



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Mecanismos apoptóticos del óxido nítrico y su papel en la regulación de la muerte celular adenohipofisaria

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

Autora: Lic. Leticia Inés Machiavelli

Directora de Tesis: Dra. Beatriz H. Duvilanski

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem



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

Buenos Aires, 2007

**Mecanismos apoptóticos del óxido nítrico y
su papel en la regulación de la muerte
celular adenohipofisaria**

Mecanismos apoptóticos del óxido nítrico y su papel en la regulación de la muerte celular adenohipofisaria

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un mediador clave de múltiples procesos biológicos. En la adenohipofisis, además de regular la secreción hormonal, el NO puede inducir apoptosis o bien tener un papel citoprotector. Esto muestra que esta molécula tiene un papel activo en la regulación de la vida y muerte celular adenohipofisaria. El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar la participación del NO en los procesos de muerte celular en la adenohipofisis y sus mecanismos de acción, estableciéndose dos objetivos puntuales:

1. Investigar los mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO, situación que puede presentarse durante procesos inflamatorias.

2. Investigar el proceso de regulación de la muerte celular luego de la ovariectomía y dilucidar el papel del NO en este proceso.

Los resultados del primer objetivo han permitido identificar algunos de los mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis inducida por concentraciones micromolares de NO en las células adenohipofisarias. Dentro de los mecanismos que caracterizan a la vía apoptótica mitocondrial, se pudo establecer la sobreproducción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ROS) como uno de los eventos disparadores de esta cascada apoptótica. Este aumento de ROS indujo cambios en la expresión de Bax y Bcl-2 y la activación posterior de la caspasa 3, que llevó finalmente a la muerte celular. Paralelamente a

esta secuencia de eventos, el NO modificó la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes y alteró los niveles intracelulares de glutatión, lo cual demuestra un papel activo del sistema de defensa antioxidante celular durante el desarrollo de este proceso apoptótico.

Los resultados del segundo objetivo mostraron, tanto *in vivo* como *in vitro*, que luego de la ovariectomía hay un aumento de la muerte celular en la glándula debido a la inducción de apoptosis. Paralelamente, se observó un incremento en los niveles adenohipofisarios de NO. Estos cambios pudieron ser prevenidos por el tratamiento con inhibidores de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) demostrando, por primera vez, que el NO tiene un papel clave en la ejecución de la muerte celular desencadenada en la adenohipófisis luego de la ovariectomía.

Palabras Claves:

Óxido nítrico, adenohipófisis, muerte celular, mecanismos apoptóticos, inflamación, ovariectomía

Nitric oxide apoptotic mechanisms and its role in the regulation of anterior pituitary cell death

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a key mediator of multiple biological processes. In addition to its function as a regulator of anterior pituitary hormonal secretion, NO can induce or prevent apoptosis in the gland. This shows that this molecule has an active role in the regulation of anterior pituitary cell death and survival. The general objective of this thesis was to study the role of NO in the anterior pituitary cell death processes and its mechanisms of action, focusing on two specific objectives:

1. To study the intracellular mechanisms involved in the apoptosis induced by the exposition to high NO concentration, situation that usually comes up during inflammatory processes.
2. To study the regulation of anterior pituitary cell death after ovariectomy and to elucidate the participation of NO in this process.

Regarding the first objective, some of the intracellular mechanisms involved in the apoptosis induced in the anterior pituitary cells by micromolar NO concentrations could be identified. Among the characteristic mechanisms described for the mitochondrial apoptotic pathway, the overproduction of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) has an essential role as a trigger of the NO-induced apoptotic cascade. The NO-induced ROS increase promoted changes on Bax and Bcl-2 expression and induced caspase 3 activation leading, finally, to cell death. Concomitant to this sequence of events, NO modified the activity of the different antioxidant enzymes and promoted changes in the

intracellular glutathione levels, showing that the cellular antioxidant defense system also actively participates during the NO apoptotic process.

In relation to the second objective, the results showed, *in vitro* as well as *in vivo*, that after ovariectomy there is an increase of cell death due to the induction of apoptosis in the gland. Concomitantly, an increase of pituitary NO levels was observed. Both events were prevented by the treatment of cells with neuronal nitric oxide sintase (nNOS) inhibitors showing, for the first time, that NO has a key role in the execution of anterior pituitary cell death after ovariectomy.

Key words:

Nitric oxide, anterior pituitary gland, cell death, apoptotic mechanisms, inflammation, ovariectomy

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz, por muchísimas razones: por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la posibilidad de realizar mi doctorado. Por el apoyo tanto profesional como personal. Y especialmente por todo el esfuerzo hecho durante este año para que hoy pueda estar presentando esta tesis.

A mi grupo de laboratorio: a Ari, que además de ser mi amigo de toda la carrera fue mi guía durante los primeros años de mi doctorado. A Fer, por las buenas charlas durante tantas horas compartidas en el cuarto de cultivo (nuestro segundo hogar), por luchar codo a codo en la puesta a punto de tantas técnicas. Por escucharme y aconsejarme. A Jimena, Nury y Fede, mis otros compañeros de laboratorio.

A todos mis compañeros de la cátedra. En primer lugar a los que convivieron conmigo en el laboratorio 1: Caro, Pau, Patri y Lucas. Al resto de la gente de la cátedra (no los nombro a todos porque son muchos pero tengo presente a cada uno). A todos gracias por todos los divertidos momentos y por su colaboración. A la Dra. Pasquini y al Dr. Soto por ofrecerme un espacio en esta cátedra donde me gustó trabajar.

A mi familia y amigos, muchos de los cuales no entendieron bien qué era esto de hacer experimentos y realizar un doctorado, pero que de una u otra forma, siempre estuvieron ahí.

A Carmen.

A la Universidad de Buenos Aires, por mi formación académica.

A CONICET, por darme la posibilidad de una segunda beca doctoral, producto de la cual resultó este trabajo de tesis.

Y a Dari. Obviamente las palabras no alcanzan para expresar todo mi agradecimiento por haberme apoyado (o mejor dicho “soportado”) durante esta etapa que me costó recorrer.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	23
3 MECANISMOS APOPTÓTICOS DEL ÓXIDO NÍTRICO	24
3.1 Objetivo	24
3.2 Materiales & Métodos	25
3.3 Resultados	44
3.4 Discusión	81
3.5 Conclusión	96
4 ÓXIDO NÍTRICO, OVARIECTOMÍA Y MUERTE CELULAR	97
4.1 Objetivo	97
4.2 Materiales & Métodos	98
4.3 Resultados	104
4.4 Discusión	116
4.5 Conclusión	123
5 CONCLUSIÓN GENERAL	124
6 BIBLIOGRAFÍA	127
APÉNDICE: Abreviaturas	145

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña y no polar capaz de difundir libremente a través de las membranas celulares y de esta manera ejercer sus diferentes funciones biológicas. Posee un electrón desapareado, lo que lo convierte en un radical libre, aunque sin la fuerte reactividad asociada normalmente a estos compuestos (Ragsdale 1973; Cotton & Wilkinson 1988).

Biosíntesis del NO

En los organismos superiores, el NO es producido por la oxidación del grupo amino terminal de la L-arginina (Palmer et al. 1988) a partir de una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Existen tres isoformas distintas de óxido nítrico sintasas (NOSs) las cuales son codificadas por genes localizados en diferentes cromosomas y presentan diferencias en cuanto a su localización subcelular, regulación y actividad catalítica.

La NOS neuronal (nNOS o NOS I) es una proteína que fue identificada por primera vez en neuronas, se localiza tanto en el citosol como asociada a membrana y es codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 12 (Knowles et al. 1989). La NOS endotelial (eNOS o NOS III) se identificó por primera vez en células endoteliales, es una proteína asociada a membrana y su gen se localiza en el cromosoma 7 (Ignarro et al. 1987). Ambas enzimas se expresan constitutivamente en las células, su actividad es dependiente de calcio-calmodulina (Bredt & Snyder 1990) y son las responsables de la formación de concentraciones bajas de NO (Nüssler & Billiar 1993; Tuteja et al. 2004).

La NOS inducible (iNOS o NOS II) es una proteína identificada inicialmente en macrófagos, se encuentra en el citoplasma y su gen reside en el cromosoma 17 (Lyons et al. 1992). Posee un dominio similar a la calmodulina, lo que hace que su

actividad sea independiente de calcio. Normalmente no se detecta en las células, su expresión es inducida por citoquinas proinflamatorias o agentes generadores de estrés intracelular, y produce de manera casi instantánea concentraciones altas y persistentes de NO (Tayeh & Marletta 1989; Lyons et al. 1992; Nüssler & Billiar 1993; Tuteja et al. 2004).

A finales de la década pasada se describió una nueva isoforma de la familia de las NOSs, que fue llamada NOS mitocondrial (mtNOS) debido a que fue descubierta en mitocondrias de hígado de rata, utilizando anticuerpos anti-iNOS (Giulivi et al. 1998; Tatoyan & Giulivi 1998). Existen diferentes variantes de la mtNOS, todas ellas dependientes de calcio (Riobó et al. 2002). Actualmente se reconoce que la mtNOS proviene de la modificación post-traducciona l y/o post-transcripcional de la nNOS (Haynes et al. 2004).

A pesar de que en un principio parecía existir una expresión tejido-específica para cada una de las isoformas, en la actualidad está completamente demostrada la localización de más de una isoforma en un mismo tejido e incluso en un mismo tipo celular. Más aún, la división entre NOS constitutiva e inducible parece estar en discusión ya que se ha demostrado que tanto la actividad como la síntesis de la nNOS y la eNOS pueden ser moduladas por diversos factores (Alderton et al. 2001; Tuteja et al. 2004).

La NOS utiliza la L-arginina como sustrato produciendo cantidades equimolares de NO y L-citrulina. Esta reacción ocurre en presencia de oxígeno molecular (O_2), NADPH, calmodulina y de cuatro cofactores/coenzimas: tetrahidrobiopterina, FMN, FAD y hemo protoporfirina IX (Knowles et al. 1989; Knowles & Moncada 1994) (Fig. 1). Una vez sintetizado, el NO difunde libremente con una vida media de 4 segundos y una constante de difusión de $2300 \mu m^2/seg$. Estos valores dan como resultado una distancia de difusión estimada en $90 \mu m$ aproximadamente, con lo cual puede decirse que el NO es capaz de ejercer sus acciones tanto sobre la célula donde es producido como sobre las células vecinas (Kasai & Petersen 1994).

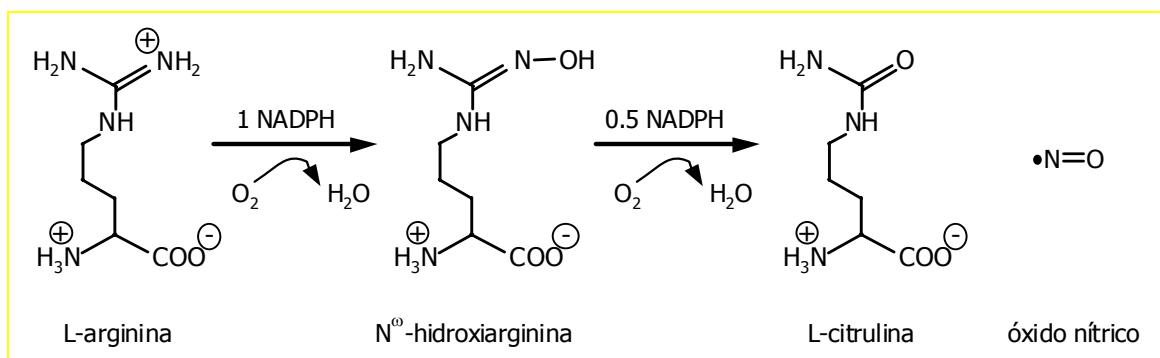


Figura 1: Biosíntesis del NO. La descripción del proceso de síntesis se detalla en el texto.

Acciones del NO

Con el descubrimiento de la formación intracelular de NO, las investigaciones crecieron incesantemente con el objetivo de dilucidar el siguiente interrogante: ¿Cuál es el rol de este radical libre en los procesos biológicos?

El NO tiene innumerables funciones a nivel fisiológico, tanto en situaciones normales como patológicas del organismo. Entre los procesos fisiológicos más conocidos se encuentran: neurotransmisión, vasodilatación, inflamación y respuesta inmune, génesis y metabolismo de células musculares, angiogénesis, regulación hormonal y regulación de las funciones neuronal, renal, ósea, gastrointestinal, pancreática, uterina y del espermatozoide. A su vez, el NO participa del desarrollo de varias patologías inflamatorias tales como artritis, miocarditis y nefritis, así como también de otras condiciones patológicas como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Moncada et al. 1991; Cameron & Campbell 1998; Ziche & Morbidelli 2000; Bogdan 2001; Herrero & Gagnon 2001; Hintze 2001; Jaiswal et al. 2001; Prast & Philippu 2001; Stamler & Meissner 2001; Van't Hof & Ralston 2001; Yago et al. 2001; Pallone & Matson 2002).

Mecanismos de acción del NO

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 (Fig. 2). En fase gaseosa, el NO puede reaccionar con el O₂ dando como resultado la formación de dióxido de nitrógeno; en cambio, en fase acuosa la reacción entre el NO y el O₂ genera cantidades iguales de nitritos y nitratos (Feelisch 1991). Además, dependiendo del microentorno, el NO puede ser convertido en otras especies reactivas tales como el catión nitroso o el anión nitroxilo.

Dentro de la célula, el NO puede reaccionar rápidamente, con constantes de velocidad iguales a su constante de difusión, con el anión superóxido (O₂⁻) formando peroxinitrito (ONOO⁻) (Stamler et al. 1992; Huie & Padmaja 1993), uno de los radicales libres más reactivos y nocivos a través del cual el NO produce nitraciones de proteínas y desaminaciones del ADN (Wink & Mitchell 1998; Koppenol 1999; Gow et al. 2002). A su vez, el NO puede reaccionar directamente con metales de transición, formándose complejos NO-metal (Wink & Mitchell 1998; Koppenol 1999). Uno de los blancos principales, debido a este tipo de reacciones, lo constituyen las hemo-proteínas tales como la guanilil ciclasa soluble (sGC), la catalasa y las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Drapier 1997; Gow & Stamler 1998; Cooper 1999). Estas interacciones promueven uno de los efectos del NO con mayores implicancias fisiológicas ya que permiten modular la expresión y síntesis de diferentes enzimas y proteínas claves del metabolismo y del ciclo celular. Asimismo, algunos de sus efectos fisiológicos también pueden ser mediados debido a su interacción con grupos aminos o tioles de proteínas ricas en cisteína (Pryor et al. 1982; Gow et al. 2002; Bryan et al. 2004).

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 celular y del estado de óxido-reducción (redox) de la célula (Wink & Mitchell 1998).

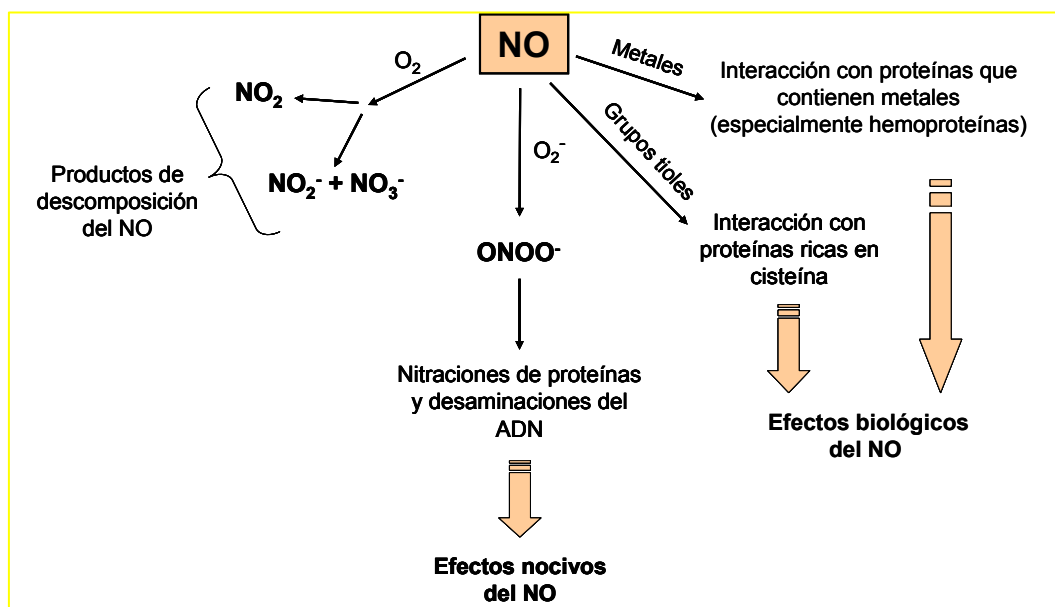


Figura 2: Mecanismos de acción del NO. Los diferentes mecanismos de acción se detallan en el texto.

Apoptosis

Actualmente se conoce que la célula puede morir básicamente de dos formas diferentes: necrosis y apoptosis (Buja et al. 1993; Malhi et al. 2006). La necrosis es un proceso espontáneo disparado por una alteración 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. La muerte por necrosis termina con el estallido de la célula y liberación del contenido intracelular al entorno, lo que promueve el desarrollo de procesos inflamatorios en los tejidos (Buja et al. 1993). La apoptosis, en cambio, es una forma de "suicidio celular" genéticamente programada en la que una cascada de eventos provoca el desensamblaje ordenado de la célula, utilizando para ello energía proveniente del ATP (van Gurp et al. 2003; Garrido & Kroemer 2004; Malhi et al. 2006). Debido al gasto de energía que implica este tipo de muerte, así como también al estricto

control que rige cada una de sus etapas, suele denominarse a la apoptosis como “muerte celular programada”. En la apoptosis la célula no se rompe ni libera el contenido intracelular, sino que se fragmenta formando vesículas llamadas “cuerpos apoptóticos”, que pueden ser fagocitados por las células vecinas, evitando la generación de procesos inflamatorios (Wyllie et al. 1980). Las primeras descripciones de la apoptosis se basaron en las características morfológicas y ultraestructurales que presentaban las células que se volvían inviables, entre ellas se encuentran la disminución del volumen celular, la condensación cromatínica, la fragmentación del ADN, y la disgregación de la célula en cuerpos apoptóticos (Fig. 3). Posteriormente, gracias a los estudios genéticos realizados en el nematode *Caenorabditis elegans*, se develaron gran parte de los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen a estos cambios morfológicos y ultraestructurales (Vaux & Korsmeyer 1999).

En el reino animal, la muerte por apoptosis se da en forma generalizada en 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 auto reactivos durante la maduración del sistema inmune. 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 (Kerr et al. 1972; Wyllie et al. 1980; Ellis et al. 1991; Garrido & 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 & Yankner 2000).

La necrosis es causada generalmente por perturbaciones metabólicas agudas en las células (Malhi et al. 2006). En cambio, las señales que desencadenan la apoptosis 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 (Garrido & Kroemer 2004; Malhi et al. 2006).

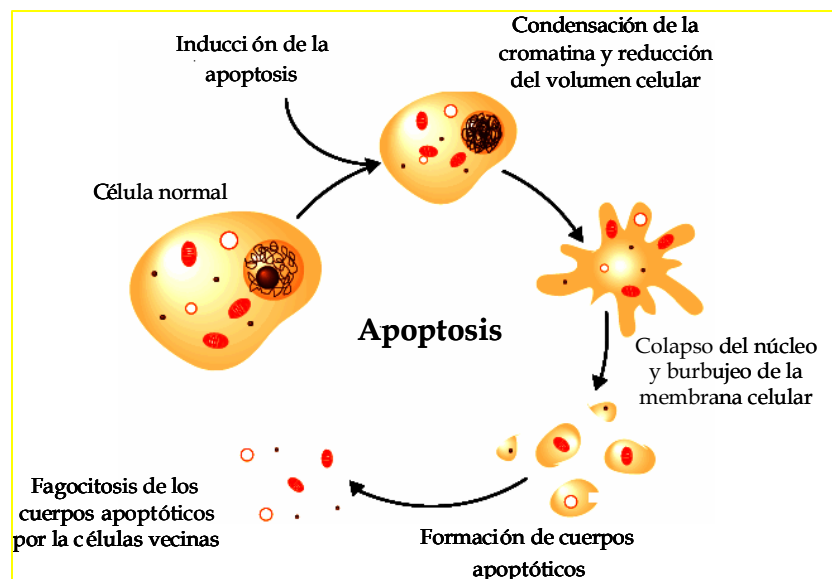


Figura 3: Cambios morfológicos asociados a la apoptosis. Durante el proceso apoptótico la célula sufre cambios morfológicos y bioquímicos secuenciales. En una primera etapa se produce la condensación de la cromatina y la reducción del volumen celular. Los cambios morfológicos en el núcleo prosiguen hasta su colapso y la formación de pequeños fragmentos nucleares. En una última etapa, la célula también se fragmenta formando los llamados cuerpos apoptóticos, pequeñas vesículas de membrana plasmática que contienen citoplasma, organelas y restos nucleares. Estos cuerpos apoptóticos son finalmente fagocitados por las células vecinas.

Muchos estímulos proapoptóticos convergen en un punto común: la activación de un conjunto de proteínas denominadas caspasas (Thornberry & Lazebnik 1998; Stennicke & Salvesen 2000). Las caspasas constituyen una familia muy conservada de cisteína-proteasas, y en mamíferos ya han sido identificados 13 miembros. 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 & Salvesen 2000). A grandes rasgos, las caspasas pueden dividirse en dos grupos: 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. Entre las principales caspasas iniciadoras se encuentran las caspasas 8 y 9,

mientras que la caspasa 3 es la caspasa efectora por excelencia (Dotto & Silke 2004).

Existen dos vías apoptóticas clásicas descritas de acuerdo con el tipo de estímulo proapoptótico que la dispara (Fig. 4) (Stennicke & Salvesen 2000; Fumarola & Guidotti 2004; Garrido & Kroemer 2004).

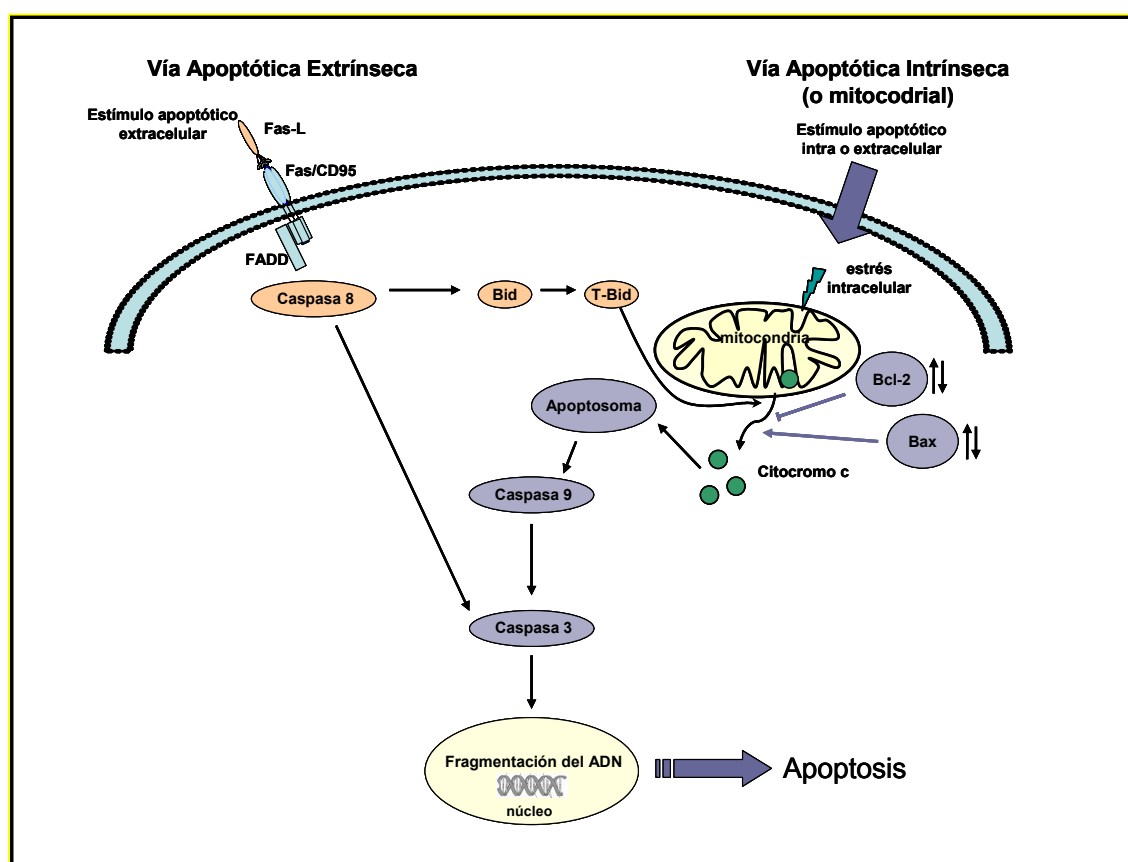


Figura 4: Esquema de las dos vías apoptóticas clásicas. La cascada de eventos que caracterizan a ambas vías apoptóticas se detalla en el texto.

La vía apoptótica extrínseca es desencadenada por la unión de un ligando extracelular específico a receptores, llamados receptores de muerte (Fumarola & 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 a la procaspasa 8 que según el “modelo de proximidad”, al encontrarse en alta concentración local, se autoprocasa y autoactiva. 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 & Grant 2003).

La vía apoptótica intrínseca en cambio, no depende de receptores, y es inducida por diferentes agentes que afectan la homeostasis celular, como por ejemplo la radiación UV, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y niveles elevados de calcio citoplasmático (Fumarola & Guidotti 2004). La mitocondria es reconocida como uno de los principales sensores de estrés intracelular y distintos factores que afectan su integridad pueden causar apoptosis (Green & Reed 1998; Desagher & Martinou 2000). En base a esto, los eventos que se desencadenan luego de producirse daño mitocondrial, se utilizan frecuentemente para ejemplificar los mecanismos involucrados en la vía apoptótica intrínseca, por lo que también se la conoce como vía apoptótica mitocondrial.

Generalmente se asume que dicha vía se inicia con una disminución del potencial de la membrana mitocondrial interna debido a la alteración de la integridad de esta membrana provocada por la acción de diversos estímulos apoptóticos. El mecanismo más conservado propuesto para explicar este fenómeno es la apertura de un poro transmembrana denominado “poro de permeabilidad transitoria” (PPT). La apertura del PPT causa un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, provocando la disipación del gradiente electroquímico. La matriz mitocondrial se expande y la membrana externa se disgrega facilitando la salida hacia el citoplasma de varios factores mitocondriales localizados en el espacio intermembrana (Wilson 1998; Polster &

Fiskum 2004). Entre los factores liberados, el citocromo c cumple un papel muy importante ya que promueve la activación de las caspasas (Stennicke & Salvesen 2000; Harada & Grant 2003; Garrido & Kroemer 2004). El citocromo c se une 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 la caspasa 3, disparando el proceso de muerte celular (Stennicke & Salvesen 2000).

Otro miembro clave en esta vía es la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia consta de al menos 15 miembros con funciones opuestas (pro y antiapoptóticas), y actualmente se sugiere que el destino de la célula estaría determinado por el balance entre los miembros de ambos grupos (Adams & Cory 1998; Reed 2006). Una señal apoptótica puede desequilibrar este balance inhibiendo la expresión de las proteínas antiapoptóticas y/o aumentando la de las proapoptóticas. Los miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL se localizan predominantemente en la membrana mitocondrial regulando su integridad y la liberación de citocromo c. Los miembros proapoptóticos como Bax, Bim y Bad se localizan en el citoplasma, y ante un estímulo apoptótico se redistribuyen hacia la mitocondria y contrarrestan el efecto protector de Bcl-2 o Bcl-XL alterando la permeabilidad de la membrana y facilitando la liberación de citocromo c (Reed 2006).

Además de las proteínas efectoras descritas, esta vía consta de moléculas adaptadoras tales como los inhibidores de apoptosis (IAPs) y la proteína Smac/DIABLO (Verhagen et al. 2000; Salvesen & Duckett 2002; van Gurp et al. 2003).

Hoy se sabe que los eventos que caracterizan a la vía apoptótica intrínseca no ocurren tan rigurosamente. Hay numerosas variantes descritas para cada estímulo y tipo celular estudiado. Por ejemplo, la despolarización de la membrana mitocondrial interna era considerada, hasta hace algunos años, el evento universal disparador esta vía, pero varios estudios demostraron que esta despolarización no es un evento esencial. Puede ocurrir que la liberación de citocromo c y la activación de caspasas preceda a este fenómeno o simplemente que no haya

despolarización de la membrana mitocondrial interna durante el proceso apoptótico (Finucane et al. 1999; Krhon et al. 1999; Singh et al. 2002; Lo & Kim 2004).

Más allá de estas vías apoptóticas muy bien caracterizadas, más recientemente se han descrito varios procesos apoptóticos independientes de caspasas (Susin et al. 1999; Garrido & Kroemer 2004). En este sentido, hace pocos años, el grupo de Kroemer identificó la proteína mitocondrial llamada AIF, que es capaz de inducir fragmentación del ADN, condensación nuclear, disipación del potencial de membrana mitocondrial y exposición de fosfatidilserinas hacia la cara externa de la membrana plasmática, cuya acción no es modificada por inhibidores de caspasas (Susin et al. 1999).

Otra vía alternativa que cobró interés en los últimos años es la que involucra al retículo endoplásmico (RE). El RE constituye otro de los sensores de estrés intracelular ya que es el principal sitio de síntesis y plegamiento de proteínas y uno de los reservorios más importantes del calcio intracelular (Paschen 2001). La perturbación de la homeostasis del calcio, el aumento de los niveles de ROS y la inhibición de la glicosilación de proteínas constituyen las causas principales de la acumulación de proteínas mal plegadas que altera la funcionalidad del RE y puede de esta forma desencadenar una cascada apoptótica independiente del estado de la mitocondria (Morishima et al. 2002; Rao et al. 2004). La inducción de estrés en el RE induce la síntesis de moléculas específicas como Bip y CHOP, cuyo papel es reestablecer la funcionalidad normal del RE (Zhao & Ackerman 2006). Cuando los niveles de estrés sobrepasan dicha respuesta, son disparados los mecanismos que llevan a la muerte celular. Entre ellos pueden mencionarse la activación de la caspasa 12 (proteasa que se encuentra en la superficie del RE), la cual puede activar a la caspasa 9 y por ende a la caspasa 3 (Nakagawa & Yuan 2000; Yoneda et al. 2001; Morishima et al. 2002; Wang & El-Deiry 2004). También puede inducirse la activación de calpaínas, proteasas dependientes de calcio asociadas al RE que activan a la caspasa 3 pero que también pueden promover un camino apoptótico independiente de caspasas (Carafoli & Molinari 1998;

Nakagawa et al. 2000). Estudios más recientes muestran que tanto miembros proapoptóticos como Bax y Bak como antiapoptóticos como Bcl-2, se encuentran asociados también a la membrana del RE regulando el contenido de calcio de este reservorio intracelular. Cualquier estímulo proapoptótico que provoque un desbalance en los miembros de esta familia puede causar una salida masiva de calcio hacia el citosol y de esta forma promover la activación de caspasas y la apoptosis por un mecanismo paralelo al de la vía mitocondrial (Mathai et al. 2005).

Dada la cantidad de factores involucrados y que no siempre existe una misma secuencia temporal de activación de las cascadas de señales en los distintos tipos celulares, resulta difícil predecir la participación de una vía apoptótica en un tipo celular no caracterizado con anterioridad. Más aún, la ausencia en algunos casos de uno o más de los eventos característicos descritos en el proceso de muerte celular programada, demuestra que ninguno de los procesos conocidos hasta el momento logra definir completamente el proceso apoptótico.

NO y Apoptosis

Dentro de las múltiples funciones que cumple el NO en los procesos biológicos, esta molécula tiene un papel fundamental como regulador de la vida y muerte de la célula ya que posee actividades tanto pro como antiapoptóticas (Wink & Mitchell 1998; Kim et al. 1999; Leong et al. 2002). La capacidad del NO para inducir apoptosis fue descrita por primera vez por Albina et al. en 1993, quienes demostraron que el NO provocaba muerte celular programada en macrófagos. En trabajos subsiguientes, se observó que existían varios tipos celulares especialmente sensibles a la acción del NO, tales como células de los islotes pancreáticos, hepatocitos, células del sistema inmune y ciertas neuronas (Fehsel et al. 1995; McDaniel et al. 1997; Heneka et al. 1998). Posteriormente, se describieron acciones antiapoptóticas del NO en diversos tipos celulares, incluyendo eosinófilos, hepatocitos y células endoteliales y neuronales (Dimmeler et al. 1997a; Kim et al. 1997; Tsai & Li et al. 1998; Hebestreit et al. 1998). Este efecto dual depende de la concentración y del tiempo de exposición de NO, así como también del tipo celular afectado, su entorno extracelular y su estado fisiológico (Shen et al. 1998;

Chung et al. 2001; Bobba et al. 2007). Generalmente los efectos antiapoptóticos están asociados con concentraciones bajas de NO (submicromolares) derivadas principalmente de la actividad de la nNOS y la eNOS. En cambio, los efectos apoptóticos están asociados con concentraciones relativamente altas (micromolares), continuas y localizadas de NO, como las producidas luego de la inducción de la iNOS (Shen et al. 1998; Liu & Stamler 1999).

Mecanismos apoptóticos del NO

No existe una única vía por la cual el NO dispara el proceso apoptótico. Actualmente, hay descriptos diversos mecanismos en los distintos tipos celulares estudiados. Además, la comprensión de los mismos se dificulta teniendo en cuenta que dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición, el NO puede pasar de tener un efecto protector a uno apoptótico en el mismo tipo celular.

El NO puede activar a la guanilil ciclasa soluble (sGC), enzima que actúa como receptor de NO dentro de la célula y convierte GTP en GMP cíclico (cGMP), un segundo mensajero con un amplio espectro de acción (Denninger & Marletta 1999; Krumenacker et al. 2004). A través de la activación de la vía sGC/cGMP, el NO ejerce la mayoría de sus efectos biológicos, incluyendo aquellos relacionados con la regulación del proceso apoptótico (Taimor et al. 2000; Heinloth et al. 2002; Valenti et al. 2003; Thippeswamy et al. 2005).

El NO puede también alterar directamente la estructura del ADN, mediante la deaminación de desoxinucleótidos, provocando rupturas en el ADN (De Rojas et al. 1995; Burney et al. 1998), o bien inhibiendo los procesos de reparación del mismo.

En varios tipos celulares, la acumulación de la proteína supresora de tumores p53 ha sido identificada como un indicador temprano del efecto apoptótico del NO (Calmels et al. 1997; Hofseth et al. 2004). Esta proteína juega un papel muy importante como reguladora del ciclo celular, pudiendo promover el arresto del mismo o desencadenar apoptosis según el grado de daño que presente la célula (Hofseth et al. 2004). En condiciones normales, los niveles intracelulares de esta proteína son muy bajos, casi indetectables, debido a que la misma es rápidamente

degradada para controlar su actividad supresora (Zhou & Brüne 2005). Ante una situación de estrés celular, los niveles de p53 pueden aumentar notablemente principalmente a causa de modificaciones post-traduccionales que inhiben su degradación (Brooks & Gu 2003). El NO puede provocar la acumulación de p53 mediante diversos mecanismos, tales como la estabilización de la proteína, la inhibición de su degradación proteosomal o la activación de kinasas (Glockzin et al. 1999; Kim et al. 2002; Brüne y Schneiderhan 2003). Se ha demostrado que la acumulación de p53 puede inducir apoptosis a través de un aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas tales como Bax (Miyashita & Reed 1995). Sin embargo, también se ha observado que el NO es capaz de inducir la transcripción de la proteína proapoptótica Bax y la represión de la antiapoptótica Bcl-2, independientemente de p53 (Messmer et al. 1996; Nishio and Watanabe 1998).

Diferentes estudios indican que las especies reactivas del oxígeno (ROS) son mediadoras del efecto apoptótico del NO (Brown & Borutaite 2001; Hu & Brindle 2005). En condiciones normales, durante la respiración mitocondrial hay una tasa constante de formación de ROS (principalmente O_2^- y H_2O_2), debido a la reducción sólo parcial del O_2 (Chance et al. 1979; Elliott & Volkert 2004). El NO es uno de los principales reguladores de la respiración mitocondrial dada su capacidad de unirse reversiblemente al complejo citocromo c oxidasa (Complejo IV), causando una inactivación transitoria del mismo y favoreciendo el incremento de la formación de ROS durante la cadena de transporte de electrones (CTE) (Poderoso et al. 1996). Los niveles altos de ROS generan estrés oxidativo en la mitocondria y pueden dañar la membrana mitocondrial interna provocando una caída de su potencial. Como consecuencia, pueden liberarse al citoplasma factores proapoptóticos como el citocromo c y de esta forma desencadenarse la vía apoptótica intrínseca (Tan et al. 1998; Droge 2002).

Paralelamente, el NO puede aumentar los niveles intracelulares de ROS debido a la alteración del sistema de defensa antioxidante celular. Este sistema está formado por componentes enzimáticos y no enzimáticos que mantienen el

balance redox de la célula previniendo los efectos tóxicos causados por un exceso de ROS. Entre los componentes enzimáticos más importantes pueden mencionarse la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la superóxido dismutasa (SOD). El glutatión reducido (GSH) es el componente no enzimático por excelencia (Townsend et al. 2003), se encuentra abundantemente en el citoplasma (0.5-10 mM) y también está distribuido en diferentes organelas como la mitocondria y el RE. Este tiol tiene capacidad antioxidante *per se* y actúa también como cofactor de la GPx. Tanto la actividad como la expresión de los distintos componentes del sistema antioxidante pueden ser moduladas por el NO a través de modificaciones traduccionales y post-traduccionales (Cooper 1999; Foster & Stamler 2004).

