



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales



# Efectos del cadmio sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal adenohipofisaria, mecanismos de acción

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
de Ciencias Biológicas.

**Autor:** Lic. Ariel H. Benitez Poliandri

**Director de tesis:** Dra. Beatriz H. Duvilanski

**Consejero de Estudios:** Dr. Osvaldo D. Uchitel



Cátedra de Química Biológica Patológica,  
Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2006.

# **Efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal adenohipofisaria, mecanismos de acción.**

## **Resumen**

Antecedentes: El Cd<sup>2+</sup> es un importante contaminante ambiental. Desde el punto de vista endocrinológico se conoce que afecta los niveles séricos de hormonas adenohipofisarias en humanos, pero su mecanismo de acción permanece desconocido.

Objetivos: Estudiar los mecanismos de acción del Cd<sup>2+</sup> sobre la adenohipófisis utilizando un modelo de células en cultivo. Validar el modelo *in vitro* realizando estudios *in vivo*. Evaluar posibles estrategias terapéuticas.

Resultados: El Cd<sup>2+</sup> afectó de manera directa la viabilidad y la liberación de prolactina de las células adenohipofisarias. El Cd<sup>2+</sup> produjo estrés oxidativo y aumento de los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup>. Distintos antioxidantes redujeron su efecto, tanto sobre la viabilidad como sobre la liberación hormonal. El Cd<sup>2+</sup> aumentó la producción de NO, el cual fue citoprotector. El tratamiento *in vivo* con Cd<sup>2+</sup> causó estrés oxidativo en la hipófisis y el hipotálamo y también aumentó la expresión de las óxido nítrico sintasas (NOS)1 y 2. La melatonina previno el daño oxidativo pero no los cambios a nivel hormonal.

Conclusiones: El estrés oxidativo parece ser el principal mediador de los efectos citotóxicos del Cd<sup>2+</sup> *in vitro*. El modelo *in vitro* parece reproducir los efectos *in vivo* del Cd<sup>2+</sup>. Aunque la melatonina previno el daño oxidativo no hizo lo mismo con

los cambios a nivel hormonal. Esto sugiere que otros mecanismos estarían involucrados en el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la liberación hormonal *in vivo*. Aun así, los antioxidantes podrían servir, potencialmente, para el tratamiento de las intoxicaciones con  $\text{Cd}^{2+}$ .

Palabras Claves: cadmio, adenohipófisis, hormonas, hipotálamo, estrés oxidativo, apoptosis, óxido nítrico.

# Effects of Cd<sup>2+</sup> on anterior pituitary cell viability and hormone release, mechanisms of action.

## Abstract

Background: Cd<sup>2+</sup> is an important environmental contaminant. Regarding the endocrine system, it is known that this metal affects serum levels of pituitary hormones in humans, but its mechanisms of action remain unknown.

Objectives: To study, in a cell culture model, the mechanisms of action of Cd<sup>2+</sup> in the anterior pituitary. To validate the *in vitro* model performing *in vivo* studies. To evaluate possible therapeutic strategies.

Results: Cd<sup>2+</sup> affected, in a direct way, the viability and prolactin release of anterior pituitary cells. Cd<sup>2+</sup> caused oxidative stress and increased cytosolic levels of Ca<sup>2+</sup>. Different antioxidants were able to reduce the effect of the metal both on cell viability and prolactin release. Cd<sup>2+</sup> increased NO production and this molecule reduced the cytotoxicity caused by the metal. *In vivo* treatment with Cd<sup>2+</sup> caused oxidative stress and increased the expression of nitric oxide synthase (NOS)1 and 2. Melatonin treatment effectively prevented Cd<sup>2+</sup>-induced oxidative stress but not the hormonal changes.

Conclusions: Oxidative stress seems to be a mediator of Cd<sup>2+</sup> cytotoxicity *in vitro*. The *in vitro* model seems correlates with the effects of Cd<sup>2+</sup> *in vivo*. Even when melatonin prevented *in vivo* Cd<sup>2+</sup>-induced oxidative stress it did not prevented changes in hormonal levels. This may suggest that factors other than oxidative

stress might influence the effects of  $\text{Cd}^{2+}$  on hormones release *in vivo*. Nonetheless, antioxidants may well be useful to reduce treat  $\text{Cd}^{2+}$  intoxications.

Key Words: cadmium, anterior pituitary, hormones, hypothalamus, oxidative stress, apoptosis, nitric oxide.

## **Agradecimientos**

A Beatriz, por su INFINITA paciencia, por su entusiasmo y por todo lo que va más allá de la ciencia y el trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Mi sensei (sigue siéndolo) el Dr. Velardez, El Horaciada, mi amiga personal Lety, Fernanda, Jimena, mi editora Nury y a Fede, que es mi pollo.

A mis compañeros y amigos de la cátedra, por toda su ayuda desinteresada (no los nombro a todos porque son muchos pero ellos saben que los quiero). Especialmente a los Drs. Soto y Pasquini que construyeron esta cátedra donde disfruté tanto trabajar.

A mis antiguos compañeros de la Cátedra de Histología: su afecto hace que uno trabaje mejor. Especialmente a la Dra. Adriana Seilicovich, que me dio un crédito que espero poder pagar algún día.

A la Dra. Ana Esquifino, que me adoptó como si fuera su propio becario, y a mis compañeras Pili (a pesar de su bordería) y Vane (a ver si llegamos ser los futuros Ana y Daniel)

A mi novia Macarena que me llena de orgullo y de confianza en el futuro (8=00).

A Mariel, que siempre fue una buena compañera.

A mi hermana que alguna vez también me ayudó.

A la Universidad de Buenos Aires y el país que la sostiene, porque me ofrecieron educación superior gratuita y de calidad.

A Palas Atenea, a quien tantas veces sentí detrás de mí cuando tuve que enfrentar al Hado cruel.

A Cadmo, sin él esta tesis tal vez no existiría.

Cadmo, sin él esta tesis tal vez no existiría.

A Susana Poliandri

# Indice

1	Introducción	Pag. 1
1.1	El Cd <sup>2+</sup> como contaminante ambiental	
1.2	El eje hipotálamo-hipofisario y regulación de la liberación hormonal	
1.3	El óxido nítrico	
1.3.1	El óxido nítrico y el eje hipotálamo-hipófisis	
1.4	Apoptosis	
1.4.1	Muerte celular en la adenohipófisis	
1.5	Efectos del Cd <sup>2+</sup> sobre el sistema endocrino	
1.6	mecanismos de acción del Cd en otros tejidos	
1.6.1	Estrés oxidativo y óxido nítrico	
1.6.2	Homeostasis del calcio	
1.6.3	Cambios en la expresión génica	
2	Objetivos	Pag. 26
3	Materiales y Métodos	Pag. 27
3.1	Reactivos	
3.2	Animales	
3.3	Cultivos primarios de células adenohipofisarias	
3.4	Tratamiento de las células en cultivo	
3.5	Ensayo de actividad celular (ensayo de MTT)	
3.6	RIA de prolactina	
3.7	Análisis de la morfología nuclear	
3.8	Ensayo de fragmentación del DNA (Ladder)	
3.9	Citometría de flujo para la medición de sondas fluorescentes	



- 3.10 Citometría de flujo para la cuantificación del contenido de DNA nuclear
- 3.11 Cuantificación de fluorescentes por espectrofluorometría
- 3.12 Determinación de los niveles de óxido nítrico en los medios de cultivo
- 3.13 Determinación de la peroxidación lipídica (Ensayo de TBARS)
- 3.14 Extracción de mRNA de los tejidos
- 3.15 RT-PCR
- 3.16 PCR cuantitativa a tiempo real
- 3.17 Análisis Estadístico

## 4 Resultados

Pag. 46

- 4.1 Estudios en cultivos primarios de células adenohipofisarias
  - 4.1.1 Efectos directos del Cd<sup>2+</sup> sobre las células adenohipofisarias
    - 4.1.1.1 El Cd<sup>2+</sup> afecta de manera directa la liberación hormonal y la viabilidad celular adenohipofisaria
    - 4.1.1.2 El Cd<sup>2+</sup> induce apoptosis en las células adenohipofisarias
  - 4.1.2 Mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por Cd<sup>2+</sup>
    - 4.1.2.1 El efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup> depende del daño a la membrana mitocondrial
    - 4.1.2.2 El efecto del Cd<sup>2+</sup> depende de la activación de caspasas
    - 4.1.2.3 El Cd<sup>2+</sup> causa estrés oxidativo en las células adenohipofisarias
    - 4.1.2.4 El aumento de las especies reactivas del oxígeno generado por el Cd<sup>2+</sup> afecta la integridad de la membrana mitocondrial
    - 4.1.2.5 El Cd<sup>2+</sup> causa un aumento de la producción de ROS en la cadena mitocondrial de transporte de electrones
    - 4.1.2.6 Papel del calcio en el efecto citotóxico del Cd
  - 4.1.3 Papel del NO en el efecto del Cd<sup>2+</sup>
    - 4.1.3.1 El Cd<sup>2+</sup> aumenta la producción de NO
    - 4.1.3.2 El NO cumple un papel citoprotector ante la exposición al Cd<sup>2+</sup>
    - 4.1.3.3 El NO suministrado exógenamente reduce la apoptosis inducida por el Cd<sup>2+</sup>

- 4.1.3.4 El NO disminuye la activación de caspasas causada por el Cd<sup>2+</sup>
- 4.1.3.5 El NO disminuye el estrés oxidativo generado por el Cd<sup>2+</sup>
- 4.1.3.6 El NO reduce el efecto Cd<sup>2+</sup> sobre las mitocondrias
- 4.1.3.7 El efecto citoprotector del NO es independiente de la vía NO/cGMP
- 4.2 Estudios *in vivo* de los efectos del Cd sobre el eje hipotálamo-hipofisario
  - 4.2.1 El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> 5 ppm afecta los niveles séricos de distintas hormonas adenohipofisarias
  - 4.2.2 El Cd<sup>2+</sup> induce estrés oxidativo en la adenohipófisis
  - 4.2.3 El Cd<sup>2+</sup> afecta la expresión de la NOS1 y la NOS2 en la adenohipófisis
  - 4.2.4 Efectos del Cd<sup>2+</sup> a nivel hipotalámico
  - 4.2.5 El tratamiento con melatonina reduce los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre el eje hipotálamo-hipofisario

## 5 Discusión

Pag. 114

- 5.1 Efecto directo del Cd sobre la liberación de prolactina y viabilidad celular adenohipofisarias.
- 5.2 Mecanismos de acción del Cd en la adenohipófisis
  - 5.2.1 Activación de caspasas
  - 5.2.2 Efecto sobre la membrana mitocondrial
  - 5.2.3 Papel del estrés oxidativo
  - 5.2.4 Papel del calcio
  - 5.2.5 Papel del óxido nítrico
- 5.3 Efectos *in vivo* de la exposición al Cd<sup>2+</sup> en el eje hipotálamo-hipofisario
  - 5.3.1 Efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la adenohipófisis
  - 5.3.2 Efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre el hipotálamo
  - 5.3.3 Efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre los niveles séricos de hormonas adenohipofisarias
  - 5.3.4 Efecto protector de la melatonina contra el estrés oxidativo causado por el Cd<sup>2+</sup>

6	Conclusiones	Pag. 145
7	Referencias	Pag. 148
8	Apéndice	Pag. 173
	Consideraciones históricas sobre el Cadmio	

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADP:	Adenosina di-fosfato
ATP:	Adenosina tri-fosfato
BAPTA:	1,2-bis-(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl) ester
bp:	Pares de bases
cGMP:	Monofosfato cíclico de guanosina
COX:	Ciclooxigenasa
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CTE:	Cadena mitocondrial de transporte de electrones
DCF-DA:	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceina
DHR123:	Dihidro rodamina 123
DIOC <sub>6</sub> :	jngheirhtgue
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de GH
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GSH:	Glutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
HO-1	Hemo oxigenasa-1
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de LH
LOX:	Lipooxigenasa
MCU	Uniporter mitocondrial de Calcio
MRE:	Elementos respondedores a metales
NAC:	N-acetil-cisteína
NO:	Oxido nítrico
NOS(s):	Óxido nítrico sintasa(s)
NOS1	Óxidónítrico sintasa neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Anión superóxido

OMS:	Organización Mundial de la Salud
ONOO:	Peroxinitrito
PI:	Ioduro de propidio
PMM:	Potencial de la membrana mitocondrial
RNOS:	Especies reactivas del nitrógeno
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
sGC:	Guanilato ciclasa soluble
SH	Grupo sulfidrido
TBARS:	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TPEN:	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
TRH:	Hormona liberadora de TSH
TSH:	Hormona estimulante de tiroides
PKC	Proteína quinasa C

# 1 Introducción

## 1.1 El cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) como contaminante ambiental

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un elemento de transición que se encuentra en muy bajas concentraciones sobre la corteza terrestre (Thornton, 1992). Sin embargo, en algunas zonas, este metal puede hallarse en niveles altos debido, principalmente, a actividades antropogénicas (Thornton, 1992). Como ejemplo de ello, la industria extrae y utiliza aproximadamente 15.000 toneladas de  $\text{Cd}^{2+}$  por año (McMurray y Tainer, 2003). Los fertilizantes sintéticos fosforados constituyen también un importante medio de dispersión de  $\text{Cd}^{2+}$  en el ambiente (WHO, 1995). El contenido alto de  $\text{Cd}^{2+}$  en las canteras de donde se extrae el mineral de fósforo para producir estos fertilizantes lleva a que los mismos puedan contener hasta 32 mg de  $\text{Cd}^{2+}$  /Kg de fertilizante (Chien y col., 2003). El depósito del metal en el suelo y su captación posterior por los vegetales determina su ingreso a la cadena alimenticia (WHO, 1995).

A diferencia de muchos otros metales de transición (tales como cobre (Cu), cromo (Cr), cobalto (Co), etc.) que en bajas concentraciones son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo, para el  $\text{Cd}^{2+}$  no se conoce función biológica alguna en organismos superiores (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Diversos estudios poblacionales han demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  es altamente tóxico para los humanos. Por esta razón la Agencia Nacional de Protección Ambiental de los Estados Unidos lo ha catalogado como contaminante ambiental prioritario (Waisberg y col., 2003) y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) lo ha clasificado como un carcinógeno humano de tipo I (International Agency for Research on Cancer, 1993).

El estudio de los posibles efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  en los individuos no expuestos laboralmente al metal ha despertado interés en el área de la salud durante los últimos años debido a su alta toxicidad y a su dispersión amplia en el ambiente por la

industria y el agro. En estos individuos, los alimentos son la principal vía de entrada del metal al organismo (Satarug y col., 2003; Thornton, 1992). Las plantas tienen una alta tolerancia al  $\text{Cd}^{2+}$  y la capacidad de concentrarlo desde el suelo (de Figueiredo, 1965). De esta manera, el metal se transfiere desde las plantas, o los animales alimentados con éstas, a los humanos (Ingwersen y Streck, 2005; Satarug y col., 2003). Otra vía importante de entrada del  $\text{Cd}^{2+}$  al organismo es el humo del cigarrillo, donde este metal puede encontrarse en altas concentraciones (Satarug y Moore, 2004; Smith y col., 1997; Rustemeier y col., 2002). En relación a esto se ha detectado hasta 5 veces más  $\text{Cd}^{2+}$  en los órganos de los fumadores que en los de los no fumadores (Benedetti y col., 1999; Satarug y col., 2004).

El primer problema importante de salud causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel poblacional, se registró en la región del río Jinzu, en Japón, en la década de 1950 (Ogawa y col., 2004). La enfermedad, llamada "enfermedad itai-itai" se caracteriza clínicamente por la presencia de osteomalacia, osteoporosis, múltiples disfunciones renales asociadas a dolor severo y aumento en la tasa de mortalidad (Nogawa y col., 2004). La enfermedad es causada por la ingesta de arroz cosechado en zonas altamente contaminadas con el metal (Nogawa y col., 2004). La mayor sensibilidad de las mujeres a esta enfermedad ha llevado a postular que las características hormonales del individuo podrían modular los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  (Nakagawa y Yuan, 2000; Vahter y col., 2002). Si bien la enfermedad itai-itai es considerada un paradigma de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , se ha demostrado que exposiciones a niveles menores del metal también son perjudiciales para la salud (Kazantzis, 2004).

La Organización mundial de la Salud (OMS) en su protocolo para la calidad del agua potable (WHO, 1995) estableció como límite diario máximo tolerable para la ingesta de  $\text{Cd}^{2+}$  1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En países desarrollados como Estados Unidos, Inglaterra o Suecia esta ingesta varía entre 0.12 y 0.49  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , lo que representa un límite de seguridad bastante pequeño (Satarug y Moore, 2004; Johnson y col., 2003). Las estimaciones de la OMS se realizaron en 1992, teniendo en cuenta la carga máxima de  $\text{Cd}^{2+}$  que puede acumularse en el riñón a lo largo de toda la vida sin que se observen problemas renales en la vejez. El límite sugerido por la OMS para la ingesta del metal fue confirmado en el año 2000 (WHO, 2004). Sin embargo, un estudio poblacional

realizado en 2000 por Viaene y col., sobre un grupo de trabajadores industriales, determinó que la exposición prolongada al  $\text{Cd}^{2+}$  podía causar problemas neuro-motrices y comportamentales sin que se detectaran problemas a nivel renal (Viaene y col., 2000). Apoyando este resultado, un estudio similar realizado en animales de laboratorio reveló efectos tóxicos del metal a nivel del sistema nervioso en ratas que no presentaban problemas renales (Leret y col., 2003). En conjunto, estos estudios sugieren que distintos tejidos del organismo poseen diferente sensibilidad al metal. Por lo tanto, un estudio realizado a nivel neuroendocrino podría ser importante, porque permitiría reconocer tempranamente los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  y determinar si niveles menores a los aceptados actualmente como tolerables, pueden resultar perjudiciales para la salud.

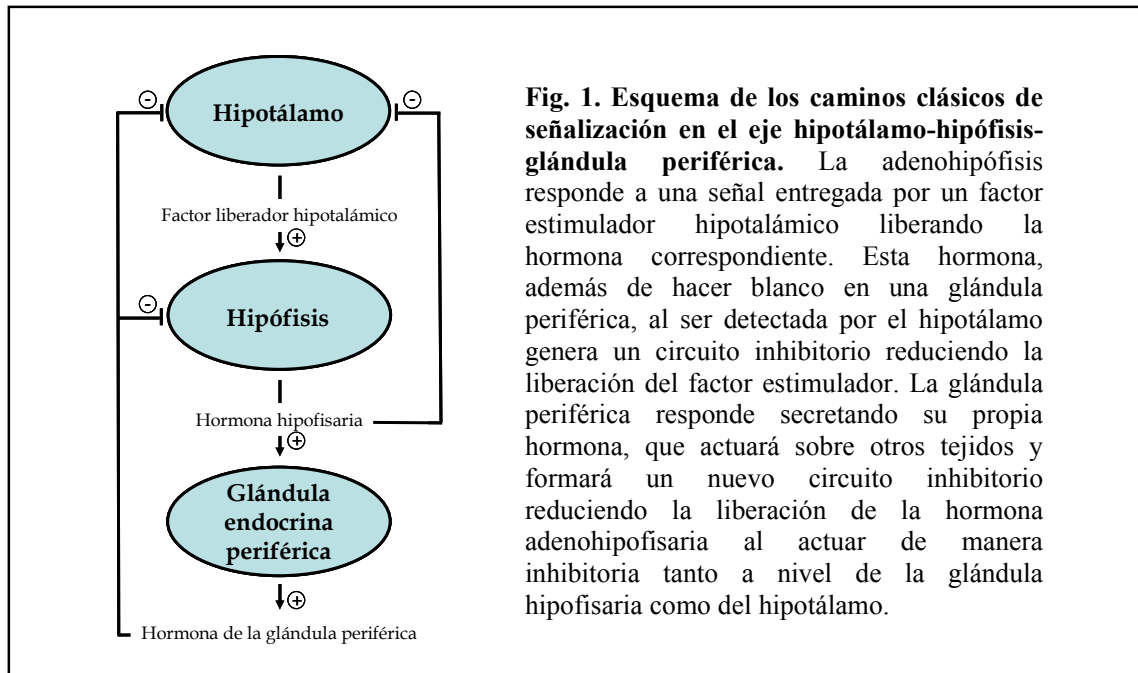
## **1.2 El eje hipotálamo-hipofisario y regulación de la liberación hormonal**

El eje hipotálamo-hipofisario es crucial para la supervivencia y la homeostasis del organismo y entre otras funciones, controla el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y el comportamiento. El eje hipotálamo-hipofisario es punto de encuentro entre los sistemas nervioso y endocrino. A partir de la información proveniente de diversos tejidos tanto centrales como periféricos el hipotálamo regula la liberación de las distintas hormonas adenohipofisarias, que a su vez, controlan el funcionamiento de tejidos y glándulas periféricas tales como la glándula tiroides, la glándula adrenal y las gónadas (Fig. 1).

La adenohipófisis es una glándula situada bajo el piso del diencefalo, que se encuentra en íntima relación con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario (Page, 1994). Está constituida por la adenohipófisis (o pituitaria anterior) y la neurohipófisis. La adenohipófisis, principalmente glandular, presenta una composición celular heterogénea en la que se pueden identificar varios tipos celulares. Existen cinco tipos de células secretoras, caracterizadas de acuerdo al tipo de hormona que producen: los lactotrofos (prolactina), los somatotrofos (hormona de crecimiento, GH), los gonadotrofos (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los corticotrofos (adrenocorticotrofina,



ACTH) y los tirotropos (hormona estimulante de la tiroides, TSH). Las células foliculo estrelladas, inmunoreactivas para la proteína S100, constituyen un tipo celular no secretor, íntimamente relacionado con las células secretoras a través de uniones comunicantes (Page, 1994).



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 factores liberadores e inhibidores específicos provenientes del hipotálamo. Los factores estimuladores actúan como secretagogos y también como factores tróficos. La hormona liberadora de GH (GHRH) es el regulador más importante de la fisiología de los somatotropos (Mayo y col., 2000), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) lo es para los gonadotropos (Conn y col., 1987), la hormona liberadora de TSH (TRH) ejerce el mismo efecto sobre los tirotropos (Gershengorn, 1986) y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) sobre los corticotropos (Turnbull y Rivier, 1997). Los lactotropos, en cambio, son el único tipo celular adenohipofisario que no posee un factor liberador hipotalámico específico que se comporte como estimulador de la secreción de prolactina y a la vez como factor trófico (Freeman y col., 2000). Sin embargo, sí existen factores hipotalámicos inhibitorios que actúan

predominantemente sobre los lactotrofos. La presencia de estos inhibidores es fundamental para la regulación de la secreción de prolactina, pues los lactotrofos son las únicas células glandulares de la adenohipófisis en las que la síntesis y la liberación de la hormona sucede de manera continua y espontánea. La secreción adenohipofisaria no es regulada únicamente por factores liberadores e inhibidores específicos provenientes del hipotálamo, sino que existen otros factores u hormonas periféricas e intrahipofisarias, así como también factores circadianos y ambientales, que regulan esta secreción (Ben-Jonathan y col., 1980; Bethea y Neill, 1980; Lamberts y Macleod, 1990; Neill y col., 1971; Terkel y col., 1972).

Actualmente, es bien conocido que los lactotrofos poseen una actividad secretora espontánea alta y que dicha secreción se encuentra bajo un control tónico predominantemente inhibitorio ejercido por el hipotálamo. Este concepto se basa en el hecho de que la desconexión entre la adenohipófisis y el hipotálamo medio basal ya sea quirúrgica, por trasplante o aislamiento de la glándula *in vitro*, lleva a un aumento constante en la secreción de prolactina (Arimura y col., 1972; Bishop y col., 1972; Kanematsu y Sawyer, 1973; Langer y col., 1978; Everett, 1954; Everett, 1956). El principal factor hipotalámico que inhibe la secreción de prolactina es la dopamina. Le siguen, con diferente potencia inhibitoria, factores hipotalámicos e intrahipofisarios tales como el ácido gamma aminobutírico (GABA), la serotonina, la acetilcolina, la somatostatina, el óxido nítrico y la propia prolactina ( Duvilanski y col., 1985; Freeman y col., 2000; Matsushita y col., 1983; Racagni y col., 1979). La dopamina, producida por las neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato y liberada en la eminencia media, ejerce su acción directamente a nivel del lactotrofo a través de la activación de su receptor específico tipo D2 (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

Existe una gran variedad de factores que estimulan la secreción de prolactina actuando directamente sobre las células adenohipofisarias. Éstos son sintetizados a nivel del hipotálamo, en la misma hipófisis o en tejidos periféricos. Entre los más estudiados podemos destacar: los estrógenos, TRH, oxitocina, vasopresina, péptido intestinal vasoactivo, polipéptido activador de la adenilato ciclasa de hipófisis, péptido histidina-isoleucina, angiotensina II, sustancia P, neurokinina A, neurotensina y péptido liberador de prolactina (Freeman y col., 2000; Kawamata y

col., 2000). Los lactotropos expresan receptores específicos para cada uno de estos factores u hormonas estimuladoras, 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 a la secreción de prolactina (Freeman y col., 2000). Los estrógenos cumplen, además, un papel preponderante estimulando la proliferación de los lactotropos.

### 1.3 El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) posee un electrón desapareado que lo convierte en un radical libre, aunque no posee la reactividad alta asociada normalmente a estos compuestos (Cotton y 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, 1998). En condiciones fisiológicas, el NO puede reaccionar con una variedad de radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) con el que forma peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) y con grupos tioles y aminas (Huie y Padmaja, 1993; Wink y Mitchell, 1998). Dependiendo del microentorno, el NO puede ser convertido en otras especies reactivas tales como el catión nitroso ( $NO^+$ ) y el anión nitroxilo ( $NO^-$ ) (Stamler y col., 1992).

El tipo de reacciones en las que participa el NO depende de las concentraciones del mismo, dividiéndose éstas en reacciones directas e indirectas. En concentraciones submicromolares predominan las reacciones directas del NO con metales de transición, formándose complejos NO-metal (Koppenol, 1999; Wink y Mitchell, 1998). En cambio, a concentraciones micromolares el NO reacciona rápidamente, con constantes de velocidad iguales a su constante de difusión, con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), con el que forma peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) y otros radicales libres, dando origen a las llamadas especies reactivas del nitrógeno (RNOS). En este caso, predominan las reacciones indirectas, a través de las RNOS, causando

principalmente nitrosilaciones y nitraciones de proteínas y desaminaciones del DNA (Koppenol, 1999; Wink y Mitchell, 1998).

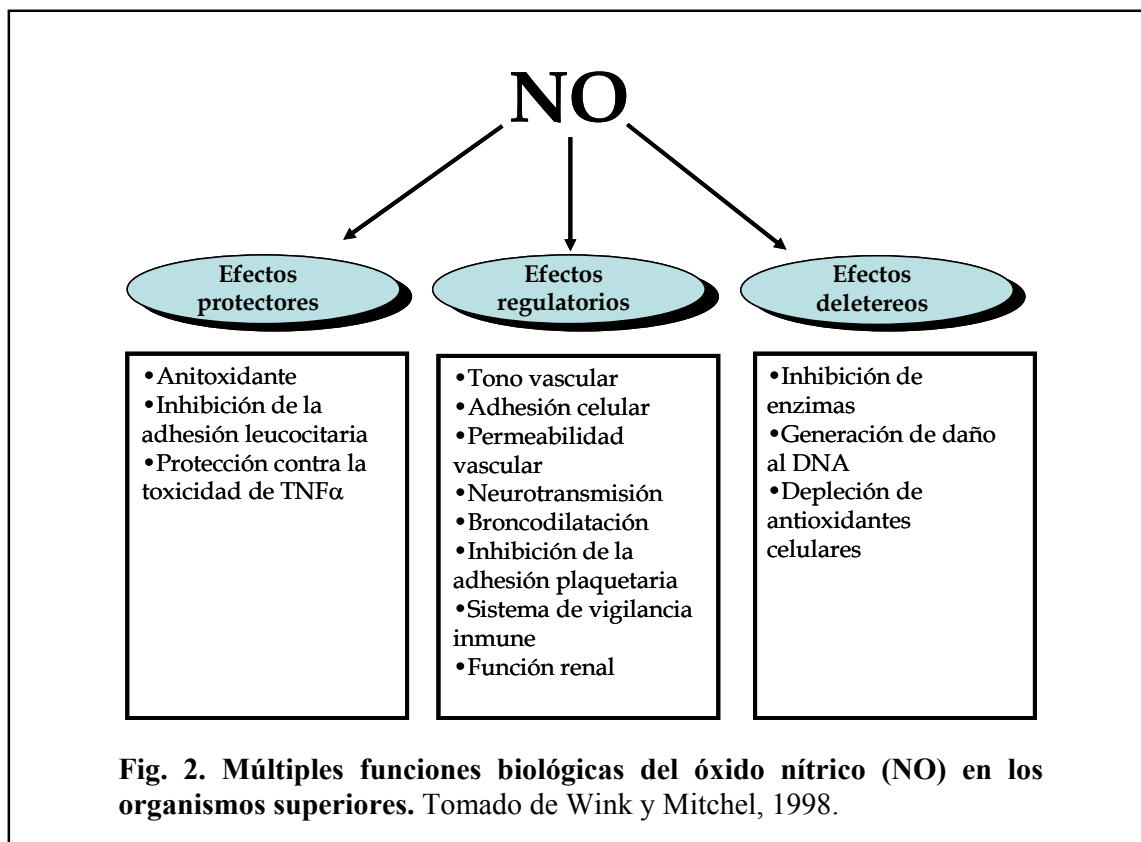
En los organismos superiores, el NO es producido por la oxidación del grupo amino terminal de la L-arginina (Palmer y col., 1988). Este proceso es catalizado por la óxido nítrico sintasa (NOS; EC 1.14.13.39) de la cual existen tres isoformas: la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la inducible (iNOS o NOS2) y la endotelial (eNOS o NOS3) (Wink y Mitchell, 1998). Las distintas isoformas de NOS son codificadas por genes localizados en diferentes cromosomas y presentan diferencias en cuanto a su forma de activación, actividad y localización subcelular.

La NOS1, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 12, es una proteína que fue identificada por primera vez en neuronas. En este tipo celular, la NOS1 se encuentra expresada constitutivamente, se localiza tanto en el citosol como asociada a la membrana y presenta una actividad dependiente de calcio-calmodulina. La NOS2 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. Por último, el gen de la NOS3 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 NOS3 es constitutiva y su actividad es dependiente de calcio-calmodulina (Bredt y Snyder, 1990; Bredt y col., 1991; Ignarro y col., 1987; Knowles y col., 1989; Leone y col., 1991; Lyons y col., 1992). A finales de la década pasada se describió un nuevo miembro de la familia de las NOS, llamada NOS mitocondrial (mtNOS) debido a que fue descubierta en mitocondrias de hígado de rata, utilizando anticuerpos anti-NOS2 (Giulivi y col., 1998; Tatoyan y Giulivi, 1998). Existen diferentes variantes de la mtNOS, todas ellas dependientes de calcio (Riobo y col., 2002). Actualmente se reconoce que la mtNOS proviene de la modificación post-traducciona l y/o post-transcripcional de la isoforma alfa de la NOS1 (Haynes y col., 2004).

Entre las funciones biológicas más conocidas en las cuales está involucrado el NO se encuentran: vasodilatación, respuesta inmune, inflamación, génesis y metabolismo de células musculares, oncogénesis, angiogénesis, regulación hormonal,

apoptosis, y regulación de las funciones neuronal, renal, ósea, gastrointestinal, pancreática, uterina y del espermatozoide (Fig. 2) (Bogdan, 2001; Cameron y Campbell, 1998; Herrero y col., 2003; Moncada y col., 1991; Prast y Philippu, 2001; Contestabile y col., 2003). 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.

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, así como también del microentorno subcelular y del estado de óxido-reducción (redox) de la célula (Wink y Mitchell, 1998).



Las reacciones del NO con mayores implicancias fisiológicas son aquellas en las que interacciona con metales contenidos en distintas proteínas. El NO reacciona con el hierro del grupo hemo de proteínas tales como las propias NOS, la guanilato ciclasa soluble, la ciclooxigenasa (COX), la catalasa, las peroxidasas y las citocromo P-450 (Cooper, 1999; Goodwin y col., 1999; Wink y Mitchell, 1998). El NO también puede modificar la actividad de proteínas que contengan átomos de hierro (no hemo) como las lipooxigenasas (LOX) y los complejos mitocondriales I y III o complejos con cobre como la cis-aconitasa (Wink y Mitchell, 1998).

Entre las reacciones del NO con proteínas que contienen grupos hemo, quizás la más relevante en cuanto a relevancia fisiológica en distintos tejidos, sea la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), principal receptor intracelular del NO (Ignarro, 1989; Ignarro, 1991). La sGC es una enzima heterodimérica que cataliza la síntesis de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) (Drewett y Garbers, 1994). El NO, en concentraciones submicromolares, puede activar la sGC actuando directamente sobre el grupo hemo de la enzima (Ignarro, 1991). Dicha activación produce un aumento importante de la concentración intracelular de cGMP el que a su vez es capaz de causar la activación o inhibición de un amplio número de proteínas como las proteínas kinasas dependientes de cGMP (PKG) tipos I y II (Fiscus, 2002), las fosfodiesterasas (PDE) reguladas por nucleótidos cíclicos (Beavo, 1995) y los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (Zagotta y Siegelbaum, 1996).

### 1.3.1 El óxido nítrico en el eje hipotálamo-hipófisario

La llegada del NO a las neurociencias revolucionó la visión de los neurotransmisores cerebrales (Rivier, 2001). Es remarcable que la mayor concentración de NOS1 en el cerebro, se encuentra justamente en la eminencia media y los núcleos hipotalámicos que regulan la liberación hormonal (Prevot y col., 2000). Desde estos núcleos el NO actúa como un modulador importante de la función endocrina; además, el NO cumple un papel regulador tanto en la hipófisis como en las glándulas periféricas. En lo que respecta a la liberación hormonal, el NO puede

tener efectos antagónicos en el hipotálamo y en la hipófisis (Rivier, 2001). De esta manera a nivel central el NO aumenta la liberación de diferentes factores estimuladores tales como LHRH, GHRH, oxitocina, vasopresina y CRH, mientras que a nivel de la adenohipófisis inhibe la liberación basal de prolactina y la liberación estimulada de ACTH (Duvilanski y col.; 1995; Rivier, 2001). Por otro lado, el NO aumenta la liberación estimulada de GH y gonadotropinas en la glándula (Kato, 1992; McCann y col., 1999). Debido a esta acción antagónica el efecto de la inyección sistémica de inhibidores de las NOS es difícil de interpretar, resultando generalmente en un aumento de los niveles séricos de prolactina o ACTH (McCann y col., 1996; Rivier, 2001). En el hipotálamo el NO actúa sobre las neuronas secretoras de LHRH y CRH activando las vías de la sGC, la COX y la LOX lo que produce un aumento de cGMP, prostaglandina E2 (PDE2) y leucotrienos, respectivamente (McCann y col., 2000; Rivier, 2001). Las neuronas productoras de NO, por otro lado, se encuentran bajo el control inhibitorio de terminales GABAérgicos (Faletti y col., 1999). Con respecto al efecto del NO sobre la liberación hormonal hipofisaria, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el NO inhibe la liberación de prolactina a través de la activación de la vía sGC/cGMP (Duvilanski y col., 1996) la cual a su vez activa a la PDE2 y la PKG (Velardez y col., 2000). Además, hemos demostrado que el NO ejerce su efecto inhibitorio sobre la liberación de prolactina afectando negativamente diferentes vías intracelulares que intervienen de manera positiva en la regulación de la secreción de esta hormona, tales como la movilización del calcio (Duvilanski y col., 1998; Velardez y col., 2003), la LOX (Velardez y col., 2001) y los fosfoinosítidos (Velardez y col., 2003). Asimismo, como se mencionará más adelante, hemos demostrado que exposiciones prolongadas al NO pueden causar apoptosis en las células de la adenohipófisis.

## 1.4 Apoptosis

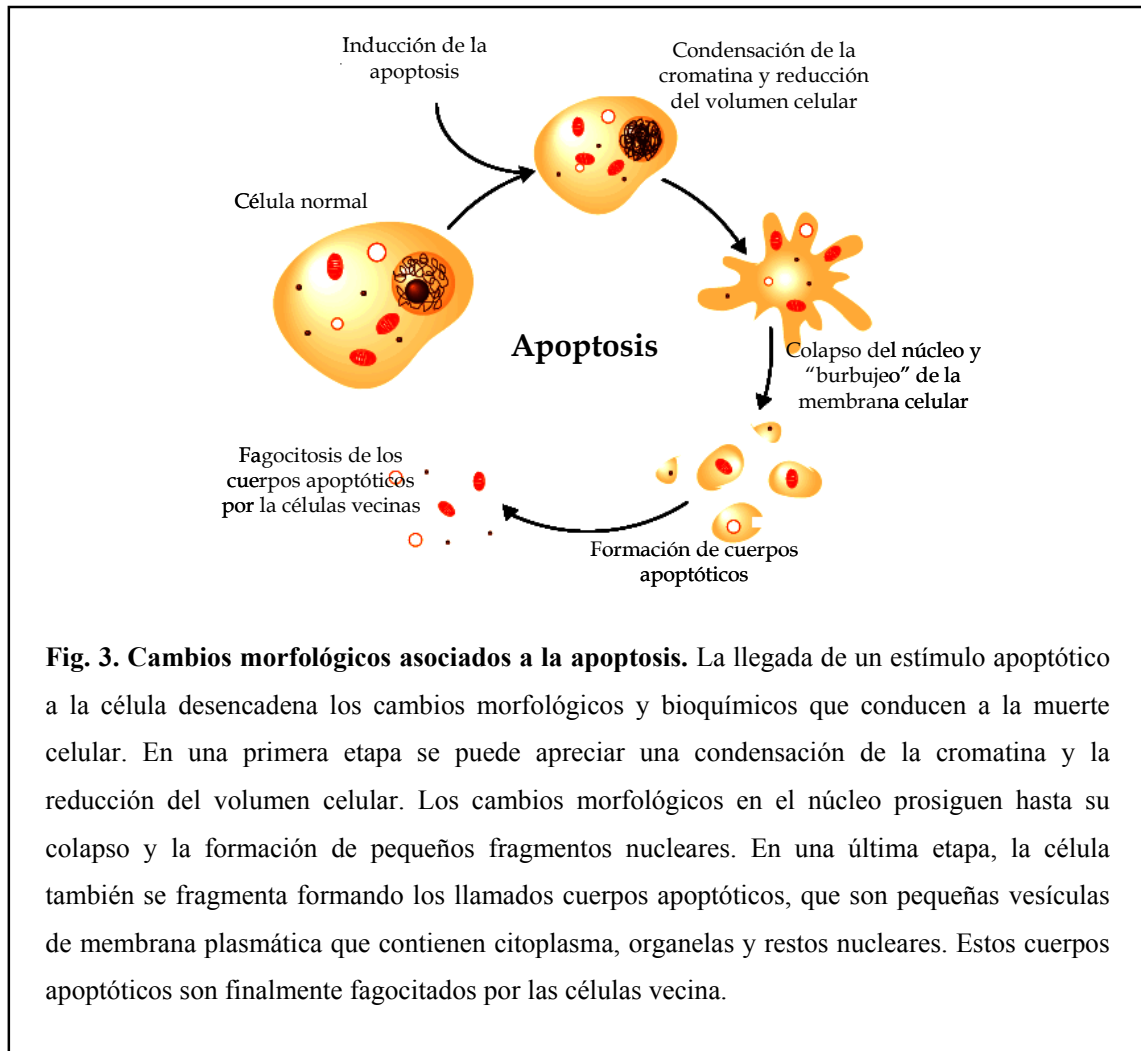
Actualmente se conoce que la célula puede morir básicamente de dos formas diferentes: necrosis y apoptosis. La necrosis es un proceso espontáneo disparado por la supresión abrupta de la homeostasis celular y que se caracteriza por la depleción

energética, la hinchazón de las organelas y el desencadenamiento de reacciones catalíticas aleatorias (Buja y col., 1993). La muerte por necrosis termina con el estallido de la célula y la liberación de su contenido citoplasmático al medio extracelular, lo que a su vez desencadena procesos inflamatorios en los tejidos (Buja y col., 1993). La apoptosis, en cambio, es un suceso programado genéticamente en el que una cascada de eventos desemboca en el desensamblaje ordenado de la célula, utilizando para ello energía proveniente del ATP (Garrido y Kroemer, 2004; Harada y Grant, 2003; Malhi y col., 2006). Debido al gasto de energía que implica este tipo de muerte, así como también al control estricto que rige en cada una de sus etapas, suele decirse que la apoptosis es una forma de “suicidio celular”. En la apoptosis el contenido intracelular no se libera al medio extracelular sino que permanece contenido en vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, que pueden ser fagocitados por las células vecinas, evitando la generación de procesos inflamatorios (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1980). Las primeras descripciones de la apoptosis se basaron en las características morfológicas y ultraestructurales que presentaban las células que se volvían inviables (Fig. 3). Posteriormente, se observó la existencia de varias vías paralelas que podían conducir al desensamblaje ordenado de las células. Sin embargo, muchas de estas vías no cumplían con todos los requisitos de la apoptosis clásica. Por ello, es preferible tal vez utilizar el término muerte celular programada por ser éste mucho más abarcativo que el término apoptosis (Asher y col., 1995).

En el reino animal la apoptosis se observa 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 y col., 1991; Garrido y Kroemer, 2004). La apoptosis también juega un papel fundamental durante el desarrollo y el recambio de células en los tejidos y en la prevención de procesos proliferativos descontrolados (Garrido y Kroemer, 2004). Sin embargo, una inducción excesiva de muerte celular también puede contribuir al desarrollo de ciertas patologías como la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (Yuan y Yankner, 2000).



La necrosis es causada generalmente por perturbaciones metabólicas agudas en las células (Malhi y col., 2006). En cambio, las señales que determinan que éstas deben cometer “suicidio”, suelen ser más sutiles. Entre ellas se pueden mencionar: la falta de factores de crecimiento, la exposición a radiaciones UV, factores proteicos extracelulares que activan receptores de muerte y estrés oxidativo (Malhi y col., 2006; Garrido y Kroemer, 2004).



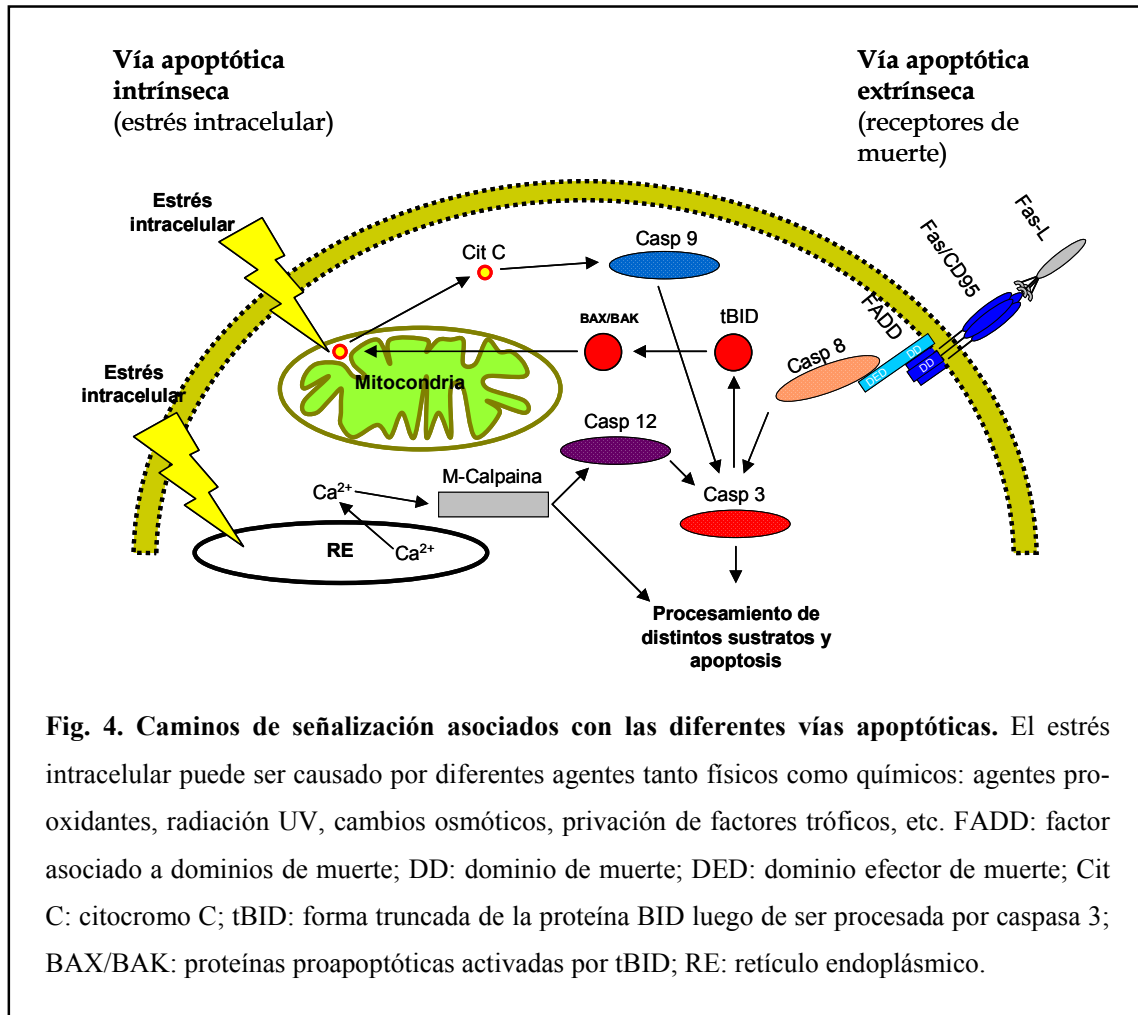
Gracias a los estudios genéticos realizados en el nematode *Caenorabditis elegans*, se han develado gran parte de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los cambios morfológicos y ultraestructurales típicos de la apoptosis (Vaux y Korsmeyer, 1999). Se sabe en la actualidad que muchos estímulos

proapoptóticos convergen en una vía común que consta básicamente de un conjunto de proteínas efectoras llamadas caspasas (Stennicke y Salvesen, 2000). Las caspasas forman una familia de proteínas muy conservada, que en mamíferos hasta el momento, cuenta con 13 miembros (Stennicke y Salvesen, 2000). 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 (Stennicke y Salvesen, 2000). A grandes rasgos, las caspasas pueden dividirse en iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras son responsables de activar a las caspasas efectoras y éstas, a su vez, actúan sobre distintos blancos celulares específicos (Dotto y Silke, 2004). Entre las principales caspasas iniciadoras se encuentran las caspasas 8 y 9, mientras que la caspasa 3 es la caspasa efectora por excelencia (Dotto y Silke, 2004). Más allá de estos efectores de muerte celular bien caracterizados, se han descrito varios procesos de apoptosis independientes de caspasas (Garrido y Kroemer, 2004; Susin y col., 1999).

De acuerdo con el tipo de factor que desencadena la apoptosis, ésta puede clasificarse en extrínseca o intrínseca (Fig. 4) (Fumarola y Guidotti, 2004; Garrido y Kroemer, 2004; Stennicke y Salvesen, 2000). La apoptosis extrínseca está mediada por receptores (llamados receptores de muerte), que al unirse a un ligando extracelular específico, desencadenan la cascada de eventos que conducen a la muerte celular (Fumarola y Guidotti, 2004). La apoptosis intrínseca no depende de receptores y es inducida por diferentes agentes que afectan la homeostasis celular, entre ellos podemos citar: especies reactivas del oxígeno (ROS), niveles elevados de calcio citoplasmático, radiación UV, etc. (Fumarola y Guidotti, 2004).

Frente a una señal proteica proapoptótica extracelular, como por ejemplo la proteína Fas-L, la activación del receptor de muerte específico (en este caso 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 autoprocetan y autoactivan. La caspasa-8 activada procesa a la procaspasa-3 llevándola a su forma activa. La caspasa-3 luego

se encarga de procesar y activar a las diferentes enzimas que serán responsables directas de los cambios morfológicos y ultraestructurales, propios de la muerte celular programada (Harada y Grant, 2003).



**Fig. 4. Caminos de señalización asociados con las diferentes vías apoptóticas.** El estrés intracelular puede ser causado por diferentes agentes tanto físicos como químicos: agentes pro-oxidantes, radiación UV, cambios osmóticos, privación de factores tróficos, etc. FADD: factor asociado a dominios de muerte; DD: dominio de muerte; DED: dominio efector de muerte; Cit C: citocromo C; tBID: forma truncada de la proteína BID luego de ser procesada por caspasa 3; BAX/BAK: proteínas proapoptóticas activadas por tBID; RE: retículo endoplásmico.

Con respecto a la vía intrínseca, en la célula existen diferentes sensores de estrés intracelular y cambios bruscos en la homeostasis pueden desencadenar la apoptosis a través de ellos. La mitocondria es reconocida como uno de los principales sensores de estrés intracelular y distintos eventos que afectan su integridad pueden causar apoptosis (Fumarola y Guidotti, 2004; Harada y Grant, 2003; Susin y col., 1999). El retículo endoplásmico funciona como otro sensor de estrés intracelular, pudiendo iniciar la cascada apoptótica independientemente del estado de la mitocondria (Nakagawa y col., 2000; Nakagawa y Yuan, 2000; Yoneda y col., 2001). El

daño del DNA también puede funcionar como un disparador de la apoptosis (Buja y col., 1993).

Tal vez por ser los más estudiados, los eventos que se desencadenan luego de producirse daño mitocondrial, se utilizan frecuentemente para ejemplificar los mecanismos involucrados en la vía apoptótica intrínseca. En respuesta a diversos agentes proapoptóticos, la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa aumenta. Esto causa la liberación de varios factores mitocondriales localizados en el espacio intermembranoso. Entre ellos: el citocromo c, que pasa al citoplasma, o el factor inductor de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G que se translocan al núcleo. Todas estas moléculas cumplen un papel importante en la activación de proteínas efectoras del proceso apoptótico (Harada y Grant, 2003; Garrido y Kroemer, 2004; Stennicke y Salvesen, 2000; Susin y col., 1999). Por ejemplo, una vez en el citosol, el citocromo c puede unirse al factor activador de apoptosis-1 (Apaf-1) y a dATP o ATP formando una estructura denominada "apoptosoma". El apoptosoma tiene la capacidad de reclutar y permitir la activación de la procaspasa-9, la cual a su vez puede activar a caspasas efectoras como la caspasa-3, iniciando el proceso de muerte celular (Stennicke y Salvesen, 2000).

### 1.4.1 Muerte celular en la adenohipófisis

Si bien existe información abundante concerniente a los factores que regulan la proliferación celular en la adenohipófisis, se conoce menos acerca del proceso de muerte celular programada en la glándula. La mayor parte de las investigaciones sobre muerte celular en la hipófisis en humanos se han centrado en el efecto de drogas antitumorales tales como la bromocriptina o la cabergolina, ambos agonistas dopaminérgicos (Freda y col., 2004; Ivan y col., 2005). Estos estudios son principalmente clínicos y no proveen mucha información sobre el mecanismo celular o molecular por el que actúan estas drogas. *In vitro*, utilizando células derivadas de tumores hipofisarios, se ha visto que la bromocriptina induce un aumento de la expresión de proteínas proapoptóticas como p38 MAPK y p53 y también una disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica bcl-2 (Kanasaki y col.,

2000; Yin y col., 1999). Trabajos recientes sugieren que ciertas citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF $\alpha$  o el interferón- $\gamma$ , actúan como posibles señales mediadoras de la remodelación celular adenohipofisaria en condiciones fisiológicas (Candolfi y col., 2002; Pisera y col., 2004).

Estudios en la línea celular GH3 han revelado que el estrés oxidativo puede causar muerte por apoptosis en estas células, derivadas de somato-lactotropos (Newton y col., 2005). Existen evidencias de que el óxido nítrico (NO) podría participar en la regulación de la apoptosis en la adenohipófisis (Candolfi y col., 2004; Velardez y col., 2004). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la exposición prolongada a concentraciones micromolares de NO induce apoptosis en células adenohipofisarias en cultivo (Velardez y col., 2004). En estas células, la apoptosis inducida por el NO depende de la generación de estrés oxidativo. Además, el NO produce en forma tiempo-dependiente, la activación de las caspasas 9 y 3. Estas caspasas también han sido involucradas en la apoptosis inducida por glutamato en células adenohipofisarias en cultivo (Caruso y col., 2004). Sin embargo, los inhibidores de caspasas revierten sólo parcialmente el efecto citotóxico del NO, lo que sugeriría la existencia de una vía alternativa de muerte que es independiente de estas enzimas en las células de la glándula (Velardez y col., 2004). En este sentido, recientemente se ha informado que la línea somato-lactotrófica GH4 puede sufrir apoptosis sin intervención de caspasas (Fombonne y col., 2004).

## **1.5 Efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre el sistema endocrino**

Hace más de dos décadas se demostró que el Cd<sup>2+</sup> tiene la capacidad de afectar el sistema endocrino, alterando la concentración sérica de distintas hormonas hipofisarias y gonadales (Chandler y col., 1976; Saksena y col., 1977; Zylber-Haran y col., 1982). Se ha postulado recientemente que este tipo de toxinas endocrinas contribuyen al deterioro de la salud reproductiva y al aumento de la incidencia de cánceres sensibles a hormonas (como cáncer de mamas, de útero o de próstata) en la población occidental (Johnson y col., 2003; Goyer y col., 2004; Waalkes, 2003). Sin

embargo, los mecanismos subyacentes al efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el sistema endocrino todavía son desconocidos.

El estudio de los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el sistema endocrino en humanos es complejo debido a que en general los individuos se encuentran expuestos a más de un contaminante y por lo tanto los resultados pueden ser difíciles de interpretar. Los estudios poblacionales más confiables son aquellos que realizan análisis multivariados que tienen en cuenta diferentes parámetros, como la concentración plasmática de otros agentes tóxicos (por ejemplo: plomo, níquel, compuestos organoclorados, etc.) (Jurasovic y col., 2004). Mediante este tipo de análisis se ha determinado que en hombres no expuestos laboralmente al  $\text{Cd}^{2+}$ , la concentración sérica de este metal se correlaciona negativamente con la de prolactina (Jurasovic y col., 2004). También se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la concentración sérica de otras hormonas como estrógenos, progesterona, testosterona y FSH, aunque existen contradicciones entre los distintos estudios (Henson y Chedrese, 2004; Zeng y col., 2004).

En animales de laboratorio se ha comprobado que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta no sólo los niveles séricos de todas las hormonas adenohipofisarias, sino también los niveles y el metabolismo de los neurotransmisores hipotalámicos que controlan la liberación de estas hormonas (Lafuente y col., 2000b; Lafuente y col., 2001a; Lafuente y col., 2001b; Lafuente y Esquifino, 1999). Los resultados muestran que el efecto del tratamiento *in vivo* con  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel hipotalámico sobre los neurotransmisores que regulan la secreción hipofisaria, no concuerda con las variaciones observadas en los niveles séricos de las hormonas liberadas por esta glándula (Lafuente y col., 2002; Lafuente y col., 2005). Es así como la exposición a concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  de 10 ppm en el agua de bebida durante un mes, disminuye los niveles hipotalámicos de dopamina, principal neurotransmisor inhibitorio de la liberación de prolactina, GABA y serotonina, pero contrariamente a lo esperado, también reduce los niveles séricos de prolactina, GH y ACTH (Lafuente y col., 2002). Esto indicaría que el  $\text{Cd}^{2+}$  causa una disrupción del control normal que el hipotálamo ejerce sobre la liberación de hormonas hipofisarias y sugiere un posible efecto directo sobre la glándula (Lafuente y col., 2002; Lafuente y col., 2003b; Lafuente y col., 2005). Apoyando la última

suposición, se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  se acumula en la adenohipófisis de ratas expuestas al metal (Calderoni y col., 2005; Lafuente y Esquifino, 1999). De esta manera, el  $\text{Cd}^{2+}$  podría afectar la liberación de las hormonas hipofisarias a través de un efecto citotóxico directo sobre las células de la glándula, ya que como se mencionará enseguida, el metal puede generar estrés oxidativo y afectar la expresión génica en otros tejidos (Beyersmann y Hechtenberg, 1997).

El  $\text{Cd}^{2+}$  también puede afectar los patrones circadianos de secreción hormonal (Lafuente y col., 2004), por lo que podría ser considerado además, como una toxina de los ritmos circadianos. La naturaleza de este fenómeno tampoco es clara y podría deberse a un efecto del metal sobre regiones hipotalámicas relacionadas con estos ritmos. De hecho, el  $\text{Cd}^{2+}$  actúa sobre el ritmo diario del metabolismo de distintos neurotransmisores en el sistema nervioso central (Lafuente y col., 2003b).

Otro factor que confunde el estudio de los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$ , tanto en humanos como en animales de laboratorio, es que este metal al igual que otros agentes tóxicos, puede presentar un efecto de hormesis (Calabrese y Baldwin, 2003); es decir que dependiendo de la concentración, el  $\text{Cd}^{2+}$  puede tener efectos opuestos. En este sentido, resultados recientes muestran que la exposición crónica a dosis bajas de  $\text{Cd}^{2+}$  en el agua de bebida (5 ppm) causa un aumento en la concentración plasmática de prolactina (Lafuente y col., 2003a), efecto opuesto al observado cuando se expone a los animales a 10 ppm o más. De igual modo, dosis bajas de  $\text{Cd}^{2+}$  aumentan también la producción de progesterona en tejido placentario, mientras que concentraciones superiores la inhiben (Henson y Chedrese, 2004).

