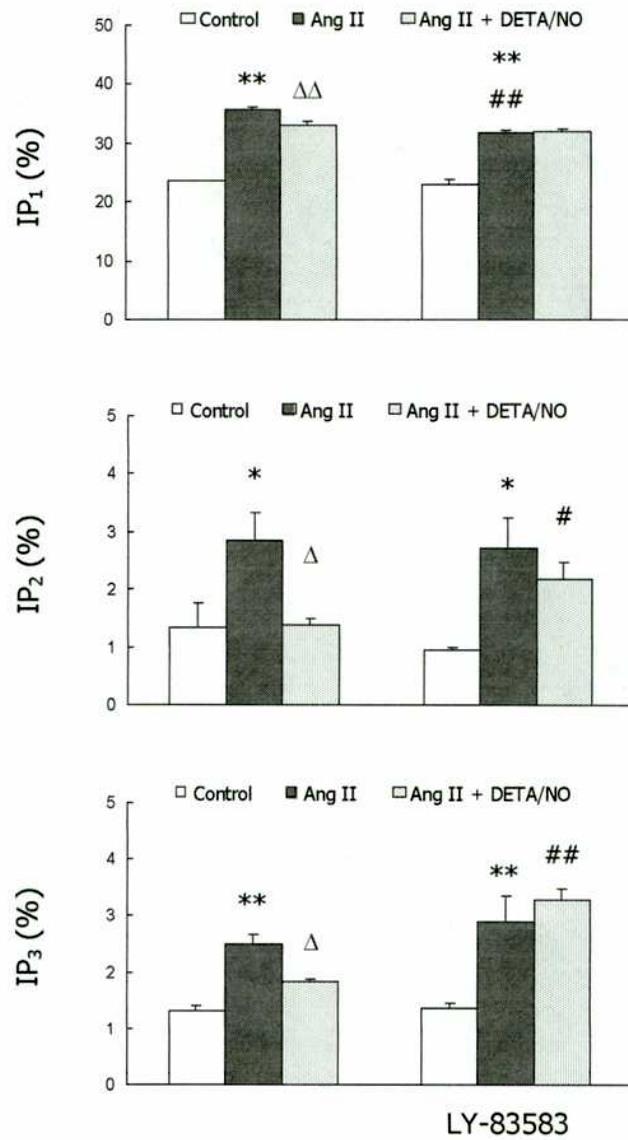


Fig. 19. Participación de la guanilil ciclasa soluble en el efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron preincubadas con o sin LY-83583 (1 μ M) durante 30 min y luego incubadas en las mismas condiciones con o sin el agregado de AngII 10^{-8} M en presencia o ausencia de DETA/NO 1 mM durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. *p<0.05, **p<0.01 vs control sin AngII, Δ p<0.05, $\Delta\Delta$ p<0.01 vs AngII, ##p<0.01 vs control respectivo sin LY-83583 (ANOVA seguido de Prueba de Student-Newman-Keuls).

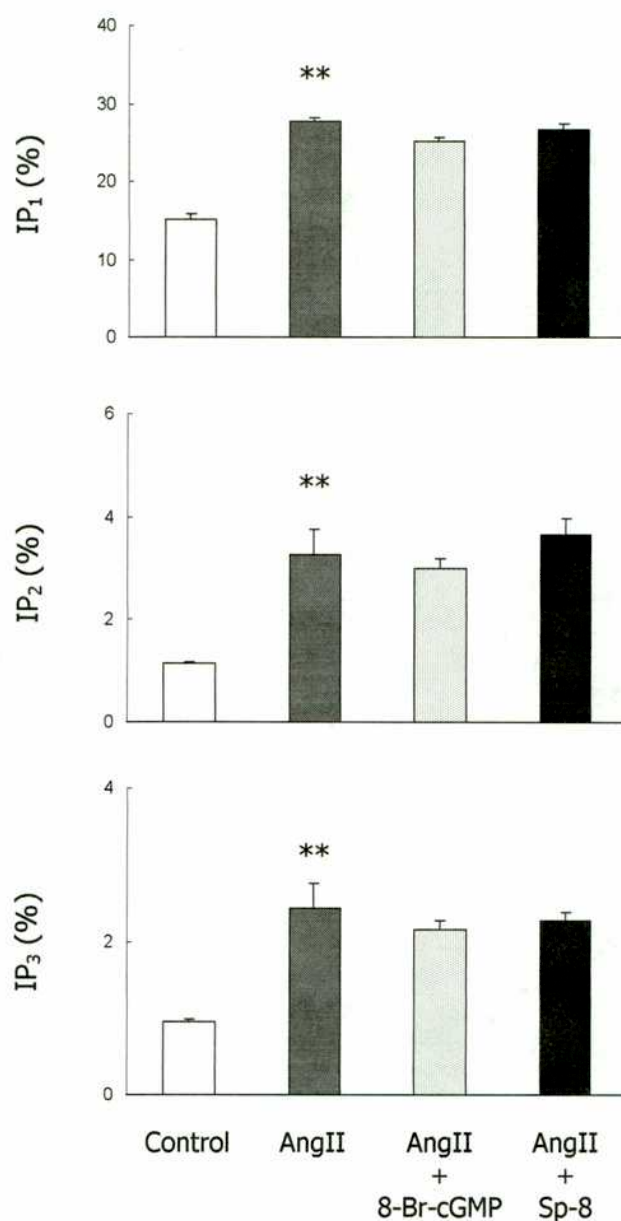


Fig. 20. Papel del cGMP y la PKG en el efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron incubadas con o sin AngII 10^{-8} M en presencia de 8-Br-cGMP (10^{-4} M) o Sp-8-pCPT-cGMPS trietilamina (Sp-8, 10^{-7} M) durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. **p<0.01 vs control sin AngII (ANOVA seguido de Prueba de Student-Newman-Keuls).

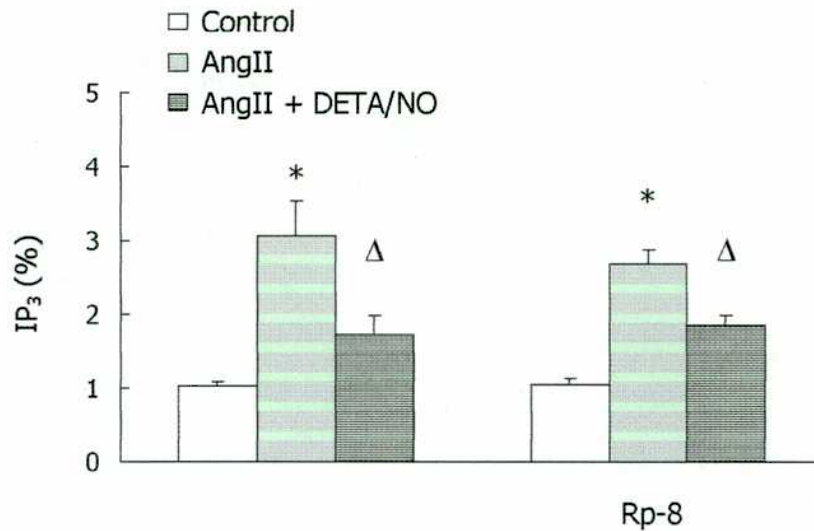


Fig. 21. Efecto del Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina, un inhibidor de la PKG, sobre la disminución de la síntesis de IP_3 inducida por DETA/NO. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol fueron preincubadas con o sin Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina (Rp-8, 10^{-7} M) durante 30 min y luego incubadas en las mismas condiciones con o sin el agregado de AngII 10^{-8} M en presencia de DETA/NO 1 mM durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), $n=6$; * $p<0.05$ vs control respectivo sin AngII, $^{\Delta}p<0.05$ vs control respectivo sin DETA/NO (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

En nuestro sistema, la reversión por parte del LY-83583 del efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs en condiciones estimuladas por AngII se contradice con los resultados obtenidos con el análogo de cGMP y los reguladores de la PKG (comparar Fig. 19-21). Esto hace pensar en la posibilidad de que dicha reversión del efecto del NO podría deberse a una acción propia del LY-83583 en donde este inhibidor podría estar modificando la respuesta de la vía de la PLC al NO. Hasta la fecha, al menos un trabajo describe un efecto

estimulador del LY-83583 sobre la hidrólisis de PIP_2 y la producción de diacilglicerol e IP_3 en una línea tumoral de células hepáticas, sugiriendo que el LY-83583 podría activar la PLC (Prasad et al., 1999). Si el LY-83583 tuviese alguna acción sobre la vía de la PLC, podría postularse que el efecto del NO sobre la producción de IPs es independiente de la vía del cGMP/PKG. Sin embargo en nuestras condiciones experimentales el LY-83583 no modificó por sí mismo la síntesis de IPs, aún a una concentración de $10 \mu M$ (datos no mostrados). Por el contrario, si el efecto inhibitorio del NO es verdaderamente dependiente de la actividad de la guanilil ciclasa soluble como indica el resultado con LY-83583 (Fig 19), otro estimulador de la guanilil ciclasa soluble (diferente del NO) debería disminuir la síntesis de IPs en condiciones estimuladas por AngII.

Con el objeto de comprobar esta posibilidad, se utilizó el BAY 41-2272, un nuevo estimulador de la actividad de guanilil ciclasa soluble el cual parece no poseer efectos inespecíficos como otros estimuladores conocidos hasta el momento (Stasch et al., 2001). Dado que la acción de este compuesto no había sido caracterizada en adenohipófisis, en primer término, se determinó su capacidad para estimular la actividad de guanilil ciclasa en células adenohipofisarias de rata en cultivo. Como puede observarse en la Tabla 5, el BAY 41-2272 (10^{-6} - 10^{-5} M) aumentó entre 5 y 6 veces la concentración de cGMP. Este nuevo estimulador, a una concentración de 10^{-5} M resultó ser 3.5-4 veces más potente que el NP y el DETA/NO para activar la guanilil ciclasa (Tabla 5).

Una vez comprobado que el BAY 41-2272 estimula la síntesis de cGMP en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata, se procedió a evaluar su acción sobre la actividad de PLC tanto en condiciones basales como estimuladas. El BAY 41-2272 no modificó la producción de IP_3 en condiciones basales ni en condiciones estimuladas por AngII 10^{-8} M (Fig. 22). Este resultado indica que el efecto inhibitorio del NO se llevaría a cabo de una manera independiente de la vía guanilil ciclasa soluble/cGMP.

Tabla 5. Efecto de los dadores de NO y un estimulador de guanilil ciclasa soluble sobre la producción cGMP en células adenohipofisarias de rata.

| Tratamiento | cGMP (pmol/well) |
|--------------------------------|------------------|
| Control | 2.10 ± 0.06 |
| NP 1mM | 3.15 ± 0.42* |
| DETA/NO 1 mM | 3.51 ± 0.14* |
| BAY 41-2272 10 ⁻⁶ M | 10.03 ± 1.38** |
| BAY 41-2272 10 ⁻⁵ M | 12.24 ± 2.66** |

Las células fueron incubadas con NP, DETA/NO o BAY 41-2272 durante 60 min en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato pH 7.35. Los valores representan la media ± SEM, n=8. *p<0.05, ** p<0.01 vs control (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

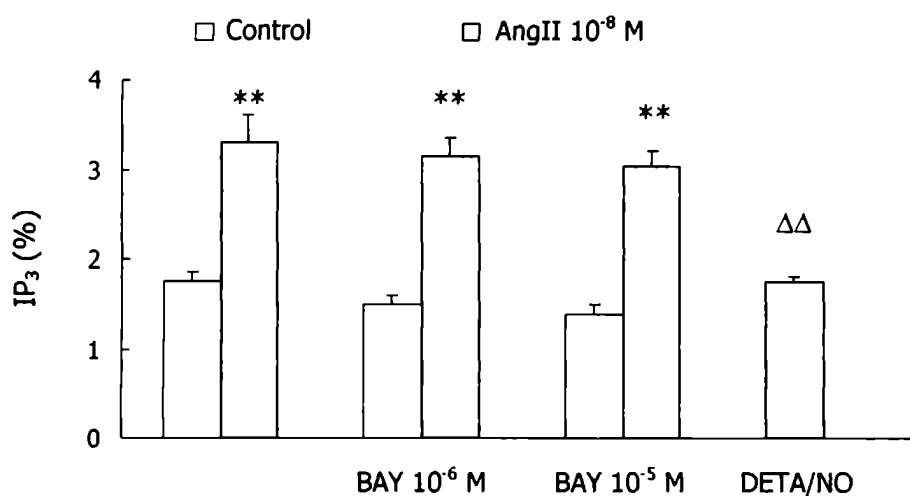


Fig. 22. Efecto del BAY 41-2272, un estimulador de la guanilil ciclasa soluble, sobre la síntesis de IP₃ estimulada por AngII. Las células adenohipofisarias fueron incubadas en presencia de AngII 10⁻⁸ M con o sin DETA/NO 1 mM o BAY 41-2272 (BAY, 10⁻⁶-10⁻⁵ M) durante 30 min. Las barras representan la media ± SEM (% de la radioactividad incorporada), n=6. **p<0.01 vs control respectivo sin AngII, ^{ΔΔ}p<0.01 vs control respectivo sin DETA/NO o BAY 41-2272 (ANOVA seguido de Prueba de Student-Newman-Keuls). En los grupos que contenían BAY 41-2272, éste estuvo presente desde el momento de la preincubación de 30 min.

Sobre la base de estos resultados, se llevó a cabo una aproximación experimental con el fin de evaluar la posibilidad de que el NO estuviera inhibiendo directamente la actividad de PLC. Dado que los receptores acoplados a PLC actúan a través de proteínas G del tipo α_q/α_{11} , se utilizó un análogo no hidrolizable del GTP, el GTP γ S, el cual estimula preferencialmente a las proteínas G. De esta manera, si el NO estuviera inhibiendo directamente a la PLC, en presencia del activador de proteínas G, los dadores de NO deberían ser igualmente capaces de disminuir la actividad de síntesis de IPs. Por el contrario, si la acción del NO se llevara a cabo en algún punto entre el receptor y las proteínas G, el GTP γ S debería impedir el efecto de los dadores de NO.

El GTP γ S aumentó la concentración de los IPs de manera dependiente de la concentración en células permeabilizadas con digitonina, llegando a un máximo de estimulación a una concentración de 1 μ M (dato no mostrado). En presencia de GTP γ S 1 μ M, la AngII 10^{-8} M produjo un ligero aumento de la síntesis de IPs y el DETA/NO 1 mM no fue capaz de modificar el efecto del GTP γ S solo ni el de GTP γ S más AngII sobre la síntesis de IPs (Fig. 23).

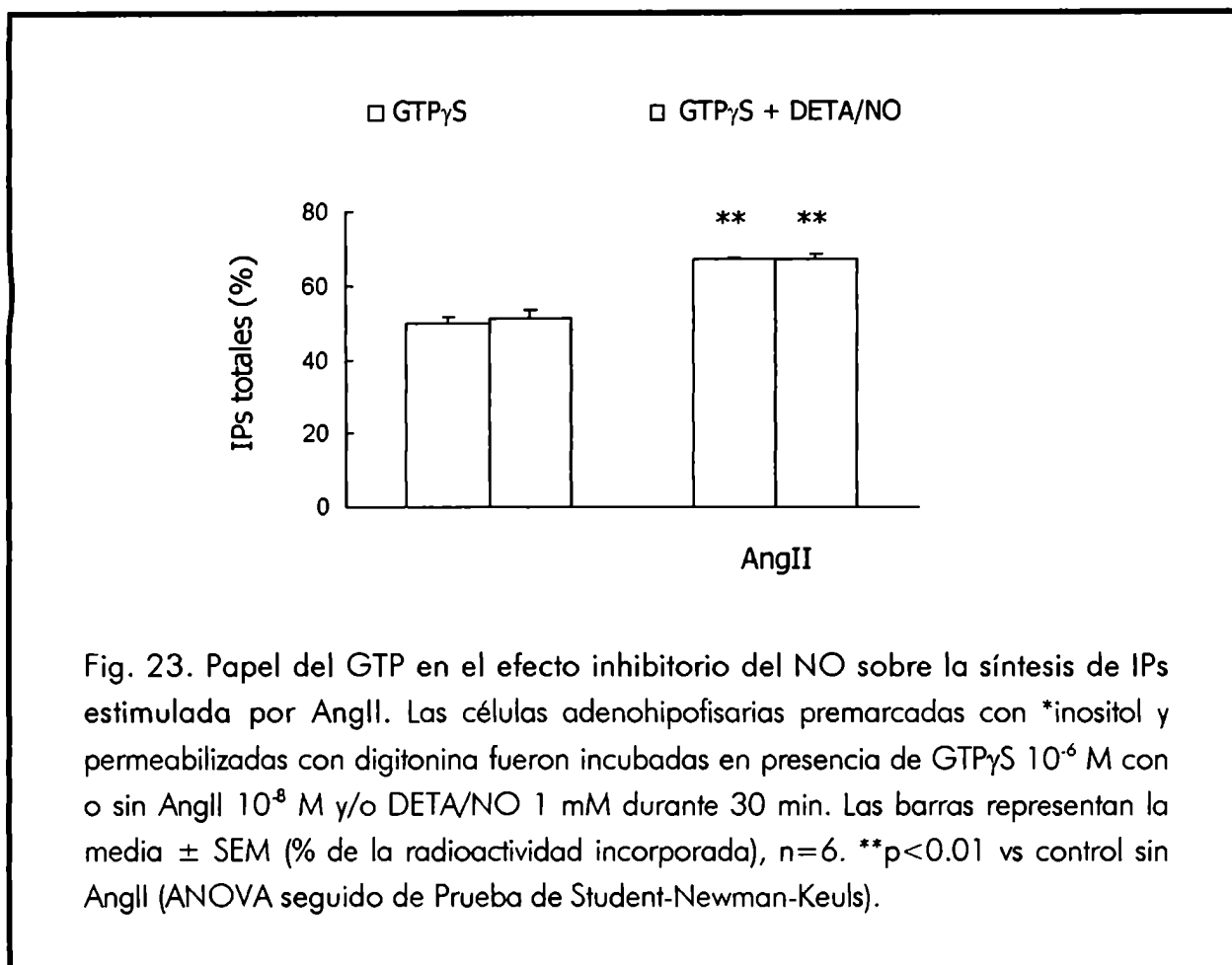


Fig. 23. Papel del GTP en el efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs estimulada por AngII. Las células adenohipofisarias premarcadas con *inositol y permeabilizadas con digitonina fueron incubadas en presencia de GTP γ S 10^{-6} M con o sin AngII 10^{-8} M y/o DETA/NO 1 mM durante 30 min. Las barras representan la media \pm SEM (% de la radioactividad incorporada), $n=6$. ** $p<0.01$ vs control sin AngII (ANOVA seguido de Prueba de Student-Newman-Keuls).

Estos resultados en conjunto indican que el NO disminuye la síntesis de IPs en condiciones de estimulación con AngII y TRH. El efecto inhibitorio del NO sobre la producción de IPs parece ser independiente de la vía guanilil ciclasa soluble/cGMP/PKG. Además, el efecto del NO se llevaría a cabo por la modificación de la vía de transducción de señales de la PLC en algún punto localizado entre el receptor de membrana y la proteína G.

3. Estudio del efecto del NO sobre la viabilidad de las células adenohipofisarias de rata

El NO es un regulador importante del proceso de muerte celular programada. El NO puede tener efectos pro o antiapoptóticos dependiendo de diversos factores como la concentración y el tiempo de exposición (Beltram et al., 2000; Dimmeler & Zeiher, 2000; Shen et al., 1998). Aunque existen diferentes mecanismos por los cuales el NO ejerce un efecto proapoptótico, éstos varían dependiendo del tejido y de las condiciones fisiológicas del mismo. Sin embargo, dicho efecto parece ser independiente de la activación de la guanilil ciclasa soluble (Brüne et al., 1996) e involucraría la producción de otras especies reactivas del nitrógeno como los peroxinitritos (Brown & Borutaite, 2001). El NO puede ejercer sus efectos estimulando las distintas vías de señales de muerte, llevando a cambios morfológicos y ultraestructurales propios de la apoptosis.

En la adenohipófisis, no se ha investigado aún el papel del NO sobre la viabilidad celular. Es por eso que el objetivo de este estudio fue:

Investigar el efecto pro o anti apoptótico del NO en células adenohipofisarias de rata.

En estos estudios se evaluaron el efecto de los dadores de NO sobre la actividad celular y la morfología nuclear. Asimismo, se estudió si el efecto del NO sobre la viabilidad celular es dependiente de la capacidad nitrosilante del propio NO, la acción de los peroxinitritos o la activación de las caspasas. Además, mediante técnicas inmunocitoquímicas, se determinaron los tipos celulares afectados por el NO.