El NO puede alterar también la homeostasis del calcio provocando la salida al citoplasma del calcio contenido en los reservorios intracelulares (mitocondria y RE). Tanto esto como la generación de estrés oxidativo pueden dañar la funcionalidad del RE y de esta forma el NO puede ejercer su efecto citotóxico disparando la vía apoptótica del RE (Chakraborti et al. 1999; Weiming et al. 2004).

Como puede verse, la actividad proapoptótica del NO puede estar mediada por una amplia variedad de mecanismos los cuales pueden estar conectados en algún punto de la cascada de señalización o ser totalmente independientes. Por tal motivo, resulta casi imposible determinar *a priori* cuál o cuales de los mecanismos descritos podrían ser inducidos por el NO en un sistema aún no estudiado como las células adenohipofisarias.

La adenohipofisis

La hipófisis es una glándula situada bajo el piso del diencéfalo, que se encuentra en íntima relación con el hipotálamo (Page 1994). Está constituida por la adenohipofisis (o glándula pituitaria anterior) y la neurohipofisis (o hipófisis posterior) (Fig. 5).

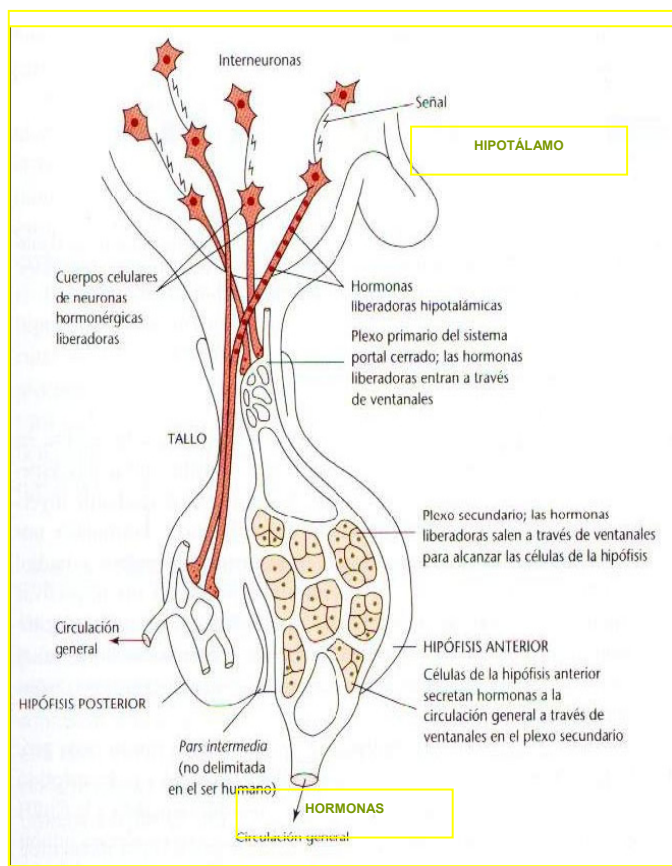


Figura 5: Conexión hipotálamo-hipófisis. La hipófisis, constituida por la adenohipófisis (glándula pituitaria anterior) y la neurohipófisis (hipófisis posterior), está conectada con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario. Las células de la adenohipófisis responden a factores liberadores hipotalámicos secretando la hormona correspondiente hacia la circulación general. Esta hormona ejerce su efecto en una glándula periférica blanco y puede actuar también sobre el hipotálamo generando un circuito inhibitorio y reduciendo la liberación del factor estimulador. La glándula periférica responde secretando su propia hormona, que tiene efecto sobre otros tejidos y forma otro circuito inhibitorio reduciendo la secreción de la hormona adenohipofisaria al actuar tanto a nivel de la hipófisis como del hipotálamo.

La adenohipófisis es principalmente glandular y presenta una composición celular heterogénea en la que se pueden identificar varios tipos de células que pueden ser clasificadas en células secretoras y no secretoras. Existen cinco tipos de células secretoras caracterizadas de acuerdo al tipo de hormona almacenada en sus gránulos de secreción: los lactotropos (prolactina, PRL), los somatotropos (hormona de crecimiento, GH), los gonadotropos (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los corticotropos (adrenocorticotrofina, ACTH) y los tiotropos (hormona estimulante de la tiroides, TSH). Además, esta glándula posee un tipo celular no secretor, las células folículo estrelladas que mantienen uniones comunicantes con las células secretoras (Page 1994). Este tipo celular posee propiedades compartidas con células dendríticas y macrófagos, y tiene la

capacidad de fagocitar rápidamente células glandulares muertas o en proceso de muerte evitando la generación de signos de inflamación (Orgnero de Gaisán et al. 1993; Allaerts & Vankelecom 2005).

Aunque muchos autores han dado a conocer la proporción de los distintos tipos de células adenohipofisarias de la rata por métodos inmunohistoquímicos, los trabajos más completos en los cuales se hace una evaluación de todos los tipos celulares son los de Dada et al. 1984 y Oishi et al. 1993. En ambos trabajos los autores coinciden en el porcentaje de los distintos tipos celulares presentes en ratas machos adultos jóvenes y en hembras. En ratas machos, los porcentajes de células inmunopositivas para las diferentes hormonas son, para PRL: 50%, GH: 23%, LH: 5%, FSH: 4%, ACTH: 3%, TSH: 2%, y para células inmunonegativas (INC): 17%; y en hembras, para PRL: 52%, GH: 20%, LH: 6%, FSH: 4%, ACTH: 3%, TSH: 2%, y para INC: 16%. Estos valores porcentuales para cada tipo celular pueden de todos modos variar en relación con la edad y el estado fisiológico del animal (Hymer et al. 1970; Kunert-Radek & Pawlikowski 1975; Jahn et al. 1984; Takahashi et al. 1984; Steipen et al. 1987).

Regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias

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. 5).

El proceso de secreción hormonal en la adenohipófisis ha sido ampliamente estudiado desde principios del siglo pasado. De los cinco tipos de células endocrinas que integran la adenohipófisis, cuatro de ellos responden a un factor liberador hipotalámico específico que actúa como secretagogo y a la vez como factor trófico. La hormona liberadora de GH (GHRH) es el regulador más importante de la fisiología de los somatotropos (Mayo et al. 2000), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) lo es para los gonadotropos (Conn et al. 1987), la hormona liberadora de TSH (TRH) ejerce el mismo efecto sobre los

tirotropos (Gershengorn 1986) y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) sobre los corticotropos (Turnbull & Rivier 1997). Por el contrario, los lactotropos son el único tipo celular adenohipofisario que no posee un factor hipotalámico específico que se comporte como estimulador de la secreción de PRL y a la vez como factor trófico (Freeman et al. 2000). Este tipo celular, a diferencia de los otros, posee una actividad secretora espontánea alta y dicha secreción se encuentra bajo un control tónico predominantemente inhibitorio ejercido por el hipotálamo a través de la dopamina, y con menor potencia por el GABA (ácido γ aminobutírico) (Langer et al. 1978; Freeman et al. 2000; Ben-Jonathan & Hnasko 2001). Ciertos factores no hipotalámicos sí son capaces de estimular la secreción de PRL actuando directamente sobre la adenohipófisis. Entre ellos, los estrógenos son unos de los más importantes ya que no solo actúan como secretagogos de PRL sino también como reguladores de la proliferación de los lactotropos (Freeman et al. 2000; Kawamata et al. 2000).

Además de los factores liberadores e inhibidores específicos provenientes del hipotálamo, la secreción hormonal adenohipofisaria es regulada por otros factores u hormonas periféricas e intrahipofisarias, así como por factores ambientales (Neill et al. 1971; Terkel et al. 1972; Lamberts & Macleod 1990).

Muerte celular en la adenohipófisis

Si bien existe abundante información 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 et al. 2004; Ivan et al. 2005). Estos estudios son principalmente clínicos y no proveen mucha información sobre el mecanismo celular o molecular por el que actúan estas drogas. Sin embargo, existen algunas evidencias que muestran la existencia de ciertos mecanismos apoptóticos inducidos en la glándula. En experimentos *in vitro*, utilizando células derivadas de tumores hipofisarios (la línea celular GH3), se ha visto que la bromocriptina

induce un aumento en la activación de p38 MAP kinasa y la disminución de la expresión de Bcl-2 (Yin et al. 1999; Kanasaki et al. 2000). Estudios con esta misma línea celular han revelado que el estrés oxidativo puede causar muerte por apoptosis (Newton et al. 2005). Trabajos recientes con cultivos primarios de células adenohipofisarias sugieren que ciertas citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α o el interferón- γ , inducen apoptosis y de esta manera actúan como posibles señales mediadoras de la remodelación celular adenohipofisaria en condiciones fisiológicas (Candolfi et al. 2002; Piserá et al. 2004). El glutamato, por su parte, induce apoptosis en estas células mediante la activación de caspasas (Caruso et al. 2004).

Óxido nítrico y muerte celular en la adenohipófisis

Mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*, se ha demostrado la existencia de los tres tipos de NOSs en la glándula. La nNOS es la isoforma predominante y está localizada principalmente en gonadotropos y células foliculo estrelladas, estando ausente en los lactotropos (Sagar & Ferreiro 1987; Vincent & Kimura 1992). La eNOS se localiza en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la glándula (Okere et al. 1998). La iNOS normalmente no se detecta pero se ha observado su expresión en las células foliculo estrelladas luego de un estímulo inflamatorio (Vankelecom et al. 1997a).

Una de las primeras funciones del NO identificada en la adenohipófisis es la de regular la secreción de ciertas hormonas hipofisarias. Estudios *in vitro* sugieren un efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de LH estimulada por GnRH (Ceccatelli et al. 1993). Con respecto a la secreción de GH, existen trabajos con resultados opuestos que indican un efecto inhibitorio (Kato 1992) o estimulatorio (Tena-Sempere et al. 1996) del NO sobre el aumento de la secreción de GH inducido por GHRH. Lo mismo ocurre con la secreción de PRL, dado que existen estudios que le otorgan al NO la capacidad de estimular (Brunetti et al. 1995) o de inhibir (Duvilanski et al. 1995, Duvilanski et al. 1996; Vankelecom et al. 1997a; Velardez et al. 2000) la secreción basal de PRL *in vitro*.

Existe otra función del NO, identificada posteriormente por nuestro grupo de trabajo y por otros investigadores, de gran relevancia fisiológica (Candolfi et al. 2004; Poliandri et al. 2004; Velardez et al. 2004). El NO se comporta como regulador de la muerte celular en la adenohipófisis. Estudios previos de nuestro laboratorio realizados con cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata demostraron un efecto dual del NO. En concentraciones submicromolares, el NO posee un efecto antiapoptótico, protegiendo a las células del daño causado por metales pesados (Poliandri et al. 2004, Poliandri et al. 2006). En cambio, la exposición prolongada (mayor a 6 hs) de las células a concentraciones micromolares de NO, como las generadas durante un proceso inflamatorio, induce apoptosis en las mismas (Velardez et al. 2004). Los mecanismos apoptóticos por los cuales el NO causa la muerte de las células adenohipofisarias no han sido identificados aún. Como primera aproximación pudimos establecer la intervención de las caspasas 9 y 3 en este proceso (Velardez et al. 2004). Sin embargo quedan por dilucidar los eventos que llevan a la activación de estas caspasas y si existe alguna otra vía implicada en el efecto apoptótico del NO. La elucidación de estos mecanismos constituyó el primer objetivo de este trabajo de tesis.

Óxido nítrico, ovariectomía y muerte celular en la adenohipófisis

La presencia o ausencia de hormonas esteroideas en determinados tejidos puede generar apoptosis. La inducción de apoptosis puede ser disparada por efecto directo de la ausencia/presencia de dichas hormonas en el tejido blanco o mediante la alteración de efectores parácrinos (Brad Thompson 1994; Aoki et al. 1998).

En la adenohipófisis, los estrógenos son las hormonas esteroideas de mayor relevancia en la regulación de la población celular. En la rata, el número de células fluctúa de acuerdo a la situación fisiológica (lactancia, preñez, ciclo estral) principalmente en respuesta a los niveles de estrógenos circulantes (Shirasawa & Yoshimura 1982; Carbajo-Pérez & Watanabe 1990; Spady et al. 1999; Candolfi et al. 2006).

En muchos de los tejidos estrógeno-dependientes como ovario y glándula mamaria, la falta de estrógenos desencadena apoptosis (Billig et al. 1986; Kiprianou et al. 1991). En la glándula adenohipofisaria, ha sido reportado que los estrógenos pueden tener un efecto dual. Algunos estudios muestran que citoquinas inflamatorias como TNF- α y LPS inducen apoptosis en la glándula adenohipofisaria por un mecanismo estrógeno-dependiente (Theas et al. 2000; Pisera et al. 2004). Sin embargo, en la mayoría de los casos se han observado efectos proliferativos de los estrógenos. El tratamiento crónico con altos niveles de estrógenos induce hiperplasia e hipertrofia adenohipofisaria debido a un aumento en el número y el tamaño de los lactotrofos. La interrupción de dicho tratamiento induce apoptosis en estas células llevando a la normalización del tamaño glandular (van Nesselrooij et al. 1992, Drewett et al. 1993). A su vez, se ha observado que durante la preñez y la lactancia (períodos con altos niveles de estrógenos) se produce un importante aumento en el número de lactotrofos. Al finalizar el periodo de lactación, cuando los niveles de estrógenos disminuyen, hay una muerte masiva de estas células debido a la inducción de apoptosis (Ahlbom et al. 1998).

En relación con estos últimos reportes, se ha hipotetizado que la ausencia de estrógenos producida luego de la ovariectomía podría afectar negativamente a la población celular adenohipofisaria, probablemente debido a la inducción de apoptosis en la glándula. Sin embargo, no existen aún evidencias consistentes que lo demuestren.

Los estrógenos pueden actuar sobre las células adenohipofisarias de forma directa y/o indirecta, modificando la liberación de neurotransmisores y péptidos hipotalámicos o de factores intrahipofisarios. Entre los blancos intrahipofisarios se encuentra la nNOS presente en los gonadotrofos. Esta enzima es regulada negativamente por los estrógenos, efecto que no sería directo sino que estaría mediado por la GnRH, hormona, que es a su vez, modulada por los estrógenos a nivel hipotalámico (Garrel et al. 1998). Estudios realizados en ratas hembras ovariectomizadas, muestran que luego de la ovariectomía se produce un aumento

de los niveles de ARNm y de proteína de la nNOS, así como también un incremento en el número de gonadotropos (Ceccatelli et al. 1993; Ceccatelli 1997; González-Hernández & González 2000). También se ha observado un aumento en la actividad de las NOSs (Velardez et al. 2003a). Consistentemente, el tratamiento de sustitución con estrógenos en ratas ovariectomizadas previene completamente estos aumentos (Ceccatelli et al. 1993; Velardez et al. 2003a) y, más aún, la estrogenización crónica reprime la expresión de la nNOS (Qian et al. 1999).

En base a los antecedentes presentados, en la segunda parte de este trabajo de tesis se utilizaron ratas hembras ovariectomizadas como modelo experimental de modo tal de intentar dilucidar dos principales interrogantes. En primer lugar se investigó el proceso de muerte celular en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía. En segundo lugar, teniendo en cuenta que el NO es capaz de prevenir o inducir apoptosis en las células adenohipofisarias y que durante la ovariectomía hay un aumento de nNOS, se investigó cómo se modifica la producción de NO en las células adenohipofisarias en relación al tiempo de ovariectomía y su relación con la inducción de la muerte celular.

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar la participación del NO en los procesos de muerte celular en la adenohipófisis y sus mecanismos de acción.

Como parte de este objetivo general se establecieron dos objetivos puntuales:

- ❖ Investigar los mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis inducida en las células adenohipofisarias luego de la exposición a altas concentraciones de NO, situación que puede presentarse durante procesos inflamatorias.

- ❖ Investigar la regulación de la muerte celular en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía y dilucidar el papel del NO en este proceso.

3 MECANISMOS APOPTÓTICOS DEL ÓXIDO NÍTRICO

3.1 OBJETIVO

Continuando con los estudios realizados en nuestro laboratorio que demostraron que la exposición prolongada (mayor a 6 hs) al NO, en concentraciones similares a las encontradas en procesos inflamatorios, induce apoptosis en las células adenohipofisarias, el primer objetivo consistió en **investigar los mecanismos intracelulares involucrados en la inducción de apoptosis.**

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El dietilentriamina NONOato (DETA NONOato) fue provisto por Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Las sondas dihidro rodamina 123 (DHR123) y 3,3-dihexiloxacarbocianina iodada (DiOC₆) y los compuestos LY-83583, N-acetilcisteína (NAC) y Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) fueron provistos por Alexis (San Diego, CA, USA). Las sondas Calcium-green, 5,6-dicarboxi-2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCDCF-DA) y monoclorobimano (MCB) fueron provistos por Molecular Probes (Eugen, OR, USA). La Anexina V-FITC fue provista por Pharmingen (BD Biosciences, San José, CA, USA). Los reactivos para extracción de ARN y RT-PCR fueron provistos por Invitrogen (Carlsbab, CA, USA) y por Promega (Madison, WI, USA). Todos los reactivos para cultivo primario, excepto el medio de cultivo y el suero fetal bovino, fueron provistos por GIBCO (Buenos Aires, Argentina). El suero fetal bovino fue adquirido en GBO (Buenos Aires, Argentina). El medio de cultivo Dulbecco Mínimo Eagle Modificado y el resto de las drogas utilizadas fueron provistos por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El material descartable estéril fue provisto por ETC Internacional (Buenos Aires, Argentina). El material plástico no estéril fue provisto por Chemit (Buenos Aires, Argentina).

Animales

Para el desarrollo del primer objetivo de esta tesis se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar de 200-250 g de peso, provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21-24 °C) y luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 hs), con libre acceso al agua y alimento, de acuerdo a las condiciones establecidas en 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 para la obtención de los cultivos primarios.

Cultivos primarios de adenohipófisis

Las adenohipófisis fueron colocadas en un tubo estéril de 20 ml con medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM), suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos para medios de cultivo mínimos esenciales (MEM-aa) 10 µg/ml, gentamicina 25 µg/ml, anfotericina B 5.6 µg/ml, pH 7.2-7.3 (DMEM-S) y seroalbúmina bovina (BSA) 0.3%. Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y cortadas en trozos de 1 mm³ aproximadamente. Los fragmentos obtenidos fueron tratados sucesivamente con tripsina 0.25% durante 20 min a 37 °C, inhibidor de tripsina 0.1% 10 min y desoxirribonucleasa del tipo II 0.1% 10 min, en condiciones de gaseado con CO₂ al 5% y sin agitación. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados en tres pasos sucesivos con una solución de EDTA 2 mM en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) libre de Ca²⁺ y de Mg²⁺ (KRB-CMF) pH 7.2-7.3, con una solución de EDTA 1 mM y con buffer solo sin EDTA. En cada lavado se centrifugó 3 minutos a 900 x g. Finalizado el último lavado, 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 8 min a 1000 x g y luego resuspendidas en DMEM-S con suero fetal bovino (FBS) 10%.

El número de células obtenidas de la dispersión se determinó por recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad se examinó por el método de exclusión utilizando azul de Trypan. La viabilidad de las células utilizadas en los cultivos primarios fue siempre mayor al 90%.

Después del recuento, las células resuspendidas en DMEM-S-FBS 10% fueron sembradas en placas de cultivo y estabilizadas durante 72 hs en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO₂ previo a la realización de los distintos experimentos.

Tratamiento de las células en cultivo

Para la inducción de apoptosis con NO se utilizó el dador de acción prolongada DETA NONOato (DETA/NO). La disolución del DETA/NO en medio de cultivo a una concentración final de 1 mM causa una liberación gradual de NO. Esta liberación tiene su máximo a las 2 hs y permanece constante durante 24 hs (Fig. 1). Con una solución de DETA/NO 1 mM se alcanza una concentración de NO de 1.9 - 2 µM (Fig. 6) (Borutaite & Brown 2003). Dicha concentración es consistente con los niveles endógenos de NO encontrados durante procesos inflamatorios (Hofseth et al. 2003).

Para iniciar los tratamientos de las células, luego del período de estabilización, el medio fue descartado y las células fueron incubadas con DMEM-S-FBS 10% fresco solo (células control) o con DETA/NO 1 mM por diferentes tiempos. El DETA/NO 1 mM fue disuelto en DMEM-S-FBS 10% 2 hs antes de iniciar las incubaciones de modo tal de alcanzar una concentración estable de NO en el medio.

Cuando se estudió el efecto de alguna droga sobre la acción del NO en las células, las mismas fueron preincubadas con la droga sola durante 1 h para evitar problemas entre la cinética de acción del NO y la droga, y luego con la droga y el dador de NO por diferentes tiempos según el diseño experimental.

En los casos en los cuales las drogas madres debieron ser disueltas en DMSO (ver Tabla 1), 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.

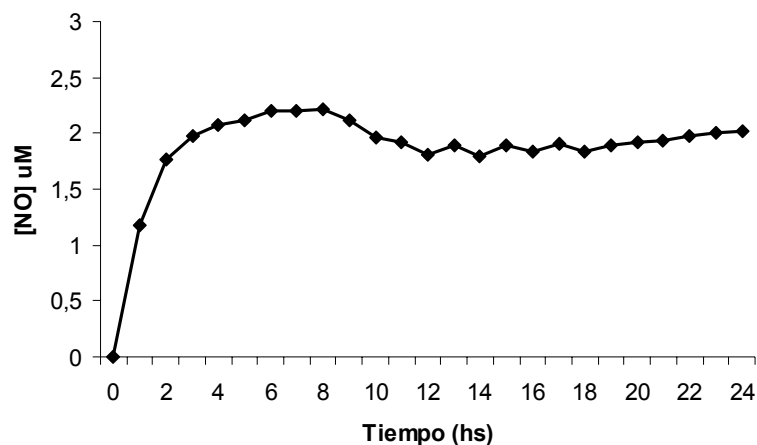


Fig. 6: Curva de liberación de NO por el DETA/NO 1 mM. La determinación de la liberación de NO fue realizada en la Cátedra de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizó un electrodo selectivo *sensor ISO-NO MARK II*, World Precision Instrument. Los registros en función del tiempo fueron grabados y analizados utilizando el programa Duo 18™.

Droga	Concentración de sol. madre (mM)	Solvente
BAPTA	20	DMSO
CalciumGreen	20	DMSO
Ciclosporina A	50	Etanol
DCDCF-DA	50	DMSO
DHR123	200	DMSO
DiOC ₆	1	DMSO
LY-83583	10	DMSO
MCB	25	DMSO
Rotenona	10	DMSO
Z-VAD-fmk	20	DMSO

Tabla 1: Drogas empleadas en los experimentos, concentración de sus soluciones madres y solventes utilizados.

Ensayo de actividad celular (MTT)

Para los ensayos de actividad celular, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (0.1×10^6 células/pocillo en 200 μl). En cada experimento, los tratamientos de las células se realizaron por columna (8 pocillos) de la placa de manera tal de tener octuplicados de los datos. Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado, las células fueron lavadas 2 veces con 100 μl de buffer KRB y se agregaron 110 μl /pocillo de una solución de metil-tiazol-tetrazolio (MTT) 5 mg/11 ml en buffer KRB. Las placas se incubaron durante 3 hs (37°C , 5% CO_2) para permitir la formación de los cristales de formazán. Al término del periodo de incubación, se retiraron cuidadosamente 90 μl de la solución de MTT y se agregaron 100 μl de HCl 0.04 N en isopropanol. Las placas se agitaron durante al menos 3 min hasta la solubilización total de los cristales de formazán. Una vez desarrollado el color, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Biotrak II, Amersham Biosciences, USA).

La actividad celular fue considerada como índice de la viabilidad celular (Newton 1995) y los resultados fueron expresados como porcentaje de la absorbancia obtenida en las células control.

Ensayo de actividad de caspasa 3

Para la medición de actividad de caspasa 3, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (1×10^6 células/pocillo en 1 ml) y cada tratamiento fue realizado por cuadruplicado. Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado, las células fueron lavadas 2 veces con 300 μl de buffer KRB-CMF y resuspendidas por tripsinización incubándolas con una solución de tripsina 0.25% - EDTA 0.038% en el mismo buffer durante 5 min a 37°C y CO_2 5%. La actividad de la tripsina fue inhibida con el agregado de FBS (33 μl /pocillo). Las células provenientes de 2 pocillos (2×10^6 células) bajo el mismo tratamiento fueron colocadas en un tubo Eppendorf y centrifugadas a $1000 \times g$ 10 min. El pellet obtenido fue resuspendido en 150 μl de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM,

ditiotreitól (DTT) 1 mM, digitonina 10 μ M, pepstatina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM) por 30 min a 0 °C. Esta suspensión fue centrifugada 20 min a 10.000 x g a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue mezclado en relación 1:1 con 100 μ l de buffer de reacción (Hepes 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM y glicerol 10%) y colocado en una placa de cultivo de 96 pocillos. La reacción se inició con el agregado de 5 μ l (5 mg/ml) del reactivo colorimétrico *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA, sustrato que es clivado específicamente por la caspasa 3). La placa (conteniendo las mezclas de reacción correspondientes a las distintas condiciones estudiadas) fue incubada durante 1 h a 37 °C y posteriormente se determinó la cantidad de sustrato clivado (pNA liberado) midiendo la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

La actividad de caspasa 3 fue calculada como Abs 405 nm/mg proteína de la muestra y los resultados se expresaron respecto de la actividad en las células control, la cual fue considerada arbitrariamente como 1.

Determinaciones realizadas por citometría de flujo

Para los estudios de citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (0.5×10^6 células/pocillo en 500 μ l) y los distintos tratamientos fueron realizados por triplicado. Para permitir que las células incorporaran la sonda, éstas fueron añadidas directamente a los medios de cultivo (a partir de una solución 10X) 20 - 30 min antes de finalizar los tratamientos. Al término del periodo de incubación, el medio fue descartado y las células fueron lavadas 2 veces con KRB-CMF para eliminar los restos de sonda que no hubieran sido incorporados. Las células fueron resuspendidas por tripsinización, como se detalló en el protocolo anterior, y colocadas en tubos plásticos de citometría. A cada tubo se le agregaron 10 μ g/ml de ioduro de propidio (IP) para poder detectar células inviables. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScalibur (San José, CA, USA). Se

analizaron 10.000 células por tubo. 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 nm).

El IP solamente es capaz de teñir células con la membrana plasmática dañada, por lo que las células positivas para IP 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 exclusivamente a células que todavía son consideradas viables.

Los datos obtenidos en el citómetro fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu>). Los valores de fluorescencia obtenidos en cada tratamiento fueron expresados como porcentaje de la fluorescencia en las células control.

- Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Para esta determinación se utilizó la sonda 3,3-dihexiloxacarbocianina iodada (DiOC₆) en una concentración final de 20 nM. 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 (Rottenberg y Wu 1998). A mayor potencial, mayor cantidad de sonda se intercalará en la membrana y mayor será la fluorescencia emitida. Contrariamente, a menor potencial, menor cantidad de sonda podrá intercalarse y en consecuencia menor será la fluorescencia emitida.

- Determinación de los niveles citosólicos de calcio

Para esta determinación se utilizó la sonda Calcium-green (concentración final 20 μ M), la cual permite detectar cambios en los niveles citosólicos de este catión por citometría de flujo (Eberhard & Erne 1991).

- Determinación de los niveles intracelulares de ROS

Para esta cuantificación se utilizó la sonda dihidro rodamina 123 (DHR123) en una concentración final de 20 μ M. Esta sonda es un compuesto lipofílico que puede

atravesar la membrana plasmática rápidamente (Crow 1997; Walrand et al. 2003). Una vez en el citoplasma, la DHR123 es oxidada al compuesto fluorescente rodamina, el cual se internaliza en la mitocondria. Esta sonda es específicamente oxidada por peroxinitrito y peróxido de hidrógeno, pero no reacciona con el anión superóxido ni con el NO (Crow 1997).

Determinación de los niveles intracelulares de ROS por espectrofluorimetría

Para esta determinación, se utilizó la sonda 5,6-dicarboxi-2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DCDCF-DA) en una concentración final de 20 μ M. Esta sonda es un análogo estructural de la DHR123, con la diferencia de que al entrar en la célula, es desacetilada por esterasas a DCDCF y luego de ser oxidada a fluoresceína permanece en el citosol (Crow 1997; Walrand et al. 2003).

Para la medición de fluorescencia por espectrofluorimetría se siguió el mismo protocolo que para los experimentos de citometría en cuanto a la siembra de células y su resuspensión por tripsinización. Las células resuspendidas (0.5×10^6 células en 300 μ l) fueron colocadas en cubetas de cuarzo y la fluorescencia de la sonda se determinó en un espectrofluorómetro Kontron SFM-25 (λ ex: 505 nm, λ em: 535 nm). La fluorescencia basal fue determinada en células sin ningún tratamiento (control) y sin el agregado de la sonda y el valor obtenido fue restado de la fluorescencia de todas las muestras. Inmediatamente después de finalizar las determinaciones de ROS, las células fueron lisadas con NP-40 (concentración final 1%), se agregó IP a la solución (concentración final 10 μ g/ml) y se determinó su fluorescencia (λ ex: 535 nm, λ em: 585 nm) como medida del contenido de ADN en cada muestra.

Los niveles intracelulares de ROS fueron calculados como fluorescencia de DCDCF-DA/fluorescencia de IP y expresados como porcentaje de los niveles de ROS en las células control.

Ensayo de Western Blot

- Obtención de la muestra proteica

Para los ensayos de Western Blot las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (1 x 10⁶ células/pocillo en 1 ml). Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado y las células fueron resuspendidas por tripsinización como se detalló anteriormente. Las células resuspendidas provenientes de 4 pocillos (4 x 10⁶ células) bajo el mismo tratamiento fueron colocadas en un tubo Eppendorf y centrifugadas 10 min a 1000 x g a 4 °C. El pellet obtenido fue resuspendido en 50 µl de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, pepstatina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y PMSF 1 mM), homogeneizado en un sonicador Branson Sonifier (VWR Scientific) durante 15 seg a potencia 4, en hielo, y luego centrifugado durante 20 min a 10.000 x g a 4 °C. Una alícuota de 10 µl del sobrenadante obtenido fue extraída para la cuantificación de proteínas en la muestra. El resto del sobrenadante fue guardado a -70°C hasta su uso.

- Separación de las proteínas e inmunodetección

Un total de 50 - 70 µg de proteína por muestra fue hervido en buffer Laemmli y sembrado en un gel desnaturizante de Acrilamida-Bisacrilamida 15% (15% SDS-PAGE). La electroforesis se realizó a 120 volts durante 1.5 - 2 hs. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de polyvinylidene fluoride (Immobilion-P) y bloqueadas toda la noche a 4 °C en 50 ml de solución de bloqueo (Tween-20 0.05% y leche descremada 6% en buffer TBS 1X). Luego las membranas fueron incubadas con 8 - 10 ml del anticuerpo primario, diluído en solución de bloqueo, durante 2 hs a 37 °C con agitación, y toda la noche a 4 °C sin agitación.

Las membranas fueron lavadas 3 veces (por 10 min) con buffer TBS 1X e incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa diluídos en buffer TBS 1X, durante 2 hs con agitación. La inmunodetección se realizó con una solución de diaminobenzidina conteniendo H₂O₂ 0.01%.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo policlonal anti p53 hecho en cabra (sc-1313, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) en una dilución

final de 1/200; anticuerpo policlonal anti Bax hecho en conejo (sc-493, Santa Cruz) en una dilución 1/200 y anticuerpo anti actina hecho en conejo (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) en una dilución 1/1000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa (A9169, Sigma) en dilución 1/2000 y anticuerpo anti IgG de cabra hecho en burro conjugado a peroxidasa (sc-2020, Santa Cruz) en dilución 1/2000.

En el caso del Western Blot de Bax, se realizó una co-incubación con los anticuerpos anti Bax y anti actina ya que las bandas reveladas correspondientes (Bax, 23 kDa y actina, 42 kDa) están bien separadas entre sí.

En el caso de p53 (53 kDa), como las bandas reveladas se superponen con las de actina (42 kDa), primero se realizó la incubación de la membrana con el anticuerpo anti p53 y su inmunodetección correspondiente. Luego, la membrana fue incubada con buffer de Stripping (Tris 62.5 mM pH 6.5, SDS 2% y β -mercaptoetanol 100 mM) durante 30 min a 66 °C con agitación, para eliminar el anticuerpo unido, y luego de varios lavados con TBS, finalmente se incubó con el anticuerpo anti actina y se realizó su inmunodetección.

Las membranas reveladas fueron pasadas por un scáner para obtener una imagen digital y la densitometría de las bandas fue realizada con el programa Gel Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Para poder realizar la comparación estadística, los resultados de la densitometría de Bax o p53 de cada muestra fueron normalizados a los valores de densitometría de actina para dicha muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células control.

RT-PCR semicuantitativa

Para la cuantificación de los niveles de ARNm por RT-PCR semicuantitativa, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (1×10^6 células/pocillo en 1 ml). Una vez finalizados los tratamientos, el medio fue descartado y se procedió al aislamiento del ARN. Se utilizaron agua y elementos descartables libres de RNAsa y DNAsa. La mesada y el resto de los elementos fueron limpiados con etanol 70%.

- Extracción de ARN de las células en cultivo

Se agregaron 177 μl de Trizol por pocillo y se incubó 5 min a temperatura ambiente. La suspensión proveniente de 4 pocillos (4×10^6 células) bajo el mismo tratamiento fue colocada en un tubo Eppendorf. Se agregaron 142 μl de cloroformo en cada tubo, se agitó vigorosamente durante 15 seg, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a $12.000 \times g$ a 4°C . La fase acuosa obtenida fue traspasada a un tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 354 μl de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a $12.0000 \times g$ a 4°C . Se descartó el sobrenadante por inversión y el pellet se resuspendió en 708 μl de etanol 75%. Los tubos se agitaron en un Vortex durante 15 seg y se centrifugaron 5 min a $7500 \times g$ a 4°C . Se descartó el sobrenadante por inversión, se dejó secar el pellet al aire por unos minutos y se resuspendió en 20 μl de agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron a $55-60^\circ\text{C}$ para la resuspensión del ARN aislado. Finalizada la incubación los mismos se colocaron rápidamente en hielo.

El contenido de ARN de cada tubo se cuantificó a partir de una alícuota en un espectrofotómetro Shimatzu UV-265 (Kioto, Japón) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}=1.8-2$ la cual permite confirmar la ausencia de contaminación con proteínas. El ARN aislado fue guardado a -70°C hasta realizar la retrotranscripción al ADN complementario (ADNc).

- Síntesis de ADNc y retrotranscripción

Se utilizaron 2 μg de ARN total para la síntesis de ADNc. Este fue incubado por 5 min a 65°C con 1 μl de Oligo dT₁₅ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Biodynamics, Argentina), 1 μl de dNTP mix 10 mM y agua libre de RNAsa csp 13 μl .

La retrotranscripción se realizó a 37°C durante 50 min en 20 μl de la siguiente mezcla de reacción: 13 μl de la mezcla anterior, 4 μl First-strand Buffer 5X, 2 μl de DTT 5.5 mM y 1 μl de la retrotranscriptasa (MMLV, 3.125 U). La reacción fue finalizada inactivando la enzima por calentamiento a 70°C durante 15 min. Los ADNc fueron guardados a -70°C hasta la realización de la PCR.

- PCR semicuantitativa

La amplificación del ADNc se realizó en un termociclador Mastercycler Eppendorf (Hamburg, Germany). La reacción de PCR contenía: 2 μ l de ADNc, 10 μ l Buffer Go Taq 5X, 1 μ l de dNTP mix 10 mM, 1 μ l de cada primer 10 μ M, 0.25 μ l Go Taq (0.625 U) y agua estéril csp 50 μ l.

La técnica de RT-PCR semicuantitativa permite detectar cambios relativos en la expresión del ARNm. Por tal motivo, las primeras reacciones de PCR tanto para Bax como para Bcl-2 se llevaron a cabo con un número de ciclos de amplificación variables (20 - 40) de modo tal de encontrar un número de ciclo en el cual comience a aparecer el producto de amplificación y asegurarnos de este modo de estar dentro del rango lineal de amplificación.

En ambos casos la aparición de producto se observó al ciclo 38, pero recién en el ciclo 40 las bandas fueron lo suficientemente intensas para poder ser detectadas por densitometría, por lo tanto las reacciones de PCR fueron realizadas en las siguientes condiciones:

Bax: 2 min a 94 °C para la activación de la polimerasa seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 10 min a 72°C.

Bcl-2: 2 min a 94 °C seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C, y un último ciclo de 10 min a 72°C.

Como control de expresión se utilizó el gen constitutivo de β -actina (ver primers en la Tabla 2). La PCR de actina se realizó siempre antes que las otras PCRs de modo tal de comprobar la integridad del cDNA sintetizado y la ausencia de contaminación con ADN genómico. La reacción de PCR fue realizada en las siguientes condiciones: 4 min a 94 °C seguidos por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 1 min a 72 °C, y un último ciclo de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas fueron visualizadas en el Foto/Analyst Investigador-PC Foto/Eclipse y la densitometría de las mismas fue realizada con el programa Gel Pro Analyzer 3.1.

Para poder realizar la comparación estadística, los resultados de la densitometría de Bax o Bcl-2 de cada muestra fueron normalizados a los valores de densitometría de actina de la misma muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células control.

Los primers para Bax y Bcl-2 fueron diseñados utilizando el software Primer3 del instituto Whitehead (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 muestran en la Tabla 2.