Se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  en concentraciones muy bajas, puede actuar como un xenoestrógeno. En 1994, García-Morales y col. demostraron que concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  en el orden de 1  $\mu\text{M}$ , inducen efectos similares a los del estrógeno en células derivadas de tumor mamario MCF-7 (García-Morales y col., 1994). Recientemente se ha confirmado que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede unirse y activar al receptor de esta hormona esteroidea (Stoica y col., 2000). Experimentos *in vivo* utilizando dosis de  $\text{Cd}^{2+}$  en el orden de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  muestran que el metal aumenta la proliferación del tejido mamario y uterino. Este efecto puede ser prevenido por antagonistas estrogénicos puros como el ICI 182,780 (Johnson y col., 2003). Esta acción proestrogénica del  $\text{Cd}^{2+}$  podría

explicar el aumento en los niveles séricos de prolactina que muestran los animales expuestos a concentraciones bajas de  $\text{Cd}^{2+}$ , independientemente del efecto del metal a nivel del hipotálamo.

El  $\text{Cd}^{2+}$ , además de alterar el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario, afecta la síntesis de hormonas esteroideas *in vivo* e *in vitro* en las gonadas, la placenta y la glándula adrenal (Henson y Chedrese, 2004; Mathias y col., 1998). En este caso la acción del  $\text{Cd}^{2+}$  se debe, al menos parcialmente, a su efecto sobre la expresión de la enzima citocromo P450 (Smida y col., 2004). Al igual que para las hormonas adenohipofisarias, el  $\text{Cd}^{2+}$  también presenta un efecto hormético sobre la síntesis de hormonas esteroideas y la respuesta es específica en cada tejido, observándose diferencias entre el ovario y la placenta (Henson y Chedrese, 2004).

En estudios de laboratorio también se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta a la glándula tiroidea, alterando tanto los niveles de triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) como la relación T3/T4 y la viabilidad de las células de la glándula (Ghosh y Bhattacharya, 1992; Gupta y Kar, 1999). Sin embargo, hasta el momento no existen pruebas concluyentes de que el metal afecte la función tiroidea en humanos (Andrzejak y col., 1996).

## **1.6 Mecanismos de acción del $\text{Cd}^{2+}$ en otros tejidos**

### **1.6.1 Estrés oxidativo y óxido nítrico**

Se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de generar estrés oxidativo en distintos tejidos y tipos celulares (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Merzenich y col., 2001; Pourahmad y col., 2003; Shih y col., 2004; Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005). A diferencia de otros metales como el  $\text{Cu(II)}$  o el  $\text{Fe(II)}$ , el  $\text{Cd}^{2+}$  no es un metal redox activo y es incapaz de generar especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de reacciones cíclicas del tipo de Fenton (Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005). A pesar de esto, el  $\text{Cd}^{2+}$  puede aumentar la formación de ROS a través de diferentes procesos indirectos.



Una de las características más remarcables del  $\text{Cd}^{2+}$  es su alta afinidad por los grupos sulfidrilos (SH) (Figueiredo-Pereira y col., 1998). Esta gran afinidad lo hace muy reactivo con el glutatión (GSH), principal antioxidante no enzimático en las células (Stohs y Bagchi, 1995). Se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  forma complejos con el GSH reduciendo marcadamente los niveles celulares de este importante antioxidante y contribuyendo de esta manera a un aumento de los niveles de ROS (Stohs y Bagchi, 1995). La afinidad altísima del  $\text{Cd}^{2+}$  por los grupos SH también le permite desplazar Fe y Cu unidos a grupos no hemo. Esto causa un aumento de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  libres en la célula, lo que a su vez conlleva al desarrollo de reacciones del tipo de Fenton que generan ROS (Watjen y Beyersmann, 2004).

Se ha demostrado también que a nivel genético, el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar a la maquinaria antioxidante celular (Stohs y Bagchi, 1995). En células de hígado de ratón se determinó que el metal es capaz de inhibir la síntesis de enzimas antioxidantes tales como la catalasa y la superóxido dismutasa (Ikediobi y col., 2004), esta disminución de las defensas antioxidantes contribuye a un aumento de los niveles intracelulares de ROS.

Las mitocondrias son la principal fuente intracelular de ROS (Budd y col., 2000; Droge, 2002; Tan y col., 1998). El  $\text{Cd}^{2+}$  sería capaz, por diferentes vías, de modificar la funcionalidad de estas organelas aumentando su producción de ROS. El  $\text{Cd}^{2+}$  puede aumentar los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lemarie y col., 2004). Se ha demostrado que un aumento de estos niveles puede alterar la funcionalidad de las mitocondrias, afectando a la cadena de transporte de electrones (CTE) y activando proteasas intramitocondriales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chakraborti y col., 1999; Jambrina y col., 2003; Petrosillo y col., 2004; Vindis y col., 2005). También se ha comprobado recientemente, en mitocondrias aisladas, que el  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe al complejo III de la CTE (Wang y col., 137). Este complejo es el principal generador de ROS en las mitocondrias y su inhibición incrementa la producción de las mismas (Poderoso y col., 1996).

Una prueba contundente de que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede generar estrés oxidativo y de que éste se encuentra frecuentemente involucrado en los efectos tóxicos del metal, es que el tratamiento con antioxidantes previene o disminuye los efectos tóxicos del

mismo en muchos de los sistemas ensayados (Valko y col., 2005). Por otro lado, líneas celulares seleccionadas por su alta resistencia al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) poseen resistencia cruzada al tratamiento con  $Cd^{2+}$  (Sugiyama, 1994). Debido a que el efecto tóxico del  $Cd^{2+}$  depende de la generación de estrés oxidativo en la mayoría de los casos, los tejidos más vulnerables al metal serían aquellos que tienen una baja capacidad de respuesta a un aumento en la producción de ROS (Stohs y Bagchi, 1995).

Se ha demostrado que el  $Cd^{2+}$  puede modular la síntesis de NO en células de origen linfático (Ramirez y col., 1999; Tian y Lawrence, 1996). El  $Cd^{2+}$  puede causar un aumento o una disminución de la síntesis de este radical libre dependiendo de la concentración y de los tiempos ensayados (Ramirez y col., 1999). Como se mencionara previamente, el NO es un radical libre poco reactivo, pero combinado con otros radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) puede generar RNOS, en especial el muy reactivo  $ONOO^{\bullet-}$  y resultar tóxico (Boczkowski y col., 2001; Riobo y col., 2001).

Existen controversias acerca del papel del NO en el efecto citotóxico del  $Cd^{2+}$ . Mientras que algunos autores han informado un papel citoprotector otros han reportado un efecto citotóxico del NO durante el tratamiento con el metal (Demontis y col., 1998; Misra y col., 1996; Liu y col., 2004). Esta discrepancia en los resultados podría deberse a los tipos diferentes de dadores de NO utilizados por los distintos autores. Estos dadores, aunque sean empleados a igual concentración nominal, poseen tasas diferentes de liberación de NO, lo que lleva a concentraciones efectivas diferentes del gas en solución y por ello, a distintos tipos de reacciones (Feelisch, 1998). Por otro lado, Harstad y Klaassen han informado no encontrar diferencias en la hepatotoxicidad causada por el  $Cd^{2+}$  en ratones knockout para NOS2, con respecto a animales normales (Harstad y Klaassen, 2002), sugiriendo que el NO no participaría en los efectos del metal en ese tejido.

## 1.6.2 Homeostasis del Calcio

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un segundo mensajero universal que controla una amplia variedad de procesos celulares y respuestas adaptativas (Carafoli, 2002; Petersen y col., 2005) y su papel en la fisiología celular se conoce desde hace más de 120 años (Ringer, 1882). Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  controlan la actividad de una gran variedad de enzimas, la expresión de genes, los procesos de exocitosis, etc., pudiendo determinar también la muerte celular (Alberdi y col., 2005). Entre las enzimas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  podemos mencionar: Ca-calmodulina quinasa II (CaMKII), proteína fosfatasa 2 (calcineurina), proteína quinasa C (PKC) y las NOS constitutivas (Bandyopadhyay y col., 2004; Bers y Guo, 2005; De Arcangelis y col., 2005; Schmidt y col., 1992).

Debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en múltiples procesos vitales para la célula, su concentración citosólica se mantiene estrictamente regulada y en condiciones basales no supera  $0.1 \mu\text{M}$  (Carafoli, 2002). Esta concentración es 4 órdenes de magnitud inferior a la extracelular normal (Carafoli, 2002). Los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen bajos gracias a los sistemas de transporte activo del catión, que lo acumulan en el retículo endoplásmico (el principal depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y transitoriamente en las mitocondrias o lo excluyen hacia el medio extracelular (Gunter y col., 2004; Szabadkai y Rizzuto, 2004; Verkhratsky, 2002).

Aumentos prolongados en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden activar diferentes mecanismos que conducen a la muerte celular. Entre ellos se puede mencionar un incremento en la fosforilación y expresión de la proteína proapoptótica y de arresto celular p53 (Chan y col., 2002) y la activación de proteasas con funciones similares a las caspasas llamadas calpaínas (Benjamins y col., 2003; Nakagawa y col., 2000; Rao y col., 2002;). Las calpaínas son enzimas asociadas al retículo endoplásmico que activan a la caspasa-3 pero que también pueden promover un camino apoptótico independiente de caspasas (Carafoli y Molinari, 1998).

Las mitocondrias pueden funcionar como depósitos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , actuando como moduladores (*buffers*) de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol (Chakraborti y col., 1999). El uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial utiliza la fuerza protón motriz de la mitocondria para transportar contra gradiente químico el  $\text{Ca}^{2+}$  a la organela (Jambrina y col., 2003). Sin embargo, si la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica se mantiene elevada durante mucho tiempo, el aumento prolongado de  $\text{Ca}^{2+}$  en las

mitocondrias puede afectar la integridad de éstas disparando la vía apoptótica intrínseca (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003).

El radio atómico del  $\text{Ca}^{2+}$  es de 99 Å mientras que el del  $\text{Cd}^{2+}$  es de 97 Å. Esta propiedad, unida a la similitud de carga, permite que el  $\text{Cd}^{2+}$  pueda reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  en muchos componentes celulares (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; The Merck Index, 1976). Debido a esto, en algunos tipos celulares, como la línea celular GH4 derivada de tumor hipofisario, más del 60 % del  $\text{Cd}^{2+}$  entra a la célula a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Brzoska y Moniuszko-Jakoniuk, 19980; Hinkle y col., 1987). Se ha informado además, que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede activar de manera específica enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como la proteínquinasa C (PKC) (Romare y Lundholm, 1999). Más aún, existen informes de que el  $\text{Cd}^{2+}$ , al unirse a calmodulina, puede activar enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Flik y col., 1987; Suzuki y col., 1985).

El  $\text{Cd}^{2+}$  actúa sobre la movilización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este metal funciona como un bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Giles y col., 1983; Thevenod y col., 2000). Esta propiedad ha permitido que el  $\text{Cd}^{2+}$  sea utilizado en electrofisiología como un inhibidor de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wright y col., 1996).

El  $\text{Cd}^{2+}$ , a pesar de bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, puede causar un aumento progresivo de los niveles citosólicos del catión debido a que inhibe tanto a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) como a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Mould y Dulhunty, 2000; Verbost y col., 1988). La inhibición de estas enzimas impide la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, donde éste ingresa por diferentes vías inespecíficas debido a que su entrada se encuentra muy favorecida por gradiente electroquímico (Carafoli, 2002). Sumado a esto, el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de estimular la producción de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), causando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde su depósito intracelular (Smith y col., 1989).

### 1.6.3 Cambios en la expresión génica

El  $\text{Cd}^{2+}$  afecta tanto la transcripción como la traducción. Esto ha llevado a postularlo como un carcinógeno debido a que la desregulación de la expresión génica es considerada un factor importante en modelos multietapa de carcinogénesis química, en especial cuando se inducen proto-oncogenes (Waisberg y col., 2003). Por otro lado, el  $\text{Cd}^{2+}$  puede inducir genes de respuesta al estrés lo cual es visto como un mecanismo protector que facilita la detoxificación, ya sea estimulando la síntesis de quelantes para el metal o aumentando las defensas contra el estrés oxidativo (Hanahan y Weinberg, 2000; Waisberg y col., 2003). La Tabla 1 muestra algunos de los genes que son afectados por el  $\text{Cd}^{2+}$  así como también el sistema en el que fueron estudiados.

Existen diversos mecanismos por los cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la expresión génica. Hasta el momento, el mecanismo más conocido es la modulación de vías de señalización intracelular, modificando los niveles de fosforilación de distintos factores de transcripción y traducción (Waisberg y col., 2003). Sin embargo, el  $\text{Cd}^{2+}$  también puede afectar la expresión génica uniéndose directamente a factores de transcripción como el factor de transcripción de respuesta a metales-1 (*metal response element transcription factor-1*, MTF-1) (Smirnova y col., 2000) o al ya mencionado receptor de estrógenos (ER) (Stoica y col., 2000).

La metalotioneína (MT) es una proteína pequeña y rica en cisteínas involucrada en el control de la homeostasis de los metales esenciales pero que también juega un papel importante en la defensa contra los metales tóxicos (Vasak, 2005). El gen de la MT tiene varios elementos respondedores a metales (MRE) en su promotor y es el paradigma de la proteína inducida en forma directa por  $\text{Cd}^{2+}$  (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). Cada MRE tiene especificidad diferente para distintos metales y ésta es aportada por los factores de transcripción que se unen a ellos (Haq y col., 2003). Esta proteína además de brindar protección contra el  $\text{Cd}^{2+}$ , disminuye la toxicidad de otros agentes como las ROS o la radiación UV (Haq y col., 2003).

Entre las formas indirectas por las cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de modificar la expresión génica, también se pueden mencionar su efecto sobre segundos mensajeros como las ROS, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el NO y las cascadas de señalización intracelular que involucran quinasas y metilasas de citosinas del DNA (Waisberg y col., 2003). Las ROS constituyen probablemente una de las principales vías por las cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la expresión génica. Existen numerosos factores de transcripción sensibles a cambios en el estado redox de las células, entre ellos AP1 y NF $\kappa$ B. El papel de las ROS en la activación transcripcional de AP1 por  $\text{Cd}^{2+}$  está bien documentado (Joseph y col., 2001).

Al aumentar los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Cd}^{2+}$  promueve la interacción directa del  $\text{Ca}^{2+}$  con la proteína de unión al elemento respondedor a cAMP (*cAMP-response element binding protein*, CREB) afectando de este modo la expresión de genes relevantes para el correcto funcionamiento de las células (Bading y col., 1997).

Entre las quinasas activadas en las células expuestas al  $\text{Cd}^{2+}$  se incluyen la PKC (Watkin y col., 2003), la proteína quinasa activada por estrés (*stress activated protein kinase*, SAPK) (Ding y Templeton, 2000) y los tres tipos de proteína quinasas activadas por mitógenos (*mitogen activated protein kinases*, MAPKs), proteína quinasa activada por señales extracelulares (*extracellular signal-activated protein kinase*, ERK), quinasa N-terminal de jun (*Jun N-terminal kinase*, JNK) y p38 MAPK (LaRoche y col., 2001). La activación de estas quinasas produce la fosforilación de gran cantidad de factores de transcripción, lo que lleva a su activación y al aumento de la expresión de los genes bajo su dominio.

El  $\text{Cd}^{2+}$  no sólo regula de manera positiva la actividad transcripcional sino que también puede ejercer un efecto negativo sobre la actividad de distintos factores de transcripción. De este modo, el metal tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de HIF-1 (Obara y col., 2003) y Sp-1 (Watkin y col., 2003), disminuyendo la expresión de genes que están bajo el control de estos últimos.

## 2. Objetivos

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un disruptor endocrino, tanto en humanos como en animales de laboratorio. Hasta el momento las evidencias de que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta de manera directa la liberación de hormonas adenohipofisarias es escasa y no se han realizado estudios para investigar los posibles mecanismos de acción del mismo en la glándula. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue:

INVESTIGAR EL EFECTO DEL  $\text{Cd}^{2+}$  SOBRE LA SECRECIÓN HORMONAL Y LA VIABILIDAD CELULAR ADENOHIPOFISARIA, ASÍ COMO TAMBIÉN SUS MECANISMOS DE ACCIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Para ellos se evaluaron:

- El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la liberación de prolactina y la viabilidad celular en cultivos primarios de células adenohipofisarias.
- Distinto mecanismos por los cuales el metal puede afectar ambos parámetros.
- Teniendo en cuenta los resultados de los dos puntos anteriores, se investigó en un modelo *in vivo* la reproducibilidad del modelo *in vitro*.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Reactivos

El  $\text{CdCl}_2$  fue provisto por Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO, USA). DETA NONOato, LY-83583, Ac-DEVD-pNA, Ac-LEHD-pNA, Ac-DEVD-CHO, N-acetil-cisteína y Trolox, fueron provistos por Alexis (San Diego, CA, USA). Todos los reactivos para cultivo primario, excepto el medio mínimo esencial de Dulbecco y el suero fetal bovino, fueron provistos por GIBCO (Bs. As., Argentina). El suero fetal bovino fue adquirido en GEN SA (Bs. As., Argentina). Dihidrorodamina 123 (DHR123), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), 5,6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-DCF-DA) y Calcium-green fueron provistos por Molecular Probes (Eugen, OR, USA). La thapsigargina fue provista por Alomone (Jerusalem, Israel). La nitrato reductasa y la lactato deshidrogenada fueron compradas en Boehringer-Mannheim (GmbH, Alemania). Los reactivos para extracción de RNA y PCR (común y cuantitativa) fueron provistos por Qiagen (Hilden, Alemania). Los reactivos para RT-PCR y primers fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El resto de los reactivos y drogas utilizados (incluyendo el medio mínimo esencial de Dulbecco) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Bs. As., Argentina). El material descartable estéril fue provisto por ETC (Bs As, Argentina).

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



## 3.2 Animales

### Experimentos *in vitro*:

Los animales fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron ratas machos 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 al agua y alimento balanceado Ganave (Bs. As., Argentina). Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996). Los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis rápidamente removidas y colocadas en recipientes estériles para su posterior disgregación y obtención de cultivos primarios.

### Experimentos *in vivo*:

Los animales fueron provistos por la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, España. Se utilizaron ratas machos adultas de la cepa Wistar de 60 días de edad al comienzo del experimento y fueron mantenidas a 21-24 °C con una fotofase de 12 horas (08:00-20:00), 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 la Salud de los Estados Unidos (NIH) (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996).

Las ratas fueron expuestas al CdCl<sub>2</sub> a través del agua de bebida a una concentración de 5 ppm durante 1 mes. En los experimentos con melatonina las ratas recibieron el CdCl<sub>2</sub> (5 ppm) y la melatonina en el agua de bebida (3 µg/ml). La solución madre de melatonina se preparó en etanol 50 %. La concentración final de etanol en el agua de bebida fue de 0.015%. Etanol al 0.015 % fue añadido al agua de bebida de las ratas controles y tratadas con Cd<sup>2+</sup>. No hubo diferencias entre el agua consumida por los distintos grupos. En promedio cada animal consumió 25 ml de agua. Teniendo en cuenta que la absorción de Cd<sup>2+</sup> a nivel intestinal es de aproximadamente un 5 % (WHO, 1995), cada animal recibió una dosis diaria de 6.25

$\mu\text{g}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ . Basados en los mismos datos, los animales recibieron una dosis diaria de aproximadamente 75  $\mu\text{g}$  de melatonina. Se ha informado previamente que el 90-95 % del consumo de agua por las ratas ocurre durante la noche (Rasmussen y col., 1999), por lo que los animales recibieron la mayor parte de la droga durante la fase natural en la que su liberación desde la glándula pineal es mayor (Rasmussen y col., 1999).

Finalizado el período de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y la adenohipófisis, el hipotálamo y el hígado fueron extraídos rápidamente y preservados en RNlater (Qiagen) o inmediatamente congelados dependiendo de su posterior utilización.

### **3.3 Cultivos primarios de células adenohipofisarias**

Las adenohipófisis fueron colocadas en un tubo estéril de 50 mL con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM), suplementado con L-glutamina 1 %, aminoácidos para medios de cultivo mínimos esenciales (MEM-aa) 1 %, gentamicina 0.26 % m/vol, anfotericina B 0.56% m/vol, pH 7.35-7.40 (DMEM-S) y seroalbúmina bovina (BSA) 0.3%. Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y cortadas en trozos de 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente. Los fragmentos obtenidos fueron sucesivamente tratados con tripsina 0.25% durante 20 min a 37 °C sin agitación en condiciones de gaseado con CO<sub>2</sub> al 5%, inhibidor de tripsina 0.1% 10 min y desoxirribonucleasa del tipo II 0.1 % 5 min, e. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados con buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) libre de Ca<sup>2+</sup> y de Mg<sup>2+</sup> (KRB-CMF) pH 7.35-7.40, con EDTA 2 mM, EDTA 1 mM y sin EDTA (en tres pasos sucesivos). En cada lavado se centrifugó tres minutos a 900 x g. 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 centrifugadas a 1000 g 8 min y luego resuspendidas en DMEM-S con suero fetal bovino 10 % (FBS).

El número de células obtenidas de la 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%.

Después del recuento, las células resuspendidas en DMEM-S-FBS 10% fueron sembradas en las placas de cultivo y estabilizadas durante 72 h en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> antes de realizar los distintos experimentos.

### 3.4 Tratamiento de las células en cultivo

Luego del período de estabilización el medio fue reemplazado por DMEM-S-FBS 10% fresco, solo, o con el agregado de Cd<sup>2+</sup> o las diferentes drogas estudiadas según el diseño experimental. El Cd<sup>2+</sup> fue administrado como CdCl<sub>2</sub> a partir de una solución madre de CdCl<sub>2</sub> 5 mM en agua bidestilada. En los casos en los cuales las drogas debieron ser disueltas en DMSO (ver tabla 2), se agregó al medio control la misma concentración de DMSO presente en el medio de las células tratadas con la máxima concentración de la droga. La concentración de DMSO nunca fue mayor a 0.05 %, concentración que no alteró la actividad celular en nuestro sistema.

Cuando se estudió el efecto de alguna droga sobre la acción del Cd<sup>2+</sup> en las células, ésta fueron preincubadas con la droga sola durante 30-60 min para evitar problemas entre la cinética de acción del Cd<sup>2+</sup> y la droga.

Droga	Conc. de la solución madre (mM)	Solvente
BAPTA	20	DMSO
CaGreen	20	DMSO
Calpain inhibitor 1	100	DMSO
Ciclosporina A	50	Etanol
DCF-DA	500	DMSO
DHR123	200	DMSO
DIOC <sub>6</sub>	1000	DMSO
Rojo de rutenio	100	Agua
Tapsigargina	1000	DMSO
TPEN	50	DMSO

**Tabla 2. Drogas empleadas en los experimentos, concentración de sus soluciones madres y solventes utilizados**

Debido a que el DETANONOato tiene una cinética de liberación de NO lenta, las soluciones con DETANONOato fueron preparadas una hora antes de su utilización para permitir que la concentración de NO llegue a un estado estacionario (Lewis y Deen, 1994).

### **3.5 Ensayo de actividad celular (ensayo de MTT)**

En los experimentos diseñados para la medición de actividad celular, las células monodispersas fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos ( $0.1 \times 10^6$  células/pocillo en 200  $\mu$ l). Finalizado el tratamiento, 160  $\mu$ l del medio 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 pocillos fue descartado. Con posterioridad a la aspiración del medio remanente, los pocillos fueron lavados 2 veces con 100  $\mu$ l de buffer KRB y posteriormente se agregaron 110  $\mu$ L de una solución de metil-tiazol-tetrazolio (MTT) 5 mg/11 mL en buffer KRB en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 3 h ( $37$  °C, 5%  $\text{CO}_2$  en aire), para permitir la formación de los cristales de formazán. Al término del periodo de incubación, se retiraron cuidadosamente 90  $\mu$ L de la solución de MTT y se agregaron 100  $\mu$ L 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 3 horas de incubación con la solución de MTT. Una vez desarrollado el color, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

### **3.6 Radio inmunoensayo (RIA)**

Como diluyente de las muestras, el estándar y la prolactina radioactiva se utilizó buffer fosfato salino (PBS) pH 7.6 con BSA al 1%. Como diluyente para el primer anticuerpo se utilizó PBS-EDTA 25 mM con suero normal de conejo (NRS) al

1 %. El volumen final del ensayo fue 400  $\mu\text{L}$  donde se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de muestra, 100  $\mu\text{L}$  de primer anticuerpo, 100  $\mu\text{L}$  de PBS y 100  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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 1000 x g. La radioactividad del pellet fue cuantificada en un contador gamma. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores al 10%.

### **3.7 Análisis de la morfología nuclear**

Para el estudio morfológico de los núcleos las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (Fisherbrand 12 mm, Fisher Scientific, USA), ubicados dentro de placas de cultivo de 24 pocillos ( $0.1 \times 10^6$  células/cubreobjeto en 500  $\mu\text{l}$ ). Las células se incubaron como en los experimentos diseñados para la medición de la actividad celular.

Al término de las incubaciones, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas por inmersión en PBS a 4 °C una vez e inmediatamente fijadas en paraformaldehído 4% en PBS durante 30 min a 4 °C. Después de la fijación las células fueron lavadas por inmersión en PBS 3 veces y luego en agua destilada. Finalizados los lavados, las células se montaron en una solución de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1,4 diazabicyclooctano (DABCO) 23.3  $\text{mg}/\text{ml}$ , 20 mM Tris-HCl (pH 8) en glicerol.

La morfología nuclear fue observada y cuantificada en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Se contaron al menos 500 núcleos por cubreobjetos en campos elegidos al azar en tres experimentos independientes. El conteo en cada cubreobjetos fue realizado por tres personas distintas. Los datos están expresados como: núcleos con morfología apoptótica/núcleos totales x 100.

### 3.8 Ensayo de fragmentación del DNA (Ladder)

Para los estudios de fragmentación del DNA, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos ( $2.5 \times 10^6$  células/pocillo en 4 ml) y las células de 3 pocillos se juntaron para la extracción por cada tratamiento.

La extracción de DNA se basó en el método de preparación de DNA con columnas de la firma Qiagen (QIAprep Spin, Cat. N° 27104), según las modificaciones introducidas por Steinfelder y col. (Steinfelder y col., 2000). Finalizado el tratamiento el medio de los tres pocillos fue colocado en un tubo de centrifuga de 50 ml, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS a 4 °C y el medio de los lavados se agregó al tubo de centrifuga. Las células fueron levantadas de los pocillos en 2 ml de PBS con la ayuda de una espátula de goma y se colocaron en el tubo de centrifuga. Las células se centrifugaron a  $900 \times g$  10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.

El pellet fue resuspendido suavemente en 0.25 ml de buffer TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM (TE) pH 7.5 y transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 0.25 ml de duodecil sulfato de sodio (SDS) 1.2% y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0.35 ml de una solución de CsCl 3 M, acetato de potasio 1 M, ácido acético glacial 0.67 M, mezclando por inversión muy suavemente y se dejó reposar 15 min en hielo.

El lisado celular se centrifugó a 14.000 rpm 15 min a temperatura ambiente y 0.7 ml del sobrenadante se transfirieron a una columna para extracción de DNA Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Ref. N° 27104, GmbH, Alemania).

La columna se centrifugó a 14.000 rpm 1 min a temperatura ambiente y se descartó el medio eluido. Posteriormente se añadieron a la columna 0.7 ml de una solución de acetato de potasio 80 mM, TrisHCl 10 mM, EDTA 40  $\mu$ M, etanol 60% pH 7.5 y la columna se centrifugó a 14.000 rpm 1 min.

Finalizada esta centrifugación la columna se transfirió a un tubo Eppendorf libre de DNasa y se le agregaron 50  $\mu$ l de buffer TE pH 8 a 50 °C. La columna se dejó descansar 5 min y se centrifugó a 14.000 rpm 1 min.

se corrieron 20  $\mu$ l del eluido en un gel de agarosa al 1.8% a 100 V durante 1.5 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador luego de incubar el gel durante 15 min en bromuro de etidio 10  $\mu$ g/ml en buffer TE.

### **3.9 Citometría de flujo para la medición de sondas fluorescentes**

Para los estudios de citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo en 1 ml). Para permitir que las células incorporaran la sonda, éstas fueron añadidas directamente a los medios de cultivo (a partir de una solución 100X) 20 min antes de finalizar los tratamientos. Al finalizar el periodo de incubación las células fueron lavadas con buffer KRB-CMF y resuspendidas por incubación con 300  $\mu$ l de buffer KRB-CMF con EDTA 0.5 mM y tripsina 0.25% m/v por 5 min a temperatura ambiente. Luego de esto la actividad de la tripsina fue inhibida por el agregado de 33  $\mu$ l de FBS. Se agregó ioduro de propidio (IP, 50  $\mu$ g/ml) a la suspensión de células para detectar células inviables y se midió la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScalibur. La excitación de todas las moléculas se realizó con un laser de argón (488 nm), el registro de la fluorescencia de todas las sondas se realizó en el canal FL1 (535 nm) y el de IP se hizo en el canal FL2 (585).

Los datos obtenidos en el citómetro fueron analizados utilizando el programa WinMDI (<http://facs.scripps.edu>). El PI sólo es capaz de teñir células con la membrana plasmática dañada, por lo que estas células son consideradas inviables. En el control, las células positivas para IP fueron siempre menos del 5%. Las células positivas para IP no fueron utilizadas para los análisis subsiguientes, por lo que los datos presentados corresponden solamente a células que todavía son consideradas viables.

### **3.10 Citometría de flujo para la cuantificación del contenido de DNA nuclear**

Para el estudio de contenido de DNA nuclear por citometría de flujo, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo en 1 ml). Al finalizar los distintos tratamientos las células fueron lavadas con buffer KRB libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  e incubadas en 300  $\mu\text{l}$  de buffer KRB-CMF con EDTA 0.5 mM y tripsina 0.25% m/v por 5 min a temperatura ambiente. Luego de esto la actividad de la tripsina fue inhibida por el agregado de 33  $\mu\text{l}$  de suero fetal bovino. El medio recogido en los lavados se juntó con las células resuspendidas y se centrifugó todo a  $900 \times g$  10 min. El pellet se resuspendió suavemente en 2 ml de etanol 70% a 4 °C y se incubó a 4 °C durante 2 h para realizar la fijación. Las células fijadas se resuspendieron suavemente en 200  $\mu\text{l}$  de una solución 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNasa en PBS (pH 7.4) 15 min a 37 °C y luego fueron colocadas a 4 °C por lo menos 24 h hasta la determinación de la fluorescencia por citometría de flujo. La determinación de la fluorescencia se efectuó en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScalibur. La excitación se realizó con láser de argón (488 nm), el registro de la fluorescencia se realizó en el canal FL2 (585 nm). Los datos adquiridos por el citómetro fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

### **3.11 Cuantificación de fluorescencia por espectrofluorometría**

Para la cuantificación de fluorescencia por espectrofluorometría, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos ( $0.5 \times 10^6$  células/pocillo en 1 ml). Para que las células incorporaran la sonda, éstas fueron añadidas directamente a los medios de cultivo (a partir de una solución 100X) 20 minutos antes de finalizar los tratamientos. Al finalizar el período de incubación las células fueron lavadas con buffer KRB-CMF e incubadas en 300  $\mu\text{l}$  de buffer KRB-CMF con EDTA 0.5 mM y



tripsina 0.25% m/v por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto la actividad de la tripsina fue inhibida por el agregado de 33  $\mu$ l de FBS.

Las células en suspensión fueron colocadas en cubetas de cuarzo y la fluorescencia de las sondas ( $\lambda_{ex}$ :505 nm;  $\lambda_{em}$ : 535 nm, en todos los casos) se determinó en un espectrofluorómetro Kontron SFM-25. Luego de esta medición las células fueron lisadas con Igepal (concentración final 1%), se agregó a la solución PI (concentración final 50  $\mu$ g/ml) y se determinó la fluorescencia del PI ( $\lambda_{ex}$ : 535 nm;  $\lambda_{em}$ : 585 nm). La fluorescencia de las sondas en los distintos tratamientos fue normalizada por el contenido de DNA (fluorescencia de PI).

### **3.12 Determinación de los niveles de óxido nítrico en los medios de cultivo**

El método de determinación de los niveles de NO se basó en la medición de nitratos y nitritos ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ), productos estables de la descomposición de este gas en soluciones acuosas. La determinación de nitratos y nitritos se realizó por el método de Griess-nitrato reductasa (Grisham y col., 1996). Para estos ensayos se sembraron  $1 \times 10^6$  células/well en 1 ml en placas de 24 pocillos.

El método de Griess es un ensayo colorimétrico que permite medir la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en una solución. Como el producto final de la descomposición de NO es el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), se utilizó la enzima nitrato reductasa para convertir el  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$ . La reacción para la transformación se realizó agregando 50  $\mu$ l del medio de cultivo en 50  $\mu$ l de una solución 0.2 mM NADPH, 8 mU/ $\mu$ l nitrato reductasa, 10 mM HEPES pH 7.4. El NADPH remanente, que puede interferir con la determinación espectrofotométrica, fue eliminado por el agregado de 35  $\mu$ l de una solución 60 mM piruvato y 55 U/ml piruvato deshidrogenada.

La reacción de Griess se realizó mezclando 100  $\mu$ l de la solución anterior con 50  $\mu$ l de ácido sulfanílico 1% en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5% 5 min a temperatura ambiente y posterior agregado de 50  $\mu$ l de N-(1-Naphthyl) Ethylendiamide (NEDA) 0.1%. Esta solución se incubó por 15 min y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro

Beckman Coulter DU520. Para establecer la concentración de las muestras se realizó una curva estándar con  $\text{NaNO}_2$ .

El Cd metálico es utilizado en un método electroquímico para la reducción de  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$ . Para establecer si el  $\text{Cd}^{2+}$ , a las concentraciones utilizadas, podía afectar la reacción de Griess, se realizaron determinaciones de curvas estándar de  $\text{NaNO}_3$  en presencia y ausencia de  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$ . El  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  no afectó la reacción, ya que las pendientes de las curvas con y sin  $\text{Cd}^{2+}$  fueron las mismas (Control  $3.282 \pm 0.192 \text{ mM}^{-1}$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$ :  $3.095 \pm 0.068 \text{ mM}^{-1}$ ; pendiente de la curva  $\pm$  intervalo de confianza (95%);  $n = 3$ ,  $N = 24$ ). El  $\text{Cd}^{2+}$  tampoco afectó la liberación de NO por parte del DETANONOato ya que la concentración de  $\text{NO}_2^-$  acumulados en un medio con o sin  $\text{Cd}^{2+}$  fue la misma.

### **3.13 Determinación de la peroxidación lipídica (Ensayo de TBARS)**

La determinación de la peroxidación lipídica se realizó por el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Santamaria y col., 1997).

Para esta determinación se sembraron  $3 \times 10^6$  células en 4 ml en placas de 6 pocillos. Al finalizar el tratamiento los pocillos fueron lavados con buffer KRB-CMF con EDTA 2 mM. El medio de los lavados se recogió en tubos de centrifuga y se colocó en hielo. Las células fueron incubadas 15 min en KRB-CMF con EDTA 2 mM a 4 °C y luego levantadas de los pocillos con la ayuda de una espátula de goma. Las células resuspendidas se agregaron a los tubos de centrifuga que contenían los lavados y se centrifugó todo a  $900 \times g$  15 min a 4 °C.

El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-Maleato pH 7.00 NaCl 7.5 mM. Se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  para la determinación de proteínas. Los 95  $\mu\text{l}$  restantes se transfirieron a un tubo de hemólisis que contenía 2 ml del reactivo de TBARS (Ácido tiobarbitúrico 0.4% m/v, ácido tricloroacético 15% m/v, hidroxitolueno butilado 1 mM en HCl 0.25 N) y se colocaron en un baño a 100 °C durante 20 min. Finalizada la incubación, los tubos

fueron rápidamente colocados en hielo y centrifugados a  $1500 \times g$  20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU520. Los datos se expresaron como:  $(\text{Abs de la muestra}/\text{mg de proteína en la muestra})/(\text{Abs del control}/\text{mg de proteína en el control}) \times 100$ .

Para la determinación de la peroxidación lipídica *in vivo*, una adenohipófisis o un trozo de hipotálamo (aproximadamente 10 mg) por punto fueron homogeneizados en un sonicador Branson, potencia 4, 10 ciclos, 12-15 pulsos. El tejido disgregado fue centrifugado a  $200 \times g$  15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se lo centrifugó a  $10.000 \times g$  15 min. El pellet de la última centrifugación se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-Maleato pH 7.00 NaCl 7.5 mM. A partir de este momento se procedió como se describe para las células.

### **3.14 Extracción de RNA de los tejidos**

El tejido fue preservado a  $-20^\circ\text{C}$  en RNAlater® (Qiagen) hasta la extracción del RNA. La extracción se realizó en columnas para purificación de RNA (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor (RNAeasy project mini kit, Ref. N° 74124). Se utilizaron agua y elementos descartables libres de RNasa y DNasa. La mesada y el resto de los elementos fueron limpiados con papel de filtro embebido en RNaseZap (Ambión, Austin, TX, USA)

Para cada extracción se utilizó media adenohipófisis, un hipotálamo o un trozo de hígado de aproximadamente 10 mg.

El tejido, en buffer de lisis RLT (provisto en el kit), fue disgregado en un sonicador Branson, potencia 4, 10 ciclos, 12-15 pulsos. El lisado se clarificó por centrifugación a 10.000 rpm en microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se agregó una cantidad 1:2 de etanol 70% mezclando inmediatamente por inversión.

Todo el contenido del tubo se transfirió a una columna de extracción y se centrifugó a 10.000 rpm 15 seg. El eluido se descartó y se agregaron a la columna 350  $\mu\text{l}$  de buffer RW1 (provisto en el kit). La columna se volvió a centrifugar a 10.000 rpm 15 seg y se descartó el eluido.

Se agregó a la columna 80  $\mu\text{l}$  de DNasa según indicación del proveedor y se incubó 15 min a 37 °C. Luego se agregaron 350  $\mu\text{l}$  de buffer RW1, se centrifugó a 10.000 rpm 15 seg y se descartó el eluido. Se hicieron 2 lavados de la columna con buffer RPE (provisto en el kit) centrifugando 2 min a 10.000 rpm en cada paso.

Finalmente las columnas fueron colocadas en tubos Eppendorf limpios, se les agregó 30  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasa y se las centrifugó a 10.000 rpm 1 min. En este paso el eluido contiene el mRNA puro. La columna se lavó con 20  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasa sin cambiar el tubo Eppendorf. Posteriormente se realizó un paso adicional de purificación siguiendo las instrucciones del proveedor del kit. Al tubo eppendorf que contenía los 50  $\mu\text{l}$  de RNA en agua se le agregaron 5  $\mu\text{l}$  de buffer 5 X y DNasa I y se los incubó 15 min a temperatura ambiente. Finalizada esta incubación se agregó a los tubos 5  $\mu\text{l}$  de EDTA 25 mM y se los calentó en bloque seco 15 min a 65 °C. Finalizada la incubación los tubos se colocaron rápidamente en hielo.

El contenido de RNA de cada tubo se midió a partir de una alícuota en un espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer para cuantificación de DNA y RNA. Sólo una muestra de treinta y dos presentó una razón de absorbancias 260/280 fuera del rango 1.8-2.1 y fue descartada. La integridad del RNA extraído fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.4%. En ningún caso se detectó una degradación apreciable.

El RNA aislado se guardó a -80 °C hasta realizar la retrotranscripción a cDNA.

### 3.15 RT-PCR

La retrotranscripción del mRNA a cDNA se realizó utilizando el kit SuperScriptII de Invitrogen (Carlslab, CA, USA ref. N° 18064-022) y hexámeros al azar (Invitrogen).

Para cada reacción se utilizó:

1  $\mu\text{g}$  de RNA

Mezcla A (250 ng de hexámeros al azar, 10 nanomoles de cada dNTP (Roche, GmbH, Alemania) y agua libre de RNasa csp 13  $\mu\text{l}$ .

Mezcla B (first-strand buffer (concentración final 1X) y 200 nanomoles de ditioneitol

1  $\mu$ l de SuperScriptII

En un mismo tubo se colocaron 1  $\mu$ g de RNA y mezcla A (volumen final 13  $\mu$ l) y se calentó la solución en bloque seco a 70 °C 5 min. Finalizada la incubación, los tubos se colocaron rápidamente en hielo y se los sometió a un spin corto.

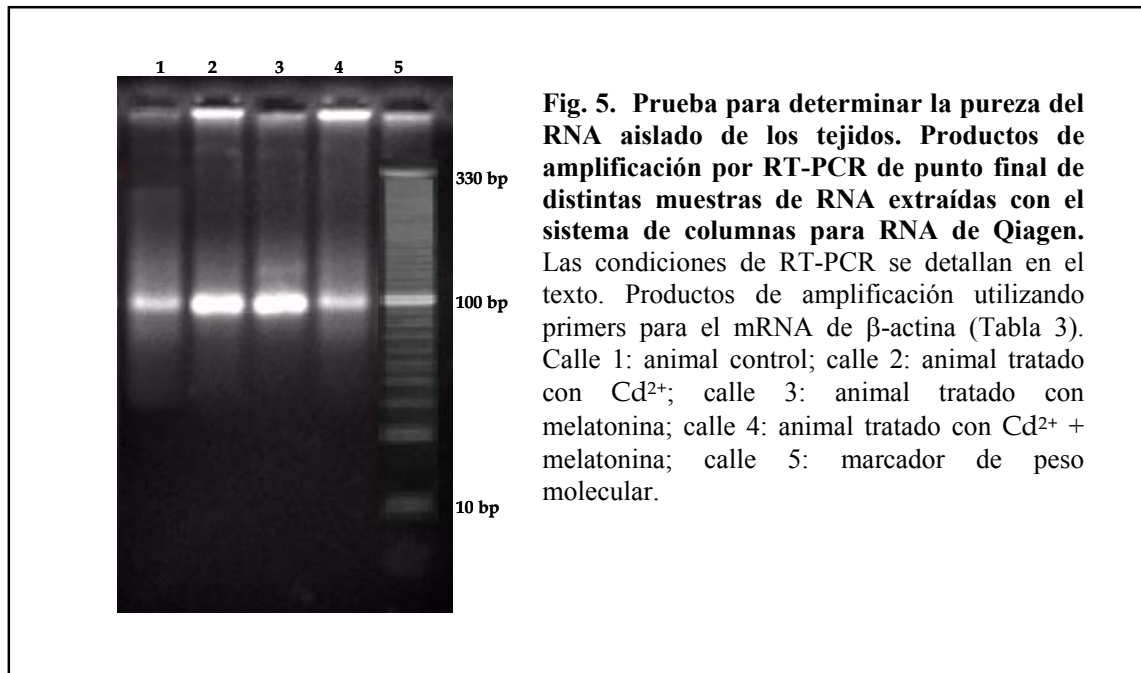
Se colocaron 6  $\mu$ l de la solución B y se incubó por 2 min a 25 °C. Luego los tubos fueron sometidos a un spin corto y se agregó 1  $\mu$ l de SuperScriptII.

Luego los tubos fueron incubados 10 min a 25 °C seguidos por 90 min a 42 °C. Finalizada la incubación los tubos fueron centrifugados brevemente y se los guardó a 4 °C.

Luego de cada RT se realizó una PCR convencional (40 ciclos) con primers para  $\beta$ -actina y se corrió un gel de agarosa al 4% para constatar la eficiencia de la retrotranscripción y la falta de contaminación de las muestras con DNA genómico. Todos los productos de amplificación fueron del tamaño esperado, cercano a los 100 pb (ver tabla 3), y no se observaron más de una banda (Fig. 5).

Gen	Locus	Primers	Tamaño del producto
Beta-actina ( $\beta$ -actina)	NM_031144	Izq. CTCTCTTCCAGCCTTCCTTC	99 bp
		Der. GGTCTTTACGGATGTCAACG	
Hemo oxigenasa-1 (HO-1)	NM_012580	Izq. TGCTCGCATGAACACTCTG	88 bp
		Der. TCCTCTGTCAGCAGTGCC	
Oxido nítrico sintasa 1 (NOS1)	NM_052799	Izq. ATCGGCGTCCGTGACTACTG	82
		Der. TCCTCATGTCCAAATCCATCTTCTTG	
Oxido nítrico sintasa 2 (NOS2)	NM_012611	Izq. TGGCCTCCCTCTGGAAAGA	93
		Der. GGTGGTCCATGATGGTCACAT	

**Tabla 2. Primers utilizados para estudiar el contenido de mRNA por RT-PCR.**



### 3.16 PCR cuantitativa a tiempo real

Diseño de los primers: Los primers fueron diseñados utilizando el software Primer3 del instituto Whitehead ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Para confirmar la especificidad de los primers, éstos fueron analizados frente a una base no redundante de secuencias génicas de rata empleando la aplicación BLAST del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los primers, el tamaño de los productos de amplificación y el código de los genes utilizados se muestra en la tabla 3.

La detección de los productos de amplificación se realizó utilizando la química de SYBRgreen (Qiagen, Hilden, Alemania) en un termociclador AbiPrism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de PCR fueron: 5 min a 95 °C para la activación de la polimerasa seguidos por 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C. La obtención de los datos se realizó a tiempo real en los ciclos de elongación (72 °C).

Cada muestra de cDNA fue analizada por triplicado en dos experimentos independientes. El termociclador fue programado para calcular automáticamente el ciclo (Ct) a partir del cual la cantidad de DNA en las muestras se volvía detectable. El

ciclo Ct se fijó como el momento a partir del cual la fluorescencia de la muestra superaba en 10 desvíos estándar la fluorescencia que el equipo registraba como ruido (15 primeros ciclos aproximadamente). Al final de la amplificación se realizó un estudio de melting de cada muestra para determinar la pureza de los productos de amplificación (Livak y Schmittgen, 2001). En los casos en los que un pocillo presentó una curva de melting con más de dos picos el pocillo fue descartado de los análisis.

Como gen *housekeeping* se utilizó el gen de  $\beta$ -actina. Para determinar si el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  afectaba la expresión de este gen se realizaron PCRs cuantitativas con diluciones seriadas de cDNA proveniente de muestras de animales controles y expuestos a  $\text{Cd}^{2+}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El tratamiento con el metal no afectó la expresión del gen de  $\beta$ -actina.

Para estudiar la eficiencia de transcripción con cada par de primers utilizado, se realizaron PCRs cuantitativas con diluciones seriadas de cDNA provenientes de muestras de animales controles (Fig. 6). Las pendientes de todas las curvas fueron iguales, lo que indica que la eficiencia de amplificación es la misma para todos los genes estudiados (Livak y Schmittgen, 2001). Como la eficiencia de transcripción no varió para los distintos pares de primers empleados (Fig. 6 y tabla 3), el contenido de cDNA en cada muestra fue normalizado por el contenido de  $\beta$ -actina y expresado en forma relativa al control utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak y Schmittgen, 2001). La base teórica de este método se deriva de las siguientes ecuaciones:

La cantidad de DNA ( $X_n$ ) luego del ciclo de amplificación  $n$  puede calcularse a partir de la ecuación:

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n \quad (1)$$

Donde  $X_o$  corresponde a la cantidad inicial de DNA y  $E_X$  es la eficiencia de transcripción ( $0 \leq E_X \leq 1$ ).

Si Ct denota al ciclo fraccional a partir del cual el contenido de DNA en la muestra alcanza el umbral de detección del aparato, entonces la cantidad  $X_t$  de DNA en este ciclo podría calcularse como:

$$X_t = X_o \times (1 + E_X)^{\text{Ct},X} = K_X \quad (2)$$

Donde  $K_X$  es una constante. Siguiendo el mismo razonamiento, para un gen H tendríamos:

$$H_t = H_o \times (1 + E_H)^{Ct,H} = K_H \quad (3)$$

Donde  $E_H$  es la eficiencia de transcripción del gen H. Si el contenido de DNA del gen H se utiliza como un valor de referencia para el gen X (control interno) puede escribirse:

$$X_t/H_t = (X_o \times (1 + E_X)^{Ct,X}) / (H_o \times (1 + E_H)^{Ct,H}) = K_X/K_H = K \quad (4)$$

Si las eficiencias de transcripción del gen X y del gen de referencia H son las mismas, entonces:

$$E_X = E_H = E \quad (5)$$

y puede escribirse:

$$K = X_o/H_o \times (1 + E)^{Ct,X - Ct,H} \quad \text{ó} \quad K = X_N \times (1 + E)^{\Delta Ct} \quad (6)$$

Donde  $X_N$  es el valor normalizado del gen X y  $\Delta Ct$  es la diferencia entre los ciclos umbral de ambos genes.

La ecuación puede reordenarse de manera de obtener el valor  $X_N$ :

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta Ct} \quad (7)$$

Si uno deseara referir el contenido de DNA del gen X en el tejido  $q$  al contenido del mismo gen en un tejido "calibrador"  $cb$ , por ejemplo el mismo tejido en un animal control, podría escribirse:

$$\begin{aligned} X_{Nq}/X_{Ncb} &= (K \times (1 + E)^{-\Delta Ct,q}) / (K \times (1 + E)^{-\Delta Ct,cb}) = (1 + E)^{-\Delta Ct,q - \Delta Ct,cb} \\ &= (1 + E)^{-\Delta \Delta Ct} \end{aligned} \quad (8)$$

Luego, en condiciones donde la eficiencia de transcripción es cercana a 1, la cantidad relativa del gen X en el tejido  $q$  con respecto a la cantidad relativa del mismo gen en el tejido control  $cb$  puede calcularse como:

$$X_{Nq}/X_{Ncb} = 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad (9)$$

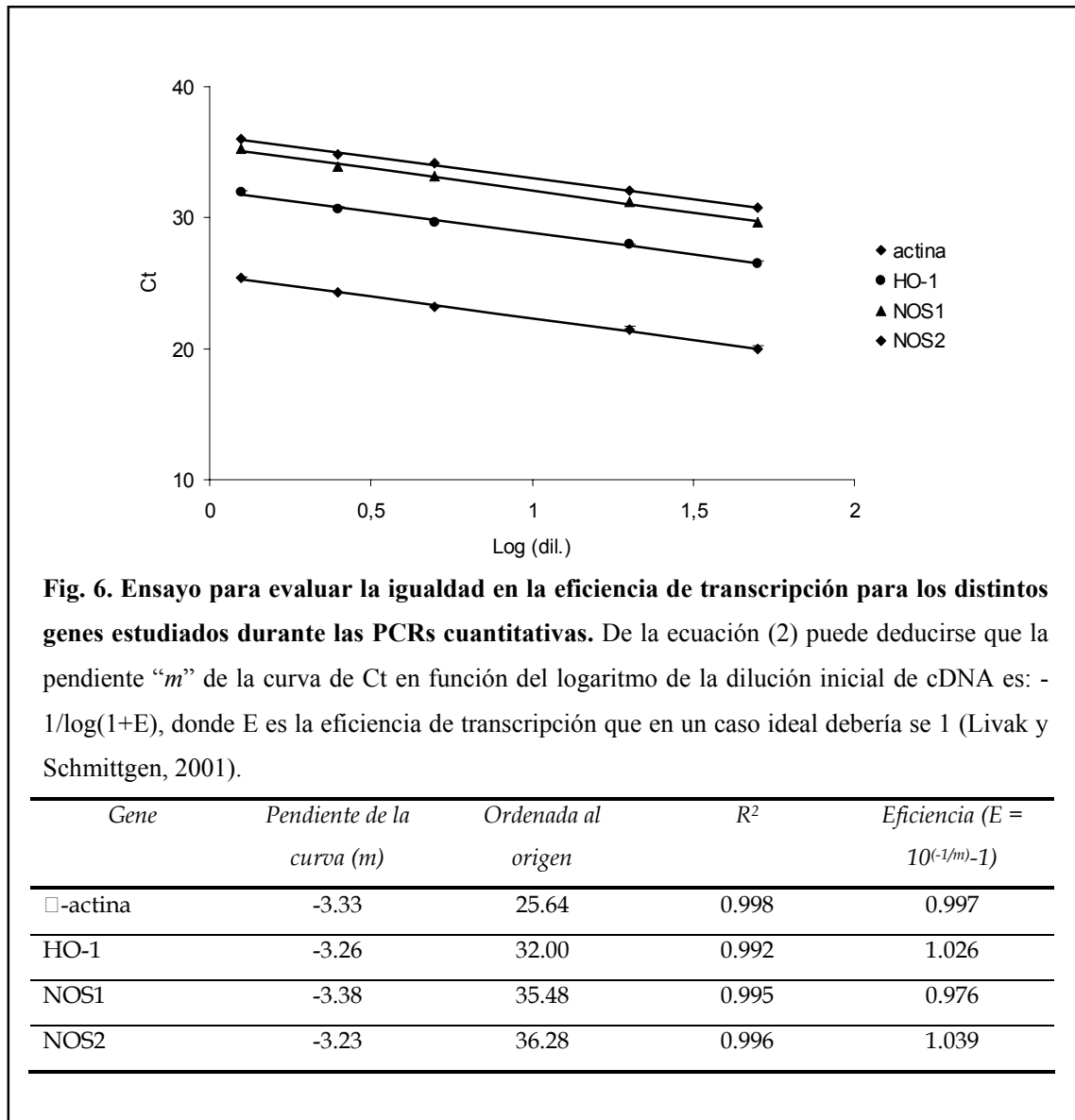
Donde  $-\Delta \Delta Ct = -\Delta Ct,q - \Delta Ct,cb$

De las ecuaciones presentadas más arriba se deriva que el contenido relativo del gen X en el control es 1 ya que:

$$\Delta Ct,cb - \Delta Ct,cb = 0 \quad \text{y} \quad 2^0 = 1$$

El contenido relativo del gen X en una muestra se expresa entonces como tantas veces el control (que siempre es considerado como 1).





### 3.17 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media o media geométrica ± error estándar de la media (SEM) y evaluados por la prueba “t” de Student para muestras no apareadas o mediante 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 Scheffé (Sokal y Rahlf, 1995).

Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando  $p$  fue menor a 0.05. Los datos fueron confirmados mediante la realización de por lo menos tres experimentos independientes.

Las distintas pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el software Graphpad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) o Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 4 Resultados

### 4.1 Estudios en cultivos primarios de células adenohipofisarias

#### 4.1.1 Efectos directos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre las células adenohipofisarias

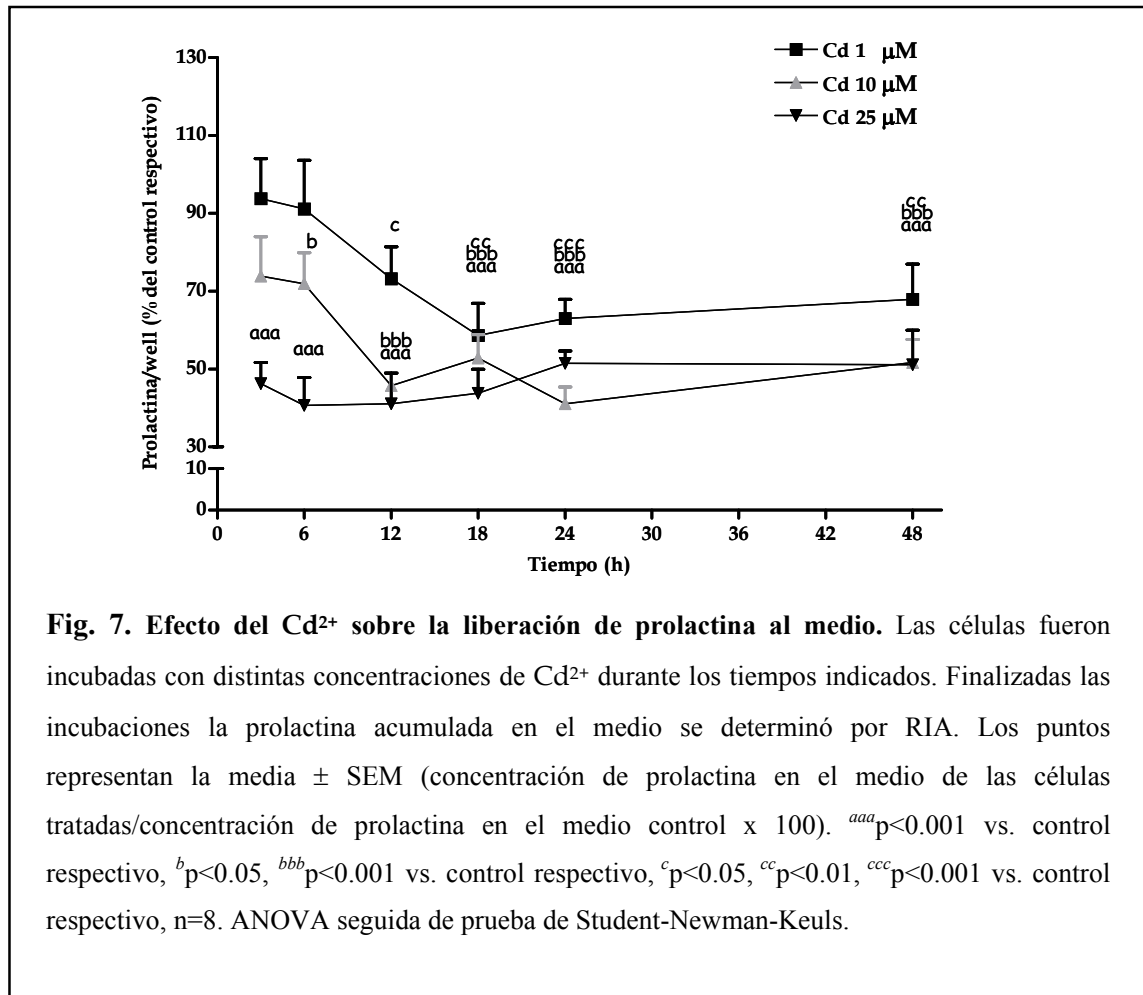
##### 4.1.1.1 El $\text{Cd}^{2+}$ afecta de manera directa la liberación de prolactina la viabilidad celular adenohipofisaria

La información bibliográfica acerca de los efectos directos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la liberación de hormonas hipofisarias es escasa y contradictoria. Un ejemplo de esto son los trabajos de Winstell y Callahan y de Cooper: mientras que los primeros informan que el  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe la liberación de prolactina estimulada por TRH en células en cultivo (Winstel y Callahan, 1992), el segundo afirma que la estimula desde fragmentos de adenohipófisis perfundidos (Cooper y col., 1987). Ambos trabajos han evaluado solo períodos cortos de exposición al metal (inferiores a 1 h de tratamiento).