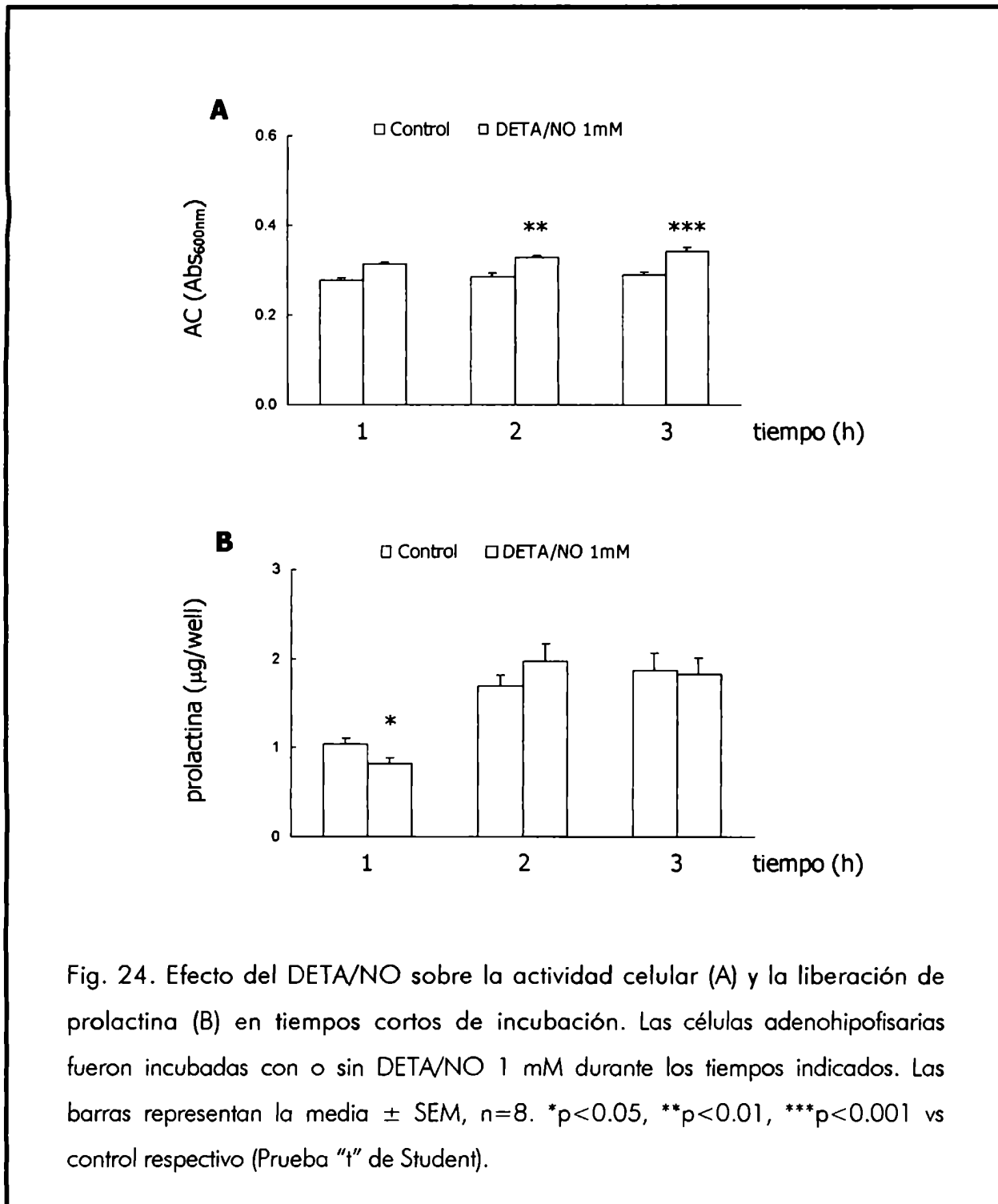
Efecto del DETA/NO sobre la actividad celular adenohipofisaria

En base a los datos previos del efecto del NO sobre la actividad secretoria de las células adenohipofisarias y teniendo en cuenta el tiempo de vida media de los dadores de NO en soluciones acuosas, en el presente estudio se

utilizó DETA/NO 1 mM como dador de NO. Se realizaron incubaciones durante tiempos cortos y largos con el dador de NO (1-72 h). En las incubaciones de 1 h con DETA/NO no se observaron cambios en la actividad celular (Fig. 24A). El DETA/NO produjo un aumento de la actividad celular adenohipofisaria cuando los tratamientos se extendieron de 2 a 12 h (Fig. 24A y 25A), mientras que no se observaron cambios en la actividad celular en las incubaciones de 24 h (Fig. 25A). En cambio, luego de 48 h de incubación con el dador de NO se observó una disminución muy marcada de la actividad celular adenohipofisaria (Fig. 25A).

En los mismos experimentos se cuantificó la liberación de prolactina. La exposición de las células al dador de NO durante 1 h produjo una disminución de la liberación de prolactina (Fig. 24B). Este resultado concuerda con los resultados previos de nuestro laboratorio en incubaciones de adenohipófisis enteras durante 1 h con dadores de NO (Duvilanski et al., 1995, 1996; Velardez et al., 2000). Dicho efecto inhibitorio no se observó en las incubaciones de 2 y 3 h en presencia del DETA/NO (Fig. 24B y 25B). En cambio, a partir de 6 h de exposición al NO, se observó una disminución significativa de la liberación de prolactina que se acentuó en los tiempos de incubación más prolongados (Fig. 25B).

Una vez establecido el tiempo de incubación óptimo para la evaluación del efecto citotóxico del NO (48 h), se realizó una curva de concentración de DETA/NO. En incubaciones de 48 h, el DETA/NO disminuyó la actividad celular adenohipofisaria a concentraciones de 0.5 y 1.0 mM, mientras que no se observaron modificaciones con una concentración de 0.1 mM (Fig 26). Una vez más, para descartar efectos inespecíficos de la molécula dadora de NO, se realizaron incubaciones en presencia DETA NONOato decaído (DETA). El DETA 1 mM no modificó la actividad celular en incubaciones de 48 h (Fig. 27A), lo cual demuestra la especificidad de acción del NO. En los mismos experimentos se evaluó la liberación de prolactina, la cual tampoco fue afectada por el DETA 1 mM (Fig. 27B).



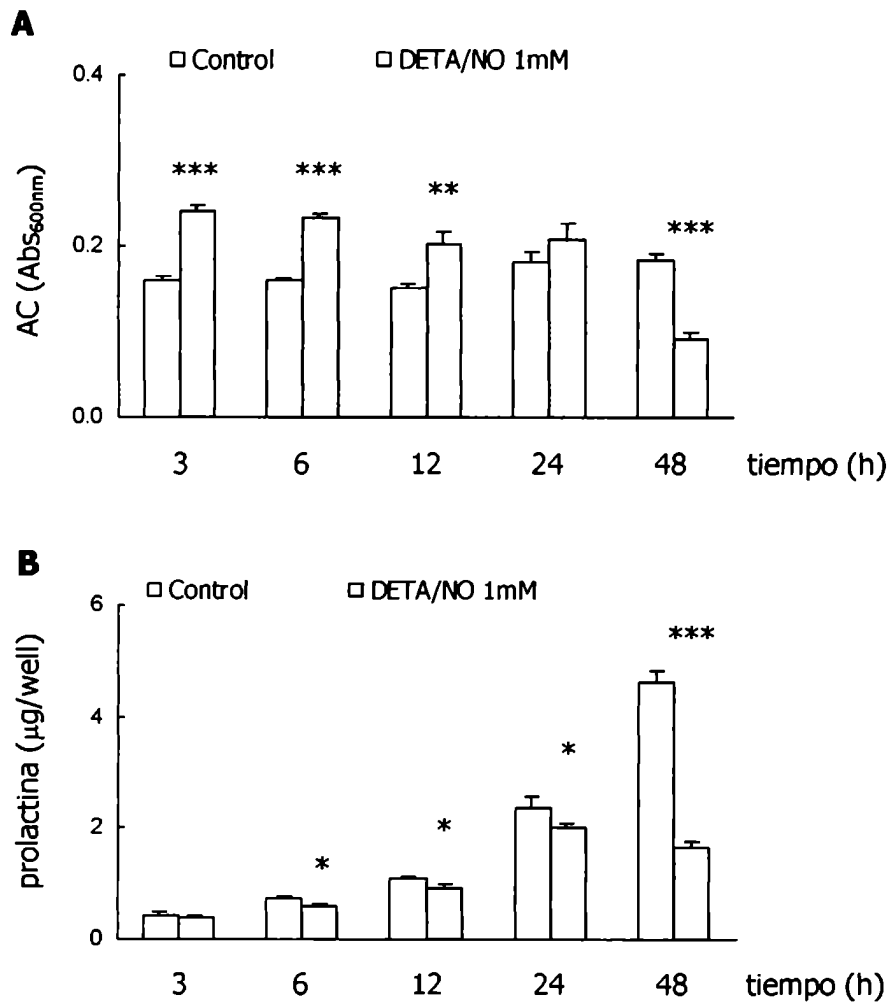


Fig. 25. Efecto del DETA/NO sobre la actividad celular (A) y la liberación de prolactina (B) en tiempos prolongados de incubación. Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin DETA/NO 1 mM durante los tiempos indicados. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control respectivo (Prueba "t" de Student).

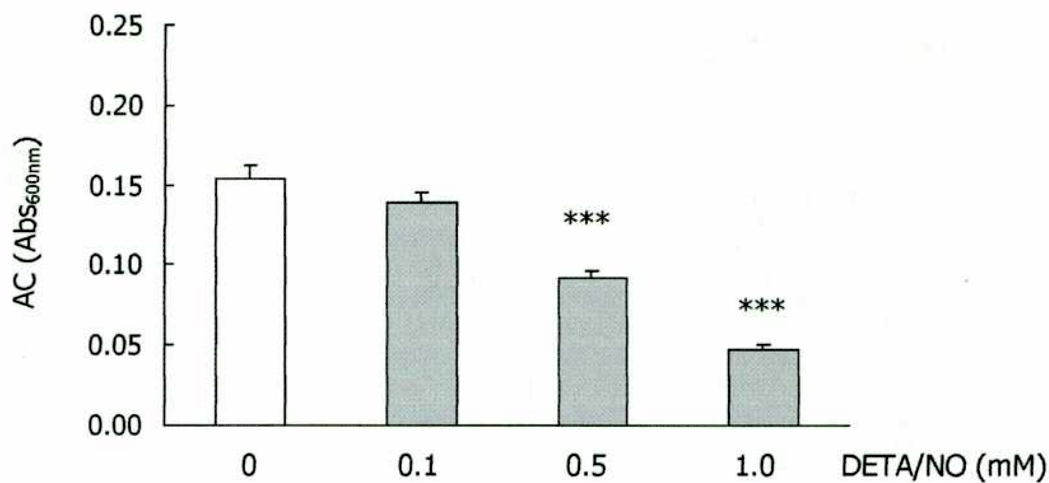


Fig. 26. Efecto del DETA/NO en concentraciones crecientes sobre la actividad celular. Las células adenohipofisarias fueron incubadas con DETA/NO en concentraciones crecientes durante 48 h. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. ***p<0.001 vs control (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

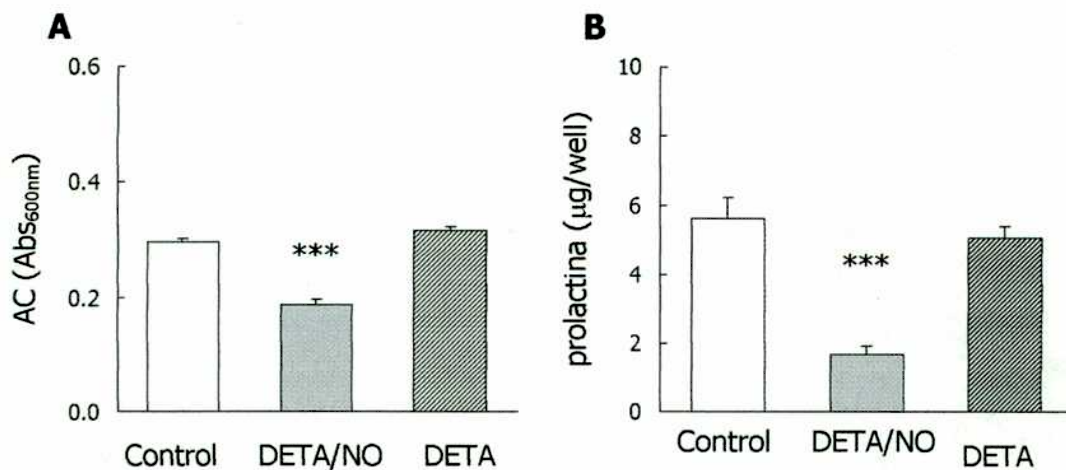


Fig. 27. El DETA NONOato sin capacidad de liberar NO no afectó la actividad celular (A) ni la liberación de prolactina (B). Las células adenohipofisarias fueron incubadas con DETA/NO 1 mM o DETA 1 mM durante 48 h. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. ***p<0.001 vs control (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

Hasta aquí los resultados muestran que el efecto citotóxico del NO sólo se manifestó cuando el tiempo de exposición con DETA/NO fue igual o mayor a 48 h (se evaluaron también incubaciones de 72 h, datos de actividad celular, Abs_{600nm} , Control: 0.149 ± 0.005 , DETA/NO 1 mM: 0.008 ± 0.003 , $n=8$, $p<0.001$, Prueba "t" de Student). Teniendo en cuenta que la liberación de NO producida por DETA/NO 1 mM en una solución acuosa a pH fisiológico se mantiene por alrededor de 20 h, se decidió determinar el tiempo mínimo de exposición al DETA/NO necesario para que se manifieste el efecto citotóxico del NO, el cual fue evaluado a las 48 h de comenzado el experimento. Además se investigó la reversibilidad del proceso de muerte desencadenado por el NO. En esta serie de experimentos se incubaron las células por periodos de 3 a 48 h con DETA/NO 1 mM y al cabo de cada uno de los tiempos de incubación se cambió el medio por DMEM-S-10% FBS y se continuaron las incubaciones hasta completar las 48 h. En estas condiciones de experimentación, el DETA/NO 1 mM disminuyó la actividad celular adenohipofisaria cuando el tiempo de exposición fue igual o mayor a 6 h (Fig. 28A). No se observaron cambios en la actividad celular en incubaciones de 3 h con DETA/NO 1 mM (Fig. 28A). En la misma serie de experimentos se cuantificó la prolactina liberada (correspondiente a los periodos post-cambio de medio) y se observó que el DETA/NO 1 mM disminuyó marcadamente la liberación de esta hormona cuando las células fueron incubadas por 6 o más horas (Fig. 28B).

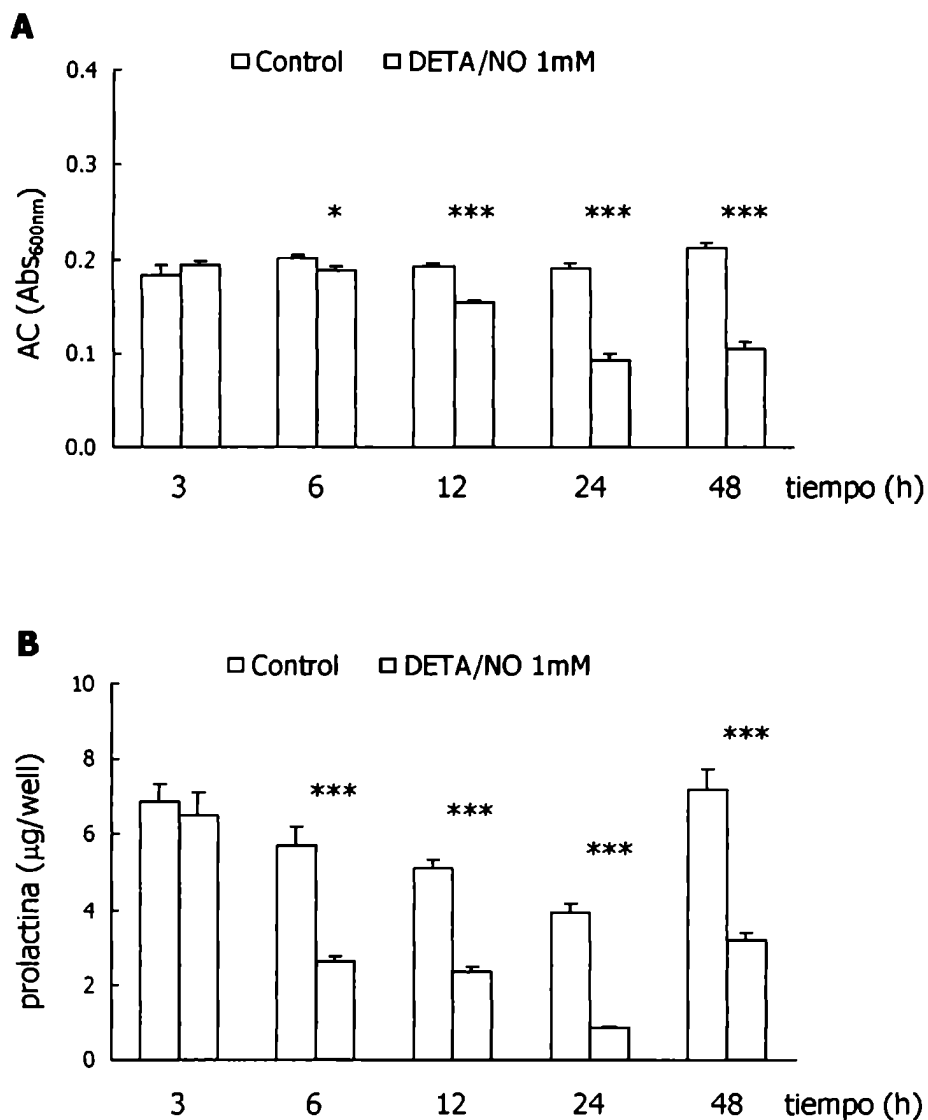


Fig. 28. Determinación del tiempo mínimo de exposición a NO para producir una disminución de la actividad celular (A) y la liberación de prolactina (B). Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin DETA/NO 1 mM durante los tiempos indicados y luego incubadas en DMEM-S-10% FBS hasta completar 48 h. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs control respectivo (Prueba "t" de Student).

Análisis morfológico e identificación del tipo celular afectado por el NO

En una serie de experimentos realizados en paralelo con los diseñados para la medición de actividad celular, se examinó si el efecto citotóxico del DETA/NO era el resultado de la inducción de un proceso apoptótico o necrótico. Como puede observarse en la figura 29, el DETA/NO 1 mM produjo la aparición de cambios morfológicos nucleares característicos de procesos apoptóticos (fragmentación y condensación cromatínica). Raramente se observaron células necróticas y su número, en las ocasiones en que fueron cuantificables, fue similar en los grupos Control y DETA/NO 1 mM (datos no mostrados). Aunque a partir de 12 h de incubación con DETA/NO 1 mM se comenzaron a observar cambios a nivel nuclear de las células adenohipofisarias, estos cambios morfológicos se manifestaron claramente a partir de las 24 h de incubación y el porcentaje de células apoptóticas fue similar en las células tratadas durante 24 y 48 h con el dador de NO (Tabla 6).

Tabla 6. El DETA/NO induce cambios morfológicos nucleares característicos de la apoptosis. Cuantificación de núcleos.

| Grupo | Control | DETA/NO 24 h | DETA/NO 48 h |
|---------------------|--------------|---------------|---------------|
| Núcleos normales | 99.7 ± 0.1 % | 88.4 ± 0.5 %* | 91.8 ± 0.6 %* |
| Núcleos Apoptóticos | 0.2 ± 0.1 % | 10.6 ± 0.9 %* | 8.1 ± 0.4 %* |

Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin DETA/NO 1 mM durante los tiempos indicados. Los datos representan la media ± SEM, n=5-6.
*p<0.05 vs control respectivo (ANOVA seguido de Prueba de Dunnett).