Gen	Locus	Primers	Tamaño del producto
β -actina	NM_031144	Izq. 5'-ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3' Der. 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'	276 pb
Bax	NM_017059	Izq. 5'-CCGAGAGGTCTTCTTCCGGG-3' Der. 5'-TGGAAGAAGATGGGCTGAG-3'	317 pb
Bcl-2	NM_016993.1	Izq. 5'-CAAGCCGGGAGAACAGGGTA-3' Der. 5'-GCCTTCTTGAGTTCGGTGGG-3'	450 pb

Tabla 2: Primers utilizados para estudiar la expresión de ARNm por RT-PCR.

Análisis de la morfología nuclear

Para este estudio las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (Fisherbrand 12 mm, Fisher Scientific, USA) ubicados dentro de placas de cultivo de 24 pocillos (0.1×10^6 células/cubreobjeto en 500 μ l). Al término de los tratamientos, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X (300 μ l/ pocillo) a 4 °C e inmediatamente fijadas con formaldehído 4% en PBS durante 30 min a 4 °C. Después de la fijación las células fueron lavadas 3 veces con PBS y luego 1 vez con agua bidestilada. 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 mg/ml y 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. De cada tratamiento se analizaron 3 cubreobjetos.

En este análisis sólo se consideraron como células apoptóticas aquellas exhibiendo núcleos fragmentados. El recuento se realizó a ciego con respecto a los distintos tratamientos de modo tal de evitar la subjetividad de la observación. Los datos fueron expresados como $(\text{n}^\circ \text{ de núcleos fragmentados} / \text{n}^\circ \text{ total de núcleos}) \times 100$.

Determinación de apoptosis con Anexina e IP

Para esta determinación, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (0.5×10^6 células/pocillo en 500 μl) y cada tratamiento fue realizado por triplicado. Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado y las células fueron resuspendidas por tripsinización. La suspensión de cada pocillo fue colocada en un tubo de citometría y los tubos fueron centrifugados durante 10 min a $1000 \times g$ a 4°C . El sobrenadante fue descartado y el pellet (0.5×10^6 células) fue resuspendido en 250 μl de buffer de incubación (Hepes 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM y CaCl_2 2.5 mM) conteniendo 2.5 μl de Anexina V-FITC (Pharmingen, BD Biosciences, USA) y 2 μl de IP 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células fueron incubadas durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se agregaron 250 μl de buffer solo y la fluorescencia fue cuantificada en un citómetro de flujo Becton Dickinson. Se analizaron 10.000 células por tubo. El registro de fluorescencia de la Anexina V-FITC se realizó en el canal FL1 (535 nm) y el de IP se hizo en el canal FL2 (585 nm). Los datos obtenidos en el citómetro fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

Este ensayo permite detectar células que están entrando en apoptosis así como también células en los últimos estadios del proceso (Vermes et al. 1995). Un

evento característico de las primeras etapas de la apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina. Este es un fosfolípido de la cara interna de la membrana plasmática que es translocado hacia la cara externa quedando totalmente expuesto. La Anexina es una molécula con alta afinidad por la fosfatidilserina por lo que la marcación de las células con Anexina V-FITC permite identificar aquellas que estén en las etapas iniciales de la apoptosis. En un estadio más avanzado del proceso apoptótico se pierde la integridad de la membrana plasmática (evento que se da también en una muerte por necrosis) y colorantes vitales como el IP pueden ingresar a la célula. El uso de ambos marcadores permite identificar células en las primeras etapas de la apoptosis (Anexina positivas, IP negativas) de células en las últimas etapas del proceso o necróticas (Anexina positivas, IP positivas).

Como previamente demostramos que luego de 48 hs de exposición al NO la presencia de células necróticas es despreciable (Velardez et al. 2004), las células que resultaron positivas para Anexina y negativas para IP fueron consideradas como apoptóticas tempranas y las que resultaron positivas para ambos marcadores fueron consideradas como apoptóticas tardías. Los resultados presentados muestran el porcentaje total de células apoptóticas (tanto tempranas como tardías).

Ensayos de actividad enzimática

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (1×10^6 células/pocillo en 1 ml) y los distintos tratamientos fueron realizados por triplicado. Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado y las células fueron resuspendidas por tripsinización. La suspensión de cada pocillo fue colocada en un tubo Eppendorf y los tubos fueron centrifugados durante 10 min a $1000 \times g$ a $4^\circ C$. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 50 μl de buffer de lisis (Hepes 500 mM pH 7.4, KCl 125 mM, pepstatina 10 $\mu g/ml$, leupeptina 10 $\mu g/ml$ y PMSF 1 mM) y homegeneizado por sonicación durante 15 seg a potencia 4, en hielo. Los

tubos fueron centrifugados 30 min a 10.000 x g a 4 °C. Una alícuota de 5 µl del sobrenadante obtenido fue extraída para la cuantificación de proteínas en la muestra. El resto del sobrenadante fue utilizado para la medición de la actividad de las diferentes enzimas. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 250 (Fullerton, CA, USA).

Para la determinación de la actividad enzimática de la catalasa se colocaron en una cuba de cuarzo 1 ml de la mezcla de reacción conteniendo 40 µl de muestra y 800 µl buffer fosfato 50 mM pH 7. La reacción comenzó con el agregado de 100 µl de H₂O₂ 0.3 M y se midió la velocidad de reducción del H₂O₂ a 240 nm durante 2 min. Las mediciones fueron realizadas contra un blanco sin H₂O₂. La actividad enzimática fue calculada como µmoles de H₂O₂ consumidos/min/mg prot.

Las actividades enzimáticas de la GPx y GR fueron determinadas midiendo la velocidad de oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 min. En el caso de la GPx, la mezcla de reacción (1 ml) contenía 40 µl de muestra, 800 µl de buffer fosfato 50 mM pH 7 - EDTA 1.5 mM - azida sódica 1 mM, 20 µl de NADPH 10 mM, 10 µl de glutatión reducido (GSH) 100 mM y 10 µl (1 unidad) de GR. La reacción fue iniciada con el agregado de 50 µl hidropéroxido de cumeno 24 mM. En el caso de la GR, la mezcla de reacción (1 ml) contenía 40 µl de muestra, 800 µl de buffer fosfato 50 mM pH 7 - EDTA 1 mM y 10 µl de NADPH 10 mM. La reacción fue iniciada con el agregado de 100 µl de glutatión oxidado (GSSG) 10 mM. En ambos casos las mediciones fueron realizadas contra un blanco sin NADPH y la actividad enzimática fue calculada como µmoles de NADPH consumidos/min/mg prot.

Determinación de los niveles intracelulares de glutatión

- Determinación de los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) con el reactivo de OPT

Los niveles intracelulares de GSH y GSSG fueron determinados mediante un ensayo fluorométrico utilizando el compuesto fluorescente orto-phthaldialdehído (OPT). Este reactivo reacciona con GSH a pH 8 y con GSSG a pH 12 (Hissin & Hilf 1976). Para llevar a cabo este ensayo las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (0.5×10^6 células/pocillo en 500 μ l) y los distintos tratamientos fueron realizados por cuadruplicado. Finalizado los tratamientos, el medio fue descartado, las células fueron lavadas con PBS 1X y las mismas fueron lisadas con Tris 15 mM pH 7.4 (300 μ l/pocillo) incubándolas durante 30 min a 37 °C. Se tomó una alícuota de 10 μ l del lisado para la cuantificación de proteínas de la muestra y dos alícuotas de 100 μ l para la determinación de GSH y GSSG respectivamente. Para la determinación de GSH, los 100 μ l de muestra se colocaron en un tubo de vidrio y se agregaron 100 μ l de OPT (1 mg/ml en metanol) y 1.8 ml de NaH_2PO_4 pH 8, los tubos se agitaron suavemente y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Kontron SFM-25 (λ ex: 350 nm, λ em: 420 nm) contra un blanco de buffer Tris.

La determinación de GSSG se realizó en forma paralela. En primer lugar los 100 μ l de muestra se colocaron en un tubo Eppendorf y se incubaron con 100 μ l de N-etilmaleimida (NEM, 5 mg/ml en metanol) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Este reactivo compleja al GSH que haya en la muestra y de este modo se previene cualquier interferencia en la determinación de GSSG (Hissin & Hilf 1976). Seguidamente, 140 μ l de esta mezcla se colocaron en un tubo de vidrio con 100 μ l de OPT y 1.76 ml de NaOH 100 mM pH 12, los tubos se agitaron suavemente y se incubaron por otros 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro (λ ex: 350 nm, λ em: 420 nm) contra un blanco de buffer Tris.

Para establecer la concentración de GSH y GSSG de las muestras se realizaron paralelamente, curvas estándares que contenían cantidades conocidas de GSH y GSSG (0 - 0.4 μ g). Los niveles intracelulares de GSH y GSSG se

calcularon como μg de GSH o GSSG/mg de proteína en la muestra y se expresaron como porcentaje de los niveles de GSH o GSSG en las células control.

- Determinación de GSH con la sonda MCB

Los niveles intracelulares de GSH también fueron determinados por otro método fluorométrico utilizando la sonda monoclorobimano (MCB). Este compuesto es incorporado por las células y reacciona específicamente con el GSH a través de una reacción enzimática catalizada por la GSH transferasa (Sebastià et al. 2003).

Para llevar a cabo este ensayo, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (0.1×10^6 células/pocillo en $200 \mu\text{l}$) y los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado. Finalizados los tratamientos, el medio fue descartado y se agregó una solución de MCB $100 \mu\text{M}$ en DMEM-S-FBS 10% ($100 \mu\text{l}$ /pocillo) y las células se incubaron en estufa ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 5%) durante 30 min. Luego, el medio con sonda fue descartado, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X ($100 \mu\text{l}$ /pocillo) para eliminar la sonda que no hubiera sido incorporada y lisadas con NP-40 1% en PBS ($200 \mu\text{l}$ /pocillo) durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La fluorescencia del lisado fue medida en un espectrofluorómetro (λ ex: 390 nm , λ em: 485 nm). La fluorescencia basal fue determinada en células sin ningún tratamiento (control) y sin el agregado de la sonda y el valor obtenido fue restado de la fluorescencia de todas las muestras. Finalizadas las determinaciones de GSH, al lisado transferido nuevamente a su correspondiente pocillo, se le agregaron $2 \mu\text{l}$ de IP 1 mg/ml (conc. final $10 \mu\text{g/ml}$) y se determinó su fluorescencia (λ ex: 535 nm , λ em: 585 nm) como medida del contenido de ADN en cada muestra.

Los niveles intracelulares de GSH fueron calculados como fluorescencia de MCB/fluorescencia de IP y expresados como porcentaje de los niveles de GSH en las células control.

Determinación de proteínas

El dosaje de proteínas en las muestras fue realizado por el método de Bradford (Biorad, Buenos Aires, Argentina) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) y evaluados mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para diseños no balanceados o por la prueba de Dunnett según el diseño experimental (Sokal & Rohlf 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 Prism 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3 RESULTADOS

❖ El NO induce la activación de caspasa 3

La activación de caspasas constituye un punto en común de diversos estímulos proapoptóticos (Thornberry & Lazebnik 1998; Stennicke & Salvesen 2000). Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por el NO en las células adenohipofisarias ya que el tratamiento con inhibidores específicos de las caspasas 9 y 3 revirtieron el efecto citotóxico del NO (Velardez et al. 2004). Con el objetivo de delinear la secuencia de eventos que llevan a la muerte celular, y teniendo en cuenta que la caspasa 3 es considerada la principal efectora del proceso apoptótico (Dotto & Silke 2004), se estudió en primer lugar el tiempo en el cual esta caspasa es activada.

Las células adenohipofisarias fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por diferentes tiempos y luego se determinó la actividad de la caspasa 3 mediante un ensayo colorimétrico. Como puede verse en la Fig. 7, recién a partir de las 6 hs de incubación se produjo un aumento en la actividad de la caspasa 3. La exposición a DETA/NO durante 3 hs no modificó la actividad de la misma.

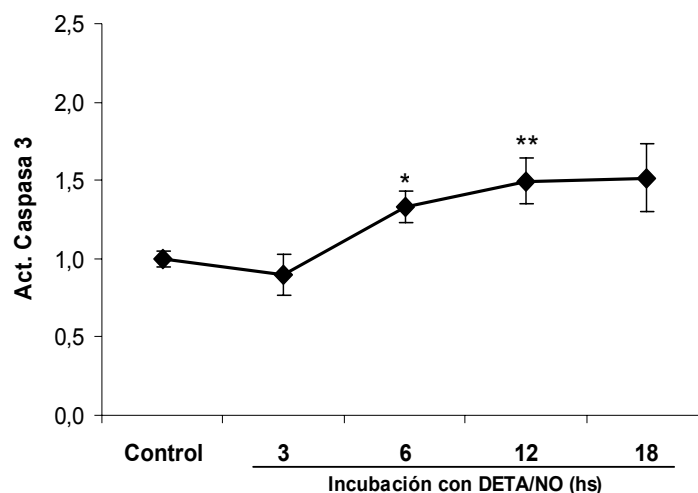


Figura 7: El NO induce la activación de caspasa 3. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados y la actividad de caspasa 3 fue determinada midiendo el clivaje del sustrato específico Ac-DEVD-pNA a 405 nm. La actividad de caspasa fue calculada como Abs 405 nm/mg prot y expresada en unidades relativas al control (células sin tratamiento). Los resultados representan la media \pm SEM, n=4. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ **La despolarización del potencial de la membrana mitocondrial interna no es un evento temprano en el proceso apoptótico inducido por el NO**

Generalmente se asume que el evento inicial de la vía apoptótica intrínseca (o mitocondrial) es la disminución del potencial de la membrana mitocondrial interna (PMM), que ocurre debido a la alteración de la integridad de la misma por la acción de diversos estímulos apoptóticos. Esto provoca la liberación de citocromo c al citosol y la consecuente activación de las caspasas 9 y 3 (Harada & Grant 2003; Garrido & Kroemer 2004).

Con el objetivo de investigar si el NO causa una despolarización de la membrana mitocondrial y de esta forma promueve la activación de caspasas, las células se incubaron con DETA/NO 1 mM por distintos tiempos y se determinó el PMM por citometría de flujo utilizando la sonda DiOC₆. Durante las primeras 12 hs de incubación con DETA/NO no hubo una modificación aparente del PMM. Recién luego de 18 hs se produjo una marcada disminución (Fig. 8). Para este

momento la caspasa 3 ya estaba activada (Fig. 7) y las características morfológicas y ultraestructurales propias del proceso apoptótico ya eran evidentes (Velardez 2004), sugiriendo que la caída del potencial no es el evento desencadenante del proceso apoptótico inducido por el NO en las células adenohipofisarias.

De todas formas, se quiso investigar cuál podía ser la causa de la disminución del PMM. El mecanismo más conservado propuesto para explicar dicha disminución es la apertura de un poro transmembrana denominado “poro de permeabilidad transitoria” (PPT). La apertura del PPT causa un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, provocando la disipación del gradiente electroquímico y por ende la disminución del PMM (Nicolli et al. 1996; Polster & Fiskum 2004).

El tratamiento con ciclosporina A (CsA), molécula que inhibe la apertura del PPT manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial (Nicolli et al. 1996), en una concentración que previamente demostramos puede prevenir la despolarización en estas células (Poliandri 2006), no pudo impedir la caída del PMM provocada por el NO (Fig. 9). Este resultado demuestra que en este sistema, la disipación del PMM observada a las 18 hs no estaría relacionada con la apertura del PPT.

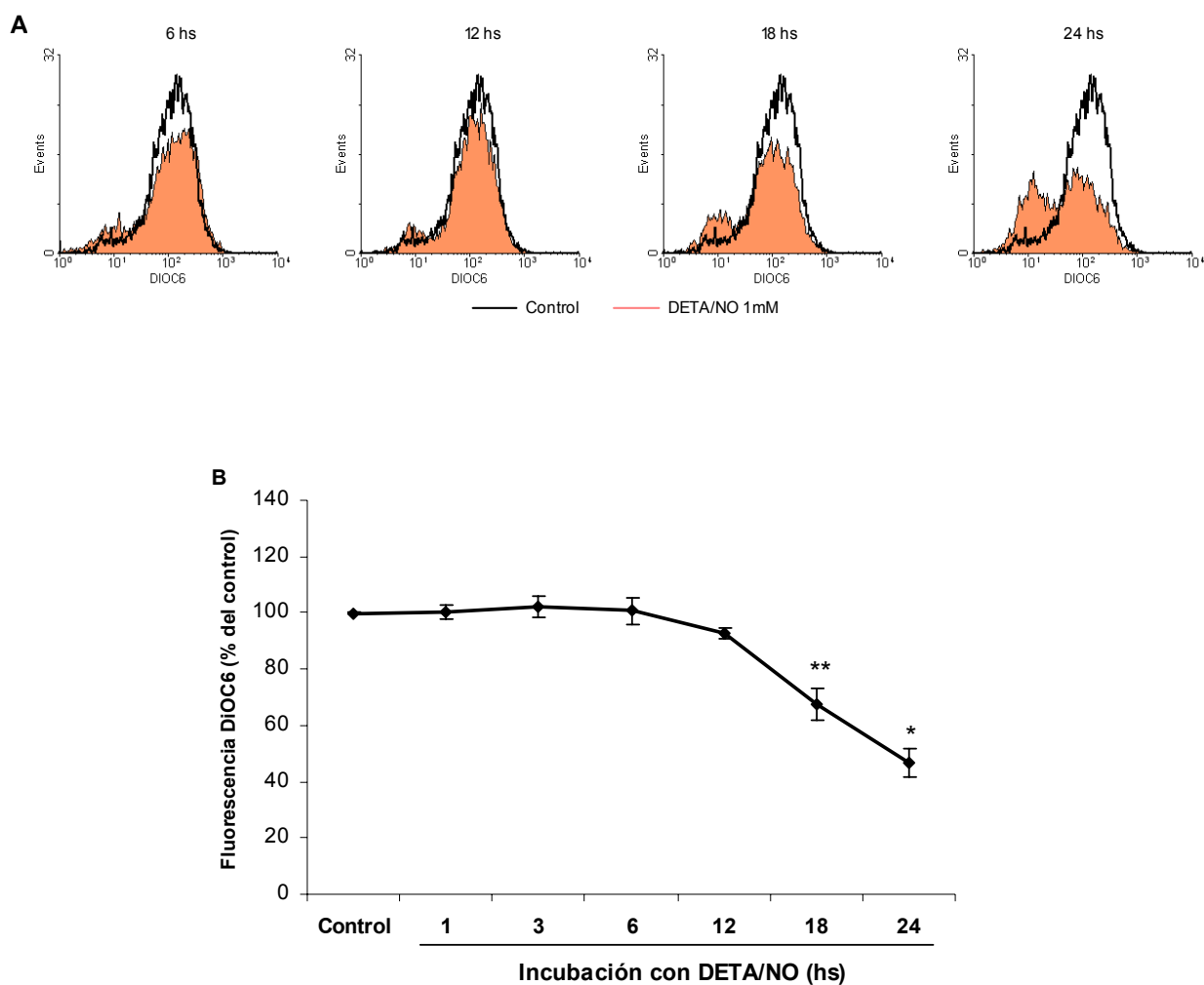


Figura 8: La despolarización del PMM no es un evento temprano en la cascada apoptótica del NO. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados y cargadas con DiOC₆ 20 nM durante los últimos 20 min de tratamiento. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. **(A)** Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje Y: número de células, eje X: intensidad de fluorescencia. Se muestra la distribución de la fluorescencia de las células incubadas con DETA/NO en forma superpuesta con la del control (células sin tratamiento). **(B)** Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

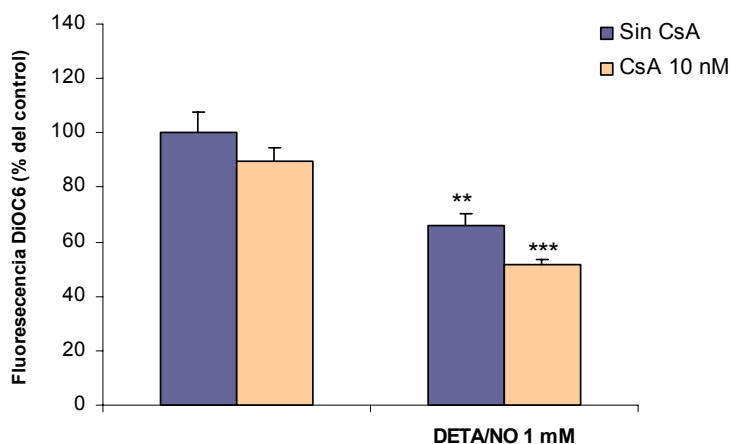


Figura 9: La CsA no revierte la caída del PMM causada por el NO. Las células fueron incubadas por 18 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de CsA 10 nM. Finalizados los tratamientos, el PMM fue determinado por citometría de flujo utilizando la sonda DiOC₆. Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=8) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). **p < 0.01, *** p < 0.001 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

El hecho de que la disrupción del PMM no sea un evento temprano que dispara la activación de caspasas sugiere que el NO no induce apoptosis en las células adenohipofisarias por el mecanismo más convencional descrito para la vía apoptótica intrínseca. En los últimos años han sido reportados diferentes mecanismos apoptóticos en los cuales se produce activación de caspasas e incluso liberación al citoplasma de factores proapoptóticos mitocondriales sin alteración alguna de la integridad mitocondrial (Finucane et al. 1999; Krhon et al. 1999; Lo & Kim 2004). Por tal motivo se decidió estudiar distintos mecanismos, relacionados o no con la vía apoptótica intrínseca, que llevan finalmente a la activación de caspasas.

❖ **El efecto apoptótico del NO es independiente de la activación de la sGC**

Como se mencionó en la introducción, muchos de los efectos biológicos del NO están mediados por la estimulación de sGC, enzima que cataliza la conversión de GTP en cGMP, un segundo mensajero con un amplio espectro de acción (Ignarro 1989; Denninger & Marletta 1999; Taimor et al. 2000; Valenti et al. 2003). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que el NO estimula la síntesis de cGMP en la adenohipófisis (Velardez et al. 2000; Velardez et al. 2003a). En base a estos antecedentes se estudió si la activación de la enzima sGC está involucrada en el efecto apoptótico del NO. Para ello se realizó un ensayo de MTT con el fin de determinar la viabilidad de las células luego del co-tratamiento con DETA/NO 1 mM y LY-83583, un inhibidor de la sGC. El LY-83583, en concentraciones que previamente demostramos son suficientes para inhibir a la enzima (Velardez et al. 2003b), no modificó el efecto del NO sobre la viabilidad celular (Fig. 10A). Confirmando este resultado, un agonista de la sGC (BAY-41.2272), en concentraciones que previamente demostramos aumentaba los niveles intracelulares de cGMP (Velardez et al. 2003b), tampoco alteró el efecto citotóxico del NO (Fig. 10B).

Estos resultados demuestran que la enzima sGC no participa en la apoptosis inducida por la exposición prolongada al NO en las células adenohipofisarias.

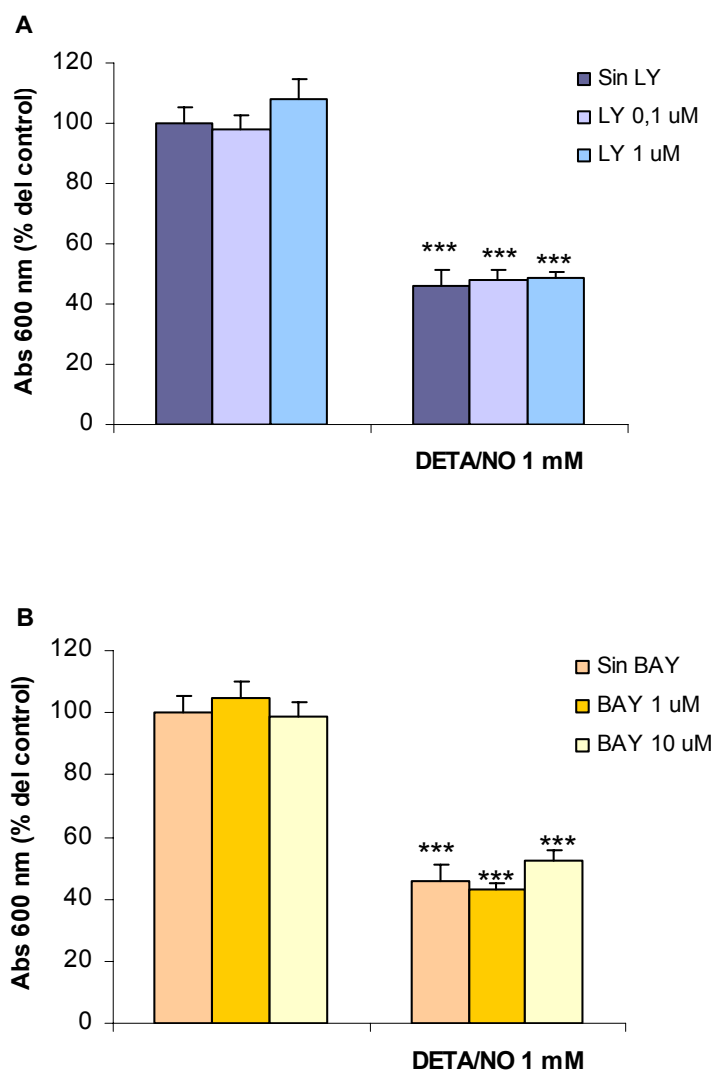


Figura 10: El efecto apoptótico del NO es independiente de la activación de la enzima sGC. Las células fueron incubadas por 24 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de LY-83583 (A) o BAY-41.2272 (B). Luego, las células fueron incubadas en medio fresco sin drogas hasta completar 48 hs y la viabilidad celular fue determinada mediante un ensayo de MTT. Los resultados representan la absorbancia media \pm SEM (n=8) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). ***p < 0.001 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El efecto apoptótico del NO es independiente de p53

La acumulación de p53 ha sido identificada como un indicador temprano del efecto apoptótico del NO (Brüne & Schneiderhan 2003; Hofseth et al. 2003). Se ha observado que el NO provoca la acumulación de p53 mediante la estabilización de la proteína transcripcionalmente activa y la inhibición de su degradación proteosomal (Glockzin et al. 1999; Brüne y Schneiderhan 2003). Además, en algunos casos, esta acumulación precede a la liberación de citocromo c y la activación de caspasas (Brockhaus & Brüne 1999).

En base a estas evidencias, como siguiente paso se estudió si el NO es capaz de inducir la acumulación de p53 en las células adenohipofisarias. Para ello se incubaron las células con DETA/NO 1 mM durante distintos tiempos y luego se evaluaron los niveles proteicos de p53 mediante Western Blot.

El nivel de proteína se mantuvo sin alteraciones durante todo el período de incubación con DETA/NO indicando que el NO no induce acumulación de p53 en las células adenohipofisarias (Fig. 11). Por lo tanto, esto indica que el efecto apoptótico del NO estaría mediado por un mecanismo independiente de p53.

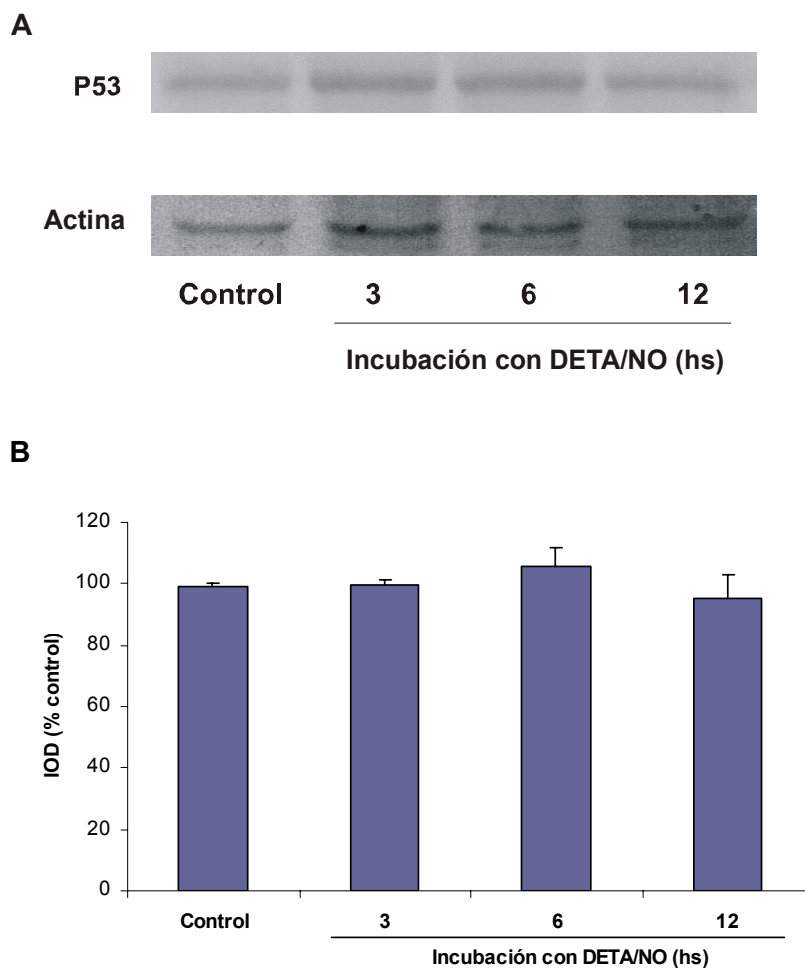


Figura 11: El efecto apoptótico del NO es independiente de p53. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados. Las células fueron lisadas por sonicación, centrifugadas y el sobrenadante obtenido fue utilizado en un ensayo de Western Blot para determinar los niveles proteicos de p53. **(A)** Western Blot de p53 y actina correspondiente a un experimento. **(B)** Densitometría de los Western Blots. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de p53 en cada condición fueron calculados como intensidad de banda de p53/intensidad de banda de actina y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). $p > 0.05$ en todos los casos. ANOVA.

❖ El NO altera la expresión de Bax y Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 constituyen un miembro clave en el proceso apoptótico. Esta familia está conformada por proteínas pro y antiapoptóticas, y actualmente se sugiere que el destino de la célula estaría determinado por el balance entre los miembros de ambos grupos (Adams & Cory 1998; Reed 2006).

Con el objetivo de investigar si el NO altera la expresión de estas proteínas, se estudiaron los cambios en la expresión de Bax (como representante de los miembros proapoptóticos) y de Bcl-2 (como representante de los miembros antiapoptóticos).

Las células adenohipofisarias se incubaron con DETA/NO 1 mM durante distintos tiempos y se evaluaron los cambios en la expresión de Bax, cuantificando los niveles de proteína mediante Western Blot. En la Fig. 12 se puede observar un aumento en los niveles proteicos de Bax a partir de las 3 hs de incubación con DETA/NO. La cuantificación de los niveles de ARNm (por RT-PCR semicuantitativa) confirmó que el NO induce un aumento de la expresión de Bax (Fig. 13 A y B)

Los cambios en la expresión de Bcl-2 se evaluaron por RT-PCR semicuantitativa midiendo los niveles de ARNm. Contrariamente al efecto sobre Bax, la incubación con DETA/NO produjo una disminución en la expresión de Bcl-2. Los niveles de ARNm no se modificaron durante las 3 primeras horas pero sí disminuyeron a partir de las 6 hs de incubación (Fig. 13 A y C).

En su conjunto, estos resultados muestran que el NO induce un aumento temprano en la expresión de Bax y una disminución en la de Bcl-2, lo que sugiere que el NO altera el equilibrio de los miembros de la familia Bcl-2 inclinándolo hacia un entorno proapoptótico.

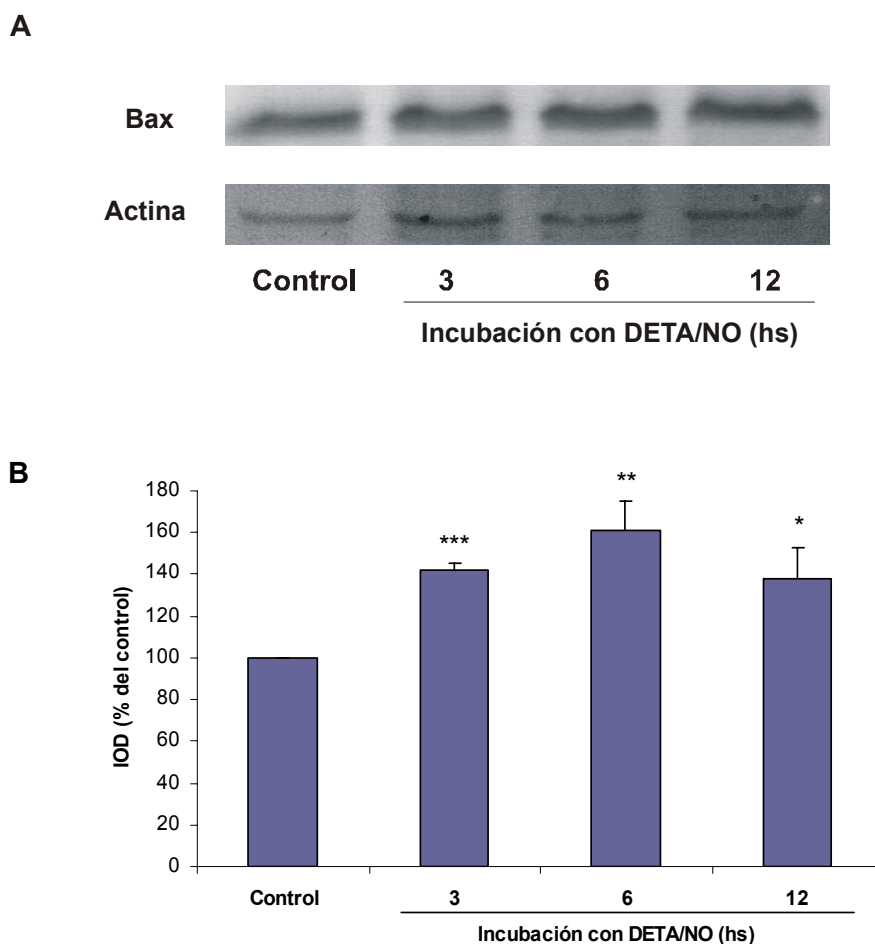


Figura 12: El NO induce un aumento de los niveles proteicos de BAX. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados. Las células fueron lisadas por sonicación, centrifugadas y el sobrenadante obtenido fue utilizado en un ensayo de Western Blot para determinar los niveles proteicos de Bax. **(A)** Western blot de Bax y actina correspondiente a un experimento. **(B)** Densitometría de los Western Blots. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de Bax en cada condición fueron calculados como intensidad de banda de Bax/intensidad de banda de actina y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

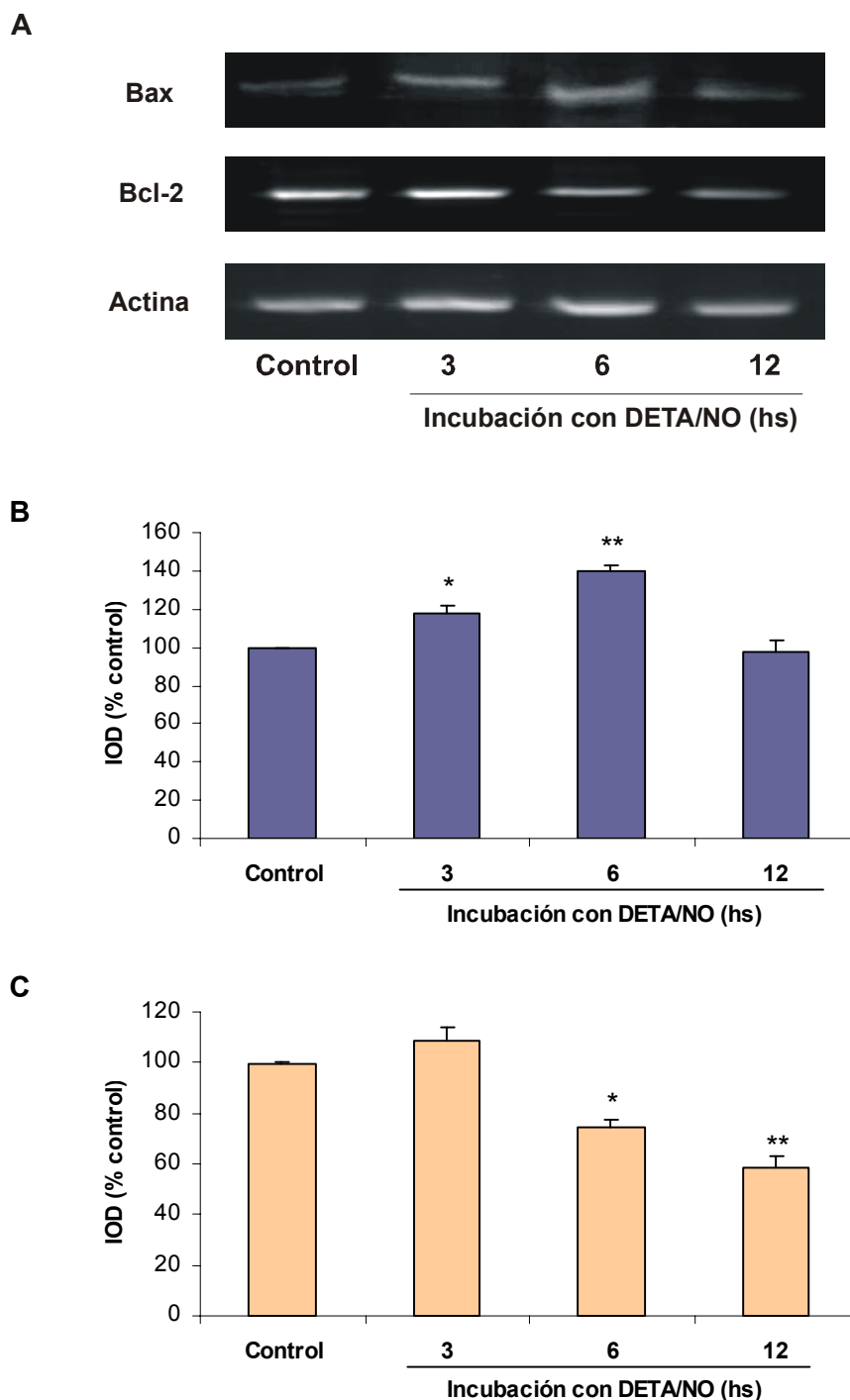


Figura 13: El NO altera la expresión de Bax y Bcl-2. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados. Los niveles de ARNm de Bax y Bcl-2 fueron determinados por RT-PCR semicuantitativa. **(A)** Productos de RT-PCR de Bax, Bcl-2 y actina correspondientes a un experimento. **(B y C)** Densitometría de Bax y Bcl-2, respectivamente. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de ARNm tanto de Bax como de Bcl-2 fueron calculados como intensidad de banda de Bax o Bcl-2/intensidad de banda de actina y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

❖ El efecto apoptótico del NO es independiente de calcio

Debido a que el calcio participa en múltiples procesos vitales para la célula, su concentración citosólica se mantiene estrictamente regulada (Carafoli 2002) y alteraciones de la misma pueden provocar muerte celular programada (Chan et al. 2002; Alberdi et al. 2005). Hay evidencias que muestran que el NO provoca un aumento citosólico de calcio y que esto es determinante en la inducción de apoptosis (Brorson & Zhang 1997). Por otro lado, estudios recientes sugieren que los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 contribuirían con el inicio del proceso apoptótico favoreciendo la salida de calcio desde el RE (Scorrano et al. 2003; Mathai et al. 2005).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que un aumento prolongado de calcio resulta perjudicial para las células adenohipofisarias (Poliandri 2006) y que el NO es capaz de inducir una movilización rápida y transitoria de calcio a tiempos muy cortos (minutos) (Duvilanski et al. 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió estudiar qué ocurre con los niveles citosólicos de este catión luego de tiempos más largos de exposición al NO (horas). Posteriormente al tratamiento de las células con el dador de NO se realizaron las mediciones de calcio por citometría de flujo, utilizando la sonda fluorescente Calcium-green. Durante las primeras 6 hs de incubación con DETA/NO no hubo modificaciones en los niveles de calcio. Hacia las 12 hs se produjo un leve aumento, el cual se hizo significativamente muy marcado luego de 18 hs de tratamiento (Fig. 14).