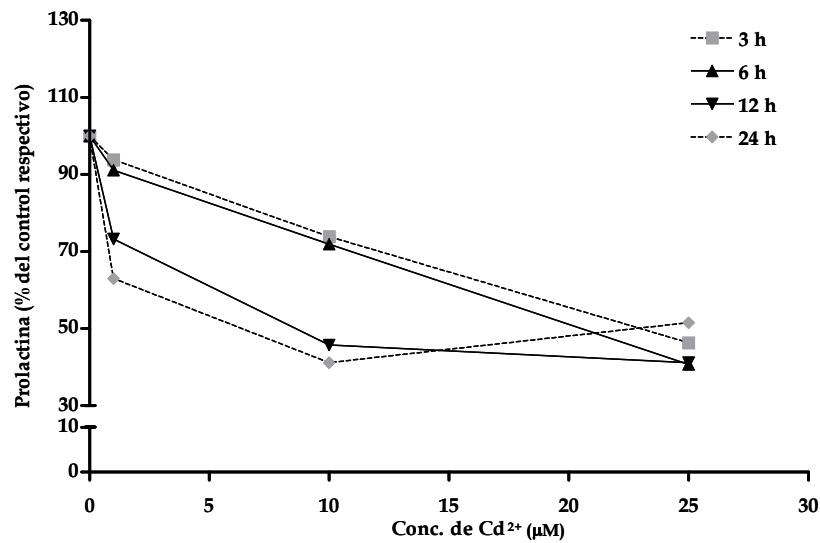
Para examinar los posibles efectos de exposiciones más prolongadas al  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la liberación hormonal y la viabilidad celular adenohipofisaria, utilizamos cultivos primarios de células de la glándula. Las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  durante distintos tiempos luego de los cuales se midió la liberación de prolactina al medio y se estudió la actividad celular como un índice de la viabilidad celular.

El  $\text{Cd}^{2+}$  inhibió la liberación basal de prolactina. El tiempo inicial a partir del cual se observó este efecto estuvo en relación inversa con la concentración del metal (Fig. 7). El  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  inhibió la liberación de prolactina a partir del primer tiempo estudiado (3 h), mientras que concentraciones de 10 y 1  $\mu\text{M}$  lo hicieron a partir de las

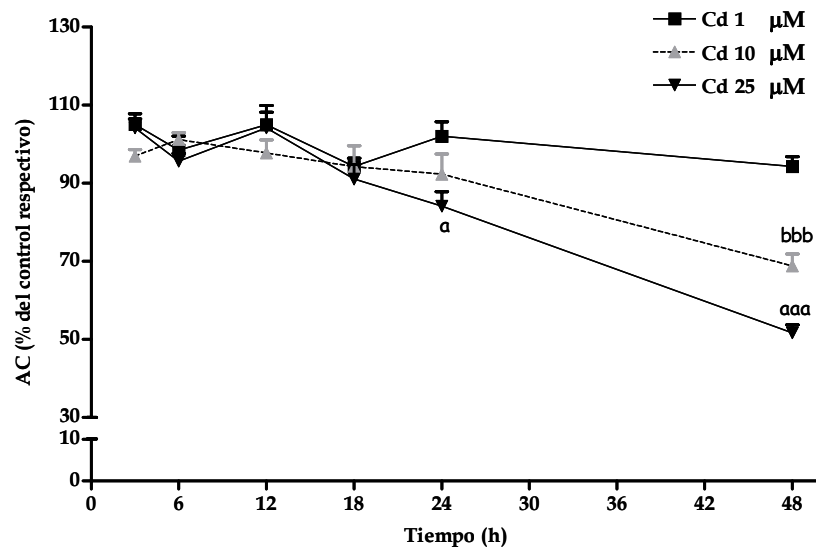
6 y 12 horas respectivamente (Fig. 7). En la figura 8 puede apreciarse que el efecto inhibitorio del Cd<sup>2+</sup> fue directamente proporcional a la concentración durante las primeras horas de tratamiento (3 y 6 h) mientras que, en tiempos más prolongados, el efecto inhibitorio fue aproximadamente el mismo para las tres concentraciones, alcanzándose un máximo de inhibición cercano al 50% a las 24 h (Fig. 7 y Fig. 8).



La actividad celular fue reducida levemente por Cd<sup>2+</sup> 25 μM luego de 24 h de incubación, mientras que a las 48 h, tanto el Cd<sup>2+</sup> 10 como el 25 μM la redujeron marcadamente (Fig. 9). El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> 1 μM no tuvo efecto sobre este parámetro en los tiempos estudiados (Fig. 9).



**Fig. 8. El efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la liberación de prolactina es dosis-dependiente solo durante los primeros tiempos de incubación.** Los datos presentados en la Fig. 8 fueron reordenados en función del tiempo de incubación. Coeficiente de correlación 3 h: -0.995 ( $r^2 = 0.990$ ,  $p < 0.01$ ), 6 h: -0.994 ( $r^2 = 0.987$ ,  $p < 0.01$ ), 12 h: -0.825 ( $r^2 = 0.681$ ), 24 h: -0.605 ( $r^2 = 0.366$ ),  $n = 8$ . prueba  $r$  de Pearson.

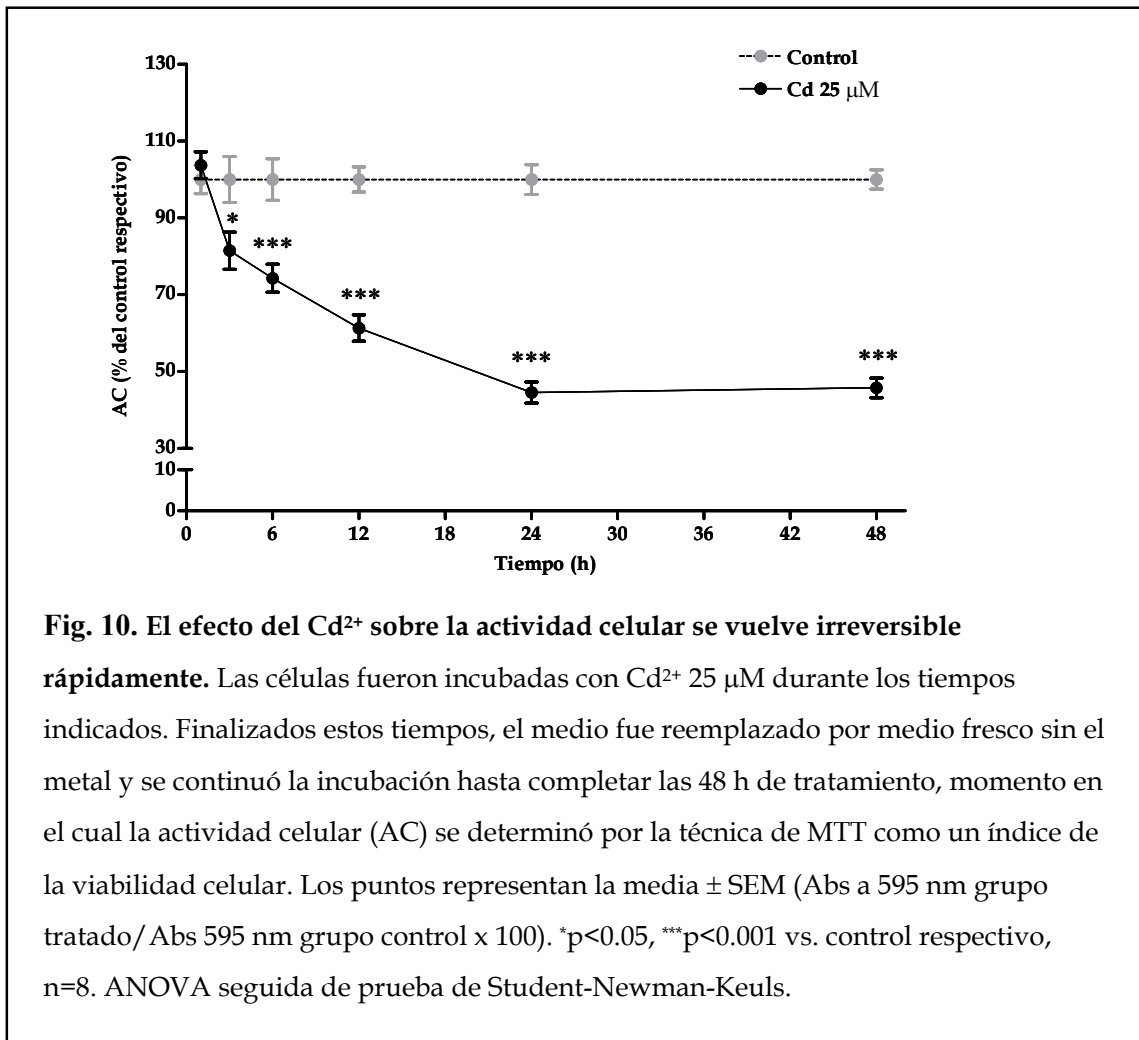


**Fig. 9. Efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la actividad celular.** Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de Cd<sup>2+</sup> durante los tiempos indicados. Finalizadas las incubaciones la actividad celular (AC) se determinó por la técnica de MTT como un índice de la viabilidad celular. Los puntos representan la media  $\pm$  SEM (Abs a 595 nm grupo tratado/Abs 595 nm grupo control  $\times 100$ ). <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>aaa</sup> $p < 0.001$  vs. control respectivo, <sup>bbb</sup> $p < 0.001$  vs. control respectivo,  $n = 8$ . ANOVA seguida de prueba de Student-Newman-Keuls.

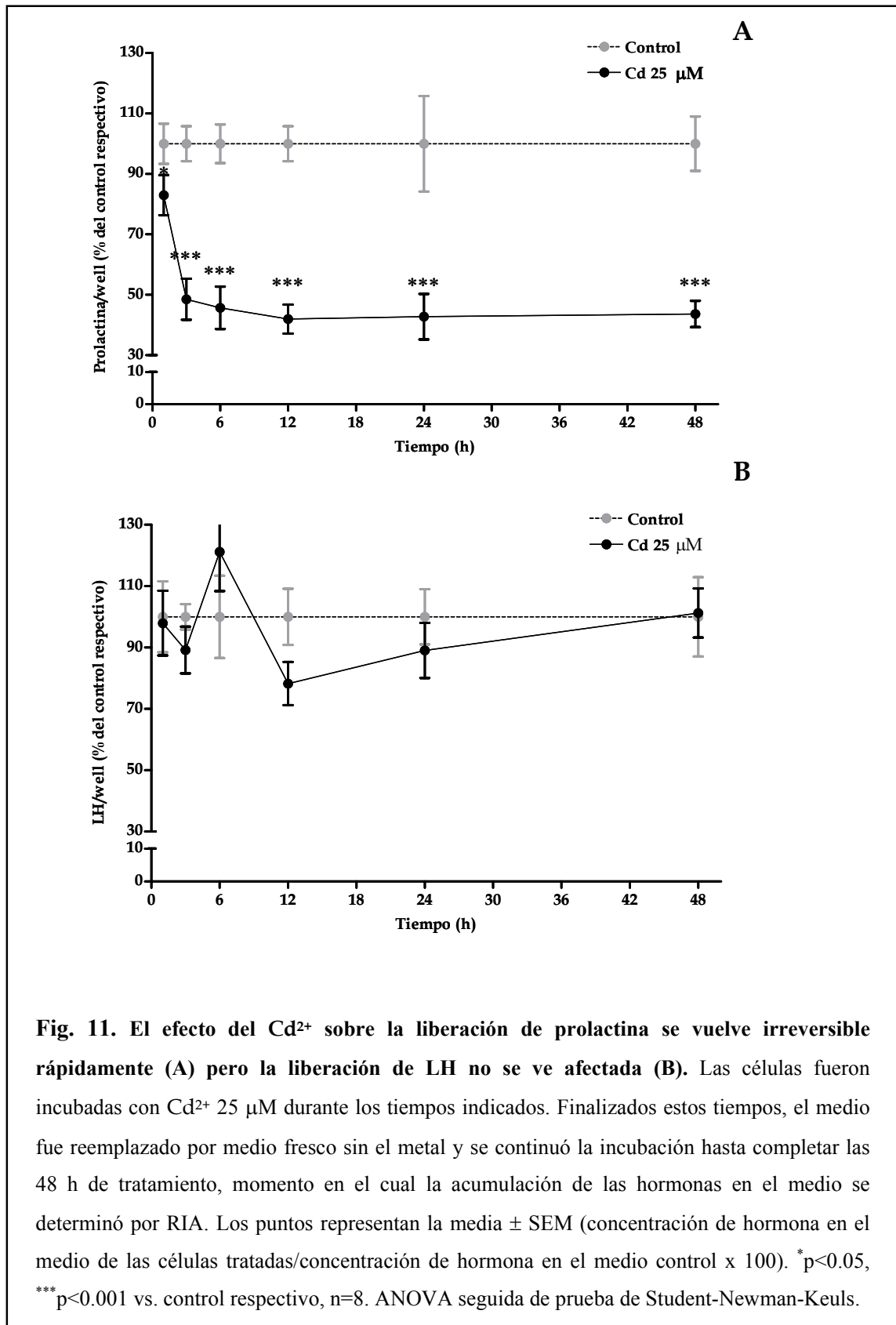
El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la viabilidad celular se manifestó más tardíamente que su efecto sobre la liberación de prolactina. Con el objetivo de evaluar si existe una relación entre los cambios en la liberación de prolactina y la viabilidad celular causados por el  $\text{Cd}^{2+}$ , se determinó el momento preciso a partir del cual el metal afectaba de manera irreversible este último parámetro. Para ello, los cultivos fueron expuestos a  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante diferentes períodos luego de los cuales el medio con  $\text{Cd}^{2+}$  fue reemplazado por medio fresco sin el metal, y se prosiguió con el cultivo hasta completar 48 h de tratamiento. Cumplido este tiempo se midieron la actividad celular y la liberación de prolactina al medio.

Los resultados presentados en la figura 10 muestran que 3 h de exposición al metal fueron suficientes para afectar de manera irreversible la viabilidad de las células medida luego de 48 hs de incubación total. El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  se hizo aun más marcado luego de 6 h de exposición. Dado que luego de 1 h de incubación no se produjeron cambios en la viabilidad celular, este resultado indica que entre las 3 y 6 h de tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  se activa algún mecanismo que conduce irremediamente a la muerte de las células varias horas después. Con respecto a la liberación de prolactina, una hora de tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  produjo una leve reducción en la acumulación de la hormona en el medio determinada a las 48 h (Fig. 11 A). De este modo se confirma que la liberación de prolactina es afectada por el  $\text{Cd}^{2+}$  antes que la viabilidad celular. La disminución de la acumulación de prolactina en el medio podría ser un marcador temprano del daño celular causado por el metal en los lactotrofos. Alternativamente, el metal podría afectar directamente la liberación de prolactina por un camino diferente del que determina la muerte celular.

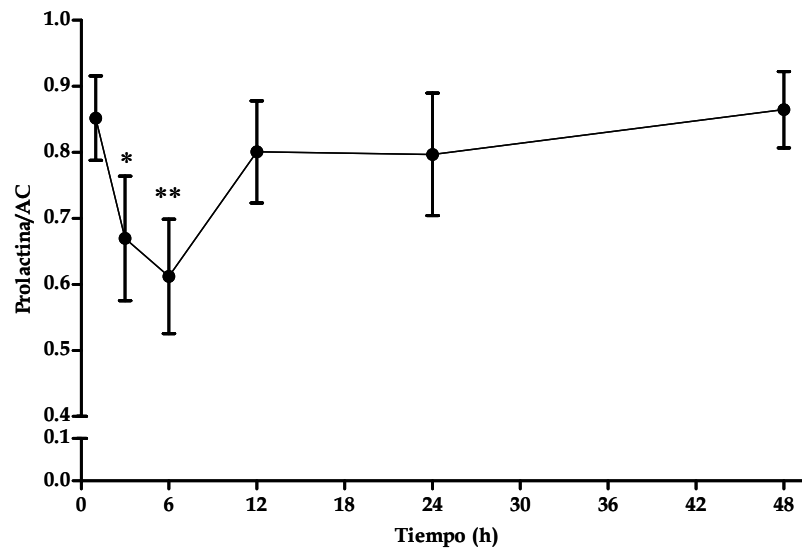
A diferencia de lo ocurrido con la prolactina, el  $\text{Cd}^{2+}$  no alteró la liberación basal de LH en los tiempos estudiados, aunque se observó una tendencia a la reducción de su contenido en el medio luego de 12 h de tratamiento (Fig. 11 B).



Al normalizar la acumulación de prolactina en el medio por la viabilidad de las células en el cultivo se observa que durante las primeras horas de tratamiento (1-6 h) el Cd<sup>2+</sup> posee un fuerte efecto inhibitorio sobre la liberación de la hormona (Fig. 12). Sin embargo, en tiempos posteriores la liberación de prolactina por célula tiende a equipararse con los valores observados en el control (Fig. 12) sugiriendo un menor grado de inhibición. Por lo tanto, la disminución en los niveles absolutos de prolactina observada en la figura 10, luego de un período prolongado de exposición al metal, se debe seguramente a la muerte de las células.







**Fig. 12. La relación [prolactina]/AC no se ve afectada por el  $\text{Cd}^{2+}$  luego de periodos prolongados de tratamiento.** Los registros de acumulación de prolactina en el medio presentados en la Fig. 11 B fueron divididos por los correspondientes registros de actividad celular (AC) expuestos en la Fig. 10. Los puntos representan la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control respectivo,  $n=8$ . Prueba "t" de Student para cada tiempo.

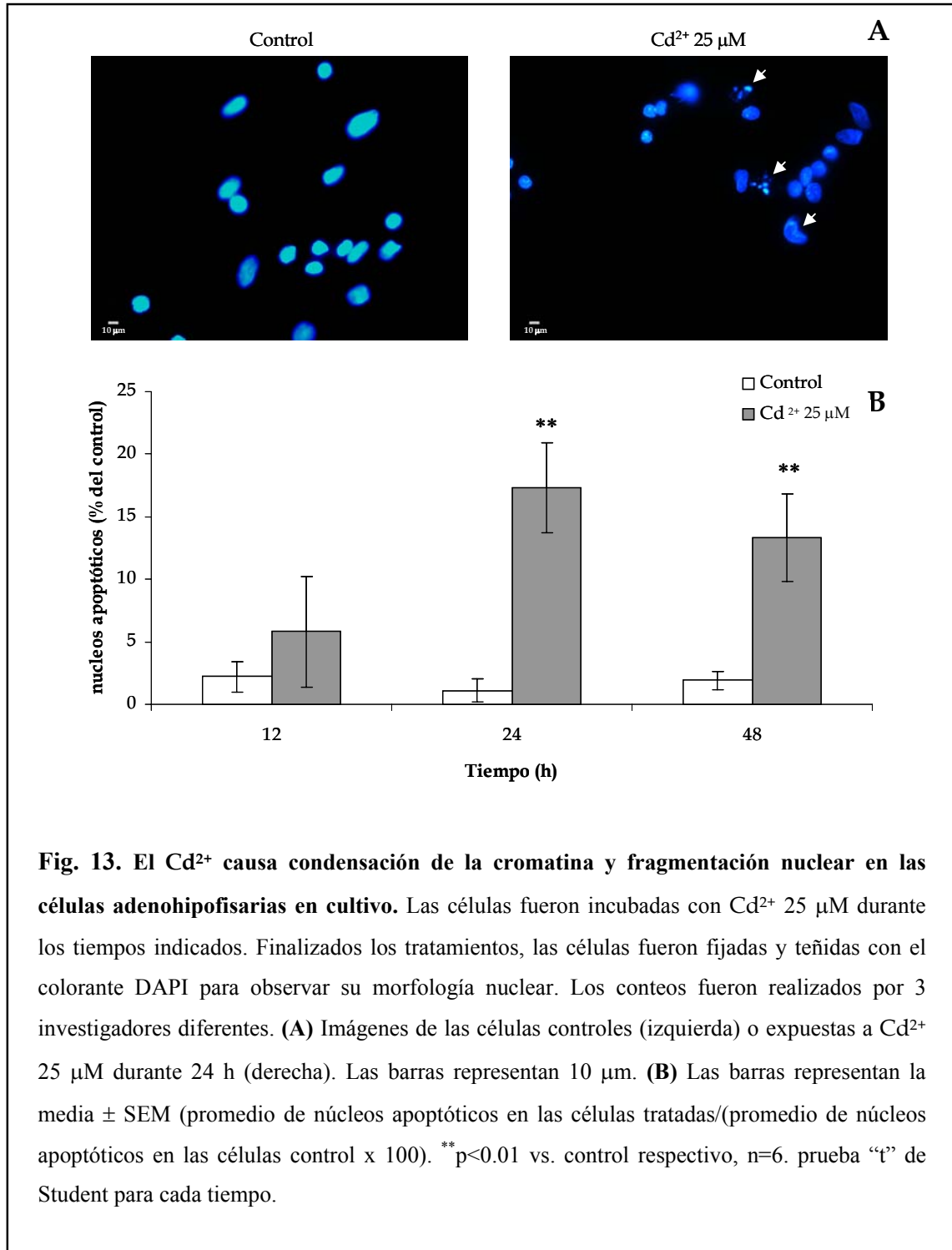
#### 4.1.1.2 El Cd<sup>2+</sup> induce apoptosis en las células adenohipofisarias

Como se mencionara en la introducción, el Cd<sup>2+</sup> puede inducir tanto necrosis como apoptosis en diferentes tejidos y tipos celulares dependiendo del estado de las células y de la concentración utilizada (Galan y col., 2000; Lag y col., 2002; Oh y col., 2004; Yoshida, 2001). En concentraciones altas (100 µM o más) se ha observado que el Cd<sup>2+</sup> induce necrosis (Yoshida, 2001). En condiciones naturales el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre los organismos es, en general, leve y crónico. Por ello, en este trabajo utilizamos las menores concentraciones del metal que producen alteraciones en nuestro sistema durante los tiempos ensayados. Para determinar si estas concentraciones representan una agresión fuerte para las células e inducen necrosis o, por el contrario, causan apoptosis, utilizamos criterios tanto morfológicos como bioquímicos.

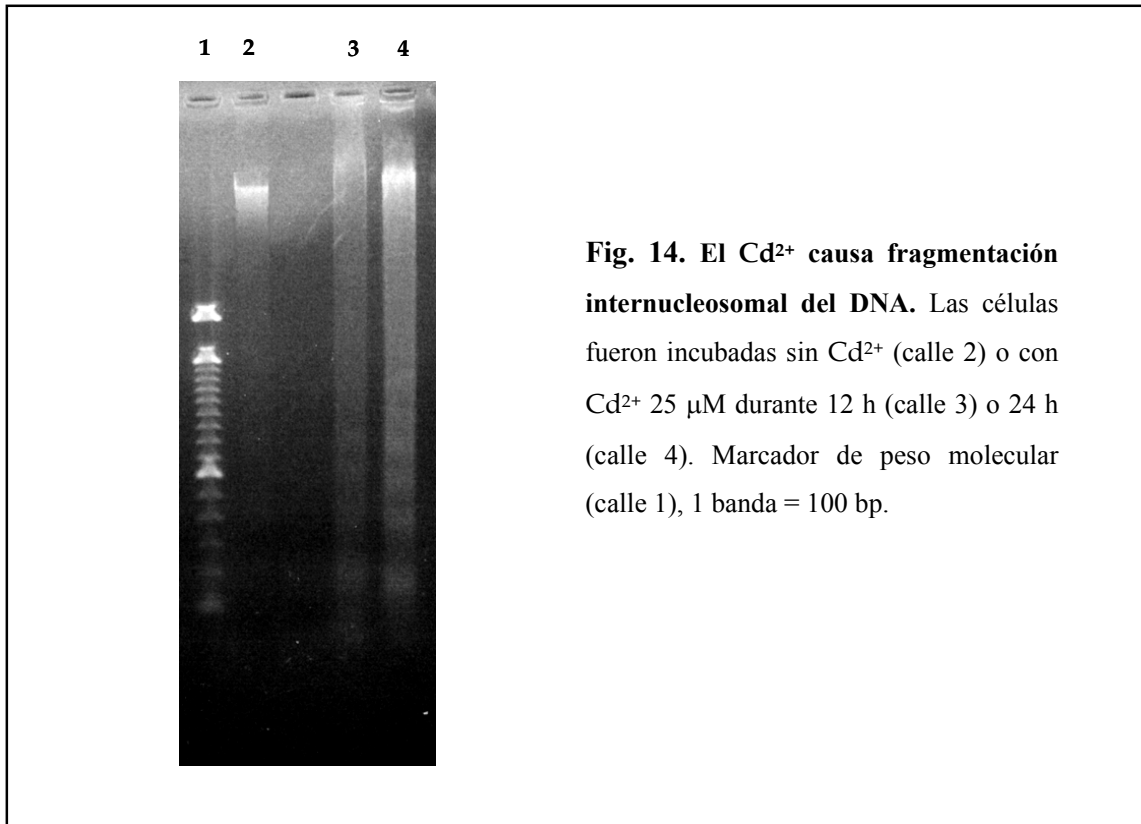
La presencia de núcleos fragmentados y con cromatina condensada es un marcador clásico de apoptosis, descrito desde los primeros estudios sobre el tema (Robertson y col., 2000). La exposición de las células adenohipofisarias al Cd<sup>2+</sup> 25 µM produjo una tendencia al aumento en el número de núcleos con características apoptóticas a partir de las 12 h (Fig. 13 A), efecto que se hizo significativo luego de 24 y 48 h de tratamiento (Fig. 13 A y B).

El estudio morfológico fue confirmado mediante el ensayo de fragmentación del DNA (laddering). Como se mencionara previamente, la apoptosis es un proceso controlado y programado genéticamente que depende de la actividad de muchas enzimas, entre ellas endonucleasas específicas que degradan el DNA cortándolo en zonas internucleosomales (Saraste y Pulkki, 2000). Este proceso de degradación del DNA lleva a la formación de fragmentos múltiples de 200 pb (Saraste y Pulkki, 2000). Aunque durante la necrosis también ocurre fragmentación del DNA, al ser esta causada por actividades enzimáticas inespecíficas y daño mecánico, no se generan fragmentos de un tamaño predeterminado (Saraste y Pulkki, 2000). El DNA de las células que sufrieron apoptosis aparecerá en una electroforesis en gel de agarosa como un patrón de bandas discretas (múltiplos de 200 pb), mientras que el DNA de

las células necróticas aparecerá como un “chorreado” en el que no pueden distinguirse bandas.



El análisis del DNA de las células incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante 24 o 48 h mostró la presencia de fragmentos discretos de DNA (Fig. 14). Este resultado confirma que la muerte de las células adenohipofisarias inducida por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  es predominantemente apoptótica.



## 4.1.2 Mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por $\text{Cd}^{2+}$

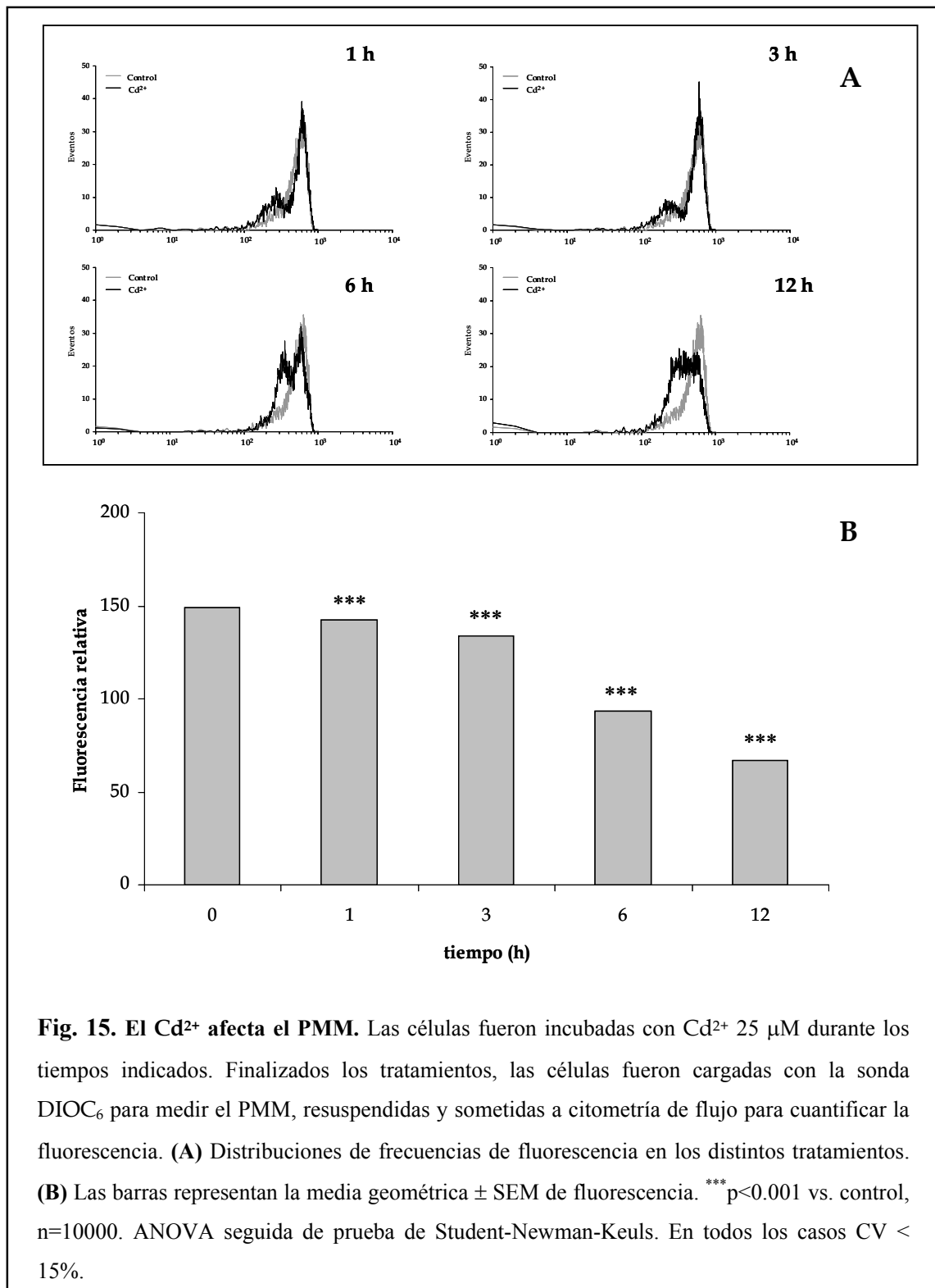
### 4.1.2.1 El efecto citotóxico del $\text{Cd}^{2+}$ depende del daño a la membrana mitocondrial

Como se mencionó en la introducción, las mitocondrias son importantes sensores del estrés intracelular. Estas organelas están frecuentemente involucradas en las primeras etapas de la vía apoptótica intrínseca (Harada y Grant, 2003; Susin y col., 1999). La vía apoptótica mitocondrial suele dispararse luego de un daño a las membranas de dichas organelas (Harada y Grant, 2003). El potencial de la membrana mitocondrial (PMM) se utiliza habitualmente como un índice de la integridad de estas membranas ya que una disminución en dicho potencial, puede ser consecuencia de la disrupción de las mismas (Castedo y col., 2002).

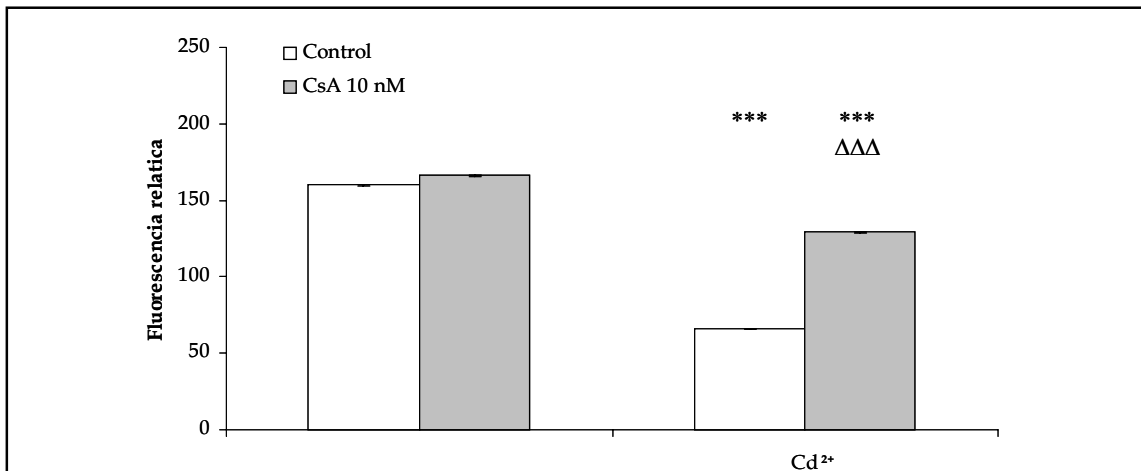
Con el objetivo de estudiar si el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  afecta a las mitocondrias, las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante diferentes tiempos luego de los cuales se midió el PMM por citometría de flujo utilizando la sonda DIOC<sub>6</sub>. Esta sonda se intercala en la membrana mitocondrial interna en función de su potencial electroquímico y al hallarse en un entorno lipídico se vuelve fluorescente. A mayor potencial, mayor cantidad de sonda se intercalará en la membrana y mayor será la fluorescencia emitida (Rottenberg y Wu, 1998). El  $\text{Cd}^{2+}$  redujo en forma significativa el PMM a partir de 3 h de incubación y su efecto fue mucho más marcado luego de 6 h de tratamiento (10 y 40% de disminución comparado con el control, respectivamente, Fig. 15 A y B).

Para evaluar si el daño a las mitocondrias juega un papel relevante en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , las células fueron incubadas con el metal en presencia de ciclosporina A (CsA). Esta molécula es conocida por mantener la integridad de la membrana mitocondrial frente al daño causado por distintos agentes (Nicolli y col., 1996). En la figura 16 se puede apreciar que la CsA efectivamente previene la

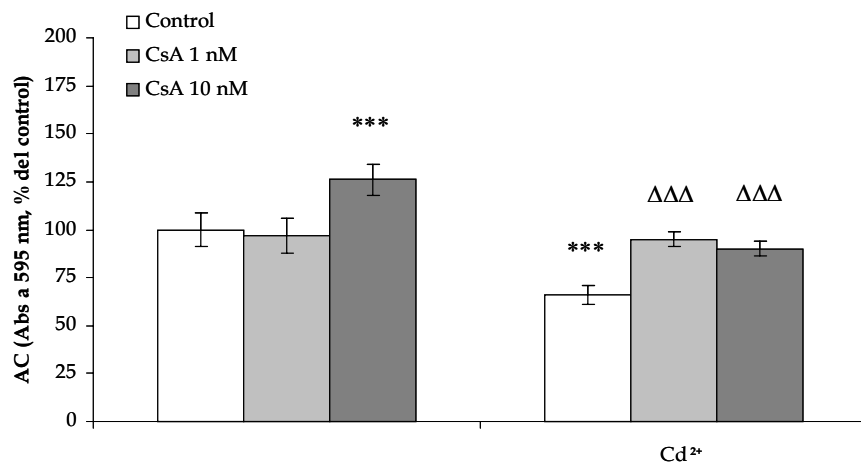
disrupción del PMM inducida por  $\text{Cd}^{2+}$ . La CsA también previno la disminución de la actividad celular medida por la técnica de MTT (Fig. 17).



**Fig. 15. El  $\text{Cd}^{2+}$  afecta el PMM.** Las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante los tiempos indicados. Finalizados los tratamientos, las células fueron cargadas con la sonda  $\text{DIOC}_6$  para medir el PMM, resuspendidas y sometidas a citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia. **(A)** Distribuciones de frecuencias de fluorescencia en los distintos tratamientos. **(B)** Las barras representan la media geométrica  $\pm$  SEM de fluorescencia. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control,  $n = 10000$ . ANOVA seguida de prueba de Student-Newman-Keuls. En todos los casos  $\text{CV} < 15\%$ .



**Fig. 16. La Ciclosporina A (CsA) previene el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre el PMM.** Las células fueron incubadas con Cd<sup>2+</sup> 25 μM y con o sin CsA 10 nM durante 6 h. Cumplido este tiempo, las células fueron cargadas con la sonda DIOC<sub>6</sub> para medir el PMM, resuspendidas y sometidas a citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia. \*\*\*p<0.001 vs. control, ΔΔΔp<0.001 vs. Cd<sup>2+</sup>, n=10000. ANOVA seguida de prueba de comparaciones múltiples de Scheffé. En todos los casos CV < 15%.



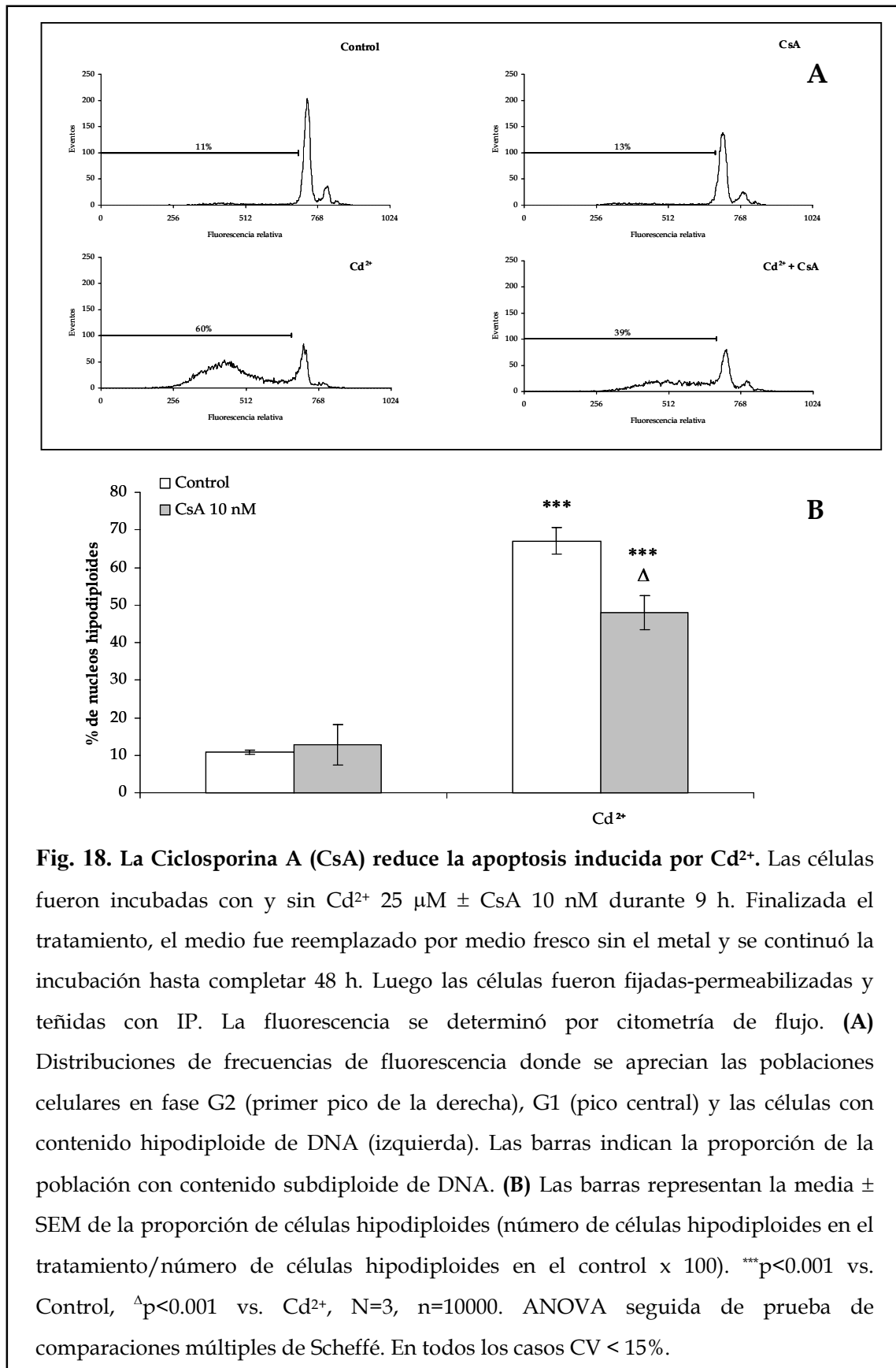
**Fig. 17. La Ciclosporina A (CsA) reduce el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la actividad celular.** Las células fueron incubadas con Cd<sup>2+</sup> 25 μM y con o sin CsA 1 o 10 nM durante 9 h. Finalizado el tratamiento, el medio fue reemplazado por medio fresco sin el metal y se continuó la incubación hasta completar 48 h, momento en el cual la actividad celular (AC) se determinó por la técnica de MTT. Las barras representan la media ± SEM (Abs a 595 nm grupo tratado/Abs 595 nm grupo control x 100). \*\*\*p<0.001 vs. control, ΔΔΔp<0.001 vs. Cd<sup>2+</sup>, n=8. ANOVA seguida de prueba de comparaciones múltiples de Scheffé.

Como el ensayo de actividad celular mide básicamente la actividad de las deshidrogenadas mitocondriales, se realizó también un ensayo de contenido de DNA nuclear (diploidía) como control. El estudio del contenido de DNA nuclear se basa en el mismo principio que el ensayo de ladder explicado más arriba. En las células apoptóticas el DNA se fragmenta en cadenas múltiples de 200 bp; cuando estas células se permeabilizan los fragmentos más pequeños de DNA se escapan del núcleo por lo que su contenido de DNA disminuye. La medición del contenido de DNA se realiza tiñéndolo con yoduro de propidio (PI) y sometiendo las células a citometría de flujo. Como la fluorescencia del PI aumenta cuando éste se intercala en el DNA existe una relación directa entre la fluorescencia emitida y el contenido de DNA en las células. Este ensayo permite una cuantificación de la proporción de células apoptóticas.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  causó un aumento en el número de células con bajo contenido de DNA (Fig. 18 A y B), mientras que el tratamiento con CsA redujo dicho efecto (Fig. 18 B).

Teniendo en cuenta que la CsA protege a las mitocondrias y también reduce la apoptosis generada por el  $\text{Cd}^{2+}$ , se puede concluir que las mitocondrias juegan un papel preponderante en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ .



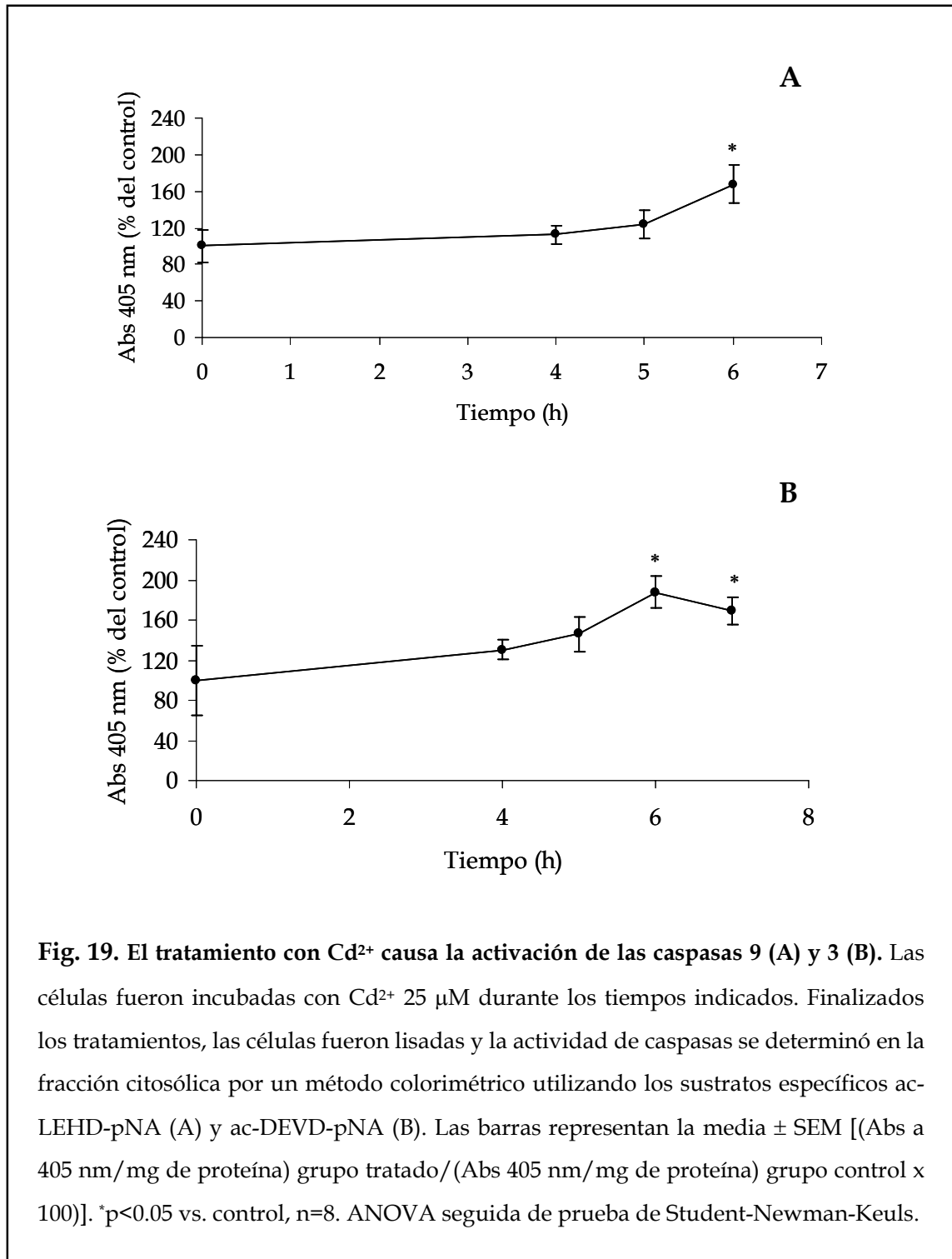


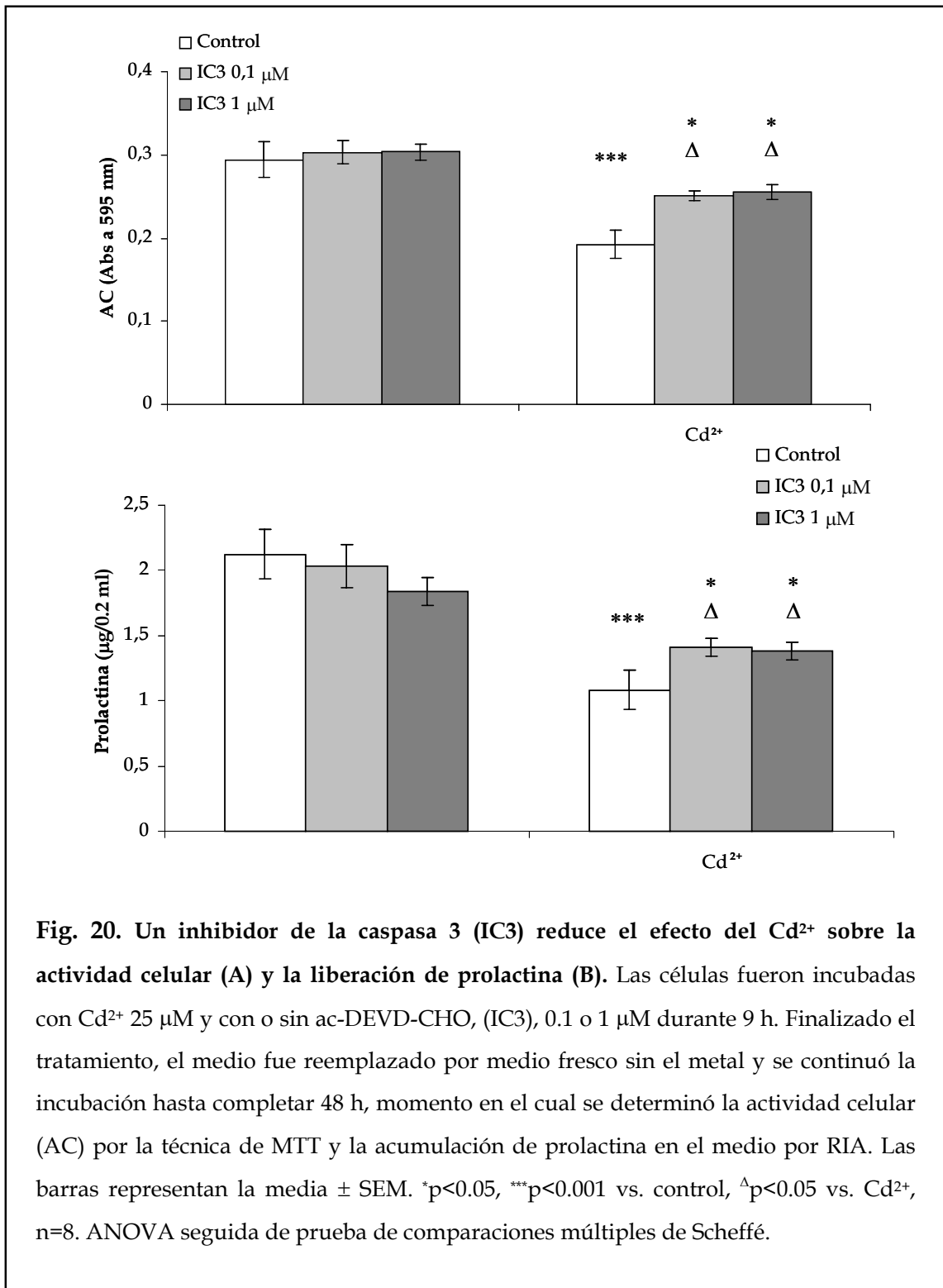
#### 4.1.2.2 El efecto del $\text{Cd}^{2+}$ depende de la activación de caspasas

Como se mencionara en la introducción, las caspasas son cisteína proteasas comúnmente involucradas en la ejecución de la apoptosis (Stennicke y Salvesen, 2000). El mecanismo clásico por el cual el daño a las membranas mitocondriales conduce a la apoptosis involucra la liberación de citocromo c que junto con ATP y la proteína apaf-1 forman un complejo llamado apoptosoma que permite la activación de la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3 (Harada y Grant, 2003).

Para establecer si el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de causar la activación de estas proteasas, las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante diferentes tiempos y luego se midió la actividad de caspasa 9 y de caspasa 3 en la fracción citoplasmática mediante ensayos colorimétricos.

El  $\text{Cd}^{2+}$  causó un aumento significativo de la actividad de ambas caspasas a partir de las 6 h de tratamiento (Fig. 19 A y B). Con el fin de establecer la relevancia de esta activación en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , las células fueron incubadas con el metal en presencia de ac-DEVD-CHO, un inhibidor específico de la caspasa 3. La inhibición de la enzima previno no sólo el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , sino también el efecto inhibitorio del metal sobre la liberación de prolactina (Fig. 20 A, y B). Estos resultados indican que la activación de las caspasas participa en el mecanismo citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  y que dicho efecto estaría relacionado con la disminución de la liberación de prolactina.



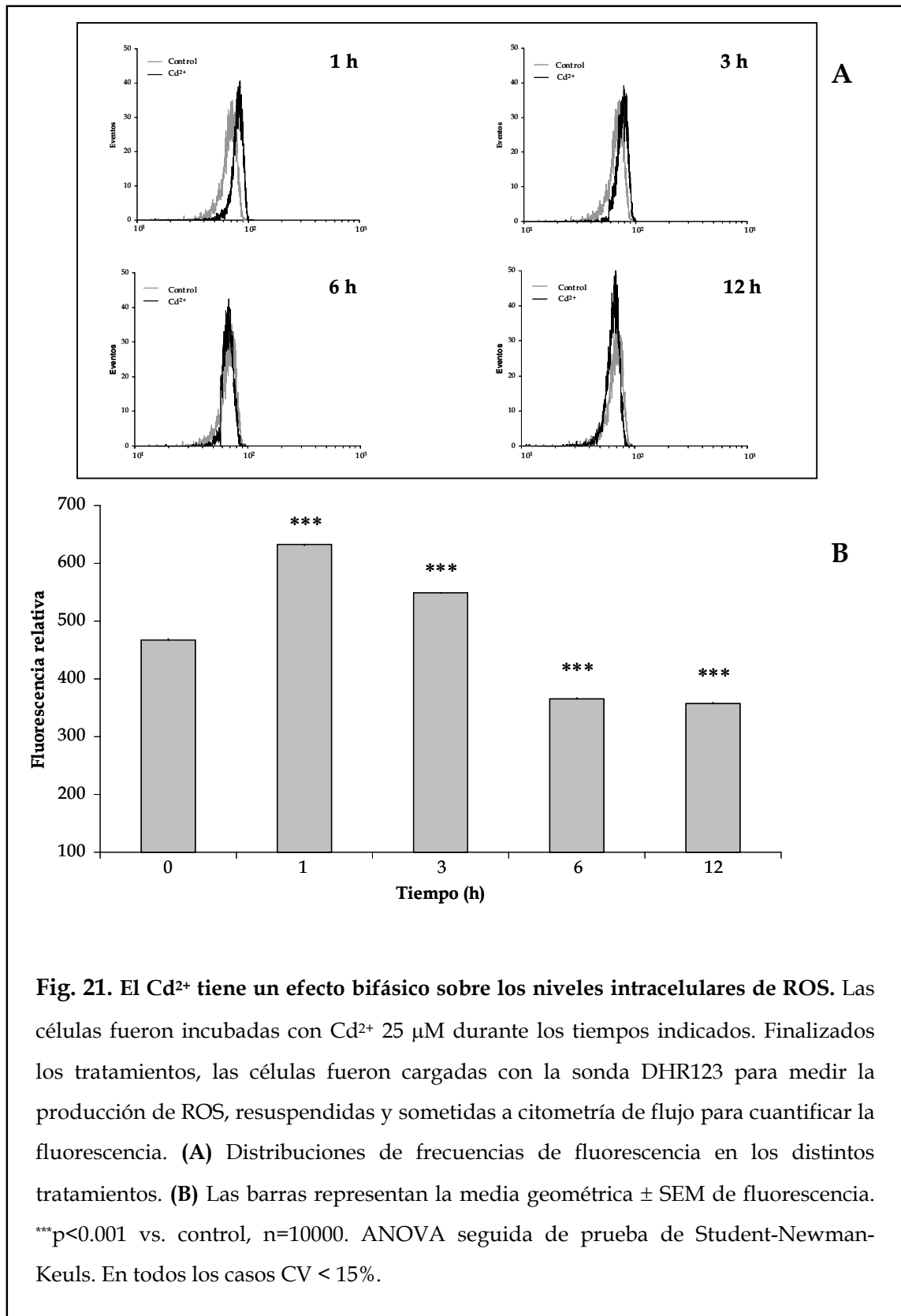


#### 4.1.2.3 El $\text{Cd}^{2+}$ causa estrés oxidativo en las células adenohipofisarias

Aunque el  $\text{Cd}^{2+}$  no es un metal redox activo y por lo tanto no genera radicales libres por su propia oxidación mediante reacciones del tipo de Fenton (Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005), se sabe que puede inducir estrés oxidativo en muchos tejidos por diferentes mecanismos (Galan y col., 2000; Shih y col., 2004; Waisberg y col., 2003). Las mitocondrias son sensores del estrés oxidativo intracelular y un aumento en los niveles de radicales libres puede afectar sus membranas disparando la apoptosis (Sastre y col., 2003).

En busca de un posible mecanismo por el cual el  $\text{Cd}^{2+}$  pudiera afectar la integridad de la membrana mitocondrial y desencadenar la apoptosis, estudiamos si este metal era capaz de generar estrés oxidativo en las células adenohipofisarias. Para ello las células fueron incubadas durante diferentes tiempos con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  luego de lo cual se las cargó con la sonda DHR123, que al ser oxidada por las especies reactivas del oxígeno (ROS) genera la molécula fluorescente rodamina 123, y se midió la fluorescencia de las células por citometría de flujo.