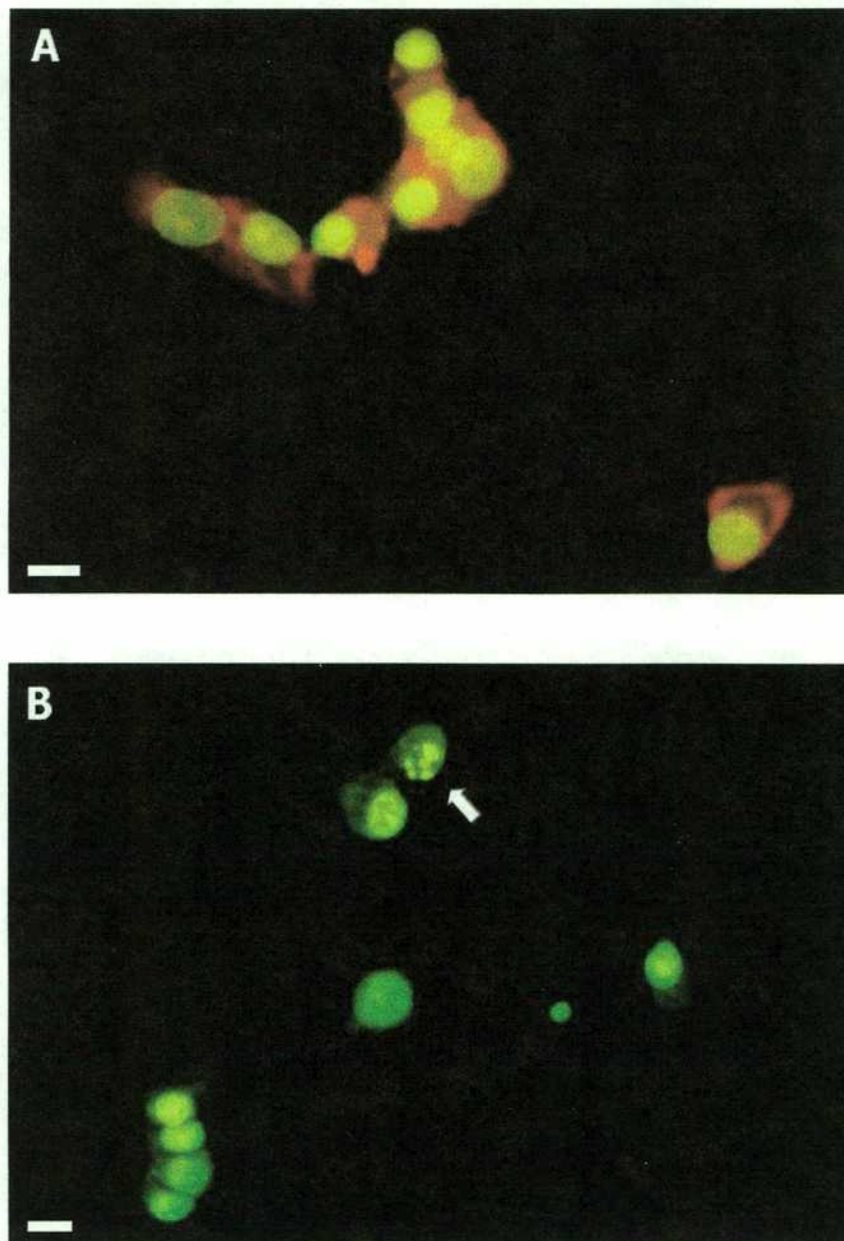


Fig. 29. El DETA/NO induce cambios morfológicos nucleares característicos de la apoptosis. Las células adenohipofisarias fueron incubadas en medio solo (A) o con DETA/NO 1 mM (B) durante 48 h. En los cultivos tratados con DETA/NO se observaron células con condensación y fragmentación cromatínica (flecha). Tinción: naranja de acridina/bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ c/u). Barra=10 μm .

Una vez demostrado que el DETA/NO 1 mM producía la aparición de morfología nuclear apoptótica, se procedió a la determinación del/os tipo/s celular/es afectado/s. Para ello se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos dirigidos contra diferentes hormonas adenohipofisarias seguido de una tinción de los núcleos con el objeto de cuantificar el número de células con morfología nuclear apoptótica pertenecientes a cada tipo celular adenohipofisario (Fig. 30). Como puede observarse en la Tabla 7, el 50% del total de células apoptóticas resultaron ser lactotrofos.

Tabla 7. Identificación de los tipos celulares con morfología nuclear apoptótica.

| Grupo | DETA/NO 48 h |
|------------------------------|--------------|
| Lactotrofos | 49.8 ± 1.1 % |
| Gonadotrofos | 7.5 ± 0.7 % |
| Somatotrofos | 1.8 ± 0.3 % |
| Tirotrofos | 1.4 ± 0.4 % |
| Células Folículo Estrelladas | 1.7 ± 0.2 % |
| Corticotrofos | N/D |

Las células adenohipofisarias fueron incubadas con DETA/NO 1 mM durante 48 h y al finalizar las incubaciones fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra las distintas hormonas adenohipofisarias o contra la proteína S-100 (células folículo estrelladas). Los datos representan la media ± SEM, n=3-4. N/D=no determinado.

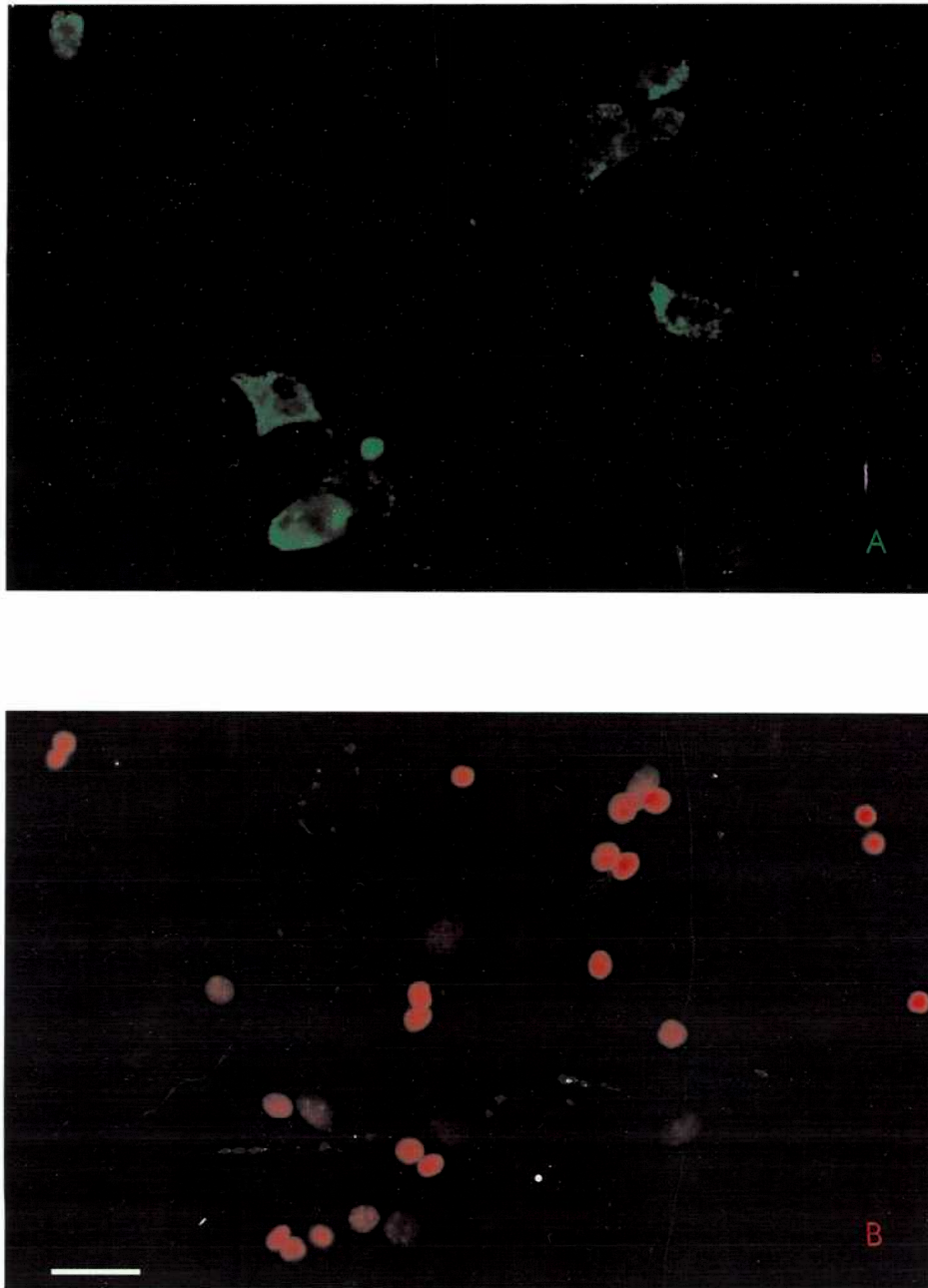


Fig. 30. Identificación de los tipos celulares afectados por el NO. Las células adenohipofisarias fueron incubadas en medio solo (A,B) o con DETA/NO 1 mM (C,D en la página siguiente) durante 48 h. Las células fijadas fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra prolactina (A,C) y se realizó una coloración de contraste de los núcleos con ioduro de propidio (B,D). En los cultivos tratados con DETA/NO se observaron células con condensación y fragmentación cromatínica tanto inmunopositivas (flecha), como negativas (cabeza de flecha) para prolactina. Barra=30 μ m.

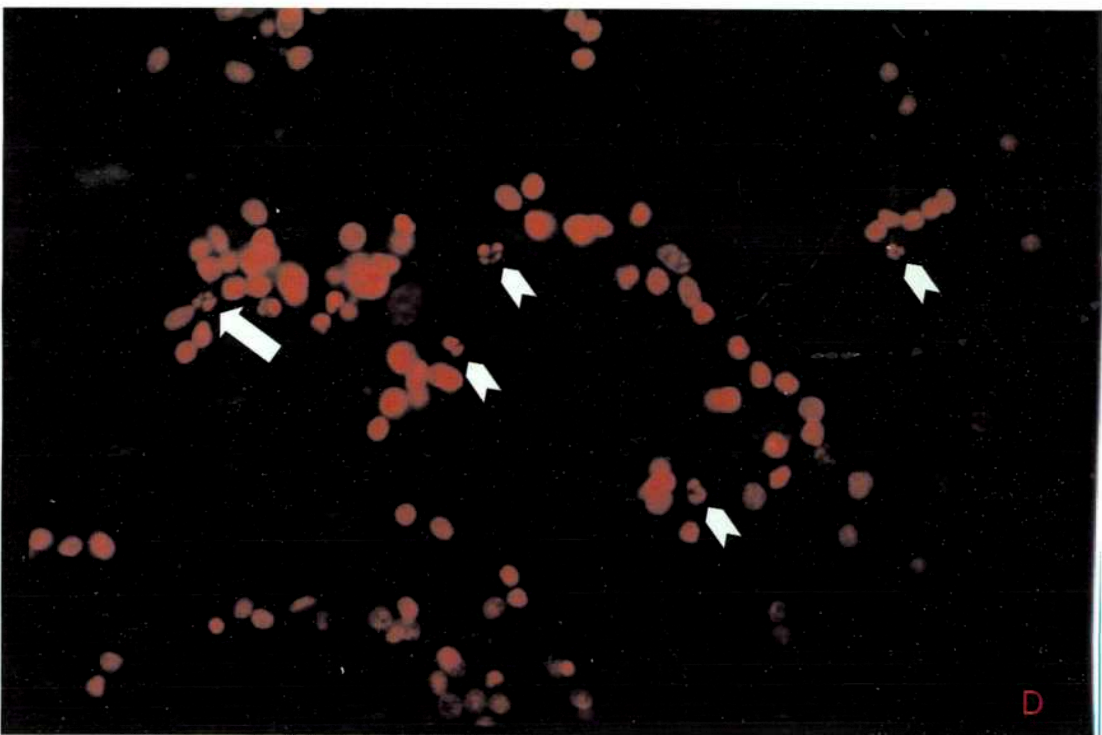
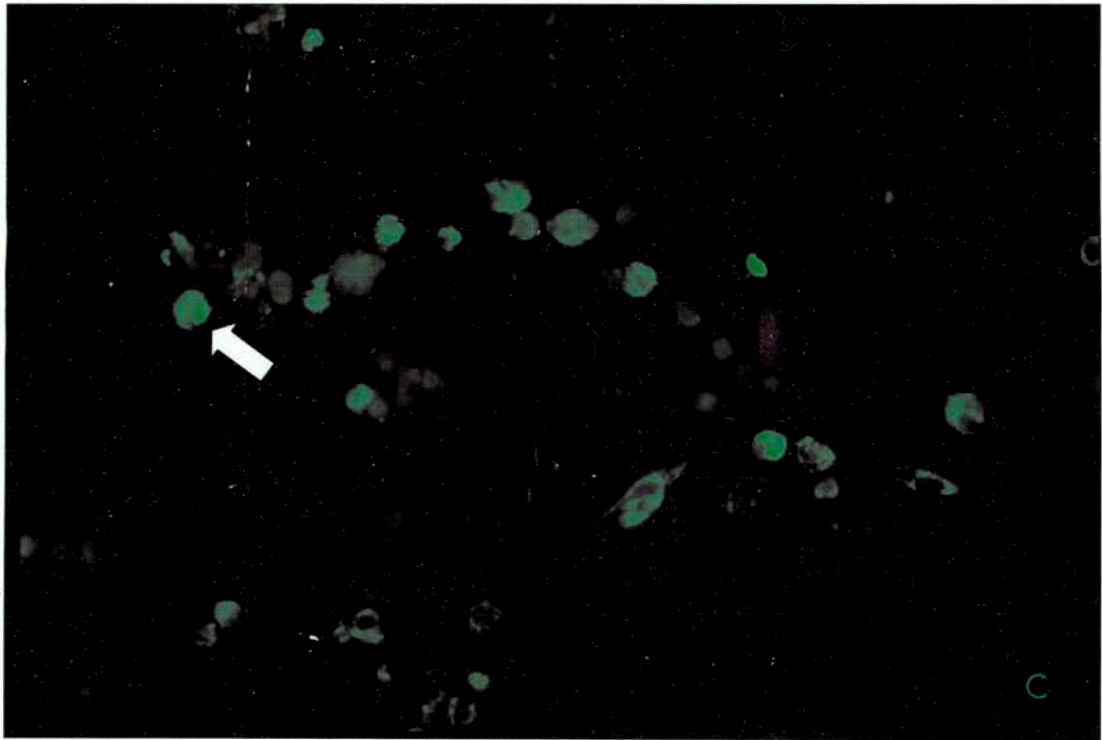


Fig. 30. Continuación.

Participación de las caspasas en el efecto citotóxico del NO

Con el objetivo de determinar la participación de las caspasas en el efecto del NO sobre la viabilidad celular adenohipofisaria, se realizaron incubaciones con DETA/NO 1 mM en presencia de inhibidores de las caspasas de los tipos 3 y 9. Ambos inhibidores revirtieron parcialmente la disminución de la actividad celular adenohipofisaria inducida por el DETA/NO 1 mM en incubaciones de 24 h y evaluada a las 48 h (Fig. 31). Sin embargo, en estas condiciones, los inhibidores de caspasas no revirtieron la aparición de la morfología nuclear apoptótica producida por el DETA/NO 1 mM en incubaciones de 24 h (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la aparición de morfología nuclear apoptótica inducida por el DETA/NO.

| Grupo | % núcleos apoptóticos |
|---|-----------------------|
| Control | 0.91 ± 0.25 |
| DETA/NO 1 mM | 6.20 ± 0.11* |
| Ac-LEHD-CHO 10 ⁻⁶ M | 1.11 ± 0.36 |
| Ac-LEHD-CHO 10 ⁻⁶ M + DETA/NO 1 mM | 7.76 ± 1.77* |
| Ac-DEVD-CHO 10 ⁻⁶ M | 1.34 ± 0.61 |
| Ac-DEVD-CHO 10 ⁻⁶ M + DETA/NO 1 mM | 5.15 ± 0.95* |

Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin inhibidor de caspasa-9 (Ac-LEHD-CHO) o caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) y/o DETA/NO durante 24 h y luego incubadas en DMEM-S-10% FBS hasta completar 48 h. Los datos representan la media ± SEM, n=4. *p<0.05, vs control respectivo sin DETA/NO, (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

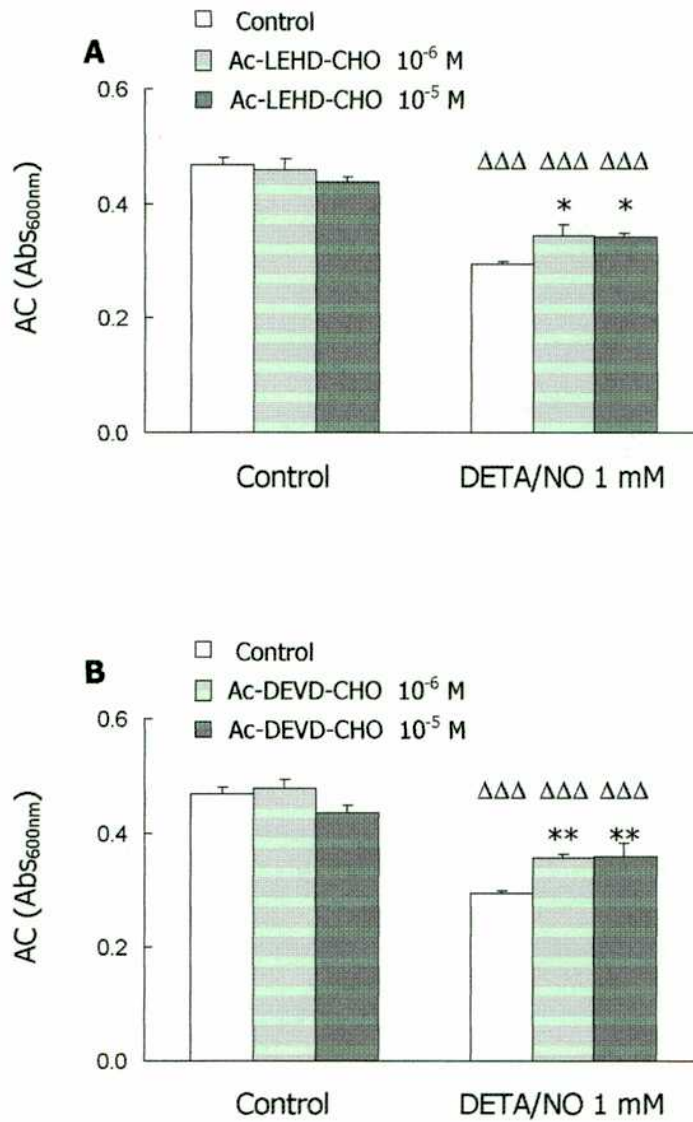


Fig. 31. Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la disminución de la actividad celular inducida por el DETA/NO. Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin inhibidor de caspasa-9 (Ac-LEHD-CHO) (A) o caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) (B) en concentraciones crecientes y/o DETA/NO durante 24 h y luego incubadas en DMEM-S-10% FBS hasta completar 48 h. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. *p<0.05, **p<0.01 vs control respectivo sin inhibidor, ^{***}p<0.001 vs control respectivo sin DETA/NO (ANOVA seguido de Prueba de Student Newman Keuls).

Participación de los peroxinitritos y los eventos de nitrosilación en el efecto citotóxico del NO

El NO puede producir nitrosilación de las proteínas, afectando la actividad de diversas enzimas implicadas en procesos de muerte celular. Por otro lado el NO es capaz de reaccionar con el anión O_2^- para formar $ONOO^-$ que pueden producir un efecto citotóxico actuando tanto a nivel mitocondrial como a nivel del DNA. Por consiguiente, se evaluó la participación de ambos procesos (nitrosilación y acción de los $ONOO^-$) en el efecto citotóxico del NO sobre las células adenohipofisarias. Para ello se utilizaron N-acetil-cisteína como bloqueante del efecto nitrosilante del NO y TROLOX[®] como un bloqueante de la acción de los $ONOO^-$.

En los experimentos realizados para evaluar la participación de la acción nitrosilante del NO como desencadenante del proceso de muerte celular programada en las células adenohipofisarias de rata, se realizaron curvas de tiempo desde 12 hasta 48 h de exposición con DETA/NO 1 mM en presencia de N-acetil-cisteína 10 mM. Además se realizaron variaciones en los protocolos de incubación los cuales constaron de tiempos de preincubación con N-acetil-cisteína, incubaciones por los tiempos correspondientes (12-48 h) y cambios de medio con el agregado de N-acetil-cisteína 10 mM hasta llegar a las 48 h. A pesar de los distintos protocolos utilizados, la N-acetil-cisteína 10 mM no bloqueó el efecto citotóxico del NO (Fig. 32). La N-acetil-cisteína 10 mM tampoco afectó la actividad celular por sí misma.