Este aumento de calcio se produce en un tiempo en el que el proceso apoptótico ya se encuentra avanzado, indicando que el calcio no sería un mediador temprano clave en la cascada apoptótica inducida por NO. Para corroborarlo, se evaluó si el tratamiento con un quelante de calcio podía prevenir el efecto apoptótico del NO. Para ello, se determinó la viabilidad celular luego del co-tratamiento de las células con DETA/NO y el quelante específico de calcio BAPTA-AM, en concentraciones que previamente demostramos anulaban los efectos nocivos del exceso del catión (Poliandri 2006). El efecto citotóxico del NO no pudo ser prevenido por el quelante de calcio BAPTA-AM, aún en la máxima

concentración posible utilizada (Fig. 15), sugiriendo que el aumento de este segundo mensajero no es relevante como desencadenante del efecto apoptótico del NO.

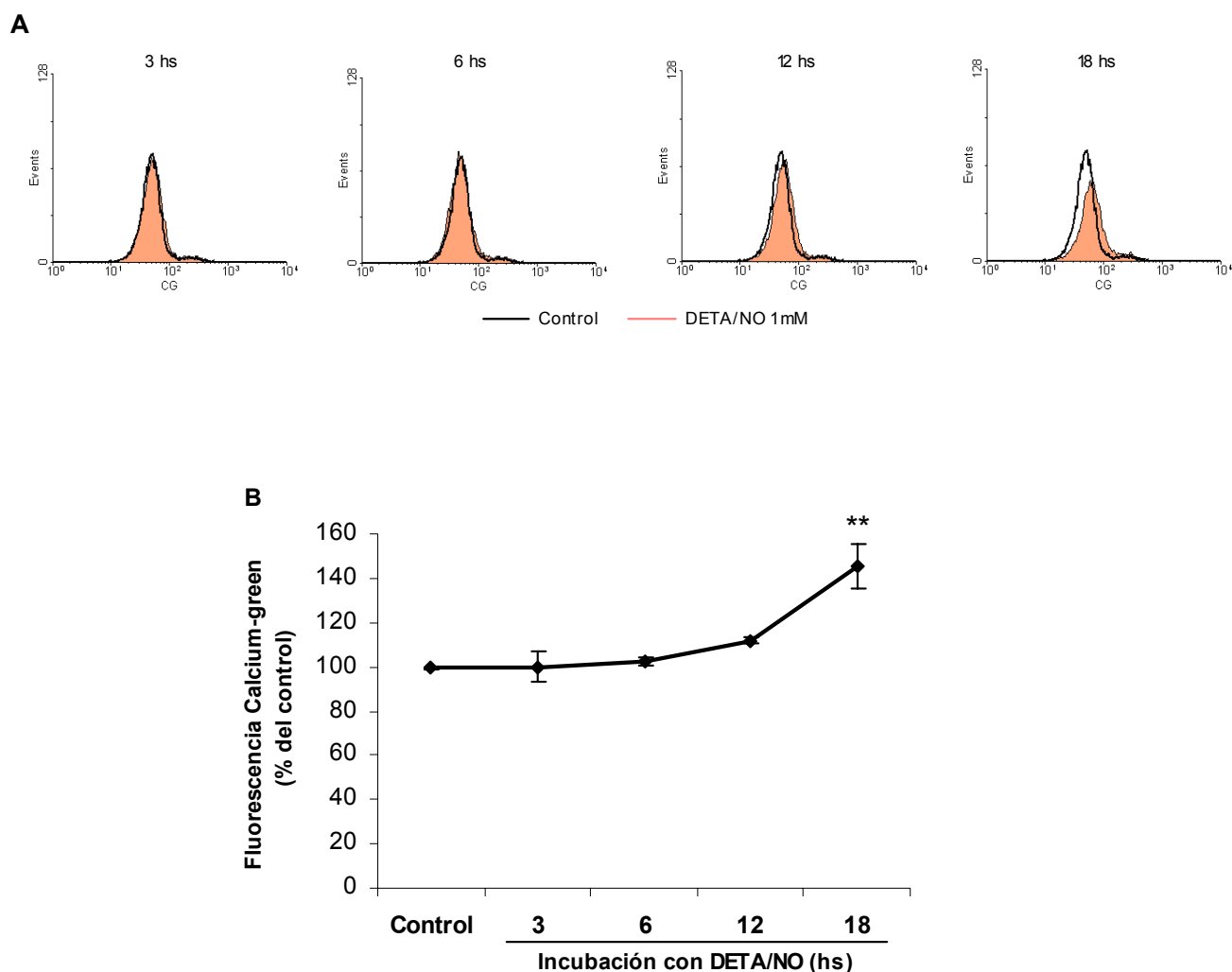


Figura 14: El NO aumenta los niveles citosólicos de calcio. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados y cargadas con la sonda Calcium-green 10 μ M durante los últimos 30 min de tratamiento. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. **(A)** Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje Y: número de células, eje X: intensidad de fluorescencia. Se muestra la distribución de la fluorescencia de las células incubadas con DETA/NO en forma superpuesta con la del control (células sin tratamiento). **(B)** Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control. **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

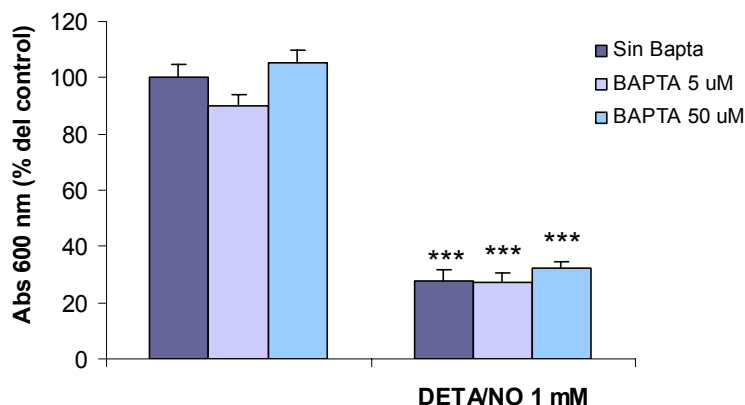


Figura 15: El efecto apoptótico del NO es independiente del calcio. Las células fueron incubadas por 24 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de BAPTA-AM. Luego, las células fueron incubadas en medio fresco sin drogas hasta completar 48 hs y la viabilidad celular fue determinada mediante un ensayo de MTT. Los resultados representan la absorbancia media \pm SEM (n=8) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). ***p < 0.001 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El NO induce un incremento temprano de ROS

Actualmente se postula que las ROS son importantes mediadoras de diversas cascadas de señales en varios procesos biológicos (Sen 2000; Lander 1997; Voeikov 2006) y que un aumento de las mismas puede inducir muerte celular por apoptosis (Tan et al. 1998, Simon et al. 2000). Consistentemente con esto, se ha observado que se requiere de la producción de ROS para la inducción de apoptosis por el NO en ciertos tipos celulares (Brown & Borutaite 2001; Hu & Brindle 2005).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se investigó si el NO es capaz de producir cambios en los niveles intracelulares de ROS en las células adenohipofisarias. Para ello, las células se incubaron con DETA/NO 1 mM por diferentes tiempos y los niveles de ROS se determinaron por citometría de flujo utilizando la sonda DHR123.

En la Fig. 16 puede observarse que el NO produjo un incremento en los niveles intracelulares de ROS durante las 3 primeras horas de incubación. Luego, éstos disminuyeron progresivamente, retornando a los niveles basales hacia las 6 hs y a niveles inferiores después de las 18 hs.

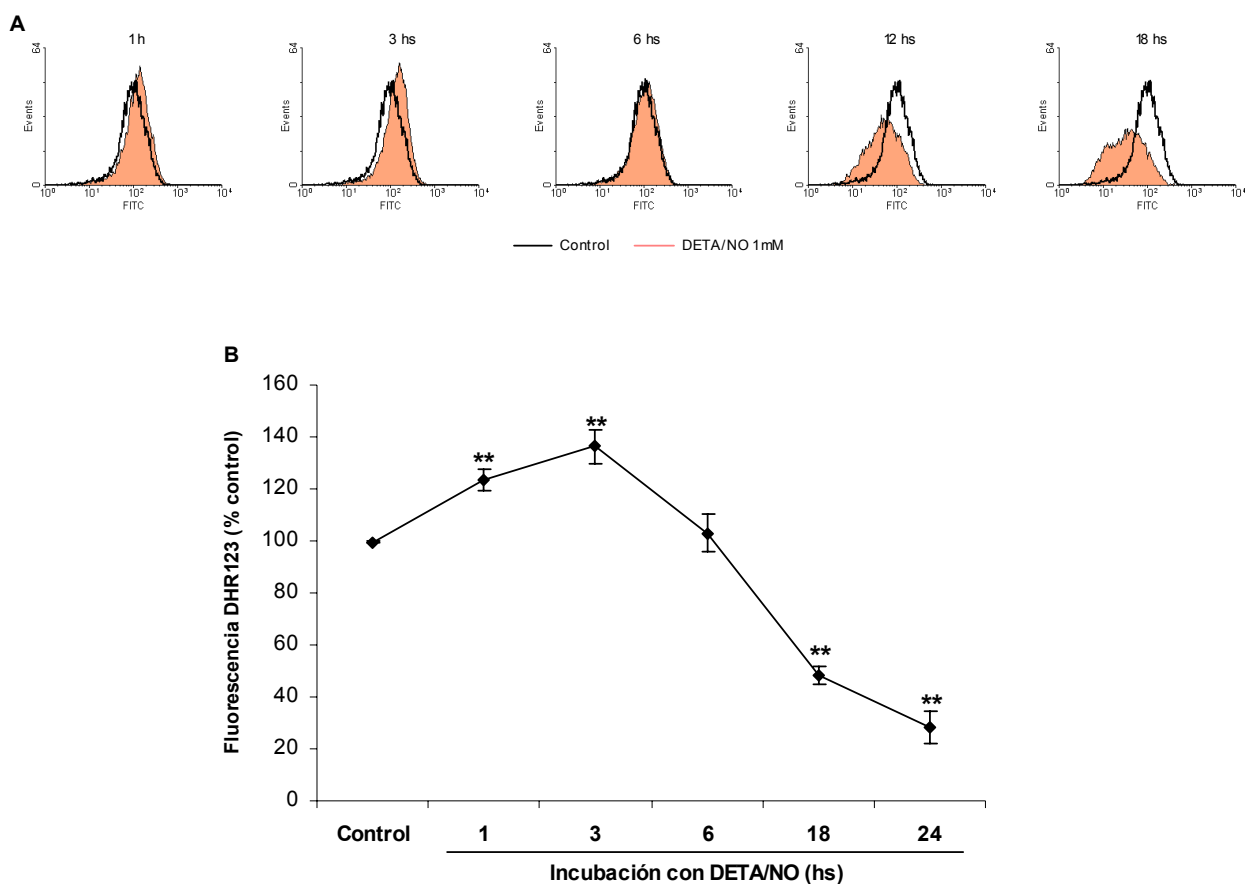


Figura 16: El NO induce un aumento transitorio de ROS. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados y cargadas con DHR123 20 μ M durante los últimos 20 min de tratamiento. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. **(A)** Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje Y: número de células, eje X: intensidad de fluorescencia. Se muestra la distribución de la fluorescencia de las células incubadas con DETA/NO en forma superpuesta con la del control (células sin tratamiento). **(B)** Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control. **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

Según algunos autores, la DHR123, que es oxidada a rodamina 123, requiere de su internalización a la membrana mitocondrial para fluorescer (Sobreira et al. 1996). Otros, sin embargo, muestran que la capacidad de fluorescer es independiente de su localización mitocondrial (Crow 1997). Los resultados obtenidos muestran una disminución de los niveles de ROS en tiempos prolongados de incubación con DETA/NO y esto coincide con la caída del PMM (Fig. 8). Para evitar que cualquier alteración en el PMM pueda interferir en la determinación de ROS, se decidió cuantificar los niveles intracelulares de ROS utilizando la sonda DCDCF-DA. Esta sonda es un análogo estructural de la DHR123 con la diferencia de que luego de ser oxidada a fluoresceína por las ROS, permanece en el citoplasma (Crow 1997). En este caso la fluorescencia fue determinada por espectrofluorometría, normalizando el resultado con el contenido de ADN teñido con IP. Los resultados obtenidos con DCDCF-DA reprodujeron a los observados con la sonda DHR123 (Fluorescencia DCDCF-DA/IP, % del control: Control: 100 ± 2 ; DETA/NO 1h: $125 \pm 6^*$; 3 hs: 117 ± 4 ; 6hs: 108 ± 1 ; 18hs: $72 \pm 2^*$; 24hs: $68 \pm 11^{**}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. Media \pm SEM, n=3. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes).

❖ El aumento de ROS inducido por el NO se origina en la mitocondria

La mitocondria es la principal fuente de ROS dentro de la célula (Brunk & Terman 2002). En condiciones normales, hasta un 5% del O_2 consumido durante la respiración mitocondrial es reducido sólo parcialmente, generando al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir del cual se forman H_2O_2 y el radical hidroxilo ($HO^{\cdot-}$), especies mucho más reactivas que el primero (Chance et al. 1979; Elliot & Volkert 2004). La mayor parte del $O_2^{\cdot-}$ se genera por el escape de electrones a nivel del complejo III de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Armstrong et al. 2004).

El NO es uno de los principales reguladores de la respiración mitocondrial. Está firmemente demostrado que el NO puede unirse reversiblemente al complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) de la CTE, causando una inactivación

transitoria del mismo y favoreciendo la formación de ROS (Poderoso et al. 1996). El NO, a su vez, reacciona con el $O_2^{\cdot-}$ formado en exceso generando peroxinitrito, uno de los radicales libres más reactivos mediadores de muchos de los efectos nocivos del NO (Wink & Mitchell 1998; Koppenol 1999; Gow et al. 2002).

Con el fin de determinar si el aumento en los niveles de ROS podría deberse a un efecto del NO sobre la CTE, las células se incubaron con DETA/NO 1 mM en presencia de rotenona. Esta droga es un inhibidor del complejo NADH oxidasa I (complejo I) de la CTE que impide la entrada de electrones a la cadena, reduciendo la capacidad de la misma para generar $O_2^{\cdot-}$ (Gennari et al. 2000; Pearlstein et al. 2002). Dado que la rotenona inhibe la respiración pudiendo inducir muerte celular, en primer lugar se realizaron incubaciones con concentraciones crecientes de esta droga de modo tal de hallar una concentración que pudiera disminuir la entrada de electrones a la CTE sin afectar la viabilidad celular. Los resultados obtenidos en el ensayo de MTT mostraron que concentraciones de rotenona inferiores o iguales a 50 nM no resultan tóxicas para las células (Fig. 17), por lo cual fueron las elegidas para el siguiente experimento.

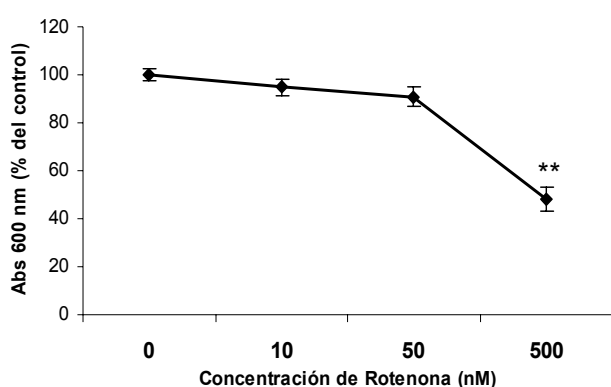


Figura 17: Efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de rotenona por 24 hs. El medio fue reemplazado por medio fresco sin la droga y se determinó la viabilidad celular a las 48 hs de iniciado el tratamiento mediante un ensayo de MTT. Los resultados representan la absorbancia media \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). ** p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

A continuación se examinó si el aumento en los niveles de ROS inducidos por el NO era modificado por la presencia de rotenona. Para ello las células se co-incubaron con DETA/NO 1 mM y/o rotenona 10 o 50 nM durante 3 hs, tiempo en el cual se produce el aumento de ROS, y la fluorescencia fue cuantificada con la sonda citosólica DCDCF-DA. Ninguna de las dos concentraciones de rotenona utilizadas modificaron *per se* los niveles basales de ROS. La rotenona en concentración de 10 nM no pudo prevenir el aumento de ROS inducido por el NO. Sin embargo, en una concentración de 50 nM, la droga sí fue efectiva e inhibió completamente el incremento de ROS (Fig. 18) confirmando que este aumento se origina en la mitocondria.

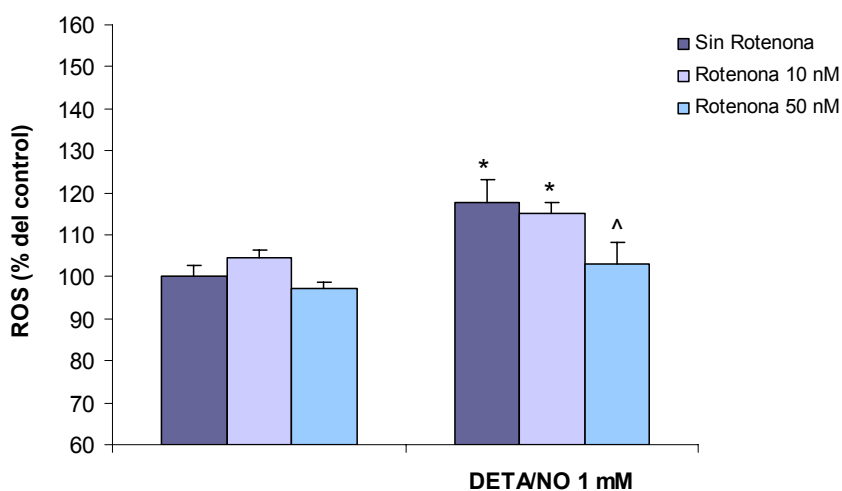


Figura 18: La rotenona previene el aumento de ROS inducido por el NO. Las células fueron incubadas por 3 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de Rotenona. Durante los últimos 20 min de tratamiento, las células fueron cargadas con DCDCF-DA 20 μ M y la fluorescencia fue cuantificada por espectrofluorometría, normalizando los valores obtenidos por el contenido de ADN. Los niveles intracelulares de ROS fueron calculados como fluorescencia de DCDCF / fluorescencia IP y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control; ^ $p < 0.05$ vs. DETA/NO sin Rotenona. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Los dos últimos resultados muestran que el aumento de ROS se produce en la mitocondria, y que ocurre muy tempranamente en la cascada de señalización generada por el NO. Este aumento precede a la activación de la caspasa 3, a la disminución de los niveles de Bcl-2, y es aparentemente simultáneo con el aumento de Bax. En base a estos resultados se planteó como hipótesis que el incremento de ROS podría constituir uno de los primeros eventos desencadenantes de la cascada apoptótica inducida por el NO en las células adenohipofisarias.

Para confirmar esta idea los siguientes experimentos se realizaron en presencia de N-acetil cisteína (NAC), un precursor del glutatión reducido con capacidad antioxidante (Zafarullah et al. 2003).

❖ El NAC revierte completamente el aumento de ROS inducido por el NO

En base al objetivo planteado, se evaluó en primer lugar el efecto de la NAC sobre el aumento de la producción de ROS.

Como puede observarse en la Fig. 19, el antioxidante redujo completamente el aumento de ROS generado por el NO.

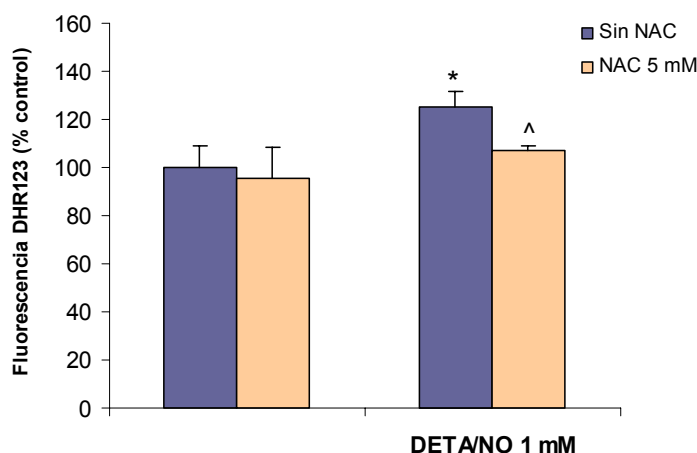


Figura 19: El NAC revierte el aumento de ROS inducido por el NO. Las células fueron incubadas por 3 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 10 mM. Durante los últimos 20 min de tratamiento, las células fueron cargadas con DHR123 20 μ M y la fluorescencia fue cuantificada por citometría de flujo. Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). *p < 0.05 vs. control; ^p < 0.05 vs. DETA/NO sin NAC. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El NAC previene la activación de caspasa 3 inducida por el NO

Para investigar si las ROS producidas por el NO llevan a la activación de caspasa 3, se evaluó la actividad de esta proteasa luego de la incubación de las células con DETA/NO 1 mM en presencia de NAC 5 mM por 12 hs (tiempo en el que la actividad de la caspasa mostró el aumento más significativo con respecto al control).

La incubación en presencia del antioxidante previno completamente la activación de caspasa 3 inducida por el NO (Fig. 20).

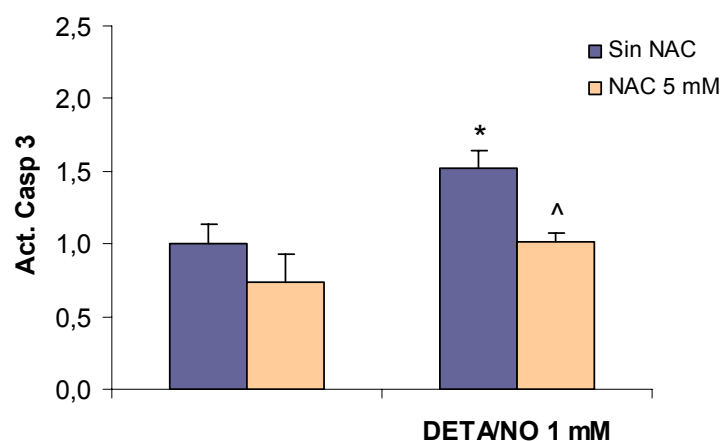


Figura 20: El NAC previene la activación de caspasa 3 inducida por el NO. Las células fueron incubadas por 12 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 5 mM. Finalizado los tratamientos, la actividad de caspasa 3 fue determinada midiendo el clivaje del sustrato específico Ac-DEVD-pNA a 405 nm. La actividad de caspasa fue calculada como Abs 405 nm/mg prot y expresada en unidades relativas al control (células sin tratamiento). Los resultados representan la media \pm SEM, n=4. *p < 0.05 vs. control; ^p < 0.05 vs. DETA/NO sin NAC. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ **El NAC reduce el efecto del NO sobre la expresión de Bax y Bcl-2**

A continuación, se estudió el efecto del antioxidante sobre los cambios producidos por el NO en la expresión de Bax y Bcl-2, incubando a las células con DETA/NO 1 mM y NAC 5 mM durante 6 hs (tiempo en el cual ocurren los cambios más marcados).

El agregado de NAC previno totalmente el aumento en la expresión de Bax a nivel de ARNm y parcialmente a nivel de proteína (Fig. 21 A, B y Fig. 22). Con respecto a la expresión de Bcl-2, el tratamiento con el antioxidante previno de forma marcada, aunque no completamente, la disminución de los niveles de ARNm causada por el NO (Fig. 21 A, C).

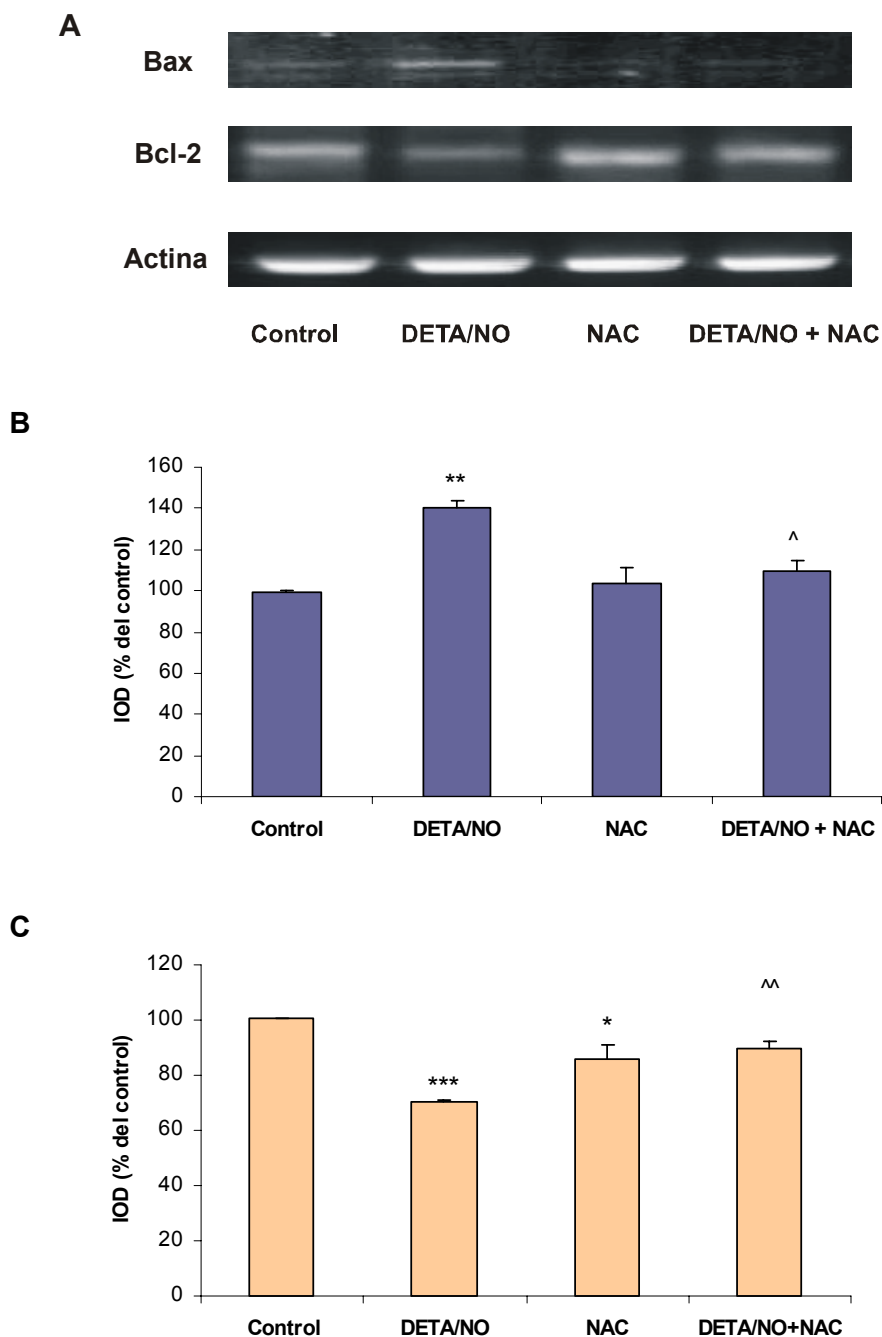


Figura 21: El NAC reduce los cambios inducidos por el NO sobre la expresión de Bax y Bcl-2. Las células fueron incubadas por 6 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 5 mM. Finalizados los tratamientos, los niveles de ARNm de Bax y Bcl-2 fueron determinados por RT-PCR semicuantitativa. **(A)** Productos de RT-PCR de Bax, Bcl-2 y actina correspondientes a un experimento. **(B y C)** Densitometría de Bax y Bcl-2, respectivamente. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de ARNm tanto de Bax como de Bcl-2 fueron calculados como intensidad de banda de Bax o Bcl-2/intensidad de banda de actina y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ vs. DETA/NO. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

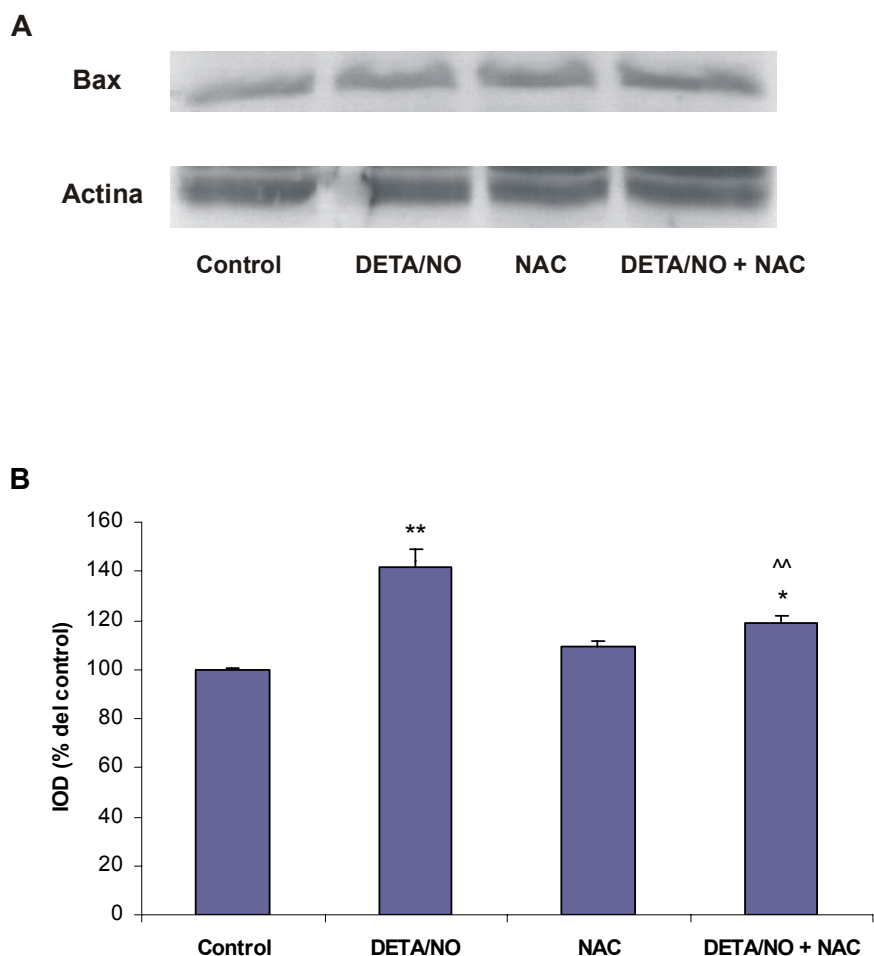


Figura 22: El NAC reduce el aumento de los niveles proteicos de BAX causado por el NO. Las células fueron incubadas por 6 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 5 mM. Finalizados los tratamientos, las células fueron lisadas por sonicación, centrifugadas y el sobrenadante fue utilizado en un ensayo de Western Blot para determinar los niveles proteicos de Bax. **(A)** Western Blot de Bax y actina correspondiente a un experimento. **(B)** Densitometría de los Western Blots. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los niveles de Bax en cada condición fueron calculados como intensidad de banda de Bax/intensidad de banda de actina y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control; ^^ $p < 0.01$ vs. DETA/NO. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

❖ El NAC previene parcialmente el efecto apoptótico del NO

Finalmente, para corroborar el papel de las ROS como mediadoras del efecto apoptótico del NO en las células adenohipofisarias, se evaluó el efecto de la NAC sobre la muerte celular inducida por el NO.

En primer lugar, se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Para ello, las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM en presencia o ausencia de NAC 5 mM por 24 hs. Luego, el medio fue descartado y reemplazado por medio fresco sin drogas hasta completar las 48 hs. Los resultados obtenidos indican que el efecto citotóxico del NO fue marcadamente reducido en presencia de NAC (Abs 600 nm, % del control: Control: 100 ± 4 ; DETA/NO 1 mM: $28 \pm 4^{***}$; NAC 5 mM: 90 ± 4 ; DETA/NO + NAC: $80 \pm 5^{***\wedge\wedge}$. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. control; $\wedge\wedge p < 0.001$ vs. DETA/NO. Media \pm SEM, n=8. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes)

Para confirmar este resultado se realizaron otros dos ensayos más que permiten detectar directamente células apoptóticas. Por un lado se realizó un análisis de la morfología nuclear y se evaluó la presencia de núcleos fragmentados, marcador morfológico clásico de las últimas etapas de la apoptosis. Como puede verse en la Fig. 23, la incubación con DETA/NO produjo un aumento del número de núcleos fragmentados, y dicho aumento fue reducido en un 70 % al co-incubar con el antioxidante.

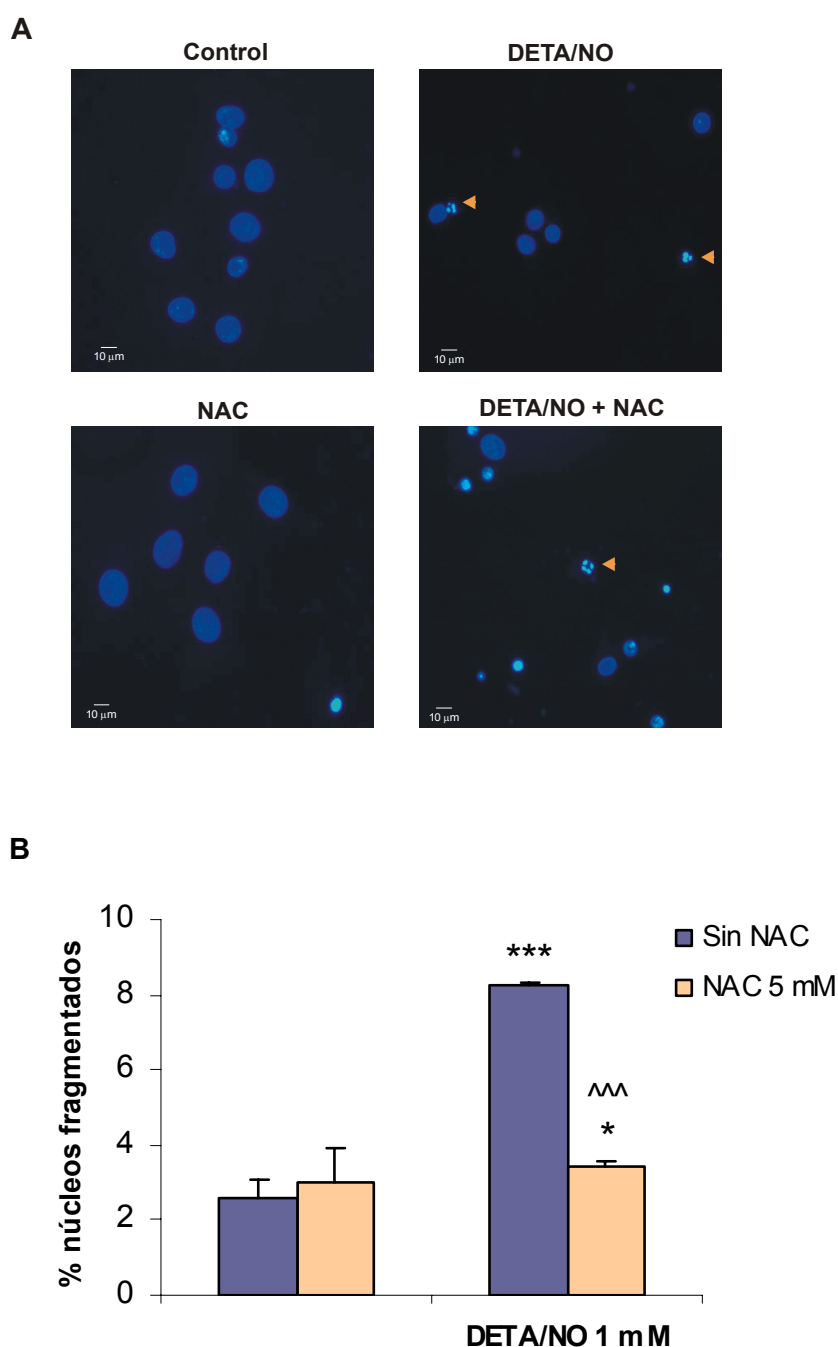


Figura 23: El NAC reduce el aumento de núcleos fragmentados causado por el NO. Las células fueron incubadas por 24 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 5 mM. Luego, las células fueron incubadas en medio fresco sin drogas hasta completar 48 hs. Posteriormente, las células fueron fijadas y se analizó la presencia de núcleos fragmentados mediante un análisis microscópico utilizando DAPI como colorante nuclear. **(A)** Imágenes de los núcleos en los distintos tratamientos visualizados con filtro UV en microscopio de fluorescencia. Los núcleos fragmentados están indicados con la punta de flecha. El resto de los núcleos son normales. **(B)** Los resultados representan la media \pm SEM, $n=3$. El porcentaje de núcleos fragmentados fue calculado como $(n^\circ \text{ de núcleos fragmentados} / \text{total de núcleos}) \times 100$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control; ^^ $p < 0.001$ vs. DETA/NO sin NAC. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Seguidamente, la inducción de apoptosis fue determinada por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e IP. Este ensayo permite detectar células que están entrando en apoptosis así como también células en los últimos estadios del proceso (Vermes et al. 1995). Para poder observar los cambios generados por el antioxidante en la apoptosis inducida por el NO, se examinó directamente la presencia de células apoptóticas luego de 48 hs de tratamiento, tiempo en el que el proceso apoptótico está muy avanzado. Como puede observarse en la Fig. 24, la incubación con DETA/NO aumentó significativamente el porcentaje de células apoptóticas. Estas células son Anexina V positivas, IP positivas casi en su totalidad debido al estado avanzado del proceso apoptótico (Materiales & Métodos, pág. 39). La co-incubación con NAC redujo marcadamente, aunque no en forma total, este aumento.