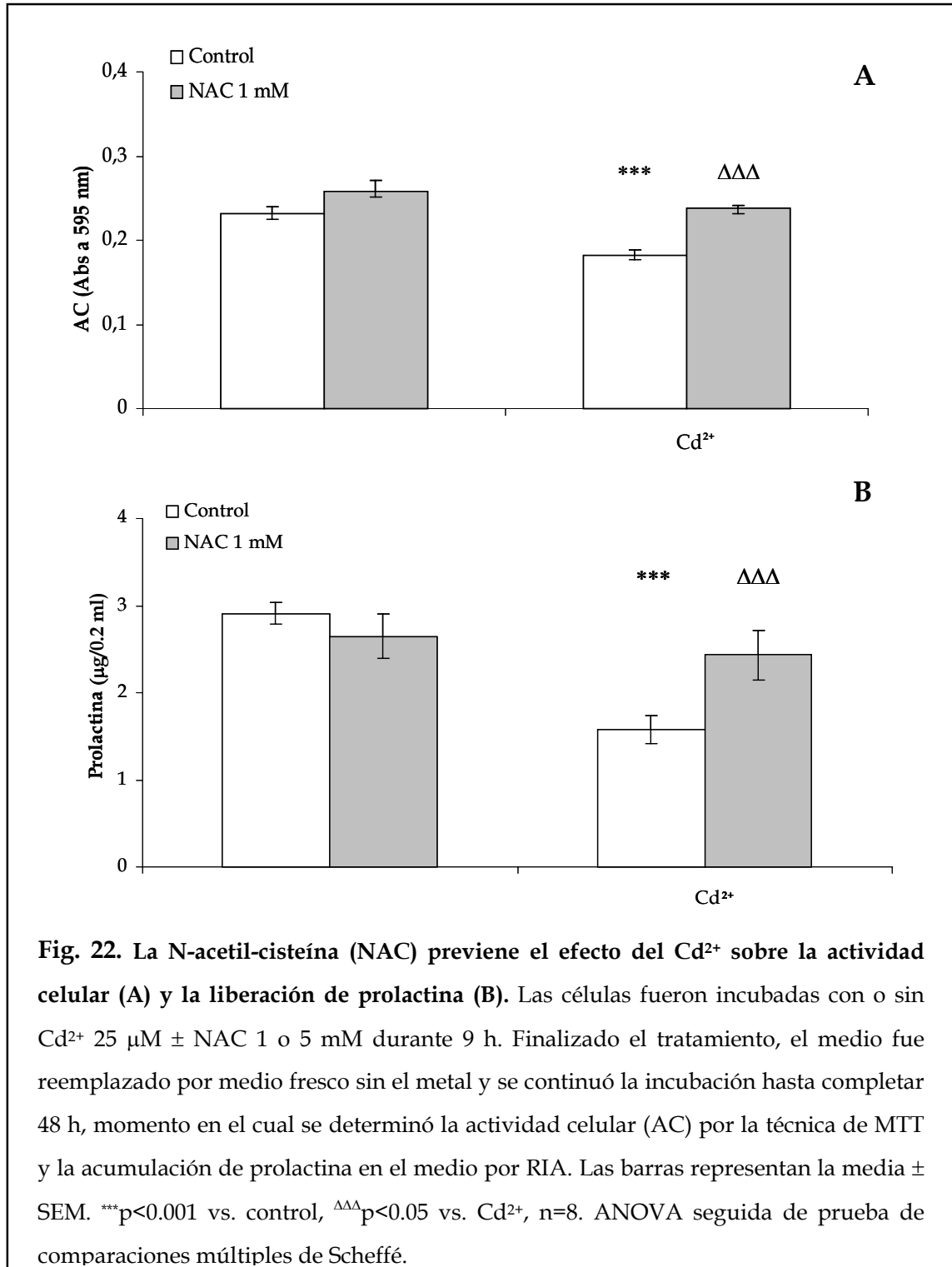
El  $\text{Cd}^{2+}$  tuvo un efecto bifásico sobre los niveles intracelulares de ROS, causando un aumento inicial (1-3 h de tratamiento) seguido de una disminución respecto al control luego de 6 h de exposición (Fig. 21 A y B).



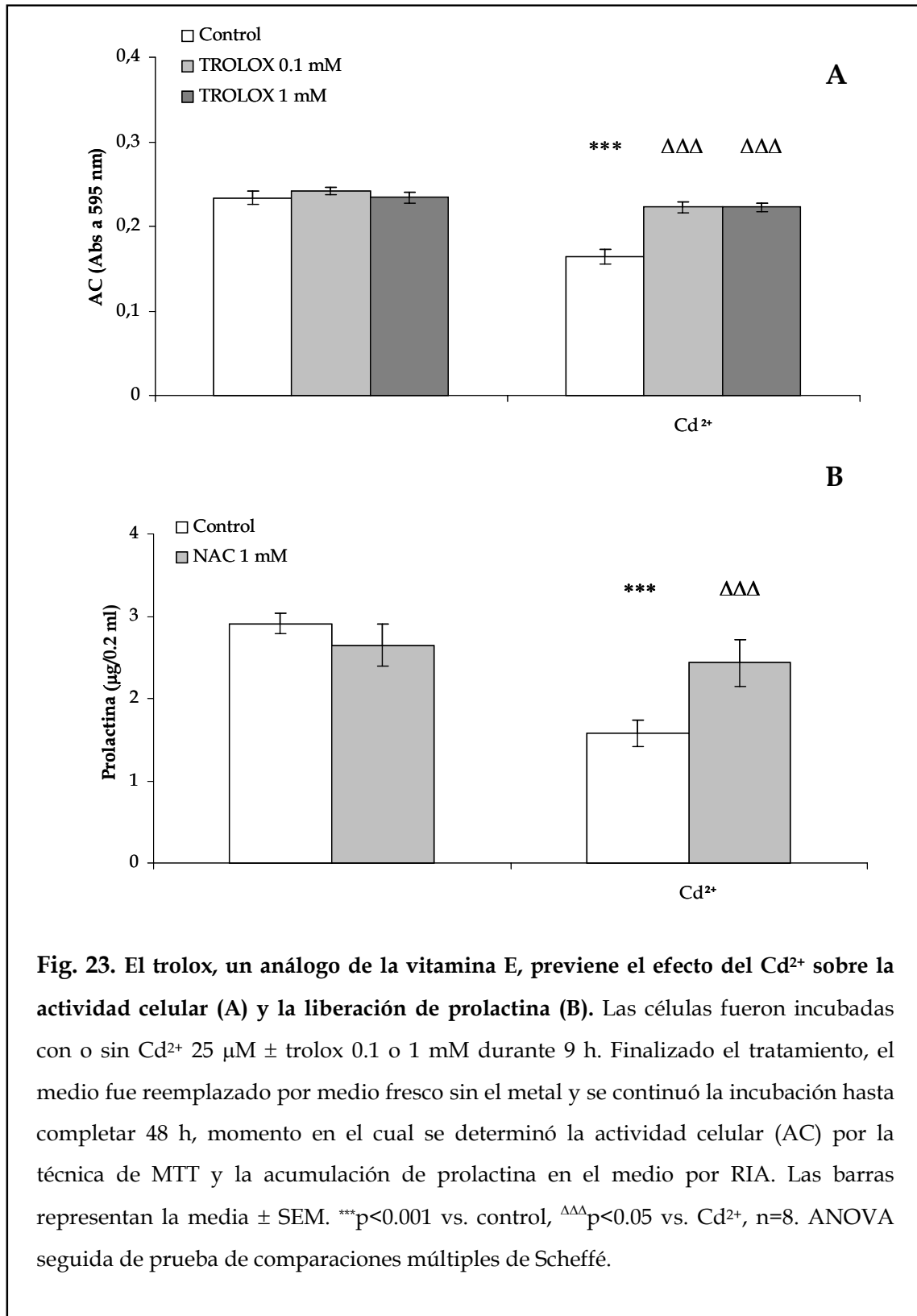
La sonda DHR123 debe intercalarse en la membrana mitocondrial luego de su oxidación para volverse fluorescente (Sobreira y col., 1996). Debido a que el  $\text{Cd}^{2+}$  reduce el PMM, éste podría afectar la incorporación de la sonda alterando las mediciones de ROS. Para comprobar si la reducción de la fluorescencia de las células tras tiempos largos de exposición al metal no era un artificio de la técnica debido a una disminución del PMM, los resultados del experimento anterior fueron contrastados utilizando la sonda DCF-DA. Esta sonda, después de su oxidación se convierte en la molécula fluorescente fluoresceína y no necesita intercalarse en la membrana mitocondrial para emitir fluorescencia (Crow, 1997). En este caso la fluorescencia de las células fue determinada por espectrofluorimetría, normalizando el resultado con el contenido de DNA teñido con IP. Como la sonda DCF-DA también puede reaccionar con NO, las células fueron preincubadas 30 min con L-NAME, un inhibidor de las NOS (Crow, 1997; Walrand y col., 2003). Los resultados obtenidos con DCF-DA reprodujeron los observados utilizando la sonda DHR123 (Fluorescencia relativa EM DCF-DA (535 nm)/EM IP (585 nm): Control:  $0.190 \pm 0.012$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  1 h:  $0.400 \pm 0.027^{***}$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  9 h:  $0.136 \pm 0.012^*$ ; media  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control; n = 3; test *t* de Student), por lo que se concluye que el efecto bifásico del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los niveles de ROS no es un artificio técnico.

Con el fin de determinar la relevancia de las ROS en los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre las células hipofisarias, éstas fueron incubadas con el metal en presencia de N-acetilcisteína (NAC) 1 mM, un precursor del glutatión con capacidad antioxidante *per se*. El NAC revirtió el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la viabilidad celular así como también sobre la liberación de prolactina (Fig. 22 A y B). Como las moléculas que contienen grupos tioles son capaces de secuestrar  $\text{Cd}^{2+}$ , para confirmar que el efecto del NAC se debía a su capacidad antioxidante y no simplemente al secuestro del metal, el experimento se repitió utilizando TROLOX como antioxidante. El TROLOX es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, no relacionado estructuralmente con el NAC. El TROLOX, a concentraciones de 0.1 y 1 mM, también revirtió los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los dos parámetros estudiados (Fig. 23 A y B). Estos resultados señalan la

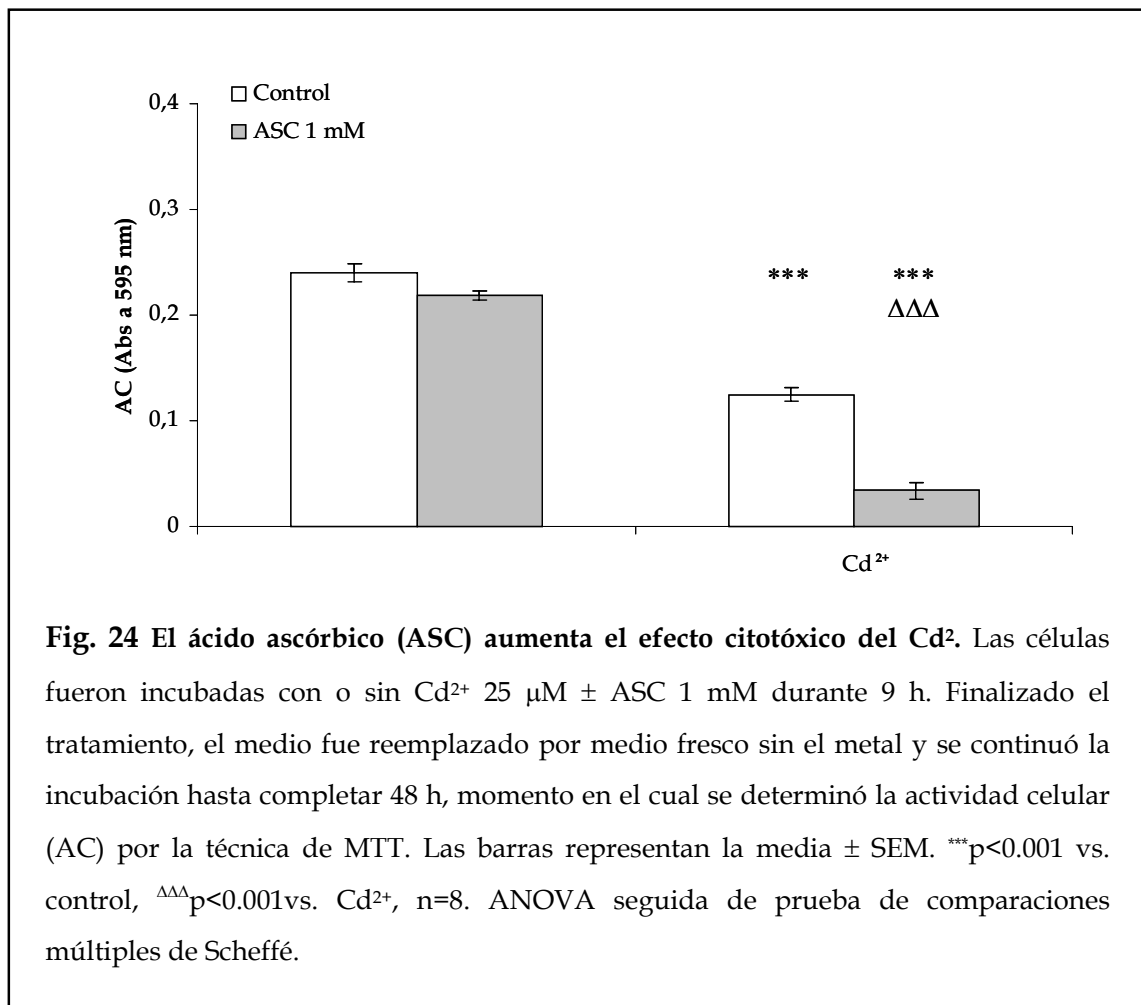
importancia de las ROS tanto en el efecto citotóxico del metal como en su efecto sobre la liberación de prolactina.







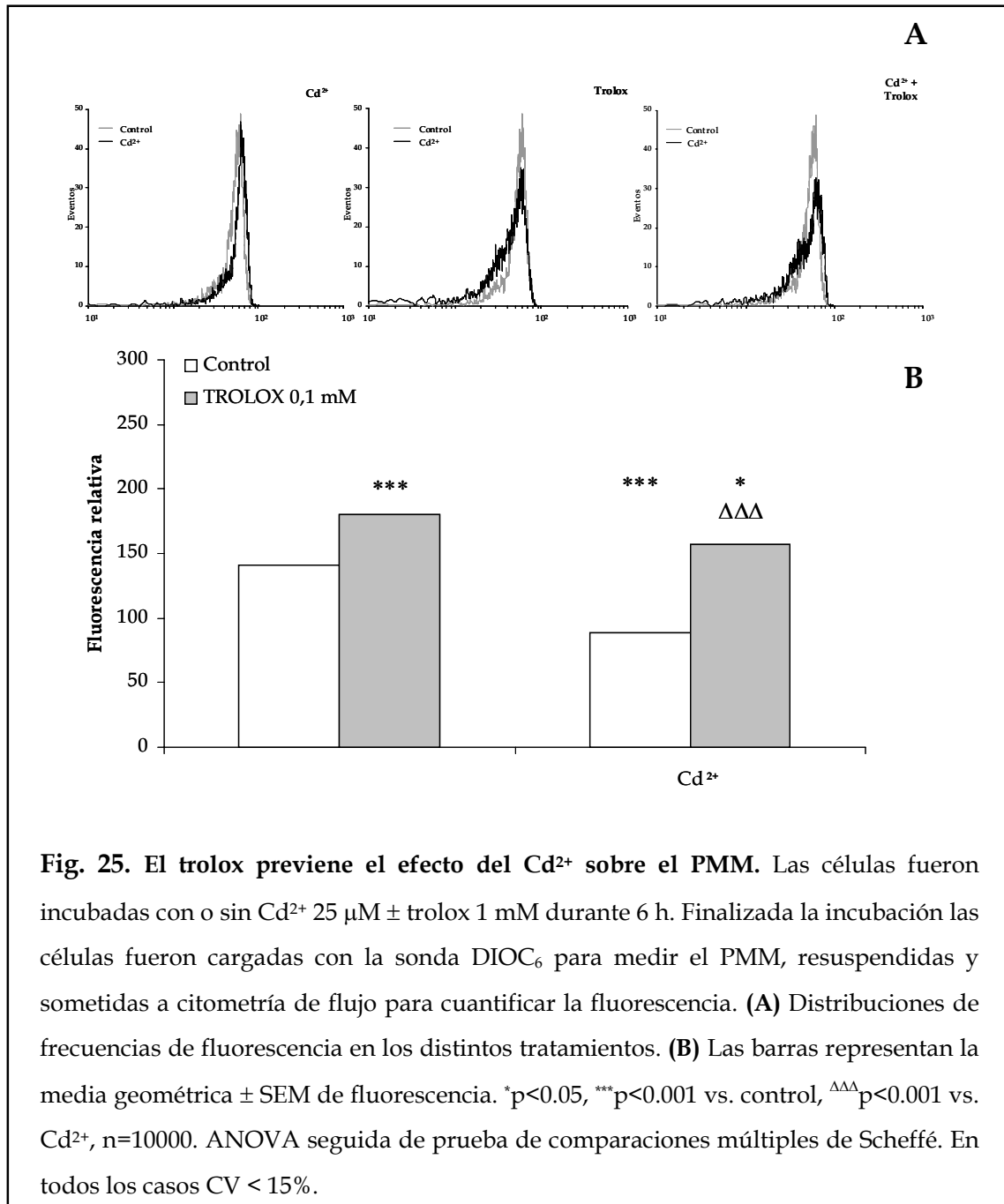
Inesperadamente el ácido ascórbico (vitamina C) 1 mM, un antioxidante ampliamente utilizado, no sólo no redujo el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  sino que lo aumentó (Fig. 24). Este resultado podría explicarse por la capacidad del ácido ascórbico en presencia de metales de transición, de descomponer a los productos de la peroxidación lipídica en compuestos muy tóxicos como el 4-hidroxi-2-nonenal (Stohs y Bagchi, 1995).



#### 4.1.2.4 El aumento de las especies reactivas del oxígeno generado por el $\text{Cd}^{2+}$ afecta la integridad de la membrana mitocondrial

Como se mencionara previamente el aumento en los niveles de radicales libres puede alterar la integridad de la membrana mitocondrial. La oxidación de los lípidos y proteínas de la membrana puede afectar su permeabilidad causando una caída del PMM y la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos (Anuradha y col., 2001; Le y col., 2005; Vercesi y col., 1997).

Con el fin de examinar si los cambios en el PMM observados en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  están relacionados con el aumento en los niveles de ROS inducido por el metal, las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  durante 6 h en presencia de TROLOX 0.1 mM. Luego éstas fueron cargadas con la sonda  $\text{DIOC}_6$  para medir el potencial de membrana mitocondrial, y se midió la fluorescencia por citometría de flujo. El TROLOX causó por sí mismo una hiperpolarización de la membrana mitocondrial pero previno completamente el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 25 A y B). Estos resultados confirman que las ROS estarían involucradas en el daño a la membrana mitocondrial producido por el  $\text{Cd}^{2+}$ .



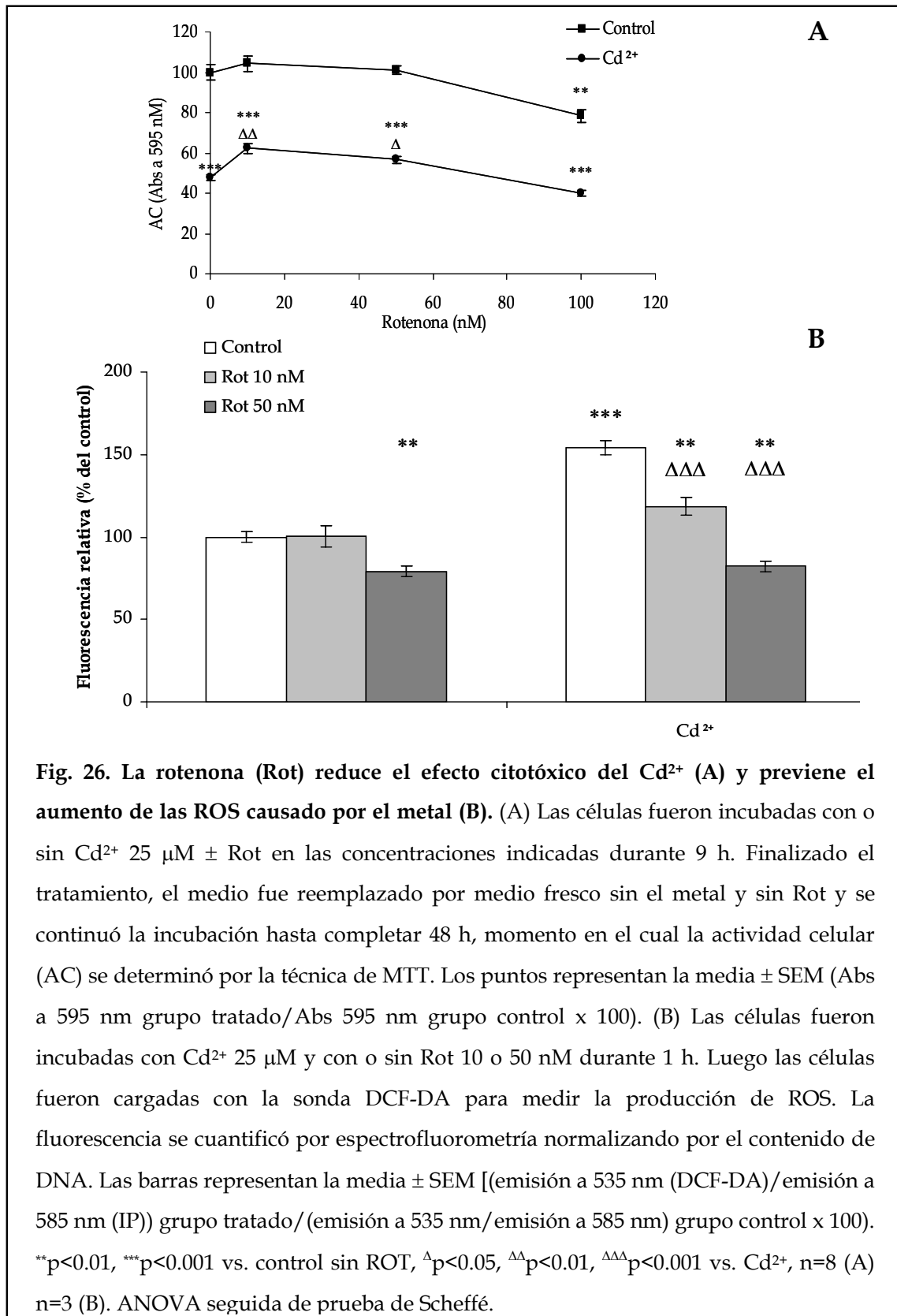
#### 4.1.2.5 El $\text{Cd}^{2+}$ causa un aumento de la producción de ROS en la cadena mitocondrial de transporte de electrones

En condiciones fisiológicas la mitocondria es la principal fuente de ROS dentro de la célula (Brunk y Terman, 2002). En condiciones normales, hasta un 5% del  $\text{O}_2$  consumido por las mitocondrias es reducido sólo parcialmente, generando al radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a partir del cual se forman el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y al radical hidroxilo ( $\text{HO}^-$ ), especies mucho más reactivas que el primero (Chance y col., 1979; Elliott y Volkert, 2004). La mayor parte del  $\text{O}_2^-$  producido en la mitocondria, se genera por el escape de electrones a nivel del complejo III de la cadena mitocondrial de transporte de electrones (CTE) (Armstrong y col., 2004; Wang y col., 2004). Debido a que el  $\text{Cd}^{2+}$  sin ser un metal redox activo aumenta la producción de ROS, es importante conocer cuál es la fuente de los mismos. Se ha demostrado recientemente, en mitocondrias aisladas, que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar al complejo III de la CTE aumentando la tasa de producción de ROS (Wang y col., 2004).

Con el fin de determinar si en nuestro sistema el aumento en los niveles de ROS podría deberse a un efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la CTE, las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  en presencia de rotenona. Esta droga es un inhibidor del complejo I de la CTE (NADH oxidasa) que impide la entrada de electrones a la cadena, reduciendo la capacidad de la misma para generar  $\text{O}_2^-$  (Gennari y col., 2000; Pearlstein y col., 2002).

Dado que la rotenona inhibe la respiración pudiendo inducir apoptosis o necrosis, en primer lugar se realizaron incubaciones con concentraciones crecientes de esta droga con el fin de hallar una concentración que no afectara la viabilidad celular. Las células fueron expuestas a la rotenona durante 8 h, luego el medio fue reemplazado con medio fresco sin la droga y se prosiguió el cultivo hasta completar las 48 h de tratamiento, tiempo en el cual se midió la actividad celular. Concentraciones de rotenona inferiores a 50 nM no resultaron citotóxicas para las células, más aún, a estas concentraciones la rotenona redujo parcialmente el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 26 A).

Se examinó a continuación si el aumento en los niveles de ROS inducidos por el  $\text{Cd}^{2+}$  era modificado en presencia de rotenona. Para ello las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  y rotenona 10 o 50 nM durante 1 h, tiempo en el cual el  $\text{Cd}^{2+}$  produce el mayor pico de ROS. Luego las células fueron cargadas con la sonda carboxy-DCF-DA, que al ser oxidada emite fluorescencia que no depende de la membrana mitocondrial y se midió la fluorescencia de las células por espectrofluorometría. El experimento se realizó en presencia de L-NAME dado que la sonda puede reaccionar con óxido nítrico. Ambas concentraciones de rotenona redujeron el aumento en los niveles de ROS generado por el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 26 B), sugiriendo que al menos en parte, este incremento tiene su origen en la mitocondria.



#### 4.1.2.6 Papel del calcio en el efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup>.

##### *El Cd<sup>2+</sup> afecta los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup> en las células adenohipofisarias*

En muchos tipos celulares el Cd<sup>2+</sup> puede aumentar la concentración citosólica de calcio (Ca<sup>2+</sup>) (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Lemarie y col., 2004; Li y col., 2000; Shen y col., 2001a). Como se mencionó en la introducción, los cambios en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> pueden inducir apoptosis (Benjamins y col., 2003; Chan y col., 2002; Nakagawa y col., 2000). Más aún, se ha demostrado que en algunos tipos celulares, el Cd<sup>2+</sup> puede causar apoptosis a través de su efecto sobre la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Li y col., 2000; Shen y col., 2001a).

Para determinar si en nuestro sistema el Cd<sup>2+</sup> puede afectar los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup>, realizamos mediciones utilizando la sonda fluorescente Calcium-green (Ca-green), que permite detectar cambios en los niveles citosólicos de este catión por citometría de flujo (Eberhard y Erne, 1991). Luego de 3 h de tratamiento, el Cd<sup>2+</sup> causó un marcado aumento en la fluorescencia de las células cargadas con la sonda (fluorescencia relativa: Control:  $8.77 \pm 2.48$ ; Cd<sup>2+</sup> 25  $\mu$ M:  $16.34 \pm 4.65$ , media geométrica  $\pm$  SD, n=10000). Este resultado indicaría que el Cd<sup>2+</sup> aumenta los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup>. Sin embargo se sabe que el Cd<sup>2+</sup>, debido a sus propiedades Ca<sup>2+</sup>-miméticas, puede interferir con la medición de este catión cuando se utilizan sondas fluorescentes (Hinkle y col., 1992; Li y col., 2000). En la bibliografía no existe información relacionada con el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre el Ca-green, por lo que no se puede asegurar que el incremento de la fluorescencia de la sonda se deba a la detección del metal en lugar de a cambios en el Ca<sup>2+</sup>. Para descartar esta posibilidad, junto con la sonda se utilizó un quelante específico para metales de transición, N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN), que tiene una afinidad 10<sup>12</sup> veces mayor por el Cd<sup>2+</sup> que por el Ca<sup>2+</sup> (Hinkle y col., 1992). La unión de Ca<sup>2+</sup> citosólico al TPEN es teóricamente, despreciable, por lo que éste no tendría que interferir con las mediciones del catión (Arslan y col., 1985). Para confirmar esto, provocamos un aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico incubando las células en presencia de thapsigargina, un inhibidor de la Ca-ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA)



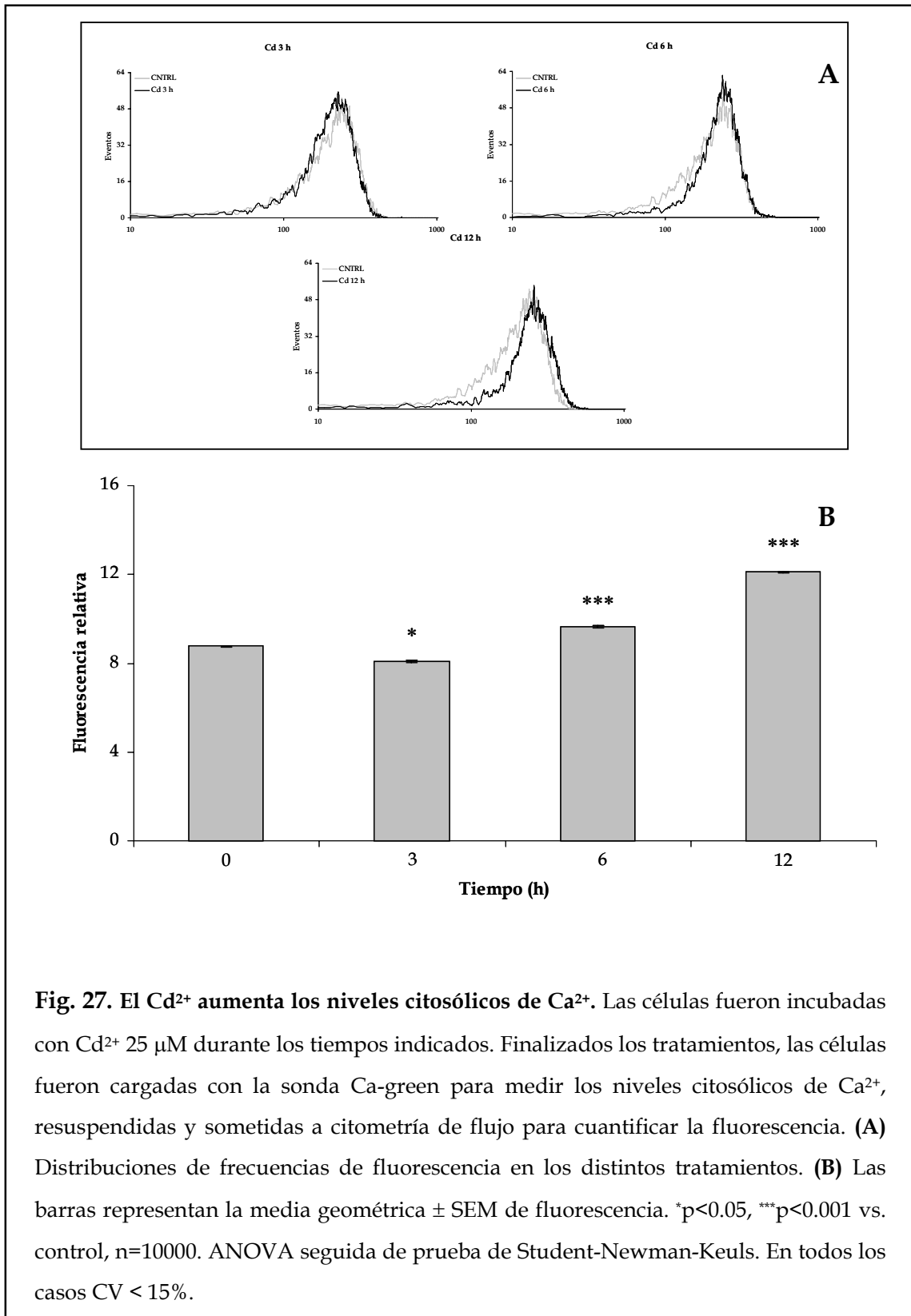
(Bouron y col., 2005) y medimos los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando la sonda Ca-green en presencia o ausencia de TPEN. El quelante de metales de transición no alteró los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  basales ni los estimulados por el inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (fluorescencia relativa: Control:  $8.77 \pm 2.48$ ; TPEN 25  $\mu\text{M}$ :  $8.92 \pm 2.78$ ; Thapsigargina 1  $\mu\text{M}$ :  $15.21 \pm 4.56$ ; Thapsigargina 1  $\mu\text{M}$  + TPEN 25  $\mu\text{M}$ :  $15.02 \pm 4.50$ , media geométrica  $\pm$  SD,  $n=10000$ ). Este resultado confirma que el TPEN no interfiere con las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

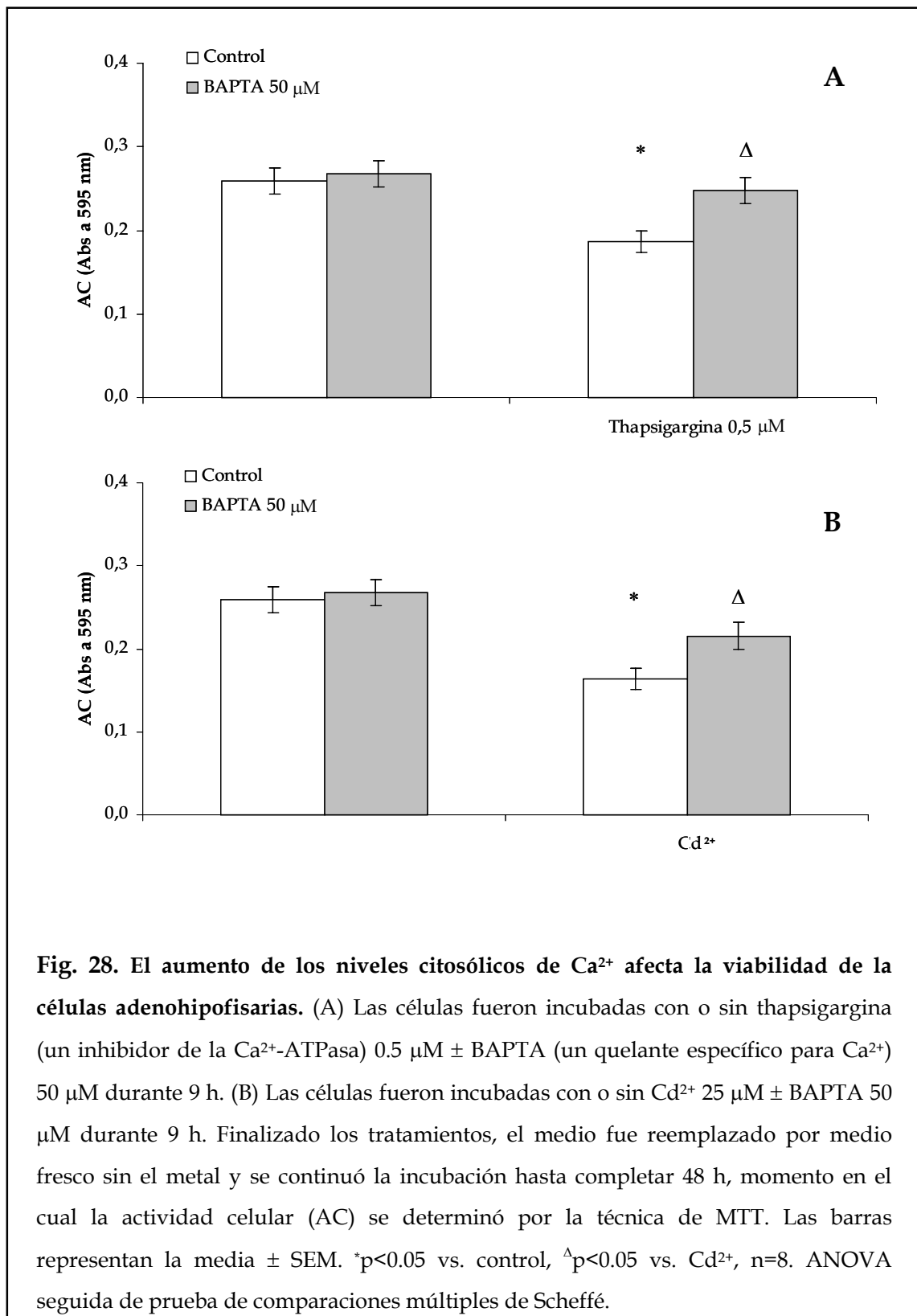
El aumento inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a las 3 h no fue observado cuando los registros se realizaron en presencia de TPEN, por el contrario, en este tiempo el  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyó los niveles intracelulares del catión. En cambio, el  $\text{Cd}^{2+}$  sí aumentó dichos niveles entre las 6 y 12 h de tratamiento (Fig. 27 A y B). Este resultado indica que el  $\text{Cd}^{2+}$  efectivamente aumenta los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es importante destacar que los registros deben ser realizados en presencia de un quelante específico del metal para evitar interferencias con la sonda.

*El aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico interviene en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  en las células adenohipofisarias:*

A pesar de que se conoce que un aumento en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  puede inducir apoptosis, no existe información bibliográfica sobre esto a nivel de las células adenohipofisarias. Para estudiar si un aumento prolongado de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  puede resultar perjudicial para estas células, las mismas fueron incubadas con thapsigargina y con o sin BAPTA-AM (un quelante específico para  $\text{Ca}^{2+}$ ).

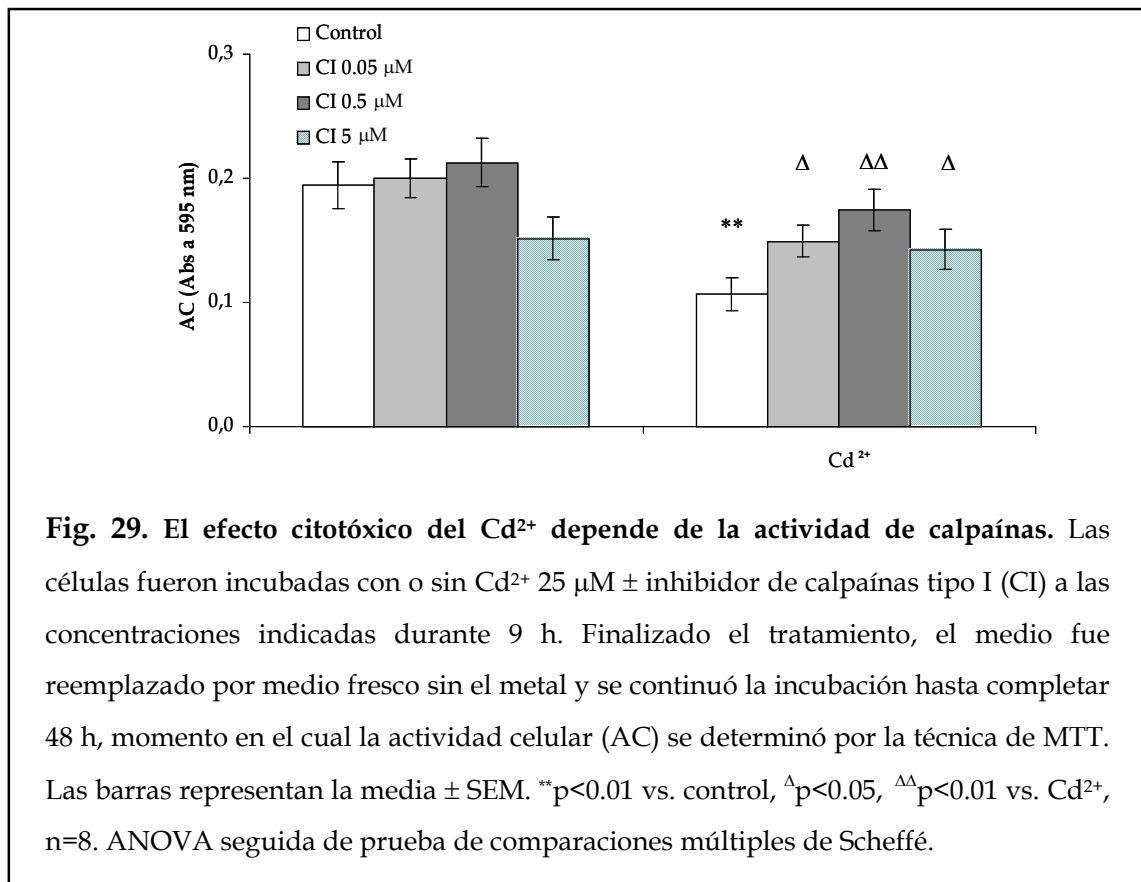
La exposición de las células adenohipofisarias a thapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  durante 8 h causó una importante disminución en la viabilidad celular medida a las 48 h de iniciado el tratamiento (Fig. 28 A). Este efecto no se observó cuando se incubaron las células con BAPTA-AM 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 28 A), sugiriendo que los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico afectan la viabilidad celular adenohipofisaria. El efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  también fue reducido por el BAPTA-AM (Fig. 28 B). Teniendo en cuenta que el BAPTA-AM no secuestra  $\text{Cd}^{2+}$  (Lemarie y col., 2004), este resultado sugiere que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  participa en el efecto citotóxico del metal.





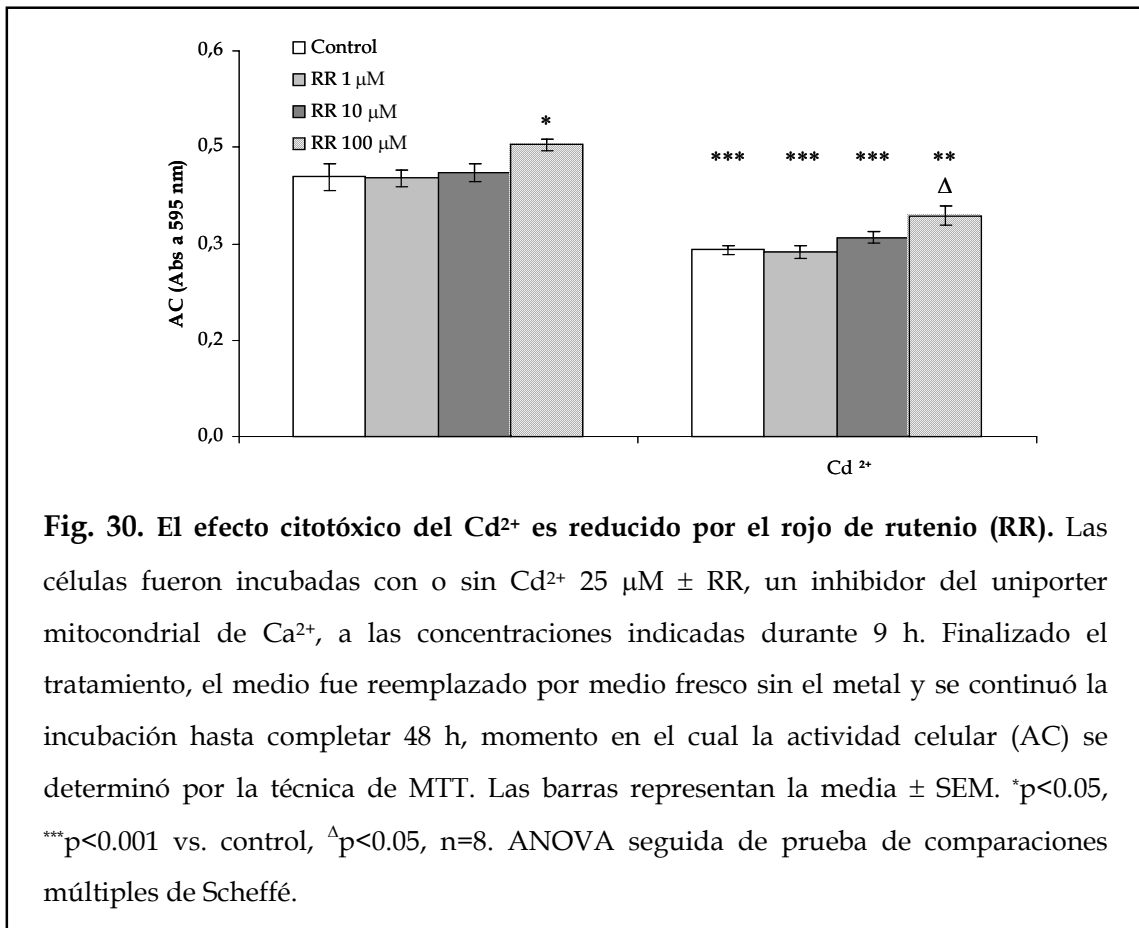
Uno de los mecanismos por los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  puede inducir apoptosis, es a través de la activación de calpaínas, proteasas que cumplen una función similar a las caspasas e incluso pueden activar a estas últimas. En algunos sistemas las calpaínas son responsables de la apoptosis, tanto dependiente de caspasas como independiente, inducida por altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli y Molinari, 1998; Nakagawa y Yuan, 2000).

Para estudiar la posible participación de calpaínas en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de calpaínas tipo I. El inhibidor, en concentraciones de 0.05 y 0.5  $\mu\text{M}$ , redujo parcialmente el efecto citotóxico del metal (Fig. 29). Una concentración mayor del inhibidor resultó tóxica por sí misma. Este resultado sugiere que la vía  $\text{Ca}^{2+}$ -calpaínas participa, al menos parcialmente, en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ .



El  $\text{Ca}^{2+}$  también puede causar apoptosis afectando a las mitocondrias. Estas organelas incorporan el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante tiempos cortos, funcionando como buffers del catión y previniendo los efectos tóxicos del mismo en el citosol (Chakraborti y col., 1999). Sin embargo, el aumento prolongado de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias puede dañarlas, afectando la CTE, causando un aumento de la producción de ROS y activando diferentes proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003).

El  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la mitocondria a través del uniporter mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (MCU), una transportador de baja afinidad y alta capacidad que actúa acoplado a la fuerza protón-motriz de la membrana mitocondrial (Jambrina y col., 2003). Con el fin de evaluar si el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar a las mitocondrias, las células fueron incubadas en presencia de distintas concentraciones de rojo de rutenio, un inhibidor del MCU (Jambrina y col., 2003). Concentraciones de la droga inferiores a  $100\ \mu\text{M}$  no tuvieron efecto alguno sobre la actividad celular, mientras que la concentración  $100\ \mu\text{M}$  aumentó por sí mismo la actividad celular además de reducir levemente el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 30). Teniendo en cuenta que la disrupción del PMM parece preceder temporalmente al aumento de los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la baja capacidad del rojo de rutenio para disminuir el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , se puede sugerir que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico no sería el responsable primario del daño a las mitocondrias causado por el metal.

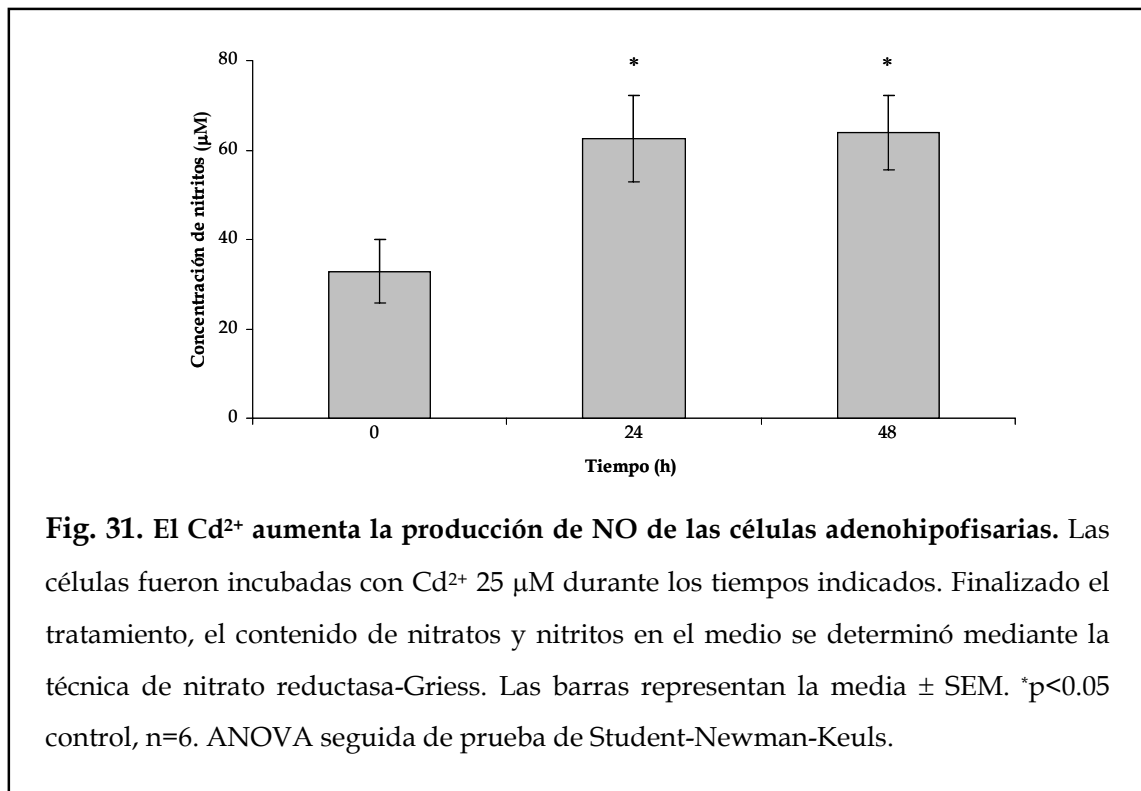


### 4.1.3 Papel del NO en el efecto del Cd<sup>2+</sup>

#### 4.1.3.1 El Cd<sup>2+</sup> aumenta la producción de NO

Entre sus muchas funciones, el óxido nítrico es un modulador del sistema endocrino que actúa como un transductor de señales de forma autocrina y paracrina (Rivier, 2001). Diversas evidencias indican que el Cd<sup>2+</sup> afecta la producción de este segundo mensajero aumentándola o disminuyéndola, dependiendo del tejido (Ramirez y col., 1999; Ramirez y Gimenez, 2003; Tian y Lawrence, 1996).

Para examinar el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la producción de NO en las células adenohipofisarias, éstas fueron expuestas a Cd<sup>2+</sup> 25 µM durante 24 o 48 h. Al finalizar el tratamiento se midió el contenido de nitritos y nitratos (productos finales de la oxidación del NO) en el medio a través la técnica de nitrato reductasa-Griess. El Cd<sup>2+</sup> aumentó la producción de NO en los tiempos estudiados (Fig. 31).

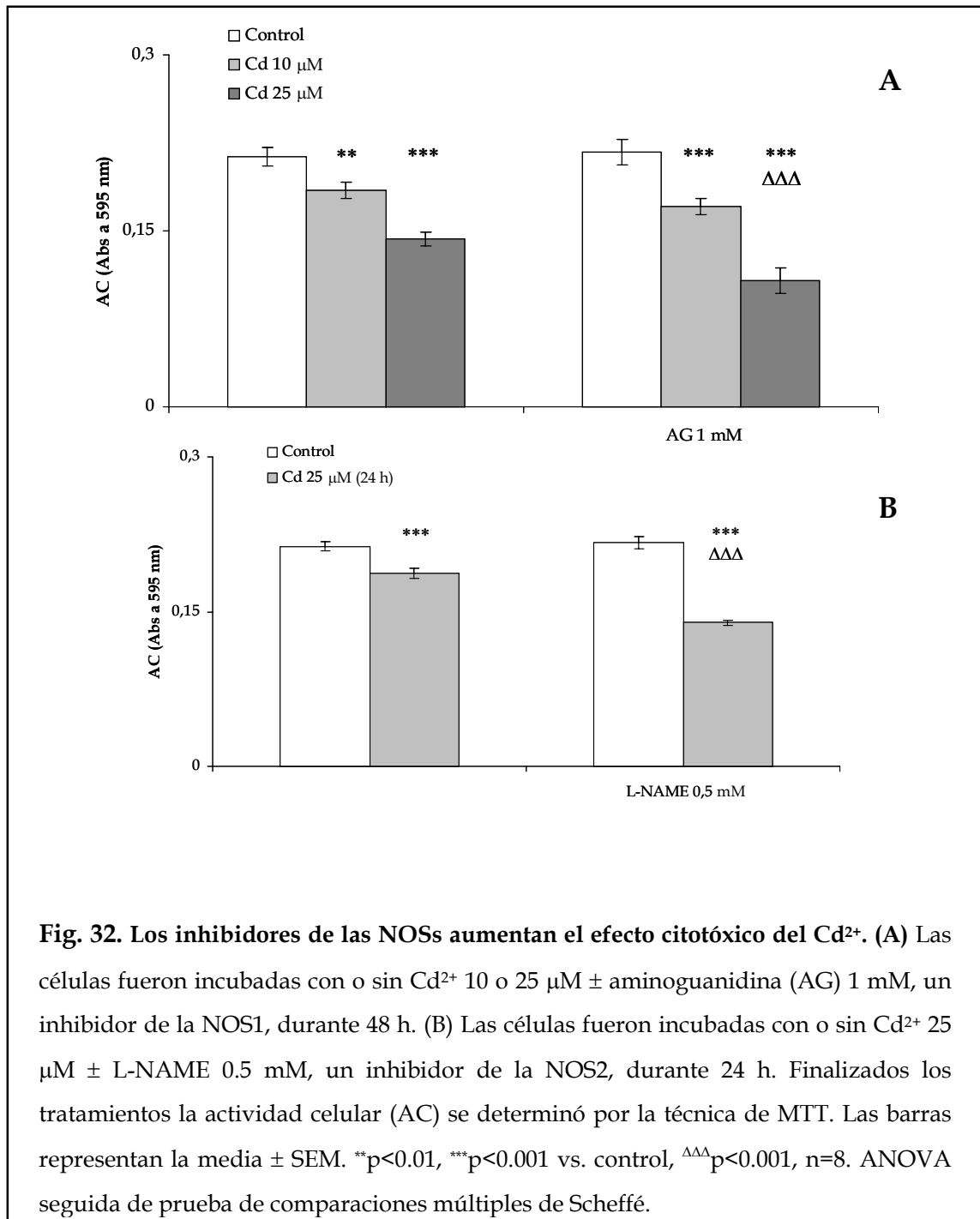


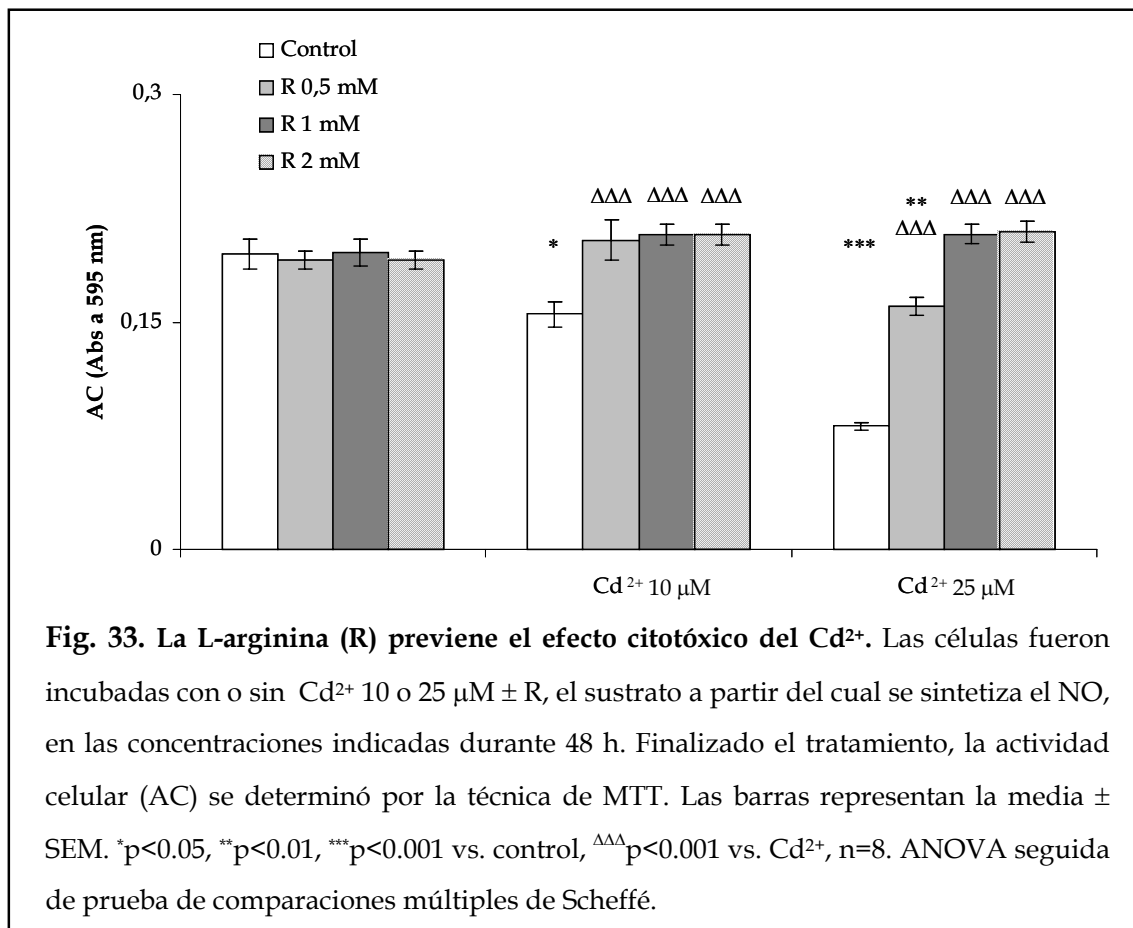
#### 4.1.3.2 El NO cumple un papel citoprotector ante la exposición al Cd<sup>2+</sup>

Existen controversias respecto al papel del NO en el efecto del Cd<sup>2+</sup>. Mientras algunos autores han visto una potenciación del efecto del metal al coexponer sus células a un dador de NO (Katakai y col., 2001; Misra y col., 1996), otros han informado que los dadores de NO tienen un efecto protector (Liu y col., 2004; Srisook y col., 2005).

Para establecer cuál es la función del NO en nuestro sistema, las células fueron incubadas con Cd<sup>2+</sup> 25 µM en presencia de Aminoguanidina 1 mM (un inhibidor de las óxido nítrico sintasas (NOSs) con una leve especificidad por la NOS1). Este inhibidor de las NOSs aumentó el efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup> (Fig. 32 A). Resultados similares se obtuvieron utilizando L-NAME, otro inhibidor de las NOSs con una leve especificidad por la NOS2. Este inhibidor aceleró el efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup> haciéndolo más marcado a las 24 h de tratamiento (Fig. 32 B). Estos resultados sugieren que el NO cumple un papel citoprotector frente al daño causado por el Cd<sup>2+</sup>. Para confirmarlo, las células fueron incubadas con Cd<sup>2+</sup> 25 µM y L-arginina, el sustrato de las NOSs a partir del cual se sintetiza NO. El efecto citotóxico del metal se redujo en presencia de L-arginina (Fig. 33). En conjunto estos resultados indican que el NO endógeno cumpliría un papel citoprotector frente a la exposición al metal.