El TROLOX[®] 0.1 mM no afectó la actividad celular por sí mismo y no fue capaz de revertir la disminución de la actividad celular adenohipofisaria producida por el DETA/NO 1 mM en incubaciones de 48 h (Fig. 33).

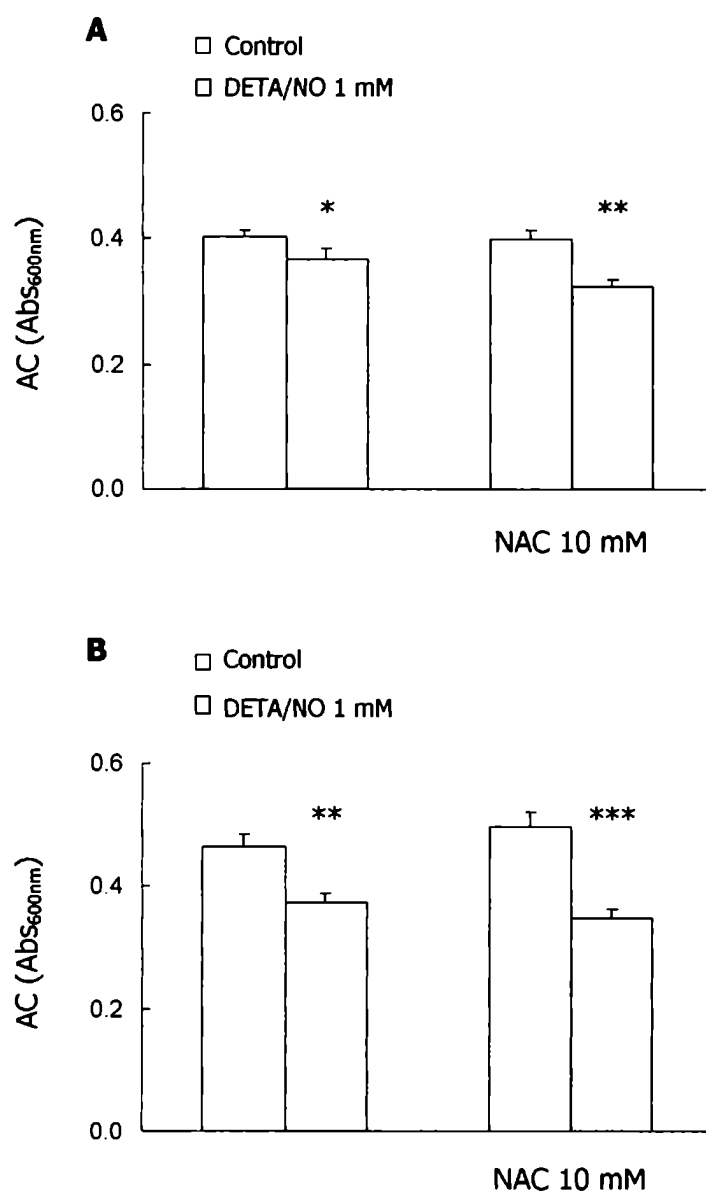
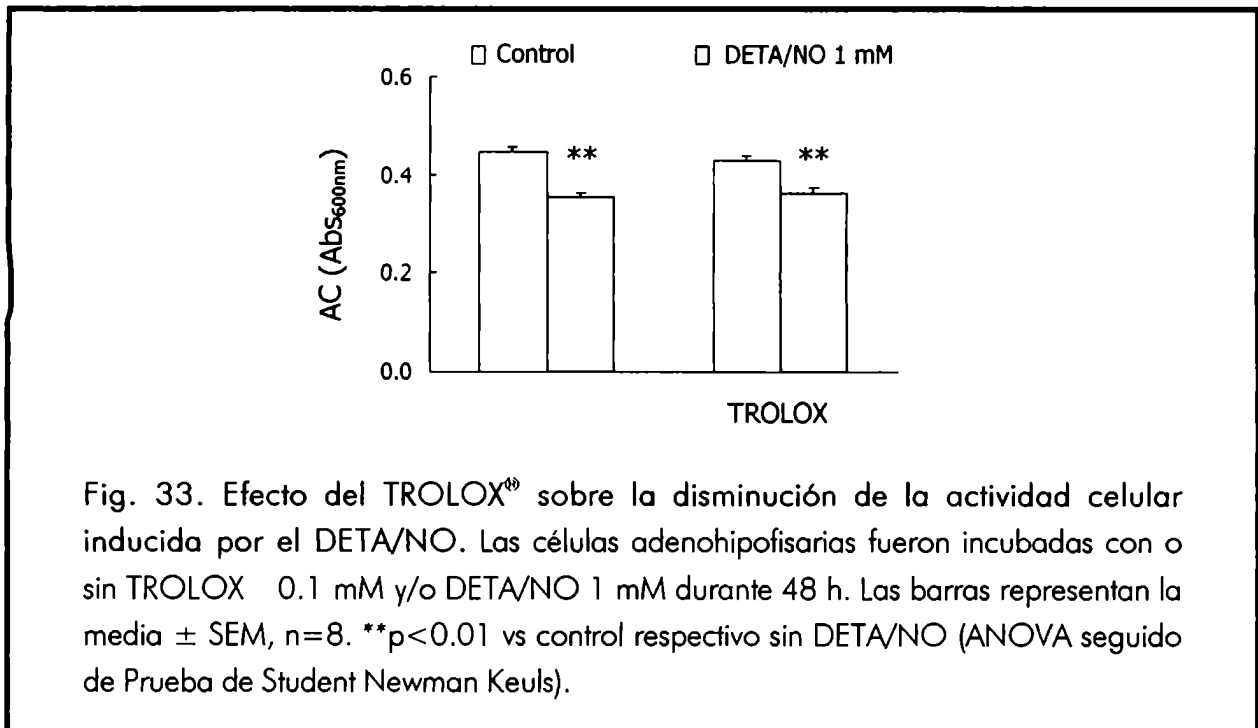


Fig. 32. Efecto de la N-acetil-cisteína sobre la disminución de la actividad celular inducida por el DETA/NO. Las células adenohipofisarias fueron incubadas con o sin N-acetil-cisteína (NAC) 10 mM y/o DETA/NO 1 mM durante 12 h y luego incubadas en medio solo (A) o con NAC 10 mM (B) hasta completar 48 h. Las barras representan la media \pm SEM, n=8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control respectivo sin DETA/NO, (Prueba de Student Newman Keuls).



Estos resultados en conjunto indican que el NO posee un efecto citotóxico sobre las células adenohipofisarias de rata. Dicho efecto citotóxico se manifestó clara e irreversiblemente a partir de las 6 h de incubación con el dador de NO, mientras que los cambios observados en la actividad celular durante tiempos cortos de exposición (3 h) fueron reversibles y no parecen tener un efecto significativo sobre la viabilidad celular. El NO produjo muerte celular con características morfológicas y (condensación y fragmentación cromatínica, disminución del volumen celular) propias de un proceso apoptótico. El hecho de que los inhibidores de caspasas revirtieran parcialmente la disminución de la viabilidad celular inducida por el NO sugiere que, al menos en parte, la inducción del proceso apoptótico se desencadenaría con la participación de estas proteasas. Además, el NO parece afectar preferencialmente a los lactotopos como lo demuestran los resultados de inmunomarcación. La disminución de la liberación de prolactina inducida por el NO en tiempos prolongados de incubación se deberían a la acción citotóxica del NO sobre los lactotopos. Por último, el mecanismo por el cual el NO induce apoptosis en las células adenohipofisarias aparentemente no se deberían a desbalances en el equilibrio redox de las células adenohipofisarias.

Discusión

La regulación de los distintos procesos fisiológicos de la adenohipófisis, tales como el desarrollo, la diferenciación, los patrones de secreción hormonal y la muerte celular, implica la acción concertada de una gran variedad de factores provenientes tanto de tejidos periféricos como del sistema nervioso central (a través del hipotálamo) o de las propias células adenohipofisarias. Durante los últimos años se ha hecho gran hincapié en el estudio de los factores intrahipofisarios que regulan dichos procesos. En este sentido, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se investigaron los efectos del NO principalmente sobre los patrones de secreción hormonal. También se estudiaron algunas vías de segundos mensajeros involucrados en estos efectos. Con respecto a la secreción de prolactina, gran parte de los trabajos realizados hasta la fecha fueron llevados a cabo en nuestro laboratorio en donde se determinaron algunas de las vías de segundos mensajeros involucrados en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción basal de dicha hormona. Con el objeto de tener una visión más integral y acabada de los mecanismos de acción del NO sobre la secreción basal y estimulada de prolactina, en el presente trabajo se evaluó la capacidad del NO de regular el metabolismo de segundos mensajeros de origen lipídico que participan en dicho proceso de secreción.

Por otro lado, a pesar de que el proceso de muerte celular en la adenohipófisis parece ser un evento frecuente, son pocos los estudios realizados hasta el momento sobre posibles factores inductores de apoptosis en las células adenohipofisarias. Teniendo en cuenta que el NO es generado por las células adenohipofisarias, que su concentración es potencialmente alta y persistente durante los procesos inflamatorios y que está involucrado en procesos citotóxicos en distintos tipos celulares, este mensajero se perfila como un candidato fuerte para cumplir un papel activo en el proceso de muerte celular en la adenohipófisis.

Los resultados muestran que el NO se comporta como un regulador del metabolismo tanto del ácido araquidónico como de los fosfoinosítidos y además produce muerte celular programada en células adenohipofisarias de rata.

1. El NO regula el metabolismo del ácido araquidónico en la adenohipófisis de rata

Numerosos trabajos muestran que el NO es capaz de actuar como regulador del metabolismo del ácido araquidónico (Curtis *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1998; Gunther *et al.*, 1997; Holzhütter *et al.*, 1997; Maccarrone *et al.*, 1996; Nakatsuka & Osawa, 1994; O'Donnell *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 1994). El efecto del NO en esta vía metabólica tiene lugar a nivel de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos a través de las COX, en HETEs y leucotrienos a través de las LOX o en EETs a través de las citocromo P-450. Dependiendo del tipo celular y las condiciones fisiológicas, el NO puede estimular o inhibir las diferentes vías de metabolización del ácido araquidónico. Se ha demostrado que la vía de la LOX es la más relevante en cuanto a la regulación de la secreción hormonal en la adenohipófisis dado que el tratamiento *in vitro* con inhibidores de esta enzima produce disminución de la secreción de varias hormonas adenohipofisarias, entre ellas, la prolactina (Conte *et al.*, 1986; Judd *et al.*, 1988; Koike *et al.*, 1985). El 5-HETE es el derivado más importante del ácido araquidónico involucrado en la secreción de prolactina, FSH y LH (Ben Menahem *et al.*, 1994; Dan Cohen *et al.*, 1992; Koike *et al.*, 1985).

Ha sido demostrado que el NO puede inhibir la LOX de varias especies, tanto vegetales como animales (Holzhütter *et al.*, 1997; Maccarrone *et al.*, 1996; Nakatsuka & Osawa, 1994; O'Donnell *et al.*, 1999). Se han descrito varios modelos de inhibición de la LOX por parte del NO, siendo el que postula una reacción entre el NO y el radical lipídico peroxilado unido a la enzima el más probable dado que tendría lugar a concentraciones nanomolares de NO

(O'Donnell *et al.*, 1999). El presente estudio muestra por primera vez que el NO inhibe la actividad de la LOX en la adenohipófisis de la rata.

En nuestros estudios, tanto el NP como el DETA/NO disminuyeron la producción de 5-HETE en adenohipófisis enteras *in vitro*. Ambos dadores de NO inhibieron la liberación de prolactina y esta inhibición se correlaciona con la caída de los niveles de 5-HETE. En el mismo sentido, la L-arginina, el sustrato natural de las NOS, disminuyó la producción de 5-HETE con una potencia similar a la observada con los dadores de NO. Teniendo en cuenta que tanto el efecto de los dadores de NO como el de la L-arginina fueron bloqueados por la hemoglobina, quelante de NO, se puede concluir que el efecto observado se debe a una acción específica del NO. El hecho de haber obtenido los mismos resultados con dadores de NO que poseen diferentes estructuras moleculares y sólo comparten su capacidad de liberar NO, refuerza aun más la idea de que los resultados obtenidos se deben a una acción específica del NO.

El 5-HETE es un mensajero intracelular con una vida media corta y sus niveles pueden ser considerados básicamente como un reflejo de su velocidad de síntesis por parte de la 5-LOX. Teniendo en cuenta este concepto, los resultados del presente trabajo indican que el NO está inhibiendo la actividad de esta enzima.

La utilización de inhibidores de las NOS es una herramienta útil para el estudio de la participación del NO endógeno en un proceso fisiológico. En el presente trabajo, la inhibición de la síntesis de NO por L-NAME y aminoguanidina indujo un aumento en los niveles de 5-HETE, sugiriendo que el NO endógeno se encuentra ejerciendo un efecto inhibitorio tónico sobre la actividad basal de la 5-LOX. Este mecanismo podría estar interviniendo en el efecto inhibitorio tónico que ejerce el NO sobre la secreción de prolactina.

Por otra parte, si bien la hemoglobina revirtió la disminución de la actividad de la 5-LOX inducida por el NO, no modificó por sí misma la producción basal de 5-HETE como sí lo hicieron los inhibidores de las NOS. La adenohipófisis es un sistema celular heterogéneo, compuesto por varios tipos de

células endocrinas y no endocrinas. Actualmente está completamente demostrada la expresión de las tres isoformas de la NOS en la adenohipófisis, en donde el tipo predominante es la nNOS que se localiza en los gonadotropos y las células foliculo estrelladas (Ceccatelli *et al.*, 1993; Sagar & Ferreiro, 1987; Vincent & Kimura, 1992). Dado que los lactotropos aparentemente no expresan ningún tipo de NOS, los efectos producidos por el NO sobre este tipo celular son necesariamente debidos a una acción paracrina del NO. Existen varios trabajos que demuestran una acción tanto autocrina (Ceccatelli *et al.*, 1993) como paracrina (Duvilanski *et al.*, 1995, 1996) del NO en adenohipófisis, por lo cual no es posible determinar si los cambios inducidos por el NO sobre la actividad de la 5-LOX reflejan una acción del NO sobre las propias células que expresan NOS o bien sobre las células vecinas. El hecho de que la hemoglobina no haya modificado la producción basal de 5-HETE probablemente se deba a que esta proteína, al no ser capaz de atravesar las membranas biológicas, sólo puede quelar el NO extracelular. En cambio, la acción del NO dentro de las propias células productoras de NO puede ser bloqueada por los inhibidores de las NOS. Este resultado sugiere que, en condiciones basales, el NO podría estar actuando principalmente sobre la actividad de la LOX en las células que sintetizan NO. Dado que existen relaciones anatómicas de continuidad (uniones comunicantes) entre células con y sin actividad de NOS (por ej. células foliculo estrelladas y lactotropos) (Morand *et al.*, 1996), no se puede descartar un efecto yuxtacrino del NO sobre la actividad de la 5-LOX en células que no poseen NOS.

El NO puede modificar la actividad de las COX en distintos tipos celulares (Cooper, 1999; Goodwin, 1999; Tsai, 1994). La mayor parte de los trabajos demuestran que el NO puede estimular esta enzima, tanto en sistemas libres de células como en cultivos celulares (Davidge *et al.*, 1995; Maccarrone *et al.*, 1997; Salvemini *et al.*, 1993 y 1996). Se han propuesto varios modelos de interacción NO-PGH sintasa y, dependiendo del sistema, cualquiera de ellos puede llegar a tener lugar en condiciones fisiológicas (Curtis *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1998; Gunther *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1994). El presente

estudio muestra que el NO estimula la actividad de la COX en la adenohipófisis de la rata. Mientras que el NP y la L-arginina sólo produjeron un aumento significativo de los niveles de PGF2_α , el DETA/NO indujo una estimulación de todos los prostanoïdes estudiados. El NO parece no estar involucrado en la regulación de la actividad basal de la COX dado que la inhibición de la síntesis de NO por L-NAME o aminoguanidina no modificó la producción de prostaglandinas y tromboxanos. En base a estos resultados con los inhibidores de las NOS, se puede inferir que el NO endógeno estaría afectando la actividad basal de la 5-LOX pero no de la PGH sintasa, lo cual sugiere que estas enzimas podrían tener diferentes afinidades por el NO. En estudios con PGH sintasa purificada, Maccarrone *et al.* establecieron una constante de activación (K_a) de la enzima por NO de $0.65 \mu\text{M}$ y $0.85 \mu\text{M}$ para la actividad de ciclooxigenasa y de peroxidasa respectivamente (Maccarrone *et al.*, 1997). El mismo grupo, trabajando con LOX de soja purificada, estableció una constante de inhibición (K_i) de la enzima por NO de $0.40 \mu\text{M}$ (Maccarrone *et al.*, 1996). En los experimentos presentados aquí, la concentración máxima efectiva de NO en el medio de incubación liberado por NP 1 mM fue de $0.87 \mu\text{M}$, medida de forma electroquímica mediante un electrodo sensible a NO (Poderoso *et al.*, 1996). Se obtuvieron concentraciones efectivas submicromolares de NO similares con DETA/NO 1 mM. Por lo tanto, las concentraciones de NO utilizadas en el presente trabajo se encontraban dentro del rango de acción capaz de interactuar con ambas enzimas.

Las capacidades diferenciales del NP y el DETA/NO para estimular la actividad de la COX podría ser explicada teniendo en cuenta las distintas cinéticas de liberación de NO que poseen ambos dadores. En solución acuosa, el NP alcanza rápidamente un máximo de concentración efectiva de NO que luego disminuye con una vida media ($t_{1/2}$) de aproximadamente 20 min a 37°C . Por el contrario, el DETA/NO libera NO lentamente, llegando a una concentración máxima de NO a los 30 min, la cual se mantiene constante por varias horas ($t_{1/2}=20 \text{ h}$ a 37°C). Por lo tanto, es posible que, para ser activada, la COX

necesite una cierta concentración de NO persistente en el tiempo, siendo poco efectivos los aumentos transitorios de NO. Si bien los productos de las COX no desempeñan un papel importante en la regulación de la secreción hormonal en adenohipófisis, éstos se comportan como mediadores de procesos inflamatorios (Morteau, 2000; Simon, 1999). En dichos procesos, el NO es generado en alta concentración y durante periodos prolongados (McCann *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1996). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un mecanismo potencial de interrelación NOS-COX durante procesos inflamatorios en la adenohipófisis.

Los conceptos discutidos en los párrafos anteriores son las hipótesis más simples que permiten interpretar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, se deben tener en cuenta también algunos otros hechos que podrían intervenir en los efectos observados. En primer lugar, se podría pensar que la disminución de la síntesis de 5-HETE podría deberse a una disminución de la oferta de sustrato (*AA) originada por la mayor actividad de metabolización del ácido araquidónico por parte de la COX inducida por el NO y viceversa. Este hecho es poco probable dado que la masa de *AA utilizada fue superior en más de dos órdenes de magnitud a la masa de la suma total de los metabolitos cuantificados (datos no mostrados). Además, bajo el supuesto de "la caída de la oferta de sustrato", se debería haber observado una mayor inhibición de la síntesis de 5-HETE durante el tratamiento con DETA/NO que con NP, dado que el efecto estimulador del DETA/NO sobre la actividad de COX fue mayor que el inducido por el NP, hecho que no fue observado. Por otro lado se ha demostrado que los HPETEs, productos intermediarios de la síntesis de HETEs, inhiben la actividad de la COX (Maccarrone *et al.*, 1997). Esto permite especular que una disminución de los niveles de los productos de la LOX inducida por el NO esté desinhibiendo a la COX, lo cual se manifestaría como un aumento de la síntesis de prostanoïdes. Por último, no puede ser descartada una acción del NO sobre otras enzimas con grupos hemo involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico, como las citocromo P-450 o algunas prostaglandina sintasas, las

cuales podrían participar en el efecto del NO sobre esta intrincada red enzimática.

2. El NO inhibe la síntesis estimulada de IPs en células de adenohipófisis de rata

Los inositoles fosfato forman una trama compleja de factores que regulan numerosas funciones celulares. Quizás una de las más relevantes desde el punto de vista endocrinológico sea la capacidad del inositol (1,4,5)-trifosfato de inducir la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (Taylor, 1998; Woodcock, 1997). Este mensajero es uno de los mediadores más importantes de la secreción de hormonas adenohipofisarias inducida por diversos secretagogos hipotalámicos, tal es el caso de la liberación de prolactina estimulada por AngII, TRH, sustancia P o neurotensina (Freeman *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1988). La vía de síntesis de IP₃ más simple involucra la activación mediada por receptor de una PLC, la cual hidroliza el fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (PIP₂) localizado principalmente en la membrana plasmática, dando como resultado cantidades equimolares de IP₃ y *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG) (Woodcock, 1997). El IP₃ induce un aumento de la concentración de calcio intracelular a través de la activación de receptores específicos localizados principalmente en el retículo endoplásmico (Taylor, 1998; Woodcock, 1997) y el DAG, por su parte, activa varias isoformas de proteínas kinasas C.

En el presente trabajo, tanto el NP como el DETA/NO disminuyeron la síntesis de IPs en células adenohipofisarias de rata en cultivo estimuladas con AngII y TRH. El DETA NONOato sin capacidad para liberar NO no modificó la producción de IPs inducida por AngII o TRH, indicando que el efecto observado es específico del NO. Por otro lado, el NO no parece estar cumpliendo un papel relevante en la regulación basal del metabolismo de los fosfoinosítidos dado que ninguno de los dadores de NO fue capaz de modificar la actividad basal de PLC.

Previamente demostramos que el NO disminuye la liberación de prolactina en condiciones basales (Duvilanski *et al.*, 1995, 1996). En condiciones de estimulación con AngII o TRH en donde se observó un fuerte aumento de la liberación de prolactina, tanto el DETA/NO como el NP fueron capaces de inhibir parcialmente dicho efecto estimulador. Este resultado se correlaciona con la disminución de la síntesis de IPs inducida por el NO en las mismas condiciones de estimulación y lleva a pensar que este mecanismo sería el responsable del efecto inhibitorio del NO sobre el aumento de la liberación de prolactina inducido por AngII o TRH.

En muchos sistemas biológicos, los efectos del NO están mediados por la activación de la guanilil ciclasa soluble, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular de cGMP. En estos sistemas, la utilización de análogos de cGMP reproduce los efectos biológicos del NO. El sistema de transducción de señales de los fosfoinosítidos puede ser modulado por el NO a distintos niveles. Se ha descrito que el NO es capaz de inhibir la PLC- β por un mecanismo que involucra la activación de la PKG (Clementi *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2001). En su trabajo, Xia *et al.* demuestran que la PKG fosforila la PLC- β tanto *in vivo* como *in vitro*, dando como resultado la imposibilidad de que la enzima sea activada por las proteínas G. Asimismo, y también a través de la activación de la PKG, el NO puede provocar la fosforilación del receptor de IP₃ del tipo I modulando su probabilidad de apertura (Cavallini *et al.*, 1996; Komalavilas & Lincoln, 1996).

En el presente trabajo, el LY-83583 que actúa como un inhibidor irreversible de la guanilil ciclasa soluble bloqueó completamente el efecto inhibitorio del NO sobre la producción de IPs estimulada por AngII. Teniendo en cuenta este resultado se podría sugerir que la actividad de la guanilil ciclasa soluble es necesaria para la acción del NO. Sin embargo, el BAY 41-2272, un compuesto recientemente caracterizado no relacionado con el NO, el cual activa específicamente la guanilil ciclasa soluble, no fue capaz de reproducir los efectos del NO sobre la síntesis de IPs. En nuestro sistema, el BAY 41-2272 estimuló la síntesis de cGMP con una potencia superior a la del DETA/NO o del NP, pero no

afectó la síntesis de IPs estimulada por AngII, lo cual sugiere que la disminución de la síntesis de IPs inducida por NO se llevaría a cabo de forma independiente de la activación la guanilil ciclasa soluble y del cGMP. Estos resultados contradictorios fueron aclarados con la utilización, como mediador directo del NO, de un análogo del cGMP permeable a las membranas biológicas y más resistente a la acción de las fosfodiesterasas que el cGMP, el 8-Br-cGMP. Según fuera demostrado en trabajos anteriores (Duvilanski *et al.*, 1996), el 8-Br-cGMP reproduce el efecto inhibitorio del NO sobre la liberación basal de prolactina en adenohipófisis. Sin embargo, en el presente trabajo dicho análogo no fue capaz de disminuir la síntesis de IPs estimulada por AngII o TRH. Este resultado refuerza la idea de que el NO disminuye la síntesis de IPs estimulada por AngII de manera independiente de la vía guanilil ciclasa soluble/cGMP.

Las PKG son uno de los sitio de acción del cGMP. A su vez estas proteínas kinasas pueden fosforilar a la PLC inhibiendo su actividad, por lo cual las PKG pueden ser consideradas como un punto de conexión entre las vías de señales del NO y de los fosfoinosítidos. Si las PKG estuvieran mediando el efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs en condiciones estimuladas, la utilización de un estimulador de esta enzima debería haber reproducido dicho efecto inhibitorio. Sin embargo, el Sp-8-pCPT-cGMPS trietilamina, un estimulador de la PKG, no reprodujo el efecto observado con los dadores de NO y el Rp-8-pCPT-cGMPS trietilamina, un inhibidor de la PKG, no fue capaz de revertir la disminución de la síntesis de IPs inducida por DETA/NO o NP.

Estos resultados en su conjunto indican que los componentes de la vía guanilil ciclasa soluble/cGMP/PKG no estarían participando del efecto del NO sobre la producción de IPs en condiciones estimuladas.

Una vez descartada la vía cGMP/PKG, se postuló que el NO estaba afectando la actividad de PLC interfiriendo directamente en algún punto de la vía de transducción de señales. Las posibilidades eran que el NO pudiese estar modificando la funcionalidad de los receptores de la membrana plasmática, de alguna de las subunidades de las proteínas $G_{q/11}$, de algún factor regulador de las

proteínas transductoras o de la propia PLC. Hay dos observaciones relevantes que indican que el NO no afecta directamente a la PLC. La primera es que los dadores de NO no fueron capaces de disminuir la síntesis basal de IPs la cual es independiente de la activación de proteínas G. La segunda es que el DETA/NO no fue capaz de disminuir la síntesis de IPs estimulada por GTP γ S tanto en presencia como en ausencia de AngII. Estas dos observaciones sugieren que el NO no estaría afectando la actividad de PLC por una acción directa sino que el factor afectado por el NO se encontraría en algún punto entre el receptor de membrana y la proteína G.

Se ha demostrado que el NO puede modular las señales iniciadas por los receptores de membrana actuando sobre diferentes elementos de las vías de transducción de señales. El NO puede afectar la función de los receptores activados por agonistas tanto intra como extracelulares (Castel & Vaudry, 2001; Choi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999), canales iónicos (Li *et al.*, 1998; Meszaros *et al.*, 1996) y receptores con actividad tirosina kinasa (Estrada *et al.*, 1997) por un mecanismo que involucra eventos de nitros(il)ación. Asimismo, tanto las proteínas G pequeñas como las heterotriméricas son blanco para la acción del NO por mecanismos dependientes (Abi-Gerges *et al.*, 2001, 2002; Nguyen *et al.*, 1991) o independientes (Lander *et al.*, 1993, 1995; Mallis *et al.*, 2001) de cGMP. Por último, varios receptores acoplados a proteínas G (Shaul & Anderson, 1998), incluyendo el receptor para AngII del tipo AT1 (Ishizaka *et al.*, 1998), así como también el sistema PIP2/PLC (Hope & Pike, 1996; Pike & Casey, 1996) están principalmente localizados en caveolas. Considerando que el NO interfiere con la integridad del andamiaje formado por la proteína caveolina-1 (Goligorsky *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001), esta interferencia puede ser propuesta como otro mecanismo hipotético de acción del NO sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos en las células adenohipofisarias de rata. Dado que la AngII estimuló la síntesis de IPs aún en presencia de GTP γ S, se puede sugerir la existencia de una vía adicional de estimulación de la síntesis de IPs por AngII independiente de GTP. Esta vía tampoco sería modificada por el NO.

En 1999, Prasad *et al.* describieron un efecto estimulador del LY-83583 sobre la hidrólisis de PIP_2 con el consiguiente aumento en la producción de DAG e IP_3 en una línea tumoral de células hepáticas, sugiriendo que el LY-83583 podría activar la PLC. Este antecedente podría explicar la reversión del efecto inhibitorio del NO sobre la síntesis de IPs en condiciones estimuladas en presencia de LY-83583. El inhibidor de la guanilil ciclasa soluble podría estar aumentando la síntesis de IPs mediante una estimulación de la PLC, lo cual bloquearía o no permitiría observar el efecto inhibitorio del NO sobre esta enzima. Sin embargo, el LY-83583 no modificó por sí mismo la síntesis de IPs tanto en condiciones basales como estimuladas con AngII, lo cual sugiere que el LY-83583 no sería un estimulador de la síntesis de IPs por sí mismo sino que actuaría como un bloqueante de la acción del NO.

En la actualidad, está fehacientemente demostrado que los subtipos de receptores para AngII AT_{1A} y AT_{1B} , así como también los receptores para TRH $TRH-R_1$ y $TRH-R_2$ activan a la PLC- β , por un mecanismo que involucra a las proteínas G de la subfamilia α_q/α_{11} (Côté *et al.*, 1997; Exton, 1994; Hsieh & Martin, 1992). En la rata macho adulta cerca de un tercio de las células adenohipofisarias expresan el mRNA que codifica para el receptor del tipo AT_{1B} . La mayor parte de estas células (aproximadamente el 78%) son inmunoreactivas para prolactina mientras que otro 18% son inmunoreactivas para ACTH (Lenkei *et al.*, 1999). Con respecto a los receptores de TRH, el 90% de las células que se marcan con TRH conjugada a rodamina son lactotropos o tirotropos (Yu *et al.*, 1998). Considerando conjuntamente ambos datos y el hecho que el NO inhibió la síntesis de IPs estimulada tanto por AngII como por TRH, se puede especular que el efecto del NO fue preferencialmente una respuesta de las células productoras de prolactina, con una menor participación de corticotropos y tirotropos.

En la primer parte del presente trabajo, se muestra que el NO se comporta como un regulador del metabolismo del ácido araquidónico. En la segunda parte, los resultados muestran que el NO regula el sistema de

transducción de señales de los receptores acoplados a proteínas G que activan PLC. Asimismo, también demostramos que el NO inhibe tanto la liberación basal como estimulada de prolactina y que en ambas condiciones habría una acción diferencial del NO sobre distintos mensajeros intracelulares. En condiciones basales, el NO activa la guanilil ciclasa soluble, aumentando la síntesis de cGMP (Duvilanski *et al.*, 1996), el cual por su parte activa la PKG y la PDE2 produciendo una disminución de la concentración intracelular de cAMP y la consecuente inhibición de la liberación de prolactina (Velardez *et al.*, 2000). En el presente trabajo se demostró que la inhibición de la actividad basal de la 5-LOX por parte del NO también juega un papel importante en el efecto inhibitorio del NO sobre la liberación basal de prolactina.

En condiciones estimuladas por AngII o TRH, el efecto inhibitorio del NO sobre la liberación de prolactina parece estar mediado, al menos en parte, por una disminución de la síntesis de IPs. Si bien nuestros resultados muestran que, en estas condiciones de estimulación, existe una correlación directa entre la concentración intracelular de IPs y la prolactina liberada, los mismos no nos permiten descartar la participación de otros segundos mensajeros en dicho efecto inhibitorio del NO. Por lo tanto, los resultados indican que, dependiendo del estado fisiológico de las células adenohipofisarias, el NO es capaz de actuar sobre diferentes vías de segundos mensajeros involucrados en la liberación de prolactina.

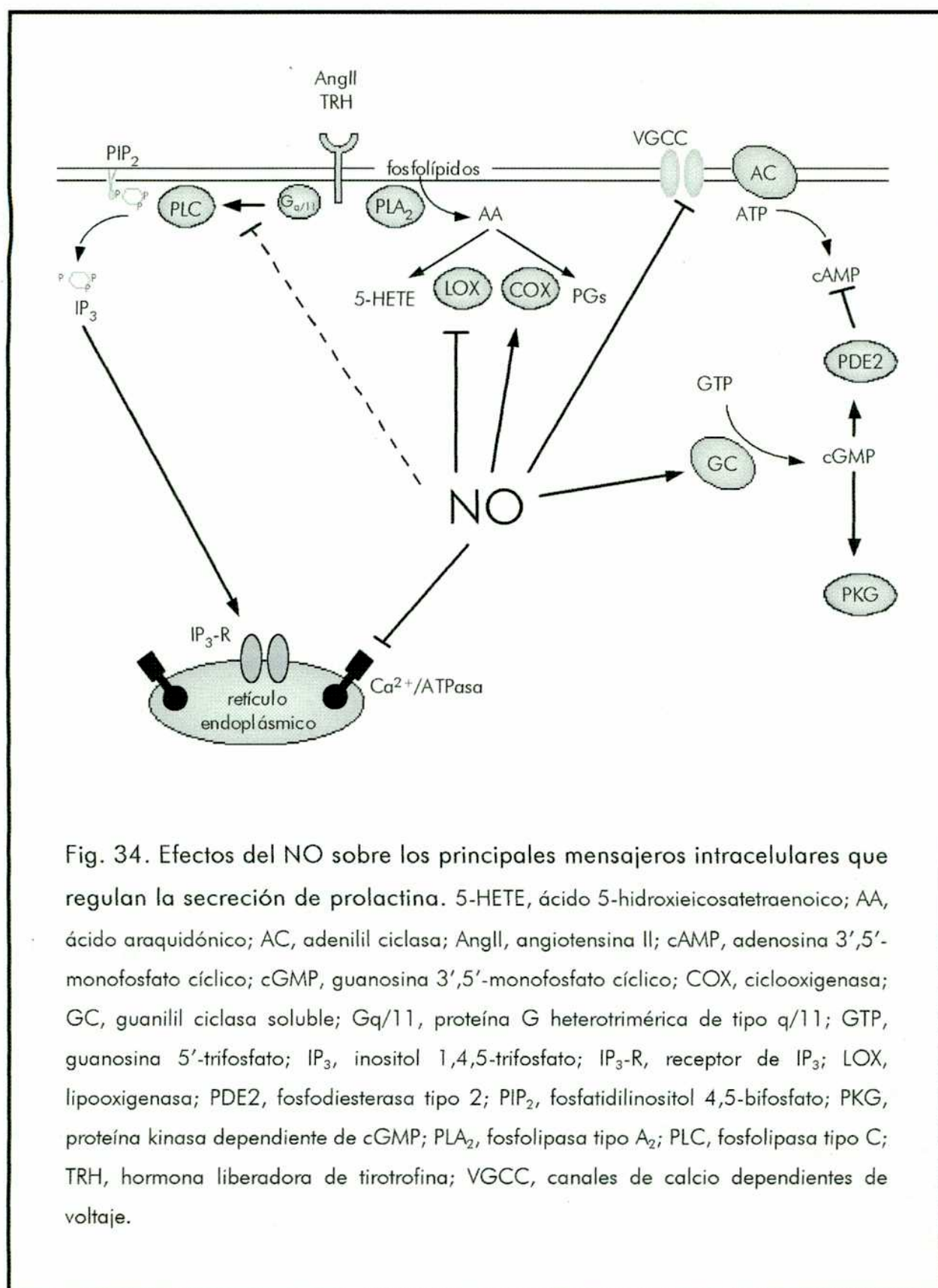


Fig. 34. Efectos del NO sobre los principales mensajeros intracelulares que regulan la secreción de prolactina. 5-HETE, ácido 5-hidroxeicosatetraenoico; AA, ácido araquidónico; AC, adenilil ciclasa; AngII, angiotensina II; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico; COX, ciclooxigenasa; GC, guanilil ciclasa soluble; Gq/11, proteína G heterotrimérica de tipo q/11; GTP, guanosina 5'-trifosfato; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; IP₃-R, receptor de IP₃; LOX, lipooxigenasa; PDE2, fosfodiesterasa tipo 2; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PKG, proteína kinasa dependiente de cGMP; PLA₂, fosfolipasa tipo A₂; PLC, fosfolipasa tipo C; TRH, hormona liberadora de tirotrifina; VGCC, canales de calcio dependientes de voltaje.

3. El NO induce muerte celular programada en células adenohipofisarias de rata

La adenohipófisis puede ser considerada como una población celular en expansión (Mastro *et al.*, 1969). En condiciones normales, la adenohipófisis de la rata adulta mantiene una renovación continua de sus células (Carbajo-Pérez & Watanabe, 1990; Nolan *et al.*, 1998; Nouët & Kujas, 1975; Sakuma *et al.*, 1984; Shirasawa & Yoshimura, 1982). El equilibrio de la población celular adenohipofisaria es un reflejo del balance entre los procesos de división celular, diferenciación, arresto del ciclo y apoptosis (Nolan *et al.*, 1998, Pagotto *et al.*, 1999). En la adenohipófisis, el proceso apoptótico no ha sido estudiado en profundidad. Varios factores sintetizados en esta glándula podrían actuar como desencadenantes del proceso apoptótico, entre ellos se ha propuesto que el TNF- α o el factor de transcripción Zac1 participarían en la renovación celular adenohipofisaria (Candolfi *et al.*, 2002, en prensa; Pagotto *et al.*, 1999). En la adenohipófisis, tanto el TNF- α como el interferón tipo γ (INF- γ) pueden inducir un aumento en la expresión de la NOS y la síntesis de NO, (Theas *et al.*, 2001; Vankelecom *et al.*, 1997a y b). Teniendo en cuenta estos datos, se consideró al NO como un buen candidato para inducir muerte celular programada en la adenohipófisis.

En el presente trabajo el DETA/NO, dador con capacidad para liberar NO durante tiempos prolongados a concentraciones relativamente constantes, produjo una disminución de la actividad celular adenohipofisaria de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. El efecto citotóxico del NO se manifestó claramente a partir de las 48 h de incubación con el DETA/NO. Este efecto no se observó cuando las células fueron expuestas a DETA NONOato decaído, lo cual demuestra que la disminución de la actividad celular inducida por el DETA/NO fue específica del NO.

En tiempos cortos de exposición al NO (2-12 h) se observó un aumento de la actividad celular, mientras que tiempos mayores indujeron una disminución de la misma. A partir de las incubaciones con DETA/NO durante diferentes

tiempos seguidas de incubaciones sin el dador de NO hasta completar 48 h, se determinó que el tiempo mínimo de exposición al NO capaz de inducir una disminución de la actividad celular fue de 6 h. Tiempos menores de incubación con DETA/NO no indujeron cambios en la actividad celular ni en la morfología nuclear (evaluados a las 48 h), por lo que puede afirmarse que una exposición de las células adenohipofisarias a NO durante al menos tres horas no produce muerte celular. Probablemente, después de estas primeras horas de exposición, el NO desencadenaría cambios celulares irreversibles que llevarían en última instancia a la muerte de las células adenohipofisarias.

Mediante el análisis morfológico de las células por microscopía de fluorescencia, se pudo demostrar que el NO induce la aparición de cambios morfológicos propios del proceso de muerte celular programada. A partir de 12 h de incubación con el DETA/NO se pudieron observar cambios en la condensación de la cromatina, los cuales se hicieron mucho más evidentes en las células incubadas durante 24 o más horas. Dichos cambios incluyeron la aparición de núcleos altamente condensados los cuales podían presentar también fragmentación y marginación de la cromatina. Además, las células presentaron una disminución del volumen citoplasmático aunque no fue posible observar la formación de ampollas en la membrana plasmática. Teniendo en cuenta los cambios morfológicos descritos y dado que la observación de células necróticas fue ocasional, se podría indicar que el NO induce la muerte de las células adenohipofisarias principalmente por un proceso apoptótico. Si bien el porcentaje de células con manifestaciones citológicas propias de la apoptosis fue similar en los cultivos tratados durante 24 y 48 h con DETA/NO, en los preparados de 48 h se observó una disminución del número total de células adheridas por campo (datos no mostrados). Este resultado indica que el NO podría estar disminuyendo la capacidad de las células de mantenerse adheridas al sustrato y por consiguiente se podría estar subestimando el número de células apoptóticas después de 48 h de tratamiento con el dador de NO.

La adenohipófisis es un sistema celular heterogéneo, compuesto por varios tipos de células endocrinas y no endocrinas por lo cual se investigó si el efecto citotóxico del NO era generalizado o específico para un tipo celular. El NO parece afectar principalmente a los lactotrofos, como lo muestran las determinaciones por métodos inmunocitoquímicos. Prácticamente el 50% de las células que mostraron morfología nuclear apoptótica fueron inmunoreactivas para prolactina, mientras que los gonadotrofos parecen ser (en cantidad) el segundo tipo celular afectado.

El DETA/NO inhibió la liberación basal de prolactina en incubaciones de 1 h, resultado que está en concordancia con trabajos anteriores realizados en adenohipófisis enteras (Duvilanski *et al.*, 1995, 1996; Velardez *et al.*, 2000). Luego de esta inhibición inicial, parece haber un periodo de tiempo durante el cual el NO no modifica la liberación basal de prolactina. A partir de las 6 h de incubación, el NO volvió a inducir una disminución de la liberación de prolactina que se acentuó en los tiempos de incubación más prolongados. Es probable que la inhibición de la liberación basal de prolactina inducida por el NO a partir de las 6 h de incubación sea una de las primeras manifestaciones de la acción citotóxica del NO sobre los lactotrofos. Por otro lado, el NO también produjo una disminución de la liberación de LH a partir de las 3 h de incubación (datos no mostrados), lo que concuerda con la hipótesis de una acción citotóxica del NO sobre los gonadotrofos sugerida por los resultados de las observaciones por métodos inmunocitoquímicos. En trabajos anteriores se muestra que el NO, en tiempos cortos de incubación, modifica solamente la liberación basal de prolactina, sin afectar la secreción de las demás hormonas adenohipofisarias (Brunetti *et al.*, 1995; Ceccatelli *et al.* 1993; Duvilanski *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1995; Kato, 1992; Tena-Sempere *et al.*, 1996). Si bien no se determinaron los niveles de secreción hormonal de todos los tipos celulares adenohipofisarios, los resultados de la inmunomarcación sugieren un efecto predominante del NO sobre los lactotrofos y en segundo término sobre los gonadotrofos. Sin embargo, no se puede descartar que el NO en tiempos de acción prolongados pudiera

estar afectando la secreción de otras hormonas adenohipofisarias además de la prolactina y la LH.

El número total de células apoptóticas marcadas con los anticuerpos contra las distintas hormonas fue sólo del 60%. Este resultado indica que una gran proporción de las células con morfología nuclear apoptótica no reaccionaron con ninguno de los anticuerpos utilizados. Este hecho se puede correlacionar con la disminución del contenido de RNA citoplasmático observado en las células tratadas con DETA/NO cuando fueron teñidas con naranja de acridina. Posiblemente el NO esté produciendo una disminución de la síntesis de RNA, lo que se traduce en un menor contenido de proteínas, dando como resultado una débil inmunomarcación con los anticuerpos contra las distintas hormonas. Este hecho podría llevar al observador a subestimar el número de células apoptóticas correspondientes a un tipo celular, lo cual dificulta la determinación fehaciente de cada tipo celular afectado por el NO.

Como ya se mencionara en la introducción, existen varias vías de señales intracelulares que desencadenan el proceso apoptótico y muchas veces estas vías comparten factores proteicos, lo que hace del estudio de una determinada vía de señalización una tarea compleja. Aunque en la actualidad se han descrito procesos apoptóticos independientes de la vía de las caspasas, se acepta que la activación de esta familia de proteínas es uno de los procesos más importantes para desencadenar la muerte celular programada (Thornberry & Lazebnik, 1998). La apoptosis inducida por NO muchas veces es acompañada por la activación de caspasas (Borutaite *et al.*, 2000; Moriya *et al.*, 2000). Una de las herramientas más utilizadas para investigar la participación de estas cisteína proteasas en el proceso apoptótico es el tratamiento de las células con inhibidores de dichas enzimas (Thornberry & Lazebnik, 1998). En el presente trabajo se utilizaron inhibidores de caspasa-9 y caspasa-3 dado que éstas son las isoformas que más frecuentemente participan en el efecto citotóxico del NO (Balakirev *et al.*, 1997; Borutaite *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2000; Daugas *et al.*, 2000; Hortelano *et al.*, 1997). Dado que ambos inhibidores revirtieron parcialmente la disminución de la

actividad celular inducida por el NO, se puede sugerir que tanto la caspasa-9 como la caspasa-3 estarían mediando, al menos en parte el efecto proapoptótico del NO en las células de adenohipófisis de rata.

Un resultado notable es que si bien los inhibidores de caspasas revirtieron parcialmente el efecto del NO sobre la actividad celular, no fueron capaces de revertir la aparición de la morfología nuclear apoptótica inducida por el NO. Este resultado, junto con el hecho de que los inhibidores de caspasas sólo produjeron una reversión parcial del efecto del NO sobre la actividad celular, hacen pensar que el NO ejercería su acción citotóxica no sólo a través de la activación de las caspasas, sino también por una vía independiente de estas proteasas. Los resultados también indican que la vía independiente de caspasas sería la responsable de la aparición de la morfología nuclear apoptótica. Se ha demostrado que el NO puede producir directamente la fragmentación del DNA (Burney *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1992) por lo cual una inducción de cambios morfológicos nucleares independiente de la acción de las caspasas no parece ser improbable. Además, se ha demostrado que la activación de la p38 MAP kinasa por el NO promueve la translocación de la proteína Bax a la mitocondria y causa muerte celular, la cual no puede ser bloqueada por inhibidores de caspasas (Ghatan *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la proteína Bcl-2 puede ser sustrato de la caspasa-3 (Kirsch *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2002). La caspasa-3 cliva el dominio BH4 de Bcl-2 necesario para inhibir la apoptosis, convirtiendo a esta proteína en un factor proapoptótico similar a las proteínas Bax/Bid. La Bcl-2 clivada se puede translocar a la mitocondria y promover la liberación del citocromo c al citosol. De esta manera, el procesamiento de la Bcl-2 por parte de la caspasa-3 se comportaría como un mecanismo de retroalimentación positiva, amplificando las señales promotoras de la muerte celular programada. Por lo tanto, la caspasa-3, mediante el procesamiento de la Bcl-2, es capaz de actuar indirectamente sobre la función mitocondrial (Kirsch *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2002). Dado que los inhibidores de caspasas revirtieron parcialmente el efecto del NO sobre la

actividad celular (reflejo de la función mitocondrial), se podría especular que el NO podría estar desestabilizando la función mitocondrial en células adenohipofisarias a través de la acción de las caspasas.

Muchos de los efectos, ya sea pro o antiapoptóticos, del NO pueden desencadenarse a raíz de su capacidad de nitrosilar ciertos aminoácidos produciendo cambios en la actividad de diversas proteínas (Borutaite *et al.*, 2000; Brüne *et al.*, 1996; Dimmeler *et al.*, 1997a y 1998; Haendeler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Mannik *et al.*, 1997; Yabuli *et al.*, 1999). En nuestro sistema, la utilización de N-acetil-cisteína, un antioxidante que bloquea el proceso de nitrosilación, no fue capaz de prevenir ninguno de los cambios celulares inducidos por el NO, aún en condiciones submáximas de acción del NO y a pesar de la presencia de N-acetil-cisteína luego del estímulo con DETA/NO. Este resultado sugiere que el efecto citotóxico del NO no dependería de su acción nitrosilante.

Por otro lado, muchas de las acciones proapoptóticas del NO pueden ser ejercidas de manera indirecta a través de la reacción del NO con el O₂, produciendo ONOO[•] (Borutaite *et al.*, 2000; Bosca & Hortelano, 1999; Burney *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 2000; Yabuli *et al.*, 1999). Dado que el TROLOX[®], un derivado de la vitamina E que bloquea la acción de los ONOO[•], no revirtió ninguno de los procesos celulares inducidos por el NO, se puede sugerir que el efecto citotóxico del NO no estaría mediado por los peroxinitritos.

En conjunto, los resultados obtenidos con los antioxidantes indican que el NO está induciendo la muerte de las células adenohipofisarias por un mecanismo que no dependería de la alteración del balance redox intracelular. Es probable que los efectos proapoptóticos del NO en este sistema se produzcan por una acción a nivel genómico, bien por la capacidad del NO de dañar al DNA o bien induciendo la expresión de factores promotores de muerte celular.

Además de la disminución de la actividad celular observada en tiempos de exposición prolongados, el NO también produjo un aumento transitorio en la actividad celular cuando las células fueron incubadas durante tiempos cortos con DETA/NO. El método de medición de actividad celular utilizado en el presente

trabajo (ensayo de MTT) es principalmente un reflejo de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Un aumento de la actividad celular determinado por este método no refleja necesariamente un aumento de la proliferación celular. Los cambios de actividad celular observados durante las primeras horas de exposición al NO podrían estar reflejando la acción del NO sobre la función mitocondrial. De hecho el ensayo de MTT modificado ha sido utilizado para investigar el efecto del NO sobre la actividad mitocondrial (Sung & Dietert, 1994). Este tipo de patrón en donde el NO produce efectos opuestos sobre la función mitocondrial y la viabilidad celular dependiendo del tiempo de exposición ha sido descrito en un trabajo reciente por el grupo de Moncada (Beltran *et al.*, 2000). En dicho trabajo, los autores describen un aumento del potencial transmembrana mitocondrial en células Jurkat durante las primeras 6-8 h de exposición al DETA/NO, mientras que mayores tiempos de exposición al NO producen una disminución muy marcada de dicho potencial. En el mismo trabajo, los autores demuestran que los cambios en el potencial de transmembrana mitocondrial se correlacionan temporalmente con los cambios de la viabilidad celular inducida por el DETA/NO pero con un desfase de 4-5 h.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo en donde se observa un aumento inicial de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, seguido de una caída de la actividad mitocondrial en el momento en que comienzan a visualizarse los cambios morfológicos propios del proceso apoptótico. Los resultados presentados sugieren que la mitocondria podría ser un sitio probable para la acción citotóxica del NO en las células adenohipofisarias de rata.

El NO y las especies reactivas del nitrógeno producen muerte celular por diversos mecanismos, los cuales no están claramente definidos y dependen del tipo celular y las condiciones fisiológicas. En las células expuestas a NO, la glucólisis es crítica para su supervivencia dado que niveles moderados de NO inhiben invariablemente la respiración mitocondrial y de esta manera la producción de ATP (Nicholls & Budd, 2000). En ausencia de glucosa o frente a

una capacidad glucolítica insuficiente, el NO puede causar necrosis, simplemente debido a la disminución de ATP (Leist *et al.*, 1999). Esto no parece estar sucediendo en nuestro sistema dado que sólo se observaron células con características necróticas de forma fortuita.

Poco se conoce acerca de los factores intrahipofisarios que pueden producir muerte celular programada en la adenohipófisis. En la rata, existen variaciones en el número de células adenohipofisarias en diferentes estados fisiológicos como son el ciclo estral, la preñez y la lactación (Ahlbom *et al.*, 1998; Haggi *et al.*, 1986; Nolan *et al.*, 1998, Oishi *et al.*, 1993; Yin & Arita, 2000). Se ha demostrado que la terminación de la lactación induce muerte celular programada en la adenohipófisis con una concomitante reducción del número de lactotopos (Ahlbom *et al.*, 1998; Haggi *et al.*, 1986; Yin & Arita, 2000). Es conocido que tanto el TNF- α como otras citocinas utilizan al NO como mediador de sus acciones sobre la secreción hormonal a nivel adenohipofisario (Theas *et al.*, 2000; Vankelecom *et al.*, 1997a y b). Asimismo, se ha demostrado que el TNF- α tiene una acción proapoptótica principalmente en proestro con una acción preferencial sobre los lactotopos (Candolfi *et al.*, 2002, en prensa). La expresión y la actividad de la nNOS también varía a lo largo del ciclo estral, siendo máxima en proestro (Lozach *et al.*, 1998). Si bien se puede postular al NO como la molécula efectora del proceso de muerte celular programada inducido por el TNF- α , los experimentos necesarios para confirmar esta hipótesis aún deben ser llevados a cabo.

Por último, es sabido que durante los procesos inflamatorios la expresión de la iNOS en la adenohipófisis se incrementa casi 50 veces y el NO es producido en alta concentración y durante tiempos prolongados (McCann *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1996). El NO generado en estas condiciones puede estimular la actividad de las COX (Weinberg, 2000). Los productos de las COX, a su vez actúan como agentes proinflamatorios y pueden estimular más aún la producción de NO. Queda por demostrar si el NO forma parte de un mecanismo de retroalimentación positiva de los procesos inflamatorios en la adenohipófisis, si

durante la respuesta inflamatoria existe una mayor tasa de apoptosis de las células adenohipofisarias y por último, si estos procesos son producidos por la acción del NO.

En resumen, en el presente trabajo se demuestra por primera vez que el NO induce la muerte de las células de adenohipófisis de rata. El NO produjo cambios morfológicos típicos de un proceso apoptótico y los lactotropos parecen ser el tipo celular predominantemente afectado. El mecanismo de acción parece ser parcialmente dependiente de la activación de las caspasas tipos 3 y 9, aunque es probable que también estén involucradas otras vías proapoptóticas independientes de esta familia de cisteína proteasas. Con respecto a la acción oxidante del NO, ya sea directa o indirectamente, los resultados muestran que el NO no produciría muerte celular por un desbalance del equilibrio redox en las células adenohipofisarias. Aún queda por demostrar si los efectos del NO se llevan a cabo por una acción a nivel de expresión génica o a nivel mitocondrial.

Conclusiones

La regulación de los distintos procesos fisiológicos de la adenohipófisis, tales como el desarrollo, la diferenciación, los patrones de secreción hormonal y la muerte celular, implica la acción concertada de una gran variedad de factores provenientes tanto de tejidos periféricos como del sistema nervioso central (a través del hipotálamo) o de las propias células adenohipofisarias. Durante los últimos años se ha hecho gran hincapié en el estudio de los factores intrahipofisarios que regulan dichos procesos. En este sentido, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se investigaron los efectos del NO principalmente sobre los patrones de secreción hormonal. También se estudiaron algunas vías de segundos mensajeros involucrados en estos efectos. Con respecto a la secreción de prolactina, gran parte de los trabajos realizados hasta la fecha fueron llevados a cabo en nuestro laboratorio en donde se determinaron algunas de las vías de segundos mensajeros involucrados en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción basal de dicha hormona. Con el objeto de tener una visión más integral y acabada de los mecanismos de acción del NO sobre la secreción basal y estimulada de prolactina, en el presente trabajo se evaluó la capacidad del NO de regular el metabolismo de segundos mensajeros de origen lipídico que participan en dicho proceso de secreción. Los resultados muestran que el NO se comporta como un regulador del metabolismo tanto del ácido araquidónico como de los fosfoinosítidos.

Con respecto al metabolismo del ácido araquidónico, el NO inhibió la actividad de la LOX produciendo una disminución de la síntesis de 5-HETE y estimuló la actividad de la COX aumentando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Dado que el 5-HETE está involucrado en la estimulación de la secreción basal de prolactina, y que ésta es la única hormona adenohipofisaria que posee una liberación basal espontánea, es probable que la disminución de la

actividad de la LOX inducida por el NO esté mediando en parte el efecto inhibitorio tónico del NO sobre la liberación basal de prolactina.

Con respecto al metabolismo de los fosfoinosítidos, el NO inhibió la síntesis de IPs solamente en condiciones estimuladas con AngII o TRH, sin afectar la síntesis basal. La inhibición de la actividad de la PLC por NO parece involucrar un mecanismo independiente de la vía guanilil ciclasa soluble/cGMP/PKG. Además, el NO no tendría una acción directa sobre la PLC, sino que estaría modificando algún factor de la vía de transducción de señales localizado entre el receptor de membrana y la proteína G.

Por otro lado, a pesar de que el proceso de muerte celular en la adenohipófisis parece ser un proceso constante, son pocos los estudios realizados hasta el momento sobre posibles factores inductores de apoptosis en las células adenohipofisarias. Teniendo en cuenta que el NO es generado por las células adenohipofisarias, que su concentración es potencialmente alta y persistente durante los procesos inflamatorios y que está involucrado en procesos citotóxicos en distintos tipos celulares, este mensajero se perfila como un candidato fuerte para cumplir un papel activo en el proceso de muerte celular en la adenohipófisis. En el presente trabajo, se demostró la capacidad del NO de producir muerte celular con cambios morfológicos propios de un proceso apoptótico. En este proceso participarían la caspasa-3 y la caspasa-9 pero no estarían involucrados ni los eventos de nitrosilación ni la acción de los peroxinitritos. Por último, la acción proapoptótica del NO parece afectar preferencialmente a los lactotropos.

En resumen, se puede afirmar que el NO al afectar dos procesos fisiológicos importantísimos de la adenohipófisis como son la secreción hormonal y la muerte celular, puede ser considerado como un factor clave dentro los reguladores de la fisiología de la adenohipófisis.



Lic. Miguel Omar Velardez



Dra. Beatriz Haydée Duvilanski

Bibliografía

Abi-Gerges N, Fischmeister R & Mery PF. G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 2001 531 117-130.

Abi-Gerges N, Szabo G, Otero AS, Fischmeister R & Mery PF. NO donors potentiate the beta-adrenergic stimulation of $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ and the muscarinic activation of $\text{I}_{\text{K,ACh}}$ in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 2002 540 411-424.

Adams JM & Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998 281 1322-1326.

Adler V, Yin Z, Tew KD & Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 1999 18 6104-6111.

Ahlbom E, Grandison L, Zhivotovsky B & Ceccatelli S. Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 1998 139 2465-2471.

Albina JE, Cui S, Mateo RB & Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1993 150 5080-5085.

Alderton WK, Cooper CE & Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001 357 593-615.

Allen RG & Tressini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol. Med.* 2000 28 463-499.

Apud JA, Cocchi D, Locatelli V, Masotto C, Muller EE & Racagni G. Biochemical and functional aspects on the control of prolactin release by the hypothalamo-pituitary GABAergic system. *Psychoneuroendocrinology* 1989 14 3-17.

Arimura A, Dunn JD & Schally AV. Effect of infusion of hypothalamic extracts on serum prolactin levels in rats treated with Nembutal, CNS depressant or bearing hypothalamic lesions. *Endocrinology* 1972 90 378-383.

Arita J, Hashi A, Hoshi K, Mazawa S & Suzuki S. D₂ Dopamine-receptor-mediated inhibition of proliferation of rat lactotropes in culture is accompanied by changes in cell shape. *Neuroendocrinology* 1998 68 163-171.

Arzt E, Buric R, Stelzer G, Stalla J, Sauer J, Renner U & Stalla GK. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 1993 132 459-467

Asa SL, Kovacs K, Hammer GD, Liu B, Roos BA & Low MJ. Pituitary corticotroph hyperplasia in rats implanted with a medullary thyroid carcinoma cell line transfected with a corticotropin-releasing hormone complementary deoxyribonucleic acid expression vector. *Endocrinology* 1992 131 715-720.

Ascoli M, Pignataro OP & Segaloff DL. The inositol phosphate/diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. *J. Biol. Chem.* 1989 264 6674-6681.

Balakirev MY, Khramtsov VV & Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 1997 246 710-718.

Bauer CE, Elsen S & Bird TH. Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999 53 495-523.

Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 1995 75 725-748.

Beers GP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ.* 1997 4 649-661.

Beltran B, Mathur A, Duchen MR, Erusalimsky JD & Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000 97 14602-14607.

Ben-Jonathan N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 1985 6 564-589.

Ben-Jonathan N & Hnasko R. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. *Endocr. Rev.* 2001 22 724-763.

Ben Menahem D, Shraga Levine Z, Limor R & Naor Z. Arachidonic acid and lipoxigenase products stimulate gonadotropin alpha-subunit mRNA levels in pituitary alpha T3-1 cell line: role in gonadotropin releasing hormone action. *Biochemistry* 1994 33:43 12795-12799.

Bethea CL & Neill JD. Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat. *Endocrinology* 1980 107 1-5.

Bevan JS, Webster J, Burke CW & Scanlon MF. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr. Rev.* 1992 13 220-240.

Bilezikjian LM, Blount AL & Vale WW. The cellular actions of vasopressin on corticotrophs of the anterior pituitary: resistance to glucocorticoid action. *Molecular Endocrinology* 1987 1 117 451-458.

Billestrup N, Gonzalez-Manchon C, Potter E & Vale W. Inhibition of somatotroph growth and growth hormone biosynthesis by activin in vitro. *Mol. Endocrinol.* 1990 4 356-362.

Bishop N, Fawcett CP, Krulich L & McCann SM. Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology* 1972 91 643-652.

Bogdan C. Nitric oxide and immune response. *Nat. Immunol.* 2001 2 907-916.

Boockfor FR, Hoeffler JP & Frawley LS. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *Am. J. Physiol.* 1986 250 E103-E105.

Borrelli E, Sawchenko PE & Evans RM. Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992 89 2764-2768.

Borutaite V, Morkuniene R, & Brown GC. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Lett.* 2000 467 155-159.