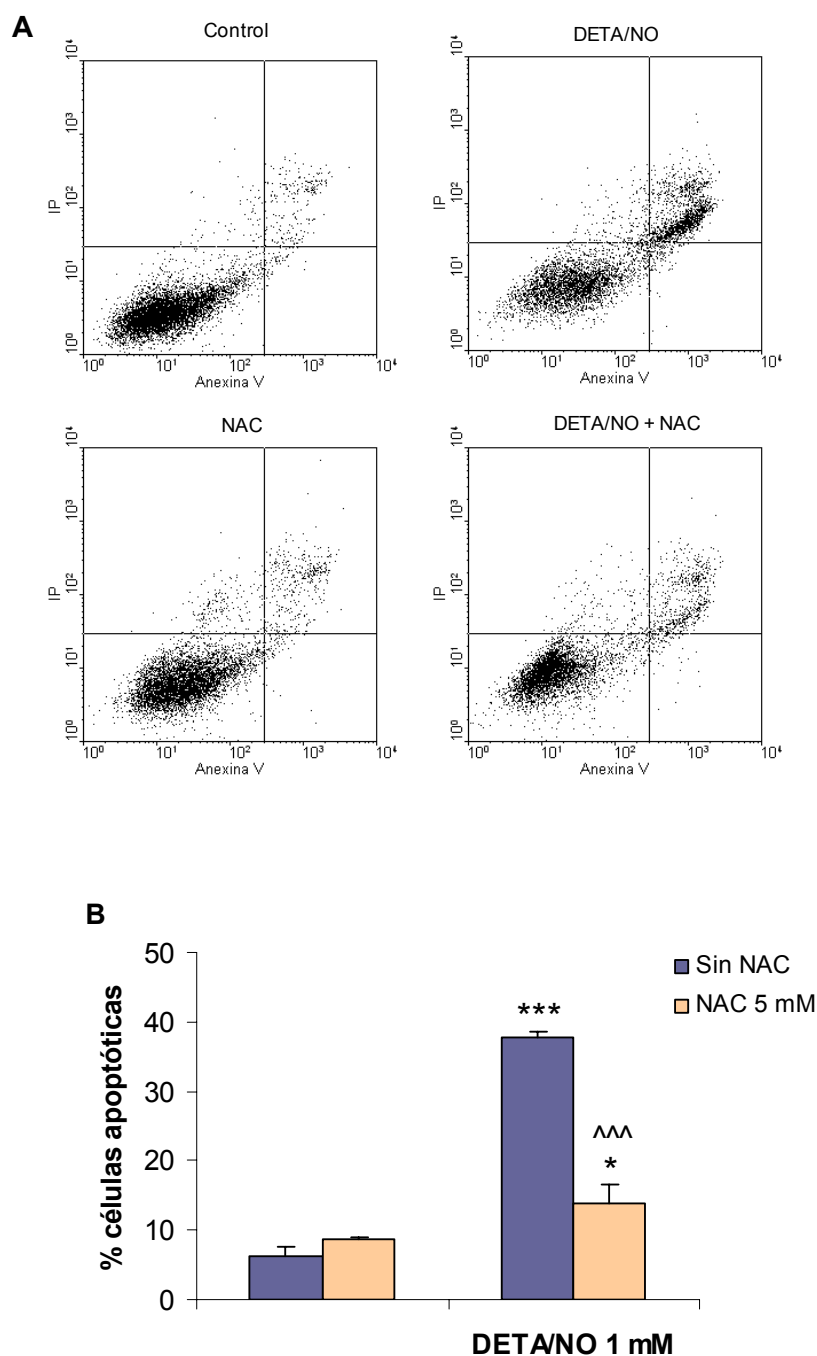


Figura 24: El NAC previene la apoptosis inducida por NO. Las células fueron incubadas por 24 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de NAC 5 mM. Luego, las células fueron incubadas en medio fresco sin drogas hasta completar 48 hs y la presencia de células apoptóticas fue determinada mediante citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e IP. **(A)** Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje Y: IP, eje X: Anexina V-FITC. Cuadrante inferior izquierdo: células vivas (An -; IP -); cuadrante inferior derecho: apoptóticas tempranas (An +, IP -); cuadrante superior derecho: apoptóticas tardías (An +, IP +); cuadrante superior izquierdo: necróticas (An -; IP +). **(B)** Resultados del porcentaje de células apoptóticas totales (An +) de los distintos tratamientos. Se representa la media de fluorescencia \pm SEM, $n=3$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control; ^^ $p < 0.001$ vs. DETA/NO sin NAC. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

En su conjunto estos resultados avalan la hipótesis de que las ROS serían uno de los principales mediadores del efecto apoptótico del NO en las células adenohipofisarias, y que podrían constituir una de las primeras señales en la vía apoptótica inducida por el NO.

Un aumento de los niveles intracelulares de ROS puede darse por un incremento en su producción y/o por una alteración en el sistema antioxidante celular. Como se describe en la introducción, el sistema antioxidante de la célula está formado por componentes enzimáticos y no enzimáticos que mantienen el balance redox, previniendo los efectos tóxicos causados por un exceso de ROS. Entre las enzimas antioxidantes más importantes pueden citarse la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 25). El glutatión reducido (GSH) es el componente no enzimático por excelencia. Este tiol actúa como cofactor de la GPx pero tiene además capacidad antioxidante *per se* (Townsend et al. 2003).

Hay varias evidencias que indican que el NO puede modular la actividad de la catalasa mediante la interacción directa con el hierro presente en el grupo hemo de la misma y de las enzimas GPx y GR a través de S-nitrosilaciones (Cooper 1999; Beltrán et al. 2000; Foster et al. 2004). Por tal motivo, a continuación se estudió el efecto del NO sobre los distintos componentes del sistema de defensa antioxidante celular.

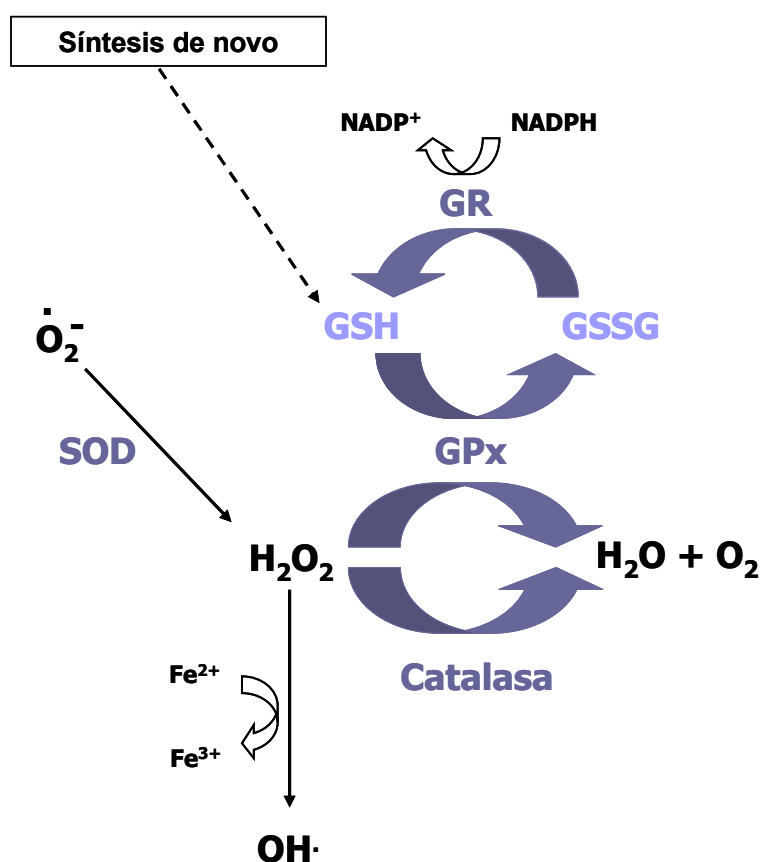


Figura 25: Sistema de defensa antioxidante celular. La SOD, la catalasa, la GPx y la GR son las enzimas antioxidantes más importantes. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido en H_2O_2 . Este es convertido a H_2O y O_2 por la acción de dos peroxidasas: la catalasa y la GPx. La catalasa es una hemo-proteína que usa al hidrógeno como agente reductor. La GPx es una selenoproteína que utiliza GSH como dador de hidrógenos. Esta enzima puede reducir también lipoperóxidos y otros hidroperóxidos orgánicos. El GSH es el componente antioxidante no enzimático por excelencia. Además de actuar como cofactor de la GPx, este tiol tiene capacidad antioxidante *per se*. Durante la detoxificación de peróxidos, la GPx oxida al GSH formando GSSG (glutación oxidado) como producto final de la reacción. El GSH consumido puede ser restablecido a través de su reciclaje por acción de la GR o bien por la síntesis *de novo*. El mantenimiento de una relación GSH/GSSG óptima es crucial para la vida de la célula (Townsend et al. 2003).

❖ **El NO modifica la actividad de las enzimas antioxidantes**

Con el objetivo de evaluar el efecto del NO sobre las enzimas antioxidantes, las células adenohipofisarias se incubaron con DETA/NO 1 mM por diferentes tiempos y luego se determinó la actividad enzimática de la catalasa, GR y GPx por ensayos cinéticos estándares. El tratamiento con DETA/NO produjo una disminución de la actividad de la catalasa del 80% desde las primeras horas de incubación (Fig. 26A). El NO también causó una reducción persistente de la actividad de la GR, aunque no tan marcada como la de la catalasa (Fig. 26B). Con respecto a la GPx, el tratamiento con DETA/NO aumentó la actividad de esta enzima después de las 6 hs (Fig. 26C).

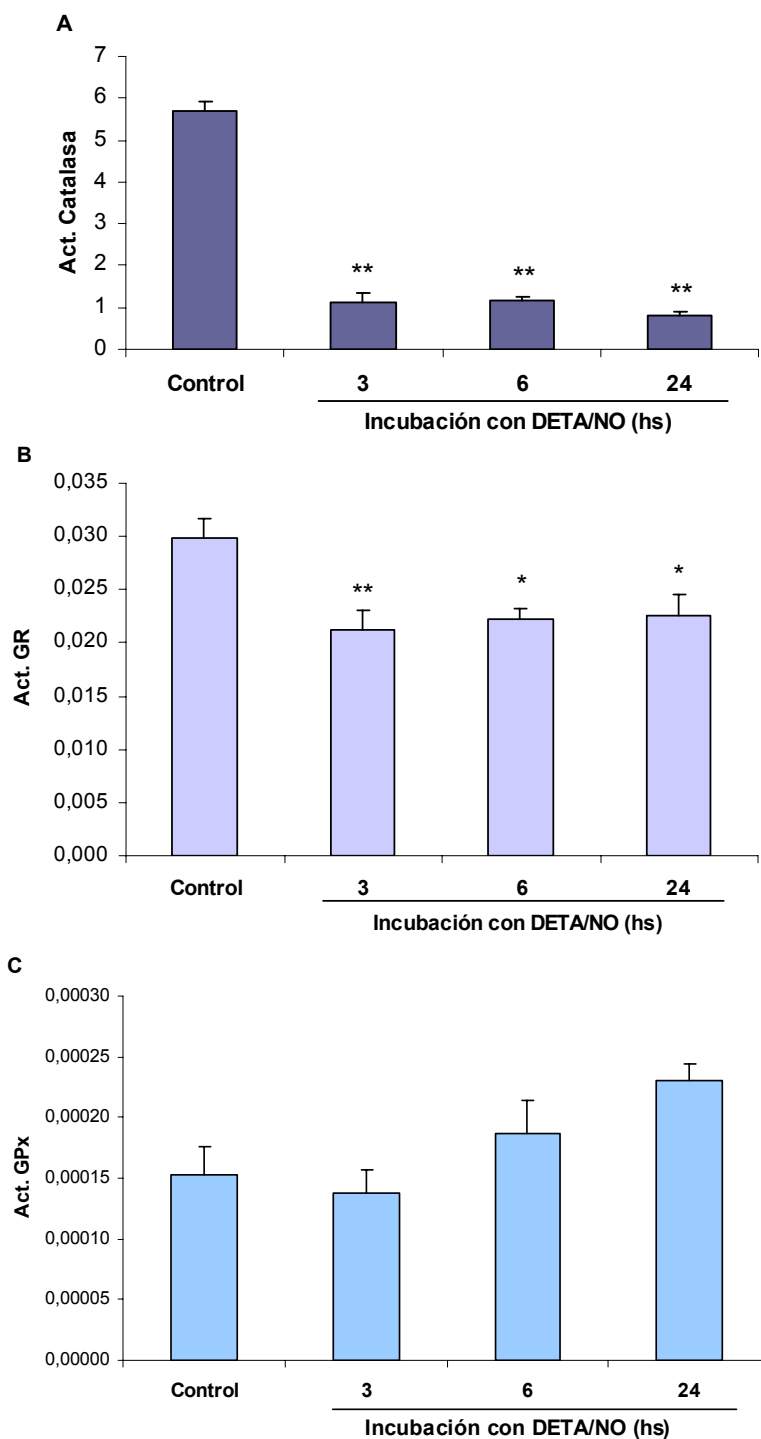


Figura 26: El NO modifica la actividad de las enzimas antioxidantes. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados, luego fueron lisadas y la actividad de las distintas enzimas fue determinada por ensayos espectrofotométricos convencionales. **(A)** La actividad enzimática de la catalasa fue determinada midiendo la velocidad de reducción del H_2O_2 a 240 nm durante 2 min y expresada como $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumidos/min/mg prot. La actividad de la GR **(B)** y de la GPX **(C)** fue determinada midiendo la velocidad de oxidación del NADPH a 340 nm durante 3 min y expresada como $\mu\text{moles de NADPH}$ consumidos/min/mg prot. Los resultados representan la media \pm SEM, n=3. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El NO modifica los niveles intracelulares de GSH y GSSG

Para estudiar el efecto del NO sobre el balance GSH/GSSG, las células se incubaron con el dador de NO por diferentes tiempos y los niveles intracelulares de GSH y GSSG se cuantificaron por espectrofluorometría utilizando el reactivo OPT.

A las 3 hs se observó un aumento en los niveles de GSSG que se mantuvo durante el resto del tratamiento con DETA/NO (Fig. 27A). Los niveles de GSH no se modificaron durante las primeras horas pero aumentaron a partir de las 6 hs de exposición al NO (Fig. 27A). Analizando la relación GSH/GSSG puede apreciarse que durante las primeras horas de tratamiento con NO dicha relación es menor a 1 indicando que la célula estaría en un estado redox más oxidado. A partir de las 6 hs, la relación vuelve a ser 1 debido a que el aumento de GSSG es compensado por el aumento de GSH (Fig. 27B).

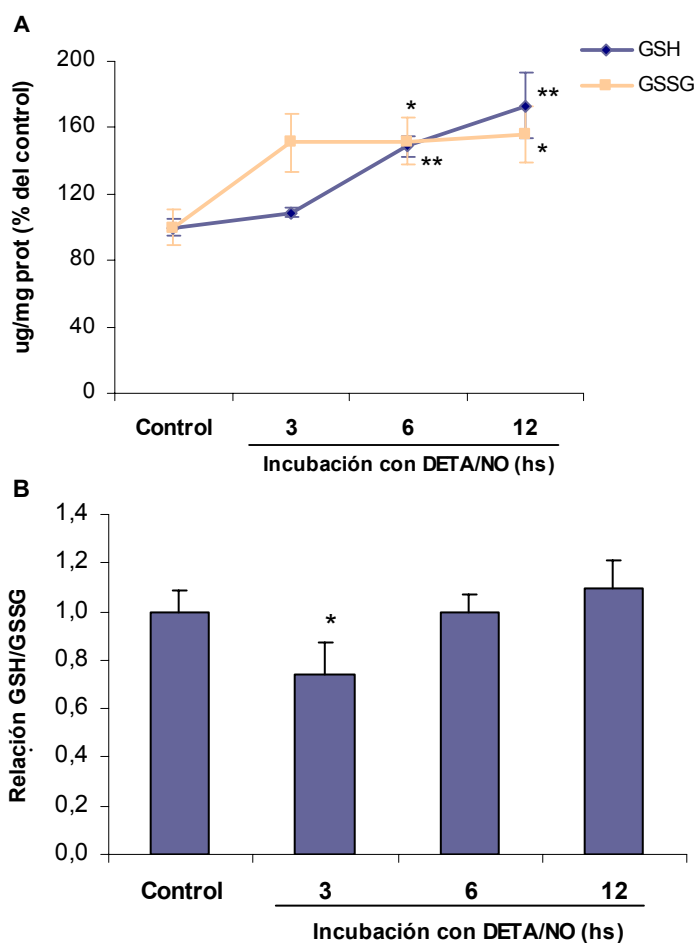


Figura 27: El NO modifica los niveles intracelulares de GSH y GSSG. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados, luego éstas fueron lisadas y los niveles intracelulares de GSH y GSSG fueron cuantificados por espectrofluorometría utilizando el reactivo OPT. **(A)** Niveles intracelulares de GSH y GSSG calculados a partir de las curvas estándares respectivas como $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ y expresados como porcentaje de los niveles en el control (células sin tratamiento). **(B)** Relación GSH/GSSG. Los resultados representan la media \pm SEM, $n=4$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Los niveles intracelulares de GSH fueron cuantificados paralelamente por otro método espectrofluorométrico utilizando la sonda MCB, la cual fluoresce luego de reaccionar específicamente con GSH (Sebastià et al. 2003). Los resultados obtenidos reprodujeron a los observados con OPT (Fig. 28)

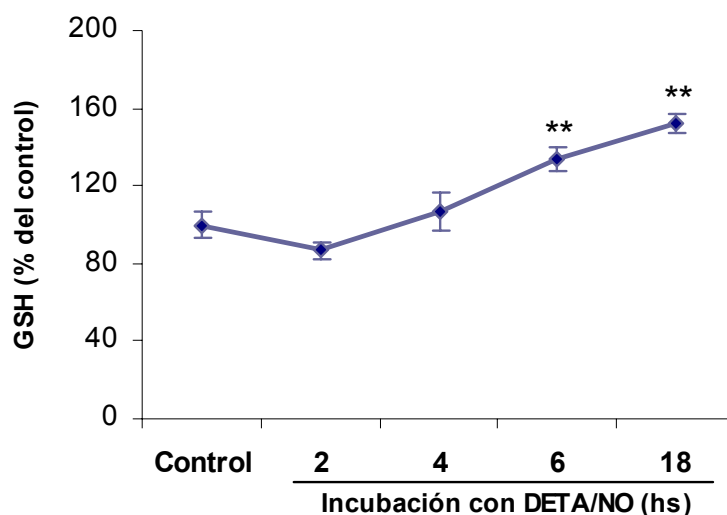


Figura 28: El NO aumenta los niveles intracelulares de GSH. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM por los tiempos indicados. Luego, las células fueron incubadas con la sonda MCB 100 μ M durante 30 min y la fluorescencia fue cuantificada por espectrofluorimetría, normalizando los valores obtenidos por el contenido de ADN. Los niveles intracelulares de GSH fueron calculados como fluorescencia de MCB/fluorescencia IP y expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM, n=4. **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El NO induce un aumento de la síntesis *de novo* de GSH

Como se describe en la Fig. 25, los niveles de GSH son mantenidos tanto por su reciclaje a partir del GSSG como por su síntesis *de novo*.

Los resultados mostraron que el tratamiento con NO causa un aumento en los niveles de GSSG y una reducción en la actividad de la GR sugiriendo que la vía de reciclaje está siendo inhibida. Sin ninguna otra alteración, se esperaría que los niveles de GSH disminuyeran durante la exposición al NO. Sin embargo se

observa un aumento, el cual podría deberse a un incremento en la síntesis. El GSH es sintetizado en el citoplasma por la acción secuencial de dos enzimas, la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) y la GSH sintasa (GS), siendo la primera la enzima limitante (Rahman & MacNee 2000). Hay evidencias que muestran que la presencia de agentes pro-oxidantes, incluyendo el NO, inducen la expresión de esta enzima y también que modificaciones post-traduccionales pueden modular su actividad (Shi et al. 1994; Moellering et al. 1998; Wild et al. 1998).

Con el objetivo de evaluar si el aumento de GSH observado se debe a un incremento de la síntesis *de novo*, los niveles intracelulares de GSH se cuantificaron luego de incubar a las células adenohipofisarias con DETA/NO 1 mM en presencia de BSO, inhibidor de la GCS. La inhibición de la enzima con BSO 30 μ M revirtió completamente el aumento de GSH causado por el NO sin modificar los niveles intracelulares basales del tiol. Una concentración mayor del inhibidor redujo levemente los niveles basales de GSH y causó una marcada disminución en la co-incubación con DETA/NO (Fig. 29).

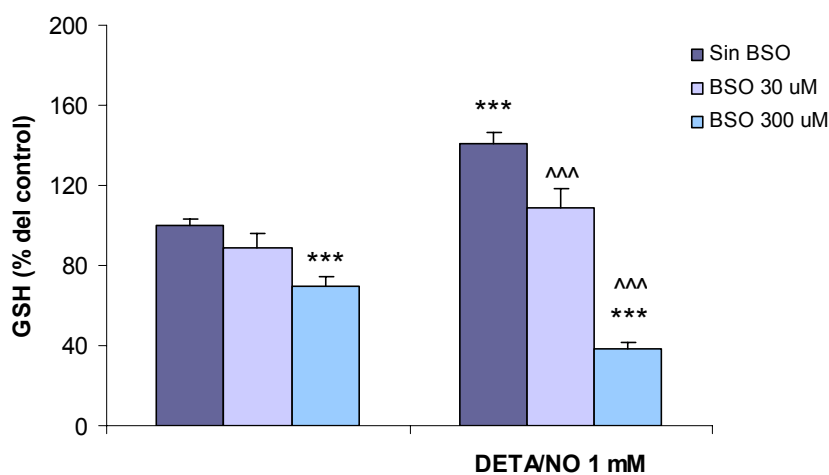


Figura 29: El NO induce un aumento de la síntesis *de novo* de GSH. Las células fueron incubadas por 6 hs con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de BSO. Luego, las células fueron incubadas con MCB 100 μ M durante 30 min y la fluorescencia fue cuantificada por espectrofluorimetría, normalizando los valores obtenidos por el contenido de ADN. Los niveles intracelulares de GSH fueron calculados como fluorescencia de MCB/fluorescencia IP y expresados como porcentaje de los niveles en el control (células sin tratamiento). Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM, n=4. ***p < 0.001 vs. control; ^^^p < 0.001 vs. DETA/NO sin BSO. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Como se mencionó previamente, el mantenimiento de una relación GSH/GSSG óptima es crucial para la vida de la célula (Townsend et al. 2003). Si bien las concentraciones de BSO utilizadas son las que se reportan en la bibliografía, la concentración más alta provocó una caída de los valores basales de GSH. Con el fin de verificar que dicha concentración no fuera tóxica para las células y que los resultados obtenidos no hayan sido enmascarados por un incremento de la muerte celular, se determinó la viabilidad celular luego del tratamiento (24 hs) con diferentes concentraciones de BSO. Ninguna de las concentraciones utilizadas modificó la viabilidad celular indicando, por un lado, que la droga no tiene un efecto nocivo *per se* y por el otro, que la reducción de GSH basal observada no resulta perjudicial para la célula (Abs 600 nm, % del control, Control: 100 ± 2 ; BSO 30 μM : 101 ± 5 ; BSO 300 μM : 96 ± 4 . Media \pm SEM, $n=8$. $p > 0.05$ en todos los casos. ANOVA. Resultado representativo de 3 experimentos independientes).

❖ **El aumento de GSH contribuye con la remoción del exceso de ROS producido por el NO**

Como puede observarse en la Fig. 16, luego del aumento inicial, los niveles de ROS disminuyen a valores basales hacia las 6 hs de tratamiento con NO y a niveles inferiores después de las 18 hs. Dado que los niveles intracelulares de GSH aumentan concomitantemente con la caída de ROS (Fig. 27A y Fig. 28), el GSH que está siendo sintetizado *de novo* podría ser responsable de dicha disminución. Para confirmarlo, se evaluó el efecto del BSO sobre los cambios en los niveles intracelulares de ROS inducidos por el NO. En la Fig. 30 puede verse que luego del aumento inicial, las ROS retornan a los valores del control hacia las 6 hs de incubación con DETA/NO. En cambio, en la incubación con DETA/NO en presencia de BSO, los niveles de ROS se mantuvieron altos por más tiempo, sugiriendo que se requiere del GSH sintetizado *de novo* para la eliminación del exceso de ROS producido por el NO. La presencia de BSO, sin embargo, no evitó

la caída de ROS que se produce luego de 18 hs de tratamiento con NO, indicando que esta disminución de ROS, que se produce más tardíamente, sería independiente de GSH.

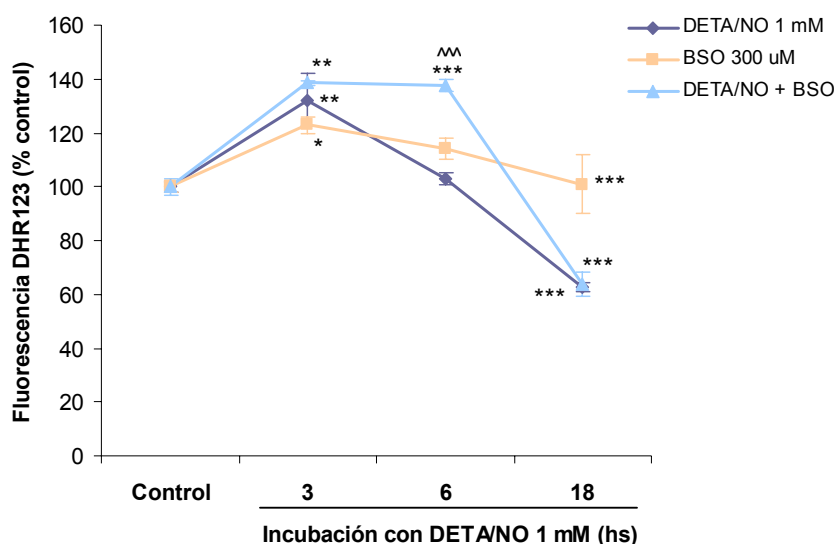


Figura 30: El aumento de GSH contribuye con la remoción del exceso de ROS producido por el NO. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados con medio solo o con DETA/NO 1 mM, con o sin el agregado de BSO 300 μ M. Durante los últimos 20 min de tratamiento, las células fueron cargadas con DHR123 20 μ M y la fluorescencia fue cuantificada por citometría de flujo. Los resultados representan la media de fluorescencia \pm SEM (n=3) y están expresados como porcentaje del control (células sin tratamiento). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. control; ^^^p < 0.05 vs. DETA/NO. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

3.4 DISCUSIÓN

El NO, además de su participación en innumerables procesos biológicos, tiene un papel fundamental como regulador de la vida y muerte de la célula debido a su capacidad de inhibir o inducir apoptosis (Wink & Mitchell 1998; Kim et al. 1999; Leong et al. 2002).

Estudios realizados por nuestro grupo han demostrado que en la adenohipófisis, el NO en concentraciones submicromolares, posee un efecto antiapoptótico, protegiendo a las células del daño causado por el cadmio (Poliandri et al. 2004, Poliandri et al. 2006). En cambio, la exposición prolongada (24 hs) de las células a concentraciones micromolares de NO, como las generadas durante un proceso inflamatorio, induce apoptosis en las mismas (Velardez et al. 2004).

Si bien hay varios mecanismos conocidos por los cuales el NO puede inducir apoptosis en otros tipos celulares, los mecanismos apoptóticos en las células adenohipofisarias, no habían sido identificados antes de la realización de este trabajo de tesis. En estudios previos de nuestro laboratorio se había podido establecer, como primera aproximación, la intervención de las caspasas 9 y 3 (Velardez et al. 2004), indicando que la vía apoptótica intrínseca está involucrada. Continuando con esta línea de investigación, en este trabajo de tesis se estudiaron los eventos que llevan a la activación de estas caspasas y si existe alguna otra vía implicada en el efecto apoptótico del NO.

Dado que la caspasa 3 es reconocida como la principal caspasa efectora del proceso apoptótico (Thornberry & Lazebnik 1998), esta investigación comenzó con el estudio del tiempo en que esta caspasa era activada. Los resultados mostraron que la activación de la caspasa 3 se produce luego de 6 hs de exposición al NO. Es interesante señalar que este tiempo de activación coincide con el tiempo mínimo requerido para que el efecto citotóxico del NO sobre las células adenohipofisarias se vuelva irreversible (Velardez et al. 2004). Teniendo en cuenta que la activación

de la caspasa 3 es considerada un punto sin retorno en la cascada apoptótica (Stennicke & Salvesen 2000), es razonable pensar que dentro de las primeras 6 hs se produzcan cambios dentro de la célula que lleven, irremediablemente, a su muerte.

Tradicionalmente se proponía que el evento disparador de la vía apoptótica intrínseca era la disminución del potencial de la membrana mitocondrial interna (Desagher & Martinou 2000; Harada & Grant 2003). El modelo más contundente postulado que explica esta disminución se basa en la formación de un canal transmembrana denominado “poro de permeabilidad transitoria” (PPT). Generalmente la apertura del PPT es inducida por efectores fisiológicos como el calcio, las ROS o cambios de pH. La apertura de este poro causa un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, provocando la disipación del potencial. Este aumento de permeabilidad facilita la salida del citocromo c al citosol, que junto con otros factores proapoptóticos, promueve la activación de la caspasa 9 y consecuentemente la activación de la caspasa 3 (Stennicke & Salvesen 2000; Harada & Grant 2003; Garrido & Kroemer 2004).

Sin embargo los resultados obtenidos muestran que durante el período de activación de la caspasa 3 no hay una alteración aparente del PMM. Recién después de 18 hs de incubación con DETA/NO se observó una marcada caída del mismo. Esta disminución del potencial no estaría relacionada con un aumento de la permeabilidad por la apertura del PPT ya que la misma no fue evitada por el tratamiento con CsA, inhibidor del PPT (Nicolli et al. 1996).

Considerando que en el momento en que se produce la caída del PMM (18 hs), la caspasa 3 ya está activada y los cambios morfológicos característicos de las últimas etapas de la apoptosis ya son evidentes, es probable que la despolarización del potencial de membrana no sea un evento temprano o clave en el proceso apoptótico desencadenado por el NO en las células adenohipofisarias, sino una consecuencia del mismo (ver explicación más adelante).

Actualmente han sido identificados varios mecanismos que difieren en algún punto de los clásicamente descritos para la vía apoptótica intrínseca. Entre ellos se encuentran los que describen la liberación de citocromo c al citosol y la activación de caspasas sin que se detecte una despolarización de la membrana mitocondrial (Funucane et al. 1999; Krhon et al. 1999; Singh et al. 2002; Brustovetsky et al. 2003; Polster et al. 2003; Lo & Kim 2004). Estas evidencias, sumadas a los resultados mencionados, permiten hipotetizar que la vía apoptótica inducida por el NO en las células adenohipofisarias es diferente de la vía mitocondrial convencional. Por tal motivo, se investigaron distintos mecanismos, conectados o no con la vía apoptótica mitocondrial, que llevan finalmente a la activación de caspasas.

Activación de la enzima sGC

Teniendo en cuenta que la mayoría de los efectos biológicos del NO son ejercidos mediante la activación de la enzima sGC (receptor intracelular de NO), se evaluó en primer lugar, si este mecanismo es un posible mediador del efecto apoptótico del NO en las células adenohipofisarias. Los resultados demuestran que la vía la enzima sGC no participa en la apoptosis inducida en estas células por la exposición prolongada al NO, dado que los co-tratamientos tanto con el inhibidor (LY-83583) como con el estimulador (BAY-41.2272) de la enzima sGC no modificaron el efecto citotóxico del NO. Estudios realizados en cultivos de células vasculares de rata muestran que la exposición crónica al NO (a partir de 4 hs) produce la inactivación de la sGC y posteriormente la inhibición de su síntesis (Papapetropoulos et al. 1996; Filipovv et al. 1997). Es posible que un mecanismo similar también actúe a nivel adenohipofisario, lo cual explicaría por qué la sGC no está involucrada en efecto apoptótico del NO.

Acumulación de p53

La proteína supresora de tumores p53 actúa como regulador del ciclo celular pudiendo promover la muerte de la célula cuando el daño generado es irreparable. La acumulación de esta proteína ha sido identificada como un indicador temprano del efecto apoptótico del NO en varios tejidos (Brüne & Schneiderhan 2003; Hofseth et al. 2003; Zhou & Brüne 2005). Sin embargo, en las células adenohipofisarias, la apoptosis inducida por el NO parece ser independiente de p53, ya que la incubación con el dador de NO no modificó los niveles de esta proteína en ninguno de los tiempos estudiados.

Participación de las proteínas de la Familia Bcl-2

Un miembro clave en la vía apoptótica mitocondrial lo constituyen las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Actualmente se sugiere que el destino de la célula estaría determinado por el balance entre los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de esta familia (Adams & Cory 1998; Reed 2006). En las células adenohipofisarias, el NO indujo un aumento en la expresión de Bax y una disminución en la de Bcl-2, lo que sugiere que el NO está desbalanceando el equilibrio de los miembros de la familia Bcl-2, inclinándolo hacia un entorno proapoptótico.

El aumento de los niveles proteicos de Bax se produjo a las 3 hs de exposición al NO, precediendo a la activación de caspasa 3. Este resultado sugiere que la inducción de la síntesis de Bax es un evento temprano en la cascada apoptótica disparada por el NO en las células adenohipofisarias, que podría llevar a la activación de caspasas.

Según se ha descrito, Bax se localiza como monómero en el citoplasma y ante un estímulo apoptótico se oligomeriza, se transloca a la mitocondria y se inserta en la membrana externa formando un poro por el cual el citocromo c puede salir al citosol y promover la activación de caspasas (van Gurp et al. 2003; Reed 2006). La internalización de Bax ha sido relacionada en muchos casos con la despolarización de la membrana mitocondrial (Desagher & Martinou 2000). Sin

embargo, también se ha demostrado que Bax puede promover la liberación de citocromo c independientemente de la disipación del PMM (Eskes et al. 1998; Desagher & Martinou 2000). Un evento similar a este último podría estar sucediendo por efecto del NO en las células adenohipofisarias dado que la activación de la caspasa 3 precede a la disrupción del PMM.

El papel de las ROS

Las ROS son importantes mediadoras de diferentes cascadas de señales en procesos biológicos, incluyendo aquellas relacionadas con la regulación de la muerte celular (Lander 1997; Tan et al. 1998; Sen 2000; Simon et al. 2000; Voeikov 2006). Diversos estudios demuestran que la inducción de estrés oxidativo es uno de los factores que puede desencadenar la activación de la vía apoptótica intrínseca (Han et al. 2004; Le et al. 2005). En relación con esto, se ha observado que la sobreproducción de ROS es un evento central en la apoptosis inducida por el NO en distintos tipos celulares (Brown & Borutaite 2001; Hu & Brindle 2005).

En las células adenohipofisarias, el NO provocó un aumento temprano de los niveles intracelulares de ROS (durante las 3 primeras horas), y se observó una disminución de los mismos luego de períodos más prolongados (mayores a 6 hs).

La rotenona es un inhibidor del Complejo I de la CTE que evita la entrada de electrones y de esta forma impide la generación de ROS (Pearlstein et al. 2002). El tratamiento con este inhibidor impidió el incremento en los niveles de ROS generados por el NO, indicando que la CTE estaría involucrada en dicho proceso. Considerando este último resultado, las variaciones observadas en los niveles de ROS pueden ser explicadas a través del conocido efecto que posee el NO sobre la respiración mitocondrial (Fig. 31). El NO puede unirse reversiblemente al complejo IV causando una inactivación transitoria del mismo, aumentando el escape de electrones a nivel del complejo III y favoreciendo la formación de ROS durante la CTE (Poderoso et al. 1996). Si la exposición al NO continúa (varias horas), la respiración mitocondrial es inhibida persistentemente debido a la inactivación del complejo I provocada por el propio NO o por el peroxinitrito

formado en las cercanías de dicho complejo (Clementi et al. 1998; Beltrán et al. 2000; Riobó et al. 2001; Brown & Borutaite 2004; Carreras et al. 2004). Esto frena la transferencia de electrones y en consecuencia cesa la formación de ROS.