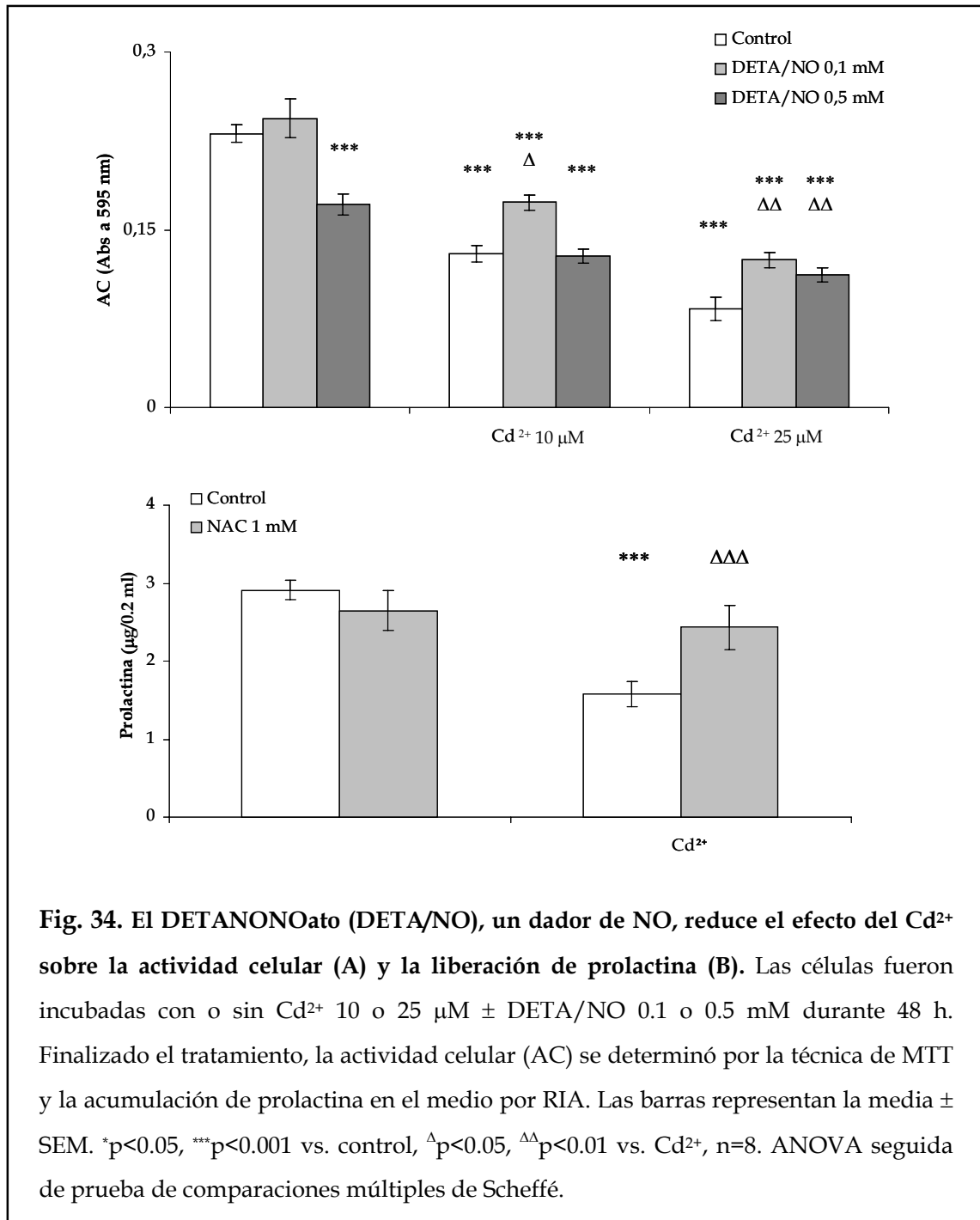




#### 4.1.3.3 El NO suministrado exógenamente reduce la apoptosis inducida por el Cd<sup>2+</sup>

Dado que el NO endógeno protege a las células del efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup>, se suministró a las células NO de manera exógena con el objetivo de estudiar los mecanismos de acción de este gas. Para ello las células fueron incubadas con DETANONOato (DETA/NO) 0.1 y 0.5 mM. El DETA/NO es un dador de NO de vida media larga (aproximadamente 24 h), que a una concentración 0.1 mM permite alcanzar un nivel de NO entre 0.2-0.3 μM en el estado estacionario (Beltran y col., 2002; Liu y col., 1998). El DETA/NO 0.1 mM redujo parcialmente el efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup> 10 y 25 μM (Fig. 34 A). Una concentración 0.5 mM del dador, confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (Velardez y col., 2004), tuvo una acción

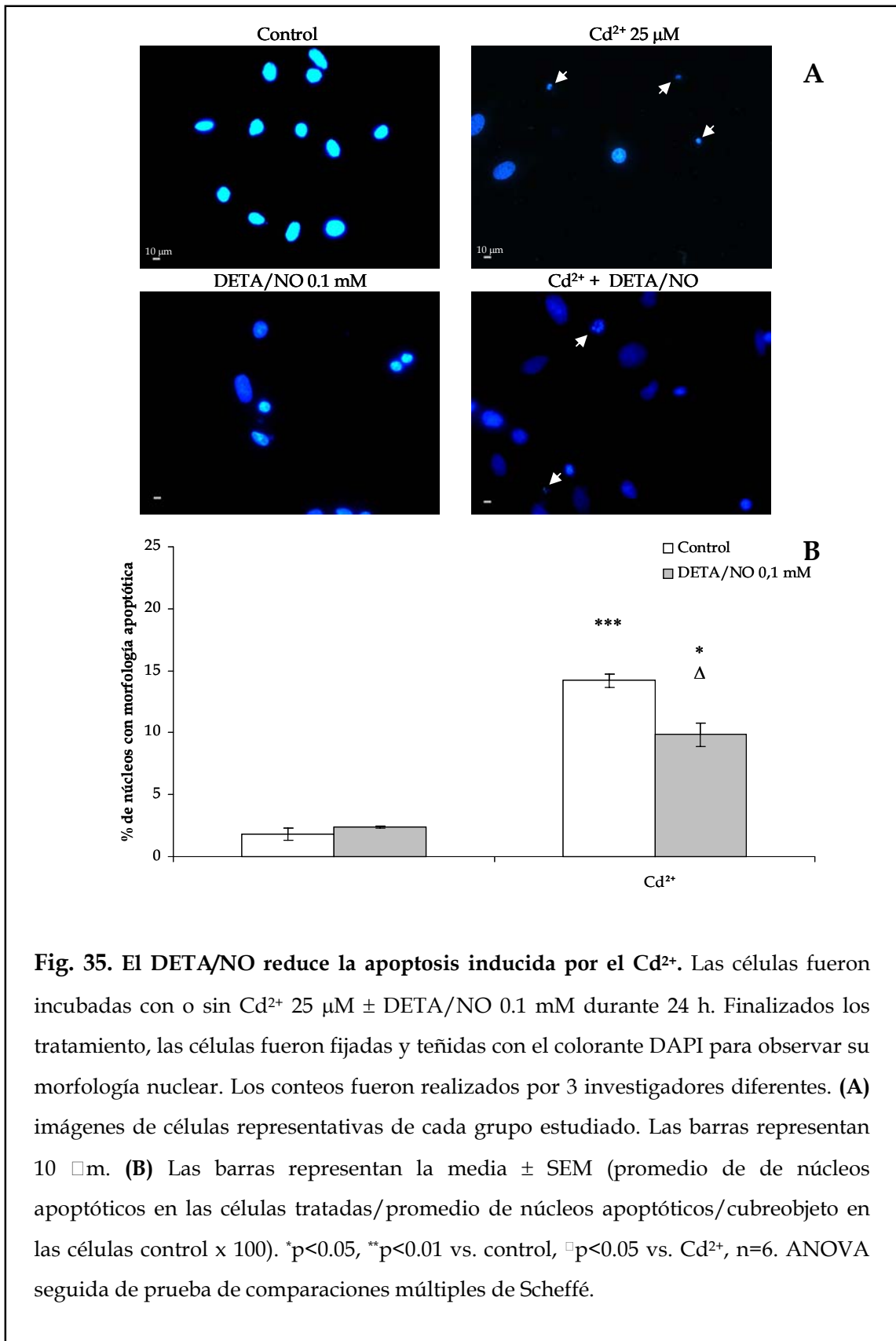
citotóxica por sí misma, pero no aumentó el efecto tóxico del metal (Fig. 34 A). El DETA/NO 0.1 mM impidió el efecto inhibitorio del Cd<sup>2+</sup> 10 μM sobre la liberación de prolactina, pero no fue capaz de modificar el efecto del Cd<sup>2+</sup> 25 μM (Fig. 34 B).



El efecto protector del DETA/NO sobre la citotoxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$  fue debido específicamente al NO liberado, ya que la molécula decaída (DETA), incapaz de liberar NO, no protegió a las células del efecto del metal (Actividad celular, Abs a 595 nm: Control:  $0.231 \pm 0.007$ ; Cd 25  $\mu\text{M}$ :  $0.092 \pm 0.010$ ; DETA 0.1 mM:  $0.235 \pm 0.015$ ; Cd 25  $\mu\text{M}$  + DETA 0.1 mM:  $0.099 \pm 0.018$ ; media  $\pm$  SEM; n = 8).

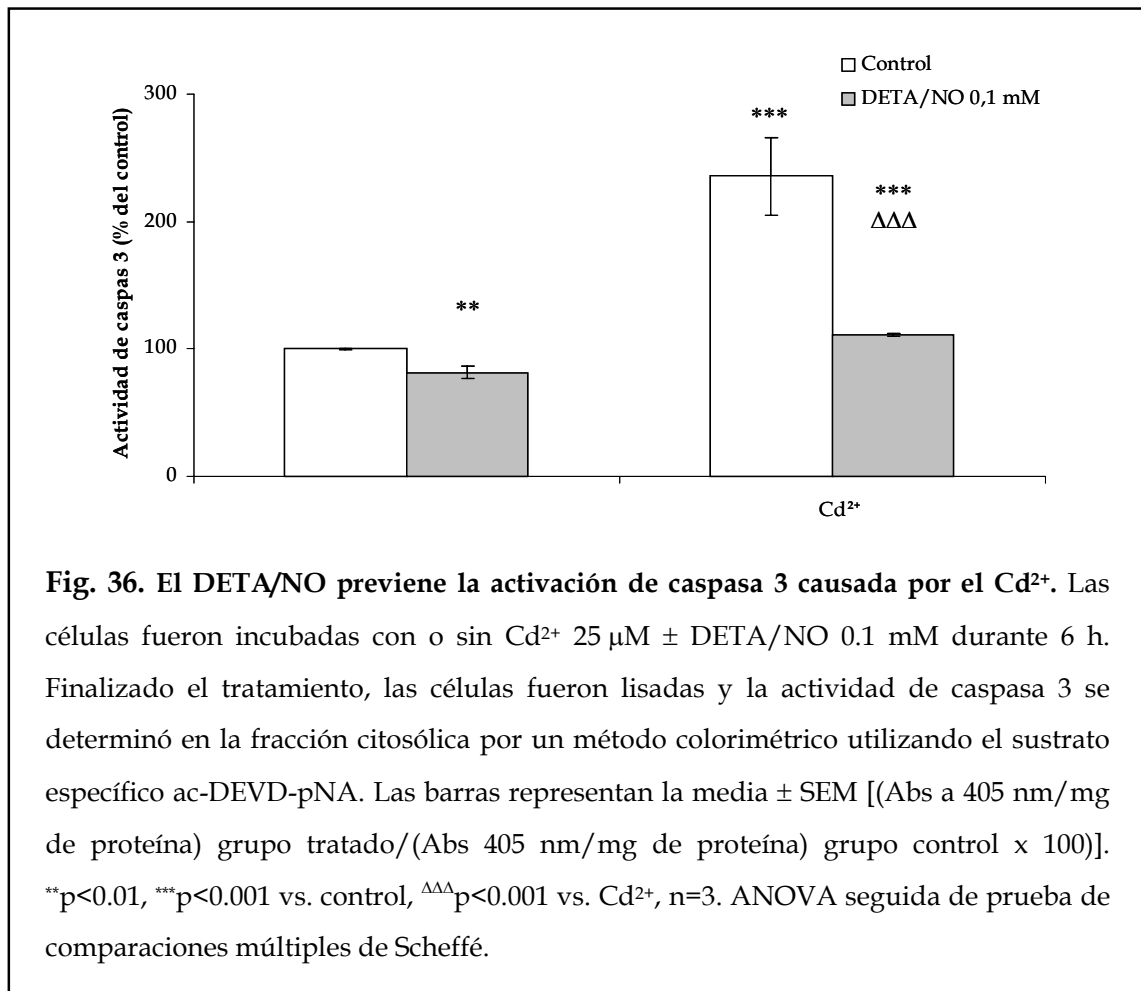
El efecto citoprotector del NO también fue confirmado a nivel morfológico. El DETA/NO 0.1 mM redujo el aumento en el número de núcleos con morfología apoptótica causado por el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 35 A y B).

Estos resultados muestran que el efecto del DETA/NO 0.1 mM es similar al del NO endógeno. Por consiguiente, esta concentración de DETA/NO fue utilizada para estudiar los mecanismos de acción del NO en células expuestas a  $\text{Cd}^{2+}$ .



#### 4.1.3.4 El NO reduce la activación de caspasas causada por Cd<sup>2+</sup>

Debido a que la activación de caspasas está involucrada en la apoptosis inducida por Cd<sup>2+</sup>, estudiamos el efecto del NO sobre estas enzimas. El DETA/NO 0.1 mM redujo por sí mismo la actividad de caspasa 3 e impidió la activación de la misma causada por Cd<sup>2+</sup> 25 μM luego de 6 h de tratamiento (Fig. 36). Esto sugiere que el NO previene el efecto del Cd<sup>2+</sup> impidiendo la activación de caspasas o actuando en un nivel anterior a la activación de las mismas.

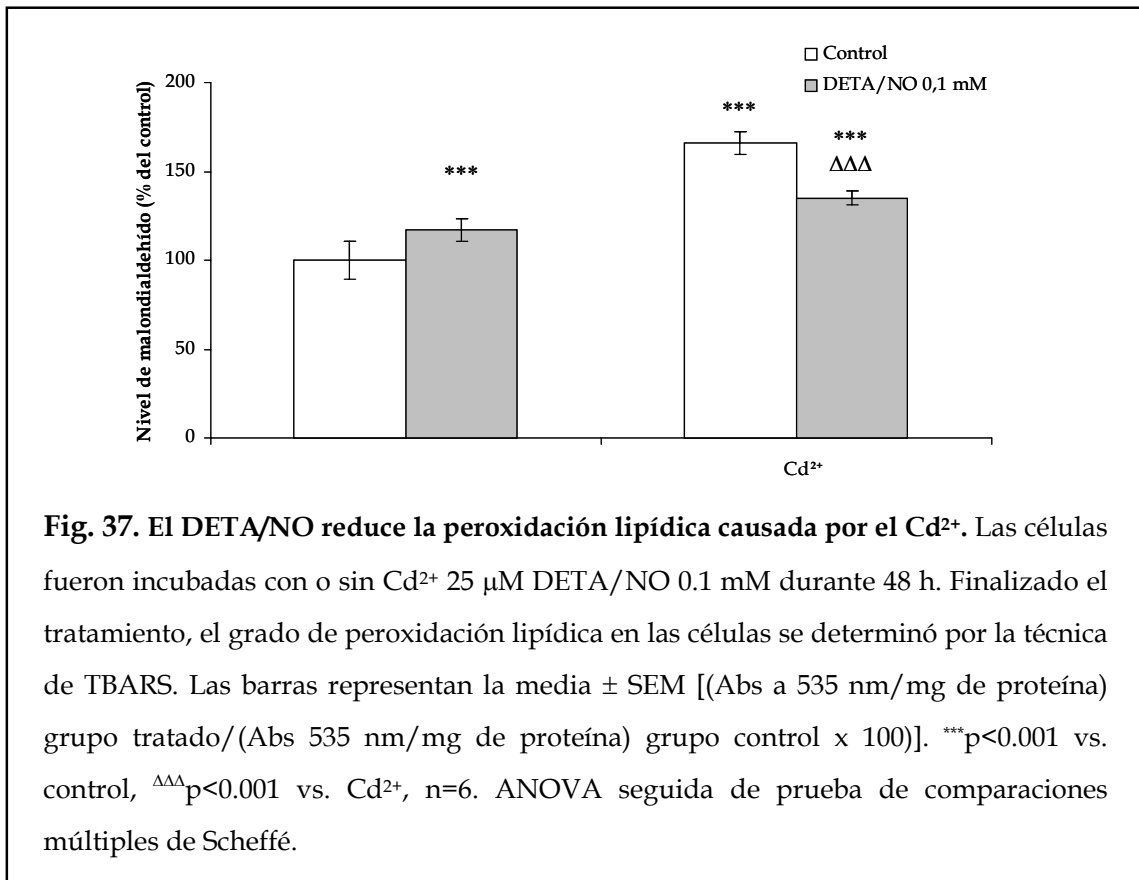


#### 4.1.3.5 El NO reduce el estrés oxidativo generado por el Cd<sup>2+</sup>.

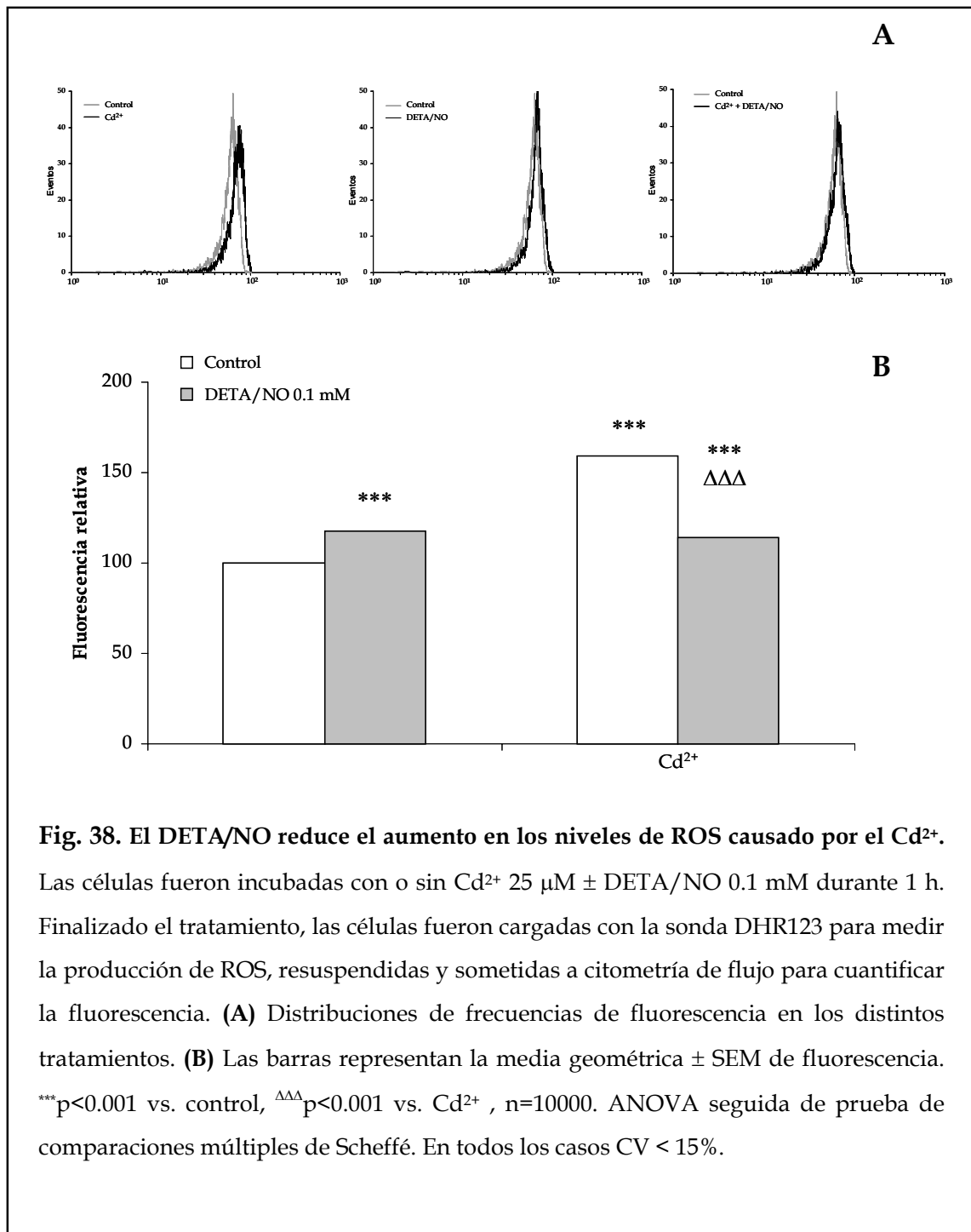
A pesar de que en diversos sistemas el NO puede generar estrés oxidativo, existen numerosos informes de que el NO, a bajas concentraciones, puede proteger a las células de diferentes agentes prooxidantes. Se ha observado que el NO puede inducir un aumento de las defensas antioxidantes propias de las células y también actuar por sí mismo como un antioxidante, ya que puede secuestrar metales redox activos o cortar las cadenas de peroxidación lipídica (Wink y Mitchell, 1998).

Debido a que el Cd<sup>2+</sup> causa un aumento en los niveles de ROS y que este aumento está involucrado en la inducción de la apoptosis y además, teniendo en cuenta que el NO reduce la apoptosis inducida por el Cd<sup>2+</sup>, estudiamos el efecto del NO sobre el estrés oxidativo generado por el metal.

Cuando las células fueron incubadas con DETA/NO 0.1 mM, el NO por sí mismo causó un leve aumento en los niveles de peroxidación lipídica medidos por la técnica de TBARS, pero redujo el aumento en los niveles de peroxidación causados por el tratamiento con Cd<sup>2+</sup> 25 μM (Fig. 37). En concordancia con este resultado, el NO, a pesar de tener un leve efecto pro-oxidante por sí mismo, también atenuó el pico en los niveles de ROS causado por la exposición a Cd<sup>2+</sup> 25 μM durante la primera hora (Fig. 38 A y B), medidos por citometría de flujo utilizando la sonda DHR123.







#### 4.1.3.6 El NO reduce el efecto del $\text{Cd}^{2+}$ sobre las membranas mitocondriales.

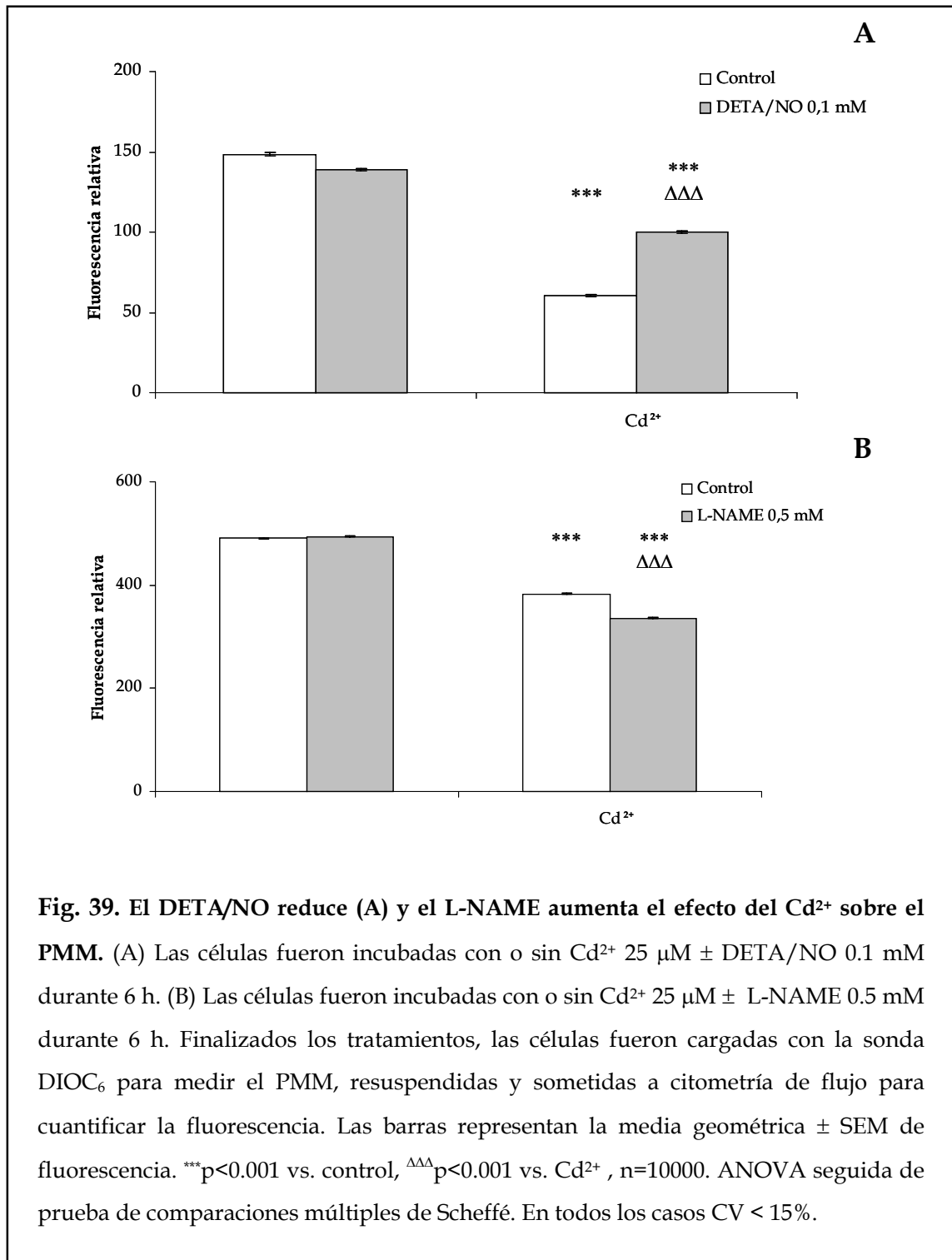
En los estudios descriptos más arriba demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$ , al generar estrés oxidativo, afectaba de manera negativa a las mitocondrias. Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes que el NO parece tener en nuestro sistema, estudiamos si era capaz de proteger a las mitocondrias de la acción del metal. Las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  con o sin DETA/NO 0.1 mM durante 12 h y el PMM se midió por citometría de flujo utilizando la sonda  $\text{DIOC}_6$ . El NO atenuó la caída en el potencial de la membrana mitocondrial causada por el metal (Fig. 39 A), confirmando su efecto protector. Por el contrario, la inhibición de la síntesis del NO endógeno con L-NAME 0.5 mM aumentó el efecto deletéreo del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre estas organelas (Fig. 39 B).

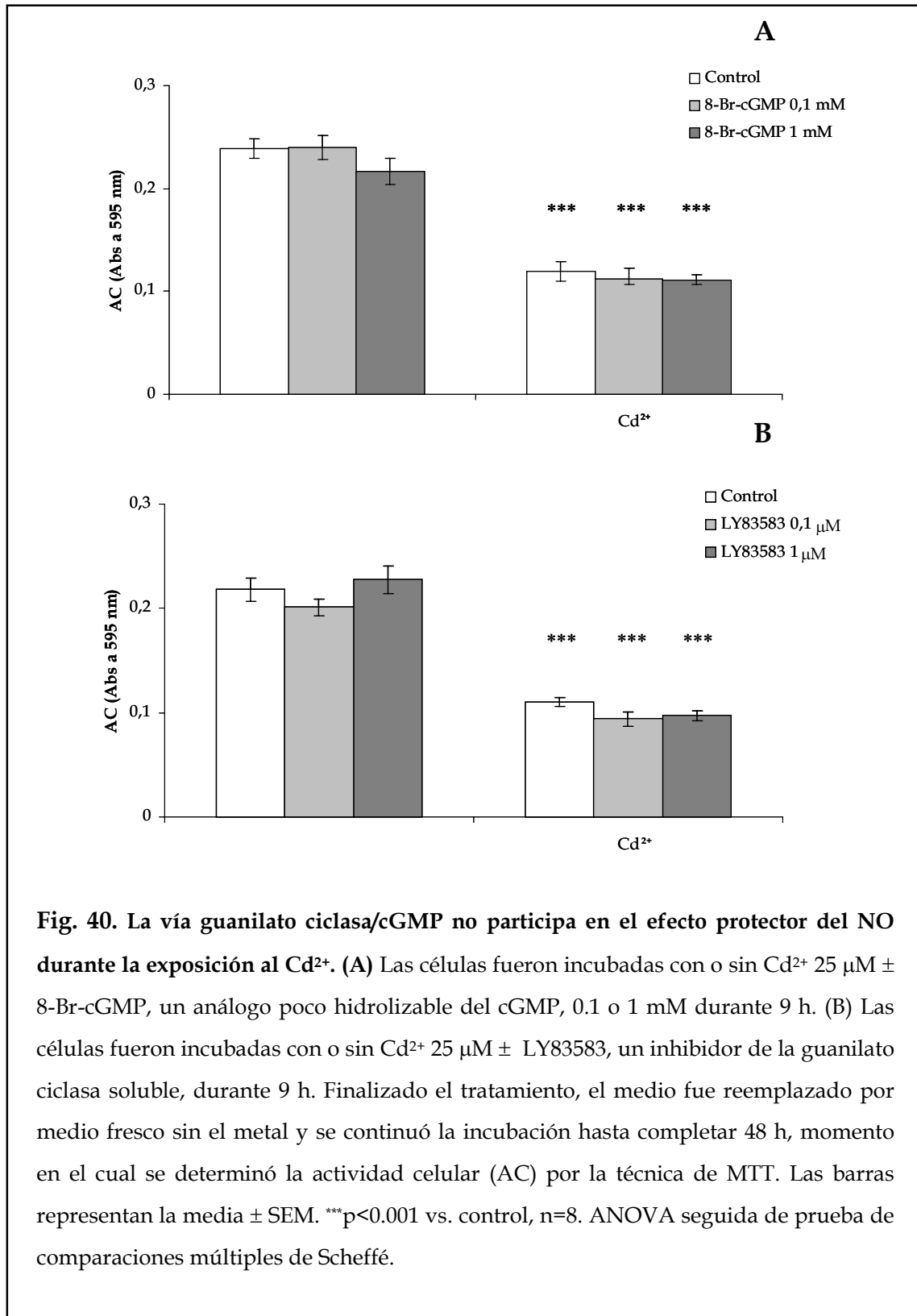
#### 4.1.3.7 El efecto citoprotector del NO es independiente de la vía NO/cGMP

La enzima guanilato ciclasa soluble es uno de los principales mediadores intracelulares de la respuesta a NO (Ignarro, 1989; Ignarro, 1991). Algunos estudios han sugerido que el efecto citoprotector del NO depende de la vía NO/guanilato ciclasa/cGMP (Dawn y Bolli, 2002). Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que el NO activa la síntesis de cGMP en las células adenohipofisarias en cultivo (Velardez y col., 2000).

Para examinar si la vía NO/cGMP participa en el efecto citoprotector del NO, las células fueron incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  en presencia de 8-Br-cGMP 0.1 o 1 mM, un análogo poco hidrolizable del cGMP. El 8-Br-cGMP no fue capaz de modificar el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 40 A). Confirmando este resultado, el BAY-41.2272, un agonista de la sGC que actúa de forma independiente de NO, a una concentración que previamente demostramos aumentaba los niveles celulares de cGMP (Velardez y col., 2003), tampoco alteró el efecto citotóxico del metal (Actividad celular,

absorbancia a 595 nm; control:  $0.272 \pm 0.090$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$ :  $0.100 \pm 0.007$  \*\*\*; BAY-41.2272 1  $\mu\text{M}$ :  $0.275 \pm 0.011$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  + BAY-41.2272 1  $\mu\text{M}$ :  $0.113 \pm 0.030$ \*\*\*; \*\*\* $p < 0.001$  vs. control,  $n = 8$ , ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Scheffé). En concordancia con los resultados anteriores, el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, LY83583, a concentraciones que previamente demostramos son suficientes para inhibir a la enzima (0.1 o 1  $\mu\text{M}$ ) (Velardez y col., 2003), tampoco modificó el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la actividad celular (Fig. 40 B). En conjunto, estos resultados demuestran que la vía NO/cGMP no participaría en el efecto citoprotector del NO en las células adenohipofisarias tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$ .



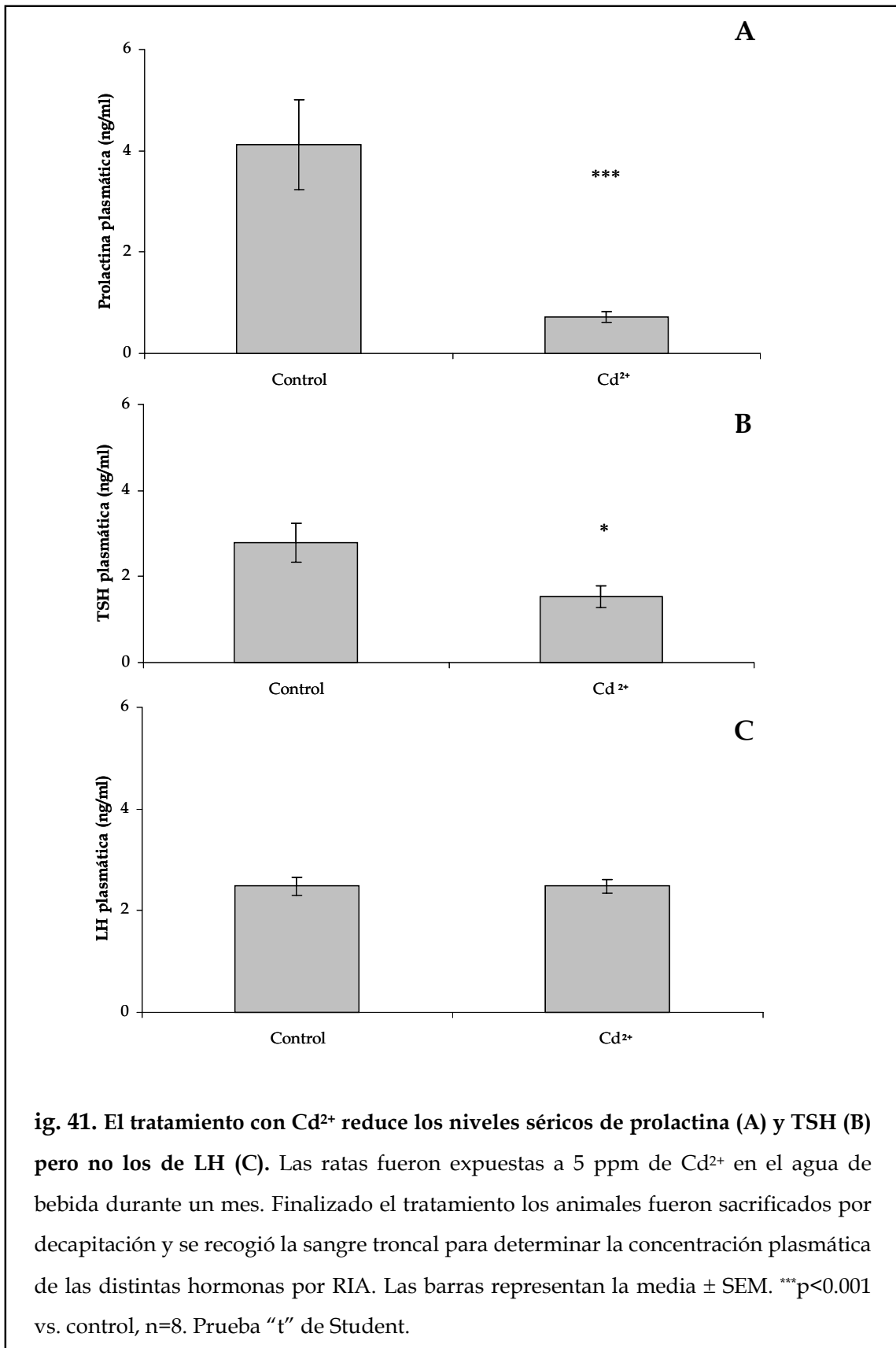


## 4.2 Estudios *in vivo* de los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre el eje hipotálamo-hipofisario

### 4.2.1 El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> 5 ppm afecta los niveles séricos de distintas hormonas adenohipofisarias

Numerosos estudios muestran que el Cd<sup>2+</sup>, administrado por vías diversas a diferentes concentraciones, modifica los niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias en ratas. Con el objetivo de evitar los posibles efectos agudos del Cd<sup>2+</sup> sobre el estado general del animal, utilizamos la menor concentración del metal que nos asegurase observar algún efecto a nivel endocrino. Resultados previos indican que el tratamiento crónico (1 mes) con 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida, afecta los niveles plasmáticos de las hormonas hipofisarias (Lafuente y col., 2003a). En la literatura no se encuentran estudios que utilicen concentraciones menores del metal. Debido a esto, la dosis de 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida fue elegida para nuestros tratamientos.

La administración de Cd<sup>2+</sup> 5 ppm durante 1 mes disminuyó los niveles plasmáticos de prolactina y TSH (Fig. 41 A y B) pero no afectó los de LH (Fig. 41 C), demostrando que esta concentración baja del metal fue suficiente para afectar al sistema endocrino de los animales de experimentación.



#### 4.2.2 El Cd<sup>2+</sup> induce estrés oxidativo en la adenohipófisis

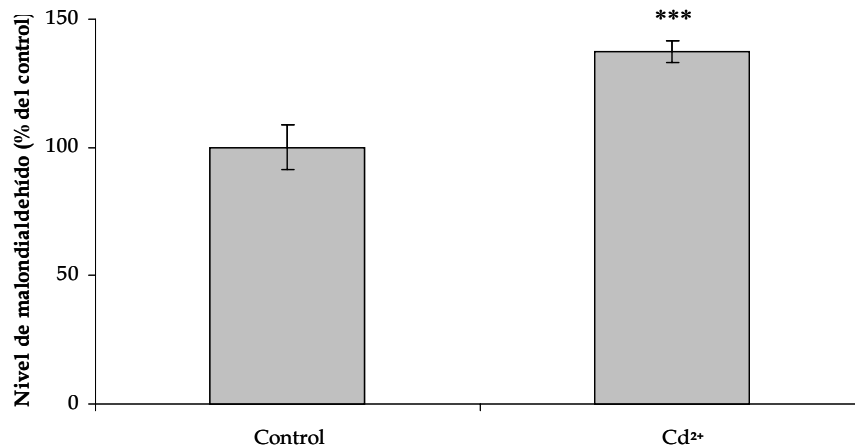
Teniendo en cuenta los resultados enumerados anteriormente en esta tesis, en los cuales observamos que en células adenohipofisarias en cultivo el Cd<sup>2+</sup> induce estrés oxidativo, estudiamos si también se observa en la glándula de las ratas expuestas crónicamente al metal.

Como un indicador del grado de estrés oxidativo se midió el grado de peroxidación lipídica en la glándula por la técnica de TBARS. El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> aumentó la peroxidación lipídica en la adenohipófisis (Fig. 42).

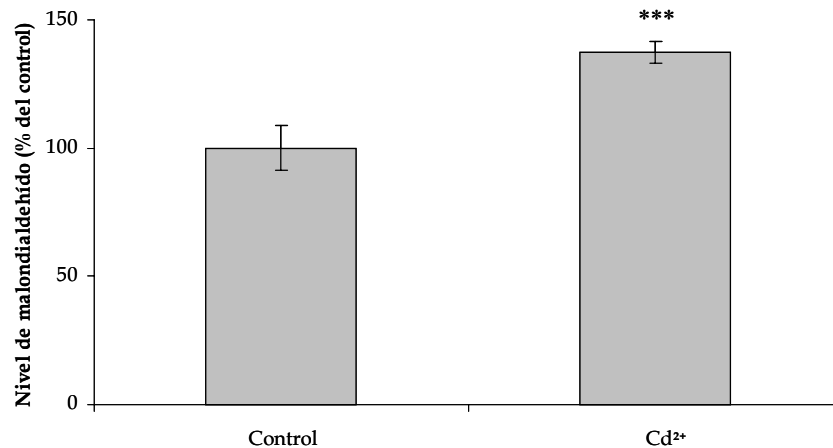
La hemo oxigenasa-1 (HO-1) es la enzima responsable de la degradación del grupo hemo en hierro libre, biliverdina y monóxido de carbono (Morse y Choi, 2002). Esta enzima forma parte de la batería antioxidante de las células y es fuertemente inducida durante la generación de estrés oxidativo, por lo que se la utiliza con frecuencia como un marcador de esta condición ( Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). Los niveles de mRNA de HO-1 fueron medidos mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (rt-RT-PCR). En concordancia con los resultados de peroxidación lipídica, el tratamiento con Cd<sup>2+</sup> aumentó 4 veces la expresión de HO-1 en la adenohipófisis de los animales tratados con respecto al control (Fig. 43).

La mayoría de los estudios sobre la toxicidad del Cd<sup>2+</sup>, tanto aguda como crónica, han sido realizados en tejido hepático o renal, dado que éstos son considerados los más sensibles al metal (Satarug y col., 2003). Teniendo en cuenta esto, se midió simultáneamente como un control, el efecto del tratamiento con Cd<sup>2+</sup> sobre los niveles de peroxidación lipídica y mRNA de HO-1 en el hígado de las ratas. El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> sorprendentemente, no afectó ninguno de estos parámetros en el hígado en el tiempo estudiado (Fig. 44 A y B). Estos resultados sugieren que, a las dosis utilizadas en nuestros experimentos, la adenohipófisis es más sensible que el hígado en la respuesta al estrés oxidativo inducido por el metal.

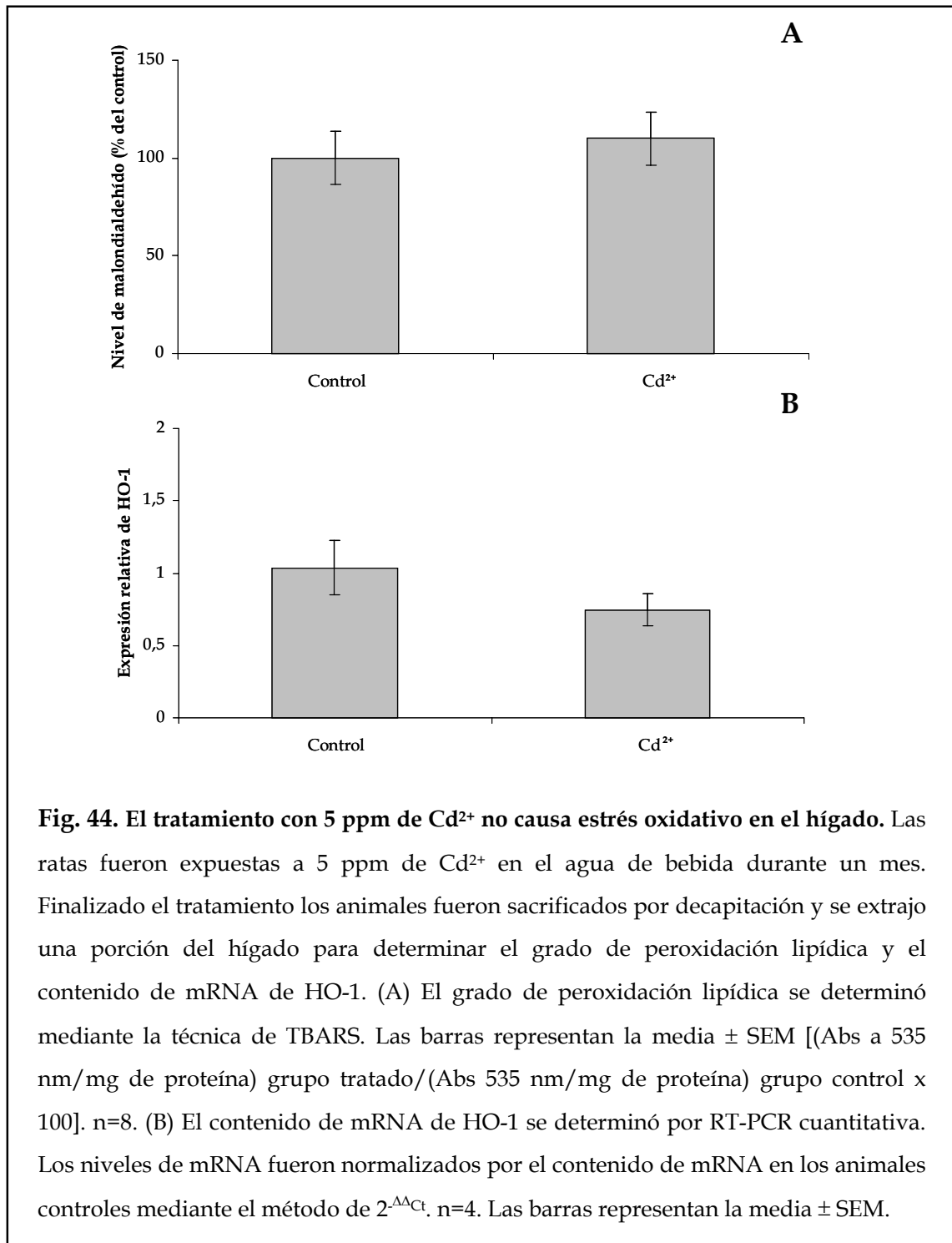




**Fig. 42. El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> causa un aumento del nivel de peroxidación lipídica en la adenohipófisis.** Las ratas fueron expuestas a 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida durante un mes. Finalizado el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajo la adenohipófisis para determinar el grado de peroxidación lipídica en la glándula por la técnica de TBARS. Las barras representan la media  $\pm$  SEM [(Abs a 535 nm/mg de proteína) grupo tratado/(Abs 535 nm/mg de proteína) grupo control x 100]. \*\*\*p<0.001 vs. control, n=8. Prueba “t” de Student.



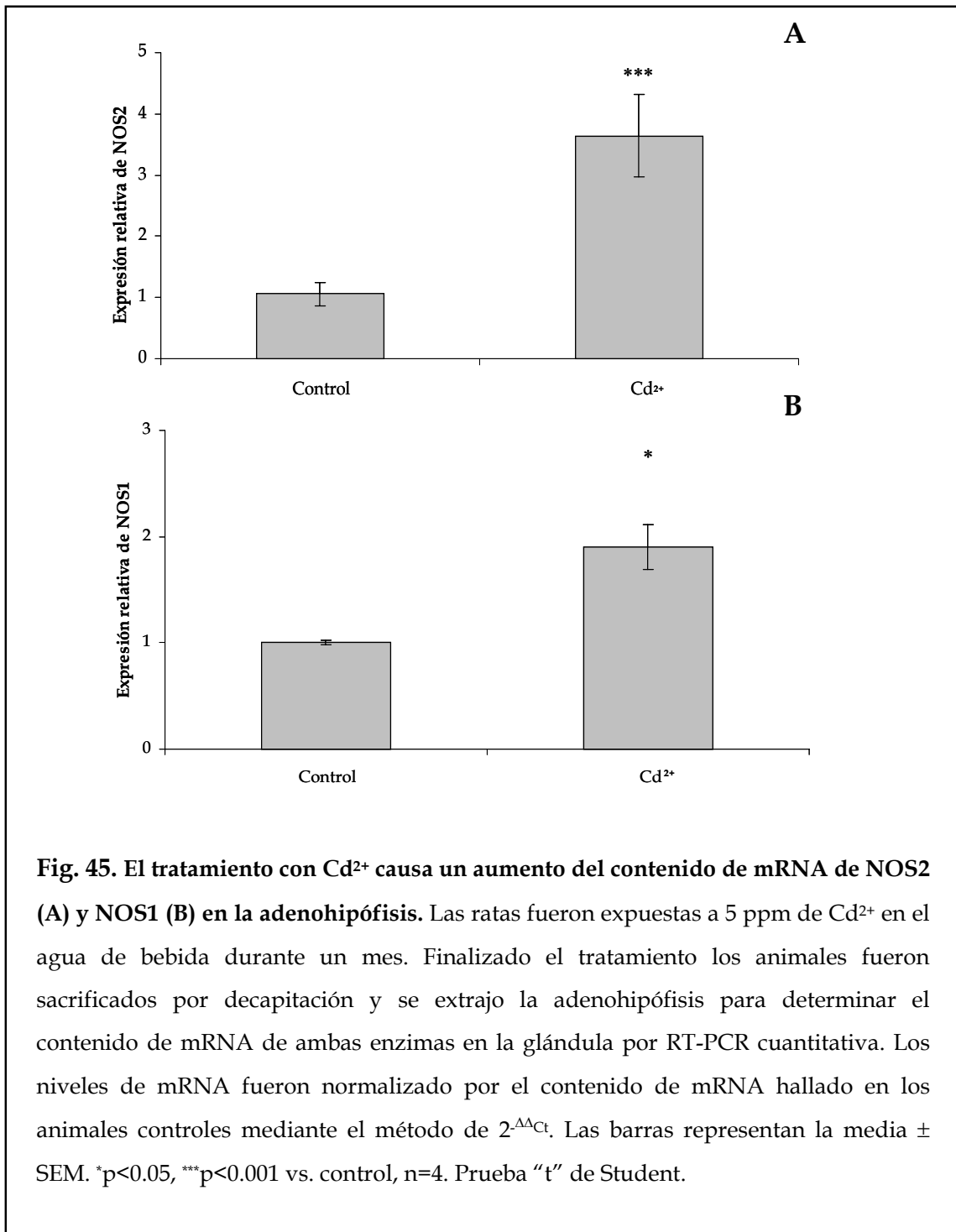
**Fig. 43. El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> causa un aumento del contenido de mRNA de HO-1 en la adenohipófisis.** Las ratas fueron expuestas a 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida durante un mes. Finalizado el tratamiento los animales fueron sacrificados y se extrajo la adenohipófisis para determinar el contenido de mRNA de HO-1 en la glándula por RT-PCR cuantitativa. Los niveles de mRNA fueron normalizado por el contenido de mRNA hallado en los animales controles mediante el método de 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. \*\*\*p<0.001 vs. control, n=4. Prueba “t” de Student.



### 4.2.3 El $\text{Cd}^{2+}$ afecta la expresión de la NOS1 y la NOS2 en la adenohipófisis

Como se mencionara previamente, el NO es un importante regulador neuroendocrino que media señales autocrinas y paracrinas tanto en la adenohipófisis como en el hipotálamo (Rivier, 2001). La isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (NOS1) interviene en la regulación de la liberación hormonal (Brann y col., 1997). La isoforma inducible (NOS2) es estimulada durante procesos fisiopatológicos como la inflamación (Brann y col., 1997). Recientemente, también se ha involucrado a esta isoforma en la remodelación normal de las poblaciones celulares hipofisarias que ocurren, por ejemplo, durante el ciclo estral en la rata (Candolfi y col., 2004). Basados en nuestros resultados *in vitro*, en los cuales demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la producción de NO en las células adenohipofisarias, estudiamos si la exposición al metal *in vivo* afectaba la expresión de la NOS1 y la NOS2.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó 1.9 veces los niveles de mRNA de NOS1 y 3.6 veces los de mRNA de NOS2 en la adenohipófisis (Fig. 45 A y B). Estos resultados permiten sugerir que el incremento en la producción de NO observada *in vitro* se debe no sólo a una activación de la NOS sino también a un aumento en su expresión.



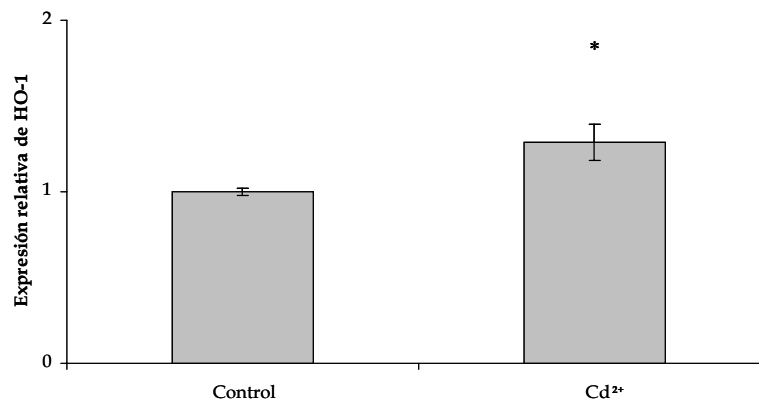
#### 4.2.4 Efectos del tratamiento con Cd<sup>2+</sup> a nivel hipotalámico

El hipotálamo anterior es una región relacionada con la regulación de la liberación hormonal hipofisaria y se ha demostrado que el Cd<sup>2+</sup> afecta la concentración de diversos neurotransmisores en esta zona del hipotálamo (Lafuente y Esquifino, 1999; Lafuente y col., 2003b). Con el objetivo de estudiar si el Cd<sup>2+</sup> se midieron los mismos parámetros estudiados en la adenohipófisis.

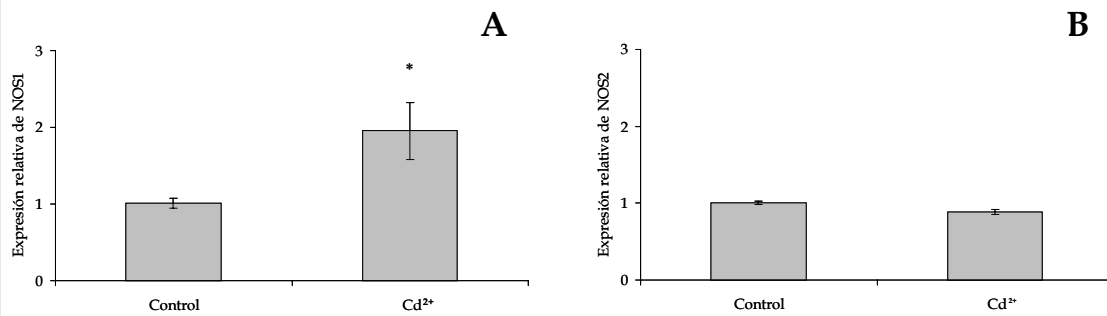
El aumento en los niveles de mRNA de HO-1 causado por el tratamiento con Cd<sup>2+</sup> en el hipotálamo fue de sólo 1.3 veces, mucho menor que el producido en la adenohipófisis (Fig. 46). El ensayo de TBARS no pudo ser realizado en el hipotálamo anterior debido a que su masa es muy pequeña e insuficiente para esta determinación.

El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> incrementó los niveles del mRNA de NOS1 2 veces en el hipotálamo pero, a diferencia de los observado en la adenohipófisis, no afectó los del mRNA de la NOS2 (NOS2) (Fig. 47 A y B ).

En conjunto estos resultados muestran que el Cd<sup>2+</sup> afecta de manera diferencial al eje hipotálamo-hipofisario siendo su efecto mayor en la adenohipófisis.



**Fig. 46.** El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> causa un aumento del contenido de mRNA de HO-1 en el hipotálamo anterior. Las ratas fueron expuestas a 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida durante un mes. Finalizado el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajo el hipotálamo para determinar el contenido de mRNA de de HO-1 por RT-PCR cuantitativa. Los niveles de mRNA fueron normalizado por el contenido de mRNA hallado en los animales controles mediante el método de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Las barras representan la media ± SEM. \*p<0.05 vs. control, n=4. Prueba “t” de Student.



**Fig. 47.** El tratamiento con Cd<sup>2+</sup> afecta el contenido de mRNA de la NOS1 (A) pero no la NOS2 (B) en el hipotálamo anterior. Las ratas fueron expuestas a 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida durante un mes. Finalizado el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajo el hipotálamo para determinar el contenido de mRNA de ambas enzimas por RT-PCR cuantitativa. Los niveles de mRNA fueron normalizado por el contenido de mRNA hallado en los animales controles mediante el método de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Las barras representan la media ± SEM. \*p<0.05 vs. control, n=4. Prueba “t” de Student.

#### 4.2.5 El tratamiento con melatonina reduce los efectos oxidativos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

La melatonina es una neurohormona relacionada con el control de los ritmos circadianos (Hardeland y col., 2003). En dosis farmacológicas, esta molécula de la familia de las indolaminas, ha sido utilizada con éxito como antioxidante en diversos estudios (Guenther y col., 2005; Reiter, 2003; Reiter y col., 2003). Se ha demostrado que la melatonina, además de su capacidad para secuestrar ROS, es capaz de inducir las defensas antioxidantes propias de las células aumentando, por ejemplo, la expresión de la glutatión peroxidasa y de la Cu/Zn superóxido dismutasa (Gomez y col., 2005; Rodriguez y col., 2004). Otra propiedad importante de la melatonina descubierta recientemente es su capacidad de aceptar electrones que se escapan de la ETC y cederlos luego al complejo IV de la misma, actuando como un *buffer* de electrones (Martin y col., 2002). La molécula de melatonina se regenera al entregar al complejo IV el electrón capturado, por lo que la reacción puede hacerse cíclica (Martin y col., 2002).