Bosca L & Hortelano S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell. Signal.* 1999 11 239-244.

Bowie AG, Moynagh PN & O'Neill LAJ. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumor necrosis factor but not by interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *J. Biol. Chem.* 1997 272 25941-25950.

Brann DW, Bhat GK, Lamar CA & Mahesh VB. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 1997 65 385-395.

Bredt DS & Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990 87 682-685.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR & Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991 351 714-718.

Brenner C & Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 2000 289 1150-1151.

Brenner-Gati L & Gershengorn MC. Effects of thyrotropin-releasing hormone on phosphoinositides and cytoplasmic free calcium in thyrotropic pituitary cells. *Endocrinology* 1986 118 163-169.

Brown GC & Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 2001 52 189-195.

Brüne B, Mohr S & Messmer UK. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1996 127 1-30.

Brunetti L, Ragazzoni E, Preziosi P & Vacca M. A possible role for nitric oxide but not for prostaglandin E2 in basal and interleukin-1-beta-induced PRL release in vitro. *Life Sci.* 1995 56 PL277-PL283.

Buja LM, Eigenbrodt ML & Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993 117 1208-1214.

Burney S, Caulfield J, Niles J, Wishnok J & Tannenbaum S. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 1998 424 37-49.

Cameron IT & Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Hum. Reprod. Update* 1998 4 565-569.

Camoratto AM & Grandison L. Evidence supporting a correlation between arachidonic acid release and prolactin secretion from GH3 cells. *Endocrinology* 1985 116 1506-1513.

Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D & Seilicovich A. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology* 2002, en prensa.

Canonico PL, Valdenegro CA, Judd AM & MacLeod RM. Arachidonic acid metabolism and thyrotropin secretion in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1984 98 45-52.

Canonico P & MacLeod R. Angiotensin peptides stimulate phosphoinositide breakdown and prolactin release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 1986 118 233-238.

Carbajo-Pérez E & Watanabe YG. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res.* 1990 261 333-338.

Castel H & Vaudry H. Nitric oxide directly activates GABA(A) receptor function through a cGMP/protein kinase-independent pathway in frog pituitary melanotrophs. *J Neuroendocrinol.* 2001 13 695-705.

Castaño JP & Frawley LS. Individual lactotropes release prolactin in a temporally divergent and sexually dimorphic pattern. *Am. J. Physiol.* 1995 269 E814-E819.

Cavallini L, Coassin M, Borean A & Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1996 271 5545-5551.

Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L & Villar M. Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993 90 11292-11296.

Chacos N, Falck JR, Wixtrom C & Capdevila J. Novel epoxides formed during the liver cytochrome P-450 oxidation of arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982 104 916-922.

Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X & Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/Diablo. *Nature* 2000 406 855-862.

Childs G, Ellison D, Foster L & Ramaley JA. Postnatal maturation of gonadotropes in the male rat pituitary. *Endocrinology* 1981 109 1683-1692.

Childs GV, Patterson J, Unabia G, Rougeau D & Wu P. *Mol. Cell. Neurosci.* 1991 2 235-243.

Childs GV, Rougeau D & Unabia G. Corticotropin-releasing hormone and epidermal growth factor: mitogens for anterior pituitary corticotropes. *Endocrinology* 1995 136 1595-1602.

Childs GV & Unabia G. Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinology* 2001 142 847-853.

Choi YB, Tanneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HSV & Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat. Neurosci.* 2000 3 15-21.

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR & Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 282 1075-1079.

Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N & Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 1991 65 1043-1051.

Clementi E, Vecchio I, Sciorati C & Nistico G. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca²⁺ release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Mol. Pharmacol.* 1995 47 517-524.

Commoner B, Townsend J & Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954 174 689-691.

Conte D, Falaschi P, Proietti A, D'Urso R, Citarella F, Nordio M, Romanelli F, Maggi R, Motta M & Isidori A. Role of arachidonate metabolism on in vitro release of luteinizing hormone and prolactin from the anterior pituitary gland: possible involvement of lipoxygenase pathway. *Neuroendocrinology* 1986 43 428-434.

Conn PM, McArdle CA, Andrews WV & Huckle WR. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol Reprod.* 1987 36 17-35.

Cooper CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1999 1411 290-309.

Côté M, Payet MD, Dufour MN, Guillon G & Gallo-Payet N. Association of the G protein α_q/α_{11} -subunit with cytoskeleton in adrenal glomerulosa cells: Role in receptor-effector coupling. *Endocrinology* 1997 138 3299-3307.

Cotton FA & Wilkinson G. The chemistry of the main group elements. En *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed. Wiley, New York. 1988.

Cowell AM, Flower RJ & Buckingham JC. Studies on the roles of phospholipase A2 and the eicosanoids in the regulation of corticotropin secretion by rat pituitary cells in vitro. *J. Endocrinol.* 1991 130 21-32.

Curtis JF, Reddy NG, Mason RP, Kalyanaraman B & Eling TE. Nitric oxide: a prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 335 369-376.

Dada MO, Campbell GT & Blake CA. Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J. Endocrinol.* 1984 101 87-94.

Dalton TP, Shertzer HG & Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999 39 67-101.

Dan Cohen H, Sofer Y, Schwartzman ML, Natarajan RD, Nadler JL & Naor Z. Gonadotropin releasing hormone activates the lipoxygenase pathway in cultured pituitary cells: role in gonadotropin secretion and evidence for a novel autocrine/paracrine loop. *Biochemistry* 1992 31:24 5442-5448.

Das UN. Nitric oxide as a mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins and essential fatty acids. *Exp. Biol. Med.* 2002 227 88-93

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N & Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 2000 476 118-123.

Davidge ST, Baker PN, McLaughlin MK & Roberts JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ. Res.* 1995 77 274-283.

Davies KJA. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *Life* 1999 48 41-47.

De Rojas-Walkers T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS & Tannenbaum SR. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 1995 8 473-477.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M & Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP32-like proteases. *J. Exp. Med.* 1997 185 601-608. (a)

Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J & Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Cir. Res.* 1997 81 970-976. (b)

Dimmeler S, Haendeler J, Sause A & Zeiher AM. Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death. *Cell Growth Differ.* 1998 9 415-422.

Dimmeler S & Zeiher AM. Cytotoxicity, apoptosis and nitric oxide. En: Contemporary Cardiology, vol 4: Nitric oxide and the cardiovascular system. Ed.: Loscalzo J & Vita JA. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, USA, pág. 69-83, 2000.

Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, & Fisher DE. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J. Biol. Chem.* 2000 275 38905-38911.

Drapier JC. Interplay between NO and [Fe-S] clusters: Relevance to biological systems. *Methods* 1997 11 319-329.

Drewett JG & Garbers DL. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocrine Rev.* 1994 15 135-162.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002 82 47-95.

Du C, Fang M, Li Y, Li L & Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000 102 33-42.

Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC, Belova N, Retori V & McCann S. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995 92 170-174.

Duvilanski BH, Zambruno C, Lasaga M, Pisera D & Seilicovich A. Role of nitric oxide /cyclic GMP pathway in the inhibitory effect of GABA and dopamine on prolactin release. *J. Neuroendocrinol.* 1996 8 909-913.

Duvilanski BH, Velardez MO, González Iglesias A, Theas S, Seilicovich A & Becu-Villalobos D. Nitric oxide donors modify free intracellular calcium levels in rat anterior pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998 146 19-26.

Ellis R, Yuan J & Horvitz R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991 7 663-668.

Engelberg-Kulka H & Glaser G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999 53 43-70.

Ericson J, Norlin S, Jessell TM & Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998 125 1005-1015.

Estrada C, Gomez C, Martin-Nieto J, De Frutos T, Jimenez A & Villalobo A. Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem. J.* 1997 326 369-376.

Everett JW. Luteotropic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* 1954 54 685-690.

Everett JW. Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology* 1956 58 786-796.

Exton JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 1994 56 349-369.

Feelisch M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991 17 S25-S33.

Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V & Kolb-Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* 1995 155 2858-2865.

Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001 292 624-626.

Flohe L, Brigelius R, Sliou C, Traber MG & Packer L. Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radical Biol. Med.* 1997 22 1115-1126.

Fomina AF & Levitan ES. Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs. *J. Neurosci.* 1995 15 4982-4991.

Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM & Gimeno M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994 91 539-543.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000 80 1523-1631.

Fröhlich KU & Madeo F. Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* 2000 473 6-9.

Galpin JR, Veldink GA, Vliegenthart JFG & Boldingh J. The interaction of nitric oxide with soybean lipoxygenase-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1978 536 356-362.

Gardner PR, Costantino G, Szabo C & Salzman AL. Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J. Biol. Chem.* 1997 272 25071-25076.

Garthwaite J, Charles SL & Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 1988 336 385-388.

Geary ES, Lim M, Ceda GP, Ro S, Rosenfeld RG & Hoffman AR. Tri-iodothyronine regulates insulin-like growth factor-1 binding to cultured rat pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* 1989 1 179-184.

Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C & Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* 1995 95 1884-1890.

Gershengorn MC. Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 1986 48 515-526.

Gertz BJ, Contreras LN, McComb DJ, Kovacs K, Tyrrell JB & Dallman MF. Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology* 1987 120 381-388.

Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, & Morrison RS. p38 MAP kinase mediates Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J. Cell Biol.* 2000 150 335-347.

Giulivi C, Poderoso J & Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol.Chem.* 1998 273 11038-11043.

Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen T, Malik A & Bahou W. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J. Cell. Physiol.* 1994 158 485-494.

Goodwin DC, Gunther MR, Hsi LC, Crews BC, Eling TE, Mason RP & Marnett LJ. Nitric oxide trapping of tyrosil radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover: detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J. Biol. Chem.* 1998 273 8903-8909.

Goodwin DC, Landino LM & Marnett LJ. Reactions of prostaglandin endoperoxide synthase with nitric oxide and peroxynitrite. *Drug Metab. Rev.* 1999 31 273-294.

Gourdji D, Bataille D, Vauclin N, Grouselle D, Rosselin G & Tixier-Vidal A. Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH3/B6). Additive effects of VIP and TRH on PRL release. *FEBS Lett.* 1979 104 165-168.

Gow AJ & Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998 391 169-173.

Green DR & Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998 281 1309-1312.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B & Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000 20 2175-2183. (a)

Griendling KK, Sorescu D & Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 2000 86 494- 501. (b)

Gulyas M, Pusztai L, Rapay G & Makara GB. Pituitary corticotrophs proliferate temporally after adrenalectomy. *Histochemistry* 1991 96 185-189.

Gunther MR, Hsi LC, Curtis JF, Gierse JK, Marnett LJ, Eling TE & Mason R. Nitric oxide trapping of the tyrosil radical of prostaglandin H synthase -2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J. Biol. Chem.* 1997 272 17086-17090.

Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM & Dimmeler S. Effects of redox-related congeners on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1997 1 282-293.

Haggi ES, Torres AI, Maldonado CA & Aoki A. Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *J. Endocrinol.* 1986 111 367-373.

Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956 11 298-300.

Harman D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981 78 7124-7128.

Hashi A, Mazawa S, Chen S, Yamakawa K, Kato J & Arita J. Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1996 137 3246-3252.

Hashimoto K, Nishioka T, Tojo C & Takao T. Nitric oxide plays no role in ACTH release induced by interleukin-1-beta, corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin and phorbol myristate acetate in rat pituitary cell cultures. *Endocr. J.* 1995 42 435-439.

Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI & Ostvold AC. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* 1999 274 7467-7473.

Hayashi I & Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* 1976 259 132-134.

Hebestreit H, Dibbert B, Balatti I, Braun D, Schapowal A, Blaser K & Simon HU. Disruption of fas receptor signaling by nitric oxide in eosinophils. *J. Exp. Med.* 1998 187 415-425.

Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U & Klockgether T. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 1998 71 88-94.

Hentges S, Boyadjieva N, & Sarkar DK. Transforming growth factor- β 3 stimulates lactotrope cell growth by increasing basic fibroblast growth factor from folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 2000 141 859-867.

Hermann C, Zeiher AM & Dimmeler S. Shear stress-induced up-regulation of superoxide dismutase inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of endothelial cells. *Circulation* 1997 96 2732.

Herrero MB & Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J. Androl.* 2001 22 349-356.

Herrlich P & Böhmer FD. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* 2000 59 35-41.

Hibbs JBJ, Taintor RR & Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987 235 473-476.

Hintze TH. Prologue: Nitric oxide - hormones, metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 2001 281 H2253-H2255.

Holzhütter HG, Wiesner R, Rathmann J, Stösser R & Kühn H. A kinetic model for the interaction of nitric oxide with mammalian lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 1997 245 608-616.

Hope HR & Pike LJ. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol. Biol. Cell* 1996 7 843-851.

Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L & Kroemer G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997 410 373-377.

Hrabie JA, Klose JR, Wink DA & Keefer LK. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.* 1993 58 1472-1476.

Hsieh KP & Martin TF. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q and G₁₁. *Mol. Endocrinol.* 1992 6 1673-1681.

Huie RE & Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* 1993 18 195-199.

Hunt TE. Mitotic activity in the anterior hypophysis of female rats of different age groups and at different periods of the day. *Endocrinology* 1943 32 334-339.

Hymer WC, Mastro A & Griswold E. DNA synthesis in the rat anterior pituitary of the male rat: effect of castration and photoperiod. *Science* 1970 167 1629-1630.

Ignarro LJ & Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Pharmacol. Toxicol.* 1985 25 171-191.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrnes RE & Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987 84 9265-9269.

Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: Regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin. Hematol.* 1989 26 63-76.

Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 1991 41 485-490.

Ignarro LJ. Haem-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: A widespread signal transduction mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 1992 20 465-469.

Inoue K & Kurosumi K. Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration. Immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Jpn.* 1981 44 71-85.

Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B & Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* 1998 32 459-466.

Jahn GA, Burdman JA & Deis RP. Regulation of pituitary DNA synthesis during different reproductive states in the female rat: role of estrogen and prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1984 35 113-119.

Jaiswal M, LaRusso NF & Gores GJ. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am. J. Physiol.* 2001 281 G626-G634.

Juckett MB, Balla G, Jessurun J, Jacob HS & Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *J. Pathol.* 1995 147 782-789.

Judd AM, Spangelo BL, Ehreth JT & MacLeod RM. A possible role for lipoxygenase and epoxygenase arachidonate metabolites in prolactin release from pituitary cells. *Neuroendocrinology* 1988 48 407-416.

Kamata H & Hirata H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal* 1999 11 1-14.

Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K & Miyamoto E. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH₃ cells. *Biol. Reprod.* 2000 62 1486-1494.

Kanematsu S & Sawyer CH. Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. *Endocrinology* 1973 93 238-241.

Kasai H & Petersen OH. Spatial dynamics of second messengers: IP₃ and cAMP as long-range and associative messengers. *TINS* 1994 17 95-101.

Katayama T, Shiota K & Takahashi M. Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1990 69 179-185.

Kato M. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992 131 2133-2138.

Kawamata Y, Fujii R, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Hinuma S, Kitada C, Onda H, Nishimura O & Fujino M. Analyses for susceptibility of rat anterior pituitary cells to prolactin-releasing peptide. *Endocrine* 2000 12 215-221.

Keefer LK, Nims RW, Davies KM & Wink DA. "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 1996 268 281-293.

Kerr RO, Cardamone J, Dalmaso AP & Kaplan ME. Two mechanisms of erythrocyte destruction in penicillin-induced hemolytic anemia. *N. Engl. J. Med.* 1972 287 1322-1325.

Kim PK, Zamora R, Petrosko P & Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 2001 1 1421-1441.

Kim WK, Choi YB, Rayudu PV, Das P, Asaad W, Arnelle DR, Stamler JS & Lipton SA. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron* 1999 24 461-469.

Kim YM, Bergonia H & Lancaster JR Jr. Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1995 374 228-232.

Kim YM, De Vera ME, Watkins SC & Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 1997 272 1402-1411.

Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA & Hardwick JM. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 1999 274 21155-21161.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMG & Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989 86 5159-5162.

Koike K, Judd AM & MacLeod RM. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid increases prolactin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1985 116 1813-1817.

Komalavilas P & Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* 1996 271 21933-21938.

Koshiyama H & Tashjian AH Jr. Control of intracellular calcium redistribution by guanine nucleotides and inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized GH₄C₁ cells. *Endocrinology* 1991 128 2715-2722.

Kühn H & Thiele BJ. Arachidonate 15-lipoxygenase. *J. Lipid Mediat. Cell Signal* 1995 12 157-70.

Kunert-Radek J & Pawlikowski MH. The effect of thyrotropin releasing hormone on cell proliferation in the anterior pituitary gland of thyroidectomized rats. *Neuroendocrinology* 1975 17 92-95.

Lamberts SWJ & MacLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.* 1990 70 279-318.

Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS & Edens WA. Novel homologs of gp91 phox. *Trends Biochem. Sci.* 2000 25 459-461.

Lander HM, Sehajpal PK & Novogrodsky A. Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins. *J. Immunol.* 1993 151 7182-7187.

Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R & Novogrodsky A. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J. Biol. Chem.* 1995 270 7017-7020.

Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, Hajjar DP, Hempstead BL, Schwartz GD, Kraemer RT, Mirza UA, Chait BT, Burk SC & Quilliam LA. Redox regulation of cell signalling. *Nature* 1996 381 380-381.

Langer G, Ferin M & Sachar E. Effect of haloperidol and L-dopa on plasma prolactin in stalk-sectioned and intact monkeys. *Endocrinology* 1973 102 367-370.

Lee EJ, Duan WR, Jakacka M, Gehm BD & Jameson JL. Dominant negative ER induces apoptosis in GH(4) pituitary lactotrope cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Endocrinology* 2001 142 3756-3763.

Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S & Nicotera P. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp. Cell Res.* 1999 249 396-403.

Lenkei Z, Nuyt AM, Grouselle D, Corvol P & Llorens-Cortes C. Identification of endocrine cell populations expressing the AT1B subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology* 1999 140 472-477.

Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis P, Ashton DS & Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J. Biol. Chem.* 1991 266 23790-23795.

Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1997 272 16709-16712.

Lewis RS & Deen WM. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions. *Chem. Res. Toxicol.* 1994 7 568-574.

Li H, Brodsky S, Basco M, Romanov V, De Angelis DA & Goligorsky MS. Nitric oxide attenuates signal transduction: possible role in dissociating caveolin-1 scaffold. *Circ. Res.* 2001 88 229-236.

Li J, Billiar TR, Talanian RV & Kim YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 240 419-424.

Li Z, Chapleau MW, Bates JN, Bielefeldt K, Lee HC & Abboud FM. Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. *Neuron* 1998 20 1039-1049.

Liang Y, Nylander KD, Yan C & Schor NF. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* 2002 61 142-149.

Lieberman ME, Maurer RA, Claude P & Gorski J. Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: regulation by estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982 25 277-294.

Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A & Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993 72 269-278.

Lloyd HM, Meares JD & Jacobi J. Effects of oestrogen and bromocryptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature* 1975 255 497-498.

Lowry OH, Rosebrough NJ & Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951 193 265-275.

Lozach A, Garrel G, Lerrant Y, Berault A & Counis R. GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998 143 43-51.

Lux-Lantos V, Rey E & Libertun C. Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 1992 56 687-693.

Lyons RC, Orloff GJ & Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 1992 267 6370-6374.

MacLeod RM & Lehmeyer JE. Suppression of pituitary tumor growth and function by ergot alkaloids. *Cancer Res.* 1973 33 849-855.

Maccarrone M, Corasaniti MT, Guerrieri P, Nistico G & Agro AF. Nitric oxide-donor compounds inhibit lipoxigenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 219 128-133.

Maccarrone M, Putti S & Finazzi-Agrò A. Nitric oxide donors activate the cyclo-oxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *FEBS Lett.* 1997 410 470-476.

Mallis RJ, Buss JE & Thomas JA. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem. J.* 2001 355 145-153.

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E & Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994 79 1137-1146.

Mannick JB, Miao XQ & Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997 272 24125-24128.

Mastro A, Shelton E & Hymer WC. DNA synthesis in the rat anterior pituitary. *J. Cell Biol.* 1969 43 626-629.

Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A & Inoue K. Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 1993 133 2150-2155.

Matsushita N, Kato Y, Shimatsu A, Katakami H, Yanaihara N & Imura H. Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sci.* 1983 32 1263-1269.

Matsuyama S, Nouraini S & Reed JC. Yeast as a tool for apoptosis research. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999 2 618-623.

Mau SE, Larsen PJ, Mikkelsen JA & Saermark T. Substance P and related tachykinins induce receptor-mediated hydrolysis of polyphosphoinositides in the rat anterior pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1990 69 69-78.

Mau SE, Witt MR, Bjerrum OJ, Saermark T & Vilhardt H. Growth hormone releasing hexapeptide (GHRP-6) activates the inositol (1,4,5)-trisphosphate/diacylglycerol pathway in rat anterior pituitary cells. *J. Recept. Sign. Transd. Res.* 1995 15 311-323.

Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J & Cunha SR. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 2000 55 237-267.

McAndrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ & Kudlow JE. Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology* 1995 136 4479-4488.

McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S & Rettori V. The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp. Gerontol.* 1998 33 813-826.

McDaniel ML, Corbett JA, Kwon G & Hill JR. A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997 426 313-319.

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G & Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997 388 432-433.

Messmer UK, Reed JC & Brüne B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996 271 192-197.

Messmer UK & Brüne B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* 1996 319 299-305.

Meszaros LG, Minarovic I & Zahradnikova A. Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *FEBS Lett.* 1996 380 49-52.

Miller LJ & Marx J. Apoptosis. *Science* 1998 281 1301.

Missale C, Boroni F, Frassine M, Caruso A & Spano P. Nerve growth factor promotes the differentiation of pituitary mammotroph cells in vitro. *Endocrinology* 1995 136 1205-1213.

Mittal CK & Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977 74 4360-4364.

Moll UM & Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.* 2001 493 65-69.

Moncada S, Palmer RMJ & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991 43 109-142.

Monteiro HP & Stern A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radical Biol. Med.* 1996 21 323-333.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B & Munari Silem Y. Cell-to cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 1996 137 3356-3367.

Moriya R, Uehara T & Momura Y. Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 2000 484 253-260.

Morteau O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2000 48 473-480.

Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M & Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: Endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.* 1996 270 H107-H114.

Murakami M, Kambe T, Shimbara S & Kudo I. Functional coupling between various phospholipase A_2 s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 1999 274 3103-3115.

Nakatsuka M & Osawa Y. Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 200 1630-1634.

Naor Z. Signal transduction mechanisms of Ca^{2+} mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.* 1990 11 326-353.

Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 6 3051-3064.

Neill JD. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1970 87 1192-1197.

Neill JD, Freeman ME & Tillson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* 1971 89 1148-1153.

Neill JD. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. En: *frontiers in Neuroendocrinology*. Ed.: Martini L & Ganong WF. New York, Raven, pág. 129-155, 1980.

Nelson MJ. The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxigenase-1. *J. Biol. Chem.* 1987 262 12137-12142.

Nguyen BL, Saitoh M & Ware JA. Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am. J. Physiol.* 1991 261 H1043-H1052.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS & Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992 89 3030-3034.

Nicholls DG & Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 2000 80 315-360.

Nishio E & Watanabe Y. NO induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. *Life Sci.* 1998 62 239-245.

Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL & Levy A. Anterior pituitary cell population control: Basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J. Neuroendocrinol.* 1998 10 207-215.

Nouët JC & Kujas M. Variations of mitotic activity in the adenohypophysis of male rats during a 24-hour cycle. *Cell Tissue Res.* 1975 164 193-200.

O'Donnell VB, Taylor KB, Parthasarathy S, Kühn H, Koesling D, Freibe A, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM & Freeman BA. 15-lipoxygenase catalytically consumes nitric oxide and impairs activation of guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1999 274 20083-20091.

O'Donnell VB & Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways. Implications for vascular disease. *Circ. Res.* 2001 88 12-21.

Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T & Morii S. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: Influences of sex, estrous cycle and circadian change. *Anat. Rec.* 1993 235 111-120.

Okere CO, Murata E & Higuchi T. Perivascular localization of nitric oxide synthase in the rat adenohypophysis: potential implications for function and cell-cell interaction. *Brain Res.* 1998 784 337-340.

Paez-Pereda M, Ledda MF, Goldberg V, Chervín A, Carrizo G, Molina H, Müller A, Renner U, Podhajcer O, Arzt E & Stalla GK. High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2000 85 263-269.

Page R. The anatomy of the hipothalamus-hipophysial complex. En: *The phisiology of reproduction. 2nd ed.* Ed: Knobil E & Neill J. Raven Press, New York. 1994.

Pagotto U, Arzberger T, Ciani E, Lezoualc'h F, Pilon C, Journot L, Spengler D & Stalla GK. Inhibition od zac1, a new gene differentially expressed in the anterior pituitary, increases cell proliferation. *Endocrinology* 1999 140 987-996.

Palacios M, Knowles RG, Palmer RMJ & Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989 165 802-809.

Pallone TL & Mattson DL. Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2002 11 93-98.

Palmer RMJ, Ferrige AG & Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 327 524-526.

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS & Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988 153 1251-1256.

Peters-Golden M. Cell biology of 5-lipoxygenase pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998 157 S227-S232.

- Phelps CJ. Immunocytochemical analysis of prolactin cells in the adult rat adenohypophysis: Distribution and quantitation relative to sex and strain. *Am. J. Anat.* 1986 176 233-242.
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S & Bours B. Multiple redox regulation in NF- κ B transcription factor activation. *Biol. Chem.* 1997 378 1237-1245.
- Pike LJ & Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem.* 1996 271 26453-26456.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schopfer F & Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and sub-mitochondrial particles. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1996 6 715-716.
- Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD & Dieguez C. Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2000 141 2113-2119.
- Porter TE, Hill JB, Wiles CD & Frawley LS. Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-secreting cells? suggestive evidence from virgin, gestating, and lactating rats. *Endocrinology* 1990 127 2789-2794.
- Prasad RK, Behrooz A & Ismail-Beigi F. LY-83583 stimulates glucose transporter-1-mediated glucose transport independent of changes in cGMP levels. *Eur. J. Pharmacol.* 1999 366 101-109.
- Prast H & Philippu A. Nitric oxide as a modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 2001 64 51-68.
- Pryor WA, Church DF, Govidan CK & Crank G. Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: Synthetic utility and toxicological implications. *J. Org. Chem.* 1982 47 156-159.

Pryor-Jones RA, Silverlight JJ & Jenkins JS. Oestradiol, vasoactive intestinal peptide and fibroblast growth factor in the growth of human pituitary tumor cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* 1989 120 171-177.

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL & Dawson TM. Role of neuronal NO in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 93 4565-4571.

Pu HF, Tau SK, Chen HL, Jea JC & Liu TC. Muscarinic regulation of basal versus thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin secretion in rat anterior pituitary cells. Differential roles of nitric oxide and intracellular calcium mobilization. *Neuroendocrinology* 1999 70 324-331.

Quintanar-Stephano A & Valverde C. Mitogenic effects of thyroxine and TRH on thyrotrophs and somatotrophs of the anterior pituitary gland in thyroidectomized rats. *J. Endocrinol.* 1997 154 149-153.

Racagni G, Apud JA, Locatelli V, Cocchi D, Nistico G, di Giorgio RM & Muller EE. GABA of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. *Nature* 1979 281 575-578.

Radmark OP. The Molecular Biology and Regulation of 5-Lipoxygenase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000 161 S11-S15.

Radomski MW, Palmer RMJ & Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987 92 639-646.

Ragsdale RO. Reactions of nitrogen (II) oxide. En *Developments in Inorganic Nitrogen Chemistry* (C. B. Colburn, ed.) Vol. 2. Elsevier, New York. 1973.

Rawlings SR & Hezareh M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr. Rev.* 1996 17 4-29.

Ray D & Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr. Rev.* 1997 18 206-228.

Roh M, Paterson AJ, Asa SL, Chin E & Kudlow JE. Stage-sensitive blockade of pituitary somatomammotrope development by targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 2001 15 600-613.

Ross PC, Judd AM & MacLeod RM. The dynamics of arachidonic acid liberation and prolactin release: A comparison of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin II, and neurotensin stimulation in perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1988 123 2445-2453.

Roudbaraki MM, Vacher P & Drouhault R. Arachidonic acid increases cytosolic calcium and stimulates hormone release in rat lactotrophs. *Am. J. Physiol.* 1995 268 E1215-E1223.

Roudbaraki MM, Drouhault R, Bacquart T & Vacher P. Arachidonic acid-induced hormone release in somatotropes: involvement of calcium. *Neuroendocrinology* 1996 63 244-256.

Rubbo H, Parthasarathy S, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M & Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995 324 15-25.

Ruvkun G. Cell signalling. A molecular growth industry. *Nature* 1992 360 711-712.

Sagar SM & Ferreiro DM. NADPH diaphorase activity in the posterior pituitary: relation to neuronal function. *Brain Res.* 1987 400 348-352.

Sakai T, Inoue K, Hasegawa Y & Kurosumi K. Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1988 122 2803-2808.

Sakuma S, Shirasawa N & Yoshimura F. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohipophysal cells in immature and mature castrated rats. *J. Endocrinol.* 1984 100 323-328.

Salerno JC & Siedow JN. The nature of nitric oxide complexes of lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1979 579 246-251.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG & Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993 90 7240-7244.

Salvemini D, Currie MG & Mollace V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation: a key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J. Clin. Invest.* 1996 97 2562-2568.

Salvesen GS & Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nature Rev.* 2002 3 401-410.

Samuelsson B, Rouzer CA & Matsumoto T. Human leukocyte 5-lipoxygenase: an enzyme possessing dual enzymatic activities and a multicomponent regulatory system. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 1987 17 1-11.

Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA & Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987 237 1171-1176.

Santolini J, Adak S, Curran CM & Stuehr DJ. A kinetic simulation model that describes catalysis and regulation in nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2001 276 1233-1243.

Sarkar DK, Gottschall PE & Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982 218 684 – 686.

Sawangjaroen K & Curlewis JD. Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 1994 6 549-55.

Schramme C & Deneff C. Stimulation of prolactin release by angiotensin II in superfused rat anterior pituitary cell aggregates. *Neuroendocrinology* 1983 36 483-485.

Schulze-Osthoff K, Schenk H & Dröge W. Effects of thioredoxin on activation of transcription factor NF- κ B. *Methods Enzymol.* 1995 252 253-264.

Schwartz J. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr. Rev.* 2000 21 488-513.

Semenza GL. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2000 88 1474 1480.

Sen CK & Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996 10 709-720.

Shaar CJ & Clemens JA. The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. *Endocrinology* 1974 95 1202.

Shaul PW & Anderson RG. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* 1998 275 L843-L851.

Shen YH, Wang XL & Wilcken DEL. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett.* 1998 433 125-131.

Shinkai T & Ooka H. Effect of angiotensin II on the proliferation of mammothrophs from the adult rat anterior pituitary in culture. *Peptides* 1995 16 25-29.

Shirasawa N & Yoshimura F. Immunohistochemical and electron micorscopic studies of mitotic adenohipophysial cells in different ages of rats. *Anat. Embryol.* 1982 165 51-61.

Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am. J. Med.* 1999 106 37S-42S.

Smith WL, Garavito RM & DeWitt DL. Prostaglandins endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996 271 33157-33160.

Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, LohmannSM & Walter U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1988 358 134-139.

Sokal RR & Rahlf FJ. *Biometry 3th Ed. Freeman.* 1995.

Song J, Jin L & Lloyd RV. Effects of estradiol on prolactin and growth hormone messenger RNAs in cultured normal and neoplastic (MtT/W15 and GH₃) rat pituitary cells. *Cancer Res.* 1989 49 1247-1253.

Stahl JH, Kendall SK, Brinkmeier ML, Greco TL, Watkins-Chow DE, Campos-Barros A, Lloyd RV & Camper SA. Thyroid hormone is essential for pituitary somatotropes and lactotropes. *Endocrinology* 1999 140 1884-1892.

Stamler JS, Single D & Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992 258 1898-1902. (a)

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki D, Michel T, Singel DJ & Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992 89 444-448. (b)

Stamler JS. Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994 78 931-936.

Stamler JS & Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 2001 81 209-237.

Stasch JP, Becker EM, Alija CA, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleib U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A & Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001 410 212-215.

Stefana B, Ray DW & Melmed S. Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immuno-neuroendocrine phenotypic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 93 12502-12506.

Steipen H, Karasek E & Pawlikowski MH. Effect of adrenalectomy and hydrocortisone on DNA synthesis in the rat anterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987 100 1531-1536.

Stratmann IE, Ezrin C, Kovacs K & Sellers EA. Effect of TRH (thyrotropin-releasing hormone) on the fine structure and replication of TSH and prolactin cells in the rat. *Z. Zellforsch.* 1973 145 23-37.

Stuehr DJ & Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1992 65 287-346.

Sugiura Y & Matsumoto T. Nucleotide-selective cleavage of duplex DNA by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 211 748-753.

Sung YJ & Dietert RR. Nitric oxide (NO)-induced mitochondrial injury among chicken .NO-generating and target leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1994 56 52-58.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM & Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999 397 441-446.

Takahashi S, Okazaki K & Kawashima S. Mitotic activity of prolactin cells in pituitary gland of male and female rats at different ages. *Cell Tissue Res.* 1984 235 497-502.

Takahashi S. Development and heterogeneity of prolactin cells. *Int. Rev. Cytol.* 1995 157 33-98.

Tashjian AHJ, Barowsky NJ & Jensen DK. Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971 43 516-523.

Tatoyan A & Giulivi C. Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998 273 11044-11048.

Taylor CW. Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1998 1436 19-33.

Tayeh MA & Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 1989 264 19654-19658.

Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez D & Aguilar E. Involvement of endogenous nitric oxide in the control of pituitary responsiveness to different elicitors of growth hormone release in prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 1996 64 146-152.

Terkel J, Blake CA & Sawyer CH. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 1972 91 49-53.

Theas S, Pisera D, Duvilanski B, De Laurentiis A, Pampillo M, Lasaga M & Seilicovich A. Estrogens modulate the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary cell proliferation and prolactin release. *Endocrine* 2000 12 249-255.

Theas S, De Laurentiis A, Candolfi M, Lopez SL, Carrasco AE, Zaldivar V, Seilicovich A. Nitric oxide mediates the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on prolactin release. *Neuroendocrinology* 2001 74 82-86.

Thornberry NA & Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998 281 1312-1316.

Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, Mulichak AM, Malkowski MG, Garavito RM & Smith WL. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J. Biol. Chem.* 2001 276 10347-10359.

Tilemans D, Andries M & Denef C. Possible involvement of an EGF-like mitogen in the postnatal development of lactotrophs in rat pituitary. *Endocr. J.* 1993 1 329-335.

Tsai AL, Wei C & Kulmacz RJ. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994 313 367-372.

Tsai AL. How does NO activate heme proteins? *FEBS Lett.* 1994 341 141-145.

Turnbull AV & Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997 215 1-10.

Vacher P, McKenzie J & Dufy B. Complex effects of arachidonic acid and its lipoxygenase products on cytosolic calcium in GH₃ cells. *Am. J. Physiol.* 1992 263 E902-E912.

Vankelecom H, Matthys P & Denef C. Involvement of nitric oxide in the interferon-gamma-induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell cultures. *Mol. Cell Endocrinol.* 1997 129 157-167. (a)

Vankelecom H, Matthys P & Denef C. Inducible nitric oxide synthase in the anterior pituitary gland: induction by interferon-gamma in a subpopulation of folliculostellate cells and in an unidentifiable population of non-hormone-secreting cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1997 45 847-857. (b)

Van't Hof RJ & Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001 103 255-261.

Vaux DL & Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999 96 245-254.

Velardez MO, De Laurentiis A, Díaz MC, Lasaga M, Pisera D, Seilicovich A & Duvilanski BH. Role of phosphodiesterase and protein kinase G on nitric oxide-induced inhibition of prolactin release from the rat anterior pituitary. *Eur. J. Endocrinol.* 2000 143 279-284.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000 102 43-53.

Vijayan E & McCann SM. In vivo and in vitro effects of substance P and neurotensin on gonadotropin and prolactin release. *Endocrinology* 1979 105 64-68.

Vincent SR & Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci.* 1992 46 755-784.

Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 2002 296 1635-1636.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC & Hammill LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 1994 78 343-352.

Weinberg JB. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol. Res.* 2000 22 319-341.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA & Raybuck SA. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme *Nature* 1994 370 270-275.

Wiklund J, Wertz N & Gorski J. A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology* 1981 109 1700 – 1707.

Wolin MS, Burke-Wolin TM & Mohazzab-H KM. Roles of NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir. Physiol.* 1999 115 229-238.

Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Canteros G, McCann SM, Gold PW & Licinio J. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat. Med.* 1996 2 581-584.

Woodcock EA. Inositol phosphates and inositol phospholipids: how big is the iceberg? *Mol. Cell. Endocrinol.* 1997 127 1-10.

Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980 68 251–306.

Wynick D, Hammond PJ, Akinsanya KO & Bloom SR. Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. *Nature* 1993 364 529-532.

Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM & Liu M. Phosphorylation and regulation of G-protein activated phospholipase C- β 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2001 276 19770-19777.

Yabuli M, Kariya S, Ishisaka R, Yasuda T, Yoshioka T, Horton AA, & Utsumi K. Resistance to nitric oxide-mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase. *Free Radic. Biol. Med.* 1999 26 325-332.

Yago MD, Manas M, Ember Z & Singh J. Nitric oxide and the pancreas: morphological base and role in the control of the exocrine pancreatic secretion. *Mol. Cell. Biochem.* 2001 219 107-120.

Yajima Y & Saito T. The effects of epidermal growth factor on cell proliferation and prolactin production by GH₃ rat pituitary cells. *J. Cell. Physiol.* 1984 120 249-256.

Yau KW. Cyclic nucleotide-gated channels: An expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994 91 3481-3483.

Yin D, Tamaki N, Kokunai T, Yasuo K & Yonezawa K. Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationship to p53 and bcl-2 expression. *J. Clin. Neurosci.* 1999 6 326-331.

Yin P & Arita J. Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 2000 72 72-79

Yoshimoto T & Yamamoto S. Arachidonate 12-lipoxygenase. *J. Lipid Mediat. Cell Signal* 1995 12 195-212.

Yu K, Ashworth R & Hinkle PM. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid* 1998 8 887-894.

Yu WH, Walczewska A, Karanth S & McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997 138 5055-5058.

Zagotta WN & Seigelbaum SA. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996 19 235-263.

Zeitler P & Siriwardana G. Stimulation of mitogen-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* 2000 12 257-264.

Zheng TS, Hunot S, Kuida K & Flavell RA. Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* 1999 6 1043-1053.

Zhu H & Bunn HF. Oxygen sensing and signaling: Impact on the regulation of physiologically important genes. *Respir. Physiol.* 1999 115 239-247.

Ziche M & Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 2000 50 139-148.

Inodoro Pereyra

por Fontanarrosa

INODORO PEREYRA
"EL RENEGAU"
 poema telúrico
 de Fontanarrosa

Soy biólogo, Pereyra, y ya
 recogí una enorme
 cantidad de insectos

¿En el campo?
 No. En su catre



Es la hospitalidad críoya...
 Es cierto. Usted me
 brindó su rancho

No. La hospitalidad que
 brinda un catre al
 insecto desamparado



¡Después dicen que en
 el campo no hay vida
 nocturna! Pero la
 movida está en la
 almohada. Liendres,
 piojos, vinchucas,
 animalitos
 querendones



¡Gueno... El Mendieta, por ejemplo
 está yeno de insectos. Y los
 insectos yenos de bacilos. Y los
 bacilos yenos de virus. Mendieta
 no es un perro. Es un
 ecosistema



Yo sigo los pasos de
 Darwin
 ¡Jodido porque
 Darwin anduvo
 mucho por el mar
 Las botas le quedaron
 a la miseria!



¿Cual es su apeyido?
 Braddock
 ¿Del norte de Italia?
 No. De Inglaterra
 ¿E Inglaterra no
 queda al norte de
 Italia?



Sudamérica es
 interesante. El
 hundimiento de la
 Atlántida separó
 especies, como el
 camello del guanaco
 ¿Eso se solucionaba
 con un alambrado



¿Había que hundir un continente pa
 separar los?; Dígame si era necesaria
 semejante catástrofe solo porque el
 guanaco escupe!



Pero ahora ando buscando una
 planta cigofilácea espinosa
 ¡Gueno... Al Tape Espinosa
 lo conozco... Pero a ese no
 se lo acepta ningún Museo



¿Usted podría describirme la
 zona, a vuelo de pájaro?
 ¡Abuelo de pájaro, padre de
 cascarrudo, tío de cuís...
 Tuitas las alimañas me son
 familiares



Vea... Esta
 es la
 planta
 ¡Almalaya!; Es la circularis
 pinchudus, el conocido
 abtojo!



Y no lo busque más, mi
 amigo; Fica' tiene uno
 priéndido a sus mechas como
 lechón a la teta!
 Oh God!



¡Fisi son estos científicos,
 Mendieta... Ven el virus en el
 organismo ajeno...
 ...y no ven el abtojo en la
 pelambre propia