Por lo tanto, el aumento de ROS observado durante las 3 primeras horas de exposición de las células adenohipofisarias al NO podría ser consecuencia de la inactivación reversible del complejo IV. La disminución posterior de los niveles de ROS se podría explicar por el efecto a largo plazo del NO sobre la respiración mitocondrial. Sin embargo, es importante no descartar que esta caída de ROS pueda ser también consecuencia de la actividad del sistema de defensa antioxidante intracelular (ver más adelante).

El efecto persistente del NO sobre la CTE, puede explicar también la caída del PMM que se produce tardíamente y que coincide con la bajada en los niveles de ROS, dado que al frenarse el pasaje de electrones en la CTE, se detiene también el bombeo de protones provocando la disipación del gradiente electroquímico y en consecuencia la interrupción del potencial de membrana.

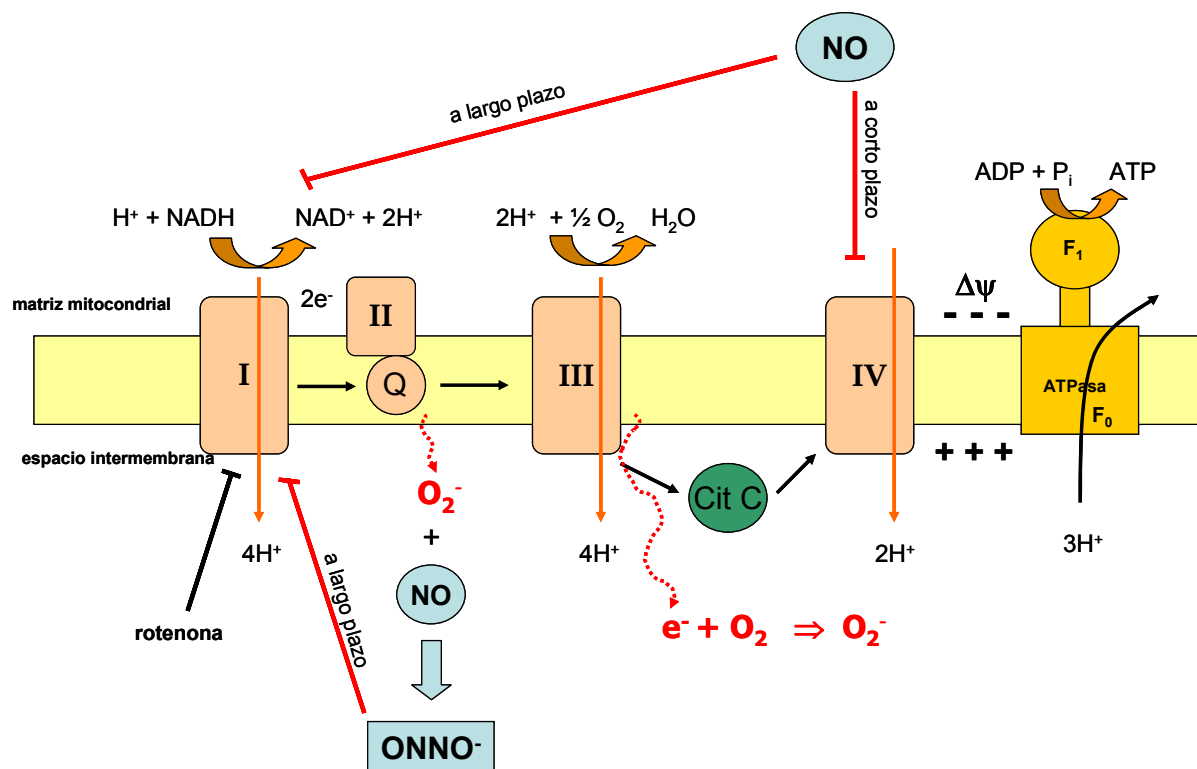


Figura 31: Efecto del NO sobre la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Durante la respiración mitocondrial, el O₂⁻ es producido por el escape de electrones a nivel del complejo III. El NO actúa como regulador de la respiración mitocondrial. A corto plazo, provoca una inhibición reversible de la respiración mitocondrial ya que se une al complejo IV, causando una inactivación transitoria del mismo y un aumento del escape de electrones a nivel del complejo III, efecto que favorece la formación de ROS. A largo plazo, la inhibición del complejo IV genera un estado altamente reducido de los componentes que lo preceden. Esto promueve la formación de O₂⁻ y de peroxinitrito en las cercanías del complejo I, lo que provoca una inactivación irreversible del mismo, y en consecuencia una inhibición persistente de la respiración mitocondrial. Además del peroxinitrito, el propio NO acumulado en las proximidades de este complejo puede causar también su inactivación. La rotenona, inhibidor del complejo I, tiene un efecto similar.

I: Complejo I, NADH-CoQ-oxidoreductasa; II: complejo II, Q: Ubiquinona; III: Complejo III, citocromo bc1 oxidoreductasa; Cyt c: Citocromo c; IV: Complejo IV, citocromo c oxidasa; F₁/F₀: Complejo V, ATPasa, $\Delta\psi$: diferencia del potencial de membrana

Los resultados de esta tesis muestran que el aumento temprano de ROS sería una de las primeras señales de la vía apoptótica inducida por el NO en las células adenohipofisarias. Consistentemente, la N-acetil-cisteína (NAC), un antioxidante precursor del glutatión, no sólo previno el incremento de ROS sino también los distintos cambios provocados por el NO. La NAC previno totalmente la activación de caspasa 3, mientras que modificó parcialmente los cambios en la expresión de Bax y Bcl-2 y redujo consecuentemente el efecto apoptótico del NO.

Existen evidencias que muestran que las ROS pueden disparar distintas vías de señalización debido a su capacidad de modular la actividad de factores de transcripción que regulan la expresión de distintas proteínas (Suzuki et al. 1997; Lea Fialkow et al. 2007). En las células adenohipofisarias, por lo tanto, las ROS podrían modificar la actividad de factores de transcripción que inducen la síntesis de Bax y reprimen la de Bcl-2. El aumento de Bax promovería a su vez la activación de caspasas llevando finalmente a la muerte de la célula.

El hecho de que el antioxidante haya prevenido totalmente el aumento de ROS y la activación de caspasas, pero sólo parcialmente el efecto apoptótico del NO sugiere que algún otro mecanismo, independiente de caspasas y de ROS, está involucrado. Estos resultados son consistentes con estudios previos de nuestro laboratorio en los cuales observamos que el tratamiento con inhibidores específicos de caspasa 9 y 3 revirtieron sólo parcialmente el efecto citotóxico del NO (Velardez et al. 2004).

El papel del calcio y las calpaínas

A nivel celular la concentración citosólica de calcio está estrictamente regulada dentro de ciertos límites por diferentes mecanismos (Carafoli 2002) y alteraciones de la misma pueden llevar a la muerte celular programada (Chan et al. 2002; Alberdi et al. 2005). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que un aumento prolongado de calcio, inducido por tapsigarina o cadmio, resulta perjudicial para las células adenohipofisarias (Poliandri 2006).

La exposición al NO produjo un marcado y significativo aumento de los niveles citosólicos de calcio. Sin embargo, dicho incremento se produce en forma tardía (18 hs) lo cual sugiere que no es un factor determinante en la inducción de apoptosis por el NO. Confirmando este resultado, el tratamiento con un quelante de calcio no previno el efecto citotóxico del NO sobre las células adenohipofisarias.

Las mitocondrias funcionan como depósitos transitorios de calcio, actuando como moduladores de la concentración de calcio libre en el citosol. Tanto la captación como la salida de calcio se da a través de canales o transportadores finamente regulados. Sin embargo, el calcio almacenado puede ser descargado de la mitocondria en forma masiva y no regulada cuando la integridad de sus membranas se ve comprometida (Chakraborti et al. 1999). En las células adenohipofisarias, el marcado incremento de calcio se observa durante un estadio bastante avanzado del proceso apoptótico (18 hs), coincidiendo con el momento en que se produce la caída del PMM, sugiriendo un origen mitocondrial del mismo.

De todos modos, no se puede descartar la posibilidad de que alteraciones a nivel del RE también provoquen la salida de calcio hacia el citoplasma. En cualquier caso, el aumento de calcio sería consecuencia del daño producido por el NO en las células adenohipofisarias y no un evento determinante de la apoptosis. Es importante aclarar que se descartó la posibilidad de que el aumento de calcio sea el resultado de su entrada desde el medio extracelular dado que, para las mediciones de calcio, se seleccionaron sólo células viables cuya membrana plasmática estaba intacta.

Recientemente han sido identificados en neuronas mecanismos apoptóticos independientes de caspasas, en donde la apoptosis inducida por el NO es mediada por la activación de calpaínas (Volbracht et al. 2005). Éstas son proteasas similares a las caspasas, que están asociadas al RE y cuya actividad es estimulada por niveles altos de calcio (Carafoli & Molinari 1998; Broker et al. 2005). Teniendo en

cuenta este antecedente y que el NO provocó un aumento en la concentración citosólica de calcio, sería lógico pensar que las calpaínas podrían estar involucradas en una vía apoptótica paralela a la de las ROS, también inducida por el NO en las células adenohipofisarias. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos utilizando distintos inhibidores de calpaínas, indican que las mismas no mediarían el efecto apoptótico del NO (datos no mostrados).

Por otro lado, estudios recientes en oligodendrocitos han mostrado que el NO induce apoptosis por otro mecanismo independiente de caspasas, en el que está involucrada la proteína mitocondrial AIF (Baud et al. 2004). Sería interesante estudiar en el futuro el papel de esta proteína como mecanismo apoptótico independiente al de las ROS, inducido por el NO en las células adenohipofisarias.

Modulación del Sistema de Defensa Antioxidante Intracelular

El peroxinitrito es uno de los radicales libres más reactivos y un potente inductor de apoptosis. Si bien la formación de este radical es muy rápida debido a que la reacción del NO con el O_2^- es casi instantánea (Radi et al. 2002), no se observó ningún signo de apoptosis o de daño celular hasta después de varias horas de incubación de las células con el dador de NO. Esto hace pensar que el sistema de defensa antioxidante celular actúa exitosamente durante las primeras horas de exposición al NO, atenuando el exceso de ROS formadas. Probablemente el proceso apoptótico sea desencadenado recién cuando los niveles de especies oxidantes sobrepasa la actividad de la maquinaria antioxidante. Prueba de esto es que el agregado exógeno del antioxidante pudo reducir, eficazmente, el efecto apoptótico del NO. En base a este planteo, se evaluó si el NO está afectando los distintos componentes del sistema antioxidante celular.

El NO produjo una inhibición marcada y persistente de la catalasa. Esta inhibición no nos sorprendió dado que está detalladamente descripta la reacción del NO con el ion férrico de esta hemo-proteína que provoca la inactivación de la enzima (Cooper 1999).

El NO también produjo una inhibición persistente de la GR, aunque no tan marcada como la de la catalasa. La GR contiene en su sitio activo dos grupos tioles y en consecuencia su actividad puede ser modulada por la reacción del NO con estos grupos. De hecho, hay evidencias que muestran que en otros tipos celulares, esta enzima es inactivada luego de la exposición prolongada al NO mediante la S-nitrosilación de su sitio activo (Beltrán et al. 2000). Un sistema similar a este podría ser responsable de la inhibición de la actividad de la GR que provoca el NO en las células adenohipofisarias.

La inhibición de estas dos enzimas dificultaría la detoxificación del exceso de ROS intensificando a largo plazo, el daño oxidativo provocado por el NO en las células adenohipofisarias.

Con respecto a la GPx, la exposición de las células adenohipofisarias al NO tuvo un efecto contrario, aumentando su actividad después de las 6 hs. Esta peroxidasa reduce tanto al H₂O₂ como a lipoperóxidos e hidroperóxidos orgánicos, contribuyendo eficientemente en la eliminación de especies oxidantes (Matés et al. 1999).

De estos resultados se puede sugerir que ante la inactivación de algunos componentes del sistema de defensa antioxidante y la sobreproducción de ROS, la GPx es estimulada de modo de contribuir con la detoxificación de ROS y atenuar el daño oxidativo. Apoyando esta hipótesis, ha sido demostrado en otros tipos celulares que tanto la expresión génica como la actividad de la GPx pueden ser inducidas por un aumento de ROS o por el NO (Dobashi et al. 2001; Shamra et al. 2006).

El GSH tiene la capacidad de secuestrar radicales libres *per se*, por lo que es considerado el componente antioxidante no enzimático más importante (Rahman & MacNee 2000; Townsend et al. 2003). Además, actúa como dador de hidrógenos durante la detoxificación de peróxidos llevada a cabo por la GPx, siendo oxidado a GSSG. Los niveles de GSH pueden ser restablecidos a través de la vía de reciclaje catalizada por la GR o bien por su síntesis *de novo*.

Dado que el NO modificó la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del GSH, se evaluaron los cambios producidos en los niveles de GSH y GSSG. Los niveles intracelulares de GSSG aumentaron hacia las 3 hs y luego se mantuvieron estables durante todo el tiempo de incubación con DETA/NO. En cambio, los niveles de GSH no fueron modificados durante las primeras horas pero aumentaron continuamente a partir de las 6 hs. Analizando la relación GSH/GSSG puede apreciarse que durante las primeras de horas de tratamiento con NO dicha relación es menor a 1, indicando que la célula estaría en un estado redox más oxidado. Esto concuerda con el hecho de que en ese momento se produce el pico máximo en los niveles de ROS y la reducción de la actividad de la GR. A partir de las 6 hs, la relación vuelve a ser 1 debido a que el aumento de GSSG es compensado por un aumento de GSH. El aumento de los niveles de GSH se produce concomitantemente con el incremento de la actividad de la GPx, demostrando que este mecanismo antioxidante está siendo estimulado. Esto apoya la hipótesis planteada de que ante la falla de alguno de los sistemas de defensa antioxidante, otros son estimulados como respuesta al daño oxidativo provocado por el NO en las células adenohipofisarias.

Como se mencionó más arriba, el GSH consumido puede ser restablecido a través de su reciclaje a partir del GSSG formado por acción de la GR, o bien mediante un aumento de su síntesis. Teniendo en cuenta que la exposición al NO provoca un aumento constante de los niveles intracelulares de GSSG y una reducción persistente de la actividad de la GR, puede sugerirse que la vía de reciclaje del GSH está inhibida. Bajo esta situación, los niveles de GSH tenderían a disminuir a largo plazo. Sin embargo, se observa un aumento constante que podría deberse a una estimulación de su síntesis *de novo*. Dicha síntesis se realiza por la acción secuencial de dos enzimas, la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) y la GSH sintasa (GS), siendo la primera la enzima limitante (Rahman & MacNee 2000). Hay evidencias que muestran que la presencia de agentes pro-oxidantes, incluyendo el NO, induce la expresión de esta enzima y que modificaciones post-traduccionales pueden modular su actividad (Shi et al. 1994; Moellering et al.

1998). Los resultados obtenidos mostraron que el NO estimula la síntesis *de novo* de GSH, dado que el co-tratamiento de las células con DETA/NO y BSO (inhibidor de la enzima GCS) previno completamente el aumento de GSH inducido por el NO.

El aumento de los niveles intracelulares de GSH coincidió con la disminución de los niveles de ROS. Además, al inhibir la síntesis de GSH con BSO no sólo se impidió la caída en los niveles de ROS que se produce luego de 6 hs de exposición al NO, sino que las ROS se mantuvieron elevadas en un nivel similar al máximo producido durante las primeras horas de exposición al NO. Estos resultados son indicativos de la importancia del GSH en la detoxificación de compuestos oxidantes y sugieren que la vía de síntesis *de novo* de GSH contribuye en la eliminación del exceso de ROS que se produce durante las primeras horas de exposición al NO.

La estimulación de la síntesis *de novo* de GSH ha sido reportada como una respuesta adaptativa de la célula para mantener o elevar la concentración intracelular de GSH frente a la acción nociva de agentes oxidantes (Shi et al. 1994). Si bien el GSH se encuentra distribuido en las distintas organelas de la célula, el GSH mitocondrial tiene un papel relevante en esta organela ya que contribuye con la eliminación de las ROS formadas durante la CTE, controlando de esta manera el funcionamiento normal de la mitocondria (Rahman & MacNee 2000). Estudios recientes realizados en la línea celular de mácrófagos RAW264.7 muestran que la inducción de la expresión de la enzima GCS es mediada por el peroxinitrito formado en la mitocondria luego de la exposición al NO (Kurozumi et al. 2005). En relación a esto es coherente pensar que en las células adenohipofisarias, ante una sobreproducción de ROS inducida por el efecto que ejerce el NO sobre la CTE, se disparen señales que lleven a un aumento del GSH para reducir el exceso de ROS y atenuar el daño mitocondrial.

La inhibición de la síntesis de GSH con BSO, sin embargo, no evitó la caída de ROS que se produce luego de 18 hs de tratamiento con NO, indicando que esta disminución tardía de ROS no sería consecuencia de la acción antioxidante del GSH. Este resultado es lógico considerando el hecho de que a largo plazo, es el mismo NO (o el peroxinitrito) el que provocaría el cese de la producción de ROS mitocondrial debido a la inactivación persistente del complejo I de la CTE. Sin embargo, en algunos reportes se postula que la inactivación del complejo I, causada por S-nitrosilación de su centro activo, puede ser revertida por el agregado de altas concentraciones de GSH u otros agentes reductores (Clementi et al. 1998; Beltrán et al. 2000; Borutaite et al. 2000). No obstante, se ha sugerido que la posibilidad de la reversión depende de la magnitud del daño existente a nivel del complejo I (Borutaite et al. 2000). Aparentemente, si el nivel de S-nitrosilación es muy alto, el centro activo nitrosilado podría desprenderse y en consecuencia la inactivación del complejo I resultaría irreversible. En las células adenohipofisarias, podría ocurrir que los niveles de GSH alcanzados por el incremento de la síntesis *de novo* resultaran efectivos para reducir las ROS formadas durante las primeras horas de exposición al NO, pero luego de tiempos prolongados de exposición, predominarían los efectos deletéreos del NO sobre la CTE, provocando un daño irreversible a nivel del complejo I que no pudiera ser revertido por el GSH.

Es importante notar que si bien el aumento de GSH posibilita la detoxificación de las ROS producidas tempranamente, dicho aumento se produce cuando la caspasa 3 ya fue activada y el proceso apoptótico ya está en marcha. Por lo tanto, la estimulación de la síntesis de GSH no sería un mecanismo suficientemente rápido y efectivo para rescatar a las células adenohipofisarias del efecto apoptótico del NO.

Como resumen de lo estudiado en esta primera parte de la tesis, los mecanismos apoptóticos identificados se detallan en el esquema que se presenta a continuación (Fig. 32).

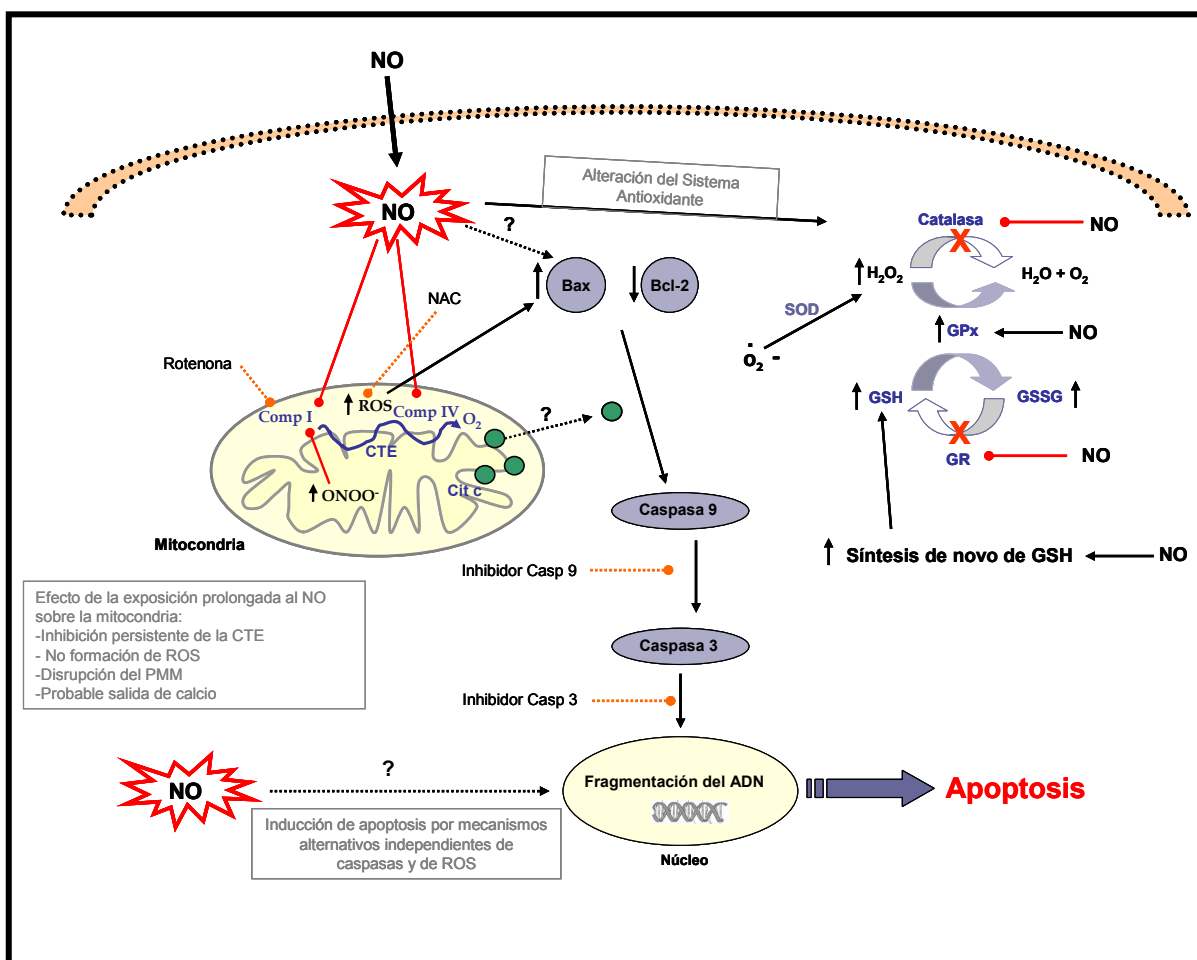


Figura 32: Resumen de los mecanismos a través de los cuales el NO induciría apoptosis en las células adenohipofisarias. Durante las primeras horas, el NO actúa sobre la CTE inhibiendo el Complejo IV y favoreciendo a corto plazo la formación de ROS. Este aumento constituye uno de los primeros eventos desencadenantes de la cascada apoptótica, que lleva a la inducción de Bax y represión de Bcl-2, a la activación de caspasas y finalmente a la muerte celular. Paralelamente, los distintos componentes del sistema de defensa antioxidante celular son modulados por la acción del NO. La catalasa y la GR son inhibidas persistentemente dificultándose la eliminación del exceso de ROS. En contraparte, y como mecanismo de respuesta, se produce un aumento de la actividad de la GPx y de la síntesis de GSH. A más largo plazo, la exposición prolongada al NO causa una inactivación persistente de la CTE, provocando el cese de la producción de ROS y la disipación del gradiente electroquímico. En consecuencia, se produce la disrupción del PMM, aumenta la permeabilidad de membrana y se facilita la salida al citoplasma del calcio almacenado en la mitocondria. Conjuntamente a los mecanismos descritos, otros mecanismos apoptóticos, independientes de caspasas y de ROS, serían inducidos por el NO.

3.5 CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

- La sobreproducción de ROS a nivel mitocondrial constituye un evento clave dentro de los mecanismos apoptóticos inducidos por el NO en las células adenohipofisarias. Este incremento de ROS induce una alteración en el patrón de expresión de Bax y Bcl-2 y promueve posteriormente la activación de caspasa 3. Por lo tanto, el aumento temprano de ROS puede ser considerado como una de las primeras señales en la cascada apoptótica inducida por el NO en las células adenohipofisarias.

- Aunque la mitocondria desempeña un papel muy importante, ya que es uno de los blancos principales de la acción del NO, la despolarización de la membrana mitocondrial no constituye un evento central en esta vía apoptótica.

- La modificación de los componentes del sistema de defensa antioxidante celular constituye otro punto relevante en el desarrollo del proceso apoptótico. La inhibición persistente de la catalasa y la GR causada por el NO impediría la eliminación del exceso de ROS producido por el NO, favoreciendo a largo plazo, el daño oxidativo provocado por el NO en las células adenohipofisarias.

- La estimulación de la síntesis de novo de GSH y el aumento concomitante de la actividad de GPx contribuyen con la detoxificación del exceso de ROS producido tempranamente. Este mecanismo sería inducido en la célula adenohipofisaria en respuesta al daño oxidativo provocado por el NO. Pese a ello, parece no ser suficiente para contrarrestar los efectos del aumento inicial de ROS, proteger a las células de efecto deletéreo del NO e impedir el desarrollo del proceso apoptótico.

- El efecto apoptótico del NO parece ser independiente de p53, de la enzima sGC y del calcio.

- Además de la vía apoptótica identificada, la ejecución de la muerte celular estaría también mediada por algún otro mecanismo paralelo que podría incluir a

las proteínas de la familia de Bcl-2, pero sería independiente de caspasas y de ROS.

En resumen, los resultados obtenidos en esta primera parte de la tesis describen por primera vez algunos de los mecanismos involucrados en el proceso apoptótico inducido en las células adenohipofisarias por concentraciones micromolares de NO. Teniendo en cuenta que estos niveles adenohipofisarios de NO se producen en la glándula durante procesos inflamatorios, la elucidación de estos mecanismos no sólo permite comprender mejor la función del NO en la regulación de la muerte celular adenohipofisaria sino que podrían colaborar con el desarrollo de posibles terapias para el tratamiento de patologías inflamatorias.

4 ÓXIDO NÍTRICO, OVARIECTOMÍA Y MUERTE CELULAR ADENOHIPOFISARIA

4.1 OBJETIVO

Investigar la regulación de la muerte celular en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía y dilucidar el papel del NO en este proceso.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El LY-83583 fue provisto por Alexis (San Diego, CA, USA). La enzima lactato deshidrogenasa fue comprada en Boehringer-Mannheim (GmbH, Alemania). El nitrito de sodio (NaNO_2) fue provisto por Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos para cultivo primario, excepto el suero fetal bovino y el medio de cultivo, fueron provistos por GIBCO (Buenos Aires, Argentina). El suero fetal bovino fue adquirido en GBO (Buenos Aires, Argentina). El medio de cultivo (Medio Esencial Mínimo sin rojo de fenol) y el resto de las drogas utilizadas fueron provistas por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El material descartable estéril fue provisto por ETC Internacional (Buenos Aires, Argentina). El material plástico no estéril fue provisto por Chemit (Buenos Aires, Argentina).

Animales

Para el desarrollo del segundo objetivo de esta tesis se utilizaron ratas hembras adultas ovariectomizadas (OVX).

Las ratas hembras adultas de la cepa Wistar (200-250g de peso) fueron provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Estas ratas fueron sometidas a una intervención quirúrgica (ovariectomía) para extraer sus ovarios de modo tal de eliminar la fuente principal de producción de estrógenos. Antes y después de la operación, los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21-24 °C) y luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 hs), con libre acceso al agua y alimento, de acuerdo a las condiciones establecidas en la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del NIH (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences 1996).

Ovariectomía

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal conteniendo 75 mg/kg de ketamina (Holliday-Scott, Buenos Aires, Argentina) y 10 mg/kg de xilacina (Konig, Buenos Aires, Argentina). El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo en condiciones asépticas. Las ratas fueron operadas a los 4, 7, 14 y 21 días previos a su utilización, de modo tal de poder realizar los experimentos simultáneamente con los distintos grupos experimentales. En algunos ensayos, ratas hembras intactas (en periodos aleatorios del ciclo estral) que no fueron sometidas a ninguna intervención quirúrgica fueron utilizadas como control.

Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo

Para este estudio se emplearon ratas intactas y ovariectomizadas (OVX) de 4, 7 y 14 días. Las mismas fueron sacrificadas e inmediatamente luego de su decapitación, las adenohipófisis fueron removidas y procesadas para la determinación de apoptosis por citometría de flujo.

Se obtuvieron células monodispersas (mediante dispersión enzimática y mecánica) de 5 adenohipófisis de cada grupo bajo la misma condición experimental. Las células fueron resuspendidas en buffer KRB-CMF, se realizó el recuento en cámara de Neubauer y se preparó una suspensión de células de 1×10^6 células/ml de cada grupo estudiado. Un ml de cada suspensión fue traspasado a un tubo de citometría (3 tubos por grupo). Los tubos fueron centrifugados a $1000 \times g$ 10 min a $4^\circ C$. El sobrenadante fue descartado por inversión y las células fueron fijadas y permeabilizadas con etanol 70% a $4^\circ C$ (2 ml/tubo) durante 2 hs. Los tubos fueron centrifugados a $1000 \times g$ 10 min a $4^\circ C$. El sobrenadante fue descartado por inversión y las células fijadas fueron resuspendidas suavemente en una solución de PBS 1X conteniendo 50 $\mu g/ml$ de IP y 10 $\mu g/ml$ RNAsa A, pH 7.4 (200 μl /tubo), incubadas a $37^\circ C$ durante 15 min y luego a $4^\circ C$ durante por lo menos 24 hs 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. Se analizaron 10.000 células por tubo. La excitación se

realizó con láser de argón (488 nm) y el registro de la fluorescencia se realizó en el canal FL2 (585 nm). Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

La fluorescencia emitida por el IP es proporcional al contenido de ADN nuclear. Se determinó el porcentaje de células con contenido hipodiploide de ADN (población sub-G1) como indicador del porcentaje de células apoptóticas presentes en la glándula adenohipofisaria.

Cultivos primarios de adenohipófisis de ratas OVX

Los cultivos primarios fueron obtenidos a partir de adenohipófisis de ratas OVX de 4, 7, 14 y 21 días. Cada cultivo primario fue obtenido de un grupo de 5 o 6 adenohipófisis provenientes de ratas bajo la misma condición experimental.

Las adenohipófisis fueron extraídas inmediatamente después de la decapitación y colocadas en un tubo estéril de 20 ml con medio DMEM sin rojo de fenol (srfDMEM) suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos para medios de cultivo mínimos esenciales (MEM-aa) 10 µg/ml, gentamicina 25 µg/ml, anfotericina B 5.6 µg/ml, pH 7.2-7.3 (srfDMEM-S) y BSA 0.3%. Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y las células fueron disgregadas por dispersión enzimática y mecánica como se detalló en Materiales & Métodos del capítulo anterior (pág. 26). Las células monodispersas fueron centrifugadas 8 min a 1000 x g y luego resuspendidas en medio srfDMEM-S conteniendo 10% de FBS adsorbido con carbón-dextrán (FBSad), un suero libre de estrógenos. El número de células obtenidas de la dispersión, se determinó por recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad se examinó por el método de exclusión utilizando azul de Trypan.

Después del recuento, las células resuspendidas en srfDMEM-S-FBSad 10% (medio libre de estrógenos) fueron sembradas en placas de cultivo y estabilizadas durante 48 hs en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO₂ previo a la realización de los distintos experimentos.

Tratamiento de las células en cultivo

Finalizado el periodo de estabilización, el medio fue descartado y las células fueron incubadas durante otras 48 hs (37 °C, 5% CO₂) con distintas drogas (según el diseño experimental). Finalizados los tratamientos, se llevaron a cabo las distintas determinaciones. El control de los tratamientos se realizó incubando a las células en medio sin drogas.

Ensayo de actividad celular (MTT)

El ensayo de MTT se usó como indicador de viabilidad celular (Newton 1995). Las células adenohipofisarias fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (0.1 x 10⁶ células por pocillo en 200 µl). Los tratamientos se realizaron por octuplicado. Finalizado los tratamientos, se realizó un ensayo de MTT como se indicó en Materiales & Métodos del capítulo anterior (pág. 29).

La viabilidad celular fue calculada como la Absorbancia a 600nm/mg proteína de la muestra y expresadas como porcentaje de la viabilidad celular de de los cultivos de ratas OVX de 4 días.

Determinación de los niveles de NO en el medio de cultivo

El método de determinación de los niveles de NO se basó en la medición de nitritos, producto estable de la descomposición del NO en soluciones acuosas. La determinación de nitritos se realizó por el método de nitrato reductasa-Griess (Grisham et al. 1996). Para estos ensayos, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (0.5 x 10⁶ células/pocillo en 500 µl). Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado.

El método de Griess es un ensayo colorimétrico que permite medir la concentración de nitritos en una solución. Como el producto final de la descomposición del NO es el nitrato, se utilizó la enzima nitrato reductasa para convertir el nitrato en nitrito. La reacción para la transformación se realizó agregando 50 µl del medio de cultivo (de 48 hs de incubación) a 50 µl de una

solución conteniendo HEPES 50 mM pH 7.4, NADPH 1 mM y 2 mU/ μ l de nitrato reductasa. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. El NADPH remanente, que puede interferir con la determinación espectrofotométrica, fue eliminado por el agregado de 35 μ l de una solución de ácido pirúvico 85 mM y 200 U/ml de piruvato deshidrogenasa, e incubando a 37 °C durante otros 30 min.

Para la reacción de Griess se tomaron 100 μ l de la solución anterior y se colocaron un pocillo de una placa de 96 pocillos. Se agregaron 50 μ l de ácido sulfanílico 1% en H₃PO₄ 5% y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 50 μ l de N-(1-Naphthyl) Ethylendiamide (NEDA) 0.1% y se incubó por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA. Para establecer la concentración de nitritos de las muestras se realizó, paralelamente, una curva estándar con NaNO₂.

Como el medio de cultivo puede tener una cantidad mínima de nitratos y nitritos, las reacciones descriptas fueron realizadas con medio de cultivo solo y los valores de absorbancia obtenidos fueron restados a los valores de las muestras.

El nivel de nitritos fue calculado como la concentración de nitritos (μ M) en el medio de incubación/mg de proteína de la muestra y fue expresado como porcentaje del nivel de nitritos de los cultivos de ratas OVX de 4 días.

La concentración de nitritos en el medio de incubación de 48 hs fue de aproximadamente 20 – 40 μ M.

Determinación de proteínas

El dosaje de proteínas en las muestras fue realizado por el método de Bradford (Biorad, Buenos Aires, Argentina) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) y evaluados por la prueba *t* de Student para muestras no apareadas o

mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para diseños no balanceados o por la prueba de Dunnett, según el diseño experimental (Sokal & Rohlf 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 Prism 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.2 RESULTADOS

❖ La viabilidad celular adenohipofisaria disminuye luego de la ovariectomía

El segundo objetivo de este trabajo de tesis se inició estudiando en qué medida se ve afectada la viabilidad celular adenohipofisaria luego de la ovariectomía. Para ello, se realizó un ensayo de MTT en cultivos primarios de adenohipófisis obtenidos de ratas ovariectomizadas (OVX) sacrificadas a los 4, 7, 14 y 21 días post-operación.

Es importante mencionar que en ensayos previos observamos que la viabilidad de las células adenohipofisarias de ratas intactas cultivadas en presencia de concentraciones basales de estrógeno fue similar a la viabilidad de las células adenohipofisarias obtenidas de ratas OVX de 4 días (OVX-4d) cultivadas en ausencia de estrógenos (Viabilidad celular, OVX-4d: $100,0 \pm 4.7\%$; Intactas: $112.6 \pm 10.2\%$, $p > 0.05$). Estos resultados demuestran que un período corto de ovariectomía (4 días) no afecta la viabilidad celular de las células adenohipofisarias. Tampoco la ausencia de estrógenos en el medio de cultivo parece modificar este parámetro. En base a esto, los estudios comparativos de viabilidad celular que se incluyen en este capítulo se realizaron con respecto a las ratas OVX-4d.

Como puede observarse en la Fig. 33, la viabilidad celular adenohipofisaria se redujo luego de la ovariectomía. La viabilidad celular de los cultivos primarios de adenohipófisis obtenidos de ratas OVX de 7 días (OVX-7d) presentó una marcada disminución (20 - 30 % aproximadamente) en relación a la viabilidad de los cultivos de ratas OVX de 4 días, y esta disminución permaneció constante en los cultivos de ratas OVX de 14 y 21 días (OVX-14d y OVX-21d).

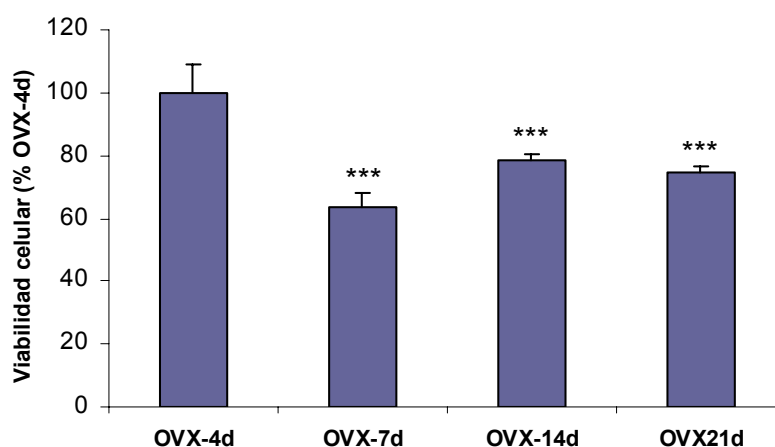


Figura 33: La viabilidad celular adenohipofisaria disminuye luego de la ovariectomía. Los cultivos primarios de células adenohipofisarias obtenidos de ratas OVX de 4, 7, 14 y 21 días fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). El medio fue reemplazado por medio fresco, y luego de otras 48 hs de incubación se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. La viabilidad celular fue calculada como Abs 600nm/mg de proteína y expresada como porcentaje de la viabilidad de los cultivos de ratas OVX-4d. Los resultados representan la media \pm SEM, n=8. ***p < 0.001 vs. OVX-4d. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ El número de células apoptóticas aumenta en la adenohipófisis luego de la ovariectomía

Fisiológicamente, el mantenimiento de la homeostasis tisular está dado por el balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada o apoptosis (Kerr 1972). Teniendo esto en cuenta, a continuación se evaluó si la reducción de la viabilidad celular producida luego de la ovariectomía se debe a un incremento de la muerte celular en la glándula adenohipofisaria.