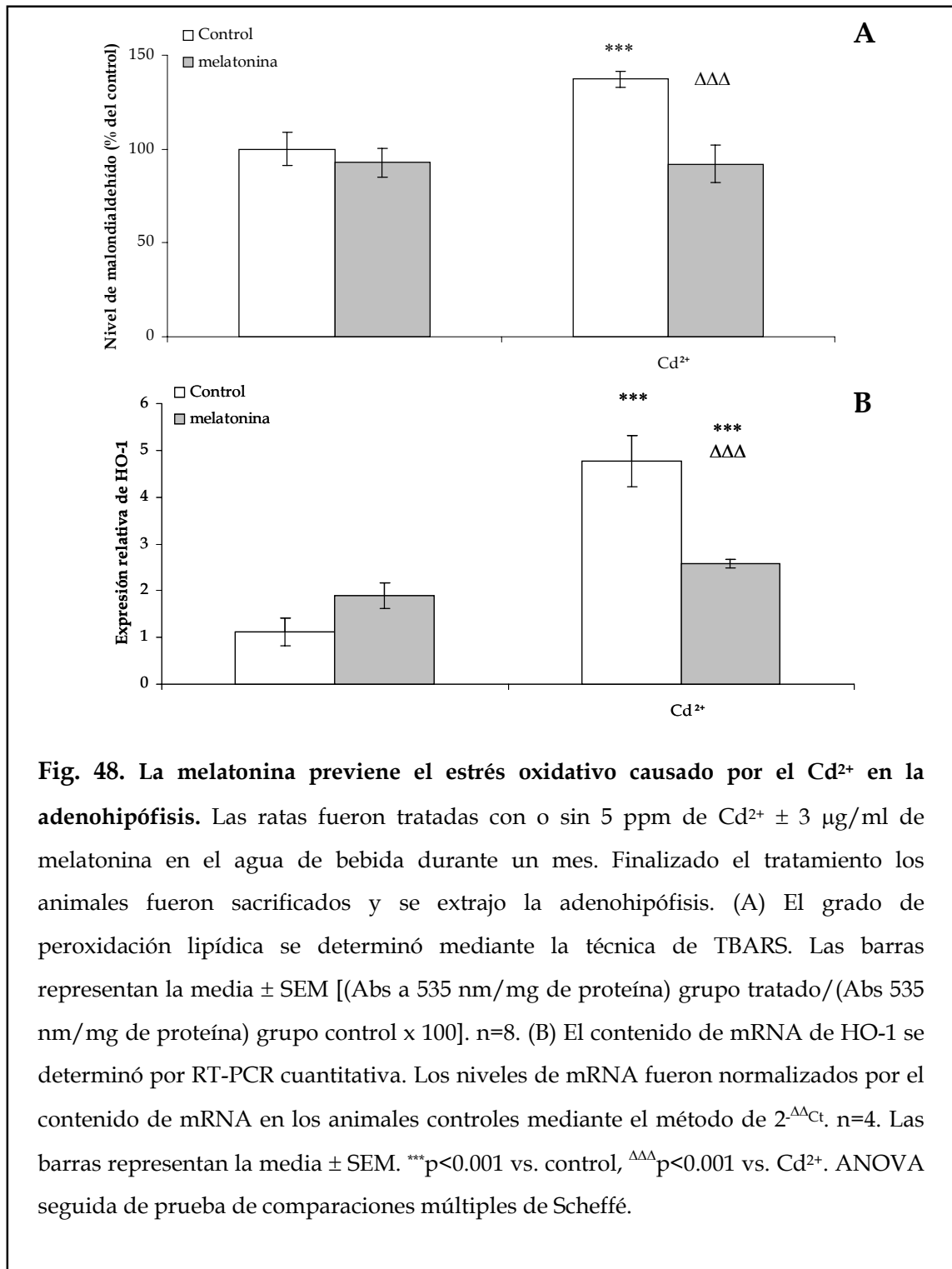
Teniendo en cuenta nuestros resultados *in vitro* y las múltiples propiedades antioxidantes de esta molécula, se evaluó el efecto de la melatonina sobre los parámetros oxidativos alterados por el tratamiento crónico con  $\text{Cd}^{2+}$ . Para ello, un grupo de ratas expuestas crónicamente al  $\text{Cd}^{2+}$  (1 mes, 5 ppm) recibieron melatonina en forma simultánea (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el agua de bebida), mientras que otro grupo de animales recibió sólo melatonina. Se midieron los mismos marcadores de estrés oxidativo que en el apartado anterior y la expresión de NOS en el hipotálamo y la hipófisis.

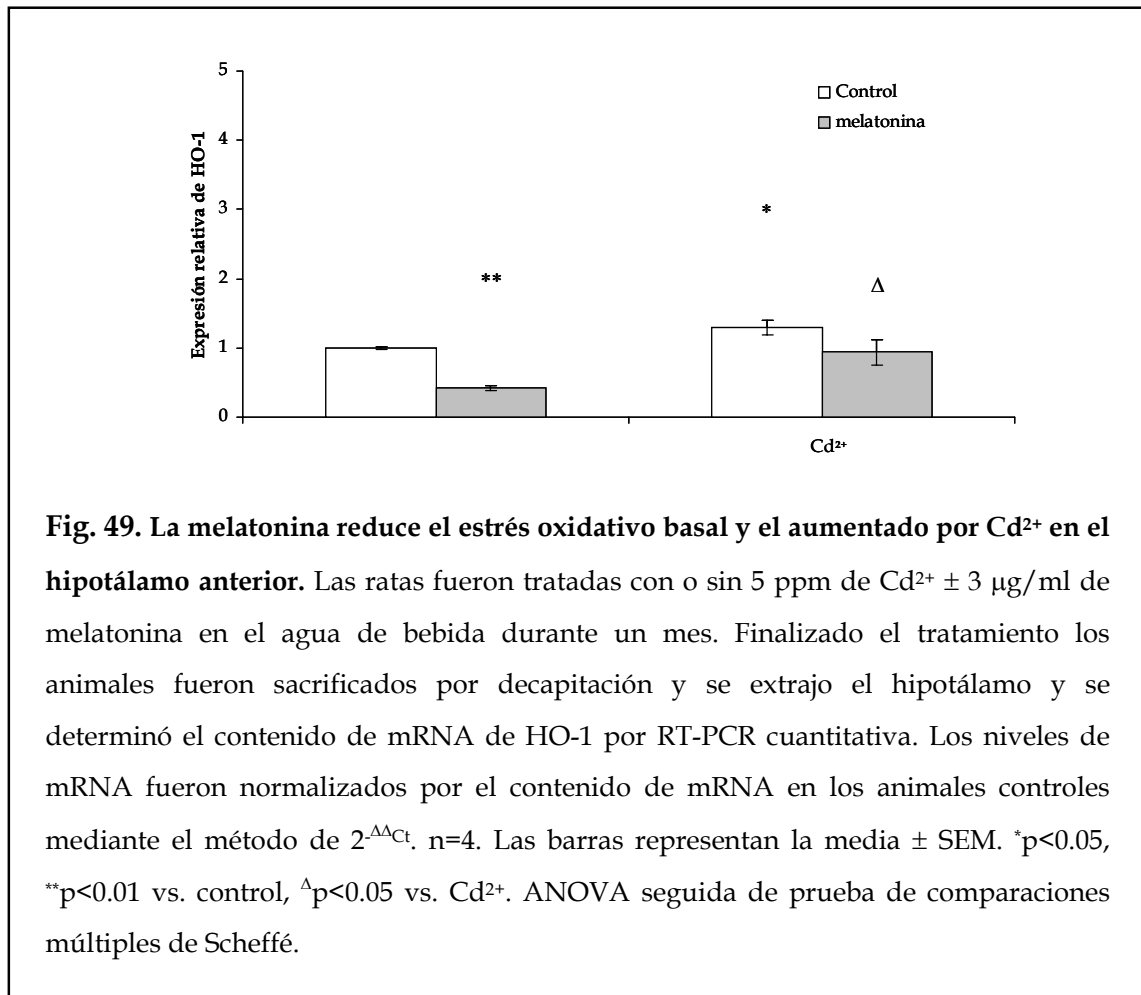
El tratamiento con melatonina redujo el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  en todos los parámetros estudiados.

En la hipófisis la melatonina redujo el aumento inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  en los niveles de peroxidación lipídica así como también en la expresión del mRNA de HO-

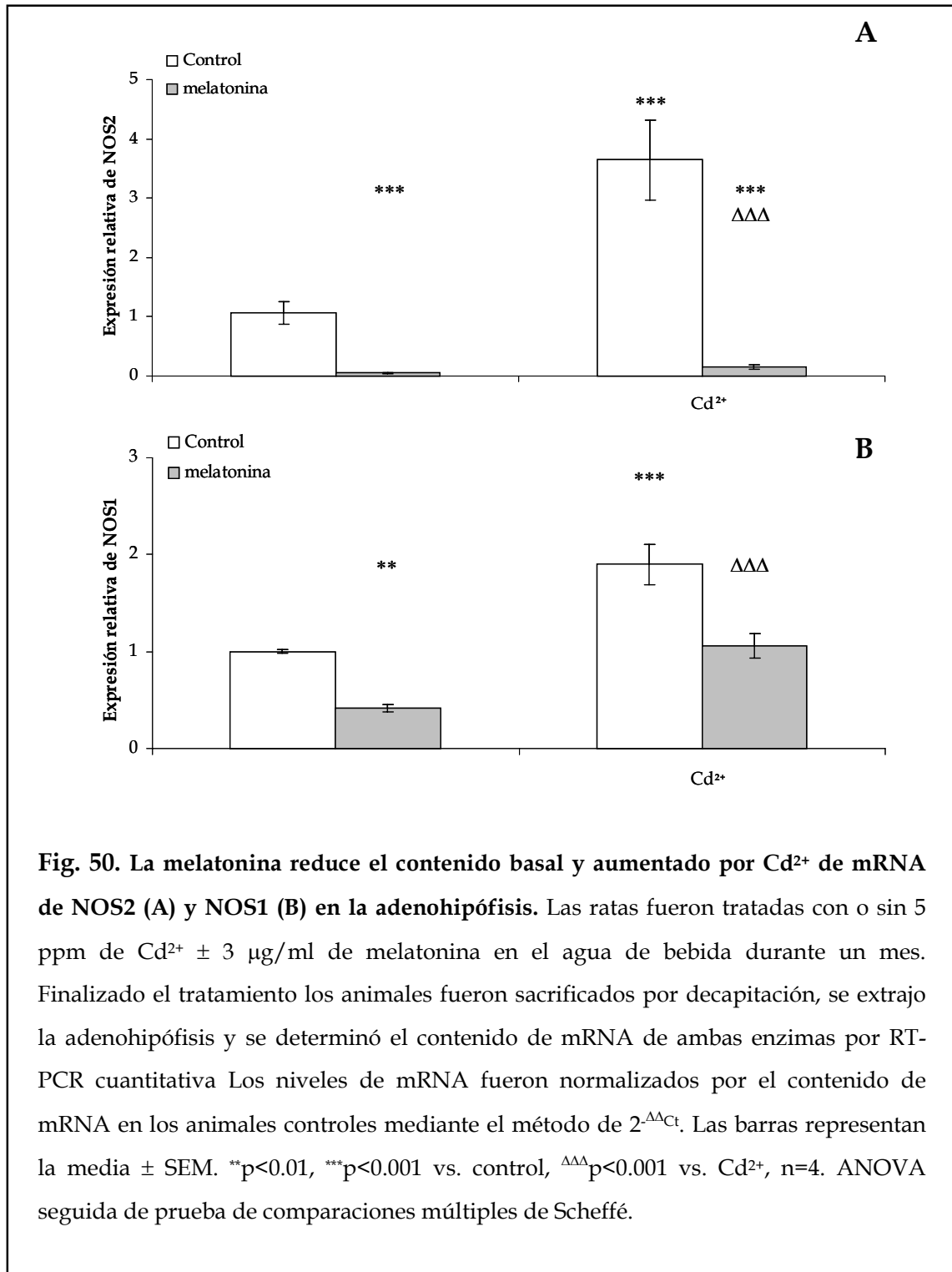
1 sin alterar sus niveles basales (Fig. 48 A y B). En el hipotálamo la melatonina por sí misma disminuyó los niveles basales del mRNA de HO-1, sugiriendo una posible reducción del estrés oxidativo basal (Fig. 49). La melatonina, además, bloqueó el aumento en la expresión de la enzima causado por el Cd<sup>2+</sup>.

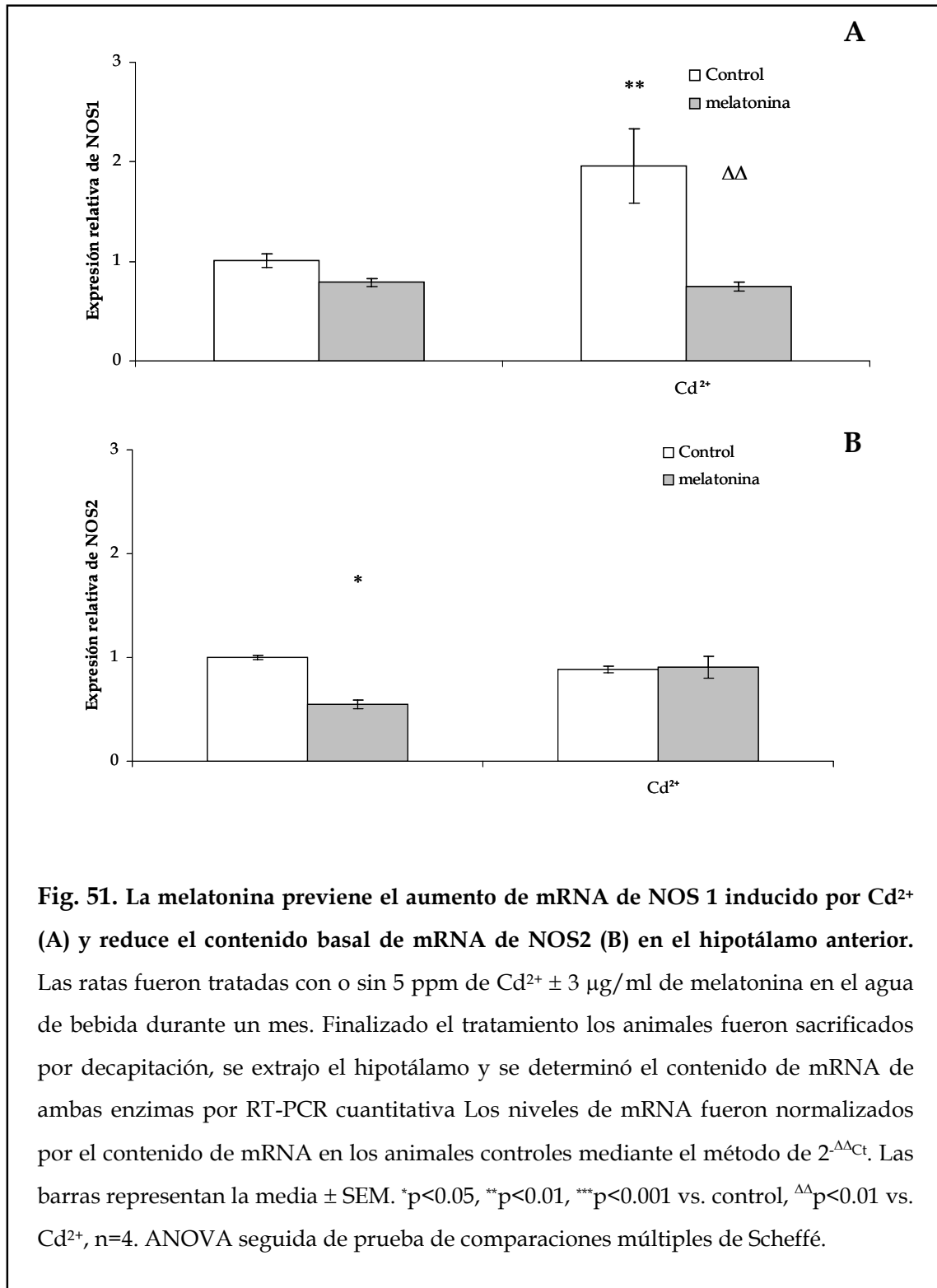




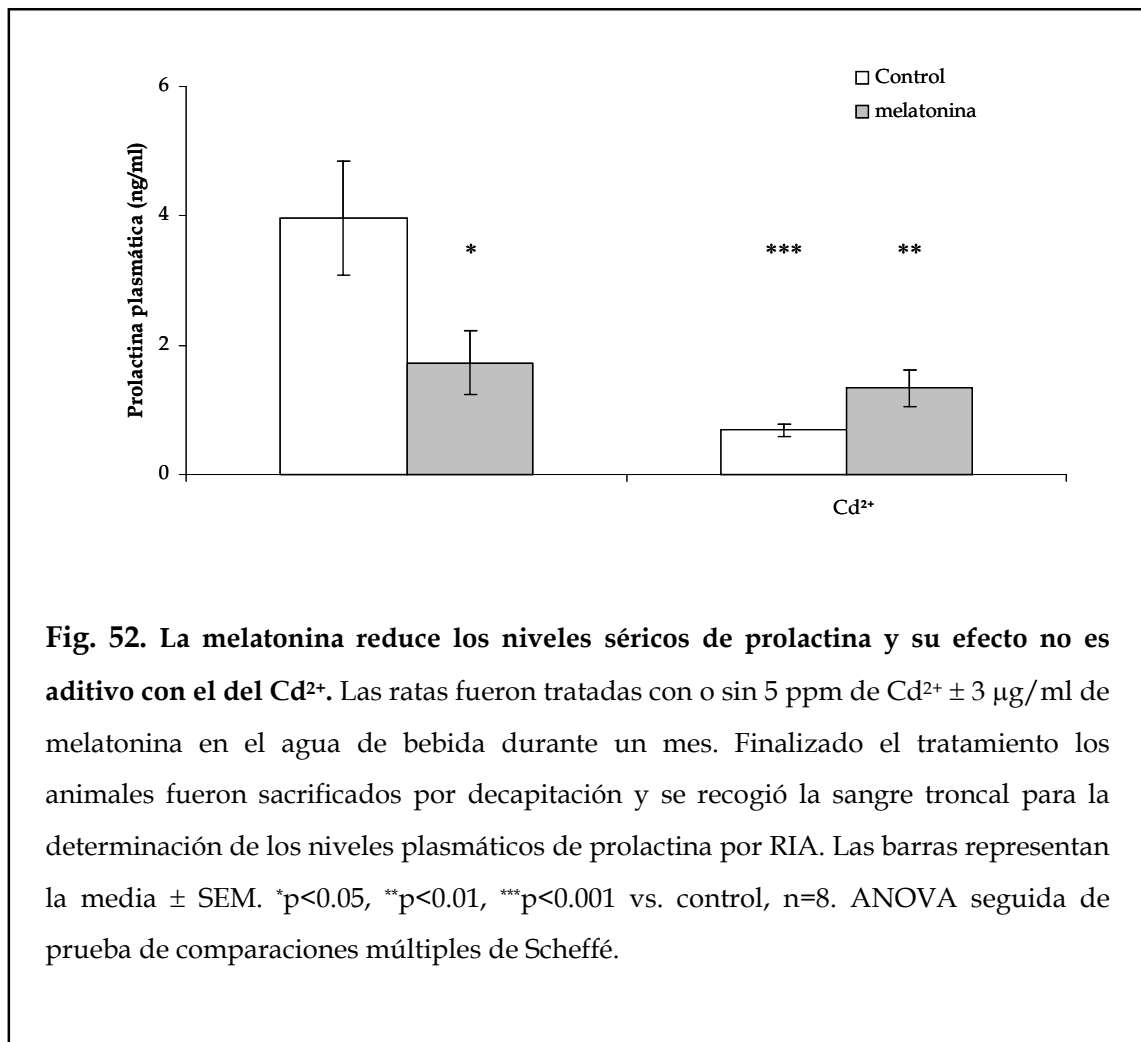


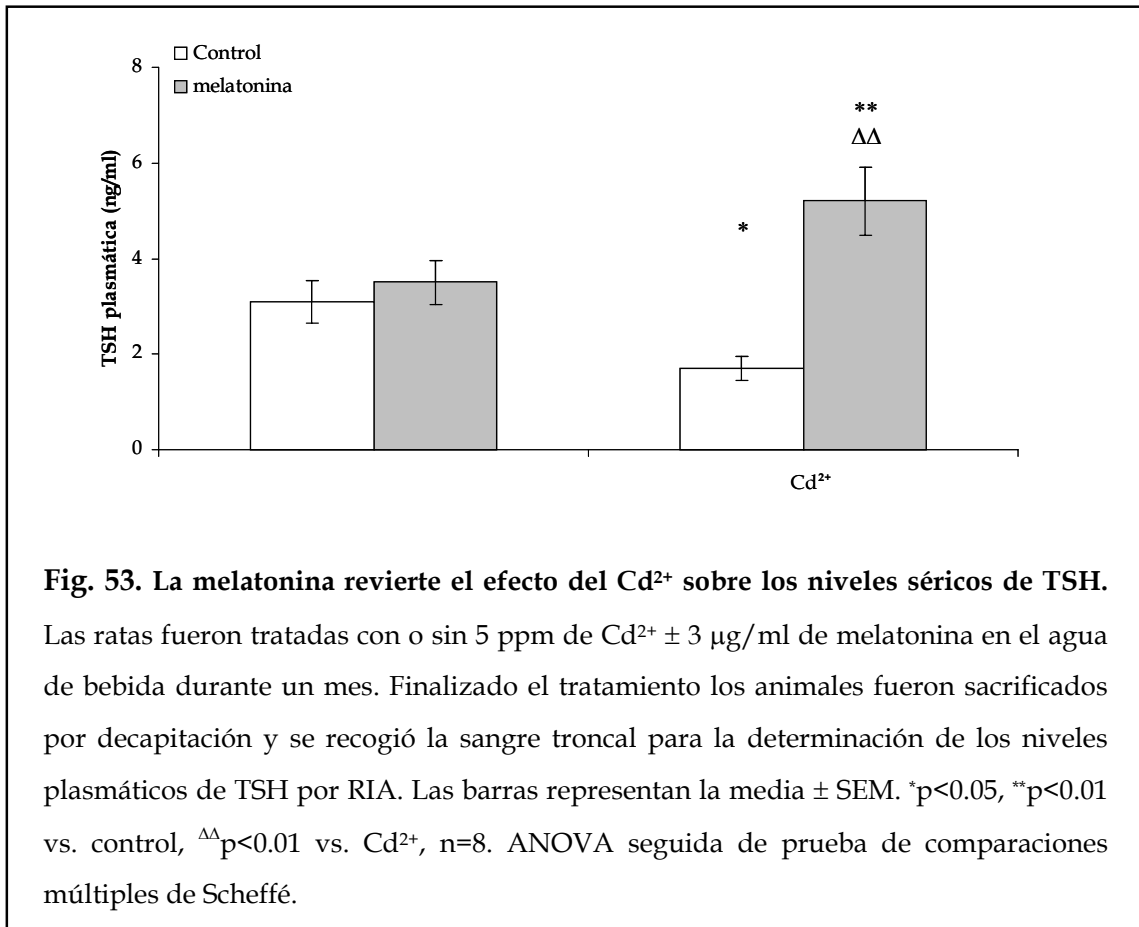
El tratamiento con melatonina tuvo un efecto inhibitorio fuerte sobre la expresión basal de ambas isoformas de la NOS tanto en la adenohipófisis como en el hipotálamo (Fig. 50 y 51). Un efecto similar de esta hormona sobre las NOSs ha sido observado en otros tejidos (Escames y col., 2003a). En la hipófisis el tratamiento con la hormona anuló el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre los niveles de los mRNAs de NOS1 y NOS2 (Fig. 50 A y B). En el hipotálamo anterior, donde el Cd<sup>2+</sup> había afectado sólo la expresión de la NOS1, el tratamiento con melatonina previno el efecto del metal (Fig. 51 A). Nuevamente, el Cd<sup>2+</sup> no afectó la expresión de NOS2 pero impidió el efecto de la melatonina (Fig. 51 B).





Tanto la melatonina como el  $\text{Cd}^{2+}$  redujeron por sí mismo los niveles plasmáticos de prolactina pero sus efectos no fueron aditivos (Fig. 52). Se ha informado previamente que concentraciones de melatonina superiores a las utilizadas por nosotros, pueden tener un efecto inhibitorio sobre la liberación de esta hormona (Griffiths y col. 1987). El tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyó los niveles séricos de TSH mientras que la melatonina no los afectó (Fig. 53). El tratamiento conjunto con  $\text{Cd}^{2+}$  y melatonina aumentó los niveles plasmáticos de TSH (Fig. 53).





## 5 Discusión

La contaminación ambiental con  $\text{Cd}^{2+}$  es un problema a nivel mundial debido a su amplia utilización en la industria, al contenido importante de  $\text{Cd}^{2+}$  en los fertilizantes sintéticos y al hábito del cigarrillo, pero también a la falta de una terapia efectiva para contrarrestar las intoxicaciones con el metal (Shih y col., 2004). En algunos países, la ingesta máxima de  $\text{Cd}^{2+}$  (dentro de la población en general) se encuentra en el mismo orden de magnitud que la ingesta máxima tolerable recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Johnson y col., 2003; Satarug y Moore, 2004). Actualmente se liberan unas 15.000 toneladas de  $\text{Cd}^{2+}$  por año a la atmósfera (McMurray y Tainer, 2003) y la concentración del metal en el suelo se incrementa a una tasa del 0.2% anual (Jarup y col., 1998). Debido a esto se estima que la exposición de los humanos al  $\text{Cd}^{2+}$  aumentará de forma progresiva durante los próximos años (Jarup y col., 1998), lo que podría causar un incremento de los problemas de salud asociados a este metal.

Desde el punto de vista endocrinológico, es conocido que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta los niveles plasmáticos de hormonas hipofisarias tanto en humanos como en animales de laboratorio (Henson y Chedrese, 2004; Jurasovic y col., 2004; Zeng y col., 2004; Zylber-Haran y col., 1982). La regulación de la secreción hormonal de esta glándula depende de la acción concertada de varios factores provenientes tanto del hipotálamo como de tejidos periféricos o de las propias células adenohipofisarias (Page, 1994). Debido a que la autorregulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula periférica es muy precisa, un disruptor que actúe en cualquiera de los niveles extra-hipofisarios podría modificar indirectamente la secreción de las hormonas adenohipofisarias sin afectar de manera directa a la glándula. Hasta el momento no existen datos bibliográficos relativos a un efecto directo del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la adenohipófisis.

Resultados previos de otros grupos demuestran que el  $\text{Cd}^{2+}$  altera los niveles y el metabolismo de distintos factores hipotalámicos, relacionados con el control de la secreción hormonal hipofisaria. Los resultados de esta tesis muestran que el  $\text{Cd}^{2+}$ , además de afectar regiones del hipotálamo que controlan la secreción hormonal de la

adenohipófisis, puede actuar de manera directa sobre la glándula. El metal induce estrés oxidativo en las células de la adenohipófisis, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dicho efecto puede ser evitado mediante el tratamiento con antioxidantes. Utilizando un modelo *in vitro* hemos estudiado algunos de los mecanismos por los cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la viabilidad celular y la liberación hormonal desde la glándula. También hemos demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  tiene un efecto diferencial sobre del eje hipotálamo-hipofisario. De acuerdo a nuestros resultados, la adenohipófisis es aún más sensible que el hígado al estrés oxidativo generado por el metal. Este es un resultado trascendente que indica que a la hora de definir niveles de riesgo con respecto a la exposición al metal, el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la función endocrina debe ser tenido en cuenta.

## **5.1 Efectos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre la viabilidad celular y la liberación hormonal hipofisaria**

Datos previos de otros grupos muestran que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la concentración sérica de prolactina y de otras hormonas adenohipofisarias y también modifica el contenido de distintos neurotransmisores hipotalámicos que regulan la secreción de estas hormonas (Lafuente y Esquifino, 1999; Lafuente y col., 2000b; Lafuente y col., 2001a; Lafuente y col., 2001b). Dichos estudios señalan que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la correlación normal entre ambos parámetros (Lafuente y col., 2002; Lafuente y col., 2005). Esto sugiere que el  $\text{Cd}^{2+}$  produce una disrupción del control normal que el hipotálamo ejerce sobre la hipófisis. Por otro lado, se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  se acumula en la glándula, lo que permitiría un efecto directo sobre la misma (Calderoni y col., 2005; Lafuente y Esquifino, 1999).

En este trabajo demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de inhibir de manera directa la liberación de prolactina. Más aun, el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la viabilidad de las células adenohipofisarias.

En nuestro sistema, a las concentraciones utilizadas, el  $\text{Cd}^{2+}$  tuvo un efecto citotóxico que se hizo evidente recién después de 24 y 48 h de tratamiento, cuando se observa una disminución en la actividad celular. Sin embargo, la acción tóxica del



metal se inicia antes de que se manifieste dicha disminución. Prueba de ello es que las células adenohipofisarias incubadas con  $\text{Cd}^{2+}$  durante sólo 3 ó 6 h presentan una disminución significativa de la actividad celular cuando se evalúa a las 48 h de iniciado el tratamiento. Esto indicaría que entre las 3 y 6 h de exposición al metal se activa algún mecanismo que llevará indefectiblemente a la muerte de las células.

El  $\text{Cd}^{2+}$  tuvo un efecto inhibitorio sobre la liberación de prolactina aun antes de que se apreciara una disminución de la viabilidad celular (figuras 7, 9, 10 y 11). La reducción en la liberación de prolactina podría ser consecuencia de un efecto del metal sobre los propios mecanismos de liberación hormonal o ser un marcador del daño celular causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los lactotrofos. Esta última parece ser la causa principal de la disminución en la acumulación de la hormona en el medio tras períodos prolongados de exposición dado que, como se discutirá más adelante, las drogas que reducen el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  reducen paralelamente los efectos del mismo sobre la liberación de la hormona. En relación con este punto, el efecto inhibitorio del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la liberación de prolactina resultó ser dependiente de la dosis durante las primeras 6 h de tratamiento, alcanzando luego una meseta de un 50% de inhibición aproximadamente para cualquiera de las concentraciones utilizadas (Figuras 7 y 8). Posteriormente, los niveles de prolactina en función de la actividad celular tendieron a alcanzar la misma relación existente en el control (Fig. 11). La independencia del efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la prolactina con respecto a su efecto citotóxico durante los primeros tiempos de incubación, apoyaría la idea de dos mecanismos de acción diferentes para la inhibición de la liberación de la hormona. Durante las primeras horas (1 a 6 h), el  $\text{Cd}^{2+}$  actuaría directamente sobre la maquinaria de liberación hormonal. En tiempos más prolongados, la inhibición dependería de su efecto sobre la viabilidad celular. En los tiempos estudiados, el  $\text{Cd}^{2+}$  no afectó la liberación basal de LH al medio, lo que sugiere un efecto diferencial sobre los lactotrofos.

Como se indicó en la introducción, pueden distinguirse dos grandes tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis (Buja y col., 1993; Malhi y col., 2006). La necrosis es una forma de muerte celular no programada genéticamente que en los tejidos está acompañada por procesos inflamatorios (Buja y col., 1993). En general la necrosis es

disparada por una agresión fuerte sobre las células. La apoptosis, en cambio, es una forma de muerte ordenada y programada genéticamente inducida por un desbalance de la homeostasis celular (Buja y col., 1993; Malhi y col., 2006). Esta última sería la forma en la que el organismo elimina de manera natural las células dañadas, las que ya cumplieron con su ciclo o las que representan un peligro para la homeostasis general (Garrido y Kroemer, 2004; Harada y Grant, 2003). A diferencia de la necrosis, en la apoptosis no ocurre una liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular, por lo que esta forma de muerte celular no causa procesos inflamatorios (Buja y col., 1993).

Existen evidencias de que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede inducir tanto apoptosis como necrosis (Galan y col., 2000; Lag y col., 2002; Oh y col., 2004; Yoshida, 2001), pero los estudios que se inclinan por el segundo tipo de muerte celular suelen provenir de trabajos en los que se utilizaron concentraciones relativamente altas del metal (Yoshida, 2001). Establecer el tipo de muerte que una toxina causa sobre las células de un tejido es muy importante desde el punto de vista de las consecuencias que produce y también para planear un tratamiento. En nuestro caso en particular, intentamos reproducir los efectos de una intoxicación crónica, por lo cual es importante determinar si el tratamiento afecta a las células de manera aguda causando necrosis o si en cambio, causa muerte celular por un proceso controlado y mucho más delicado como la apoptosis.

En este trabajo de tesis demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  induce apoptosis en los cultivos primarios de células adenohipofisarias. Este estudio se realizó mediante el empleo de tres técnicas bien tipificadas que permiten diferenciar entre los dos tipos de muerte celular, el ensayo de fragmentación internucleosomal del DNA (Ladder) (Buja y col., 1993; Steinfeldt y col., 2000), la observación de la morfología nuclear (Robertson y col., 2000) y el estudio del contenido de DNA nuclear en células permeabilizadas (hipodiploidía) (Martini y col., 2000).

## 5.2 Mecanismos de acción del Cd<sup>2+</sup> en la adenohipófisis

### 5.2.1 Activación de caspasas

Las caspasas son proteasas involucradas frecuentemente en el desencadenamiento y la ejecución de la apoptosis (Stennicke y Salvesen, 2000). Generalmente se reconoce a la activación de estas enzimas como un punto sin retorno a partir del cual la célula inicia irremediablemente el proceso de muerte al que fue destinada (Stennicke y Salvesen, 2000). Diversos caminos pueden conducir a la activación de las caspasas, ya sea a través de las vías extrínsecas (activados por receptores de membrana) o intrínsecas (activados por estrés celular) (Garrido y Kroemer, 2004; Fumarola y Guidotti, 2004). Ambos caminos convergen en la activación de la caspasa 3, principal caspasa ejecutora. Si bien la activación de caspasas no es la única vía que puede conducir a la apoptosis (Fombonne y col., 2004; Lemarie y col., 2004; Shih y col., 2004), debido a que estas proteasas están frecuentemente involucradas en el proceso apoptótico, estudiamos el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la actividad de las mismas.

El Cd<sup>2+</sup> causó la activación de las caspasas 9 y 3. Dicho efecto fue dependiente del tiempo de exposición al metal, observándose un aumento significativo en la actividad de ambas enzimas, a partir de las 6 h de tratamiento. Este tiempo coincide con aquel en el que el efecto deletéreo del metal sobre las células se vuelve irreversible.

La caspasa 9 es una de las caspasas iniciadoras responsables de activación de la caspasa 3 (Stennicke y Salvesen, 2000). Conociendo la secuencia temporal de activación de estas enzimas se esperaría que el incremento en la actividad de caspasa 9 precediera al de caspasa 3, hecho que no hemos observado. Es posible que la técnica empleada no sea lo suficientemente sensible para resolver diferencias temporales en nuestro sistema, considerando que el tiempo que dista entre una y otra activación podría ser muy corto. Alternativamente, la caspasa 3 podría ser activada por algún mecanismo independiente de caspasa 9 (Nakagawa y Yuan, 2000;

Stennicke y Salvesen, 2000). La participación de las caspasas en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  fue confirmada mediante el uso de inhibidores específicos.

Los inhibidores de caspasas redujeron sólo parcialmente el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ . Esto podría deberse a que las concentraciones de los mismos no hayan sido suficientes para inhibir de forma completa a las caspasas o a la participación de un mecanismo alternativo para la ejecución de la apoptosis inducida por el metal. No se pudo ensayar concentraciones mayores de los inhibidores, debido a que estas resultaron tóxicas por sí mismas. Con respecto a posibles mecanismos alternativos, diversos estudios indican que la apoptosis puede desencadenarse en forma independiente o sólo parcialmente dependiente de caspasas en otros tejidos. En este sentido la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF) desde la mitocondria o la activación de la quinasa N-terminal de c-jun (JNK), pueden causar apoptosis aún en presencia de inhibidores de caspasas (Harada y Grant, 2003; Shrivastava y col., 2004; Susin y col., 1999). Por otro lado, también se ha visto que las calpaínas, de las que se hablará más adelante, pueden mediar procesos de muerte celular programada en forma independiente de caspasas.

Es interesante remarcar que los inhibidores de caspasas no sólo redujeron parcialmente el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la viabilidad celular sino también sobre la liberación de prolactina. Este paralelismo entre ambas respuestas confirmaría nuestra hipótesis de que al menos en parte, la disminución de la liberación de prolactina se debe al efecto citotóxico del metal.

## 5.2.2 Efecto sobre la membrana mitocondria

Como se mencionó anteriormente existen dos vías principales por las cuales se puede iniciar la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Fumarola y Guidotti, 2004; Garrido y Kroemer, 2004). En la vía extrínseca el evento que inicia la apoptosis es la unión de una molécula, tal como una citoquina, a su receptor de membrana. En la vía intrínseca, es un agente químico o físico que altera la homeostasis celular afectando, por ejemplo, el estado redox de la célula o la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fumarola y Guidotti, 2004). Más allá del evento

que señale el comienzo de la apoptosis el final será el mismo: el desensamblaje ordenado de la célula.

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un agente tóxico que puede afectar la homeostasis celular, por lo que la vía más probable por la que induciría apoptosis sería la vía intrínseca. No obstante esto, Li y col. han informado que el  $\text{Cd}^{2+}$  podría aumentar la expresión de receptores de muerte y de sus ligandos, por lo que también sería capaz de activar la vía apoptótica extrínseca (Li y col., 2000). Las mitocondrias son importantes sensores de estrés intracelular y están comúnmente involucradas en la vía apoptótica intrínseca (Fumarola y Guidotti, 2004; Harada y Grant, 2003; Susin y col., 1999). Un daño en la membrana mitocondrial facilita la liberación de citocromo c, el cual junto con otros factores, permite la activación de la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3 (Garrido y Kroemer, 2004; Harada y Grant, 2003; Stennicke y Salvesen, 2000; Susin y col., 1999). La disminución del potencial de la membrana mitocondrial (PMM) suele utilizarse como un índice de fallas en la integridad de la misma ya que puede correlacionarse con un aumento de su permeabilidad.

Nuestros resultados muestran que la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  reduce el PMM, efecto que se hizo evidente luego de 3 h de tratamiento y fue muy marcado a partir de las 6 h.

La ciclosporina A es una molécula que al interactuar con la membrana mitocondrial permite mantener su integridad frente a la agresión de diversos factores (Nicolli y col., 1996). Esta molécula previno el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el PMM y redujo parcialmente la apoptosis inducida por el metal.

Estos resultados demuestran que el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  depende, al menos parcialmente, de un daño a la membrana mitocondrial.

### 5.2.3 Papel del estrés oxidativo

Diversos estudios demuestran que el estrés oxidativo es uno de los eventos que puede desencadenar la activación de la vía apoptótica intrínseca. Un aumento en las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno (ROS) puede dañar a las

mitocondrias, lo que conduce a la activación de las caspasas (Castedo y col., 2002; Vercesi y col., 1997; Le y col., 2005).

El  $\text{Cd}^{2+}$  no es un metal redox activo y es incapaz de generar ROS mediante reacciones cíclicas del tipo de Fenton (Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005). Sin embargo, numerosos estudios señalan que el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  puede generar estrés oxidativo de forma indirecta por diferentes mecanismos (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Merzenich y col., 2001; Pourahmad y col., 2003; Shih y col., 2004; Stohs y Bagchi, 1995; Valko y col., 2005).

En nuestro sistema el  $\text{Cd}^{2+}$  causó un aumento de los niveles celulares de ROS durante las primeras horas de tratamiento.

Los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$ , tanto sobre la liberación de prolactina como sobre la viabilidad celular, fueron reducidos por el tratamiento con dos antioxidantes no relacionados estructuralmente, la N-acetilcisteína y el TROLOX. El tratamiento con TROLOX también previno el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel del PMM. Ambos resultados señalan la participación de las ROS en la acción del metal. Además, permiten postular que el daño causado a las mitocondrias por el  $\text{Cd}^{2+}$  estaría mediado por un aumento en los niveles de ROS.

En forma inesperada, el ácido ascórbico (vitamina C) un antioxidante utilizado con frecuencia, aumentó el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ . Esta acción aparentemente paradójica del ácido ascórbico podría explicarse por el desplazamiento por el  $\text{Cd}^{2+}$  del  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  unidos a proteínas (Beyersmann y Hechtenberg, 1997). El ácido ascórbico tiene la propiedad de descomponer, en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$  libres, productos de la peroxidación lipídica en compuestos altamente tóxicos como el 4-hidroxi-2-nonenal, que podrían aumentar la citotoxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$  (Waisberg y col., 2003). Apoyando nuestro resultado, recientemente Watjen y col. informaron que la coexposición de células C6 de glioma a  $\text{Cd}^{2+}$  y ácido ascórbico aumenta el efecto citotóxico del metal (Watjen y Beyersmann, 2004).

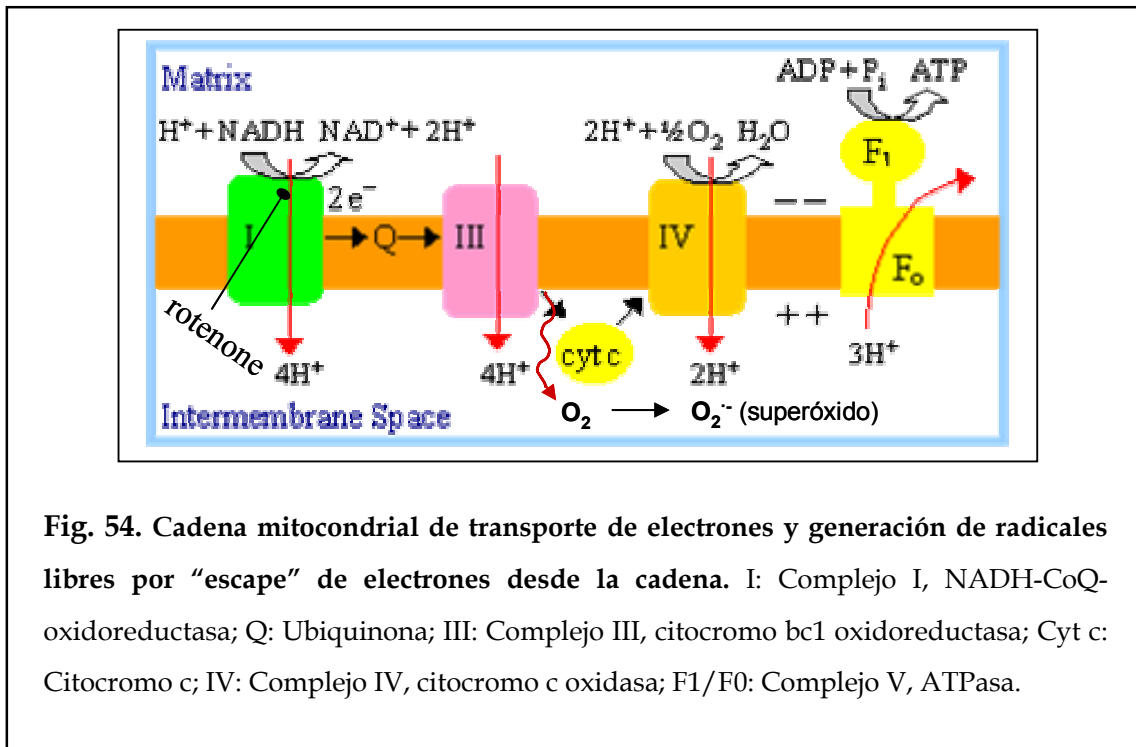
El incremento en la producción de ROS ocurrió durante las 3 primeras h de tratamiento, mientras que exposiciones más prolongadas al metal tuvieron un efecto opuesto. Tras 6 h de tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  se produjo una disminución de los niveles intracelulares de ROS en comparación con los del control. Este resultado se debió, en

efecto a una reducción en los niveles de ROS en las células dado que para las mediciones se seleccionaron solo células viables, evitando de esta manera incluir en el análisis células muertas que no producen ROS. Es importante señalar la coincidencia temporal (6 h aproximadamente) que existe entre la disminución en los niveles de ROS, la modificación del PMM y el momento en el que las células son comprometidas a seguir la vía apoptótica.

Los resultados presentados hasta aquí indican que las ROS participan en el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ . De este modo se propone la siguiente secuencia de eventos que conducen a la apoptosis durante el tratamiento con el metal: Aumento en la producción de ROS => daño a la membrana de la mitocondria => activación de caspasas => muerte celular.

Las mitocondrias son las principales fuentes de ROS en las células (Brunk y Terman, 2002). La mayoría de los radicales libres se generan por fallas en la CTE en el complejo III (ubiquinona-citocromo bc1 oxidoreductasa) (Fig. 54) (Armstrong y col., 2004; Wang y col., 2004). Las moléculas que afectan la eficiencia de la CTE pueden aumentar la producción de ROS (Bai y Cederbaum, 2001; Paradies y col., 2000). Recientemente se determinó en mitocondrias aisladas, que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede aumentar la tasa de generación de ROS al afectar al complejo III (Wang y col., 2004). Teniendo en cuenta este antecedente y la participación de las ROS en el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la membrana mitocondrial y la inducción de apoptosis, estudiamos si el metal podría aumentar la producción de ROS a través de una alteración de la CTE.

La rotenona es un inhibidor de la NADH oxidasa (Complejo I), que evita la entrada de electrones a la CTE y de esta forma impide la generación de ROS (Fig. 54) (Pearlstein y col., 2002). Este inhibidor redujo el aumento en los niveles de ROS generados por el  $\text{Cd}^{2+}$ . Más aún, la rotenona redujo levemente la toxicidad del metal. Estos resultados indican que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la generación de ROS por un mecanismo que involucra a la CTE.



**Fig. 54. Cadena mitocondrial de transporte de electrones y generación de radicales libres por “escape” de electrones desde la cadena.** I: Complejo I, NADH-CoQ-oxidoreductasa; Q: Ubiquinona; III: Complejo III, citocromo bc1 oxidoreductasa; Cyt c: Citocromo c; IV: Complejo IV, citocromo c oxidasa; F1/F0: Complejo V, ATPasa.

Los cambios en el PMM observados en presencia de  $Cd^{2+}$  pueden ser atribuidos al efecto directo del metal sobre la CTE, que es la responsable de la generación y mantenimiento del potencial. Por otro lado, el  $Cd^{2+}$  podría reducir el PMM de manera indirecta, a través del aumento en los niveles de las ROS. Estas últimas pueden atacar a las proteínas que forman los complejos de la CTE y alterar la fluidez de la membrana por oxidación de sus lípidos (Gabbita y col., 1998; Le y col., 2005), hechos que afectarían el PMM. En relación con esto, el aumento inicial en los niveles de ROS podría ser la causa determinante de su disminución posterior a partir de las 6 h. La disminución se debería a una retroalimentación negativa causada por el efecto deletéreo de las ROS sobre la funcionalidad de los complejos de la CTE que las producen. Esta observación está apoyada por el hecho de que el momento en el que se observa una disminución en los niveles de ROS, coincide con el momento en el que se aprecia una clara disminución en la integridad de la membrana mitocondrial.



## 5.2.4 Papel del calcio

Actualmente existen numerosas evidencias de que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar tanto la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  como los caminos de señalización, mediados por este segundo mensajero (Shen y col., 2001b; Misra y col., 2002; Molnar y col., 2004; Romare y Lundholm, 1999). Esta acción se debe principalmente a la gran semejanza química entre ambos elementos en cuanto a carga y radio atómico (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; The Merck Index, 1976;). El  $\text{Cd}^{2+}$  bloquea los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje e impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al citoplasma, y por ello es utilizado frecuentemente en electrofisiología para inhibir las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Giles y col., 1983; Thevenod y col., 2000; Wright y col., 1996). Sin embargo, el metal también impide la extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol ya que inhibe tanto a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) como a la de la membrana plasmática (PMCA); de este modo exposiciones prolongadas al  $\text{Cd}^{2+}$  pueden incrementar los niveles citosólicos de este catión (Beyersmann y Hechtenberg, 1997; Mould y Dulhunty, 2000; Verboost y col., 1988). También se sabe que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede aumentar los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  por otras vías, por ejemplo, al estimular la vía del inositol trifosfato (Smith y col., 1989).

Aumentos prolongados en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son capaces de inducir apoptosis por diferentes vías (Chan y col., 2002; Nakagawa y col., 2000). Se ha demostrado que en algunos tipos celulares la acción citotóxica del  $\text{Cd}^{2+}$  puede ser mediada por su efecto sobre la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Lemarie y col., 2004; Li y col., 2000; Shen y col., 2001a). Debido a la importancia de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en un tejido secretor como la adenohipófisis, estudiamos los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre este segundo mensajero, así como también su posible participación en la inducción de la apoptosis.

Los registros se realizaron utilizando la sonda Ca-green. La posible interferencia del  $\text{Cd}^{2+}$  con esta sonda no había sido estudiada antes, por ello las determinaciones se realizaron en presencia del quelante específico para  $\text{Cd}^{2+}$ , TPEN. Este quelante tiene una especificidad  $10^{12}$  veces mayor por el  $\text{Cd}^{2+}$  que por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Hinkle y col., 1992). Nuestros experimentos realizados con TPEN y thapsigargina en ausencia de  $\text{Cd}^{2+}$  muestran que este quelante específico de metales de transición no

afecta las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  es necesario utilizar el TPEN para no sobrevalorar los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la sonda Ca-green reconoce al primero inespecíficamente.

En las células adenohipofisarias en cultivo, el  $\text{Cd}^{2+}$  causó una leve disminución de los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  luego de 3 h de tratamiento. Este efecto podría ser una consecuencia de un bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. En cambio partir de las 6 h, el  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El aumento en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  tuvo efectos deletéreos para las células, ya que el quelante específico para  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM redujo parcialmente la citotoxicidad del metal. Los niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pueden afectar la integridad de la mitocondria e inducir apoptosis. En nuestro caso, el inhibidor del transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , rojo de rutenio, redujo levemente el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  a una concentración relativamente alta (Dorta y col., 2003; Jambrina y col., 2003; Lemarie y col., 2004). A esta concentración, el rojo de rutenio aumentó por sí mismo la actividad celular en la misma proporción en que redujo el efecto del metal. Teniendo en cuenta estos resultados y la secuencia temporal del aumento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  y la disminución del PMM, podemos suponer que el  $\text{Ca}^{2+}$  no es el responsable primario del efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre las mitocondrias. Por otro lado, ha sido descripto que las mitocondrias pueden liberar  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol cuando la integridad de sus membranas se ve comprometida (Chakraborti y col., 1999). De esta manera la elevación en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de las 6 h de exposición al metal también podría ser consecuencia del efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre las mitocondrias. Además, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial hacia el citosol ha sido involucrado en la inducción de muerte celular (Chakraborti y col., 1999).

Las calpaínas son proteasas con funciones similares a las caspasas que se activan por elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (Carafoli y Molinari, 1998; Nakagawa y Yuan, 2000). En nuestro estudio, el inhibidor de calpaínas tipo I redujo parcialmente la citotoxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$ , involucrando a estas proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  en el efecto citotóxico del metal.

Las calpaínas pueden inducir apoptosis de forma tanto dependiente como independiente de las caspasas (Carafoli y Molinari, 1998; Nakagawa y Yuan, 2000). El hecho de que el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  sea reducido parcialmente mediante el uso de BAPTA-AM y del inhibidor de calpaínas, así como también mediante el uso de ciclosporina A y del inhibidor de caspasa 3, permiten sugerir la existencia de al menos dos vías paralelas mediante las cuales el metal podría afectar la viabilidad celular adenohipofisaria. Una involucraría a la vía mitocondrial y otra a la vía del retículo endoplásmico. Alternativamente, podrían existir poblaciones celulares con sensibilidades diferentes para ambas vías. Esta posibilidad, así como también la interacción entre ambas vías apoptóticas o la participación de las ROS en el aumento de los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían plantearse en estudios futuros.

### 5.2.5 Papel del óxido nítrico.

El NO es un importante regulador de la liberación hormonal adenohipofisaria tanto a nivel hipotalámico como intrahipofisario que podría intervenir en la remodelación de las poblaciones celulares de la glándula (Brann y col., 1997; Rivier, 2001; McCann y col., 1996; McCann y col., 2000). Se postula además que podría intervenir en la remodelación de las poblaciones celulares adenohipofisarias (Candolfi y col., 2004; Velardez y col., 2004;). El NO puede actuar como una molécula citotóxica o citoprotectora dependiendo de su concentración y del sistema estudiado (Bogdan, 2001; Contestabile y col., 2003; Leong y col., 2002; Liu y Stamler, 1999).

El  $\text{Cd}^{2+}$  puede modificar la producción de NO, aumentándola o disminuyéndola dependiendo del tiempo de exposición, la concentración y el tejido (Tian y Lawrence, 1996; Ramirez y col., 1999; Chao y Kuo, 2003). Hasta hoy existen evidencias que sustentan dos hipótesis contrapuestas:

1. Que el NO potencia (o incluso media) el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  (Misra y col., 1996).
2. Que el NO tiene una acción protectora contra el efecto citotóxico del metal (Demontis y col., 1998; Liu y col., 2004).

Dado el significativo papel regulador que el NO juega en la hipófisis, estudiamos el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la producción de este radical libre y segundo mensajero.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó la producción de NO en las células adenohipofisarias en cultivo y este incremento tuvo un efecto protector sobre las mismas. El bloqueo de la síntesis de NO mediante el uso de inhibidores de las NOS acentuó el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  tanto sobre el PMM como sobre la viabilidad celular. En cambio, elevando la síntesis de NO endógeno (mediante la incubación con L-arginina) o exponiendo a las células a dosis bajas de NO exógeno (DETA/NO 0.1 mM) se previno tanto la apoptosis como la inhibición de la liberación de prolactina inducidos por el metal. La concentración de NO liberada por el DETA/NO 0.1 mM es de aproximadamente 0.2-0.3  $\mu\text{M}$  en el estado estacionario (Beltran y col., 2002; Liu y col., 1998). Apoyando nuestros resultados, numerosos estudios muestran que concentraciones bajas de NO pueden cumplir un papel citoprotector (Dawn y Bolli, 2002; Liu y Stamler, 1999; Andoh y col., 2002; Andoh y col., 2000). Por otro lado, en la cercanía de macrófagos activados, donde el NO cumpliría una función citotóxica, el gas puede alcanzar una concentración de entre 5 y 10  $\mu\text{M}$  (Koppenol, 1999). En este sentido, en estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que la exposición de las células adenohipofisarias a DETANONOato en una concentración 1 mM induce apoptosis en las células adenohipofisarias.

Diversas fuentes señalan que el NO puede tener funciones antioxidantes (Wink y Mitchell, 1998). En concordancia con estos informes y en nuestras condiciones el NO redujo el estrés oxidativo generado por el  $\text{Cd}^{2+}$ . Si bien el NO por sí mismo causó un leve aumento de la peroxidación lipídica y la producción de ROS, disminuyó el incremento causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  en ambos parámetros. Apoyando la idea de una función antioxidante para el NO, el DETANONOato, al igual que el TROLOX, un antioxidante derivado de la vitamina E, también redujo el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el PMM. En relación con esto, se ha demostrado que el NO puede actuar como un antioxidante reaccionando con radicales alquilo y alcoxilo y terminando las cadenas de peroxidación lipídica (Wink y Mitchell, 1998). Además, el NO puede formar complejos con metales redox activos como el  $\text{Fe}^{2+}$ , desplazados por el  $\text{Cd}^{2+}$  de

las proteínas, evitando la generación de radicales libres por reacciones cíclicas de Fenton (Robb y Connor, 2002).

En nuestro sistema, el NO revirtió parcialmente la activación de caspasa 3 causada por el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$ . Li y col. demostraron que el NO puede inhibir de manera directa a las caspasas mediante la S-nitrosilación de la cisteína en el sitio activo de estas enzimas (Li y col., 1997). Apoyando esta hipótesis, en nuestro caso el NO por sí mismo redujo la actividad basal de la caspasa 3. Sin descartar este mecanismo, teniendo en cuenta la secuencia de eventos presentada más arriba y debido a que el NO evitó tanto el aumento en los niveles de ROS como la disrupción de la membrana mitocondrial, nuestros resultados sugieren que el NO puede cumplir una función protectora en pasos previos a la activación de las caspasas, debido posiblemente a su acción como antioxidante.

Varios estudios han sugerido que el NO podría participar del fenómeno de *precondicionamiento* (Andoh y col., 2000; Andoh y col., 2002; Dawn y Bolli, 2002). Durante este proceso, concentraciones bajas de NO causan un aumento de las defensas propias de las células de manera que, cuando éstas son expuestas a una agresión mayor, están mejor preparadas para responder. La vía NO-guanilato ciclasa soluble (SGc)-cGMP ha sido involucrada en algunos casos de pre-condicionamiento (Andoh y col., 2002). En nuestro sistema, esta vía no parece estar comprometida en el efecto citoprotector del NO. Ni el 8-Br-cGMP, un análogo poco hidrolizable del cGMP, ni el BAY-41.2272, un agonista de la SGc (Stasch y col., 2001), fueron capaces de reducir el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ . Además, el LY83583, un inhibidor de la SGc (Schmidt y col., 1985) tampoco modificó el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la viabilidad celular. Estos resultados, sumados a los presentados previamente, apoyan nuestra hipótesis de que el efecto protector del NO se debe principalmente a su acción como antioxidante.

El NO también puede alterar el balance redox de las células y causar por ello la activación de distintos factores de transcripción, como NF $\kappa$ B, que llevarían a un aumento de las defensas antioxidantes (Droge, 2002; Yi y col., 2002; Mattson, 1997). En nuestro caso la modificación del balance redox por el NO se ve sustentada por el

hecho de que éste, por sí solo, causó un aumento leve de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo (peroxidación lipídica y niveles de ROS).

Otro mecanismo por el cual el NO, a la concentración utilizada, podría reducir la producción de ROS es a través de su unión al complejo I de la CTE inhibiéndolo irreversiblemente (Burwell y col., 2006; Poderoso y col., 1996;). En este caso el NO podría ejercer un efecto similar al de la rotenona (Burwell y col., 2006). Esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de que el tratamiento con DETA/NO redujo levemente el PMM. Sin embargo, el NO por sí mismo causó un leve aumento en los niveles de ROS y de la peroxidación lipídica. Este resultado podría explicarse por varias razones, entre ellas que el NO también puede inhibir al complejo III de la CTE, elevando la producción de ROS (Poderoso y col., 1996). La cinética de inhibición por NO del complejo III es más rápida que la del complejo I, por lo que en un primer momento el NO podría aumentar la producción de ROS y luego disminuirla (Poderoso y col., 1996). Otra forma por la cual el NO podría incrementar los niveles de ROS es a través de la inhibición de la catalasa, hemoproteína responsable de la detoxificación del  $H_2O_2$  (Cooper, 1999).

Hasta aquí se han presentado varias formas por las cuales el NO podría proteger a las células del efecto citotóxico del  $Cd^{2+}$ . Ninguna de estas posibilidades son mutuamente excluyentes, por lo que el NO podría ejercer su efecto protector a través de estos mecanismos en forma simultánea.

La discrepancia entre nuestros resultados (y los de otros autores) y los de aquellos que postulan un efecto deletéreo del NO en los tratamientos con  $Cd^{2+}$ , muy se deba probablemente a diferencias en los dadores de NO utilizados. Las reacciones del NO con distintas moléculas dependen no solo de la concentración nominal del dador utilizado sino también de la cinética de liberación de NO y la concentración efectiva alcanzada por el gas (Feelisch, 1998). Un dador de vida media corta permitirá alcanzar, durante un tiempo breve, concentraciones de NO en el medio más altas que uno de vida media larga, a pesar de que ambos sean utilizados a la misma concentración (Feelisch, 1998). De esta manera, dadores con vida media diferente conducirán a distintos tipos de reacciones y a la activación de otros procesos independientemente de que se encuentren a la misma concentración

nominal. Si se acepta que concentraciones elevadas de NO conducen a la muerte celular, mientras que concentraciones bajas pueden tener una actividad citoprotectora contra algunas agresiones, entonces el efecto de distintos dadores sobre la acción del  $\text{Cd}^{2+}$  dependerá de la concentración efectiva de NO que éstos liberen al medio. independientemente de los distintos dadores que se puedan utilizar, la confirmación de que el NO tiene un efecto citoprotector en nuestro sistema, está sustentada porque la inhibición de su síntesis aumenta el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que su activación lo reduce.

La importancia del NO en el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  se ve acentuada debido a que el metal estimula la síntesis del gas. Sin embargo, la observación de que el NO reduce el estrés oxidativo y de que puede hacerlo de diferentes maneras es de gran interés por sí misma. Estos datos incorporan una nueva función para el NO en la adenohipófisis. Sumado a su función como modulador de la liberación hormonal y su papel putativo en el control de las poblaciones celulares de la glándula, el NO tendría un efecto citoprotector relacionado con su actividad antioxidante. De esta manera el NO también podría proteger a las células adenohipofisarias de otros agentes que generan estrés oxidativo.

Hasta aquí se han estudiado algunos de los mecanismos intracelulares por los cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar la viabilidad celular adenohipofisaria. En la figura 55 los resultados discutidos en estas secciones se han esquematizado para brindar un resumen de lo expuesto.

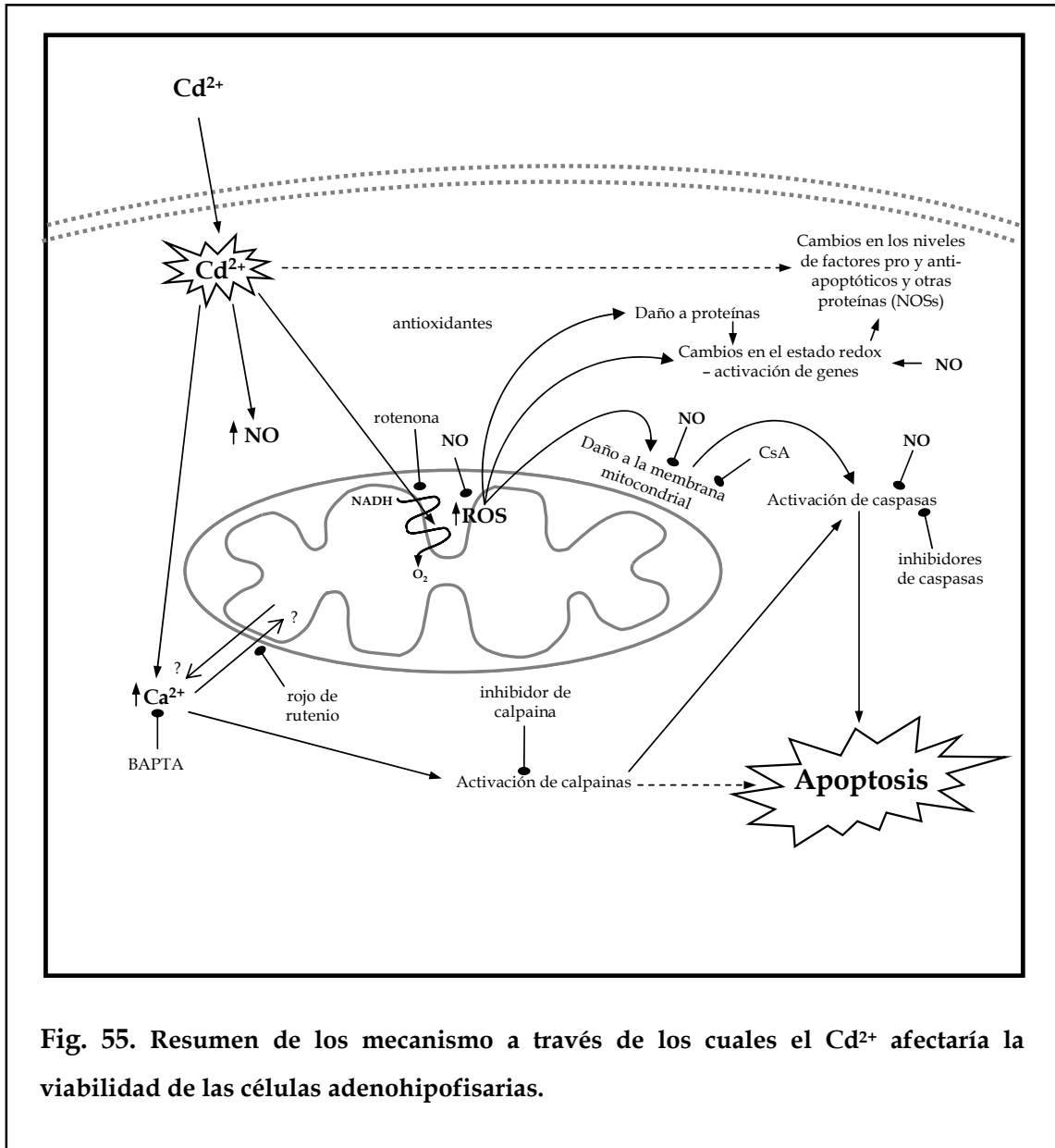


Fig. 55. Resumen de los mecanismo a través de los cuales el Cd<sup>2+</sup> afectaría la viabilidad de las células adenohipofisarias.



### 5.3 Efectos *in vivo* de la exposición al Cd<sup>2+</sup> en el eje hipotálamo-hipofisario

Hasta el momento existen evidencias de que el Cd<sup>2+</sup> afecta la regulación normal que el hipotálamo ejerce sobre la hipófisis, así como también de un posible efecto directo del metal sobre la glándula (Lafuente y col., 2002; Lafuente y Esquifino, 1999; Calderoni y col., 2005). En el trabajo presentado hasta aquí se han decripto los efectos directos del Cd<sup>2+</sup> sobre células adenohipofisarias en cultivo y varios de los mecanismos involucrados en su acción. Este sistema *in vitro* es un modelo ideal para efectuar estudios mecanísticos. Sin embargo, para poder realizar inferencias de importancia biomédica, es importante validar el modelo *in vitro* mediante experimentos *in vivo*. En esta segunda etapa se estudió el efecto del Cd<sup>2+</sup> *in vivo* a nivel de la hipófisis y el hipotálamo, así como también sobre las concentraciones plasmáticas de algunas hormonas hipofisarias, en animales expuestos al metal en forma crónica, a través del agua de bebida durante 30 días.

Como se informó en la introducción, la OMS ha establecido como límite máximo tolerable para la ingesta diaria 1 µg de Cd<sup>2+</sup> (WHO, 1995). Varios estudios, incluyendo los informes de la OMS, han señalado preocupación por los niveles actuales de incorporación de Cd<sup>2+</sup> por parte de los humanos, ya que, para la demarcación de límites en la ingesta de compuestos tóxicos, suele recomendarse un factor de incertidumbre de no menos de 100 veces con respecto a la menor concentración que se conoce puede afectar la salud (Speijers, 1999; WHO, 2004).

Muchos de los estudios realizados en animales de laboratorio para determinar los efectos del Cd<sup>2+</sup> han empleado dosis en el orden de los mg, utilizando como vía de administración una o múltiples inyecciones del metal, lo que permite estudiar su efecto agudo (Lafuente y col., 2000a; Lafuente y col., 2000b; Liu y col., 2004; Okamoto y col., 2001; Waalkes, 2003). En nuestro estudio en cambio, tratando de imitar el tipo de exposición más frecuente en los humanos, hemos realizado un tratamiento prolongado, administrando el Cd<sup>2+</sup> a concentraciones bajas en el agua de bebida.

La selección de la concentración de Cd<sup>2+</sup> utilizada en nuestros estudios se basó en datos bibliográficos. La dosis de 5 ppm de Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida es la menor

concentración en la que se han estudiado y visto cambios en los niveles séricos de las hormonas hipofisarias estudiadas. Teniendo en cuenta el volumen de agua consumida por los animales, la ingesta diaria de  $\text{Cd}^{2+}$  en nuestros experimentos fue de aproximadamente 6.25  $\mu\text{g}$ . Si bien esta ingesta es mayor al máximo recomendado por la OMS, debe tenerse en cuenta que este máximo fue calculado para una ingesta diaria continua durante unos 50 años. Estudios previos en ratas han demostrado que el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  en el agua de bebida a una concentración de 50 ppm durante un mes causa una reducción de la tasa de crecimiento (Lafuente y col., 2001a), mientras que 15 ppm causan un aumento de la peroxidación lipídica en el hígado (Koyu y col., 2006). Durante nuestro tratamiento ninguno de estos parámetros se vio afectado, lo que permite suponer que nuestras condiciones experimentales no fueron muy severas. La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , sin embargo, redujo los niveles séricos de prolactina y TSH, lo que demuestra que este tratamiento es suficiente para causar alteraciones en el sistema endocrino.

### 5.3.1 Efectos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre la adenohipófisis.

El tratamiento con 5 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  en el agua de bebida produjo estrés oxidativo en las adenohipófisis de las ratas. Esto fue determinado mediante dos marcadores clásicos de estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y la expresión de la enzima inducible hemo oxigenasa-1 (HO-1), regulada en gran medida por el estado redox de las células (Morse y Choi, 2002; Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  elevó la peroxidación lipídica e incrementó en casi 5 veces el contenido de mRNA de la HO-1 en la glándula.

Tanto los riñones como el hígado han sido considerados tradicionalmente como los blancos preferenciales del  $\text{Cd}^{2+}$ . Estos órganos han sido utilizados como patrón para definir concentraciones tóxicas del metal (Satarug y col., 2003). Numerosos informes indican que el  $\text{Cd}^{2+}$  causa estrés oxidativo en el hígado (Koyu y col., 2006; Liu y col., 2004; Liu y col., 2002). Por ello utilizamos al hígado como un control positivo. De forma sorprendente, los parámetros relacionados con el estrés oxidativo que aumentaron en la hipófisis no se modificaron en el hígado. Teniendo

en cuenta que entre el 50 y el 85% del  $\text{Cd}^{2+}$  ingerido se deposita en el hígado y los riñones (WHO, 1995), esto podría ser indicativo de que la glándula hipofisaria es más sensible que el hígado al estrés oxidativo generado por el metal. Si bien la expresión basal de HO-1 en este órgano es bastante alta, lo que podría enmascarar aumentos leves, se acepta generalmente que la técnica de PCR a tiempo real es suficientemente sensible para detectar cambios pequeños en la expresión génica (Livak y Schmittgen, 2001). Este resultado es sumamente importante porque muestra que el sistema endocrino puede ser más sensible al  $\text{Cd}^{2+}$  que aquellos órganos normalmente utilizados para estudiar niveles de riesgo del metal en la población. En el mismo sentido, un estudio epidemiológico realizado por Viaene y col. (Viaene y col., 2000) en 2000, en Alemania, determinó que trabajadores expuestos a  $\text{Cd}^{2+}$  en el ambiente laboral pueden presentar problemas de comportamiento y de habilidad motriz sin mostrar signos de daño a nivel renal. Estas evidencias señalan que en el desarrollo de futuras normativas que regulen el nivel de ingesta máxima tolerable de  $\text{Cd}^{2+}$ , deberían tenerse en cuenta algunos parámetros neuroendocrinos además de los efectos clásicos del metal sobre el hígado y el riñón.

Como se mencionara, el NO es un importante regulador neuroendocrino. Previamente vimos que el  $\text{Cd}^{2+}$  eleva la producción de este gas en células adenohipofisarias en cultivo. Teniendo en cuenta el importante papel que el NO parece tener en la protección de las células adenohipofisarias contra el metal, además de su acción sobre la liberación hormonal, estudiamos el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la maquinaria de síntesis de este segundo mensajero. Para ello se midieron los niveles de mRNA de una isoforma constitutiva de NOS (NOS neuronal, NOS1) y de la isoforma inducible de la enzima (NOS inducible, NOS2).

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó los niveles de mRNA de ambas isoformas de NOS en la adenohipófisis. La inducción de la expresión fue mayor para la NOS2 que para la NOS1 (3.6 y 1.9 veces más mRNA que en los controles, respectivamente). El incremento causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  en la expresión de estas enzimas podría explicarse a través de distintos mecanismos. Teniendo en cuenta los resultados presentados anteriormente, dos de los mecanismos más probables serían: *a)* la generación de estrés oxidativo *b)* el aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es bien sabido

que el estrés oxidativo puede causar la inducción de la NOS2 (Adcock y col., 1994; Hur y col., 1999; Kuo y col., 1997). Por otro lado, se ha observado que cambios en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden llevar tanto a la inducción de la NOS2 como de la NOS1 (Arbones y col., 1996; Korhonen y col., 2001; Taguchi y col., 1996).

Como se discutió previamente, el NO posee una dualidad en lo que respecta a la muerte-supervivencia de las células. Concentraciones submicromolares de NO suelen tener un efecto citoprotector mientras que las concentraciones micromolares, que pueden encontrarse en sitios de inflamación, son citotóxicas ( Bogdan, 2001; Contestabile y col., 2003; Leong y col., 2002; Liu y Stamler, 1999). La NOS2 sintetiza NO en forma continua e independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a una tasa de producción mucho mayor que la NOS1 (Wink y Mitchell, 1998). Esta enzima ha sido asociada generalmente a procesos inflamatorios y a la generación de estrés oxidativo en varios sistemas (Kubes y McCafferty, 2000). Sin embargo se ha informado que en ciertas condiciones, la inhibición de la NOS2 puede potenciar el efecto citotóxico de moléculas tales como las citoquinas o el glutamato en la adenohipófisis (Caruso y col., 2004; Candolfi y col., 2004), lo cual sugiere que esta isoforma podría tener un papel citoprotector. En nuestro sistema, el  $\text{Cd}^{2+}$  causó una mayor inducción de la NOS2 que de la NOS1. Considerando los resultados obtenidos *in vitro*, en los cuales el NO produjo un efecto citoprotector frente al tratamiento con el metal, en nuestro caso la inducción de la NOS2 también podría cumplir, *in vivo*, un papel protector en lugar de citotóxico. Sin embargo se requiere profundizar estos estudios para establecer cuál es el papel de la NOS2 en el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  así como también por qué se produce una inducción diferencial entre ambas isoformas.

La HO-1 forma parte de la maquinaria antioxidante de las células y cumple un papel citoprotector en varios tejidos (Morse y Choi, 2002; Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). El NO, a través de cambios en el estado redox de las células, puede afectar la expresión de la HO-1 (Morse y Choi, 2002). Más aún, en células de glioma murino se ha determinado que el NO reduce parcialmente el efecto citotóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  a través de la inducción de HO-1 (Srisook y col., 2005). En nuestras condiciones, el  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó la expresión de HO-1 y dado que también incrementó la expresión de las NOS, la posible interacción NO/HO-1 en la adenohipófisis es un tema de

potencial importancia. Si la HO-1 contribuye de alguna manera a disminuir el estrés oxidativo en nuestro sistema, el NO podría cumplir un papel protector frente al  $\text{Cd}^{2+}$  mediante la inducción de esta enzima. Esto añadiría otro mecanismo citoprotector del NO a los ya mencionados en la sección 5.2.5.

### 5.3.2 Efectos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre el hipotálamo.

Se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  reduce los niveles hipotalámicos de diferentes neurotransmisores tales como: dopamina, serotonina (Lafuente y col., 2005), norepinefrina (Lafuente y col., 2004), glutamato, GABA y taurina (Lafuente y Esquifino, 2002). El metal también disminuye el metabolismo hipotalámico de la dopamina (Lafuente y col., 2002). Al igual que en la adenohipófisis, su mecanismo de acción permanece desconocido. Debido a que el  $\text{Cd}^{2+}$  se acumula en este tejido (Lafuente y col., 2001a), el metal podría ejercer una acción tóxica sobre el mismo.

En nuestro modelo experimental se observó que el  $\text{Cd}^{2+}$  produjo sólo una leve inducción de la HO-1 en el hipotálamo basal (1.3 veces más mRNA que en el control) y no afectó la expresión de NOS2; en cambio el contenido de mRNA para NOS1 aumentaron en 1.9 veces con respecto al control. Estos resultados muestran una acción diferencial del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el eje hipotálamo-hipofisario. El menor efecto sobre la expresión de HO-1 en el hipotálamo con respecto a la adenohipófisis podría deberse a que el  $\text{Cd}^{2+}$  se acumula menos en este tejido que en la glándula (Lafuente y col., 2001a), por lo que su efecto podría ser más leve, o a una mayor resistencia del hipotálamo al estrés oxidativo. Con respecto a la NOS2, se mencionó previamente que esta enzima puede ser inducida por estrés oxidativo (Adcock y col., 1994; Hur y col., 1999; Kuo y col., 1997). Es posible que el menor grado de estrés oxidativo generado en el hipotálamo no sea suficiente para aumentar la expresión de la NOS2 como ocurre en la adenohipófisis. Por otro lado, independientemente de su efecto sobre el estado redox, también es posible que la acumulación del metal sea insuficiente para causar la inducción de la enzima en el hipotálamo por otros mecanismos, por ejemplo a través de cambios en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Además, dado la importancia del papel del NO a nivel del sistema nervioso central es posible que su síntesis esté regulada más estrictamente en este tejido.

### 5.3.3 Efectos del $\text{Cd}^{2+}$ sobre los niveles séricos de hormonas adenohipofisarias.

Si bien hace varios años se conoce que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la liberación de distintas hormonas adenohipofisarias, su mecanismo de acción permanece sin ser establecido. Estudios poblacionales en humanos han demostrado que los niveles plasmáticos de  $\text{Cd}^{2+}$  y prolactina poseen una correlación negativa (de Burbure y col., 2006; Jurasovic y col., 2004). En humanos, el efecto del metal sobre otras hormonas adenohipofisarias como LH, FSH y TSH (así como también sobre hormonas controladas por éstas, como testosterona, estrógenos y tiroxina) es más controvertido. Mientras que algunos estudios poblacionales informan que el  $\text{Cd}^{2+}$  altera los niveles de estas hormonas, otros no detectan efecto alguno del metal (Andrzejak y col., 1996; Henson y Chedrese, 2004; Mason, 1990; Osius y col., 1999; Zeng y col., 2004). A pesar de esto, bajo condiciones controladas de laboratorio, se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede afectar la liberación de todas las hormonas hipofisarias (Ghosh y Bhattacharya, 1992; Gupta y Kar, 1999; Lafuente y col., 2003a).

En nuestras condiciones experimentales el  $\text{Cd}^{2+}$  redujo los niveles plasmáticos de prolactina y TSH, sin afectar los de LH.

Lafuente y col observaron previamente que el  $\text{Cd}^{2+}$  no afectó los niveles de LH en condiciones experimentales similares a las nuestras (Lafuente y col., 2003a). Sin embargo, en el mismo estudio, los autores informan que el tratamiento con 5 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta los niveles de prolactina y TSH, lo que contrasta con lo presentado en nuestro trabajo.

Nuestros resultados *in vivo* sobre los valores de prolactina y LH coinciden con nuestros resultados *in vitro* y con lo observado en humanos (Jurasovic y col., 2004; Mason, 1990; Zeng y col., 2004). Las diferencias entre nuestros resultados y los presentados por otros autores que utilizaron la misma dosis de  $\text{Cd}^{2+}$ , podrían deberse

a diferencias en la respuesta a la intoxicación entre distintas cepas de ratas dado que ellos utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawly mientras que nosotros usamos la cepa Wistar. En la literatura pueden encontrarse numerosas referencias a la respuesta diferencial de distintas cepas de animales de laboratorio a un mismo tratamiento (Lopez-Varela y col., 2004; Moncek y col., 2001; Philibin y col., 2005).

En este trabajo demostramos que el  $Cd^{2+}$ , además de generar estrés oxidativo, lo cual podría afectar la liberación hormonal por causar la muerte de las células secretoras y/o dañar su maquinaria de liberación hormonal, también produce un incremento en la expresión de las NOS y la producción de NO.

La dopamina y el GABA hipotalámicos son los principales reguladores inhibitorios de la liberación de prolactina. El GABA hipotalámico muestra un efecto dual sobre la liberación de prolactina. El GABA, liberado desde la eminencia media a través de la vía túbero-hipofisaria, inhibe en forma directa la liberación de la hormona, aunque que a nivel intrahipotalámico, por inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas, la estimula indirectamente (Vijayan y McCann, 1978; McCann y col., 1984; McCann y Rettori, 1986). El NO es un importante segundo mensajero y neurotransmisor en el hipotálamo (Stern, 2004). En particular, a nivel hipotalámico el NO estimula la liberación de prolactina por la hipófisis (McCann y col., 1996). El  $Cd^{2+}$  disminuye los niveles de dopamina y GABA en el hipotálamo (Lafuente y Esquifino, 2002). Si el efecto del  $Cd^{2+}$  sobre la liberación hormonal estuviera mediado sólo por su acción a nivel del hipotálamo, la reducción en el contenido de neurotransmisores inhibitorios, sumada al aumento hipotalámico de la NOS1 observado por nosotros, debería causar un incremento en los niveles plasmáticos de prolactina. Sin embargo el  $Cd^{2+}$  redujo los niveles de la hormona, lo que resalta el hecho de que este metal parece actuar como un disruptor del control hipotalámico de la liberación de hormonas hipofisarias y predominando su efecto a nivel de la adenohipófisis.

Como se describió en la introducción, el NO tiene efectos opuestos sobre el hipotálamo y la hipófisis con respecto a la liberación hormonal. En el hipotálamo la función del NO es principalmente estimuladora, mientras que a nivel de la glándula juega un papel principalmente inhibitorio (Rivier, 2001). Esta podría ser una de las

razones por las cuales la inhibición sistémica de las NOS causa un aumento y no una reducción en la liberación de las hormonas de la glándula (Rivier, 2001). Se ha observado que el NO *in vitro*, a través de la vía cGMP/proteína quinasa G, inhibe la liberación de prolactina en la adenohipófisis (Duvilanski y col., 1996; Velardez y col., 2000). Además, el NO afecta diversos mecanismos involucrados en la regulación intrahipofisaria de la liberación hormonal. Entre ellos, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Duvilanski y col., 1998; Velardez y col., 2003), la actividad de la LOX (Velardez y col., 2001), y la producción de inosítoles fosfato (Velardez y col., 2003). El  $\text{Cd}^{2+}$ , a través de un aumento intrahipofisario en la producción de NO, podría cambiar los patrones secretorios de la adenohipófisis independientemente de su efecto a nivel hipotalámico, lo que podría explicar su acción disruptora.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el producto la HO-1 podría tener, *in vivo*, un papel estimulador de la liberación de prolactina y LH (Alexandreaanu y Lawson, 2003). Los efectos del aumento causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  en la expresión de las NOS y la HO-1 serían, por lo tanto, similares y necesitan ser estudiados con mayor profundidad a la luz de un posible efecto bifásico del metal en los niveles de prolactina.

El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  no puede despreciarse a la hora de elaborar una hipótesis sobre el mecanismo por el cual este metal afecta la liberación hormonal. En este trabajo demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en células adenohipofisarias en cultivo. Además, este aumento es en parte responsable de la acción citotóxica del metal. Las mayores concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  podría producir por sí misma un aumento en la liberación hormonal o sensibilizar a las células de la glándula para su respuesta a los factores estimuladores de la liberación. En nuestro caso, los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular serían enmascarados por una acción tóxica del metal que causaría la muerte de las células secretoras o afectaría su maquinaria de secreción hormonal. De esta manera, aunque ocurriera un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, no se observaría un aumento de la liberación hormonal.

Tampoco puede descartarse un efecto proestrogénico del  $\text{Cd}^{2+}$ , a concentraciones bajas, como ha sido descrito en otros tejidos (Stoica y col., 2000). Esto



añadiría otro factor de complejidad al análisis de la relación dosis-efecto del metal. Un efecto pro-estrogénico puro del  $\text{Cd}^{2+}$  determinaría un aumento en la liberación de prolactina. Contrastando con informes previos, Silva y col. han recientemente observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede poseer también propiedades anti-estrogénicas (Silva y col., 2006). Este tipo de acción pro y anti-estrogénica ha sido observado también con el tamoxifeno (MacNab y col., 1984). En este caso, actuando como un antagonista estrogénico, el  $\text{Cd}^{2+}$  podría reducir la liberación de prolactina lo que justificaría nuestro resultado. Sin embargo, la complejidad de la relación entre los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el receptor de estrógenos, el estrés oxidativo y los niveles de NO y CO conjuntamente con sus efectos diferenciales a nivel de la hipófisis y el hipotálamo hacen difícil la interpretación de los resultados.

Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue evaluar la validez de un modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos de acción del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el sistema endocrino. En este trabajo hemos obtenido resultados similares trabajando tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que permite sugerir que el modelo de células adenohipofisarias en cultivo, es un buen sistema para estudiar los mecanismos de acción del  $\text{Cd}^{2+}$ . Es importante remarcar que en cultivo utilizamos la mínima concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  que nos permitió detectar un efecto durante los tiempos empleados, por lo que podría suponerse que esta concentración no es muy elevada y podría semejar el efecto de un tratamiento crónico *in vivo*. Correlacionar los niveles plasmáticos de  $\text{Cd}^{2+}$  con la concentración efectiva utilizada *in vitro* es muy difícil y tal vez infructuoso, ya que el metal se acumula en los tejidos mientras que su concentración plasmática permanece habitualmente muy baja (Gulden y Seibert, 2003; WHO, 1995). La dosis de  $\text{Cd}^{2+}$  administrado en el agua fue equivalente a 27,3  $\mu\text{M}$ , aunque debe tenerse en cuenta que sólo se incorpora aproximadamente un 5% del metal presente en la bebida o la comida (WHO, 1995). Por otro lado, no es posible realizar tratamientos más prolongados en cultivos primarios, debido a que las células secretoras de la adenohipófisis tienden a morir y ser reemplazadas por fibroblastos. Por lo expuesto más arriba, a pesar de la bondad del modelo *in vitro*, deberá profundizarse el estudio de los efectos del metal en el modelo *in vivo*, utilizando dosis diferentes de  $\text{Cd}^{2+}$  para esclarecer algunas de las incógnitas expuestas durante esta sección.

### 5.3.4 Efecto protector de la melatonina contra el estrés oxidativo causado por el Cd<sup>2+</sup>

La melatonina es una neurohormona relacionada con el control de los ritmos circadianos (Reiter, 2003). En dosis farmacológicas, esta molécula de la familia de las indolaminas, ha sido utilizada con éxito como antioxidante en muchos estudios (Guenther y col., 2005; Reiter, 2003; Reiter y col., 2003). La base del poder antioxidante de la melatonina radica en que no sólo reacciona con radicales libres como muchos antioxidantes sino, que además, es un potente inductor de las defensas antioxidantes propias del organismo (Gomez y col., 2005; Srinivasan y col., 2005). Se comprobó que la melatonina es capaz de inducir, entre otras, la expresión de glutatión peroxidasa y de Cu/Zn superóxido dismutasa (Gomez y col., 2005; Srinivasan y col., 2005). Además estudios recientes señalan que aún concentraciones fisiológicas de esta molécula (nanomolares) son capaces de mejorar la eficiencia de la CTE reduciendo la producción de ROS al actuar como un *buffer* que acepta los electrones que escapan del complejo III y los restituye al complejo IV (Citocromo C oxidasa) generando una reacción cíclica (Escames y col., 2003; Martin y col., 2002;). Esta última función de la melatonina resulta muy interesante para nuestro sistema, en el cual proponemos un papel central de la mitocondria en la producción de ROS inducida por el Cd<sup>2+</sup>.

Previamente comprobamos que el ácido ascórbico, *in vitro*, podía tener efectos contraproducentes al combinarse con el Cd<sup>2+</sup>. Dado los efectos negativos que podrían presentar tratamientos prolongados tanto con NAC como con vitamina E (Brumas y col., 1992; Chen y Wells, 2006; Graat y col., 2002; Marchioli y col., 2006; Nkondjock y col., 2003) y teniendo en cuenta las múltiples ventajas de la melatonina mencionadas anteriormente, decidimos utilizar esta molécula como antioxidante para tratar a los animales expuestos al Cd<sup>2+</sup>.

La melatonina redujo el estrés oxidativo generado por la exposición al Cd<sup>2+</sup> en la adenohipófisis y el hipotálamo, confirmando el papel antioxidante de esta

molécula. Recientemente, Chwelatiuk y col. demostraron que la melatonina reduce la acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en tejido hepático, renal e intestinal (Chwelatiuk y col., 2006), por lo que no podemos actualmente descartar la posibilidad de que la disminución vista en los marcadores de estrés oxidativo se deba también a una disminución de los niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  en la adenohipófisis y el hipotálamo además de al efecto antioxidante propio de la melatonina. Sin embargo, debido a los efectos conjuntos de la melatonina y el  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la expresión de las NOS y la liberación hormonal en ambos tejidos, parece existir una interacción entre los dos agentes que va más allá del simple secuestro del metal.

La melatonina abolió el aumento en la expresión de las NOS inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$ , aunque tuvo efecto por sí misma en la expresión de estas enzimas. Existen informes previos de una acción inhibitoria de la melatonina sobre la expresión de NOS en algunos tejidos (Hardeland y col., 2003), pero su efecto sobre la adenohipófisis y el hipotálamo anterior no había sido caracterizado. En la adenohipófisis la melatonina redujo los niveles de mRNA de la NOS inflamatoria a niveles prácticamente indetectables, tanto en condiciones basales como aumentadas por  $\text{Cd}^{2+}$ . Asimismo la melatonina redujo la expresión basal de NOS1, evitando el aumento causado por el metal. En el hipotálamo la acción de la melatonina por sí misma sobre la expresión de las NOS fue similar a la observada en la adenohipófisis. Además, la melatonina bloqueó el aumento causado por el  $\text{Cd}^{2+}$  en los niveles de mRNA para la NOS neuronal. Previamente sugerimos un papel protector del NO frente a la agresión causada por el  $\text{Cd}^{2+}$ . A pesar de que la melatonina redujo la expresión de las NOS, lo que provocaría una disminución en la producción del gas y por lo tanto reduciría la protección ejercida por el mismo, previno también y de manera efectiva el estrés oxidativo generado por el  $\text{Cd}^{2+}$ , compensando de este modo la falta de protección brindada por el NO.

La melatonina también afectó por sí misma los niveles plasmáticos de prolactina, reduciendo la concentración de la hormona. La dosis de melatonina usada en nuestros experimentos permite alcanzar una concentración sérica de la indolamina unas 5-6 veces superior a la fisiológica (Cardinali y col., 2004). Debido a la forma en la que fue suministrada la droga, un 90-95% de la misma se incorporó

durante la etapa nocturna, coincidiendo con el momento natural de mayor concentración plasmática de melatonina (Rasmussen y col., 1999). Previamente se observó que dosis altas de melatonina reducen los niveles séricos de prolactina además de actuar como un depresor del sistema reproductivo (Griffiths y col., 1987; Richardson y col., 1983; Vaughan y col., 1986). Además, se observó recientemente que la melatonina, a una dosis 7 veces superior a la utilizada por nosotros (500  $\mu\text{g}/\text{rata}$  vs. 75  $\mu\text{g}/\text{rata}$ ), detiene el crecimiento e induce apoptosis en prolactinomas de rata (Yang y col., 2006).

La reducción en los niveles de prolactina causada por el  $\text{Cd}^{2+}$  fue mayor que la generada por la melatonina y sus efectos no fueron aditivos. Por el contrario, la indolamina tendió a reducir el efecto del metal, llevando los niveles de prolactina a valores similares a los del tratamiento con melatonina sola. Anteriormente relacionamos la desregulación de la liberación hormonal, causada por el  $\text{Cd}^{2+}$  con el estrés oxidativo y la alteración de la expresión de la NOS en el eje hipotálamo-hipofisario. Dado que la melatonina efectivamente redujo la acción del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre ambos parámetros, cabría esperar una disminución semejante sobre la inhibición de la liberación de prolactina. No obstante, debido al efecto que la droga tuvo por sí misma, no puede asegurarse si los niveles reducidos de prolactina en los animales expuestos al tratamiento conjunto se deben a la persistencia de la acción del metal, a pesar de la presencia del antioxidante o a la melatonina por sí misma, una vez reducidos los efectos propios del  $\text{Cd}^{2+}$ .

A diferencia de lo observado con la liberación de prolactina, la melatonina no afectó los niveles basales de TSH. Confirmando nuestros resultados anteriores, el  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyó los niveles séricos de esta hormona. El efecto del tratamiento conjunto con  $\text{Cd}^{2+}$  y melatonina fue sorprendente, ya que se observó una elevación en los niveles de TSH por encima de los valores encontrados en el control. Este resultado es prueba de una gran complejidad en los efectos tanto del  $\text{Cd}^{2+}$  como de la melatonina. Como sugerimos anteriormente, el intenso estrés oxidativo generado por el tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  podría enmascarar otras acciones del metal, tales como cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  o la expresión de distintos genes. La melatonina, al actuar como un antioxidante eficaz, podría revelar estos efectos

enmascarados previamente por el estrés oxidativo. Un ejemplo de ello podría ser aumentando la relevancia del efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , los que podrían causar un aumento de la liberación hormonal.

Globalmente estos resultados muestran que la melatonina (una sustancia de venta libre), podría ser útil en el tratamiento de las intoxicaciones crónicas con  $\text{Cd}^{2+}$ , pero se requiere un estudio más completo para determinar la dosis a ser utilizada teniendo en cuenta sus efectos sobre la secreción hormonal.

## 6 Conclusiones

La contaminación ambiental con  $\text{Cd}^{2+}$  es un problema a nivel mundial relacionado con su amplia utilización en la industria, el alto contenido de  $\text{Cd}^{2+}$  en los fertilizantes sintéticos, el hábito del tabaquismo y también la falta de una terapia efectiva para contrarrestar las intoxicaciones con el metal (Shih y col., 2004). En algunos países, la ingesta máxima de  $\text{Cd}^{2+}$  dentro de la población en general se encuentra cerca de la ingesta máxima tolerable recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Johnson y col., 2003; Satarug y Moore, 2004; WHO, 1995). Actualmente se liberan a la atmósfera unas 15.000 toneladas de  $\text{Cd}^{2+}$  por año (McMurray y Tainer, 2003) y la concentración del metal en el suelo se incrementa a una tasa del 0.2 % anual (Jarup y col., 1998). Debido a esto se estima que la exposición de los humanos a este metal tóxico aumentará de forma progresiva durante los próximos años (Jarup y col., 1998), lo que podría causar un incremento de los problemas de salud asociados al  $\text{Cd}^{2+}$ .

Desde el punto de vista endocrinológico, es conocido que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta los niveles plasmáticos de hormonas hipofisarias tanto en humanos como en animales de laboratorio (Henson y Chedrese, 2004; Jurasovic y col., 2004; Zeng y col., 2004; Zylber-Haran y col., 1982). El diseño de un tratamiento efectivo contra la desregulación endocrina causada por el  $\text{Cd}^{2+}$  dependerá del conocimiento de los mecanismos que estén involucrados en dicho efecto.

Actualmente los mecanismos por los cuales el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la liberación hormonal de la adenohipófisis no son conocidos. La regulación de la liberación hormonal de esta glándula depende de la acción concertada de varios factores provenientes tanto del hipotálamo como de tejidos periféricos o de las propias células adenohipofisarias. Como la autorregulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula periférica es muy precisa, un disruptor que actúe en cualquiera de los niveles extrahipofisarios podría modificar indirectamente la secreción de las hormonas adenohipofisarias sin afectar de manera directa a la glándula. Hasta el momento no existen datos bibliográficos relativos a un efecto directo del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la adenohipófisis.

En este estudio hemos demostrado, por primera vez, que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta de manera directa a la adenohipófisis, tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro* el  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe la liberación de prolactina e induce apoptosis. El estrés oxidativo y cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  desempeñan un papel central en el efecto citotóxico de este metal en las células adenohipofisarias en cultivo y la ejecución de la muerte celular depende parcialmente tanto de la activación de caspasas como de calpaínas. *In vivo* el  $\text{Cd}^{2+}$  también indujo estrés oxidativo en el eje hipotálamo-hipofisario. Tanto *in vitro* como *in vivo* el  $\text{Cd}^{2+}$  redujo la liberación de prolactina y no modificó la liberación de LH sugiriendo un posible efecto diferencial sobre los distintos tipos celulares de la adenohipófisis. El  $\text{Cd}^{2+}$  *in vivo*, además redujo los niveles plasmáticos de TSH

En las células en cultivo, dos antioxidantes, la N-acetil-cisteína y el TROLOX, pero no el ácido ascórbico, fueron capaces de reducir el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la viabilidad celular así como también sobre la secreción de prolactina. *In vivo*, la melatonina actuó como un antioxidante y fue capaz de reducir el estrés oxidativo generado por el metal tanto en la adenohipofisis como en el hipotalámico. Sin embargo, el tratamiento con melatonina no fue capaz de impedir completamente el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la secreción prolactina y TSH. Al menos para el caso de la prolactina, su papel como antioxidante y protector podría verse enmascarado por el efecto propio de esta indolamina sobre la liberación hormonal. Es posible que la melatonina a concentraciones menores mantenga sus capacidades antioxidantes sin afectar por sí misma la liberación hormonal.

El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la producción de NO es un punto a destacar. El tratamiento con el metal alteró la producción de NO en las células adenohipofisarias en cultivo y la expresión de las NOS en el eje hipotálamo-hipofisario *in vivo*. Este segundo mensajero cumple un papel importante en la regulación hormonal, tanto en el hipotalámico como en la hipofisario, por lo que se podría suponer que a través de este efecto el  $\text{Cd}^{2+}$  sería capaz de alterar el normal funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario. Además, *in vitro* demostramos que el NO realiza un papel citoprotector durante a la exposición al metal y estudiamos algunos de los mecanismos responsables de este efecto.

Un último punto a destacar es que, *in vivo*, al utilizar una dosis muy baja de  $\text{Cd}^{2+}$ , hemos podido detectar un efecto sobre el balance redox en el hipotálamo y la hipófisis sin observar efectos similares en el hígado, considerado uno de los principales blancos del metal. Este resultado indica que en futuros estudios tendientes a establecer límites máximos para la ingesta de  $\text{Cd}^{2+}$  se debería tener en cuenta las acciones del metal a nivel neuroendocrino, sumados a los blancos clásicos del  $\text{Cd}^{2+}$  como el hígado y el riñón

Este estudio nos permitió conocer algunos de los mecanismos involucrados en la acción del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre el eje hipotálamo-hipofisario. A partir de estos resultados hemos ensayado vías posibles de tratamiento para disminuir la alteración endocrina causada por el metal. La información obtenida podría ser útil para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas orientadas a disminuir los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la salud en general.

Lic. Ariel H. Benitez Poliandri

Dr. Beatriz Haydeé Duvilanski



## 7 Referencias

- Adcock, I. M., Brown, C. R., Kwon, O. y Barnes, P. J. Oxidative Stress Induces NF Kappa B DNA Binding and Inducible NOS mRNA in Human Epithelial Cells. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**[3]:1518-1524.
- Alberdi, E., Sanchez-Gomez, M. V. y Matute, C. Calcium and Glial Cell Death. (2005) *Cell Calcium.* **38**[3-4]:417-425.
- Alexandrea, I. C. y Lawson, D. M. Heme Oxygenase in the Rat Anterior Pituitary: Immunohistochemical Localization and Possible Role in Gonadotropin and Prolactin Secretion. (2003) *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **228**[1]:64-69.
- Andoh, T., Chock, P. B. y Chiueh, C. C. Preconditioning-Mediated Neuroprotection: Role of Nitric Oxide, CGMP, and New Protein Expression. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:1-7.
- Andoh, T., Lee, S. Y. y Chiueh, C. C. Preconditioning Regulation of Bcl-2 and P66shc by Human NOS1 Enhances Tolerance to Oxidative Stress. (2000) *FASEB J.* **14**[14]:2144-2146.
- Andrzejak, R., Antonowicz, J., Bolanowska, B., Hebdzinski, L., Kabacinska-Knapik, D. y Smolik, R. Thyroid Function in Smelters After Long-Term Exposure to Heavy Metals. (1996) *Med. Pr.* **47**[3]:253-258.
- Anuradha, C. D., Kanno, S. y Hirano, S. Oxidative Damage to Mitochondria Is a Preliminary Step to Caspase-3 Activation in Fluoride-Induced Apoptosis in HL-60 Cells. (2001) *Free Radic. Biol. Med.* **31**[3]:367-373.
- Arbones, M. L., Ribera, J., Agullo, L., Baltrons, M. A., Casanovas, A., Riveros-Moreno, V. y Garcia, A. Characteristics of Nitric Oxide Synthase Type I of Rat Cerebellar Astrocytes. (1996) *Glia.* **18**[3]:224-232.
- Arimura, A., Dunn, J. D. y Schally, A. V. Effect of Infusion of Hypothalamic Extracts on Serum Prolactin Levels in Rats Treated With Nembutal, CNS Depressants or Bearing Hypothalamic Lesions. (1972) *Endocrinology.* **90**[2]:378-383.
- Armstrong, J. S., Yang, H., Duan, W. y Whiteman, M. Cytochrome Bc(1) Regulates the Mitochondrial Permeability Transition by Two Distinct Pathways. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**[48]:50420-50428.
- Arslan, P., Di, Virgilio F., Beltrame, M., Tsien, R. Y. y Pozzan, T. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Ehrlich and Yoshida Carcinomas. A New, Membrane-Permeant Chelator of Heavy Metals Reveals That These Ascites Tumor Cell Lines Have Normal Cytosolic Free Ca<sup>2+</sup>. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**[5]:2719-2727.
- Asher, E., Payne, C. M. y Bernstein, C. Evaluation of Cell Death in EBV-Transformed Lymphocytes Using Agarose Gel Electrophoresis, Light Microscopy and Electron

- Microscopy. II. Induction of Non-Classic Apoptosis ("Para-Apoptosis") by Tritiated Thymidine. (1995) *Leuk. Lymphoma*. **19**[1-2]:107-119.
- Bading, H., Hardingham, G. E., Johnson, C. M. y Chawla, S. Gene Regulation by Nuclear and Cytoplasmic Calcium Signals. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**[3]:541-543.
- Bai, J. y Cederbaum, A. I. Mitochondrial Catalase and Oxidative Injury. (2001) *Biol. Signals Recept.* **10**[3-4]:189-199.
- Bandyopadhyay, J., Lee, J. y Bandyopadhyay, A. Regulation of Calcineurin, a Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Phosphatase, in *C. Elegans*. (2004) *Mol. Cells*. **18**[1]:10-16.
- Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms. (1995) *Physiol Rev.* **75**[4]:725-748.
- Beltran, B., Quintero, M., Garcia-Zaragoza, E., O'Connor, E., Esplugues, J. V. y Moncada, S. Inhibition of Mitochondrial Respiration by Endogenous Nitric Oxide: a Critical Step in Fas Signaling. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**[13]:8892-8897.
- Ben-Jonathan, N. y Hnasko, R. Dopamine As a Prolactin (PRL) Inhibitor. (2001) *Endocr. Rev.* **22**[6]:724-763.
- Ben-Jonathan, N., Neill, M. A., Arbogast, L. A., Peters, L. L. y Hoefler, M. T. Dopamine in Hypophysial Portal Blood: Relationship to Circulating Prolactin in Pregnant and Lactating Rats. (1980) *Endocrinology*. **106**[3]:690-696.
- Benedetti, J. L., Samuel, O., Dewailly, E., Gingras, S. y Lefebvre, M. A. Levels of Cadmium in Kidney and Liver Tissues Among a Canadian Population (Province of Quebec). (1999) *J. Toxicol. Environ. Health A*. **56**[3]:145-163.
- Benjamins, J. A., Nedelkoska, L. y George, E. B. Protection of Mature Oligodendrocytes by Inhibitors of Caspases and Calpains. (2003) *Neurochem. Res.* **28**[1]:143-152.
- Bers, D. M. y Guo, T. Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. (2005) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**:86-98.
- Bethea, C. L. y Neill, J. D. Lesions of the Suprachiasmatic Nuclei Abolish the Cervically Stimulated Prolactin Surges in the Rat. (1980) *Endocrinology*. **107**[1]:1-5.
- Beyersmann, D. y Hechtenberg, S. Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**[2]:247-261.
- Bishop, W., Fawcett, C. P., Krulich, L. y McCann, S. M. Acute and Chronic Effects of Hypothalamic Lesions on the Release of FSH, LH and Prolactin in Intact and Castrated Rats. (1972) *Endocrinology*. **91**[3]:643-656.
- Boczkowski, J., Lisdero, C. L., Lanone, S., Carreras, M. C., Aubier, M. y Poderoso, J. J. Peroxynitrite-Mediated Mitochondrial Dysfunction. (2001) *Biol. Signals Recept.* **10**[1-2]:66-80.

- Bogdan, C. Nitric Oxide and the Immune Response. (2001) *Nat. Immunol.* **2**[10]:907-916.
- Bouron, A., Altafaj, X., Boisseau, S. y De, Waard M. A Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Influx Activated in Response to the Depletion of Thapsigargin-Sensitive Ca<sup>2+</sup> Stores Is Developmentally Regulated in Embryonic Cortical Neurons From Mice. (2005) *Brain Res. Dev.* **159**[1]:64-71.
- Brann, D. W., Bhat, G. K., Lamar, C. A. y Mahesh, V. B. Gaseous Transmitters and Neuroendocrine Regulation. (1997) *Neuroendocrinology.* **65**[6]:385-395.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R. y Snyder, S. H. Cloned and Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase. (1991) *Nature.* **351**[6329]:714-718.
- Bredt, D. S. y Snyder, S. H. Isolation of Nitric Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**[2]:682-685.
- Brumas, V., Hacht, B., Filella, M. y Berthon, G. Can N-Acetyl-L-Cysteine Affect Zinc Metabolism When Used As a Paracetamol Antidote? (1992) *Agents Actions* **36**[3-4]:278-288.
- Brunk, U. T. y Terman, A. The Mitochondrial-Lysosomal Axis Theory of Aging: Accumulation of Damaged Mitochondria As a Result of Imperfect Autophagocytosis. (2002) *Eur. J Biochem.* **269**[8]:1996-2002.
- Brzoska, M. M. y Moniuszko-Jakoniuk, J. The Influence of Calcium Content in Diet on Cumulation and Toxicity of Cadmium in the Organism. (1998) *Arch. Toxicol.* **72**[2]:63-73.
- Budd, S. L., Tenneti, L., Lishnak, T. y Lipton, S. A. Mitochondrial and Extramitochondrial Apoptotic Signaling Pathways in Cerebrocortical Neurons. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**[11]:6161-6166.
- Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L. y Eigenbrodt, E. H. Apoptosis and Necrosis. Basic Types and Mechanisms of Cell Death. (1993) *Arch. Pathol. Lab Med.* **117**[12]:1208-1214.
- Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., Young, S. y Brookes, P. S. Direct Evidence for S-Nitrosation of Mitochondrial Complex I. (2006) *Biochem. J.* **394**[Pt 3]:627-634.
- Calabrese, E. J. y Baldwin, L. A. Toxicology Rethinks Its Central Belief. (2003) *Nature* **421**[6924]:691-692.
- Calderoni, A. M., Oliveros, L., Jahn, G., Anton, R., Luco, J. y Gimenez, M. S. Alterations in the Lipid Content of Pituitary Gland and Serum Prolactin and Growth Hormone in Cadmium Treated Rats. (2005) *Biometals.* **18**[3]:213-220.
- Cameron, I. T. y Campbell, S. Nitric Oxide in the Endometrium. (1998) *Hum. Reprod. Update.* **4**[5]:565-569.

- Candolfi, M., Jaita, G., Zaldivar, V., Zarate, S., Pisera, D. y Seilicovich, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Nitric Oxide Restrains the Apoptotic Response of Anterior Pituitary Cells. (2004) *Neuroendocrinology*. **80**[2]:83-91.
- Candolfi, M., Zaldivar, V., De, Laurentiis A., Jaita, G., Pisera, D. y Seilicovich, A. TNF-Alpha Induces Apoptosis of Lactotropes From Female Rats. (2002) *Endocrinology*. **143**[9]:3611-3617.
- Carafoli, E. Calcium Signaling: a Tale for All Seasons. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**[3]:1115-1122.
- Carafoli, E. y Molinari, M. Calpain: a Protease in Search of a Function? (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**[2]:193-203.
- Cardinali, D. P., Garcia, A. P., Cano, P. y Esquifino, A. I. Melatonin Role in Experimental Arthritis. (2004) *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* **4**[1]:1-10.
- Caruso, C., Bottino, M. C., Pampillo, M., Pisera, D., Jaita, G., Duvilanski, B., Seilicovich, A. y Lasaga, M. Glutamate Induces Apoptosis in Anterior Pituitary Cells Through Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. (2004) *Endocrinology*. **145**[10]:4677-4684.
- Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N. y Kroemer, G. Quantitation of Mitochondrial Alterations Associated With Apoptosis. (2002) *J Immunol. Methods*. **265**[1-2]:39-47.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S. y Chakraborti, S. Oxidant, Mitochondria and Calcium: an Overview. (1999) *Cell Signal*. **11**[2]:77-85.
- Chan, S. L., Culmsee, C., Haughey, N., Klapper, W. y Mattson, M. P. Presenilin-1 Mutations Sensitize Neurons to DNA Damage-Induced Death by a Mechanism Involving Perturbed Calcium Homeostasis and Activation of Calpains and Caspase-12. (2002) *Neurobiol. Dis.* **11**[1]:2-19.
- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. (1979) *Physiol Rev.* **59**[3]:527-605.
- Chandler, J. A., Timms, B. G., Morton, M. S. y Groom, G. V. Proceedings: Effect of Cadmium Administration in Vivo on Plasma Testosterone and the Ultrastructure of Accessory Sex Organs of the Rat. (1976) *J. Endocrinol.* **69**[3]:21P.
- Chao, J. I. y Kuo, P. C. Role of P53 and P38 MAP Kinase in Nitric Oxide-Induced G2/M Arrest and Apoptosis in the Human Lung Carcinoma Cells. (2004) *Carcinogenesis*. **25**[4]:645
- Chen, C. S. y Wells, P. G. Enhanced Tumorigenesis in P53 Knockout Mice Exposed in Utero to High-Dose Vitamin E. (2006) *Carcinogenesis*. **27**[7]:1358-1368.
- Chien, S. H., Carmona, G., Prochnow, L. I. y Austin, E. R. Cadmium Availability From Granulated and Bulk-Blended Phosphate-Potassium Fertilizers. (2003) *J. Environ. Qual.* **32**[5]:1911-1914.

- Chwelatiuk, E., Wlostowski, T., Krasowska, A. y Bonda, E. The Effect of Orally Administered Melatonin on Tissue Accumulation and Toxicity of Cadmium in Mice. (2006) *J Trace Elem. Med. Biol.* **19**[4]:259-265.
- Conn, P. M., McArdle, C. A., Andrews, W. V. y Huckle, W. R. The Molecular Basis of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action in the Pituitary Gonadotrope. (1987) *Biol. Reprod.* **36**[1]:17-35.
- Contestabile, A., Monti, B., Contestabile, A. y Ciani, E. Brain Nitric Oxide and Its Dual Role in Neurodegeneration/Neuroprotection: Understanding Molecular Mechanisms to Devise Drug Approaches. (2003) *Curr. Med. Chem.* **10**[20]:2147-2174.
- Cooper, C. E. Nitric Oxide and Iron Proteins. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* **1411**[2-3]:290-309.
- Cooper, R. L., Goldman, J. M., Rehnberg, G. L., McElroy, W. K. y Hein, J. F. Effects of Metal Cations on Pituitary Hormone Secretion in Vitro. (1987) *J Biochem. Toxicol.* **2**:241-9.
- Cotton, F. A. y Wilkinson, G. The Chemistry of the Main Group Elements. Advanced Inorganic Chemistry 5th Edition. (1988) . Wiley, New York.
- Crow, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. (1997) *Nitric. Oxide.* **1**[2]:145-157.
- Dawn, B. y Bolli, R. Role of Nitric Oxide in Myocardial Preconditioning. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:18-41.
- De Arcangelis, V., Coletti, D., Canato, M., Molinaro, M., Adamo, S., Reggiani, C. y Naro, F. Hypertrophy and Transcriptional Regulation Induced in Myogenic Cell Line L6-C5 by an Increase of Extracellular Calcium. (2005) *J Cell Physiol.* **202**[3]:787-795.
- de Burbure C., Buchet, J. P., Leroyer, A., Nisse, C., Haguenoer, J. M., Mutti, A., Smerhovsky, Z., Cikrt, M., Trzcinka-Ochocka, M., Razniewska, G., Jakubowski, M. y Bernard, A. Renal and Neurologic Effects of Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic in Children: Evidence of Early Effects and Multiple Interactions at Environmental Exposure Levels. (2006) *Environ. Health Perspect.* **114**[4]:584-590.
- de Figueiredo, Filho J. Piqui Plant Food. (1965) *Rev. Bras. Med.* **22**[9]:580-582.
- Demontis, M. P., Varoni, M. V., Volpe, A. R., Emanuelli, C. y Madeddu, P. Role of Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Acute Hypertensive Response to Intracerebroventricular Cadmium. (1998) *Br. J. Pharmacol.* **123**[1]:129-135.
- Ding, W. y Templeton, D. M. Stress-Activated Protein Kinase-Dependent Induction of C-Fos by Cd(2+) Is Mediated by MKK7. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**[2]:718-722.
- Dorta, D. J., Leite, S., DeMarco, K. C., Prado, I. M., Rodrigues, T., Mingatto, F. E., Uyemura, S. A., Santos, A. C. y Curti, C. A Proposed Sequence of Events for Cadmium-Induced Mitochondrial Impairment. (2003) *J. Inorg. Biochem.* **97**[3]:251-257.

- Dotto, G. P. y Silke, J. More Than Cell Death: Caspases and Caspase Inhibitors on the Move. (2004) *Dev. Cell.* **7**[1]:2-3.
- Drewett, J. G. y Garbers, D. L. The Family of Guanylyl Cyclase Receptors and Their Ligands. (1994) *Endocr. Rev.* **15**[2]:135-162.
- Droge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. (2002) *Physiol. Rev.* **82**[1]:47-95.
- Duvilanski, B. H., Seilicovich, A., Diaz, M. C., Munoz, Maines V., Lasaga, M. y Debeljuk, L. Effect of GABA-T Inhibitors on Prolactin Secretion in Vitro. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* **115**[1]:65-69.
- Duvilanski, B.H., Zambruno, C., Seilicovich, A., Pisera, D., Lasaga, M., Diaz, M.C., Belova, N., Rettori, V., McCann, S.M. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**[1]:170-174.
- Duvilanski, B. H., Velardez, M. O., Gonzalez, Iglesias A., Theas, S., Seilicovich, A. y Becu-Villalobos, D. Nitric Oxide Donors Modify Free Intracellular Calcium Levels in Rat Anterior Pituitary Cells. (1998) *Mol. Cell Endocrinol.* **146**[1-2]:19-26.
- Duvilanski, B. H., Zambruno, C., Lasaga, M., Pisera, D. y Seilicovich, A. Role of Nitric Oxide/Cyclic GMP Pathway in the Inhibitory Effect of GABA and Dopamine on Prolactin Release. (1996) *J. Neuroendocrinol.* **8**[12]:909-913.
- Eberhard, M. y Erne, P. Calcium Binding to Fluorescent Calcium Indicators: Calcium Green, Calcium Orange and Calcium Crimson. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**[1]:209-215.
- Elliott, N. A. y Volkert, M. R. Stress Induction and Mitochondrial Localization of Oxr1 Proteins in Yeast and Humans. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**[8]:3180-3187.
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y. y Horvitz, H. R. Mechanisms and Functions of Cell Death. (1991) *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:663-698.
- Escames, G., Leon, J., Macias, M., Khaldy, H. y Acuna-Castroviejo, D. Melatonin Counteracts Lipopolysaccharide-Induced Expression and Activity of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase in Rats. (2003) *FASEB J.* **17**[8]:932-934.
- EVERETT, J. W. Luteotropic Function of Autografts of the Rat Hypophysis. (1954) *Endocrinology.* **54**[6]:685-690.
- EVERETT, J. W. Functional Corpora Lutea Maintained for Months by Autografts of Rat Hypophyses. (1956) *Endocrinology.* **58**[6]:786-796.
- Faletti, A. G., Mastronardi, C. A., Lomniczi, A., Seilicovich, A., Gimeno, M., McCann, S. M. y Rettori, V. Beta-Endorphin Blocks Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Release by Inhibiting the Nitricoxidergic Pathway Controlling Its Release. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**[4]:1722-1726.
- Feelisch, M. The Use of Nitric Oxide Donors in Pharmacological Studies. (1998) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**[1]:113-122.

- Figueiredo-Pereira, M. E., Yakushin, S. y Cohen, G. Disruption of the Intracellular Sulfhydryl Homeostasis by Cadmium-Induced Oxidative Stress Leads to Protein Thiolation and Ubiquitination in Neuronal Cells. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**[21]:12703-12709.
- Fiscus, R. R. Involvement of Cyclic GMP and Protein Kinase G in the Regulation of Apoptosis and Survival in Neural Cells. (2002) *Neurosignals.* **11**[4]:175-190.
- Flik, G., van de Winkel, J. G., Part, P., Bonga, S. E. y Lock, R. A. Calmodulin-Mediated Cadmium Inhibition of Phosphodiesterase Activity, in Vitro. (1987) *Arch. Toxicol.* **59**[5]:353-359.
- Fombonne, J., Reix, S., Rasolonjanahary, R., Danty, E., Thirion, S., Laforge-Anglade, G., Bosler, O., Mehlen, P., Enjalbert, A. y Krantic, S. Epidermal Growth Factor Triggers an Original, Caspase-Independent Pituitary Cell Death With Heterogeneous Phenotype. (2004) *Mol. Biol. Cell.* **15**[11]:4938-4948.
- Freda, P. U., Reyes, C. M., Nuruzzaman, A. T., Sundeen, R. E., Khandji, A. G. y Post, K. D. Cabergoline Therapy of Growth Hormone & Growth Hormone/Prolactin Secreting Pituitary Tumors. (2004) *Pituitary.* **7**[1]:21-30.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. y Nagy, G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. (2000) *Physiol. Rev.* **80**[4]:1523-1631.
- Fumarola, C. y Guidotti, G. G. Stress-Induced Apoptosis: Toward a Symmetry With Receptor-Mediated Cell Death. (2004) *Apoptosis.* **9**[1]:77-82.
- Gabbita, S. P., Subramaniam, R., Allouch, F., Carney, J. M. y Butterfield, D. A. Effects of Mitochondrial Respiratory Stimulation on Membrane Lipids and Proteins: an Electron Paramagnetic Resonance Investigation. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1372**[2]:163-173.
- Galan, A., Garcia-Bermejo, M. L., Troyano, A., Vilaboa, N. E., de Blas E., Kazanietz, M. G. y Aller, P. Stimulation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is an Early Regulatory Event for the Cadmium-Induced Apoptosis in Human Promonocytic Cells. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**[15]:11418-11424.
- Garcia-Morales, P., Saceda, M., Kenney, N., Kim, N., Salomon, D. S., Gottardis, M. M., Solomon, H. B., Sholler, P. F., Jordan, V. C. y Martin, M. B. Effect of Cadmium on Estrogen Receptor Levels and Estrogen-Induced Responses in Human Breast Cancer Cells. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**[24]:16896-16901.
- Garrido, C. y Kroemer, G. Life's Smile, Death's Grin: Vital Functions of Apoptosis-Executing Proteins. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**[6]:639-646.
- Gennari, A., Viviani, B., Galli, C. L., Marinovich, M., Pieters, R. y Corsini, E. Organotins Induce Apoptosis by Disturbance of  $[Ca^{2+}]_i$  and Mitochondrial Activity, Causing Oxidative Stress and Activation of Caspases in Rat Thymocytes. (2000) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **169**[2]:185-190.
- Gershengorn, M. C. Mechanism of Thyrotropin Releasing Hormone Stimulation of Pituitary Hormone Secretion. (1986) *Annu. Rev. Physiol.* **48**:515-526.

- Ghosh, N. y Bhattacharya, S. Thyrotoxicity of the Chlorides of Cadmium and Mercury in Rabbit. (1992) *Biomed. Environ. Sci.* **5**[3]:236-240.
- Giles, W., Hume, J. R. y Shibata, E. F. Presynaptic and Postsynaptic Actions of Cadmium in Cardiac Muscle. (1983) *Fed. Proc.* **42**[13]:2994-2997.
- Giulivi, C., Poderoso, J. J. y Boveris, A. Production of Nitric Oxide by Mitochondria. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**[18]:11038-11043.
- Gomez, M., Esparza, J. L., Nogues, M. R., Giralt, M., Cabre, M. y Domingo, J. L. Pro-Oxidant Activity of Aluminum in the Rat Hippocampus: Gene Expression of Antioxidant Enzymes After Melatonin Administration. (2005) *Free Radic. Biol. Med.* **38**[1]:104-111.
- Goodwin, D. C., Landino, L. M. y Marnett, L. J. Effects of Nitric Oxide and Nitric Oxide-Derived Species on Prostaglandin Endoperoxide Synthase and Prostaglandin Biosynthesis. (1999) *FASEB J.* **13**[10]:1121-1136.
- Goyer, R. A., Liu, J. y Waalkes, M. P. Cadmium and Cancer of Prostate and Testis. (2004) *Biometals.* **17**[5]:555-558.
- Graat, J. M., Schouten, E. G. y Kok, F. J. Effect of Daily Vitamin E and Multivitamin-Mineral Supplementation on Acute Respiratory Tract Infections in Elderly Persons: a Randomized Controlled Trial. (2002) *JAMA.* **288**[6]:715-721.
- Griffiths, D., Bjoro, T., Gautvik, K. y Haug, E. Melatonin Reduces the Production and Secretion of Prolactin and Growth Hormone From Rat Pituitary Cells in Culture. (1987) *Acta Physiol Scand.* **131**[1]:43-49.
- Grisham, M. B., Johnson, G. G. y Lancaster, J. R. Jr. Quantitation of Nitrate and Nitrite in Extracellular Fluids. (1996) *Methods Enzymol.* **268**:237-246.
- Guenther, A. L., Schmidt, S. I., Laatsch, H., Fotso, S., Ness, H., Ressimyer, A. R., Poeggeler, B. y Hardeland, R. Reactions of the Melatonin Metabolite AMK (N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine) With Reactive Nitrogen Species: Formation of Novel Compounds, 3-Acetamidomethyl-6-Methoxycinnolinone and 3-Nitro-AMK. (2005) *J Pineal Res.* **39**[3]:251-260.
- Gulden, M. y Seibert, H. In Vitro-in Vivo Extrapolation: Estimation of Human Serum Concentrations of Chemicals Equivalent to Cytotoxic Concentrations in Vitro. (2003) *Toxicology.* **189**[3]:211-222.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. y Salter, J. D. Calcium and Mitochondria. (2004) *FEBS Lett.* **567**[1]:96-102.
- Gupta, P. y Kar, A. Cadmium Induced Thyroid Dysfunction in Chicken: Hepatic Type I Iodothyronine 5'-Monodeiodinase Activity and Role of Lipid Peroxidation. (1999) *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**[1]:39-44.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. (2000) *Cell.* **100**[1]:57-70.



- Haq, F., Mahoney, M. y Koropatnick, J. Signaling Events for Metallothionein Induction. (2003) *Mutat. Res.* **533**[1-2]:211-226.
- Harada, H. y Grant, S. Apoptosis Regulators. (2003) *Rev. Clin. Exp. Hematol.* **7**[2]:117-138.
- Hardeland, R., Coto-Montes, A. y Poeggeler, B. Circadian Rhythms, Oxidative Stress, and Antioxidative Defense Mechanisms. (2003) *Chronobiol. Int.* **20**[6]:921-962.
- Harstad, E. B. y Klaassen, C. D. NOS2-Null Mice Are Not Resistant to Cadmium Chloride-Induced Hepatotoxicity. (2002) *Toxicology.* **175**[1-3]:83-90.
- Haynes, V., Elfering, S., Traaseth, N. y Giulivi, C. Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase: Enzyme Expression, Characterization, and Regulation. (2004) *J. Bioenerg.* **36**[4]:341-346.
- Henson, M. C. y Chedrese, P. J. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant With Paradoxical Effects on Reproduction. (2004) *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **229**[5]:383-392.
- Herrero, M. B., de, Lamirande E. y Gagnon, C. Nitric Oxide Is a Signaling Molecule in Spermatozoa. (2003) *Curr. Pharm. Des.* **9**[5]:419-425.
- Hinkle, P. M., Kinsella, P. A. y Osterhoudt, K. C. Cadmium Uptake and Toxicity Via Voltage-Sensitive Calcium Channels. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**[34]:16333-16337.
- Hinkle, P. M., Shanshala, E. D. y Nelson, E. J. Measurement of Intracellular Cadmium With Fluorescent Dyes. Further Evidence for the Role of Calcium Channels in Cadmium Uptake. (1992) *J Biol. Chem.* **267**[35]:25553-25559.
- Huie, R. E. y Padmaja, S. The Reaction of NO With Superoxide. (1993) *Free Radic. Res. Commun.* **18**[4]:195-199.
- Hur, G. M., Ryu, Y. S., Yun, H. Y., Jeon, B. H., Kim, Y. M., Seok, J. H. y Lee, J. H. Hepatic Ischemia/Reperfusion in Rats Induces NOS2 Gene Transcription by Activation of NF-KappaB. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**[3]:917-922.
- Ignarro, L. J. Signal Transduction Mechanisms Involving Nitric Oxide. (1991) *Biochem. Pharmacol.* **41**[4]:485-490.
- Ignarro, L. J. Heme-Dependent Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Nitric Oxide: Regulation of Enzyme Activity by Porphyrins and Metalloporphyrins. (1989) *Semin. Hematol.* **26**[1]:63-76.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. y Chaudhuri, G. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released From Artery and Vein Is Nitric Oxide. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**[24]:9265-9269.
- Ikediobi, C. O., Badisa, V. L., Yuk-Takem, L. T., Latinwo, L. M. y West, J. Response of Antioxidant Enzymes and Redox Metabolites to Cadmium-Induced Oxidative Stress in CRL-1439 Normal Rat Liver Cells. (2004) *Int. J. Mol. Med.* **14**[1]:87-92.

- Ingwersen, J. y Streck, T. A Regional-Scale Study on the Crop Uptake of Cadmium From Sandy Soils: Measurement and Modeling. (2005) *J. Environ. Qual.* **34**[3]:1026-1035.
- Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (1996) . **National Academy Press** , Washington, D.C.
- International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (1993) **53**:119.
- Ivan, G., Szigeti-Csucs, N., Olah, M., Nagy, G. M. y Goth, M. I. Treatment of Pituitary Tumors: Dopamine Agonists. (2005) *Endocrine.* **28**[1]:101-110.
- Jambrina, E., Alonso, R., Alcalde, M., del Carmen, Rodriguez M., Serrano, A., Martinez, A., Garcia-Sancho, J. y Izquierdo, M. Calcium Influx Through Receptor-Operated Channel Induces Mitochondria-Triggered Paraptotic Cell Death. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**[16]:14134-14145.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G. y Vahter, M. Health Effects of Cadmium Exposure--a Review of the Literature and a Risk Estimate. (1998) *Scand. J. Work. Environ. Health.* **24 Suppl 1**:1-51.
- Johnson, M. D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Sholler, P. F., Lirio, A. A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S. y Martin, M. B. Cadmium Mimics the in Vivo Effects of Estrogen in the Uterus and Mammary Gland. (2003) *Nat. Med.* **9**[8]:1081-1084.
- Joseph, P., Muchnok, T. K., Klishis, M. L., Roberts, J. R., Antonini, J. M., Whong, W. Z. y Ong, T. Cadmium-Induced Cell Transformation and Tumorigenesis Are Associated With Transcriptional Activation of C-Fos, C-Jun, and C-Myc Proto-Oncogenes: Role of Cellular Calcium and Reactive Oxygen Species. (2001) *Toxicol. Sci.* **61**[2]:295-303.
- Jurasovic, J., Cvitkovic, P., Pizent, A., Colak, B. y Telisman, S. Semen Quality and Reproductive Endocrine Function With Regard to Blood Cadmium in Croatian Male Subjects. (2004) *Biometals.* **17**[6]:735-743.
- Kanasaki, H., Fukunaga, K., Takahashi, K., Miyazaki, K. y Miyamoto, E. Involvement of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Bromocriptine-Induced Apoptosis in Rat Pituitary GH3 Cells. (2000) *Biol. Reprod.* **62**[6]:1486-1494.
- Kanematsu, S. y Sawyer, C. H. Elevation of Plasma Prolactin After Hypophysial Stalk Section in the Rat. (1973) *Endocrinology.* **93**[1]:238-241.
- Katakai, K., Liu, J., Nakajima, K., Keefer, L. K. y Waalkes, M. P. Nitric Oxide Induces Metallothionein (MT) Gene Expression Apparently by Displacing Zinc Bound to MT. (2001) *Toxicol. Lett.* **119**[2]:103-108.
- Kato, M. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. (1992) *Endocrinology.* **131**[5]:2133-2138.

- Kawamata, Y., Fujii, R., Fukusumi, S., Habata, Y., Hosoya, M., Hinuma, S., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O. y Fujino, M. Analyses for Susceptibility of Rat Anterior Pituitary Cells to Prolactin-Releasing Peptide. (2000) *Endocrine*. **12**[3]:215-221.
- Kazantzis, G. Cadmium, Osteoporosis and Calcium Metabolism. (2004) *Biometals*. **2004**. **17**[5]:493-498.
- Kerr, R.O, Cardamone, J., Dalmaso, A. P. y Kaplan, M. E. Two Mechanisms of Erythrocyte Destruction in Penicillin-Induced Hemolytic Anemia. (1972) *N. Engl. J. Med.* **287**[287]:1322-1325.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. y Moncada, S. Formation of Nitric Oxide From L-Arginine in the Central Nervous System: a Transduction Mechanism for Stimulation of the Soluble Guanylate Cyclase. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**[13]:5159-5162.
- Koppenol, W. H. Chemistry of Peroxynitrite and Its Relevance to Biological Systems. Ed. Sigel, A y Sigel, H. Metal ions in biological systems. (1999) [18]:597-619. Marcel Dekker, New York-Basel. ????????
- Korhonen, R., Kankaanranta, H., Lahti, A., Lahde, M., Knowles, R. G. y Moilanen, E. Bi-Directional Effects of the Elevation of Intracellular Calcium on the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in J774 Macrophages Exposed to Low and to High Concentrations of Endotoxin. (2001) *Biochem. J.* **354**[Pt 2]:351-358.
- Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D. S. y Kocak, A. Evaluation of the Effects of Cadmium on Rat Liver. (2006) *Mol. Cell Biochem.* **284**[1-2]:81-85.
- Kubes, P. y McCafferty, D. M. Nitric Oxide and Intestinal Inflammation. (2000) *Am. J Med.* **109**[2]:150-158.
- Kuo, P. C., Abe, K. Y. y Schroeder, R. A. Oxidative Stress Increases Hepatocyte iNOS2 Gene Transcription and Promoter Activity. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**[2]:289-292.
- Lafuente, A., Cano, P. y Esquifino, A. Are Cadmium Effects on Plasma Gonadotropins, Prolactin, ACTH, GH and TSH Levels, Dose-Dependent? (2003a) *Biometals*. **16**[2]:243-250.
- Lafuente, A. y Esquifino, A. I. Possible Role of Glutamate, Aspartate, GABA or Taurine on Cadmium Toxicity on the Hypothalamic Pituitary Axis Activity in Adult Male Rats. (2002) *Biometals*. **15**[2]:183-187
- Lafuente, A. y Esquifino, A. I. Cadmium Effects on Hypothalamic Activity and Pituitary Hormone Secretion in the Male. (1999) *Toxicol. Lett.* **110**[3]:209-218.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Marquez, N., Pazo, D. y Esquifino, A. I. Oral Cadmium Exposure Throughout Puberty Does Not Inhibit Secretion of Prolactin, GH and ACTH Through Dopamine Metabolism Changes in Male Rat. (2002) *J. Trace Elem. Med. Biol.* **16**[4]:249-254.

- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., Cabaleiro, T. y Esquifino, A. I. Toxic Effects of Cadmium on the Regulatory Mechanism of Dopamine and Serotonin on Prolactin Secretion in Adult Male Rats. (2005) *Toxicol. Lett.* **155**[1]:87-96.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., Cano, P. y Esquifino, A. I. Cadmium Exposure Differentially Modifies the Circadian Patterns of Norepinephrine at the Median Eminence and Plasma LH, FSH and Testosterone Levels. (2004) *Toxicol. Lett.* **146**[2]:175-182.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A. y Esquifino, A. I. Effect of Cadmium on 24-h Variations in Hypothalamic Dopamine and Serotonin Metabolism in Adult Male Rats. (2003b) *Exp. Brain Res.* **149**[2]:200-206.
- Lafuente, A., Marquez, N., Pazo, D. y Esquifino, A. I. Effects of Subchronic Alternating Cadmium Exposure on Dopamine Turnover and Plasma Levels of Prolactin, GH and ACTH. (2000a) *Biometals.* **13**[1]:47-55.
- Lafuente, A., Marquez, N., Pazo, D. y Esquifino, A. I. Cadmium Effects on Dopamine Turnover and Plasma Levels of Prolactin, GH and ACTH. (2001a) *J. Physiol. Biochem.* **57**[3]:231-236.
- Lafuente, A., Marquez, N., Perez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A. I. Cadmium Effects on Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis in Male Rats. (2001b) *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **226**[6]:605-611.
- Lafuente, A., Marquez, N., Perez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A. I. Pubertal and Postpubertal Cadmium Exposure Differentially Affects the Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis Function in the Rat. (2000) *Food Chem. Toxicol.* **38**[10]:913-923.
- Lag, M., Westly, S., Lerstad, T., Bjornsrud, C., Refsnes, M. y Schwarze, P. E. Cadmium-Induced Apoptosis of Primary Epithelial Lung Cells: Involvement of Bax and P53, but Not of Oxidative Stress. (2002) *Cell Biol. Toxicol.* **18**[1]:29-42.
- Lamberts, S. W. y Macleod, R. M. Regulation of Prolactin Secretion at the Level of the Lactotroph. (1990) *Physiol. Rev.* **70**[2]:279-318.
- Langer, G., Ferin, M. y Sachar, E. J. Effect of Haloperidol and L-Dopa on Plasma Prolactin in Stalk-Sectioned and Intact Monkeys. (1978) *Endocrinology.* **102**[2]:367-370.
- LaRochelle, O., Gagne, V., Charron, J., Soh, J. W. y Seguin, C. Phosphorylation Is Involved in the Activation of Metal-Regulatory Transcription Factor 1 in Response to Metal Ions. (2001) *J Biol. Chem.* **276**[45]:41879-41888.
- Le, Bras M., Clement, M. V., Pervaiz, S. y Brenner, C. Reactive Oxygen Species and the Mitochondrial Signaling Pathway of Cell Death. (2005) *Histol. Histopathol.* **20**[1]:205-219.
- Lemarie, A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O. y Vernhet, L. Cadmium Induces Caspase-Independent Apoptosis in Liver Hep3B Cells: Role for Calcium in Signaling Oxidative Stress-Related Impairment of Mitochondria and Relocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **36**[12]:1517-1531.

- Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. y Moncada, S. Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases Incorporate Molecular Oxygen into Both Nitric Oxide and Citrulline. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**[35]:23790-23795.
- Leong, S. K., Ruan, R. S. y Zhang, Z. A Critical Assessment of the Neurodestructive and Neuroprotective Effects of Nitric Oxide. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:161-181.
- Leret, M. L., Millan, J. A. y Antonio, M. T. Perinatal Exposure to Lead and Cadmium Affects Anxiety-Like Behaviour. (2003) *Toxicology* **186**[1-2]:125-130.
- Lewis, R. S. y Deen, W. M. Kinetics of the Reaction of Nitric Oxide With Oxygen in Aqueous Solutions. (1994) *Chem. Res. Toxicol.* **7**[4]:568-574.
- Li, J., Billiar, T. R., Talanian, R. V. y Kim, Y. M. Nitric Oxide Reversibly Inhibits Seven Members of the Caspase Family Via S-Nitrosylation. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**[2]:419-424.
- Li, M., Kondo, T., Zhao, Q. L., Li, F. J., Tanabe, K., Arai, Y., Zhou, Z. C. y Kasuya, M. Apoptosis Induced by Cadmium in Human Lymphoma U937 Cells Through Ca<sup>2+</sup>-Calpain and Caspase-Mitochondria- Dependent Pathways. (2000) *J Biol. Chem.* **275**[50]:39702-39709.
- Liu, J., Kadiiska, M. B., Corton, J. C., Qu, W., Waalkes, M. P., Mason, R. P., Liu, Y. y Klaassen, C. D. Acute Cadmium Exposure Induces Stress-Related Gene Expression in Wild-Type and Metallothionein-I/II-Null Mice. (2002) *Free Radic. Biol. Med.* **32**[6]:525-535.
- Liu, J., Qu, W., Saavedra, J. E. y Waalkes, M. P. The Nitric Oxide Donor, O<sub>2</sub>-Vinyl 1-(Pyrrolidin-1-Yl)Diazen-1-Ium-1,2-Diolate (V-PYRRO/NO), Protects Against Cadmium-Induced Hepatotoxicity in Mice. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**[1]:18-24.
- Liu, L. y Stamler, J. S. NO: an Inhibitor of Cell Death. (1999) *Cell Death. Differ.* **6**[10]:937-942.
- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D. y Lancaster, J. R. Jr. Accelerated Reaction of Nitric Oxide With O<sub>2</sub> Within the Hydrophobic Interior of Biological Membranes. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**[5]:2175-2179.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. (2001) *Methods.* **25**[4]:402-408.
- Lopez-Varela, S., Chacon, F., Cano, P., Arce, A. y Esquifino, A. I. Differential Responses of Circulating Prolactin, GH, and ACTH Levels and Distribution and Activity of Submaxillary Lymph Node Lymphocytes to Calorie Restriction in Male Lewis and Wistar Rats. (2004) *Neuroimmunomodulation.* **11**[4]:247-254.
- Lyons, C. R., Orloff, G. J. y Cunningham, J. M. Molecular Cloning and Functional Expression of an Inducible Nitric Oxide Synthase From a Murine Macrophage Cell Line. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**[9]:6370-6374.

- MacNab, M. W., Tallarida, R. J. y Joseph, R. An Evaluation of Tamoxifen As a Partial Agonist by Classical Receptor Theory--an Explanation of the Dual Action of Tamoxifen. (1984) *Eur. J Pharmacol.* **103**[3-4]:321-326.
- Malhi, H., Gores, G. J. y Lemasters, J. J. Apoptosis and Necrosis in the Liver: a Tale of Two Deaths? (2006) *Hepatology.* **43**[2 Suppl 1]:S31-S44.
- Marchioli, R., Levantesi, G., Macchia, A., Marfisi, R. M., Nicolosi, G. L., Tavazzi, L., Tognoni, G. y Valagussa, F. Vitamin E Increases the Risk of Developing Heart Failure After Myocardial Infarction: Results From the GISSI-Prevenzione Trial. (2006) *J Cardiovasc. Med. (Hagerstown).* **7**[5]:347-350.
- Martin, M., Macias, M., Leon, J., Escames, G., Khaldy, H. y Acuna-Castroviejo, D. Melatonin Increases the Activity of the Oxidative Phosphorylation Enzymes and the Production of ATP in Rat Brain and Liver Mitochondria. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**[4]:348-357.
- Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A. y Weiner, R. I. The Antiangiogenic Factor 16K PRL Induces Programmed Cell Death in Endothelial Cells by Caspase Activation. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**[10]:1536-1549.
- Mason, H. J. Occupational Cadmium Exposure and Testicular Endocrine Function. (1990) *Hum. Exp. Toxicol.* **9**[2]:91-94.
- Mathias, S. A., Mgbonyebi, O. P., Motley, E., Owens, J. R. y Mrotek, J. J. Modulation of Adrenal Cell Functions by Cadmium Salts. 4. Ca(2+)-Dependent Sites Affected by CdCl<sub>2</sub> During Basal and ACTH-Stimulated Steroid Synthesis. (1998) *Cell Biol. Toxicol.* **14**[3]:225-236.
- Matsushita, N., Kato, Y., Shimatsu, A., Katakami, H., Yanaihara, N. y Imura, H. Effects of VIP, TRH, GABA and Dopamine on Prolactin Release From Superfused Rat Anterior Pituitary Cells. (1983) *Life Sci.* **32**[11]:1263-1269.
- Mattson, M. P. Neuroprotective Signal Transduction: Relevance to Stroke. (1997) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**[2]:193-206.
- Mayo, K. E., Miller, T., DeAlmeida, V., Godfrey, P., Zheng, J. y Cunha, S. R. Regulation of the Pituitary Somatotroph Cell by GHRH and Its Receptor. (2000) *Recent. Prog. Horm. Res.* **55**:237-266; discussion 266-267.
- McCann, S. M., Karanth, S., Kimura, M., Yu, W. H. y Rettori, V. The Role of Nitric Oxide (NO) in Control of Hypothalamic-Pituitary Function. (1996) *Rev. Bras. Biol.* **56 Su 1 Pt 1**:105-112.
- McCann, S. M., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W. H., Mastronardi, C. A. y Rettori, V. The Mechanism of Action of Cytokines to Control the Release of Hypothalamic and Pituitary Hormones in Infection. (2000) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**:4-18.
- McCann, S. M., Lumpkin, M. D., Mizunuma, H., Khorram, O. y Samson, W. K. Recent Studies on the Role of Brain Peptides in Control of Anterior Pituitary Hormone Secretion. (1984) *Peptides.* **5 Suppl 1**:3-7.

- McCann, S.M., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W.H. The role of nitric oxide in reproduction. (1999) *Braz J Med Biol Res.* **32**[11]:1367-1379.
- McCann, S. M. y Rettori, V. Gamma Amino Butyric Acid (GABA) Controls Anterior Pituitary Hormone Secretion. (1986) *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **42**:173-189.
- McMurray, C. T. y Tainer, J. A. Cancer, Cadmium and Genome Integrity. (2003) *Nat. Genet.* **34**[3]:239-241.
- Merzenich, H., Hartwig, A., Ahrens, W., Beyersmann, D., Schlepegrell, R., Scholze, M., Timm, J. y Jockel, K. H. Biomonitoring on Carcinogenic Metals and Oxidative DNA Damage in a Cross-Sectional Study. (2001) *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **10**[5]:515-522.
- Misra, R. R., Hochadel, J. F., Smith, G. T., Cook, J. C., Waalkes, M. P. y Wink, D. A. Evidence That Nitric Oxide Enhances Cadmium Toxicity by Displacing the Metal From Metallothionein. (1996) *Chem. Res. Toxicol.* **9**[1]:326-332.
- Misra, U. K., Gawdi, G., Akabani, G. y Pizzo, S. V. Cadmium-Induced DNA Synthesis and Cell Proliferation in Macrophages: the Role of Intracellular Calcium and Signal Transduction Mechanisms. (2002) *Cell Signal.* **14**[4]:327-340.
- Molnar, G., Salanki, J. y Kiss, T. Cadmium Inhibits GABA-Activated Ion Currents by Increasing Intracellular Calcium Level in Snail Neurons. (2004) *Brain Res.* **1008**[2]:205-211.
- Moncada, S., Palmer, R. M. y Higgs, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. (1991) *Pharmacol. Rev.* **43**[2]:109-142.
- Moncek, F., Kvetnansky, R. y Jezova, D. Differential Responses to Stress Stimuli of Lewis and Fischer Rats at the Pituitary and Adrenocortical Level. (2001) *Endocr. Regul.* **35**[1]:35-41.
- Morse, D. y Choi, A. M. Heme Oxygenase-1: the "Emerging Molecule" Has Arrived. (2002) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**[1]:8-16.
- Mould, J. y Dulhunty, A. F. Delayed Contractures Induced by External Cadmium Ions in Rat Soleus Muscle Fibres. (2000) *Pflugers Arch.* **439**[3]:263-270.
- Nakagawa, T. y Yuan, J. Cross-Talk Between Two Cysteine Protease Families. Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. (2000) *J. Cell Biol.* **150**[4]:887-894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. y Yuan, J. Caspase-12 Mediates Endoplasmic-Reticulum-Specific Apoptosis and Cytotoxicity by Amyloid-Beta. (2000) *Nature.* **403**[6765]:98-103.
- Neill, J. D., Freeman, M. E. y Tillson, S. A. Control of the Proestrus Surge of Prolactin and Luteinizing Hormone Secretion by Estrogens in the Rat. (1971) *Endocrinology.* **89**[6]:1448-1453.
- Newmeyer, D. D. y Ferguson-Miller, S. Mitochondria. Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. (2003) *Cell.* **112**[4]:481-490.

- Newton, C. J., Bilko, D., Tichomirowa, M., Renner, U. y Stalla, G. K. The Role of Poly (Adenosine 5'-Diphosphate-Ribose) Polymerase in the Response of Pituitary Tumor Cells to Reactive Oxygen Species. (2005) *Endocrinology*. **146**[3]:1119-1127.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M. y Bernardi, P. Interactions of Cyclophilin With the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, and Cyclosporin A-Sensitive Channel. (1996) *J Biol. Chem.* **271**[4]:2185-2192.
- Nkondjock, A., Shatenstein, B. y Ghadirian, P. A Case-Control Study of Breast Cancer and Dietary Intake of Individual Fatty Acids and Antioxidants in Montreal, Canada. (2003) *Breast*. **12**[2]:128-135.
- Nogawa, K., Kobayashi, E., Okubo, Y. y Suwazono, Y. Environmental Cadmium Exposure, Adverse Effects and Preventive Measures in Japan. (2004) *Biometals*. **17**[5]:581-587.
- Obara, N., Imagawa, S., Nakano, Y., Suzuki, N., Yamamoto, M. y Nagasawa, T. Suppression of Erythropoietin Gene Expression by Cadmium Depends on Inhibition of HIF-1, Not Stimulation of GATA-2. (2003) *Arch. Toxicol.* **77**[5]:267-273.
- Ogawa, T., Kobayashi, E., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kido, T. y Nogawa, K. Relationship Among Prevalence of Patients With Itai-Itai Disease, Prevalence of Abnormal Urinary Findings, and Cadmium Concentrations in Rice of Individual Hamlets in the Jinzu River Basin, Toyama Prefecture of Japan. (2004) *Int. J. Environ. Health Res.* **14**[4]:243-252.
- Oh, S. H., Lee, B. H. y Lim, S. C. Cadmium Induces Apoptotic Cell Death in WI 38 Cells Via Caspase-Dependent Bid Cleavage and Calpain-Mediated Mitochondrial Bax Cleavage by Bcl-2-Independent Pathway. (2004) *Biochem. Pharmacol.* **68**[9]:1845-1855.
- Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorre, L. R., Bechara, E. J. y Colepicolo, P. Antioxidant Modulation in Response to Metal-Induced Oxidative Stress in Algal Chloroplasts. (2001) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**[1]:18-24.
- Osius, N., Karmaus, W., Kruse, H. y Witten, J. Exposure to Polychlorinated Biphenyls and Levels of Thyroid Hormones in Children. (1999) *Environ. Health Perspect.* **107**[10]:843-849.
- Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. y Bach, F. H. Heme Oxygenase-1: Unleashing the Protective Properties of Heme. (2003) *Trends. Immunol.* **24**[8]:449-455.
- Page, R. The Anatomy of Hypothalamus-Hypophysial Complex. Ed. Knobil, E. y Neill, J. The physiology of reproduction 2nd edition. (1994) . Raven Press, New York.
- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S. y Moncada, S. L-Arginine Is the Physiological Precursor for the Formation of Nitric Oxide in Endothelium-Dependent Relaxation. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**[3]:1251-1256.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M. y Ruggiero, F. M. The Effect of Reactive Oxygen Species Generated From the Mitochondrial Electron Transport Chain on the Cytochrome c Oxidase Activity and on the Cardiolipin Content in Bovine Heart Submitochondrial Particles. (2000) *FEBS Lett.* **466**[2-3]:323-326.



- Pearlstein, D. P., Ali, M. H., Mungai, P. T., Hynes, K. L., Gewertz, B. L. y Schumacker, P. T. Role of Mitochondrial Oxidant Generation in Endothelial Cell Responses to Hypoxia. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**[4]:566-573.
- Petersen, O. H., Michalak, M. y Verkhatsky, A. Calcium Signalling: Past, Present and Future. (2005) *Cell Calcium.* **38**[3-4]:161-169.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., Pistolese, M. y Paradies, G. Ca<sup>2+</sup>-Induced ROS Production Promotes Cytochrome c Release From Rat Liver Mitochondria Via MPT-Dependent and MPT-Independent Mechanisms. Role of Cardiolipin. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**[51]:53103-53108.
- Philibin, S. D., Vann, R. E., Varvel, S. A., Covington, H. E., III, Rosecrans, J. A., James, J. R. y Robinson, S. E. Differential Behavioral Responses to Nicotine in Lewis and Fischer-344 Rats. (2005) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **80**[1]:87-92.
- Pisera, D., Candolfi, M., Navarra, S., Ferraris, J., Zaldivar, V., Jaita, G., Castro, M. G. y Seilicovich, A. Estrogens Sensitize Anterior Pituitary Gland to Apoptosis. (2004) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**[4]:E767-E771.
- Poderoso, J. J., Carreras, M. C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. y Boveris, A. Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **328**[1]:85-92.
- Poon, H. F., Calabrese, V., Scapagnini, G. y Butterfield, D. A. Free Radicals: Key to Brain Aging and Heme Oxygenase As a Cellular Response to Oxidative Stress. (2004) *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **59**[5]:478-493.
- Pourahmad, J., O'Brien, P. J., Jokar, F. y Daraei, B. Carcinogenic Metal Induced Sites of Reactive Oxygen Species Formation in Hepatocytes. (2003) *Toxicol. In Vitro.* **17**[5-6]:803-810.
- Prast, H. y Philippu, A. Nitric Oxide As Modulator of Neuronal Function. (2001) *Prog. Neurobiol.* **64**[1]:51-68.
- Prevot, V., Bouret, S., Stefano, G. B. y Beauvillain, J. Median Eminence Nitric Oxide Signaling. (2000) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **34**[1-2]:27-41.
- Racagni, G., Apud, J. A., Locatelli, V., Cocchi, D., Nistico, G., di, Giorgio RM y Muller, E. E. GABA of CNS Origin in the Rat Anterior Pituitary Inhibits Prolactin Secretion. (1979) *Nature.* **281**[5732]:575-578.
- Ragsdale, R. O. Reactions of Nitric (II) Oxide. Ed. Colburn, C. B. Developments in inorganic nitrogen chemistry. (1973) . Elsevier, New York.
- Ramirez, D. C. y Gimenez, M. S. Induction of Redox Changes, Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 by Chronic Cadmium Exposure in Mouse Peritoneal Macrophages. (2003) *Toxicol. Lett.* **145**[2]:121-132.

- Ramirez, D. C., Martinez, L. D., Marchevsky, E. y Gimenez, M. S. Biphasic Effect of Cadmium in Non-Cytotoxic Conditions on the Secretion of Nitric Oxide From Peritoneal Macrophages. (1999) *Toxicology*. **139**[1-2]:167-177.
- Rao, R. V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del, R. G., Bredesen, D. E. y Ellerby, H. M. Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program. An Apaf-1-Independent Intrinsic Pathway. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**[24]:21836-21842.
- Rasmussen, D. D., Boldt, B. M., Wilkinson, C. W., Yellon, S. M. y Matsumoto, A. M. Daily Melatonin Administration at Middle Age Suppresses Male Rat Visceral Fat, Plasma Leptin, and Plasma Insulin to Youthful Levels. (1999) *Endocrinology*. **140**[2]:1009-1012.
- Reiter, R. J. Melatonin: Clinical Relevance. (2003) *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **17**[2]:273-285.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R. M. y Mayo, J. C. Melatonin: Detoxification of Oxygen and Nitrogen-Based Toxic Reactants. (2003) *Adv. Exp. Med. Biol.* **527**:539-548.
- Richardson, B. A., Vaughan, M. K., Petterborg, L. J., Johnson, L. Y., King, T. S., Smith, I. y Reiter, R. J. Natural and Synthetic Analogues of Melatonin and Related Compounds. I. Effects on the Reproductive System of the Male Syrian Hamster. (1983) *J Neural Transm.* **56**[2-3]:187-197.
- Ringer, S. A Further Contribution Regarding the Influence of Different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. (1882) *J Physiol* **4**:29-42.
- Riobo, N. A., Clementi, E., Melani, M., Boveris, A., Cadenas, E., Moncada, S. y Poderoso, J. J. Nitric Oxide Inhibits Mitochondrial NADH:Ubiquinone Reductase Activity Through Peroxynitrite Formation. (2001) *Biochem. J.* **359**[Pt 1]:139-145.
- Riobo, N. A., Melani, M., Sanjuan, N., Fiszman, M. L., Gravielle, M. C., Carreras, M. C., Cadenas, E. y Poderoso, J. J. The Modulation of Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase Activity in Rat Brain Development. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**[45]:42447-42455.
- Rivier, C. Role of Gaseous Neurotransmitters in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **933**:254-264.
- Robb, S. J. y Connor, J. R. Nitric Oxide Protects Astrocytes From Oxidative Stress. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:93-102.
- Robertson, J. D., Orrenius, S. y Zhivotovsky, B. Review: Nuclear Events in Apoptosis. (2000) *J Struct. Biol.* **129**[2-3]:346-358.
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V. y Reiter, R. J. Regulation of Antioxidant Enzymes: a Significant Role for Melatonin. (2004) *J Pineal Res.* **36**[1]:1-9.

- Romare, A. y Lundholm, C. E. Cadmium-Induced Calcium Release and Prostaglandin E2 Production in Neonatal Mouse Calvaria Are Dependent on Cox-2 Induction and Protein Kinase C Activation. (1999) *Arch. Toxicol.* **73**[4-5]:223-228.
- Rottenberg, H. y Wu, S. Quantitative Assay by Flow Cytometry of the Mitochondrial Membrane Potential in Intact Cells. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**[3]:393-404.
- Rustemeier, K., Stabbert, R., Haussmann, H. J., Roemer, E. y Carmines, E. L. Evaluation of the Potential Effects of Ingredients Added to Cigarettes. Part 2: Chemical Composition of Mainstream Smoke. (2002) *Food Chem. Toxicol.* **40**[1]:93-104.
- Saksena, S. K., Dahlgren, L., Lau, I. F. y Chang, M. C. Reproductive and Endocrinological Features of Male Rats After Treatment With Cadmium Chloride. (1977) *Biol. Reprod.* **16**[5]:609-613.
- Santamaria, A., Santamaria, D., Diaz-Munoz, M., Espinoza-Gonzalez, V. y Rios, C. Effects of N Omega-Nitro-L-Arginine and L-Arginine on Quinolinic Acid-Induced Lipid Peroxidation. (1997) *Toxicol. Lett.* **93**[2-3]:117-124.
- Saraste, A. y Pulkki, K. Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. (2000) *Cardiovasc. Res.* **45**[3]:528-537.
- Sastre, J., Pallardo, F. V. y Vina, J. The Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Aging. (2003) *Free Radic. Biol. Med.* **35**[1]:1-8.
- Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E., Williams, D. J. y Moore, M. R. A Global Perspective on Cadmium Pollution and Toxicity in Non-Occupationally Exposed Population. (2003) *Toxicol. Lett.* **137**[1-2]:65-83.
- Satarug, S. y Moore, M. R. Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. (2004) *Environ. Health Perspect.* **112**[10]:1099-1103.
- Satarug, S., Ujjin, P., Vanavanitkun, Y., Nishijo, M., Baker, J. R. y Moore, M. R. Effects of Cigarette Smoking and Exposure to Cadmium and Lead on Phenotypic Variability of Hepatic CYP2A6 and Renal Function Biomarkers in Men. (2004) *Toxicology.* **204**[2-3]:161-173.
- Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Nakane, M., Forstermann, U. y Murad, F. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Regulated Nitric Oxide Synthases. (1992) *Cell Calcium.* **13**[6-7]:427-434.
- Schmidt, M. J., Sawyer, B. D., Truex, L. L., Marshall, W. S. y Fleisch, J. H. LY83583: an Agent That Lowers Intracellular Levels of Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate. (1985) *J Pharmacol. Exp. Ther.* **232**[3]:764-769.
- Shen, H. M., Dong, S. Y. y Ong, C. N. Critical Role of Calcium Overloading in Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. (2001a) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **171**[1]:12-19.
- Shen, H. M., Dong, S. Y. y Ong, C. N. Critical Role of Calcium Overloading in Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. (2001b) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **171**[1]:12-19.

- Shih, C. M., Ko, W. C., Wu, J. S., Wei, Y. H., Wang, L. F., Chang, E. E., Lo, T. Y., Cheng, H. H. y Chen, C. T. Mediating of Caspase-Independent Apoptosis by Cadmium Through the Mitochondria-ROS Pathway in MRC-5 Fibroblasts. (2004) *J. Cell Biochem.* **91**[2]:384-397.
- Shrivastava, P., Pantano, C., Watkin, R., McElhinney, B., Guala, A., Poynter, M. L., Persinger, R. L., Budd, R. y Janssen-Heininger, Y. Reactive Nitrogen Species-Induced Cell Death Requires Fas-Dependent Activation of C-Jun N-Terminal Kinase. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**[15]:6763-6772.
- Silva, E., Lopez-Espinosa, M. J., Molina-Molina, J. M., Fernandez, M., Olea, N. y Kortenkamp, A. Lack of Activity of Cadmium in in Vitro Estrogenicity Assays. (2006) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [Epub ahead of print]
- Smida, A. D., Valderrama, X. P., Agostini, M. C., Furlan, M. A. y Chedrese, J. Cadmium Stimulates Transcription of the Cytochrome P450 Side Chain Cleavage Gene in Genetically Modified Stable Porcine Granulosa Cells. (2004) *Biol. Reprod.* **70**[1]:25-31.
- Smirnova, I. V., Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H. y Andrews, G. K. Zinc and Cadmium Can Promote Rapid Nuclear Translocation of Metal Response Element-Binding Transcription Factor-1. (2000) *J Biol. Chem.* **275**[13]:9377-9384.
- Smith, C. J., Livingston, S. D. y Doolittle, D. J. An International Literature Survey of "IARC Group I Carcinogens" Reported in Mainstream Cigarette Smoke. (1997) *Food Chem. Toxicol.* **35**[10-11]:1107-1130.
- Smith, J. B., Dwyer, S. D. y Smith, L. Cadmium Evokes Inositol Polyphosphate Formation and Calcium Mobilization. Evidence for a Cell Surface Receptor That Cadmium Stimulates and Zinc Antagonizes. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**[13]:7115-7118.
- Sobreira, C., Davidson, M., King, M. P. y Miranda, A. F. Dihydrorhodamine 123 Identifies Impaired Mitochondrial Respiratory Chain Function in Cultured Cells Harboring Mitochondrial DNA Mutations. (1996) *J Histochem. Cytochem.* **44**[6]:571-579.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. Biometry, 3rd edition (1995) WH Freeman. New York.
- Speijers, G. J. Precision of Estimates of an ADI (or TDI or PTWI). (1999) *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **30**[2 Pt 2]:S87-S93.
- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S. R., Maestroni, G. J., Esquifino, A. I., Hardeland, R. y Cardinali, D. P. Role of Melatonin in Neurodegenerative Diseases. (2005) *Neurotox. Res.* **7**[4]:293-318.
- Srisook, K., Jung, N. H., Kim, B. R., Cha, S. H., Kim, H. S. y Cha, Y. N. Heme Oxygenase-1-Mediated Partial Cytoprotective Effect by NO on Cadmium-Induced Cytotoxicity in C6 Rat Glioma Cells. (2005) *Toxicol. In Vitro.* **19**[1]:31-39.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. y Loscalzo, J. S-Nitrosylation of Proteins With Nitric Oxide: Synthesis and Characterization of Biologically Active Compounds. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**[1]:444-448.

- Stasch, J. P., Becker, E. M., onso-Alija, C., Apeler, H., Dembowsky, K., Feurer, A., Gerzer, R., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schroder, H., Schroeder, W., Stahl, E., Steinke, W., Straub, A. y Schramm, M. NO-Independent Regulatory Site on Soluble Guanylate Cyclase. (2001) *Nature*. **410**[6825]:212-215.
- Steinfelder, H. J., Quentin, I. y Ritz, V. A Fast and Sensitive Technique to Study the Kinetics and the Concentration Dependencies of DNA Fragmentation During Drug-Induced Apoptosis. (2000) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. **43**[1]:79-84.
- Stennicke, H. R. y Salvesen, G. S. Caspases - Controlling Intracellular Signals by Protease Zymogen Activation. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*. **1477**[1-2]:299-306.
- Stern, J. E. Nitric Oxide and Homeostatic Control: an Intercellular Signalling Molecule Contributing to Autonomic and Neuroendocrine Integration? (2004) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **84**[2-3]:197-215.
- Stohs, S. J. y Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. (1995) *Free Radic. Biol. Med.* **18**[2]:321-336.
- Stoica, A., Katzenellenbogen, B. S. y Martin, M. B. Activation of Estrogen Receptor-Alpha by the Heavy Metal Cadmium. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**[4]:545-553.
- Sugiyama, M. Role of Cellular Antioxidants in Metal-Induced Damage. (1994) *Cell Biol. Toxicol.* **10**[1]:1-22.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. y Kroemer, G. Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. (1999) *Nature*. **397**[6718]:441-446.
- Suzuki, Y., Chao, S. H., Zysk, J. R. y Cheung, W. Y. Stimulation of Calmodulin by Cadmium Ion. (1985) *Arch. Toxicol.* **57**[3]:205-211.
- Szabadkai, G. y Rizzuto, R. Participation of Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Calcium Handling in Apoptosis: More Than Just Neighborhood? (2004) *FEBS Lett.* **567**[1]:111-115.
- Taguchi, H., Heistad, D. D., Chu, Y., Rios, C. D., Ooboshi, H. y Faraci, F. M. Vascular Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Is Associated With Activation of Ca(++)-Dependent K<sup>+</sup> Channels. (1996) *J Pharmacol. Exp. Ther.* **279**[3]:1514-1519.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P. y Schubert, D. The Regulation of Reactive Oxygen Species Production During Programmed Cell Death. (1998) *J. Cell Biol.* **141**[6]:1423-1432.
- Tatoyan, A. y Giulivi, C. Purification and Characterization of a Nitric-Oxide Synthase From Rat Liver Mitochondria. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**[18]:11044-11048.
- Terkel, J., Blake, C. A. y Sawyer, C. H. Serum Prolactin Levels in Lactating Rats After Suckling or Exposure to Ether. (1972) *Endocrinology*. **91**[1]:49-53.

- The Merck Index. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. (1976) 9. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ.
- Thevenod, F., Friedmann, J. M., Katsen, A. D. y Hauser, I. A. Up-Regulation of Multidrug Resistance P-Glycoprotein Via Nuclear Factor-KappaB Activation Protects Kidney Proximal Tubule Cells From Cadmium- and Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**[3]:1887-1896.
- Thornton, I. Sources and Pathways of Cadmium in the Environment. (1992) *IARC. Sci. Publ.* [118]:149-162.
- Tian, L. y Lawrence, D. A. Metal-Induced Modulation of Nitric Oxide Production in Vitro by Murine Macrophages: Lead, Nickel, and Cobalt Utilize Different Mechanisms. (1996) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**[2]:540-547.
- Turnbull, A. V. y Rivier, C. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Endocrine Responses to Stress: CRF Receptors, Binding Protein, and Related Peptides. (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **215**[1]:1-10.
- Vahter, M., Berglund, M., Akesson, A. y Liden, C. Metals and Women's Health. (2002) *Environ. Res.* **88**[3]:145-155.
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. (2005) *Curr. Med. Chem.* **12**[10]:1161-1208.
- Vasak, M. Advances in Metallothionein Structure and Functions. (2005) *J Trace Elem. Med. Biol.* **19**[1]:13-17.
- Vaughan, M. K., Richardson, B. A., Petterborg, L. J., Vaughan, G. M. y Reiter, R. J. Reproductive Effects of 6-Chloromelatonin Implants and/or Injections in Male and Female Syrian Hamsters (*Mesocricetus Auratus*). (1986) *J Reprod. Fertil.* **78**[2]:381-387.
- Vaux, D. L. y Korsmeyer, S. J. Cell Death in Development. (1999) *Cell.* **96**[2]:245-254.
- Velardez, M. O., Benitez, A. H., Cabilla, J. P., Bodo, C. C. y Duvilanski, B. H. Nitric Oxide Decreases the Production of Inositol Phosphates Stimulated by Angiotensin II and Thyrotropin-Releasing Hormone in Anterior Pituitary Cells. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* **148**[1]:89-97.
- Velardez, M. O., De Laurentiis, A., del Carmen, Diaz M., Lasaga, M., Pisera, D., Seilicovich, A. y Duvilanski, B. H. Role of Phosphodiesterase and Protein Kinase G on Nitric Oxide-Induced Inhibition of Prolactin Release From the Rat Anterior Pituitary. (2000) *Eur. J. Endocrinol.* **143**[2]:279-284.
- Velardez, M. O., Ogando, D., Franchi, A. M. y Duvilanski, B. H. Role of Nitric Oxide in the Metabolism of Arachidonic Acid in the Rat Anterior Pituitary Gland. (2001) *Mol. Cell Endocrinol.* **172**[1-2]:7-12.
- Velardez, M. O., Poliandri, A. H., Cabilla, J. P., Bodo, C. C., Machiavelli, L. I. y Duvilanski, B. H. Long-Term Treatment of Anterior Pituitary Cells With Nitric Oxide Induces Programmed Cell Death. (2004) *Endocrinology.* **145**[4]:2064-2070.

- Verboost, P. M., Flik, G., Lock, R. A. y Wendelaar Bonga, S. E. Cadmium Inhibits Plasma Membrane Calcium Transport. (1988) *J Membr. Biol.* **102**[2]:97-104.
- Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Grijalba, M. T., Meinicke, A. R. y Castilho, R. F. The Role of Reactive Oxygen Species in Mitochondrial Permeability Transition. (1997) *Biosci. Rep.* **17**[1]:43-52.
- Verkhatsky, A. The Endoplasmic Reticulum and Neuronal Calcium Signalling. (2002) *Cell Calcium.* **32**[5-6]:393-404.
- Viaene, M. K., Masschelein, R., Leenders, J., De, Groof M., Swerts, L. J. y Roels, H. A. Neurobehavioural Effects of Occupational Exposure to Cadmium: a Cross Sectional Epidemiological Study. (2000) *Occup. Environ. Med.* **57**[1]:19-27.
- Vijayan, E. y McCann, S. M. The Effects of Intraventricular Injection of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) on Prolactin and Gonadotropin Release in Conscious Female Rats. (1978) *Brain Res.* **155**[1]:35-43.
- Vindis, C., Elbaz, M., Escargueil-Blanc, I., Auge, N., Heniquez, A., Thiers, J. C., Negre-Salvayre, A. y Salvayre, R. Two Distinct Calcium-Dependent Mitochondrial Pathways Are Involved in Oxidized LDL-Induced Apoptosis. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**[3]:639-645.
- Waalkes, M. P. Cadmium Carcinogenesis. (2003) *Mutat. Res.* **533**[1-2]:107-120.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. y Beyersmann, D. Molecular and Cellular Mechanisms of Cadmium Carcinogenesis. (2003) *Toxicology.* **192**[2-3]:95-117.
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J. y Vasson, M. P. Flow Cytometry Study of Polymorphonuclear Neutrophil Oxidative Burst: a Comparison of Three Fluorescent Probes. (2003) *Clin. Chim. Acta.* **331**[1-2]:103-110.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S. y Rao, K. M. Cadmium Inhibits the Electron Transfer Chain and Induces Reactive Oxygen Species. (1997) *Free Radic. Biol. Med.* **36**[11]:1434-1443.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S. y Rao, K. M. Cadmium Inhibits the Electron Transfer Chain and Induces Reactive Oxygen Species. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **36**[11]:1434-1443.
- Watjen, W. y Beyersmann, D. Cadmium-Induced Apoptosis in C6 Glioma Cells: Influence of Oxidative Stress. (2004) *Biometals.* **17**[1]:65-78.
- Watkin, R. D., Nawrot, T., Potts, R. J. y Hart, B. A. Mechanisms Regulating the Cadmium-Mediated Suppression of Sp1 Transcription Factor Activity in Alveolar Epithelial Cells. (2003) *Toxicology.* **184**[2-3]:157-178.
- WHO. Inorganic Constituents And Physical Parameters. Guidelines for Drinking Water-Quality: Health Criteria and other Supporting Information. (1995) **2nd edition**[13.9]. World Health Organization, Geneva.

- WHO. Chemical Aspects. Guidelines for Drinking Water-Quality. (2004) **3rd edition**[8]. World Health Organization, Geneva.
- Wink, D. A. y Mitchell, J. B. Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide. (1998) *Free Radic. Biol. Med.* **25**[4-5]:434-456.
- Winstel, C. y Callahan, P. Cadmium Exposure Inhibits the Prolactin Secretory Response to Thyrotrophin Releasing Hormone (TRH) in Vitro. (1992) *Toxicology.* **74**[1]:9-17.
- Wright, S. N., Brodwick, M. S. y Bittner, G. D. Presynaptic Calcium Currents at Voltage-Clamped Excitator and Inhibitor Nerve Terminals of Crayfish. (1996) *J Physiol.* **496**[Pt 2]:347-361.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. y Currie, A. R. Cell Death: the Significance of Apoptosis. (1980) *Int. Rev. Cytol.* **68**:251-306.
- Yang, Q. H., Xu, J. N., Xu, R. K. y Pang, S. F. Inhibitory Effects of Melatonin on the Growth of Pituitary Prolactin-Secreting Tumor in Rats. (2006) *J Pineal Res.* **40**[3]:230-235.
- Yi, M. J., Park, S. H., Cho, H. N., Yong, Chung H., Kim, J. I., Cho, C. K., Lee, S. J. y Lee, Y. S. Heat-Shock Protein 25 (Hspb1) Regulates Manganese Superoxide Dismutase Through Activation of Nfkb (NF-KappaB). (2002) *Radiat. Res.* **158**[5]:641-649.
- Yin, D., Tamaki, N., Kokunai, T., Yasuo, K. y Yonezawa, K. Bromocriptine-Induced Apoptosis in Pituitary Adenoma Cells: Relationship to P53 and Bcl-2 Expression. (1999) *J. Clin. Neurosci.* **6**[4]:326-331.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T. y Tohyama, M. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, Through Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2-Dependent Mechanism in Response to the ER Stress. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**[17]:13935-13940.
- Yoshida, S. Re-Evaluation of Acute Neurotoxic Effects of Cd<sup>2+</sup> on Mesencephalic Trigeminal Neurons of the Adult Rat. (2001) *Brain Res.* **892**[1]:102-110.
- Yuan, J. y Yankner, B. A. Apoptosis in the Nervous System. (2000) *Nature.* **407**[6805]:802-809.
- Zagotta, W. N. y Siegelbaum, S. A. Structure and Function of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.* **19**:235-263.
- Zeng, X., Jin, T., Buchet, J. P., Jiang, X., Kong, Q., Ye, T., Bernard, A. y Nordberg, G. F. Impact of Cadmium Exposure on Male Sex Hormones: a Population-Based Study in China. (2004a) *Environ. Res.* **96**[3]:338-344.
- Zeng, X., Jin, T., Jiang, X., Kong, Q., Ye, T. y Nordberg, G. F. Effects on the Prostate of Environmental Cadmium Exposure--a Cross-Sectional Population Study in China. (2004b) *Biometals.* **17**[5]:559-565.



Zylber-Haran, E. A., Gershman, H., Rosenmann, E. y Spitz, I. M. Gonadotrophin, Testosterone and Prolactin Interrelationships in Cadmium-Treated Rats. (1982) *J. Endocrinol.* **92**[1]:123-130.

## 8 Apéndice

### Consideraciones históricas sobre el Cadmio

Desde que los humanos son humanos, y como tales adquirieron la capacidad de transmitir sus vivencias de generación en generación (característica casi única de nuestra especie), siempre les gustó vanagloriarse de su historia o de su estirpe creyendo tal vez, que en un pasado glorioso y lleno de aventuras, se encuentra la justificación más rotunda de su existencia presente. Quizás por eso, me siento impulsado a terminar esta tesis con un breve recuento de eventos que comenzaron hace más de 3000 años.

Como Henry Kissinger dijo una vez “No tenemos aliados permanentes, sólo aliados estratégicos...”. Este es el caso del villano de la tesis, el Cd. Este metal tan maltratado por causa de su toxicidad, fue hace mucho tiempo un componente clave para el desarrollo de la civilización occidental.

La historia comienza en la ciudad de Tiro, Fenicia, tras el rapto de Europa. Su padre, el rey Agenor, envió en busca de la princesa secuestrada por un extraño toro a sus hijos Celix, Fénix y Cadmo, con la advertencia de que no regresaran si no la traían de vuelta.

Cadmo llegó a Grecia y fue a Delfos, a consultar al oráculo por su hermana. Como era costumbre, la Pitia no fue muy precisa y escribió:

- No busques más a tu hermana, pues ella es feliz. Sigue a la vaca blanca y establécete donde ésta se detenga.

Cadmo siguió el consejo enviado por Febo Apolo y en la Focea encontró una vaca blanca que lo condujo a la región que más adelante se llamó Cadmea. Allí fundó la orgullosa ciudad de las siete puertas, Tebas, cuna de Edipo y Heracles descendientes del mismo Cadmo.

Cadmo, quien por honrar a Palas Atenea, mató a un dragón hijo de Ares, lo cual obviamente enfureció enormemente al dios de la Guerra, realizó muchas

proezas de héroe. Sus hazañas al servicio de Ares finalmente lo congraciaron con el dios, quien le entregó la mano de su hija Armonía, habida con Afrodita.

Antes de su apoteosis, Cadmo legó a los griegos dos cosas claves que contribuyeron a la civilización del mundo occidental (por aquel entonces muy poco desarrollado) y que ulteriormente permitieron que se escriba esta tesis: el alfabeto con vocales (¡que difícil debe ser leer sin ellas!) y la técnica para la fundición del hierro. Para poder fundir a este duro metal, los griegos lo mezclaban con un mineral blanquecino que, como mineral puro, sólo se encontraba en la región de Cadmea y que Friedrich Stromayer bautizó como cadmio, en 1817. La asociación entre el hierro y el cadmio llegó algo tarde a los muros de Ilión, pero defendió a la Hélade junto con Milkíades en Maratón y viajó sobre Bucéfalo hasta más allá de la derrotada Persia nada menos que junto al muslo de Alejandro. La historia posterior, como se ve, es mucho menos heroica.



Cadmo y Atenea, vasija del  
sigilo IV a.C.