Durante las últimas etapas del proceso apoptótico se producen cambios en las células, tales como la fragmentación del ADN, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos (Wyllie 1980). Las células con ADN fragmentado son susceptibles de perder en forma masiva los fragmentos de ADN. Estas células con menor contenido de ADN pueden ser detectadas mediante un

análisis por citometría de flujo en el cual se distingue una población celular con contenido hipodiploide de ADN (denominada población sub-G1). Utilizando esta técnica, se realizó un experimento *in vivo* para poder examinar la presencia de células apoptóticas directamente en las glándulas adenohipofisarias de ratas OVX de 4, 7 y 14 días y de ratas intactas.

Al cuarto día post-ovariectomía, se observó un leve incremento de la población celular adenohipofisaria con un menor contenido de ADN con respecto a las ratas intactas, el cual se hizo mucho más marcado a los 7 y 14 días (Fig. 34).

Estos resultados demuestran que la disminución de la viabilidad celular observada en el experimento anterior con los cultivos primarios está directamente relacionada con el incremento de la muerte celular adenohipofisaria. Por otro lado, aportan evidencia de la existencia de apoptosis en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía.

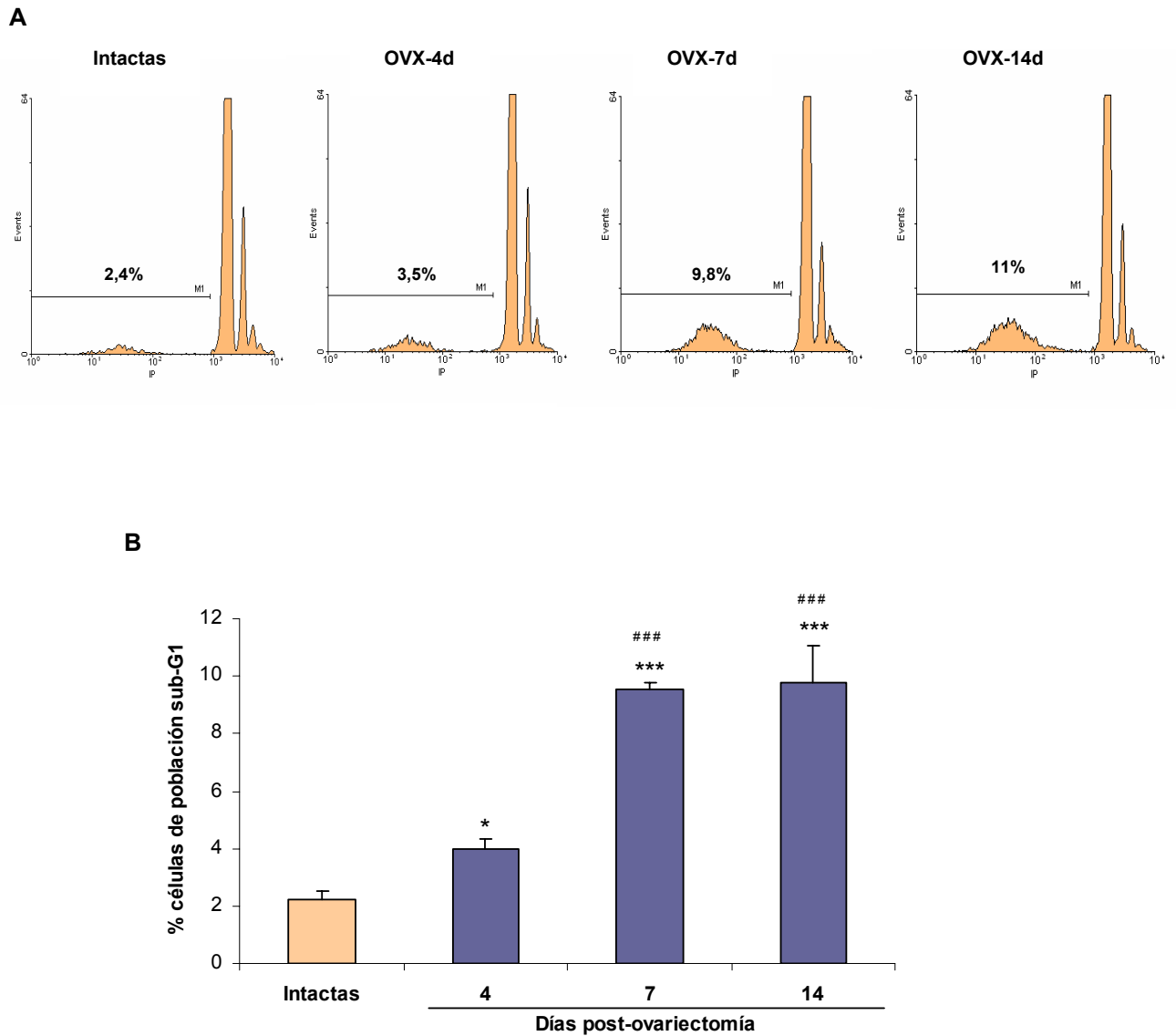


Figura 34: El número de células apoptóticas aumenta en la glándula luego de la ovariectomía. Las ratas OVX de 4, 7 y 14 días y las intactas fueron sacrificadas, las respectivas adenohipófisis fueron extraídas e inmediatamente luego de la dispersión de las células, las mismas fueron fijadas y permeabilizadas, y el ADN teñido con IP, fue cuantificado por citometría de flujo. **(A)** Gráfico del análisis de la citometría correspondiente a un experimento representativo de 3 experimentos independientes, eje Y: número de células, eje X: intensidad de fluorescencia del IP. Por debajo de la línea M1 se muestra la población sub-G1 (células con ADN fragmentado) y se indica el porcentaje de células correspondiente. **(B)** Los resultados representan la media del porcentaje de células de la población sub-G1 \pm SEM, $n=3$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Intactas; ### $p < 0.001$ vs. 4 días post-ovariectomía. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

Estudios inmunocitoquímicos y de hibridización *in situ* con ratas hembras OVX muestran un aumento de los niveles de nNOS en la adenohipófisis (Ceccatelli et al. 1993; González-Hernández & González 2000). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que a los 14 días post-ovariectomía hay un aumento de la actividad de NOS en la glándula (Velardez et al. 2003a). Teniendo en cuenta estos antecedentes y la capacidad dual del NO de prevenir o promover la apoptosis en las células adenohipofisarias, a continuación se investigó la relación entre NO y la apoptosis desencadenada luego de la ovariectomía.

❖ **Los producción adenohipofisaria de NO aumenta luego de la ovariectomía**

Si bien ha sido reportado un aumento de la expresión y actividad de nNOS en la adenohipófisis luego de la ovariectomía, no existen estudios previos sobre el efecto de dicho aumento en la producción adenohipofisaria de NO a lo largo de este período. Por lo tanto, con el objetivo de elucidar este interrogante, se determinaron los niveles de NO mediante la cuantificación de la concentración de nitritos (producto estable de la descomposición del NO) en los medios de incubación de los cultivos celulares obtenidos a partir de ratas OVX de 4, 7, 14 y 21 días.

Es importante aclarar que, de forma similar a lo observado para la viabilidad celular, en ensayos previos observamos que el nivel de nitritos obtenido en cultivos de células adenohipofisarias de ratas intactas no presenta diferencias con el nivel de nitritos de los cultivos de ratas OVX-4d (Nitritos, OVX-4d: $100,0 \pm 6,4\%$; Intactas: $110,0 \pm 6,7\%$, $p > 0,05$). Por lo tanto, las comparaciones se realizaron con respecto a las ratas OVX-4d.

Se observó un importante incremento en el nivel de nitritos (30 - 40 %) en los cultivos primarios de las ratas OVX de 7 días en relación a la obtenida en las ratas OVX de 4 días, el cual se mantuvo sin variaciones por lo menos hasta los 21 días post-ovariectomía (Fig. 35).

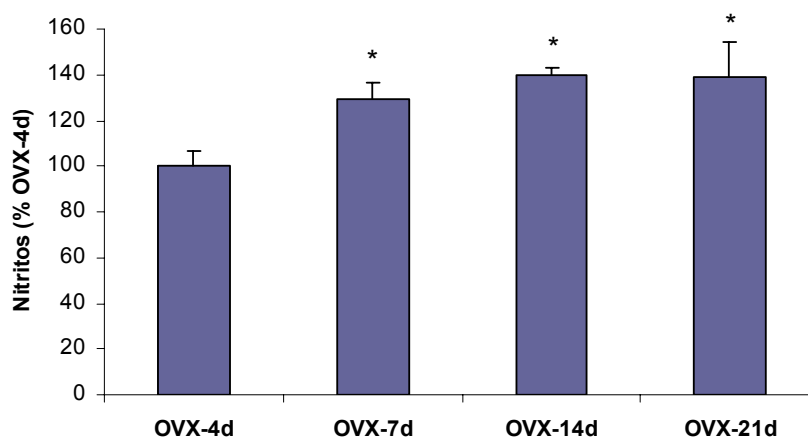


Figura 35: La producción adenohipofisaria de NO aumenta luego de la ovariectomía. Los cultivos primarios de células adenohipofisarias obtenidos de ratas OVX de 4, 7, 14 y 21 días fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). El medio fue reemplazado por medio fresco, y luego de otras 48 hs de incubación se cuantificó la concentración de nitritos en los respectivos medios de incubación mediante el método de nitrato reductasa-Griess. El nivel de nitritos en cada muestra fue calculado como concentración de nitritos (µM)/mg de proteína y expresado como porcentaje del nivel de nitritos de los cultivos de las ratas OVX-4d. Los resultados representan la media ± SEM, n=4. *p < 0.05 vs. OVX-4d. ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Con el objetivo de confirmar que la nNOS adenohipofisaria es la responsable del aumento de NO observado, los niveles de nitritos fueron determinados en cultivos de ratas OVX de 14 días luego de ser incubados por 48 hs con inhibidores de las distintas NOSs (Misko et al. 1993; Alderton et al. 2001).

Los tratamientos con L-NAME (inhibidor con mayor selectividad por nNOS) y con NMMA (inhibidor general de las NOSs) redujeron en forma significativa el aumento en la concentración de nitritos producido en los cultivos de ratas OVX-14d (control), alcanzando un nivel de nitritos similar al de las ratas OVX de 4 días. El tratamiento con aminoguanidina (AG), inhibidor de la iNOS, en una concentración que previamente demostramos ser efectiva en estas células (Velardez 2001; Poliandri 2004), no produjo modificaciones (Fig. 36).

En conjunto estos resultados demuestran que la nNOS sería la principal responsable del aumento de NO producido a los 14 días de ovariectomía, siendo consistentes con datos bibliográficos previos que muestran un aumento de la expresión de esta isoforma en esta situación (Ceccatelli 1997; González-Hernández & González 2000).

La iNOS no parece estar involucrada en la producción de NO, pero no se puede descartar totalmente la participación de la eNOS, dado que el inhibidor de la nNOS utilizado (L-NAME) reacciona parcialmente con esta isoforma.

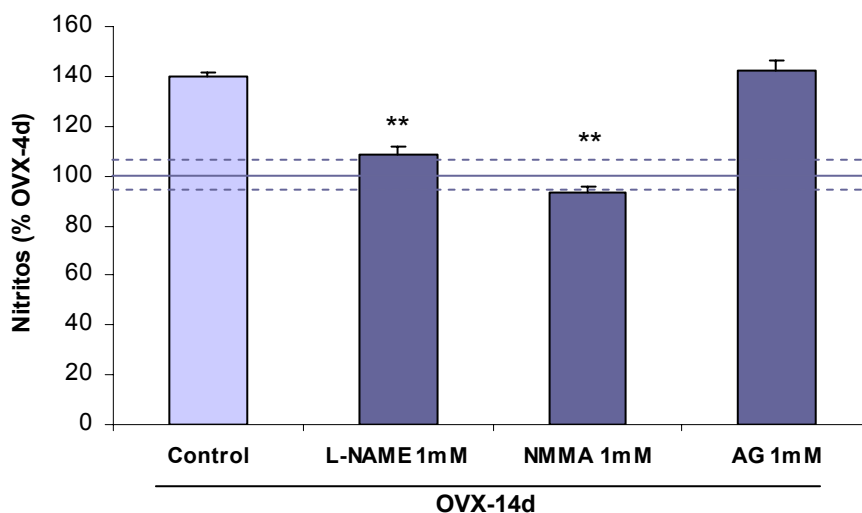


Figura 36: El aumento de NO estaría mediado principalmente por la acción de la nNOS. Los cultivos primarios obtenidos de ratas OVX de 14 días fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). El medio fue descartado, las células fueron incubadas con medio solo (control) o con los distintos inhibidores de las NOSs por 48 hs en medio fresco y la concentración de nitritos fue cuantificada en el medio de incubación por el método de nitrato reductasa-Griess. El nivel de nitritos en cada muestra fue calculado como concentración de nitritos (μM)/mg de proteína y expresado como porcentaje de los nitritos de los cultivos de ratas OVX-4d. Los resultados representan la media ± SEM, n=4. El nivel de nitritos de los cultivos de ratas OVX-4d está indicado en el gráfico como la media (línea llena) ± SEM (línea punteada) y se utilizó como medida de la concentración basal de nitritos. **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ **El NO es un mediador clave de la apoptosis inducida en la adenohipófisis luego de la ovariectomía**

De los resultados anteriores (Fig. 33, 34 y 35) puede observarse que el aumento de NO es aparentemente simultáneo al incremento de apoptosis. Esto sugiere que el NO puede tener un efecto proapoptótico y de esta forma participar en la muerte celular desencadenada en la adenohipófisis luego de la ovariectomía. Para corroborar esta hipótesis se examinó el efecto de la inhibición de la producción de NO sobre la viabilidad celular en cultivos de ratas OVX de 14 días.

La presencia de L-NAME o NMMA impidió la disminución de la viabilidad celular que se observó en los cultivos de ratas OVX-14d en ausencia de dichos inhibidores (control), obteniéndose una viabilidad similar a la de los cultivos de ratas OVX-4d. La AG, en cambio, no modificó el efecto de la ovariectomía sobre la viabilidad celular (Fig. 37).

Estos resultados demuestran que la inhibición de la producción de NO previene completamente la reducción en la viabilidad celular producida a los 14 días de ovariectomía y por lo tanto sugieren que los niveles adenohipofisarios de NO alcanzados luego de la ovariectomía tienen un papel preponderante en la ejecución de la apoptosis en la glándula adenohipofisaria.

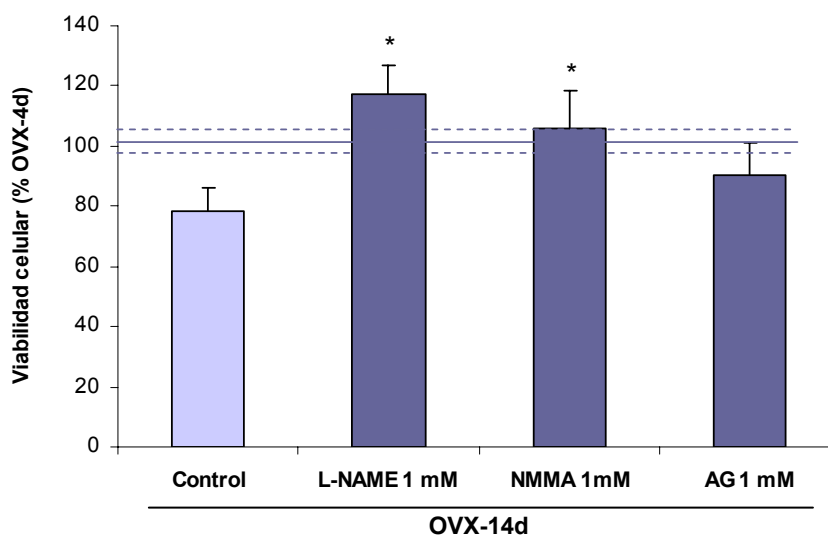


Figura 37: El NO es un mediador clave de la apoptosis inducida en la adenohipófisis luego de la ovariectomía. Los cultivos primarios obtenidos de ratas OVX de 14 días fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). Luego el medio fue descartado y las células fueron incubadas con medio solo (control) o con los distintos inhibidores de las NOSs por 48 hs y la viabilidad celular fue determinada por un ensayo de MTT. La viabilidad celular fue calculada como Abs 600nm/mg de proteína y expresada como porcentaje de la viabilidad de los cultivos de ratas OVX-4d. Los resultados representan la media \pm SEM, n=8. La viabilidad celular de los cultivos de ratas OVX-4d está indicada en el gráfico como la media (línea llena) \pm SEM (línea punteada) y se utilizó como medida de la viabilidad celular basal. *p < 0.05 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ La activación de la sGC media el efecto del NO

Varios de los efectos biológicos del NO están mediados por la estimulación de la enzima sGC, la cual actúa como receptor de NO y cataliza la conversión de GTP en cGMP (Denninger & Marletta 1999; Krumenacker et al. 2004). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que el NO es capaz de estimular la producción adenohipofisaria de cGMP en ratas OVX de 14 días (Velardez et al. 2003a). En base a estos antecedentes, se estudió si la activación de esta enzima está involucrada en la muerte celular inducida en las células adenohipofisarias luego de la ovariectomía. Para ello, se determinó la viabilidad celular de los cultivos de ratas OVX de 14 días luego del tratamiento con LY-83583, inhibidor de la enzima sGC.

El inhibidor previno la disminución de la viabilidad celular producida en los cultivos de ratas OVX-14d (control), obteniéndose una viabilidad similar a la de los cultivos de ratas OVX-4d (Fig. 38). Este resultado demuestra que la inhibición de la sGC impide la reducción de la viabilidad celular que se produce luego de la ovariectomía, sugiriendo que el proceso apoptótico desencadenado es ejercido vía NO/sGC/cGMP.

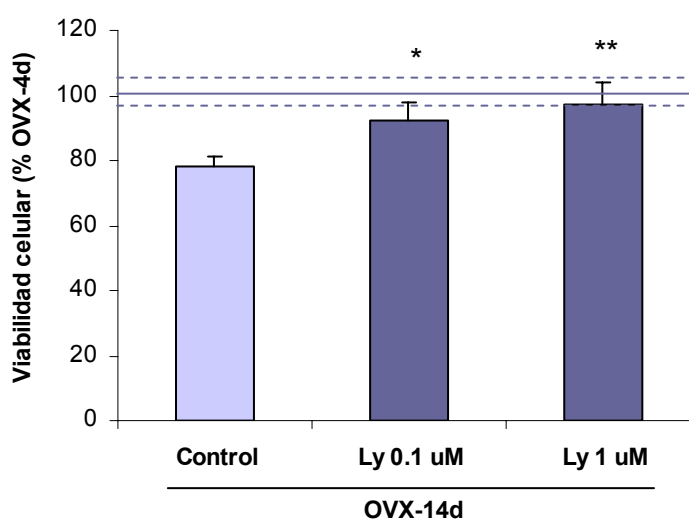


Figura 38: La activación de la enzima sGC media el efecto del NO. Los cultivos primarios obtenidos de ratas OVX de 14 días fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). Luego el medio fue descartado y las células fueron incubadas con medio solo (control) o con LY-83583 por 48 hs y la viabilidad celular fue determinada por un ensayo de MTT. La viabilidad celular fue calculada como Abs 600nm/mg de proteína y expresada como porcentaje de la viabilidad de los cultivos de ratas OVX-4d. Los resultados representan la absorbancia media \pm SEM, n=8. La viabilidad celular de los cultivos de ratas OVX-4d está indicada en el gráfico como la media (línea llena) \pm SEM (línea punteada) y se utilizó como medida de la viabilidad celular basal. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control. ANOVA seguido de la prueba de Dunnett. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

❖ **Las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida en la adenohipófisis luego de la ovariectomía**

Teniendo en cuenta que la activación de caspasas representa un punto clave y común de distintas vías apoptóticas (Thorneberry & Lazebnik 1998; Stennicke & Salvesen 2000) y, que según los resultados presentados en la sección anterior, el NO induce apoptosis en las células adenohipofisarias mediante la activación de caspasas, se evaluó si estas proteasas también están involucradas en la apoptosis desencadenada luego de la ovariectomía. Para ello, los cultivos celulares de ratas OVX de 14 días fueron incubados por 48 hs con Z-VAD-fmk, un inhibidor de caspasas de amplio espectro, y la viabilidad celular fue determinada mediante un ensayo de MTT.

El tratamiento con el inhibidor produjo un aumento significativo de la viabilidad celular en relación a los cultivos de ratas OVX-14d (control), alcanzándose una viabilidad similar a la de los cultivos de ratas OVX-4d (Fig. 39). Esto demuestra que la inhibición de caspasas que el proceso apoptótico es dependiente de la activación de caspasas.

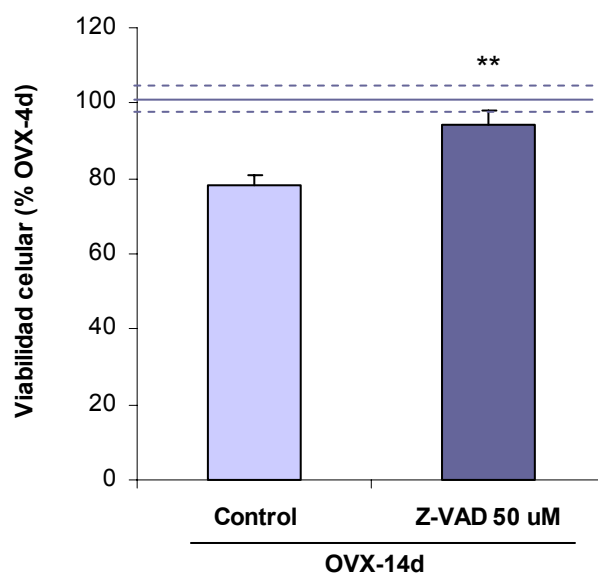


Figura 39: Las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida en la adenohipófisis luego de la ovariectomía. Los cultivos primarios de células adenohipofisarias obtenidos de ratas de 14 días de ovariectomía fueron estabilizados por 48 hs (37°C, 5% CO₂). Luego el medio fue descartado y las células fueron incubadas con medio solo (control) o con Z-VAD-fmk 50 μ M, inhibidor de caspasas, por 48 hs y la viabilidad celular fue determinada por un ensayo de MTT. La viabilidad celular fue calculada como Abs 600nm/mg de proteína y expresada como porcentaje de la viabilidad de los cultivos de ratas OVX-4d. Los resultados representan la absorbancia media \pm SEM, n=8. La viabilidad celular de los cultivos de ratas OVX-4d está indicada en el gráfico como la media (línea llena) \pm SEM (línea punteada) y se utilizó como medida de la viabilidad celular basal **p < 0.01 vs. control. Prueba *t* de Student. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

4.3 DISCUSIÓN

Los estrógenos son las hormonas esteroideas de mayor relevancia en la regulación de la población celular adenohipofisaria. En la rata, el número de células fluctúa de acuerdo a la situación fisiológica (lactancia, preñez, ciclo estral) principalmente en respuesta a los niveles de estrógenos circulantes (Shirasawa & Yoshimura 1982; Carbajo-Pérez & Watanabe 1990; Spady et al. 1999; Candolfi et al. 2006).

La falta de estrógenos desencadena apoptosis en varios tejidos estrógeno-dependientes como ovario, médula ósea y glándula mamaria (Billing et al. 1993; Kiprianou et al. 1991; Shevde & Pike 1996). En la adenohipófisis, la interrupción de tratamientos crónicos con altos niveles de estrógenos también desencadena muerte celular por apoptosis (van Nesselrooij et al. 1992; Drewett et al. 1993; Ahlbom et al. 1998). En base a esto ha sido hipotetizado que la falta de estrógenos que se produce luego de la ovariectomía podría afectar negativamente a la población celular adenohipofisaria, probablemente debido a la inducción de apoptosis en la glándula. Sin embargo, no existen evidencias previas consistentes que lo demuestren.

En este trabajo se muestra que luego de la ovariectomía, y posiblemente como consecuencia de la falta de estrógenos, se reduce la viabilidad de la población celular adenohipofisaria a través de la inducción de apoptosis, proceso en el que estaría involucrado el NO.

En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que la viabilidad de la población celular adenohipofisaria resultó negativamente afectada luego de la ovariectomía. Se observó una significativa disminución de la viabilidad a partir de los 7 días post-ovariectomía, manteniéndose hasta por lo menos los 21 días (el mayor tiempo post-ovariectomía estudiado).

Además, se observó que el porcentaje de células con ADN fragmentado aumentó luego de 7 días de ovariectomía, mostrando un incremento en el porcentaje de células que se encuentran en las últimas etapas del proceso apoptótico.

Relacionando ambos resultados se puede sugerir que la reducción de la viabilidad celular observada en los cultivos primarios está directamente relacionada con el incremento de la apoptosis que se observó directamente en la glándula luego de la ovariectomía.

Si bien el porcentaje de células con ADN fragmentado aumentó significativamente en la glándula luego de 7 días de ovariectomía (10% vs. 2 - 4% en ratas intactas y OVX de 4 días), este cambio es inferior al porcentaje de reducción en la viabilidad celular de los cultivos primarios en el mismo período de tiempo (20 - 30%). Una explicación posible para esta diferencia se relaciona con el hecho de que, a nivel glandular, las células muertas o que ya han comenzado el proceso apoptótico suelen ser rápidamente removidas por las células foliculo estrelladas. Por ejemplo, existen evidencias histológicas que muestran que finalizado el período de lactación, los cuerpos apoptóticos de los lactotropos son rápidamente fagocitados por células foliculo estrelladas propias de la glándula. Esta remoción rápida y efectiva de las células apoptóticas constituye una ventaja a nivel fisiológico ya que evita el desarrollo de procesos inflamatorios (Orgnero de Gaisán et al. 1993; Aoki et al. 1996). Dado que es esperable que la remoción de células en proceso apoptótico esté limitada o reducida durante el cultivo, es lógico que el porcentaje de células muertas detectado en los experimentos de MTT haya sido mayor al porcentaje de células apoptóticas detectado *in vivo*.

Reportes previos muestran que luego de la ovariectomía se produce un aumento de la expresión y actividad de la nNOS (Ceccatelli 1997; González-Hernández & González 2000; Velardez et al. 2003a). Estos efectos son revertidos por el tratamiento con estradiol, demostrando que los estrógenos son los principales responsables de la inhibición de la nNOS adenohipofisaria (Ceccatelli et al. 1993;

Velardez et al. 2003a). En este trabajo se muestra que los cambios a nivel de la enzima se ven reflejados en un incremento en la producción adenohipofisaria de NO. El nivel de nitritos aumentó significativamente a partir de los 7 días post-ovariectomía y se mantuvo elevado por lo menos hasta los 21 días, en forma paralela al incremento en la actividad y expresión de la nNOS previamente observada (Ceccatelli et al. 1993; Garrel et al. 1998). Es decir que luego de la ovariectomía, se suprimiría la inhibición que ejercen los estrógenos sobre la nNOS, favoreciendo la estimulación de la enzima y la consiguiente sobreproducción de NO.

Esta inhibición ejercida por los estrógenos sobre la nNOS adenohipofisaria no sería directa, sino que estaría mediada por GnRH y por lo tanto dependería de la conexión hipotalámica (Garrel et al. 1998). Los estrógenos regulan la liberación de la GnRH a nivel del hipotálamo. En ausencia de estrógenos se produce un aumento de la liberación de GnRH, y al actuar sobre los gonadotropos, esta hormona estimula la expresión génica de nNOS. Sin embargo, este efecto sobre la enzima no sería permanente debido a que la exposición prolongada de la glándula a GnRH provoca una desensibilización de los gonadotropos a la acción de esta hormona (Garrel et al. 1998). Este fenómeno de estimulación seguido de una desensibilización nos permitiría explicar por qué el incremento en la producción de NO luego de la ovariectomía es acotado en el tiempo, alcanzándose un máximo en los niveles de NO hacia los 7 y 14 días post-ovariectomía, para luego estabilizarse por lo menos hasta los 21 días.

Confirmando las evidencias citadas, los resultados obtenidos muestran que la nNOS adenohipofisaria sería la principal responsable de la sobreproducción de NO post-ovariectomía, dado que el aumento de nitritos alcanzado a los 14 días de ovariectomía fue completamente prevenido por el tratamiento con NMMA (inhibidor general de las NOSs) o con L-NAME (inhibidor con mayor selectividad por nNOS).

Teniendo en cuenta que el L-NAME reacciona parcialmente con la eNOS (Alderton et al. 2001), no se puede descartar totalmente la participación de esta isoforma. Sin embargo, ensayos de Western Blots realizados con adenohipófisis de

ratas castradas no revelaron expresión de la eNOS en la glándula (Garrel et al. 1998). Apoyando esto, se ha observado que la administración aguda de estradiol a ratas OVX induce un aumento de los niveles de ARNm de eNOS en la glándula (Candolfi et al. 2004), demostrando que los estrógenos estimulan la expresión de eNOS, tal como sucede en otros tejidos (MacRitchie et al. 1997, Xia & Krukoff 2004).

La incubación con aminoguanidina (inhibidor de la iNOS) (Misko et al. 1993) no modificó el nivel de nitritos alcanzado a los 14 días de ovariectomía, indicando que esta isoforma no estaría involucrada en el aumento de NO. Este resultado no fue muy sorprendente dado que la iNOS normalmente no se detecta en las células de la glándula y su expresión se induce ante situaciones de estrés intracelular o durante procesos inflamatorios (Wong et al. 1996; Satta et al. 1998; Tuteja et al. 2004). Apoyando estas evidencias y los resultados de esta tesis, en estudios realizados con ratas hembras OVX no se detectó la expresión de ARNm ni de proteína de esta isoforma en la adenohipófisis luego de la ovariectomía (Garrel et al. 1998; Candolfi et al. 2004).

Considerando el hecho de que el NO puede tener un efecto tanto pro como antiapoptótico sobre las células adenohipofisarias (Poliandri et al. 2004; Velardez et al. 2004), y que se observó que el aumento de NO es concomitante al incremento de apoptosis que se produce luego de la ovariectomía, se investigó el papel del NO en este proceso.

Los resultados muestran que el NO jugaría un papel clave en la muerte celular desencadenada en las células adenohipofisarias luego de la ovariectomía, dado que los tratamientos con L-NAME y con NMMA previnieron completamente la disminución de la viabilidad celular que se produce a los 14 días de ovariectomía.

Generalmente los efectos apoptóticos están asociados con concentraciones relativamente altas (micromolares) y/o continuas de NO, como las producidas luego de la inducción de la iNOS. Los efectos antiapoptóticos, en cambio, están

asociados con concentraciones bajas de NO (submicromolares) derivadas principalmente de la actividad de la nNOS y la eNOS (Shen et al. 1998; Liu & Stamler 1999). Contrariamente a esto, los resultados obtenidos sugieren que el NO derivado de la estimulación de la nNOS es el que desencadena el proceso apoptótico. Una explicación posible es que la estimulación de la nNOS que se produce luego de la ovariectomía produzca niveles bajos de NO pero persistentes, que generen en forma localizada concentraciones relativamente altas de NO y en estas condiciones se induzca apoptosis en la glándula. También es posible que como consecuencia de la ovariectomía, y por consiguiente de las alteraciones hormonales que de ella derivan, las células adenohipofisarias pasen a ser más sensibles ante diversos estímulos. Por lo tanto, aún niveles relativamente bajos de NO, como los producidos por la nNOS, podrían ser suficientes para desencadenar el proceso apoptótico en esta situación.

En relación a esto, es interesante mencionar que durante los primeros 4 días de ovariectomía no se producen cambios notables en los niveles de NO ni en el porcentaje de células apoptóticas (o en la reducción de la viabilidad celular) en relación a los valores en cultivos de ratas intactas. Recién luego de 7 días post-ovariectomía dichos cambios se hacen significativos y se mantienen sin variaciones hasta por lo menos los 21 días. Esto sugiere que existe un período de latencia previo a que los cambios hormonales inducidos por la ovariectomía produzcan sus efectos.

La mayoría de los efectos fisiológicos del NO son ejercidos a través de la activación de la enzima sGC, conocida también como el receptor intracelular de NO (Denninger & Marletta 1999; Krumenacker et al. 2004). En relación a la regulación de la muerte celular, generalmente la activación de la sGC está relacionada con el efecto antiapoptótico del NO (Shen et al. 1998; Krumenacker et al. 2004; Thippeswamy et al. 2005). Sin embargo, hay reportes que muestran que la activación de la vía sGC/cGMP puede mediar también el efecto apoptótico del NO (Taimor et al. 2000; Valenti et al. 2003). En las condiciones de este estudio, el

tratamiento de los cultivos primarios de adenohipófisis con un inhibidor específico de la sGC (LY-83583) previno la reducción de la viabilidad celular que se produce a los 14 días de ovariectomía, sugiriendo que la activación de esta enzima media el efecto apoptótico del NO. Consistentemente, estudios previos de nuestro laboratorio muestran la producción de cGMP estimulada por el NO es mayor en ratas OVX de 14 días que en intactas (Velardez et al. 2003a). Teniendo en cuenta ambos resultados se puede sugerir que la apoptosis inducida en las células adenohipofisarias luego de la ovariectomía es ejercida por la vía NO/sGC/cGMP.

El cGMP es un segundo mensajero que regula varios procesos celulares a través de diversas cascadas de señalización (Denninger & Marletta 1999). Por lo tanto, la activación de la vía sGC/cGMP por el NO podría constituir uno de los primeros eventos de alguna de estas cascadas que dispare el proceso apoptótico. En relación a esto, se ha observado que la estimulación de la proteína kinasa G (PKG) inducida por el cGMP media los procesos apoptóticos inducidos por el NO en ciertos tejidos (Shimojo et al. 1999; Taimor et al. 2000). Sería interesante poder dilucidar en estudios futuros si esta proteína (o algún otro blanco del cGMP) forma parte de los mecanismos que inducen muerte celular en las células adenohipofisarias luego de la ovariectomía.

Tanto en los resultados presentados en el capítulo anterior como en estudios previos (Velardez et al. 2004) se demostró que el NO es puede inducir apoptosis de las células adenohipofisarias mediante la activación de caspasas.

En los estudios realizados en este capítulo se observó que el tratamiento de los cultivos primarios con un inhibidor de caspasas atenuó la disminución de la viabilidad celular que se produce a los 14 días de ovariectomía. Por lo tanto, se puede inferir por un lado, que las caspasas están involucradas en el proceso apoptótico inducido luego de la ovariectomía, y por el otro que el NO está involucrado en dicha activación. En relación con esto último, es posible que la inducción de caspasas por el NO sea mediada por alguna de las vías apoptóticas disparadas por el cGMP. De hecho hay evidencias que muestran que la apoptosis

inducida por el NO en células musculares de rata es prevenida por inhibidores de la sCG, PKG y de caspasas (Shimojo et al. 1999). Estudios futuros permitirán corroborar esta hipótesis.

Es interesante mencionar que si bien en las dos situaciones estudiadas en esta tesis el NO estaría induciendo la activación de caspasas, el mecanismo apoptótico desencadenado por el NO en las células adenohipofisarias no sería el mismo. Prueba de ello es que, como se mostró en el capítulo anterior, la apoptosis inducida por la exposición prolongada a concentraciones micromolares de NO sería independiente de la activación de la sGC, mientras que la muerte celular desencadenada luego de la ovariectomía estaría mediada por esta enzima.

Como se mencionó al comienzo de la discusión, los estrógenos son las hormonas esteroideas de mayor relevancia en la fisiología adenohipofisaria dado que el número de células en la glándula fluctúa de acuerdo a los niveles circulantes de estrógenos. Por lo tanto, de los resultados obtenidos en este capítulo se puede concluir que luego de la ovariectomía, la falta de estrógenos induce un aumento de la producción de NO en la adenohipófisis al eliminar la inhibición que ejercen los mismos sobre la nNOS. Este incremento de NO induce apoptosis de las células adenohipofisarias. Por lo tanto, el NO podría ser considerado uno de los principales efectores de la muerte celular desencadenada en la glándula como consecuencia de los cambios hormonales inducidos por la ovariectomía.

4.4 CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

- Luego de la ovariectomía se produce un incremento de la muerte celular en la glándula adenohipofisaria debido a la inducción de apoptosis.

- Los niveles de NO aumentan durante este período, como consecuencia de la estimulación de la nNOS que se produce al suprimir la inhibición que ejercen los estrógenos sobre la enzima.

- El NO tiene un papel clave en la apoptosis inducida en la células adenohipofisarias luego de la ovariectomía.

- El proceso apoptótico desencadenado por el NO es dependiente de la estimulación de la enzima sGC y de la activación de caspasas.

En resumen, los resultados obtenidos en esta segunda parte de la tesis han permitido ampliar el conocimiento acerca de la regulación de la muerte celular en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía y dilucidar el papel del NO en este proceso. La falta de estrógenos provocada por la ovariectomía induciría un aumento de la producción de NO en la adenohipófisis, al eliminar la inhibición que ejercen los mismos sobre la nNOS. Este aumento de NO provoca un incremento de la muerte celular en la glándula debido a la inducción de apoptosis. Por lo tanto, el NO sería el mediador principal de las alteraciones que produce la falta de estrógenos sobre la viabilidad celular adenohipofisaria.

Estos resultados constituyen el primer paso en el estudio de los mecanismos intracelulares que regulan el proceso de muerte celular en la adenohipófisis durante este período. La elucidación de estos mecanismos permitirá avanzar en la comprensión de las alteraciones funcionales y hormonales que se producen a nivel neuroendocrino ante la pérdida de la función ovárica, como ocurre por ejemplo en mujeres post-menopáusicas o con ovariectomía por razones médicas.

5 CONCLUSIÓN GENERAL

La adenohipófisis, además de poseer una importante actividad de síntesis y secreción hormonal, es un tejido con una alta actividad de recambio celular. El número de células en la glándula fluctúa constantemente de acuerdo a la situación fisiológica. Esto se debe a la acción concertada de una gran variedad de factores provenientes tanto de tejidos periféricos como del sistema nervioso central (a través del hipotálamo) o de las propias células adenohipofisarias.

Durante los últimos años, se ha hecho gran hincapié en el estudio de los factores intrahipofisarios que regulan la secreción hormonal y la proliferación celular, pero poco se conoce acerca de los factores que regulan el proceso de muerte celular en la glándula.

Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado al NO como un regulador muy importante de la muerte y viabilidad celular adenohipofisaria, función que está íntimamente relacionada con el efecto dual de esta molécula de inducir o prevenir la apoptosis. Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre el papel del NO como regulador del proceso apoptótico, se evaluó la acción del NO en las células adenohipofisarias de rata, en dos situaciones diferentes:

1. Se investigaron los mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis inducida por el NO en una situación similar a la encontrada en procesos inflamatorios.

2. Se investigó el papel del NO en el proceso de muerte celular en la glándula adenohipofisaria luego de la ovariectomía.

En primer lugar, los resultados obtenidos han permitido identificar algunos de los mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis inducida por concentraciones micromolares de NO en las células adenohipofisarias. Dentro de los mecanismos estudiados que caracterizan a la vía apoptótica mitocondrial, se

pudo establecer la sobreproducción mitocondrial de ROS como uno de los eventos disparadores de esta cascada apoptótica. Este aumento de ROS induce cambios en la expresión de Bax y Bcl-2 y la activación posterior de la caspasa 3, que lleva finalmente a la muerte celular. A esta secuencia de eventos se le suma la modulación que ejerce el NO sobre los distintos componentes del sistema antioxidante, la cual contribuye en el desarrollo del proceso apoptótico.

Bajo esta situación, el efecto apoptótico del NO parece ser independiente de p53, de la enzima sGC y del calcio. Además de la vía apoptótica identificada, la ejecución de la muerte celular estaría también mediada por algún otro mecanismo paralelo que no alcanzó a ser abarcado en este estudio. El mismo podría incluir a las proteínas de la familia de Bcl-2, pero sería independiente de caspasas y de ROS.

Los resultados del segundo objetivo muestran que luego de la ovariectomía, y posiblemente como consecuencia de la falta de estrógenos, hay un incremento de la muerte celular en la glándula debido a la inducción de apoptosis. El NO, que aumenta luego de la ovariectomía, tiene un papel clave en el desarrollo del proceso apoptótico, el cual se produciría a través de la vía sGC/cGMP y de la activación de caspasas.

Como puede apreciarse, el proceso apoptótico inducido por el NO en las dos situaciones en estudio está mediado por mecanismos intracelulares diferentes. La activación de uno u otro dependería principalmente de la concentración local de NO a la que están expuestas las células, de la persistencia del estímulo y del entorno celular. Esto hace que la regulación de la muerte celular adenohipofisaria llevada a cabo por el NO sea un proceso sumamente complejo y variable.

Este estudio permitió esclarecer ciertos aspectos del papel activo del NO en el proceso de muerte celular en la adenohipófisis. Se han identificado algunos de los mecanismos por los cuales el NO induce muerte celular programada en la glándula, pero quedan aún preguntas sin resolver y nuevos interrogantes que deberán responderse en futuras investigaciones.

Lic. Leticia Inés Machiavelli

Dra. Beatriz H. Duvilanski

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM & Cory S, 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Ahlbom E, Grandison L, Zhivotovsky B, Ceccatelli S, 1998. Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 139: 2465-2471.
- Alberdi E, Sanchez-Gomez MV & Matute C, 2005. Calcium and Glial Cell Death. *Cell Calcium* 38: 417-425.
- Albina JE, Cui S, Mateo RB & Reichner JS, 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 150: 5080-5085.
- Alderton WK, Cooper CE & Knowles RG, 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal* 357: 593-615.
- Allaerts W & Vankelecom H, 2005. History and perspectives of pituitary-stellate cell research. *European Journal of Endocrinology* 153: 1-12.
- Aoki A, de Gaisán EO, Pasolli HA & Torres AI, 1996. Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 104: 2562-62.
- Aoki MP, Maldonado AC, Aoki A, 1998. Apoptotic and non-apoptotic cell death in hormone-dependent glands. *Cell Tissue Research* 291: 571-574.
- Armstrong JS, Yang H, Duan W & Whiteman M, 2004. Cytochrome Bc1 Regulates the Mitochondrial Permeability Transition by Two Distinct Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 50420-50428.
- Baud O, Jianrong L, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ & Rosenberg PA, 2004. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *The European Journal of Neuroscience* 20: 1713-1726.
- Beltrán B, Orsi A, Clementi E & Moncada S, 2000. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *British Journal of Pharmacology* 129: 953-960.
- Ben-Jonathan N & Hnasko R, 2001. Dopamine as a prolactin inhibitor. *Endocrine Reviews* 22: 724-763.
- Billing H, Furuta I & Hsueh AJ, 1993. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133: 2204-2212.
- Bobba A, Atlante A, Moro L, Calissano P & Marra E, 2007. Nitric oxide has dual opposite roles during early and late phases of apoptosis in cerebellar granule neurons Apoptosis. 12: 1597-1610.

- Bogdan C, 2001. Nitric oxide and immune response. *Nature Immunology* 2: 907-916.
- Borutaite V, Budriunaite A & Brown GC, 2000. Reversal of nitric oxide-, peroxy-nitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1459: 405-412.
- Bredt DS & Snyder SH, 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87: 682-685.
- Brockhaus F & Brüne B, 1999. p53 accumulation in apoptotic macrophages is an energy demanding process that precedes cytochrome c release in response to nitric oxide. *Oncogene* 18: X405-X410.
- Broker LE, Kruyt FA & Giaccone G, 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research* 11: 3155-3162.
- Brooks CL & Gu W, 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis of p53 degradation. *Current Opinion of Cell Biology* 15: 134-171.
- Brorson JR & Zhang H, 1997. Disrupted [Ca²⁺]_i homeostasis contributes to the toxicity of nitric oxide in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*. 69: 1882-1889.
- Brown GC & Borutaite V, 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52: 189-195.
- Brown GC & Borutaite V, 2004. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxy-nitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658: 44-49.
- Brüne B & Schneiderhan N, 2003. Nitric oxide evoked p53-accumulation and apoptosis. *Toxicology Letters*. 139: 119-123.
- Brunetti L, Ragazzoni E, Preziosi P & Vacca M, 1995. A possible role for nitric oxide but not for prostaglandin E2 in basal and interleukin-1-beta-induced PRL release in vitro. *Life Sciences* 56: PL277-PL283.
- Brunk UT & Terman A, 2002. The Mitochondrial-Lysosomal Axis Theory of Aging: Accumulation of Damaged Mitochondria As a Result of Imperfect Autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry* 269: 1996-2002.
- Brustovetsky N, Dubinsky JM, Antonsson B & Jemmerson R, 2003. Two pathways for tBID-induced cytochrome c release from rat brain mitochondria: BAK- versus BAX-dependence. *Journal of Neurochemistry* 84: 196-207.
- Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR & Feelisch M, 2004. Cellular targets and mechanisms of nitrosylation: An insight into their nature and kinetics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 4308-4313.
- Buja LM, Eigenbrodt ML & Eigenbrodt EH, 1993. Apoptosis and Necrosis. Basic Types and Mechanisms of Cell Death. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 117: 1208-1214.

- Burney S, Caulfield J, Niles J, Wishnok J & Tannenbaum S, 1998. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research* 424: 37-49.
- Calmels S, Hainaut P, Ohshima H, 1997. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Research* 57: 3365-3369.
- Cameron IT & Campbell S, 1998. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reproduction Update* 4: 565-569.
- Candolfi M, Jaita G, Zaldivar V, Zarate S, Pisera D & Seilicovich A, 2004. Tumor necrosis factor-alpha-induced nitric oxide restrains the apoptotic response of anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 80: 83-91.
- Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D & Seilicovich A, 2002. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology* 143: 3611-3617.
- Candolfi M, Zaldivar V, Jaita G & Seilicovich A, 2006. Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle. *Frontiers of Hormone Research* 35: 9-21.
- Carafoli E & Molinari M, 1998. Calpain: a Protease in Search of a Function? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247: 193-203.
- Carafoli E, 2002. Calcium Signaling: a Tale for All Seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U SA* 99: 1115-1122.
- Carbajo-Pérez E & Watanabe YG, 1990. Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Research* 261: 333-338.
- Carreras MC, Franco MC, Peralta JG & Poderoso JJ, 2004. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 125-139.
- Caruso C, Bottino MC, Pampillo M, Pisera D, Jaita G, Duvilanski B, Seilicovich A & Lasaga M, 2004. Glutamate induces apoptosis in anterior pituitary cells through group II metalotropic glutamate receptor activation. *Endocrinology* 145: 4677-4684.
- Ceccatelli S, 1997. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. *Brain Research Bulletin* 44: 533-538.
- Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L & Villar M, 1993. Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 11292-11296.
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S & Chakraborti S, 1999. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signaling* 11: 77-85.
- Chan SL, Culmsee C, Haughey N, Klapper W & Mattson MP, 2002. Presenilin-1 Mutations Sensitize Neurons to DNA Damage-Induced Death by a Mechanism Involving Perturbed Calcium Homeostasis and Activation of Calpains and Caspase-12. *Neurobiology of Disease* 11: 2-19.

- Chance B, Sies H & Boveris A, 1979. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological Reviews* 59: 527-605.
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR & Kim YM, 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 1075-1079.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M & Moncada S, 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 7631-7636.
- Conn PM, McArdle CA, Andrews WV & Huckle WR, 1987. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biology of Reproduction* 36: 17-35.
- Cooper CE, 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 290-309.
- Cotton FA & Wilkinson G, 1988. The chemistry of the main group elements. *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed, Wiley, New York.
- Crow JP, 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157.
- Dada MO, Campbell GT & Blake CA, 1984. Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *Journal of Endocrinology* 101: 87-94.
- De Rojas-Walkers T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS & Tannenbaum SR, 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chemical Research in Toxicology* 8: 473-477.
- Denninger JW & Marletta MA, 1999. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 334-350.
- Desagher S & Martinou JC, 2000. Mitochondria and the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10: 369-377.
- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M & Zeiher AM, 1997a. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP32-like proteases. *The Journal of Experimental Medicine* 185: 601-608.
- Dobashi K, Asayama K, Nekane T, Kodera K, Hayashibe H & Nakazawa S, 2001. Induction of Glutathione Peroxidase in response to inactivation by nitric oxide. *Free Radical Research* 35: 319-327.
- Dotto GP & Silke J, 2004. More Than Cell Death: Caspases and Caspase Inhibitors on the Move. *Developmental Cell* 7: 2-3.
- Drapier JC, 1997. Interplay between NO and [Fe-S] clusters: Relevance to biological systems. *Methods* 11: 319-329.

- Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA & Lloyd HM, 1993. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 57: 89-95.
- Droge W, 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- Duvilanski BH, Velardez MO, González Iglesias A, Theas S, Seilicovich A & Becu-Villalobos D, 1998. Nitric oxide modify free intracellular calcium levels in rat anterior pituitary cells. *Molecular and cellular Endocrinology* 146: 19-26.
- Duvilanski BH, Zambruno C, Lasaga M, Pisera D & Seilicovich A, 1996. Role of nitric oxide /cyclic GMP pathway in the inhibitory effect of GABA and dopamine on prolactin release. *Journal of Neuroendocrinology* 8: 909-913.
- Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC, Belova N, Retori V & McCann S, 1995. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 170-174.
- Eberhard M & Erne P, 1991. Calcium Binding to Fluorescent Calcium Indicators: Calcium Green, Calcium Orange and Calcium Crimson. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180: 209-215.
- Elliott N A & Volkert MR, 2004. Stress Induction and Mitochondrial Localization of Oxr1 Proteins in Yeast and Humans. *Molecular and Cell Biology* 24: 3180-3187.
- Ellis RE, Yuan JY & Horvitz HR, 1991. Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annual Review of Cell Biology* 7: 663-698.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A & Martinou JC, 1998. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *The Journal of Cell Biology* 143: 217-224.
- Feelisch M, 1991. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 17: S25-S33.
- Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V & Kolb-Bachofen V, 1995. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *Journal of Immunology* 155: 2858-2865.
- Fialkow L, Wang Y & Downey GP, 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine* 42: 153-164.
- Filippov G, Bloch DB & Bloch KD, 1997. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 942-948.

- Finucane DM, Waterhouse NJ, Amarante-Mendes GP, Cotter TG & Green DR, 1999. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Experimental Cell Research* 251: 166-174.
- Foster MW & Stamler JS, 2004. New insights into protein S-nitrosylation. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 25891-25897.
- Freda PU, Reyes CM, Nuruzzaman AT, Sundeen RE, Khandji AG & Post KD, 2004. Cabergoline Therapy of Growth Hormone & Growth Hormone/Prolactin Secreting Pituitary Tumors. *Pituitary* 7: 21-30.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G, 2000. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80: 1523-1631.
- Fumarola C & Guidotti GG, 2004. Stress-Induced Apoptosis: Toward a Symmetry With Receptor-Mediated Cell Death. *Apoptosis* 9: 77-82.
- Garrel G, Lerrant Y, Siriostis C, Bérault A, Magre S, Bouchaud C, Counis R, 1998. Evidence that gonadotropin-releasing hormone stimulates gene expression and levels of active nitric oxide synthase type I in pituitary gonadotrophs, a process altered by desensitization and, indirectly, by gonadal steroids. *Endocrinology* 139: 2163-2170.
- Garrido C & Kroemer G, 2004. Life's Smile, Death's Grin: Vital Functions of Apoptosis-Executing Proteins. *Current Opinion in Cell Biology* : 639-646.
- Gennari A, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R & Corsini E, 2000. Organotins Induce Apoptosis by Disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and Mitochondrial Activity, Causing Oxidative Stress and Activation of Caspases in Rat Thymocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 169: 185-190.
- Gershengorn MC, 1986. Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annual Review Physiology* 48: 515-526.
- Giulivi C, Poderoso JJ & Boveris A, 1998. Production of Nitric Oxide by Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 11038-11043.
- Glockzin S, von Knethen A, Scheffner M & Brüne B, 1999. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 19581-19586
- González-Hernández T & González MC, 2000. Gender differences and the effect of different endocrine situations on the NOS expression pattern in the anterior pituitary gland. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48: 1639-1648.
- Gow AJ & Stamler JS, 1998. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391: 169-173.
- Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H & Stamler JS, 2002. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 9637-9640.
- Green DR & Reed JC, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

- Grisham MB, Johnson GG & Lancaster JR Jr, 1996. Quantitation of Nitrate and Nitrite in Extracellular Fluids. *Methods Enzymology* 268: 237-246.
- Han H, Long H, Wang H, Wang J, Zhang Y & Wang Z, 2004. Progressive apoptotic cell death triggered by transient oxidative insult in H9c2 rat ventricular cells: a novel pattern of apoptosis and the mechanisms. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286: H2169-H2182.
- Harada H & Grant S, 2003. Apoptosis Regulators. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* 7: 117-138.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N & Giulivi C, 2004. Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase: Enzyme Expression, Characterization, and Regulation. *Journal of Bioenergetics* 36: 341-346.
- Hebestreit H, Dibbert B, Balatti I, Braun D, Schapowal A, Blaser K & Simon HU, 1998. Disruption of fas receptor signaling by nitric oxide in eosinophils. *The Journal of Experimental Medicine* 187: 415-425.
- Heinloth A, Brüne B, Fischer B, Galle J, 2002. Nitric oxide prevents oxidized LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation, and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation. *Atherosclerosis* 162: 93-101.
- Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U & Klockgether T, 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *Journal of Neurochemistry* 71: 88-94.
- Herrero MB & Gagnon C, 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology* 22: 349-356.
- Hintze TH, 2001. Prologue: Nitric oxide - hormones, metabolism and function. *The American Journal of Physiology* 281: H2253-H2255.
- Hissin PJ & Hilf R, 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74: 214-226.
- Hofseth LJ, Hussain SP & Harris CC, 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 25: 177-181.
- Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E & Harris CC, 2003. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 143-148.
- Hu DE & Brindle KM, 2005. Immune cell-induced synthesis of NO and reactive oxygen species in lymphoma cells causes their death by apoptosis. *FEBS Letters* 579: 2833-2841.
- Huie RE & Padmaja S, 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Research Communications* 18: 195-199.

- Hymer WC, Mastro A & Griswold E, 1970. DNA synthesis in the rat anterior pituitary of the male rat: effect of castration and photoperiod. *Science* 167: 1629-1630.
- Ignarro LJ, 1989. Heme-Dependent Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Nitric Oxide: Regulation of Enzyme Activity by Porphyrins and Metalloporphyrins. *Seminars in Hematology* 26: 63-76.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrnes RE & Chaudhuri G, 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84: 9265-9269.
- Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, NIH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996. National Academy Press, Washington DC.
- Ivan G, Szigeti-Csucs N, Olah M, Nagy GM & Goth MI, 2005. Treatment of Pituitary Tumors: Dopamine Agonists. *Endocrine* 28:101-110.
- Jahn GA, Burdman JA & Deis RP, 1984. Regulation of pituitary DNA synthesis during different reproductive states in the female rat: role of estrogen and prolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 35: 113-119.
- Jaiswal M, LaRusso NF & Gores GJ, 2001. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *The American Journal of Physiology* 281: G626-G634.
- Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K & Miyamoto E, 2000. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH₃ cells. *Biology of Reproduction* 62: 1486-1494.
- Kasai H & Petersen OH, 1994. Spatial dynamics of second messengers: IP₃ and cAMP as long-range and associative messengers. *Trends in Neurosciences* 17: 95-101.
- Kato M, 1992. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 131: 2133-2138.
- Kawamata Y, Fujii R, Fukusumi S, Habata Y, Hosoya M, Hinuma S, Kitada C, Onda H, Nishimura O & Fujino M, 2000. Analyses for Susceptibility of Rat Anterior Pituitary Cells to Prolactin-Releasing Peptide. *Endocrine* 12: 215-221.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257.
- Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS & Chun JS, 2002. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 1332-13329.
- Kim YM, Bombeck CA & Billiar TR, 1999. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research* 84: 253-256.

- Kim YM, De Vera ME, Watkins SC & Billiar TR, 1997. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis inducing heat shock protein 70 expression. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 1402-1411.
- Knowles RG & Moncada S, 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal* 298: 249-58.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMG & Moncada S, 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86: 5159-5162.
- Koppenol WH, 1999. Chemistry of Peroxynitrite and Its Relevance to Biological Systems. Metal ions in biological systems. 18: 597-619. Ed. Sigel A & Sigel H. Marcel Dekker, New York-Basel.
- Krhon AJ, Wahlbrink T & Prehn JH, 1999. Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *Journal of Neurosciences* 19: 7394-7404.
- Krumenacker JS, Hanafy A & Murad F, 2004. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin* 62: 505-515.
- Kunert-Radek J & Pawlikowski MH, 1975. The effect of thyrotropin releasing hormone on cell proliferation in the anterior pituitary gland of thyroidectomized rats. *Neuroendocrinology* 17: 92-95.
- Kurozumi R, Takahashi M & Kojima S, 2005. Involvement of mitochondrial peroxynitrite in nitric oxide-induced glutathione synthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28: 779-785.
- Kyprianou N, English HF, Davidson NE & Isaacs JT, 1991. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Research* 51: 162-166.
- Lamberts SWJ & MacLeod RM, 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70: 279-318.
- Lander HM, 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB Journal* 11: 118-124.
- Langer G, Ferin M & Sachar EJ, 1978. Effect of Haloperidol and L-Dopa on Plasma Prolactin in Stalk-Sectioned and Intact Monkeys. *Endocrinology* 102: 367-370.
- Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S & Brenner C, 2005. Reactive Oxygen Species and the Mitochondrial Signaling Pathway of Cell Death. *Histology and Histopathology* 20: 205-219.
- Leong SK, Ruan RS & Zhang Z, 2002. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 962: 161-181.
- Liu L & Stamler JS, 1999. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differentiation* 6: 937-942.

- Lo MY & Kim HT, 2004. Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition. *Journal of Orthopedic Research* 22: 1120-1125.
- Lyons RC, Orloff GJ & Cunningham JM, 1992. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 6370-6374.
- MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS & Shaul PW, 1997. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circulation Research* 81: 355-362.
- Malhi H, Gores GJ & Lemasters JJ, 2006. Apoptosis and Necrosis in the Liver: a Tale of Two Deaths? *Hepatology* : S31-S44.
- Matés JM, Pérez-Gómez C & Nuñez de Castro I, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603.
- Mathai JP, Germain M & Shore GC, 2005. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 24: 23829-23836.
- Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J & Cunha SR, 2000. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Progress in Hormone Research* 55: 237-267.
- McDaniel ML, Corbett JA, Kwon G & Hill JR, 1997. A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 426: 313-319.
- Messmer UK, Reed JC & Brüne B, 1996. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 192-197.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR & Currie MG, 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *European Journal of Pharmacology* 233: 119-125.
- Miyashita T & Reed JC, 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 80: 293-299.
- Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo H & Darley-USmar VM, 1998. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Archives of Biochemistry Biophysics* 358: 74-82.
- Moncada S, Palmer RMJ & Higgs EA, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43: 109-142.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T & Yasuhiko Y, 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 34287-34294.

- Nakagawa T & Yuan J, 2000. Cross-Talk Between Two Cysteine Protease Families. Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 150: 887-894.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA & Yuan J, 2000. Caspase-12 Mediates Endoplasmic-Reticulum-Specific Apoptosis and Cytotoxicity by Amyloid-Beta. *Nature* 403: 98-103.
- Neill JD, 1970. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197.
- Newton CJ, 1995. Estrogen receptor blockade by the pure antiestrogen, ZM 182780, induces cell death of tumor pituitary cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 55: 327-336.
- Newton CJ, Bilko D, Tichomirowa M, Renner U & Stalla GK, 2005. The Role of Poly (Adenosine 5'-Diphosphate-Ribose) Polymerase in the Response of Pituitary Tumor Cells to Reactive Oxygen Species. *Endocrinology* 146: 1119-1127.
- Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM & Bernardi P, 1996. Interactions of Cyclophilin With the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, and Cyclosporin A-Sensitive Channel. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 2185-2192.
- Nishio E & Watanabe Y, 1998. NO induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. *Life Sciences* 62: 239-245.
- Nüssler AK & Billiar TR, 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology* 54: 171-178.
- Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T & Morii, 1993. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: Influences of sex, estrous cycle and circadian change. *The Anatomical Record* 235: 111-120.
- Okere CO, Murata E & Higuchi T, 1998. Perivascular localization of nitric oxide synthase in the rat adenohypophysis: potential implications for function and cell-cell interaction. *Brain Research* 784: 337-340.
- Orgnero de Gaisán EM, Maldonado CA & Aoki A, 1999. Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study. *The Histochemical Journal* 25: 150-165.
- Page R, 1994. The anatomy of the hypothalamus-hypophysial complex. The physiology of reproduction. 2nd ed, Knobil E & Neill J, Raven Press, New York.
- Pallone TL & Mattson DL, 2002. Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 11: 93-98.
- Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS & Moncada S, 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 153: 1251-1256.

- Papapetropoulos A, Go CY, Murad F & Catravas JD, 1996. Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *British Journal Pharmacology* 117: 147-155.
- Paschen W, 2001. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium* 29: 1-11.
- Pearlstein DP, Ali MH, Mungai P T, Hynes KL, Gewertz BL & Schumacker PT, 2002. Role of Mitochondrial Oxidant Generation in Endothelial Cell Responses to Hypoxia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 22: 566-573.
- Pisera D, Candolfi M, Navarra s, Ferari J, Zaldivar V, Jaita g, Castro MG & Seilicovich A, 2004. Estrogens sensitize pituitary gland to apoptosis. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 287: E767-E771.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F & Boveris A, 1996. Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 328: 85-92.
- Poliandri AH, 2006. Tesis de Doctorado.
- Poliandri AH, Machiavelli LI, Quinteros AF, Cabilla JP & Duvilanski BH, 2006. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 679-688.
- Poliandri AH, Velardez MO, Cabilla JP, Bodo CC, Machiavelli LI, Quinteros AF & Duvilanski BH, 2004. Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1463-1471.
- Polster BM & Fiskum G, 2004. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 90: 1281-1289.
- Prast H & Philippu A, 2001. Nitric oxide as a modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology* 64: 51-68.
- Pryor WA, Church DF, Govidan CK & Crank G, 1982. Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: Synthetic utility and toxicological implications. *The Journal of Organic Chemistry* 47: 156-159.
- Qian X, Jin L & Lloyd RV, 1999. Estrogen downregulates neuronal nitric oxide synthase in rat anterior pituitary cells and GH3 tumors. *Endocrine* 11: 123-130.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C & Castro L, 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 1451-1464.
- Ragsdale RO, 1973. Reactions of nitrogen (II) oxide. *Developments in Inorganic Nitrogen Chemistry*, C. B. Colburn ed, Vol 2, Elsevier, New York.
- Rahman I & MacNee W, 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European Respiratory Journal* 16: 534-554.

- Rao RV, Ellerby HM & Bredesen DE, 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differentiation* 11: 372-80.
- Reed JC, 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differentiation* 13: 1378-1386.
- Riobó N, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S & Poderoso JJ, 2001. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *The Biochemical Journal* 359: 139-145.
- Riobó NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E & Poderoso JJ, 2002. The Modulation of Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase Activity in Rat Brain Development. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 42447-42455.
- Rottenberg H & Wu S, 1998. Quantitative Assay by Flow Cytometry of the Mitochondrial Membrane Potential in Intact Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1404: 393-404.
- Sagar SM & Ferreiro DM, 1987. NADPH diaphorase activity in the posterior pituitary: relation to neuronal function. *Brain Research* 400: 348-352.
- Salvesen GS & Duckett CS, 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6: 401-10.
- Satta MA, Jacobs RA, Kaltsas GA & Grossman B, 1998. Endotoxin induces Interleukin-1 and nitric oxide synthase mRNA in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology* 67: 109-116.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T & Korsmeyer SJ, 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135-139.
- Sebastià J, Cristofol R, Martin M, Rodriguez-Farre E & Sanfeliu C, 2003. Evaluation of Fluorescent Dyes for Measuring Intracellular Glutathione Content in Primary Cultures of Human Neurons and Neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry Part A* 51A: 16-25.
- Sen CK, 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction *Current Topics in Cellular Regulation* 36: 1-30.
- Sharma S, Dewald O, Adroque J, Salazar RL, Razeghi P, Crapo JD, Bowler RP, Entman ML & Taegtmeier H, 2006. Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 2223-2231.
- Shen YH, Wang XL & Wilcken DE, 1998. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Letters* 433: 125-131.
- Shevde NK & Pike JW, 1996. Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. *Blood* 87: 2683-2692.

- Shi MM, Kulgelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ, 1994. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 26512-26517.
- Shimojo T, Hiroe M, Ishiyama S, Ito H, Nishikawa T & Marumo F, 1999. Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway. *Experimental Cell Research* 247: 38-47.
- Shirasawa N & Yoshimura F, 1982. Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohypophysial cells in different ages of rats. *Anatomy and Embriology* 165: 51-61.
- Simon HU, Haj-Yehia A & Levi-Schaffer F, 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Singh R, Pervin S & Chaudhuri G, 2002. Caspase-8-mediated BID cleavage and release of mitochondrial cytochrome c during Nomega-hydroxy-L-arginine-induced apoptosis in MDA-MB-468 cells. Antagonistic effects of L-ornithine. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37630-37636.
- Sobreira C, Davidson M, King MP & Miranda AF, 1996. Dihydrorhodamine 123 Identifies Impaired Mitochondrial Respiratory Chain Function in Cultured Cells Harboring Mitochondrial DNA Mutations. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 44: 571-579.
- Sokal RR & Rohlf FJ, 1995. *Biometry*, 3rd edition, WH Freeman, New York.
- Spady TJ, McComb RD & Shull JD, 1999. Estrogen action in the regulation of cell proliferation, cell survival, and tumorigenesis in the rat anterior pituitary gland. *Endocrine* 11: 217-233.
- Stamler JS & Meissner G, 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews* 81: 209-237.
- Stamler JS, Single D & Loscalzo J, 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Steipen H, Karasek E & Pawlikowski MH. 1987. Effect of adrenalectomy and hydrocortisone on DNA synthesis in the rat anterior pituitary. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 100: 1531-1536.
- Stennicke HR & Salvesen GS, 2000. Caspases - Controlling Intracellular Signals by Protease Zymogen Activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 299-306.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM. & Kroemer G, 1999. Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. *Nature* 397: 441-446.
- Suzuki YJ, Forman HJ & Sevanian A, 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free radical Biology and Medicine* 22: 269-285.

- Taimor G, Hofstaetter B & Piper HM, 2000. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovascular Research* 45: 588-594.
- Takahashi S, Okazaki K & Kawashima S, 1984. Mitotic activity of prolactin cells in pituitary gland of male and female rats at different ages. *Cell and Tissue Research* 235: 497-502.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P & Schubert D, 1998. The Regulation of Reactive Oxygen Species Production During Programmed Cell Death. *The Journal of Cell Biology* 141: 1423-1432.
- Tatoyan A & Giulivi C, 1998. Purification and Characterization of a Nitric-Oxide Synthase From Rat Liver Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 11044-11048.
- Tayeh MA & Marletta MA, 1989. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 19654-19658.
- Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez D & Aguilar E, 1996. Involvement of endogenous nitric oxide in the control of pituitary responsiveness to different elicitors of growth hormone release in prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 64: 146-152.
- Terkel J, Blake CA & Sawyer CH, 1972. Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91: 49-53.
- Theas S, Pisera D, Duvilanski B, De Laurentiis A, Pampillo M, Lasaga M & Seilicovich A, 2000. Estrogens modulate the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary cell proliferation and prolactin release. *Endocrine* 12: 249-255.
- Thippeswamy T, McKay JS, Morris R, Quinn J, Wong LF & Murphy D, 2005. Glial-mediated neuroprotection: evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glial communication in the peripheral nervous system. *Glia* 49: 197-210.
- Thompson EB, 1994. Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Endocrinology* 8: 665-673.
- Thornberry NA & Lazebnik Y, 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Townsend DM, Tew KD & Tapiero H, 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57: 145-155.
- Tsai MJ & Lee EH, 1998. Nitric oxide donors protect cultured rat astrocytes from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 705-713.
- Turnbull AV & Rivier C, 1997. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 215: 1-10.

- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R & Misra MK, 2004. Nitric oxide as a unique bioactive signalling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 4: 227-237.
- Valenti L, Mathieu J, Chancerelle Y, Levacher M, Chanaud B, De Sousa M, Strzalko S, Dinh-Xuan AT, Giroud JP & Florentin I, 2003. Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury by inducing cytostasis, apoptosis, and necrosis of activated T lymphocytes: role of the guanylate cyclase. *Cellular Immunology* 221: 50-63.
- van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X & Vandenabeele P, 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 487-497.
- van Nesselrooij JH, Szeverenyi NM, Ritter-Hrncirik C, Tillapaugh-Fay GM & Feron VJ, 1992. Rat pituitary changes observed with magnetic resonance imaging following removal of estrogen stimulus: correlation with histopathology and immunohistology. *Carcinogenesis* 13: 277-282.
- Van't Hof RJ & Ralston SH, 2003. Nitric oxide and bone. *Immunology* 103: 255-261.
- Vankelecom H, Matthys P & Denef C, 1997a. Involvement of nitric oxide in the interferon-gamma-induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology* 129: 157-167.
- Vaux DL & Korsmeyer SJ, 1999. Cell Death in Development. *Cell* 96: 245-254.
- Velardez MO, Benitez AH, Cabilla JP, Bodo CC & Duvilanski BH, 2003b. Nitric Oxide Decreases the Production of Inositol Phosphates Stimulated by Angiotensin II and Thyrotropin-Releasing Hormone in Anterior Pituitary Cells. *European Journal of Endocrinology* 148: 89-97.
- Velardez MO, De Laurentiis A, Díaz MC, Lasaga M, Pisera D, Seilicovich A & Duvilanski BH, 2000. Role of phosphodiesterase and protein kinase G on nitric oxide-induced inhibition of prolactin release from the rat anterior pituitary. *European Journal of Endocrinology* 143: 279-284
- Velardez MO, Díaz MC, Lasaga M, Franchi AM & Duvilanski BH, 2003a. Estrogen decreases the sensitivity of anterior pituitary to the inhibitory effect of nitric oxide on prolactin release. *Hormone Research* 60: 111-115.
- Velardez MO, Ogando D, Franchi AM & Duvilanski BH, 2001. Role of nitric oxide in the metabolism of arachidonic acid in the rat anterior pituitary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology* 172: 7-12.
- Velardez MO, Poliandri AH, Cabilla JP, Bodo CC, Machiavelli LI & Duvilanski BH, 2004. Long-term treatment of anterior pituitary cells with nitric oxide induces programmed cell death. *Endocrinology* 145: 2064-2070.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Vaux DL, 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.

- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H & Reutelingsperger C, 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal Immunological Methods* 184: 39-51.
- Vincent SR & Kimura H, 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-784.
- Voeikov VL, 2006. Reactive oxygen species--(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 12: 111-118.
- Volbracht C, Chua BT, Ng CP, Bahr BA, Hong W & Li P, 2005. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide, *Journal of Neurochemistry* 93: 1280-1292.
- Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J & Vasson MP, 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta* 331: 103-110.
- Wang S & El-Deiry WS, 2004. Cytochrome c: A crosstalk between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis. *Cancer Biology and Therapy* 3: 44-46.
- Weiming X, Liu L, Charles IG & Moncada S, 2004. Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signaling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nature Cell Biology* 6: 1129-1134.
- Wild AC, Gipp JJ & Mulcahy T, 1998. Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. *The Biochemical Journal* 332: 373-381.
- Wilson MR, 1998. Apoptotic signal transduction: emerging pathways. *Biochemistry and Cell Biology* 76: 573-82.
- Wink DA & Mitchell JB, 1998. Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 434-456.
- Wong ML, Rettori V, Al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Canteros G, McCann SM, Gold PW & Licinio J, 1996. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nature Medicine* 2: 581-584.
- Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR, 1980. Cell Death: the Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251-306.
- Xia Y & Krukoff TL, 2004. Estrogen induces nitric oxide production via activation of constitutive nitric oxide synthases in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 145: 4550-4557.

- Yago MD, Manas M, Ember Z & Singh J, 2001. Nitric oxide and the pancreas: morphological base and role in the control of the exocrine pancreatic secretion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 219: 107-120.
- Yin D, Tamaki N, Kokunai T, Yasuo K & Yonezawa K, 1999. Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationship to p53 and bcl-2 expression. *Journal of Clinical Neuroscience* 6: 326-331.
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T & Tohyama M, 2001. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 13935-13940.
- Yuan J & Yankner BA, 2000. Apoptosis in the Nervous System. *Nature* 407: 802-809.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J & Ahmad M, 2003. Molecular mechanisms of N-acetyl cysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 6-20.
- Zhao L & Ackerman SL, 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion Cell Biology* 18: 444-452.
- Zhou J & Brüne B, 2005. NO and transcriptional regulation: from signaling to death. *Toxicology* 208: 223-233
- Ziche M & Morbidelli L, 2000. Nitric oxide and angiogenesis. *Journal of Neurooncology* 50: 139-148.

APÉNDICE: Abreviaturas

AC-DEVD-pNA	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp- <i>p</i> -nitroanilide
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AG	Aminoguanidina hidroclicorada
AIF	Factor inductor de apoptosis
An	Anexina V-FITC
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina tri-fosfato
BAPTA	1,2bis-(2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético acetoximetil ester
bp	Pares de bases
GTP	Guanosina trifosfato
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CTE	Cadena de transporte de electrones
DABCO	1,4 diazabicyclooctane
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DCDCF-DA	5,6-dicarboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DETA/NO	DETA NONOato
DHR123	Dihidro rodamina 123
DiOC ₆	3,3-dihexiloxacarbocianina iodada
DMSO	Dimetil sulfóxido
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FBS	Suero fetal bovino
FBSad	Suero fetal bovino adsorbido con carbón-dextrán
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas (FSH, LH)
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Ioduro de propidio

LH	Hormona luteinizante
L-NAME	L-N ^o -Nitroarginina metil ester
MCB	Monoclorobimano
NAC	N-acetil-cisteína
NMMA	NG-Metil-L-arginina sal de acetato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Oxido nítrico
NOS(s):	Óxido nítrico sintasa(s)
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ • ⁻	Anión superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OVX	Ovariectomizadas
OVX-4d:	4 días de ovariectomía
OVX-7d	7 días de ovariectomía
OVX-14d:	14 días de ovariectomía
OVX-21d:	21 días de ovariectomía
PKG	Proteína kinasa G
PMM	Potencial de la membrana mitocondrial
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PRL	Prolactina
RE	Retículo endoplásmico
Redox	Óxido-reducción
ROS	Especies reactivas del oxígeno
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SOD	Superóxido dismutasa
TSH	Hormona estimulante de tiroides
Z-VAD-fmk	Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilketona