

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**MECANISMOS DE MUERTE CELULAR QUE PARTICIPAN EN LA
REGRESIÓN DE LOS PROLACTINOMAS**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Médica Claudia Mariela Palmeri

CÓRDOBA
REPUBLICA ARGENTINA

2010

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Directora:

Prof. Dra. Alicia Inés Torres

Integrantes:

Prof. Dra. Patricia Paglini de Oliva

Prof. Dr. Javier Zamudio

Artículo 30º del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía:

**“LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”**

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Una Tesis es un camino en el cual a cada paso se aprende a andar y *al andar se hace camino*. Ahora que he llegado al final de esta etapa quiero agradecer a todas las personas que han contribuido directa e indirectamente con este trabajo de Tesis Doctoral, a todos los maestros en los distintos aspectos de la vida, a cada persona que me acompañó y con quienes he compartido un tiempo de intenso aprendizaje.

Al Prof. Dr. Agustín Aoki, por abrirme las puertas del Centro de Microscopía Electrónica posibilitando la realización de este trabajo de Tesis.

A la Prof. Dra. Alicia Torres, por su impecable dirección en estos años, por sus agudas observaciones, por la paciencia, la confianza y el estímulo que fueron esenciales para crecer y afianzarme en esta etapa de mi carrera. Por su calidez y su afecto siempre presente desde los pequeños detalles.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento, Prof. Dra. Patricia Paglini y Prof. Dr. Javier Zamudio por brindarme su asesoramiento en el desarrollo de la Tesis y la corrección del manuscrito.

A la Prof. Dra. Cristina Maldonado por transmitirme sin reparos sus conocimientos en el área de la inmunohistoquímica. Por su comprensión y su cariño desde el primer momento. A la Prof. Dra. Elsa Orgnero por su vasta experiencia en la microscopía electrónica y la valiosa lectura de esta Tesis. Por las conversaciones sobre literatura, historia, cine, viajes y anécdotas que tanto aportaron a mi cultura general. A la Prof. Dra. Patricia Pons por su colaboración en todo momento, por su sensibilidad, su generosidad, su calidez, su cariño. Gracias por los colores.

A la Prof. Dra. Ana De Paul por su apoyo constante y sus inestimables consejos. Por los momentos compartidos, por las charlas de las siestas, por su cariño. A la Dra. Silvana Gutiérrez por sus oportunas observaciones, su buena predisposición y su afecto. Al Prof. Dr. Jorge Mukdsi, por guiarme desde mi primer día en el CME en el manejo de los animales, los procesamientos para microscopía fotónica, la inmunohistoquímica. Por su inestimable ayuda en todas las instancias de esta Tesis. Por su paciencia y su amistad. Al Dr. Juan Petiti por su curiosidad que le permitió abrir camino en el complejo campo de la transmisión de señales y porque supo orientarme entre las PKCs y las MAPKs. Por su colaboración y buen criterio, por su cordialidad y su amistad.

Al Dr. Amado Quintar por su ayuda desinteresada, por iniciarme en el uso del Photoshop y asistirme en cuanta dificultad informática se cruzó en el camino, por sus atinados consejos. Por los papers, papers y más papers... por las conversaciones serias y las no tanto. Por los momentos de edición y su amistad. Al Dr. Félix Roth por su creatividad y su sensibilidad, por sus valiosos consejos, por los días compartidos y su amistad. A la Lic. Gabriela Alvin por el trabajo codo a codo y su dedicación. Por la mano amiga a la hora de

las necesidades, por abrirme las puertas de su casa, por su valor. A la Dra. Andrea Passera por su hermosa amistad. A la Dra. Elisa Uribe Echevarría por su alegría y optimismo.

A mi compañera de recorridos Lic. Liliana Sosa, por cada jornada de trabajo, por asistirme en el uso de los equipos, por sus consejos, por su incondicionalidad. Por su amistad y los sueños compartidos. A mi amiga Lic. Carolina Leimgruber por su solidaridad, su empatía y su simpatía. A la Méd. Luciana García por su preciada amistad, su sensibilidad, sus ocurrencias, por las risas compartidas, la complicidad, la poesía. Por todos los abrazos. A las chicas nuevas del CME, Lic. Virginia Juárez, que recibe la posta de la muerte celular, la Lic. Eugenia Sabatino, y la Lic. Alicia Vaca, por la alegría de los momentos compartidos y la amistad.

A las excelentes técnicas, Mercedes Guevara, por el entrenamiento en el procesamiento de los materiales para microscopía electrónica y por sus cortes impecables, a Elena Pereyra por su inestimable ayuda y su enorme cariño, a Lucía Artino por su permanente predisposición, su colaboración y su aporte a la ciencia (ay! de los científicos sin glucosa!). Por despertar mi inquietud por la fotografía. Al Técnico Cristian Giacomelli, por su desinteresada ayuda y asistencia.

Al Ing. Gabriel Balabanian por la formación en el uso del Microscopio Electrónico. Al Ing. Roald Pitau por su constante asistencia técnica en el manejo del Microscopio. Al Ing. Néstor Boeto por solucionar siempre los inconvenientes técnicos.

A las queridas secretarias Irma Alegre y Natalia Luna, por su eficiencia, amabilidad y paciencia. Al Sr Primo Flores por su aptitud en la tarea contable. Al Sr. Luis Magni, por su asesoramiento informático. A la Sra. Griselda Gudiño por los mates nuestros de cada día. Al Sr. Oscar Correa por su asistencia en el manejo y cuidado de los animales.

A la Prof. Dra Ruth Fernández y el Prof. Dr. Julio Enders porque allá lejos y hace tiempo me iniciaron en la investigación básica. Por su cariño durante todos estos años.

A mis padres, por los ideales y altos valores con que nos educaron, por su permanente ejemplo de fortaleza, honradez y trabajo. Por su estímulo constante y su amor fundamental. A mis hermanos, Nicolás, Mariana, Maricel, Ailen, Nahuel y Federico Guiñazú, por compartir tantos años de estudio, por su permanente presencia, por su inmenso cariño. A mis abuelos y tíos por seguir con interés mis pasos y por hacerme sentir niña de vez en cuando. A mis sobrinas Malena y Josefina, por las morisquetas, las palabras a media, las sonrisas engrudadas, por la magia cristalina de sus carcajadas, por la alegría alborotada de los rincones de la casa.

A mis amigos Georgina Guissani, Silvana Puccini, Nahuel Pazos, Ignacio Piedrafita, Nicolás Gilio, Gastón del Río y Renata Porello, por estar siempre a pesar de las distancias, por los ánimos y los mimos, por las huídas, escapadas y afines, por los viajes que vendrán.

A mi estimado compañero Andreas Doll, por ayudarme a encontrar el camino de la felicidad y por elegirme para compartir su pasión por la ciencia.

Y me dijo una vez que si él se quedara solo,
si lo dejaran solo un mediodía en la llanura
él creía poder llegar a intuir el universo.

Y que posiblemente el enigma del universo había sido resuelto muchas veces
pero que no era comunicable en palabras,
porque las palabras presuponen
una memoria compartida.

J.L.Borges

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	IV
INTRODUCCIÓN	1
LA MUERTE CELULAR.....	1
Necrosis	4
Mecanismos de muerte celular programada	5
Tipo 1: Apoptosis	6
Tipo 2: Autofagia	9
Tipo 3: Degeneración citoplasmática no lisosomal.....	11
Necrosis programada o Necroptosis:.....	13
LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	16
PKCs.....	17
MAPKs.....	21
ERK1/2.....	22
JNK	23
p38.....	24
LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	26
NF-κB.....	26
TUMORES HIPOFISARIOS.....	29
PROLACTINOMAS	33
ROL DE LA MUERTE CELULAR EN LA REGRESIÓN DE LOS PROLACTINOMAS	39
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
MODELOS EXPERIMENTALES	43
ABORDAJE DE LOS OBJETIVOS: DIFERENTES TÉCNICAS UTILIZADAS ...	45
TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS.....	47
RESULTADOS	64
Evaluación del modelo proliferativo inducido mediante estrogenización	64
Análisis Ultraestructural de la glándula hipofisaria. Caracterización de la lesión proliferativa y de la muerte celular inducida por BC.....	69

Características bioquímicas de la Muerte Celular.....	74
Participación de las isoformas de PKC en la muerte celular inducida por BC.	78
Rol de p38	83
Rol de ERK1/2	89
Participación de NF- κ B.	92
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	122
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS EMPLEADOS	136
APÉNDICE.....	141

RESUMEN

RESUMEN

El prolactinoma es el tumor más frecuente de la hipófisis y causa una gran morbilidad debido a la hipersecreción hormonal de prolactina (PRL). El tratamiento de primera línea es la administración de Bromocriptina (BC), un agonista de los receptores dopaminérgicos que posee una efectividad de alrededor del 90%. En numerosos estudios clínicos se ha documentado que BC inhibe la transcripción, la síntesis y liberación de PRL y además, suprime la proliferación e induce la muerte celular provocando la involución de la masa tumoral. La apoptosis ha sido identificada como un mecanismo de muerte inducido por BC, pero su baja frecuencia no explica la reducción en el tamaño de los prolactinomas. Es por ello que el efecto citotóxico de la BC puede disparar otros mecanismos no apoptóticos en las células hipofisarias que serían los principales responsables de la involución del tumor.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se abordó el estudio de los mecanismos de muerte celular inducidos por BC para lo cual se estableció un modelo experimental de lesiones proliferativas adenohipofisarias, inducidas mediante la administración prolongada de estrógenos y que manifestaron altos niveles de PRL sérica. El posterior tratamiento de los tumores hipofisarios con BC indujo una marcada reducción de la masa tumoral y de los niveles séricos de PRL. A nivel ultraestructural evidenciamos un mecanismo de muerte celular no apoptótico que se caracterizó por una extensa vacuolización citoplasmática, un aumento en la electrodensidad celular y que representó el 25% del total de las células hipofisarias contadas. Además, los resultados obtenidos mediante ensayos bioquímicos tales como el análisis de la fragmentación del ADN, la activación de caspasa 3 y el clivaje selectivo de la PARP1 permitieron diferenciarlo de apoptosis y necrosis. Este mecanismo de muerte identificado como paraptosis, sería el principal responsable de la respuesta de las células adenohipofisarias al tratamiento con BC y mediría su efectividad terapéutica.

Las investigaciones en el área molecular de los procesos de muerte celular son relevantes para el conocimiento de los mismos, tanto en la fisiología como en la

comprensión de los mecanismos de resistencia a los tratamientos farmacológicos. Dentro de las vías de señalización involucradas en la muerte celular estudiamos la participación de Proteína quinasas C (PKC), las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre ellas p38 y ERK1/2 y NF- κ B y demostramos que la paraptosis se relacionó con un aumento en la activación clásica de NF- κ B siendo evidente su translocación nuclear. También pudimos establecer que la PKC δ y las MAPKs p38 y ERK1/2 participan activamente en este tipo de muerte celular inducida por la administración del agonista dopaminérgico.

Los resultados obtenidos aportan al conocimiento general de los diferentes procesos de muerte celular y permiten vislumbrar otras moléculas diana para el desarrollo de nuevos fármacos en los casos de resistencia a la BC, temáticas de gran interés en la actualidad. Futuras investigaciones sobre los mecanismos moleculares que participan en la paraptosis y la interdependencia con otras vías abrirán nuevos horizontes en la comprensión de los programas de muerte celular, sus roles en la fisiología y la potencial manipulación para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.

SUMMARY

SUMMARY

Prolactinomas are the most commonly occurring pituitary adenomas and they cause an important morbidity due to the hypersecretion of prolactin (PRL). Bromocriptine (BC), a dopaminergic receptor agonist, is the “gold standard” treatment of these pathologies with almost 90% effectiveness. BC inhibits PRL gene transcription, PRL synthesis and release, suppresses cellular proliferation, and induces cell death. Although apoptosis has been identified in BC treatments, its rare occurrence does not explain the significant pituitary tumoral mass regression. It is relevant that the cytotoxic effect of BC could trigger non apoptotic mechanisms of cell death in the pituitary cells and therefore be responsible for the tumor involution.

The current work was focused on the study of different cell death mechanisms induced by BC. In this way we developed an experimental model of pituitary proliferation induced by prolonged estrogen administration that manifested high serum PRL levels. The BC treatment induced a significant reduction of the tumoral size and serum PRL levels. At the ultrastructural level we observed an alternative cell death mechanism characterized by extensive cytoplasmic vacuolization with an increased cell electron density. This cell death type constituted around 25% of the total pituitary cells. Furthermore, the results obtained from biochemical assays as analysis of DNA fragmentation, caspase 3 activation and selective cleavage of PARP1 did not fit the regular criteria for apoptosis or necrosis. We postulate that the most frequent death mechanism observed in our experimental conditions corresponds to paraptosis and is the main responsible of tumor shrinkage induced by BC.

The study of other mechanisms of cell death at molecular level is essential to understand their implication in the maintenance of physiological and pathological pituitary homeostasis and the appearance of resistance to pharmacological treatments. We also investigated the participation of protein kinase C (PKC), mitogen activated protein kinases (MAPK) as p38 and ERK1/2, and the activation of NF- κ B pathways in the cell death induced by BC. An important observation was the significant increase in phosphorylated forms of these MAPKs, the holoenzyme and catalytic fragments of PKC δ in nuclear fraction, and the classical activation of NF- κ B pathway after BC

administration compared to control and estrogen treated rats. Furthermore, the immunolocalization at ultrastructural level of these kinases showed a similar distribution pattern, with a prevalent localization at nuclear level in lactotrophs from BC treated rats.

In summary, these results contribute to the general knowledge of the different cell death induced in response to BC treatment. Further investigations into the molecular mechanisms of non apoptotic processes should yield fresh insights into their roles in cell death and their potential manipulation by new antitumoral drugs.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LA MUERTE CELULAR

La muerte celular es un aspecto esencial en la fisiopatología de los organismos multicelulares. Durante el desarrollo embriológico, las células que se encuentran en exceso deben ser eliminadas selectivamente a fin de formar las extremidades y completar la organogénesis [1]. A lo largo de toda la vida este proceso de muerte celular continúa en la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo y está perfectamente balanceado por la aparición de nuevas células manteniendo la homeostasis tisular [2, 3]. Además, constituye un mecanismo de defensa mediante el cual las células alteradas, potencialmente peligrosas, son eliminadas. Las alteraciones que produzcan un exceso de la muerte celular, así como las fallas en la inducción de la misma, están estrechamente relacionadas con diferentes patologías. El exceso de la muerte celular se vincula con enfermedades neurodegenerativas como la de Parkinson o de Alzheimer, enfermedades inflamatorias y el infarto agudo de miocardio [4]. La disminución de la muerte celular, en cambio, sumada a un aumento en la proliferación se observa en enfermedades autoinmunes y en el cáncer [5]. El estudio actual de la muerte celular tiene como principal objetivo la caracterización de los distintos mecanismos y su utilización como posibles blancos terapéuticos, pudiendo inhibir la muerte celular en las patologías en donde está exacerbada, e inducirla en aquellas enfermedades donde las células la evaden [6].

PERSPECTIVA HISTÓRICA

La muerte celular fue reportada por primera vez en 1842 por Vogt [6] y en 1858 definida por Virchow como un proceso de *degeneración, debilitamiento y necrosis* [7]. A partir de entonces, la muerte celular fue un evento esencial en el estudio de la biología de la célula y si bien se observaba en situaciones patológicas, también era fundamental en la embriología y la fisiología de los organismos multicelulares [8, 9].

Distintas investigaciones experimentales realizadas en la década de los setenta permitieron reconocer la existencia de dos mecanismos muy diferentes de muerte celular, en cuanto a sus características morfológicas, bioquímicas e incidencias: *apoptosis* y *necrosis*. La *apoptosis* se describió como un proceso programado de auto-

desmantelamiento celular que evita la inflamación y que juega el rol opuesto a la mitosis en la regulación de la homeostasis tisular. La *necrosis*, por el contrario, se caracterizó como un proceso pasivo que resulta en la disrupción de la estructura y función celular, luego de un daño irreversible y que culmina con la liberación incontrolada del contenido citoplasmático hacia el espacio extracelular, con el consiguiente estímulo inflamatorio (figura 1) [10].

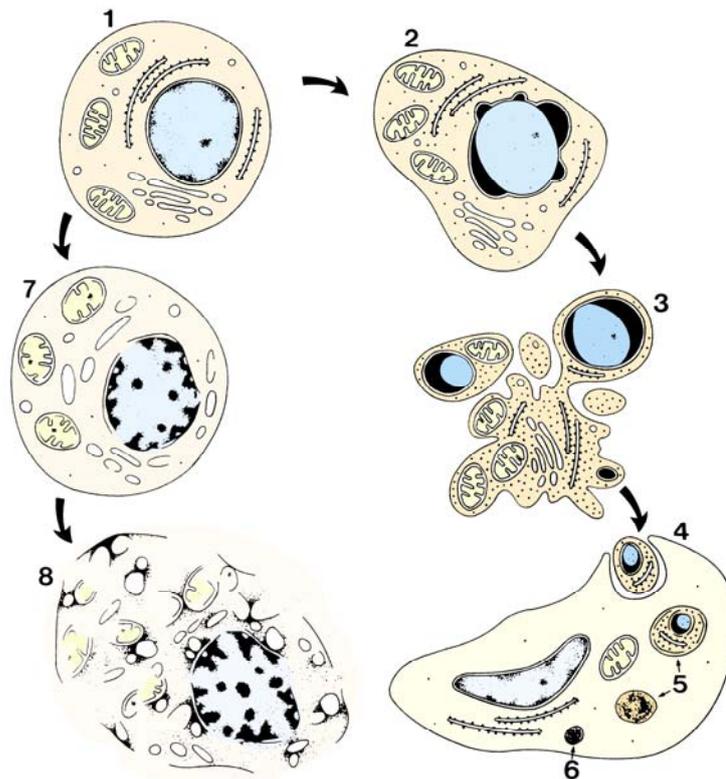


Fig. 1: Esquema que muestra los cambios ultraestructurales en la apoptosis (2-6) y necrosis (7-8). Una célula normal está representada en el dibujo 1. La apoptosis temprana se caracteriza por la acumulación de cromatina y la contracción celular (2). Luego el núcleo y la célula se fragmentan (3) en cuerpos apoptóticos que son luego fagocitados (4) y degradados en los lisosomas (5), hasta la reducción total en residuos irreconocibles (6). En la necrosis (7) ocurre disrupción de las mitocondria, más tarde las organelas y membranas se desintegran (8) [11].

A pesar de la apreciación dicotómica de la muerte celular en apoptosis y necrosis, en los últimos años surgieron evidencias de otros tipos de muerte celular, los cuales acontecen en condiciones fisiológicas y patológicas y que fueron denominados como *autofagia*, *paraptosis*, *necroptosis*, etc [8, 12-16]. Los eventos moleculares y genéticos que participan en estos mecanismos son objeto de numerosas investigaciones en la actualidad.

LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a diferentes criterios [17]:

- El *aspecto funcional*: si es una muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica.
- Su *apariencia morfológica*: necrosis, apoptosis, autofagia, paraptosis, o estar asociadas con la mitosis.
- El *criterio enzimológico*: es decir, la participación de nucleasas, distintas clases de proteasas, calpainas, catepsinas y transglutaminasas.
- Sus *características inmunológicas*: en inmunogénicas o no inmunogénicas.

Tomando en cuenta el rol fisio-patológico, la muerte accidental conocida clásicamente como necrosis, es un proceso que se observa en condiciones patológicas cuando la intensidad de la noxa induce una lesión tan grave que excede la capacidad de adaptación de la célula. Con el concepto de muerte celular programada (MCP) se agrupan distintas modalidades morfológicas que se caracterizan porque las células juegan un rol activo en su propio deceso y mueren de forma discreta siendo rápidamente eliminadas [8, 18]. A su vez, los distintos tipos de MCP se clasifican de acuerdo al compartimiento celular donde se observan las primeras alteraciones en: Tipo 1, nuclear o apoptosis, Tipo 2 o autofagia, Tipo 3, degeneración citoplasmática no lisosomal [1]. En la figura 2 se resume en un diagrama la clasificación de muerte celular anteriormente mencionada y se reúnen los tipos morfológicos más conocidos y aceptados en las revisiones bibliográficas actuales [6, 14, 17].

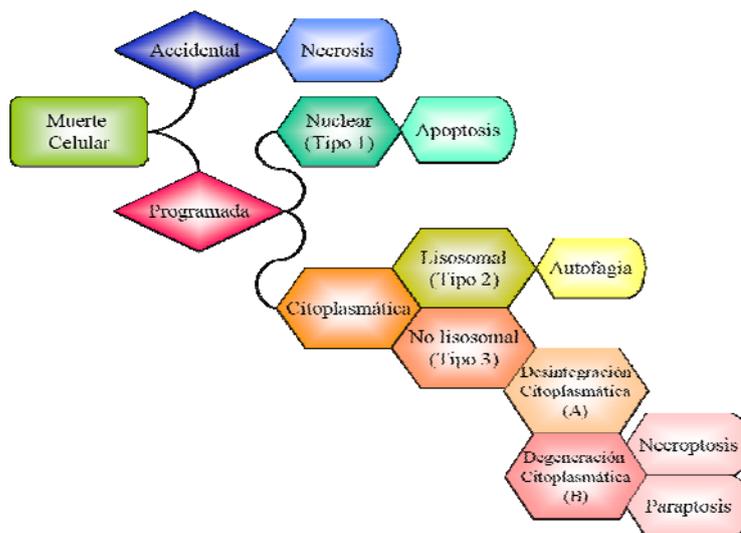


Fig. 2: Esquema basado en la clasificación de los distintos mecanismos de muerte celular teniendo en cuenta los aportes de revisiones recientes [1, 2, 3].

Mecanismos de muerte celular accidental

Necrosis

Esta forma de muerte celular acontece ante agentes nocivos o tratamientos muy severos y no requiere energía. Afecta a grupos de células contiguas y en los tejidos adyacentes viables se desarrolla usualmente una reacción inflamatoria en respuesta a la liberación del contenido intracelular [19].

La lesión de la membrana plasmática es un factor central en la patogenia de la necrosis y se produce en las etapas iniciales de la lesión irreversible. Las células se evidencian aumentadas de tamaño u *oncóticas*, al alterarse las bombas iónicas que mantienen la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, con el consiguiente ingreso de moléculas extracelulares, entre ellas el Ca^{2+} , que es un importante mediador de las alteraciones bioquímicas [20].

En etapas más avanzadas se observa la *picnosis* nuclear, la dilatación del retículo endoplasmático rugoso (RER) con disgregación de los polisomas, la disrupción de las crestas mitocondriales lo que impide la fosforilación oxidativa y la ruptura de lisosomas con liberación de hidrolasas que degradan proteínas, ARN y ADN [19]. El ADN nuclear que es degradado inespecíficamente puede ser observado como una banda continua o “chorreado” (smear) cuando se lo analiza en una electroforesis en gel de agarosa [21]. Aunque en la necrosis hay una marcada alteración de la mayoría de las organelas citoplasmáticas, el núcleo permanece relativamente intacto y la condensación es granulada y mal definida (Fig. 3). El evento final de la necrosis es la ruptura de la membrana celular [11, 20].

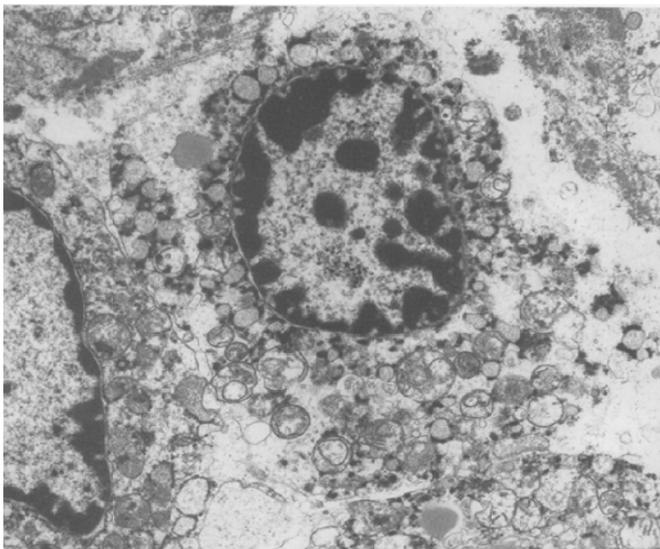


Fig. 3. Micrografía electrónica donde puede observarse necrosis confluyente debida a isquemia. Se evidencian grumos de cromatina con bordes poco definidos. Las organelas citoplasmáticas se encuentran severamente dilatadas y extensa ruptura de la membrana plasmática [22].

Mecanismos de muerte celular programada

Los mecanismos de MCP son fundamentales para el desarrollo y el mantenimiento de los organismos multicelulares. A partir de investigaciones realizadas en el campo de la biología del desarrollo se establecieron distintos tipos morfológicos de muerte celular [1, 9]

El primero en ser caracterizado fue la *apoptosis* (MCP tipo 1), considerándose como un mecanismo de suicidio celular, en el cual la célula que muere se fragmenta en pequeños cuerpos que son destruidos por el sistema lisosomal de las células vecinas. Posteriormente, la MCP tipo 2, también conocida como *autofagia*, presenta extensa degradación llevada a cabo por el propio sistema lisosomal que culmina en la muerte. Finalmente, la MCP tipo 3 fue descrita como una degeneración no lisosomal dentro de la cual, algunos autores han diferenciado la *oncosis* [23, 24], *paraptosis* [12, 25, 26] y *necrosis programada o necroptosis* [2, 15, 17]. Las diferencias en su morfología quedan reflejadas a grandes rasgos en la figura 4.

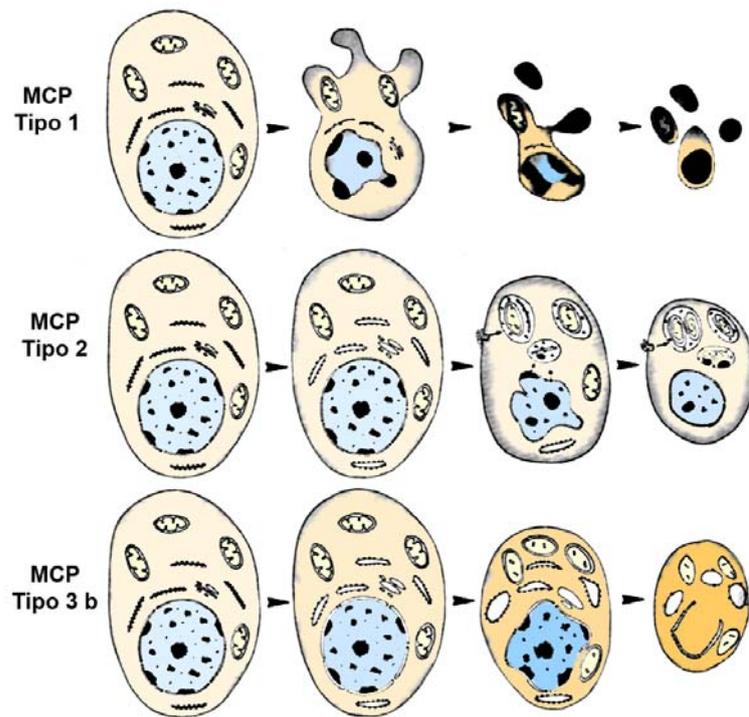


Fig. 4: Representación esquemática de los tres tipos principales de MCP donde se enfatizan las características más documentadas y constantes de cada tipo de muerte celular. Tipo 1 corresponde a la apoptosis, tipo 2 a la autofagia y tipo 3 B a la degeneración citoplasmática [1].

Tipo 1: Apoptosis

En contraste con la necrosis, la apoptosis representa un proceso más sutil y organizado, que afecta a células individuales más que a grupos celulares [27]. Este mecanismo de MCP es el más estudiado y mejor caracterizado tanto a nivel morfológico como molecular.

A nivel morfológico la cromatina se agrega en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien delimitadas (*picnosis*). La célula se encoge (*shrinkage*), el citoplasma se condensa y hay protrusión de la membrana plasmática y del contenido citoplasmático en forma de ampollas (*blebbing*). Posteriormente, el núcleo se divide en fragmentos rodeados por envoltura nuclear (*cariorexis*). Durante las etapas finales de la apoptosis, la célula se fragmenta dando origen a cuerpos rodeados de una membrana simple, que contienen organelas intactas y fragmentos citoplasmáticos [28] (figura 5A). Estos cuerpos apoptóticos son finalmente fagocitados por las células vecinas o por los macrófagos [29] (figura 5B). A nivel molecular el ADN es degradado por una endonucleasa, la deoxirribonucleasa dependiente de caspasa o (CAD), en pequeños fragmentos que pueden ser evidenciados al someterlos a electroforesis en gel de agarosa. La imagen típica es la disposición en “escalera” por los distintos pesos moleculares de los fragmentos que son múltiplos de 180 pares de bases (pb) [20, 28, 30]. Sin embargo, en algunos casos de apoptosis, no ocurre esta degradación indicando que éste no es un componente esencial de la apoptosis.

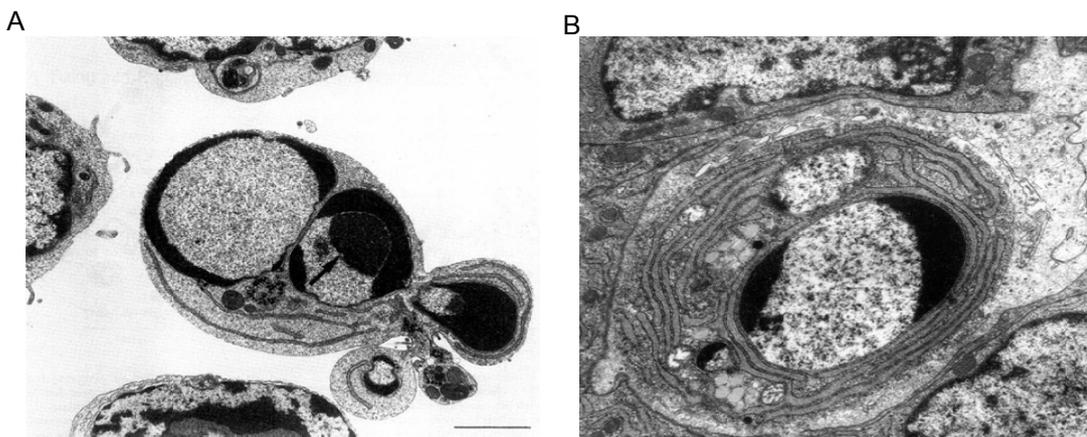


Fig. 5 Micrografías electrónicas de células que presentan ultraestructura característica de la apoptosis. En la imagen A se puede observar una célula con la cromatina condensada en formaciones de bordes bien definidos y el núcleo dividido. Se evidencian también fragmentación del citoplasma y formación de los cuerpos apoptóticos. Un cuerpo apoptótico dentro del citoplasma de otra célula puede verse en la figura B. Es remarcable la perfecta conservación de las organelas incluso en esta etapa [22].

El paradigma primordial de la apoptosis fue elucidado por estudios genéticos en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [31-33] que demostraron que al menos 10 genes **ced** (*C.elegans death*) estaban involucrados en el proceso de muerte y eran fundamentales para que la misma aconteciese. Los genes *ced-3* y *ced-4* inducen la apoptosis, mientras que *ced-9* la inhibe. Las proteínas codificadas por estos genes son homólogas a una proteasa de cisteína presente en los vertebrados, la enzima convertidora de la interleukina 1 β o *ICE* (*interleukin conversor enzyme*) [34]. Subsecuentemente, se detectaron varias proteasas relacionadas a ICE y se designaron con el término **caspasas**. Todas las células contienen *caspasas* las cuales están presentes como proteínas precursoras inactivas denominadas *pro-caspasas*. Dentro de esta familia de enzimas se conocen distintos grupos: *caspasas iniciadoras* (como las caspasas 8, 9 y 12) que son activadas por oligomerización y éstas activan a su vez, las formas precursoras de las *caspasas efectoras* (caspasas 3, 6 y 7) [15, 35]. Las *caspasas efectoras* actúan sobre sustratos celulares específicos, resultando de ello la tan conocida constelación de cambios morfológicos y bioquímicos que están asociados al fenotipo apoptótico.

No es sorprendente que la iniciación de la apoptosis esté cuidadosamente regulada. Son muchas las señales externas e internas que influyen en la decisión de vida o muerte; a su vez, la misma señal puede tener efectos opuestos en las diferentes poblaciones celulares. Se han descrito tres vías a través de las cuales se dispara la activación de las caspasas que son esquematizadas en la figura 6 [15, 18, 31, 36]

- **A través de receptores de muerte:** también conocida como *vía extrínseca*, se caracteriza porque la unión de ligandos como el factor de necrosis tumoral (TNF) y Fas ligando (*FASL*) a distintos receptores presentes en la superficie celular induce la formación de un complejo de muerte celular *DISC* (*death-induced signalling complex*). *DISC* a su vez, recluta la *caspasa 8* y promueve la activación de la cascada de las caspasas hasta la ejecución de la apoptosis [37, 38].

- **Mecanismos mitocondriales:** clásicamente conocida como *vía intrínseca*, es desencadenada por estrés intracelular o extracelular, como la hipoxia, la falta de factores de crecimiento, el daño en el ADN o la inducción de oncogenes. Las señales traducidas en respuesta a estos estímulos, convergen hacia la mitocondria donde resultan en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, liberando *citocromo c* y otras moléculas pro-apoptóticas, que forman un complejo denominado *apoptosoma*,

constituido por *citocromo c*, *APAF1* y *caspsa 9*. Esto repercute en la activación de la cascada de caspasas. La apoptosis a este nivel está estrechamente regulada por la familia de proteínas *Bcl-2*, entre la que se describen proteínas pro-apoptóticas (*bak* y *bax*) y anti-apoptóticas (*bcl-2*, *bcl-Xl* y *mcl-1*). Una vez que el *citocromo c* es liberado, la activación de las caspasas es irreversible [18, 36, 39].

- **Mecanismos mediados por el retículo endoplasmático:** los agentes que provocan estrés en el RE, como la acumulación de proteínas no plegadas, la desregulación del Ca^{2+} o infecciones virales resultan en la activación de la *caspsa 12*, y esto desencadena la activación de la cascada de caspasas [36, 40].

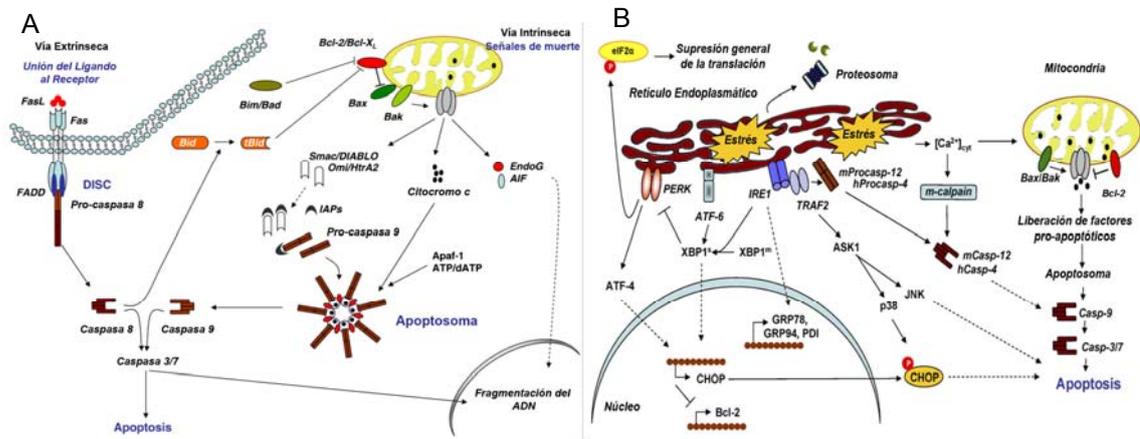


Fig. 6: Vías de señalización que disparan la apoptosis: A) Vía Extrínseca: La unión de ligandos multiméricos a los receptores de muerte reclutan moléculas adaptadoras que involucran la activación de caspasa 8. Vía Intrínseca: Cuando la mitocondria recibe las señales adecuadas, se libera citocromo c y otras moléculas hacia el citosol. Citocromo c junto con APAF1 y ATP activa la caspasa 9. B) Alteraciones en la homeostasis del calcio y la acumulación de proteínas provocan un estrés en el RE que resulta en la activación de la caspasa 12. Las flechas continuas representan las vías conocidas en la actualidad, y las flechas discontinuas denotan posibles interacciones[36].

Apoptosis independiente de caspasa

Como se mencionó anteriormente, las caspasas median la activación de sustratos específicos que explican la mayoría de los rasgos característicos de apoptosis: por ejemplo, el clivaje del inhibidor de la ADNasa activada por caspasa (*ICAD*) conduce a cambios en la cromatina, la proteólisis de las *laminas* llevan al achicamiento nuclear, la degradación de proteínas del citoesqueleto producen la reorganización citoplasmática, y el clivaje de *p21* o *Rho* llevan a la formación de las típicas lobulaciones.

Sin embargo, la apoptosis también puede ser desencadenada por otras proteínas mitocondriales. La *endonucleasa G* y el factor inductor de apoptosis (*AIF*) pueden inducir esta muerte celular independientemente de la activación de las caspasas. Otras proteasas, como *catepsinas*, *calpaínas*, *proteasas de serina* y el complejo del *proteosoma* pueden clivar algunos sustratos clásicamente específicos para las caspasas, indicando que pueden imitar su efecto celular [18, 41, 42].

Tipo 2: Autofagia

Una forma de muerte celular no apoptótica, no necrótica, está asociada con un proceso conocido como autofagia. En células normales, las proteínas alteradas o aquellas que son necesarias se degradan por dos mecanismos independientes. Uno es la proteólisis mediada por *ubiquitina* que acontece en los proteosomas y otro mecanismo es la *autofagia*, que se realiza a través de la vía lisosomal [8].

La autofagia es un proceso catabólico intracelular evolutivamente conservado que opera bajo condiciones normales, encargándose de la degradación de componentes citoplasmáticos, agregados de proteínas, y organelas intracelulares envejecidas a través de la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas [15, 43]. En condiciones de privación de nutrientes, la autofagia promueve la supervivencia celular degradando contenido celular prescindible, para la obtención de energía, favoreciendo la síntesis de proteínas y reduciendo al mínimo sus demandas nutricionales [3].

Los primeros cambios ultraestructurales detectables son el incremento de los lisosomas, la erosión del RER y una sustancial caída de la síntesis proteica [44]. Los cambios citoplasmáticos son numerosos, mientras que el núcleo es semejante al normal. Durante este período la respiración celular y el contenido de ATP son normales como podría esperarse ya que la célula no tiene alteración de la permeabilidad de sus membranas. Aunque la morfología ultraestructural de la autofagia fue descrita por primera vez en mamíferos, el control de este mecanismo a través de los genes relacionados a la autofagia *ATG* (*autophagy related genes*) fue estudiado en las levaduras y está altamente conservado en los humanos (BOX 2). Se han reportado 16 genes que participan en la autofagia de las levaduras. Luego de la inducción de la autofagia, las vesículas autofágicas o autofagosomas, se forman a través del

ensamblamiento y la expansión de estructuras delimitadas por una doble membrana de origen desconocido [15] (figura 7). Hay teorías de que en mamíferos, estas membranas son aportadas por el RER que se degranula y rodea porciones de citoplasma u organelas fusionándose por sus extremos y queda así delimitada una estructura de doble membrana. Posteriormente, los autofagosomas se unen con los lisosomas y son degradados por las hidrolasas lisosomales.

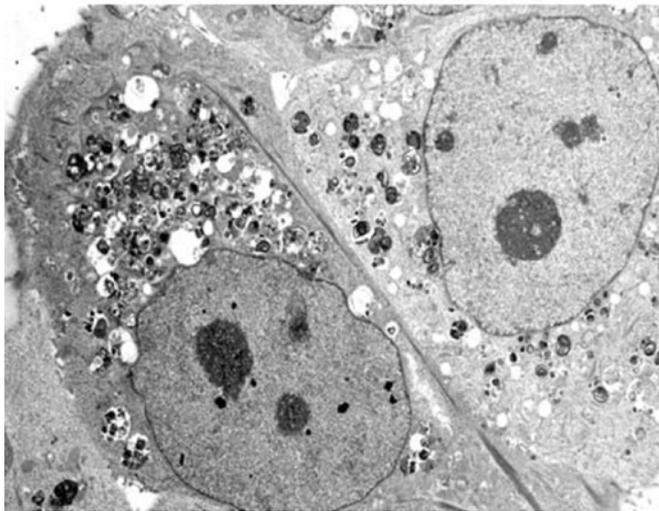


Fig. 7. Ultraestructura de dos células autofágicas. En el citoplasma se destacan numerosas vacuolas con contenido heterogéneo. Es de destacar el incremento en la electrodensidad en la célula donde el proceso está más avanzado.

A nivel molecular (figura 8), las vías de señalización que conducen a la autofagia involucran la actividad de la Fosfatidilinositol-3-quinasa (*PI3K*) que representa un homólogo del *Atg6* (también conocida como *Beclina-1*) y de la quinasa diana de la rapamicina (*TOR*). La actividad de la *PI3K clase III* es particularmente importante en las etapas tempranas de la formación de las vacuolas autofágicas e interactúa con *bcl-2*, convergiendo así los mecanismos de muerte apoptóticos y no apoptóticos. Por el contrario, *TOR* regula negativamente la formación y expansión de los autofagosomas. De esta forma, la inhibición de *TOR* por la rapamicina bloquea la progresión del ciclo celular y desencadena la autofagia [45].

La autofagia también puede contribuir a la muerte celular inducida por las infecciones virales. El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH 1) induce la acumulación de *Beclina 1* y la muerte celular de células T CD4 por la interacción de proteínas de la envoltura nuclear con el receptor de quemoquinas CXCR4.

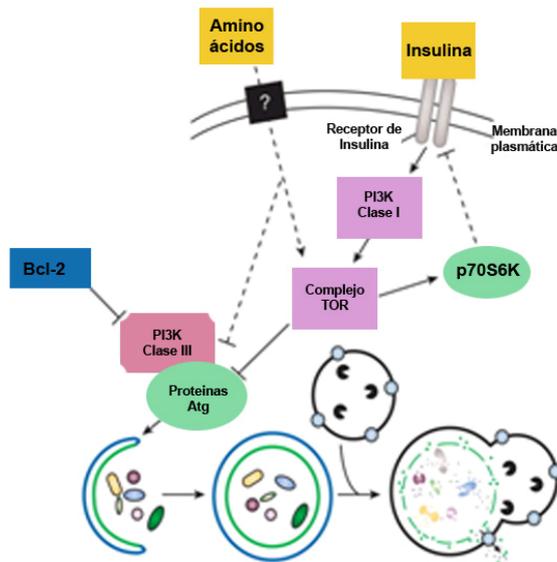


Fig. 8: La autofagia puede ser inducida en respuesta a señales medioambientales, que incluyen nutrientes, hormonas y patógenos. La vía regulatoria mejor caracterizada incluye PI3K clase III y TOR. TOR actúa inhibiendo la autofagia a través de mecanismos desconocidos. PI3K clase III es necesaria para la activación de la autofagia [46].

Aunque los componentes de la maquinaria autofágica están altamente conservados en un amplio rango de organismos, el rol fisiológico de este proceso, varía de una especie a otra. Hay evidencias que indican que la degradación lisosomal es necesaria para el remodelado celular debido a la diferenciación, el estrés o el daño producido por la exposición a citotoxinas. Otros reportes recientes indican que la desregulación de la autofagia puede resultar en un estado patológico como las enfermedades neurodegenerativas, cardiomiopatías, miopatías, enfermedades infecciosas y cáncer [46, 47]

Tipo 3: Degeneración citoplasmática no lisosomal

Tipo 3A: Desintegración no lisosomal

Este mecanismo de muerte celular fue descrito únicamente durante el desarrollo embrionario en células mesenquimales aisladas y en regiones vacuoladas del cartílago durante la mineralización [48]. Se caracteriza por el hinchamiento de organelas intracelulares, seguido de la formación de espacios vacíos en el citoplasma que se fusionan entre ellos y se conectan con el espacio extracelular. La célula se destruye mediante su desintegración en pequeños pedazos y éstos a su vez, son cada vez más pequeños hasta su desaparición. Parecería que los lisosomas de la propia célula no están involucrados y no se detecta fagocitosis en las células vecinas [1].

Tipo 3B: Degeneración citoplasmática, paraptosis o paraptosis

Este mecanismo de muerte celular se caracteriza morfológicamente por presentar organelas dilatadas y citoplasma vacuolado, también es notable la conservación del núcleo que no se desintegra y que se vuelve picnótico en etapas tardías. Inicialmente la alteración que desencadena este tipo de muerte celular es la intensa dilatación del RER y el abalonamiento mitocondrial [49], pero se distingue de la autofagia por la ausencia de vacuolas autofágicas (figura 9). A diferencia de la necrosis accidental o la apoptosis, los ribosomas permanecen adheridos a las cisternas dilatadas y no hay dispersión de polisomas ni ribosomas libres. La envoltura nuclear y el complejo de Golgi, también pueden observarse dilatados [50]. Este tipo de muerte celular no presenta una detectable condensación del núcleo y la cariólisis es tardía. Tampoco ocurre la fragmentación de la célula [28].

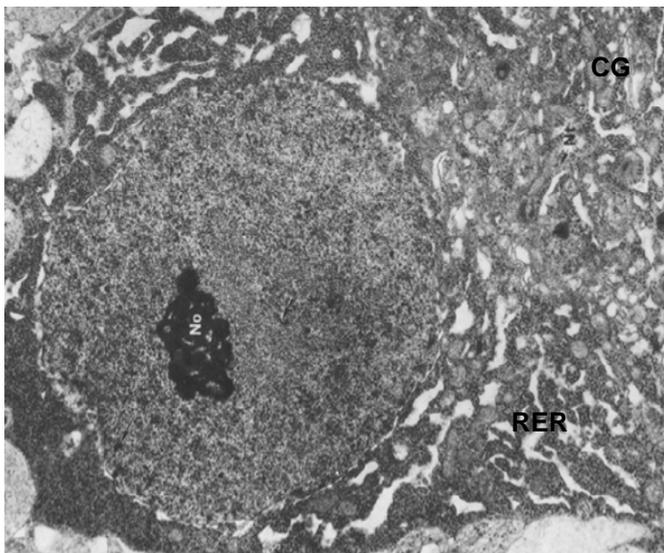


Fig. 9. Degeneración citoplasmática no lisosomal. Célula que presenta una marcada condensación nuclear (N) y citoplasmática. Hay intensa dilatación del RER, del complejo de Golgi (CG) y de la envoltura nuclear. Los polirribosomas aún tienen la típica distribución en rosetas. En el núcleo se observa el aspecto granular de la cromatina[1].

El término *paraptosis* [del griego *παρα* o *παρ* (para) usado para designar algo diferente o relacionado y *αποπτωση* (apoptosis) que significa deterioro] fue originalmente introducido para describir una forma de muerte celular programada que no cumplía con los criterios morfológicos y bioquímicos de apoptosis ni necrosis [51, 52]. Posteriormente, otros grupos de investigación pudieron vincular este mecanismo de muerte celular con el descrito por Clarke como MCP tipo 3B y la denominaron *paraptosis* [16, 25, 26] (figura 10). Las alteraciones observadas en la paraptosis no pueden ser prevenidas mediante el uso de inhibidores de caspasa, ni por la sobre expresión de proteínas antimitóticas como bcl-2. Al parecer, la cascada de señalización

específica, en distintas líneas celulares (células 293T y Hepa1c1c7) involucra miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [17].

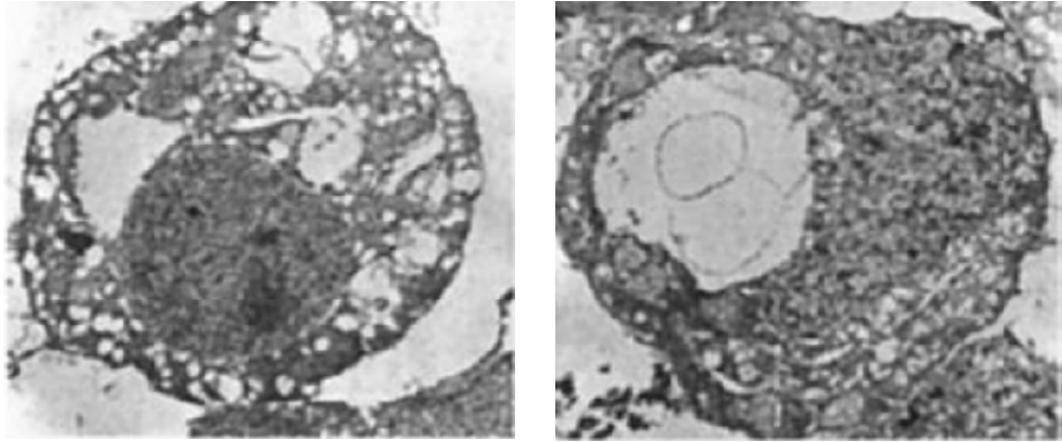


Fig. 10. Células paraptóticas con extensa vacuolización citoplasmática en ausencia de fragmentación nuclear, condensación de cromatina, segmentación celular o formación de cuerpos apoptóticos [26].

Necrosis programada o Necroptosis:

Por mucho tiempo la necrosis fue considerada como un tipo de muerte celular accidental y descontrolado, pero en la actualidad hay nuevas evidencias de que la necrosis puede ser también un mecanismo estrechamente regulado [17]. Por ejemplo, se han reportado distintos receptores de muerte celular (TNFR 1, Fas/CD95 y TRAIL-R) y receptores Toll-Like (TLR 3 y TLR 4) en la inducción de la necrosis en presencia de los inhibidores de caspasa. Aunque no hay un consenso generalizado en el uso del término *necroptosis*, algunos autores lo han propuesto para diferenciarlo de la necrosis accidental.

A nivel bioquímico, este tipo de muerte celular puede ser evitada inhibiendo la quinasa *RIP1* que está relacionada a receptores Toll-Like. Este proceso también presenta alteraciones mitocondriales, cambios lisosomales, cambios nucleares (híper activación de PARP 1), degradación lipídica, aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico y activación de proteasas no caspasas. Sin embargo, aún no se ha encontrado un marcador bioquímico de la muerte celular por necroptosis y este mecanismo se identifica por diagnóstico negativo de apoptosis y autofagia [2, 3, 17].

Mecanismos de Muerte Celular Atípicos

Como puede observarse, la clasificación de los distintos mecanismos de muerte celular es compleja y está en constante revisión. Además de los tipos morfológicos y bioquímicos descritos se han reportado otros procesos que culminan con la eliminación celular en órganos específicos.

- **Catástrofe Mitótica:** es una forma de muerte celular que ocurre luego de una mitosis desregulada o con fallas. Sus alteraciones morfológicas incluyen la *micronucleación* (cromosomas o fragmentos de cromosomas que no han sido distribuidos a los núcleos de las células hijas) y la *multinucleación* (presencia de dos o más núcleos derivados de una separación deficiente durante la citocinesis). La catástrofe mitótica puede conducir a la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis [53].

- **Anoikis:** se denomina de esta forma a la apoptosis inducida por la pérdida de la unión al sustrato o a otras células [54]. Además de su forma de inducción específica, los mecanismos moleculares asociados con este tipo de muerte celular coinciden con los descritos en la apoptosis clásica. Sin embargo, se han descrito anoikis refractarias a los inhibidores de las caspasas [17].

- **Exitotoxicidad:** esta forma de muerte celular ocurre en neuronas desafiadas con aminoácidos excitadores como el glutamato. Esto conduce a la apertura del canal permeable al Ca^{+2} N-metil-D-aspartato, seguido de sobrecarga citosólica de Ca^{+2} con la consiguiente activación de las vías de señalización de la muerte celular [55].

- **Piroptosis:** este mecanismo fue descrito en macrófagos infectados con bacterias del género *Salmonella*, y posteriormente también se lo asoció con otros microorganismos [56]. Involucra la activación atípica de la *caspa* 1, pero no de la caspa 3 ni 7 [24]. Los macrófagos que presentan este mecanismo de muerte celular, exhiben características morfológicas típicas de apoptosis y necrosis [57].

- **Entosis:** también conocida como “canibalismo celular” se caracteriza porque una célula fagocita a una célula vecina que aún está con vida, la que muere dentro del fagosoma y desaparece por la degradación lisosomal [58]. Las células internalizadas parecen normales. Curiosamente, las células más eficientes en la ejecución de la entosis son las células del cáncer de mama MCF7, las cuales no tienen ni caspa 3 ni beclina 1 y por lo tanto, son relativamente incompetentes en la apoptosis y en la autofagia señalando la posibilidad de que la entosis sea una vía por defecto [59].

Características diferenciales de los principales mecanismos de muerte celular.

En el siguiente cuadro se resumen las principales características de los mecanismos de muerte celular mejor estudiados.

Tipo de Muerte Celular	Cambios Morfológicos			Características Bioquímicas	Métodos de Detección
	Núcleo	Membrana celular	Citoplasma		
Apoptosis	Condensación de cromatina Fragmentación nuclear Degradación intranucleosomal del ADN	Exteriorización de fosfatidil serina Gemación	Fragmentación Cuerpos apoptóticos	Activación de caspasas	Microsc. Electrón. TUNEL Annexina V Ensayos de fragm. ADN Cambios en pot de membr. Mitocondrial Clicaje de la PARP a los 89 kDa.
Autofagia	Condensación parcial de la cromatina NO hay degr.del ADN	Preservada	Aumento en el nº de vacuolas autofágicas con contenido en digestión	Independiente de caspasas Aumento de activ. lisosomal	Microsc. Electrón. Ensayos de degradación proteica Detecc. LC3
Paraptosis	Condensación parcial de cromatina NO hay degr. Del ADN	Preservada	Intensa vacuolización no lisosomal Abalonamiento mitocondrial	Independiente de caspasas	Microsc. Electrón.
Necrosis	Aglutinamiento de la cromatina Degradación inespecífica del ADN	Turgencia, abalonamiento y ruptura	Abalonamiento de organelas Ruptura		Microsc. Electrón. Detección de inflamación. Clivaje de la PARP en fragm de 50 kDa.

Se puede concluir que tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, las células pueden desarrollar una asombrosa versatilidad respecto a la forma en que mueren. La muerte celular *in vivo*, e *in vitro*, es un proceso heterogéneo incluso ante la exposición al mismo estímulo y se caracteriza por la presencia de subpoblaciones que mueren por diferentes mecanismos [8]. La redundancia en los tipos de muerte celular asegura la eliminación eficaz de las células alteradas. Además, estos mecanismos pueden ser desencadenados simultánea o secuencialmente indicando la existencia de numerosos “cross-talk” entre las vías de muerte celular [42]. El desafío clave de los investigadores actuales es comprender los mecanismos moleculares que participan en los distintos procesos de muerte celular, permitiendo utilizar la señalización selectiva de los mismos, para ediseño de drogas que permitan la optimización de los tratamientos y evitar la aparición de resistencia [2].

LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Todas las células reciben señales desde su medio ambiente y responden a ellas. En los animales pluricelulares la comunicación célula-célula alcanza su mayor grado de complejidad ya que la actividad de cada célula es cuidadosamente regulada para satisfacer los requerimientos del organismo. Esto se consigue a través de gran cantidad de moléculas señalizadoras que son secretadas o expresadas en la superficie celular, las cuales se unen a receptores localizados en otras células, integrando y coordinando las funciones de las células individuales.

La unión de estas moléculas señalizadoras a sus receptores, provoca una cascada de reacciones intracelulares que son las que regulan los diferentes aspectos del comportamiento celular incluyendo su metabolismo, motilidad, proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte. La comprensión de los mecanismos moleculares que constituyen estas vías de señalización celular se ha convertido, por lo tanto, en un área prioritaria de investigación [60].

Tipos de señalización célula-célula

La señalización celular tiene lugar a través de la interacción directa entre células vecinas por contacto o mediante la acción de moléculas señalizadoras secretadas que se caracterizan por tener bajo peso molecular y que incluyen hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas y gases.

Los diferentes tipos de señalización mediante moléculas secretadas suelen clasificarse en tres grandes grupos en función de la distancia recorrida por la molécula señalizadora [60]:

- **Endocrina:** cuando las moléculas (hormonas) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan a través de la circulación, actuando en células diana localizadas en lugares alejados del organismo.
- **Paracrina:** la molécula liberada por la célula al espacio extracelular actúa sobre las células vecinas.
- **Autocrina:** la célula responde a la molécula señal secretada por sí misma.

Luego de que la molécula se une a un receptor de membrana, éste transmite la información hacia el interior de la célula a través de un “*mecanismo de transducción de*

señales”. Normalmente el acoplamiento entre el receptor y las moléculas efectoras de la respuesta no es directo, sino que requiere de proteínas, o complejos proteicos que funcionan como transductores y permiten la transmisión desde el receptor al efector. El producto generado por la acción catalítica del efector es generalmente un metabolito de bajo peso molecular o un ión denominado segundo mensajero, que a su vez activan proteínas quinasas. Estas enzimas fosforilan proteínas específicas tales como factores de transcripción, que regulan la expresión de genes involucrados en la proliferación, diferenciación o muerte celular [61].

La existencia de eventos secuenciales de fosforilación, en los cuales una serie de proteínas quinasas fosforila y regula la actividad de la siguiente ha dado lugar a la definición del concepto de “*cascada de proteínas quinasas*” [61]. Ejemplos ampliamente conocidos en la transducción de señales son la proteína quinasa C (PKC) y las MAPKs.

PKCs

La familia de las PKCs fosforila específicamente aminoácidos serina y treonina de una gran variedad de proteínas. Son activadas por numerosos estímulos extracelulares como hormonas y factores de crecimiento que actuando a través de receptores acoplados a proteína G y tirosina quinasa, generan diacilglicerol (DAG) el cual activa a las PKC. A su vez, estas enzimas pueden ser activadas directamente por ésteres de forbol, moléculas que presentan actividad promotora de tumores [62].

Las PKC son proteínas formadas por una sola cadena polipeptídica compuesta de dos dominios, uno catalítico o dominio quinasa, y uno regulador que se une a los lípidos y al Ca^{2+} . Las técnicas de clonado molecular revelaron que las PKC son una familia de al menos diez enzimas diferentes. Todas las isoformas tienen la región quinasa con alta homología, pero presentan grandes diferencias en sus propiedades regulatorias. Basados en su estructura y en los factores requeridos para su activación óptima se han definido tres familias:

- Las ***PKC convencionales o clásicas***: que incluyen las isoformas α , βI , βII , y γ . Estas isoformas son activadas por fosfolípidos y Ca^{2+} . También se unen al DAG y a los ésteres de forbol.

- Las **PKC noveles o nuevas**: incluyen las isoformas δ , ϵ , η y θ . Estas quinasas son insensibles al Ca^{2+} pero son activadas por DAG y ésteres de forbol en presencia de fosfolípidos.
- Las **PKC atípicas**: que comprenden a las isoformas λ y ζ , estas proteínas son insensibles al Ca^{2+} y no responden al DAG ni a los ésteres de forbol.

La estructura general de las PKC presenta cuatro dominios conservados (C1-C4) y cinco regiones variables (V1-V5). El dominio regulatorio incluye las regiones C1 y C2, y también una zona conocida como pseudosustrato, que interactúa con el dominio catalítico, manteniendo a la enzima en un estado inactivo dentro del citosol [63] (figura 11).

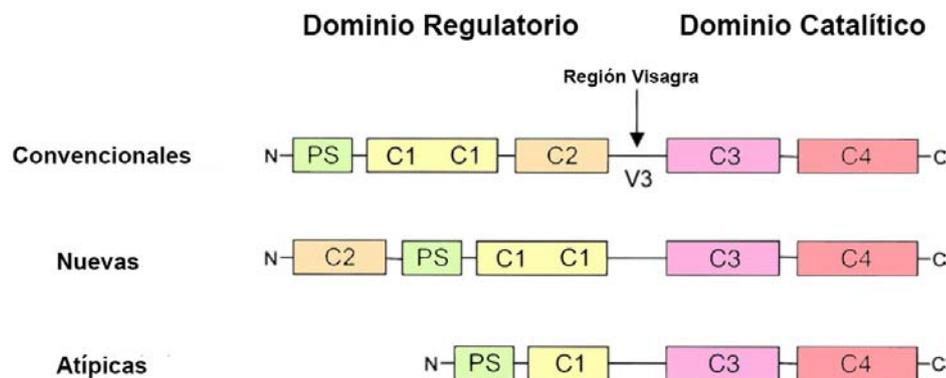


Fig. 11: Principales características estructurales de la familia de las PKC [64]

Las PKC poseen la capacidad de interactuar y ser activadas por componentes de membrana, entre ellos la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol. El DAG aumenta la afinidad de las PKC por la fosfatidilserina, y estabiliza la unión de la PKC a la membrana. Esta unión induce un cambio conformacional que le permite activarse y fosforilar sustratos intracelulares. Se ha descrito que PKC puede interactuar con la proteína RACK1 lo que determinaría su localización y distribución subcelular [64].

PKC y la muerte celular

Los primeros estudios para establecer el rol de las PKC en la señalización de la muerte celular fueron muy contradictorios. La activación de PKC era capaz de inducir apoptosis en un determinado tipo celular, mientras que la prevenía en otras poblaciones. En la actualidad, es aceptado que los roles en la regulación de la muerte por parte de las PKC son isoforma-específicos. De esta forma, las PKC convencionales y atípicas son

generalmente consideradas anti-apoptóticas, estando involucradas principalmente a la proliferación y a la promoción de la supervivencia. Las PKC nuevas, sin embargo, tienen una función supresora de los tumores que está relacionada con proteínas pro-apoptóticas. PKC α y PKC δ son las dos isoformas mejor caracterizadas que previenen o promueven la apoptosis, respectivamente [64].

Isoformas anti-apoptóticas

PKC α

Esta isoforma ha sido descrita como la más importante en la promoción de la supervivencia. Los mecanismos mediante los que produce su efecto anti-apoptótico se vinculan con la estabilización de Bcl-2 en la membrana mitocondrial, previniendo de esta forma la apoptosis [65]. Otro posible blanco es la proteína Raf-1, que estabiliza Bcl-2 y fosforila e inactiva Bad [66].

Sin embargo, PKC α puede tener una función pro-apoptótica en células epiteliales de distintos órganos. En el túbulo proximal del nefrón esta isoforma se localiza a nivel mitocondrial liberando citocromo c y activando la caspasa 3 luego de tratamientos con cis-platino [67].

PKC β

PKC β I y PKC β II son isoformas generadas por un splicing alternativo. La isoforma PKC β II es la más vinculada con las funciones anti-apoptóticas, promoviendo la supervivencia y la proliferación. Esta PKC produce un aumento en los niveles de Bcl-2 [68].

Sin embargo, en monocitos tratados con ésteres de forbol, PKC β I provoca la liberación de citocromo c desde la mitocondria a través de la vía de las quinasas terminales NH₂ Jun (JNK) [69].

PKC ϵ

Está ampliamente establecido que esta isoforma tiene propiedades anti-apoptóticas, siendo además propuesta como una de las isoformas responsables de la oncogénesis [70]. En linfocitos T, PKC ϵ activa una vía de señalización que culmina con la inactivación de la proteína mitocondrial pro-apoptótica Bad [71]. Además bloquea la activación de la caspasa en células de cáncer de pulmón [72].

Isoformas pro-apoptóticas

Las isoformas de PKC predominantemente asociadas con la promoción de la muerte celular son las PKC δ y θ

PKC δ

Es la isoforma más ampliamente distribuida en todas las poblaciones celulares. La activación de PKC δ ocurre en respuesta a gran variedad de estímulos como señales iniciadas a través de un receptor de muerte [73], radiaciones ultravioleta [74], y agentes alquilantes quimioterápicos [75]. Además se ha demostrado que la pérdida de la expresión de PKC δ está asociada a crecimiento tumoral [76]. PKC δ es un sustrato de la caspasa 3, que cliva proteolíticamente la región bisagra y libera el fragmento catalítico activo de 40 kDa del dominio regulatorio [77]. Los blancos de la PKC δ están localizados en el núcleo, y se ha demostrado que PKC δ se transloca al núcleo antes de ser clivada por la caspasa 3. Las proteínas nucleares incluyen lamina B (proteína estructural), el fragmento catalítico de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK), una enzima esencial en la reparación de las dobles hebras de ADN, y p73, un homólogo de p53 [78-80]. Además, PKC δ también puede activar a la caspasa 3 creando una retroalimentación positiva en la amplificación de sus efectos [81].

PKC δ transloca a la mitocondria y promueve la liberación de citocromo c [82]. Se ha consensuado que la holoenzima de PKC δ regularía los eventos tempranos de la muerte celular, mientras que su fragmento catalítico, regularía la apoptosis tardía [64].

PKC θ

Esta proteína quinasa también ha sido relacionada con la promoción de la apoptosis y se ha reportado como sustrato de la caspasa 3. Sin embargo, esta PKC parece estar más limitada a tejidos específicos como músculo esquelético y células hematopoyéticas [64].

En la figura 12 puede observarse puede observarse cómo la interacción de las distintas isoformas están involucradas en la regulación de funciones como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.

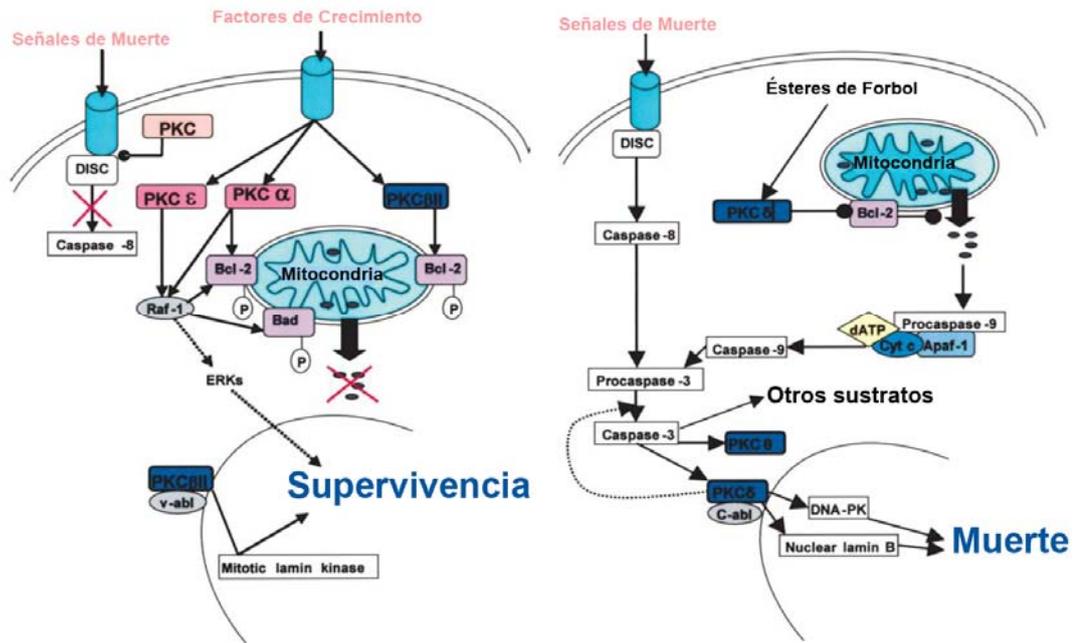


Fig. 12: Regulación de la muerte celular por las isoformas de PKC. En estos esquemas se han representado las isoformas relacionadas con la muerte y la supervivencia de las células[64]

MAPKs

La vía de transducción de señales de las MAPKs regula una gran variedad de mecanismos dentro de las células. Todas las células eucariotas poseen múltiples MAPKs que son activadas por distintos estímulos, y permiten que las células respondan de manera coordinada a numerosos y divergentes desafíos. Las MAPKs de los mamíferos pueden activarse por gran cantidad de factores como hormonas (insulina, estradiol), factores de crecimiento [factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermal (EGF)], citoquinas inflamatorias, factores de necrosis (TNF), estrés medioambiental (radiación, shock osmótico, isquemia). Estos estímulos actúan a través de receptores acoplados a las vías de las MAPKs y su activación coordina las diversas actividades celulares [83] (figura 13).

Se han caracterizado seis grupos distintos de MAPKs: las quinasas reguladas por señales extracelulares (*ERK1/2*), las *JNK1/2/3*, *p38* (*p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$*), *ERK7/8*, *ERK3/4* y *ERK5* [84].

Los grupos más extensamente estudiados son ERK1/2, JNKs, y p38. En líneas generales se observó que ERK1/2 se activan en respuesta a factores de crecimiento y

ésteres de forbol, mediando las actividades relacionadas con la proliferación, mientras que JNK y p38, responden a estímulos estresantes como el shock osmótico, las radiaciones ionizantes y variados citotóxicos.

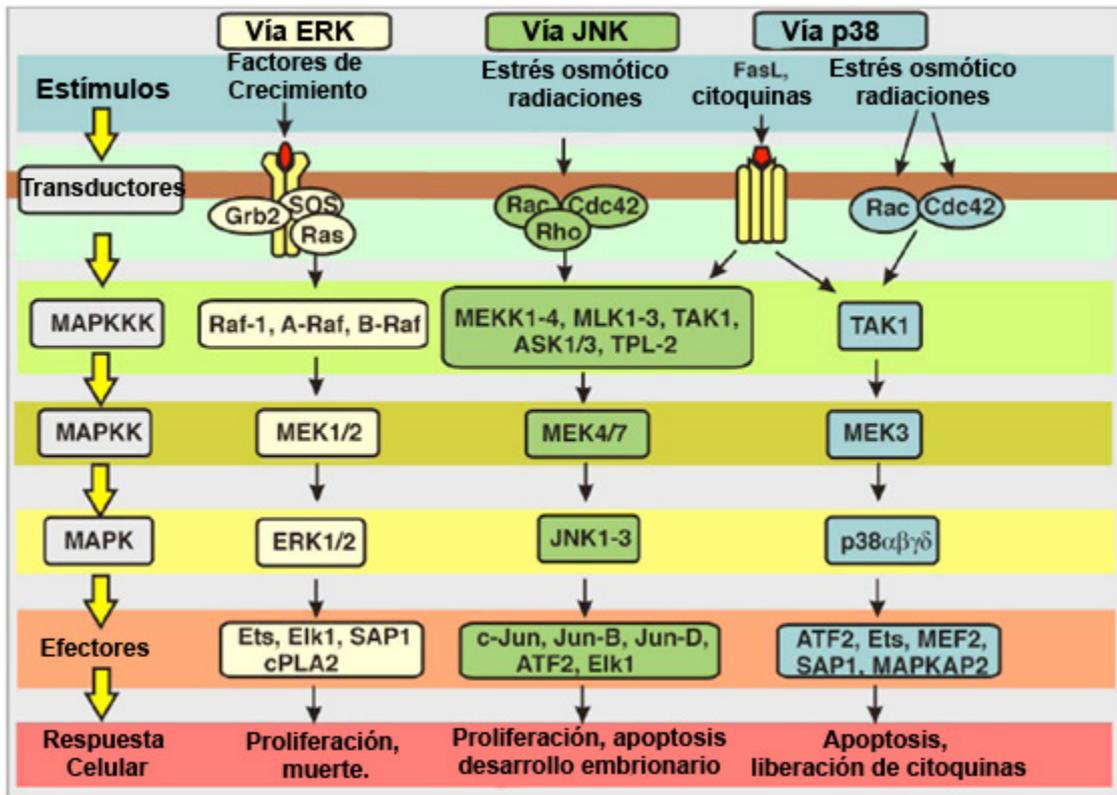


Fig. 13: Vías de activación de las MAPKs y en los distintos procesos celulares que regulan [83].

ERK1/2

Estas quinasas fueron las primeras en ser caracterizadas y son las más estudiadas en los mamíferos. Hay dos isoformas de ERK que presentan similitud en el 83% de los aminoácidos, ERK1 y ERK2 y están expresadas en todos los tejidos.

Son activadas por gran cantidad de estímulos tanto extracelulares como intracelulares, pero responden fuertemente a factores de crecimiento, suero y ésteres de forbol [85]. Usualmente su activación suele iniciarse mediante receptores de superficie, como los receptores tirosina quinasa (figura 13). La señal es transducida por las proteínas G (por ejemplo Ras/Raf). La activación de Raf, fosforila MEK 1 y 2, que a su vez fosforilan ERK1/2 [83].

Las ERK activadas fosforilan un gran número de sustratos en todos los compartimientos celulares, incluidos varias proteínas citosólicas, de membrana, del

citoesqueleto y sustratos nucleares relacionados con numerosos procesos como proliferación, diferenciación y muerte celular [84].

ERK en la muerte celular:

A pesar de que las ERK han sido siempre relacionadas con la supervivencia de la gran mayoría de los tipos celulares, su activación también puede contribuir a la muerte celular. En cultivos de oligodendrocitos se observó que la inhibición de las ERK con PD98059, impide la muerte inducida por peróxido de hidrógeno [86]. Estas observaciones fueron confirmadas también en células HeLa [87], neuronas corticales [88] y cultivos primarios de células B [89].

Otros factores inductores de muerte celular producen la activación de las ERK1/2 como las especies reactivas de oxígeno, la toxina de la *E. coli*, el zinc, y la privación de factores de crecimiento [83].

Los mecanismos a través de los cuales las ERK median la apoptosis, parecen ocurrir a diferentes niveles de la vía de transducción de señales. Se postula que ERK actuaría sobre la mitocondria favoreciendo la liberación de citocromo c y la consiguiente activación de la caspasa 3 [67]. Otros estudios indican que las ERK1/2 podrían mediar la regulación positiva de Bax y p53 [90, 91] inhibiendo la acción de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl en la mitocondria. Además ERK1/2 fosforilan directamente p53, reforzando su rol pro-apoptótico. Otros datos también vinculan la activación de ERK1/2 con la regulación positiva de la expresión de TNF α y la activación de la caspasa 8 [92]. La promoción de la muerte celular también puede estar relacionada con la supresión de Akt [93].

En lo que respecta al rol de estas quinasas en otros mecanismos de muerte celular no apoptóticos, se ha reportado que la paraptosis requiere de la activación de las ERK1/2 tanto en la muerte celular inducida en cultivos de fibroblastos por IGF-I [16] como en células de hematoma de ratón al ser sometidas a 1-Nitropireno [12].

JNK

Estas quinasas fueron identificadas originalmente como proteínas quinasas activadas por el estrés (SAPKs). Posteriormente fueron denominadas como JNKs para enfatizar su rol en la fosforilación y activación del factor de transcripción c-jun. Las

JNK son activadas en respuesta a citoquinas, radiación UV, la supresión de factores de crecimiento, agentes que dañan la integridad del ADN y algunos factores de crecimiento presentes en el suero [94].

En los mamíferos, las JNK están codificadas por tres genes, JNK1, JNK2 y JNK3. El “splicing” alternativo conduce a diez productos diferentes entre los 44 y los 55 kDa [95]. Mientras que JNK1 y JNK2 están presentes en todos los tejidos, JNK3 se expresa solamente en cerebro, corazón y testículos.

Al igual que las ERK1/2, las JNK pueden re-localizarse en el núcleo luego de su activación, pero en menor proporción que las ERK. Se ha demostrado que gran número de factores de transcripción (c-fos, Elk-1, p53, c-myc, etc) y de receptores hormonales nucleares (receptores del ácido retinoico, receptores de los glucocorticoides) son blanco de las JNK [96]. El sustrato más extensamente estudiado es c-jun, el cual aumenta la actividad transcripcional de AP-1.

JNK en la muerte celular

El rol de las JNK en la apoptosis ha sido bien establecido y parece ser específico en cada tejido y ante cada estímulo [83]. Los blancos pro-apoptóticos principales son el supresor de tumor p53 y c-myc entre otros [97]. Numerosas proteínas mitocondriales como Bcl-2, Bcl-xl, Bad, Bim y Bax, han sido descritas como blanco de las JNK [98] ya sea inhibiendo las anti-apoptóticas, como activando las pro-apoptóticas [99].

p38

Los homólogos de p38 han sido encontrados tanto en las células eucariotas inferiores como las superiores y su rol generalmente ha sido implicado en la osmorregulación, la respuesta a estímulos estresantes extracelulares y algunos eventos del ciclo celular [83, 84]. En la mayoría de los casos, los mismos estímulos que activan JNK activan también p38. Los casos de isquemia-reperfusión son exclusivos de esta última quinasa.

Hay cuatro isoformas de p38 α , β , γ y δ , siendo la isoforma α la más ampliamente distribuida y estudiada.

Como todas las MAPK, p38 es activada por quinasas de quinasas, las MKK3 y MKK6. También se ha reportado que otras quinasas pueden activar p38, incluso las clásicamente descritas para JNK, MKK4 y MKK7, lo que indicaría cierto entrecruzamiento en estas vías. Algunas proteínas adaptadoras de bajo peso molecular como Ras/Raf/MEK han sido relacionadas a la activación de p38 [100].

La quinasa p38 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células quiescentes. Algunas evidencias sugieren que luego de su activación, p38 transloca hacia el núcleo, pero también se lo detecta activo en citoplasma [101].

El rol de p38 ha sido extensamente estudiado en sistema inmune, participando en la respuesta funcional de macrófagos y neutrófilos, incluida la quimiotaxis, la exocitosis de gránulos, la adherencia y la apoptosis, y también modulando la apoptosis y diferenciación de linfocitos T por la producción de IFN γ [102]. En algunos tipos celulares se han descrito numerosos activadores, factores de crecimiento como el FGF, eritropoyetina, interleuquinas, NGF, IGF y PDGF. También se ha relacionado a esta quinasa en respuesta a TGF β , agonistas muscarínicos, péptidos vasoactivos, shock de calor, y a la isquemia-reperfusión. Aún así, es difícil categorizar a p38 con algún tipo de respuesta en particular. La quinasa p38 activada fosforila numerosos factores de transcripción como ATF1/2/6, CHOP o GAAD (un factor de arresto celular luego de los daños del ADN), p53, Elk-1, etc [103]. A parte de éstos factores se han identificado otros blancos en las proteínas citosólicas como la proteína Tau asociada a microtúbulos, la queratina 8, la isoforma 1 del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE-1) y la fosfolipasa A2 [104].

p38 en la muerte celular:

La activación de p38 fue observada en células apoptóticas en respuesta a estímulos como el daño en el ADN inducido por agentes como el cis-platino y dorrubicina [105]. La administración de inhibidores de las caspasas disminuyen la activación de p38, por lo que p38 tendría un rol ejecutor de dichas proteasas. Otro mecanismo por el cual p38 puede participar en la apoptosis es a través de la fosforilación y regulación negativa de Bcl-x1 y el aumento en la activación de p53 [106].

LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es el proceso por el cual la información codificada en el ADN pasa al ARN mensajero. La síntesis del ARN es realizada por la ARN polimerasa, pero para su iniciación y progresión necesita la participación de gran número de factores de transcripción que posibilitan el acoplamiento de la ARN polimerasa al promotor del gen. Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de los genes y estimulan o inhiben la actividad de la ARN polimerasa. [60].

Dentro de estas proteínas, el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) tiene un rol clave en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

NF- κ B

El NF- κ B es una familia de dímeros que participa en la respuesta inmunitaria innata y adquirida, la proliferación celular, la inflamación y la muerte celular. Las alteraciones en la regulación de NF- κ B y las vías de señalización que controlan su actividad están involucradas tanto en el desarrollo y progresión del cáncer, como en la resistencia a la quimioterapia y radioterapia [107].

En los mamíferos este factor comprende 5 miembros: NF- κ B1 (formado por los dímeros p105 y p50), NF- κ B2 (constituído por p100 y p52), c-Rel, RelA/p65 y RelB. Estas proteínas comparten una homología en el dominio Rel, el cual media la unión al ADN, la dimerización y las interacciones con factores inhibitorios, las I κ B [108]. Los miembros de la familia Rel son funcionalmente activos como homodímeros o heterodímeros, lo que determina que tengan distinta especificidad. El miembro más estudiado de esta familia es el heterodímero compuesto por RelA/p65 y p50.

Antes de su activación NF- κ B reside en el citoplasma como un complejo inactivo unido a las proteínas inhibitoras I κ B. A su vez estas proteínas inhibitoras también conforman una familia que incluye I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , p105, p100 y Bcl-3 [109].

La mayoría de los estímulos activan este factor de transcripción liberándolo del factor inhibitorio por acción de unas quinasas dependientes de I κ B (IKK). El complejo IKK consiste en dos subunidades homólogas IKK α e IKK β y un componente regulatorio no enzimático IKK γ /NEMO [110].

Existen dos vías de activación de NF- κ B (figura 14):

- **Vía clásica:** depende de IKK que fosforila y degrada a las I κ B, liberando al factor de transcripción que transloca al núcleo donde regula la transcripción de diversos genes como citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, y proteínas pro y anti-apoptóticas [111, 112]. Esta vía se relaciona con la activación del dímero p50: RelA/p65.
- **Vía alternativa:** conduce a la activación selectiva del dímero p52: RelB a través del procesamiento de la proteína precursora NF- κ B2:p100, que se encuentra como un heterodímero inactivo en el citoplasma. Esta vía se dispara por miembros de la familia del TNF a través de la activación selectiva de un homodímero de IKK α .

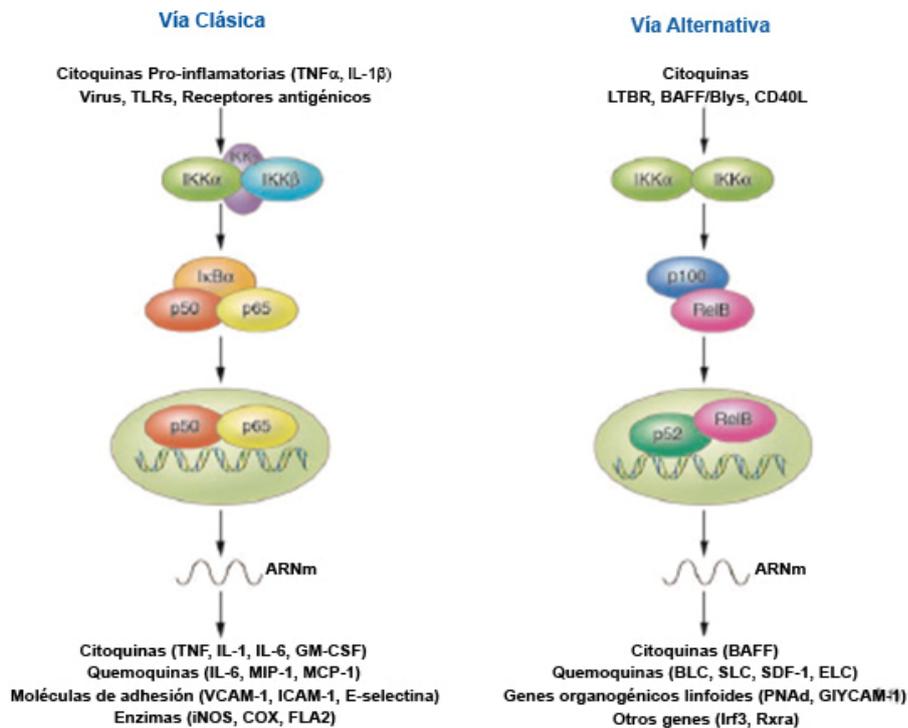


Fig. 14. Vías de activación de NF- κ B. En este esquema se representan las vías clásica y alternativa [113].

Ambas vías de activación participan en la regulación de la supervivencia y de la muerte celular.

NF- κ B en la muerte celular

La mayoría de las sustancias carcinogénicas y los promotores tumorales activan NF- κ B para la ejecución de las respuestas anti-apoptóticas. Paradójicamente, otros agentes entre los que se encuentran numerosas citoquinas, drogas quimioterapéuticas y

radiaciones inducen apoptosis activando este factor de transcripción, poniendo en evidencia el rol de NF- κ B en los mecanismos de auto-defensa [114].

En relación a la inducción de la muerte celular se ha descrito que NF- κ B regula la transcripción de numerosos genes pro-apoptóticos, que incluyen receptores de factores de muerte [receptor de Fas (CD95) y TRAIL (DR4, DR5 y DR6)], ligandos inductores de muerte (FasL, TNF α y TRAIL), factores supresores tumorales como p53, miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bax) o aumenta el “splicing” alternativo de algunos miembros anti-apoptóticos como Bcl-xL, Bcl-xS [109].

Recientes investigaciones han relacionado también la activación de NF- κ B con su importante rol en la muerte celular inducida por el estrés del RER y establecieron un vínculo con la vía del receptor de muerte TNF. Estos estudios sugieren que la activación de este factor de transcripción estaría dada por la relación entre dos proteínas de la membrana del RER que sirven de sensores de estrés, IRE1 α y TRAF2 o TRAF6, las cuales producen la activación de las IKK que conducen a la activación de NF- κ B. Este factor en el núcleo de las células promueve la expresión de TNF α (figura 15) [115].

El factor NF- κ B puede actuar indirectamente sobre la muerte celular activando genes que regulan positivamente la expresión de otros factores de transcripción como p53 y IRF-1, los cuales junto a NF- κ B, estimulan la producción de la óxido nítrico sintasa, promotora de muerte luego de la injuria isquémica [116].

Teniendo en cuenta que la muerte celular programada requiere la transcripción de genes, no sorprende la activa participación de diversos factores de transcripción en este proceso. En la actualidad es controvertido establecer el rol de NF- κ B en la regulación de la muerte celular ya que su función pro o anti-apoptótica depende principalmente del tipo celular y de la noxa que actúe sobre el mismo [109].

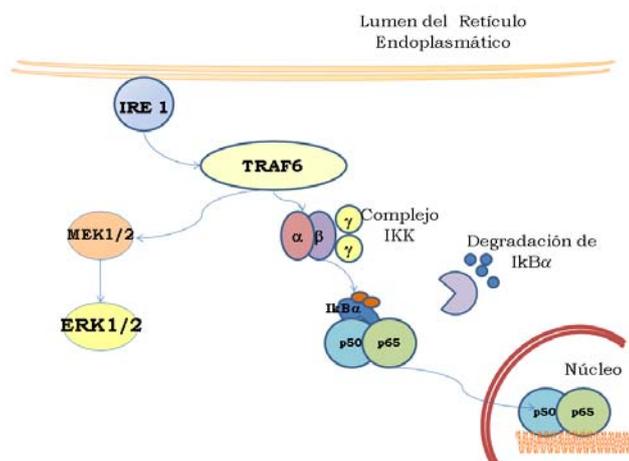


Fig. 15. La activación de NF- κ B puede relacionarse con el estrés del retículo endoplasmático[115].

TUMORES HIPOFISARIOS

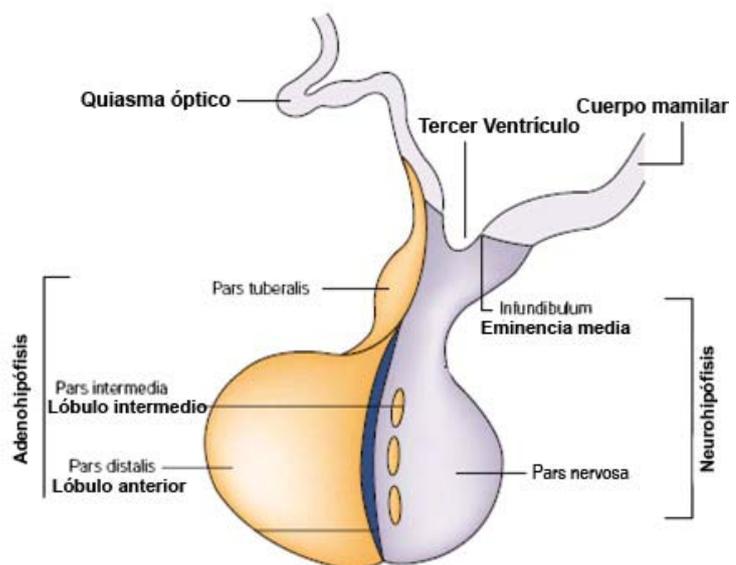
LA HIPÓFISIS

La hipófisis o glándula pituitaria, es la coordinadora del sistema endocrino y un órgano crucial para el mantenimiento de parámetros homeostáticos del metabolismo, el crecimiento y la reproducción. En el hombre adulto pesa alrededor de 0.5 g y mide 10 a 15 mm de diámetro mayor [117]. Se aloja en una fosa profunda en la cara superior del hueso esfenoides denominada silla turca. Su cara superior está recubierta por el diafragma hipofisario, constituido por una dependencia de la duramadre, que sólo es atravesada por el “tallo pituitario” mediante el cual mantiene la continuidad anatómica con el hipotálamo.

Esta glándula está compuesta por dos partes histológica y funcionalmente diferentes: una porción epitelial que embriológicamente deriva de una extensión del conducto oral o bolsa de Ratke la cual se denomina **adenohipófisis** y una porción neural que se origina a partir del techo del tercer ventrículo o **neurohipófisis** (figura 16).

La adenohipófisis comprende el 80% de la glándula y está compuesta por tres partes: *pars distalis* o lóbulo anterior, es responsable de la secreción de numerosas hormonas; *pars intermedia* que produce dos hormonas estimulantes de los melanocitos y la *pars tuberalis* que sintetiza factores que influyen sobre la actividad de otras células.

Fig. 16. La hipófisis normal y sus componentes anatómicos. La neurohipófisis o lóbulo posterior es una extensión del hipotálamo. La adenohipófisis comprende el lóbulo anterior compuesto por células epiteliales secretantes, la *pars tuberalis* y la *pars intermedia*[117].



La actividad de la hipófisis es posible debido a la existencia de una perfecta organización morfológica-funcional en la cual distintos grupos celulares se distribuyen en proporciones relativamente constantes. Sin embargo, por medio de estudios ultraestructurales y morfométricos en animales experimentales, se ha demostrado una considerable plasticidad en las poblaciones de cada tipo celular ya que pueden experimentar grandes variaciones de acuerdo al grado de estimulación o inhibición de su actividad secretoria [118, 119].

Las células de la hipófisis anterior

El lóbulo anterior está formado por cordones irregulares de células glandulares que secretan diferentes hormonas. La estroma está constituida por una trama de delicadas fibras reticulares, las cuales también sostienen las delgadas paredes de sinusoides fenestrados.

Mediante técnicas histoquímicas especializadas y por la localización inmunocitoquímica de los productos hormonales sintetizados y secretados por estas células, se han establecido seis grupos celulares que ultraestructuralmente se identifican por presentar las siguientes características:

Células lactotropas: sintetizan y secretan prolactina (PRL). En las ratas machos las células lactotropas constituyen alrededor del 25% de las células de la hipófisis anterior. En las ratas hembras este porcentaje es mayor y aumentan de tamaño y número durante la preñez y la lactancia. Ultraestructuralmente se caracterizan por contener gránulos secretorios de forma y tamaño variados, con un diámetro promedio entre 600 y 900 nm [120].

Células somatotropas: productoras de hormona de crecimiento (GH), constituyen alrededor del 50% de las células de la hipófisis anterior en ratas macho representando un menor porcentaje en las hembras. Se reconocen por sus numerosos gránulos esféricos, con un contenido electrodensos y diámetros que oscilan entre 260-400 nm [119, 121, 122].

Células corticotropas: producen adrenocorticotrofina (ACTH) y representan entre el 15-20% de las células adenohipofisarias. Son poligonales y contienen en su citoplasma gránulos dispersos de unos 200 a 500 nm de diámetro y un núcleo electrodensos.

Células gonadotropas: sintetizan y liberan gonadotropinas como la hormona foliculo estimulante y la luteinizante (FSH y LH), constituyen alrededor del 10% de las células de la adenohipófisis. A nivel ultraestructural presentan gránulos secretorios redondos entre 150 y 400 nm de diámetro y de electrodensidad variable [123].

Células tiotropas: productoras de tirotrófina (TSH), tienen forma irregular y angulosa. Contienen gránulos secretorios de densidad electrónica variable, la mayoría esféricos y con un diámetro entre 100-150 nm, alineados a lo largo de la membrana celular [119].

Las **células foliculares o foliculo estrelladas (FE)** son agranulares [124], pero a pesar de esta particularidad, producen moléculas bioactivas que actúan localmente como agentes paracrinos, regulando la actividad de los diferentes tipos celulares que componen la adenohipófisis [125].

TUMORES HIPOFISARIOS

Las patologías que afectan a la adenohipófisis se manifiestan por:

- Aumento de la producción de la hormona tópicamente: generalmente relacionado con un tumor funcionando del lóbulo anterior, o a una pérdida de la inhibición hipotalámica [126].
- Disminución de la producción hormonal: mucho menos frecuente y que reconoce un origen multivariado donde existe una destrucción de la glándula por tumores no funcionantes o infecciones [127].
- Efectos locales: originados por lesiones expansivas halladas mediante metodologías diagnósticas de imagen [128].

Los tumores de la hipófisis son neoplasmas constituidos por células adenohipofisarias, que generalmente no metastatizan. Usualmente son detectados en la silla turca en el 20% de la población y un tercio de los mismos causan complicaciones en la salud [117]. Estos tumores muestran un amplio rango de comportamientos hormonales y proliferativos. Por un lado pueden ser lesiones pequeñas con un bajo índice de crecimiento, o crecer rápidamente ocasionando síntomas de una masa intracraneal [129]. Cuando estos tumores son hormonalmente inactivos son detectados radiográficamente como “incidentalomas” o luego de exámenes post mortem [130]. Por

el contrario, si producen hormonas en exceso, pueden llegar a originar grandes síndromes que tienen repercusión sobre diversos sistemas del organismo como la acromegalia y la enfermedad de Cushing [129, 131].

Los tumores hipofisarios constituyen el 10% de los tumores intracraneales diagnosticados y representan el 25% de los tumores intracraneales resecados quirúrgicamente [129, 131]. Gran parte de estas lesiones proliferativas son adenomas que se originan de las células lactotropas (prolactinomas), o son lesiones hormonalmente inactivas derivadas de las células gonadotropas. Ocurren con igual frecuencia en ambos sexos, sin embargo, se evidencian más tempranamente en el sexo femenino (20-45 años) que en el masculino (35-60 años). A pesar de que los tumores hipofisarios también están asociados con las neoplasias endocrinas múltiples tipo 1 (NEM 1), éstos apenas representan una pequeña minoría de los casos [129].

Los adenomas hipofisarios pueden ser clasificados en base a distintos criterios[129]:

- **Clasificación funcional:** basada en su actividad hormonal, somatotrofinomas, prolactinomas, adenomas secretores de ACTH, tumores productores de TSH, gonadotrofinomas, y tumores endocrinológicamente inactivos.
- **Clasificación anatómica o radiográfica:** tiene en cuenta el tamaño tumoral y el grado de invasión local.

La frecuencia de los diferentes subtipos de tumor hipofisario fue estudiada en más de 2000 pacientes sujetos a cirugía entre los años 1963 a 1993 en USA [132] y es expuesta en la Tabla 2.

Tabla 2: Incidencia de los tumores hipofisarios más frecuentes

<i>Subtipo de Tumor Hipofisario</i>	<i>Incidencia (casos por millón por año)</i>	<i>Prevalencia (total de casos por millón)</i>
Prolactinoma	6-10	60-100
Tumores nofuncionantes	7-9	70-90
Somatotrofinoma	4-6	40-60
Corticotrofinoma	2-3	20-30

Datos extraídos de un trabajo retrospectivo realizado en la población de Estados Unidos por Mindermann y Wilson, 1994.

Los mecanismos patogénicos que subyacen estas neoplasias comunes, no han sido totalmente comprendidos [133]. Las mutaciones genéticas que son características en la mayoría de las neoplasias humanas, son raramente detectadas en los tumores hipofisarios. Por otro lado, el crecimiento tumoral parecería estar promovido por hormonas que modulan la actividad normal de la glándula hipofisaria y por factores de crecimiento que han sido implicados en el desarrollo fetal normal de la hipófisis [134].

Prolactinomas

En las células lactotropas, la síntesis y secreción de PRL está tónicamente inhibida por la dopamina, una amina biógena proveniente del núcleo arcuato del hipotálamo, y cualquier proceso que interrumpa la secreción dopaminérgica o interfiera con la llegada de la dopamina al sistema de vasos porta puede causar hiperprolactinemia. La función de la PRL es la estimulación de la lactancia y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo [128]. Los niveles séricos normales de prolactina son de 25 µg/l y 20 µg/L en mujeres y hombres respectivamente. La hipersecreción de PRL lleva a infertilidad y a disfunciones gonadales, ya que al inhibir la liberación de FSH y LH impide la esteroidogénesis gonadal [129]. Los adenomas secretantes de prolactina corresponden al 30% de los adenomas hipofisarios y al 50-60% de los tumores funcionantes. Se desarrollan con mayor frecuencia en mujeres jóvenes. El 90% de estas lesiones son pequeñas y no suelen aumentar de tamaño [135].

La presentación clínica más frecuente se da en pacientes adultos en sus años reproductivos. Las mujeres son cinco veces más sintomáticas que los hombres y concurren al especialista por un síndrome de *amenorrea-galactorrea* o *infertilidad*. Los hombres en cambio presentan síntomas por efecto de masa intracraneal, como pérdida del campo visual, disminución de la libido e impotencia sexual [136].

El diagnóstico de los prolactinomas se realiza a través de la detección de niveles elevados de PRL en suero. En líneas generales los niveles de hiperprolactinemia se relacionan cercanamente con el tamaño tumoral. El diagnóstico se confirma con una resonancia magnética nuclear contrastada con galio. La tomografía computada con contraste intravenoso es una alternativa, pero la resonancia magnética es más efectiva en la detección de lesiones pequeñas. Los prolactinomas se clasifican en microadenomas, si tienen menos de 10 mm de diámetro y en macroadenomas, cuando el tamaño es mayor [136, 137].

Patogénesis del Prolactinoma

Los mecanismos patogénicos de los tumores hipofisarios siguen siendo objeto de numeros estudios [134]. En líneas generales hay dos grandes teorías sobre las que se basaron la mayoría de las investigaciones [138, 139]:

- ***Sobre-estimulación hormonal:*** hormonas que modulan la actividad normal de la hipófisis, factores hipotalámicos y factores de crecimiento implicados en el desarrollo normal. Por ejemplo, una estimulación excesiva de las hormonas regulatorias conduce a un incremento en el número de células de la hipófisis en situaciones fisiológicas como la lactancia y situaciones patológicas como el hipoadrenalismo primario, hipotiroidismo primario y tumores secretantes de GHRH ectópica, donde se produce la proliferación de las diferentes poblaciones celulares [117, 140].

- ***Defectos moleculares:*** anormalidad en receptores del Péptido liberador de Prolactina (PrRP), receptores de Estrógeno (ERs) o receptores de Prolactina en las mismas células lactotropas. Las evidencias a favor de la naturaleza monoclonal de los tumores hipofisarios postulan que un defecto molecular intrínseco de la célula es el evento inicial de la formación tumoral [141].

La sobreestimulación de las células hipofisarias por los factores hipotalámicos y hormonales, si bien no iniciarían la transformación de las células, crea un medio ambiente que favorece la aparición de mutaciones tumorigénicas.

En el caso particular de los Prolactinomas, se ha descrito que la alteración en la regulación hormonal de las células lactotropas pueden producirse a distintos niveles y éstos son esquematizados en la figura 17. [142]:

- ***Receptor de Dopamina:*** la Dopamina es una hormona hipotalámica con acción inhibitoria sobre la célula lactotropa. Sus efectos son mediados por los receptores dopaminérgicos (RD) que a su vez se dividen en dos grandes familias, los RD1 y los RD2. En la hipófisis el tipo de receptor más abundante es el tipo 2 y se ha descrito que ratones knockout para este receptor desarrollan hiperplasia de las células lactotropas, seguida por el desarrollo de prolactinomas [117].

Algunos prolactinomas no responden a la terapia con agonistas dopaminérgicos que podría explicarse a través de la menor expresión de receptores RD2. A nivel experimental, en cultivos de líneas celulares resistentes a la dopamina la expresión de

los RD2 también es menor pero puede incrementarse luego del estímulo con Factor de crecimiento neural (NGF) [143]. Se ha sugerido que la expresión del RD2 está regulada por el NGF en una vía dependiente de NF- κ B [144].

- ***Péptido liberador de PRL (PrRP)***: es un péptido hipotalámico cuyos receptores específicos están presentes tanto en la glándula hipofisaria normal [145] como en todos los tipos de tumores hipofisarios [146]. La expresión del receptor del PrRP es inhibida por el tratamiento con agonistas dopaminérgicos en los prolactinomas humanos [146] y esto podría tener importantes efectos terapéuticos.

- ***Retroalimentación negativa de la PRL***: la PRL tiene una retroalimentación negativa de su propia secreción a través de receptores de PRL (PRL-R) presentes a nivel del hipotálamo y en las propias células lactotropas [147]. Los ratones deficientes en PRL-R desarrollan grandes tumores, incluso de mayor tamaño que aquellos observados en la deficiencia de RD2 [147]. Las lactotropas normales expresan mayores niveles del receptor RD2 comparadas con las células adenomatosas y los tratamientos con agonistas dopaminérgicos disminuyen la expresión de los mismos [148].

- ***Estrógenos***: el aumento en los niveles de estrógeno son directamente responsables de la hiperplasia de las células lactotropas (por ejemplo el agrandamiento hipofisario durante el embarazo) lo que a su vez repercute en un aumento de los niveles de PRL sérica [140]. Además se ha descrito que durante una estimulación prolongada con estrógenos, las células somatotropas y gonadotropas pueden cambiar su fenotipo y trans-diferenciarse a célula lactotropa tanto en situaciones fisiológicas como patológicas [149, 150].

Los anticonceptivos orales que contienen estrógenos no aumentan el riesgo del desarrollo de prolactinomas [151] y no están asociados con un aumento del tamaño tumoral, al menos cuando la administración de los mismos es por un corto tiempo [152]. Sin embargo el uso continuo de estrógenos ha sido implicado en la patogénesis de los prolactinomas en hombres transexuales [153]. En estudios experimentales, el tratamiento estrogénico se asoció con el aumento de numerosos factores, los cuales estuvieron relacionados con la promoción de la tumorigénesis, como por ejemplo, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el gen transformador de tumor

hipofisario (PTTG), la galanina, Pit-1, causando extensos adenomas en los roedores [117, 150, 154, 155].

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios que presentan niveles más altos en la concentración de los receptores estrogénicos α y β (REs), siendo aún mayores en los macroprolactinomas [156]. En un estudio sobre las variantes alternativas del RE α , se observó que la gran mayoría de los tumores analizados expresaron el receptor RE α clásico y múltiples variantes del mismo. El RE β también está expresado en las células lactotropas y el RNAm de este receptor, estuvo co-expresado con el del RE α y sus variantes alternativas. Los efectos mediados por estrógenos en la hipófisis normal y neoplásica parecen ser directamente dependientes de la expresión de las isoformas RE α y RE β , las cuales varían en sus actividades transcripcionales. Los mutantes dominantes negativos para el RE suprimen el crecimiento de la célula lactotropa, y el promotor de la PRL [157].

- **Proteína morfogenética del hueso (BMP-4):** la BMP-4 es una proteína perteneciente a la familia de factores de crecimiento TGF- β , cuyas acciones multifuncionales están involucradas en numerosos aspectos del desarrollo tisular y la morfogénesis [158]. BMP-4 está sobre expresada en prolactinomas, tanto en los inducidos experimentalmente por estrógenos como en humanos, en comparación con la expresión basal del tejido normal y otros adenomas hipofisarios. Esta proteína estimula la proliferación celular y se relaciona con la expresión de c-myc. La proteína smad-4 también está involucrada en la vía de señalización de los miembros de la familia del TGF- β y parece estimular la interacción entre los REs y BMP-4 [159].

- **Péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) y VIP:** el PACAP está presente en células hipofisarias normales y en todos los tipos de adenomas produciendo una respuesta positiva en términos de proliferación celular y síntesis hormonal en la mayoría de las líneas celulares hipofisarias, en los cultivos primarios adenohipofisarios y en los adenomas humanos. Los receptores de PACAP reconocen el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y pueden mediar los efectos del VIP en las células lactotropas [160]. Sin embargo, aún no está claro cuál es su rol en la tumorigénesis pituitaria.

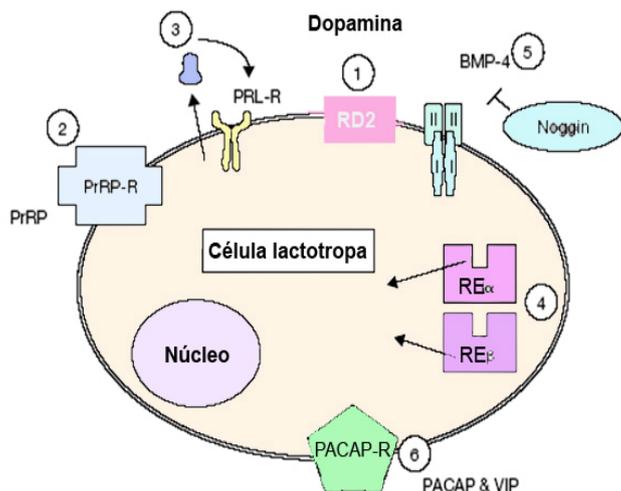


Fig. 17: Posibles mecanismos en la tumorigénesis de las células lactotropas: 1) Receptor de Dopamina, 2) Péptido liberador de PRL, 3) Retroalimentación negativa de la PRL, 4) Retroalimentación del estrógeno y receptores estrogénicos, 5) BMP-4, 6) PACAP y VIP [142].

Tratamiento Médico de los Prolactinomas

Principios generales

Los objetivos generales del tratamiento de los prolactinomas están orientados a suprimir los niveles excesivos de hormonas y sus consecuencias clínicas, restaurar la fertilidad, remover la masa tumoral, preservar la función adecuada del resto de la glándula hipofisaria, prevenir la progresión y evitar la recurrencia de la enfermedad [131, 136].

La elección del tratamiento adecuado estará basada en el tamaño tumoral, el grado de disfunción gonadal y los deseos del paciente respecto a la fertilidad [129]. La terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos es la primera línea considerada para todos los prolactinomas. Los agonistas dopaminérgicos aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) para su uso en Estados Unidos son la Bromocriptina (BC) y la Cabergolina. Ambos son muy efectivos en la normalización de los niveles séricos de PRL, en la reducción del tamaño de la masa tumoral y en la restauración de la función gonadal. La cirugía trans-esfenoidal no necesariamente asegura una cura a largo tiempo y puede recurrir la hiperprolactinemia [136].

Bromocriptina

Este agonista dopaminérgico se une a los receptores D2 ubicados en la membrana de las células lactotropas, inhibiendo la síntesis y secreción de PRL. La BC es un derivado del ergot y ha sido utilizado eficazmente desde 1978, en el tratamiento

de distintas entidades clínicas que resultan de la proliferación de células hipofisarias. Se han descrito diferentes efectos de su acción tales como la inhibición de la biosíntesis del ADN de las células hipofisarias, de PRL, GH, ACTH y la disminución en la secreción de estas hormonas a través de la inhibición de la producción de AMP cíclico y/o de la elevación del calcio citosólico [128]. También se describen efectos citotóxicos y antimitóticos, pero se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que, inducidos por bromocriptina, conducen a la muerte celular [161].

Bromocriptina tiene una potencia de alto grado y es utilizada por sus resultados en la normalización de los niveles de PRL en más del 90% de los casos y de una significativa reducción de la masa tumoral en aproximadamente el 85% de los casos que ocurre rápidamente dentro de las primeras semanas y es muy efectiva en la descompresión de los nervios ópticos en pacientes con macroprolactinomas [128]. Algunos tumores son muy respondedores a esta droga logrando una reducción del 80% de su tamaño dentro de las primeras seis semanas posteriores a la iniciación del tratamiento [136]. En algunas instancias, incluso, la lesión puede disminuir tanto su tamaño que se vuelve indetectable por los métodos diagnósticos de imagen [137]. Bromocriptina, también logra restaurar las funciones gonadales y de la hipófisis anterior en más de un 80% de los casos. La mayoría de las pacientes femeninas comienzan su menstruación luego de 6 meses de instaurada la terapia [136].

La administración de BC se comienza con dosis bajas de 1,25 a 2,5 mg por día, vía oral y se va incrementando las siguientes 2 a 3 semanas hasta alcanzar los 5 a 10 mg por día en dosis divididas. Luego de la normalización de los niveles séricos de PRL, la dosis puede ser reducida. La suspensión de la droga suele resultar en la recurrencia de la hiperprolactinemia y la reexpansión del tumor [136].

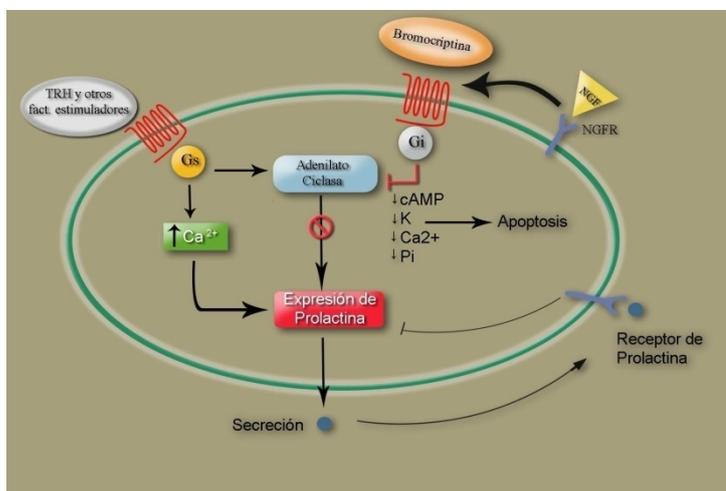


Fig.18: Mecanismo de acción de Bromocriptina, y la respuesta que induce al unirse al receptor dopaminérgico D2 [136].

Aproximadamente un 15% de los pacientes tratados con BC son parcial o completamente resistentes o presentan intolerancia a la terapia por lo cual deben requerir la cirugía [131]. Los efectos adversos asociados a la administración de esta droga incluyen náuseas, arritmias y molestias gastrointestinales. La hipotensión ortostática también puede limitar su tolerancia en algunos pacientes. Además, los agonistas dopaminérgicos pueden desencadenar algunos episodios psicóticos en pacientes que reciben medicación con neurolépticos [136].

Cabergolina y otros agonistas dopaminérgicos

Cabergolina es otro derivado del ergot de acción selectiva sobre los receptores D2 de vida media más prolongada que BC. Se ha usado efectivamente en el tratamiento de primera línea de los microprolactinomas y también de los macroprolactinomas. Aunque es más cara que la BC, se han descrito una mejor tolerancia y menor incidencia de sus efectos adversos. Parece además tener mayor eficacia que BC en la normalización de la prolactinemia y se utiliza en pacientes que han evidenciado resistencia a la BC o que no pueden tolerar sus efectos adversos. Se ha reportado además la remisión de la hiperprolactinemia luego de abandonar el tratamiento con lo que reviste un importante potencial curativo [128, 136].

Pergolida, lisurida y quinagolida son otros agentes que han demostrado disminuir los niveles de prolactina sérica, además de reducir el tamaño tumoral en pacientes con prolactinomas. Sin embargo el uso de estos fármacos aún no está normatizado por la FDA para el tratamiento de los prolactinomas [131, 136].

ROL DE LA MUERTE CELULAR EN LA REGRESIÓN DE LOS PROLACTINOMAS

Como describimos anteriormente, la muerte celular es un proceso fundamental en condiciones fisiológicas y patológicas, además de ser la responsable de la involución de los tumores hipofisarios en respuesta a los tratamientos.

En condiciones fisiológicas la hipófisis tiene la capacidad de regular sus poblaciones celulares para adaptarse a los requerimientos hormonales [119, 121, 149] manteniendo un delicado balance entre la proliferación y la eliminación de las células redundantes [118].

En la génesis de los prolactinomas se produce una alteración de este equilibrio a favor de la proliferación, pero hay evidencias de que la muerte celular es un factor importante ya que una vez provocada la lesión tumoral, la tasa de crecimiento de la misma es muy baja y alcanza un nuevo estado de equilibrio [150, 154, 155].

Es durante la regresión del prolactinoma inducida mediante la administración de agonistas dopaminérgicos, que la muerte celular es un proceso fundamental. Aunque en numerosas investigaciones se ha demostrado que BC provoca apoptosis como mecanismo de muerte [161-163], otros estudios han demostrado que este alcaloide induce llamativos cambios morfológicos y ultraestructurales, compatibles con un fenómeno necrobiótico que fue denominado como “células negras” [164, 165]. Sin embargo, este mecanismo de muerte no ha sido caracterizado de acuerdo a los criterios morfológicos y bioquímicos en vigencia. Tampoco se ha reportado la incidencia de cada tipo de muerte celular en la involución de los tumores hipofisarios. El juego entre los distintos mecanismos de muerte celular son los que determinan la respuesta terapéutica ante los efectos citotóxicos de la BC.

El éxito en los tratamientos con drogas que inducen la regresión del tumor, depende de la prevención a la resistencia de las mismas. Para ello es necesario comprender la forma en que los tumores se protegen de la inducción de la muerte celular. La posibilidad de focalizar los tratamientos que promuevan la activación de las vías de transducción de señales promotoras de la muerte celular es de sumo interés en la investigación sobre la etiopatogenia de la regresión tumoral.

Dentro de ellas, las PKC juegan un rol muy importante en la apoptosis de células adenomatosas y de las líneas celulares GH3B6 [166]. La vía de las MAPKs ha sido implicada en la transducción de una amplia variedad de señales extracelulares que están involucradas en la iniciación de la muerte celular por distintos agentes anticancerígenos y se describe su activación en diversos tratamientos con BC [167]. El factor de transcripción NF- κ B ha sido propuesto como un blanco farmacológico controversial en el tratamiento de cánceres epiteliales y hematopoyéticos ya que de acuerdo al tipo celular, la promoción o la inhibición de su activación evitan la resistencia a drogas anticancerígenas [113]. El papel que NF- κ B desempeña en la regresión de los prolactinomas no ha sido investigado aún.

Dada la importancia de la participación de la muerte celular en la regresión de los prolactinomas en respuesta a los tratamientos con BC, es importante investigar cuales son los mecanismos implicados en los diferentes tipos de muerte que pueden manifestar las células lactotropas. La identificación de moléculas que participan en las vías de señalización que regulan la población de estas células, podrían ser utilizadas como blanco terapéutico en la optimización del tratamiento de los prolactinomas.

OBJETIVO GENERAL

Establecer los mecanismos celulares y moleculares que participan en la muerte de células lactotropas en modelos de prolactinomas experimentales, luego del tratamiento con drogas que inducen la regresión del tumor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las variables funcionales que caracterizan a la población de células lactotropas durante la estimulación estrogénica y la administración de BC.
- Identificar ultraestructuralmente los diferentes tipos de muerte celular que dan como resultado la involución de los procesos proliferativos.
- Analizar parámetros bioquímicos y funcionales para diferenciar los mecanismos de muerte celular inducidos por BC.
- Interrelacionar la muerte de las células lactotropas con la expresión de distintas isoformas de PKC, ERK1/2 y p38.
- Analizar la regulación de la síntesis a nivel de los ARNm de las isoformas de PKC analizadas en el proceso de muerte celular inducido por BC.
- Establecer la distribución subcelular de PKC α , δ , ϵ , ERK1/2 y p38 en la involución del prolactinoma inducida por BC.
- Analizar la participación del factor de transcripción nuclear NF- κ B en la muerte de las células adenohipofisarias inducida por el tratamiento con BC.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELOS EXPERIMENTALES

Animales

En el presente trabajo de tesis doctoral se emplearon ratas macho de la cepa *Wistar*, de 3 meses de edad, con un peso promedio de 300 g, endocriadas y mantenidas en condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 3^\circ\text{C}$) y fotoperíodo (14h luz/10h oscuridad), con libre acceso a agua corriente y alimento balanceado comercial (Cargill, División Nutrición Animal, S.A.C.I., Córdoba) suplementado con semillas de girasol y avena.

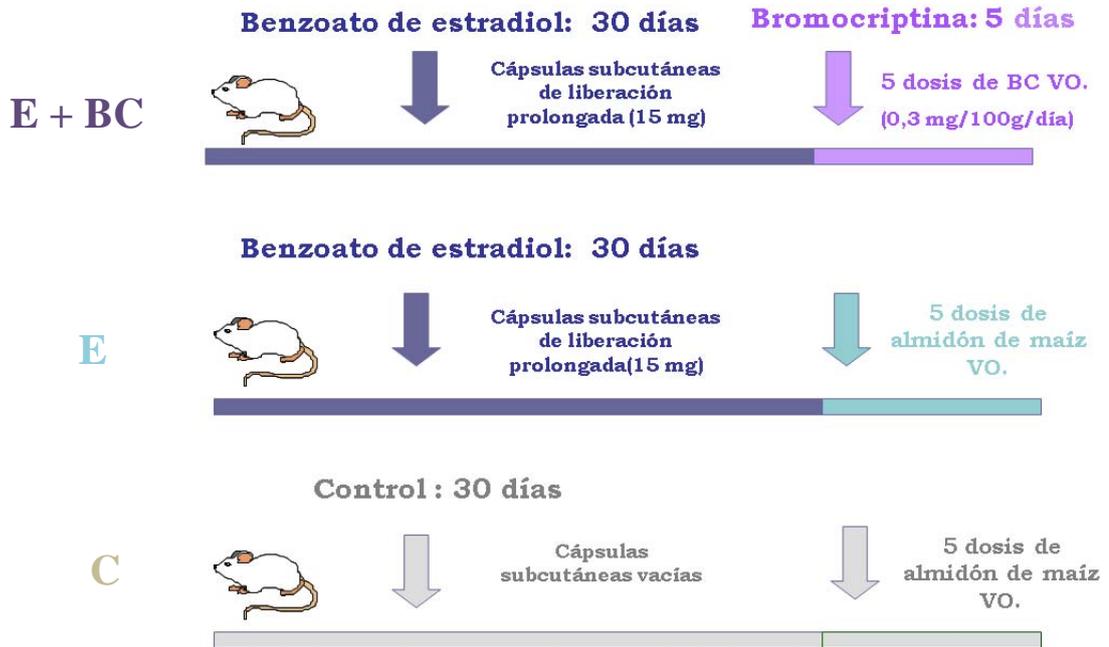
Ensayos in vivo

Considerando que la administración prolongada de estrógenos exógenos induce tumores hipofisarios [117, 150], se implantaron cápsulas subcutáneas de liberación prolongada a los animales intactos durante 30 días. Las cápsulas fueron realizadas con tubuladuras de silicona (Silastic, Dow Corning, Medical grade, Midland, MI, USA) las cuales se rellenaron con 10 mg de cristales de benzoato de estradiol (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y luego se sellaron con cemento silástico.

Veinticinco días posteriores a la implantación de las cápsulas, cuando la estimulación estrogénica indujo el desarrollo de un tumor hipofisario, los animales fueron divididos en dos grupos:

- 1) ***Tumor hipofisario tratado con Bromocriptina (E+BC)***: animales con tumores hipofisarios tratados por vía oral (VO) con mesilato de bromocriptina (BC) (Parlodel, Novartis, Buenos Aires, Argentina) con una dosis de 3 mg/kg de peso corporal/día, durante 5 días. La dosis de BC fue seleccionada de acuerdo a trabajos anteriormente realizados en ratas estrogenizadas [163, 168].
- 2) ***Tumor hipofisario sin tratamiento (E)***: animales con tumores hipofisarios que recibieron por VO almidón de maíz por 5 días, por ser éste el excipiente de los comprimidos comerciales de BC.

En forma paralela se realizó un **grupo Control (C)**, a cuyos animales se les colocaron las cápsulas de silástico vacías y se les administró almidón de maíz durante 5 días en reemplazo de la BC.



Dos horas después de la última administración de BC o vehículo, los animales fueron decapitados evitando cualquier estrés o estímulo externo de acuerdo a Las Guías Internacionales de Entrenamiento y Manejo de Animales de Laboratorio, publicadas por la Federación Universitaria para el cuidado de animales, y el Comité Institucional Local de Cuidado animal. Las hipófisis fueron y posteriormente procesadas para los estudios morfológicos, inmunocitoquímicos y bioquímicos. Además, se recogió sangre troncal para la determinación de PRL sérica (PRLs) por radioinmunoanálisis (RIA) y los niveles de Estrógeno circulantes por Electro quimioluminiscencia (EQLIA).

ABORDAJE DE LOS OBJETIVOS: DIFERENTES TÉCNICAS UTILIZADAS

Evaluación del modelo proliferativo inducido en hipófisis mediante estrogenización prolongada

- a) *Cuantificación morfométrica de la población de células lactotropas por inmunocitoquímica a nivel fotónico.*
- b) *Estudio ultraestructural de la progresión de la lesión hipofisaria inducida por los estrógenos.*
- c) *Determinación de los niveles séricos de PRL por RIA.*
- d) *Cuantificación de los niveles séricos de estradiol por EQLIA*

Caracterización morfológica y bioquímica de la muerte celular inducida con BC

- a) *Estudio morfológico y morfométrico ultraestructural de la población de células lactotropas.*
- b) *Detección de Apoptosis “in situ” por método de TUNEL*
- c) *Valoración del proceso apoptótico por evidencia de fragmentación intranucleosomal del ADN por electroforesis en gel de agarosa*
- d) *Valoración de la participación de caspasa 3 mediante análisis de la expresión de la misma por Western Blot (WB)*
- e) *Análisis de Polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP) por WB*

Participación de las isoformas de PKC en la muerte inducida por BC

- a) *Valoración de la expresión de isoformas α , β y δ de PKC en homogenatos totales de hipófisis y en fracciones subcelulares.*
- b) *Estudio de la localización subcelular de las distintas isoformas PKC mediante inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica y electrónica.*
- c) *Expresión de ARNm de PKC α , β y δ mediante la transcripción reversa por la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).*

Participación de las isoformas de MAPKs en la muerte inducida por BC.

- a) *Valoración de la expresión de p38 y ERK1/2, tanto la forma total como la fosforilada.*
- b) *Estudio de la localización subcelular de p38 y ERK1/2 por inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica y electrónica.*
- c) *Expresión de ARNm de p38 mediante RT-PCR*

Participación de NF- κ B en la muerte de las células adenohipofisarias inducida por el tratamiento con Bromocriptina

- a) *Valoración de la expresión de NF- κ B en extractos nucleares y citoplasmáticos mediante WB*
- b) *Análisis de la expresión de I κ B α y su degradación durante la activación de NF- κ B mediante WB*
- c) *Estudio de la localización subcelular de NF- κ B por inmunocitoquímica electrónica.*

TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS

Procesamiento para Microscopía Fotónica

Las hipófisis (n=3 por cada grupo experimental) fueron fijadas en formol tamponado en buffer fosfato al 4% durante 12 h respetando la proporción de fijador/muestra (20:1) para permitir una adecuada preservación morfológica del tejido. Luego las glándulas fueron lavadas dos veces con Buffer fosfato (PBS), deshidratadas en soluciones de alcohol etílico en concentraciones crecientes (50%, 70%, 90%, 100%), clarificadas en sucesivos pasajes de xilol y finalmente incluidas en parafina. Los cortes de los tejidos hipofisarios fueron realizados en un micrótopo (tipo Minot), con un espesor de 4 μm , montados en portaobjetos previamente tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano APES, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) y secados en estufa a 37° durante 24 h.

Esta técnica fue utilizada a los fines de realizar una observación de la histoarquitectura general de la glándula, la detección in situ de la muerte celular y la identificación de distintas moléculas mediante métodos inmunocitoquímicos.

Estudio inmunohistoquímico de secciones en parafina

En secciones del material incluido en parafina, se realizaron inmunomarcaciones para PRL, utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-PRL (PRL9) provisto por National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) y anti-p38 de Santa Cruz, Biotechnology, USA.

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo biotinilado (Laboratorios Vector, Burlingame, CA, USA), como amplificador de señal el sistema avidina-biotina (ABC) (Vectastain ABC Kit, Laboratorios Vector USA) y como revelador el cromógeno diaminobencidina (DAB) (3,3'diaminobenzidina- tetrahidroclorida- Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA).

Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón fosfato salino-albúmina bovina al 1% (PBS-BSA) empleándose las siguientes concentraciones:

- anti-PRL: 1:3.000

- anti-p38: 1:300

A continuación se detalla la técnica inmunohistoquímica aplicada:

<i>- Desparafinar e hidratar</i>	
Xilol	3 pasajes de 5 min c/u
Alcohol	5 min
PBS	5 min
<i>-Permeabilizar</i>	
Tritón X	0,5% por 20 min
Lavar con PBS y aspirar exceso de líquido	
<i>Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena</i>	
H ₂ O ₂ (Baker)	3% en metanol por 5 min
Lavar en PBS	2 lavados de 5 min cada uno
<i>Bloqueo de uniones no específicas</i>	
PBS-BSA	1% a temperatura ambiente (TA) por 30 min
<i>Incubación con anticuerpo primario</i>	
1 h a TA y posteriormente toda la noche a 4°C	
Lavar con PBS	3 veces, 5 min cada uno
Bloquear con PBS-BSA al 1%, durante 15 min a TA	
<i>Sistema de revelado</i>	
Antisuero secundario biotinilado, diluido 1:150 en PBS por 30 min a TA	
Lavar con PBS	3 veces, 5 min cada uno
Sistema ABC, en una dilución de 1:100 en PBS durante 1 h a TA	
Lavar con TRIS- HCl 0,2 M pH 7.6	
DAB (5 mg de DAB en 10 ml de TRIS/HCl 0,2 M pH 7.6) con 0,001% de H ₂ O ₂ .	
<i>Contracoloración</i>	
Hematoxilina para inmunomarcaciones citoplasmáticas	
Verde de metilo para inmunodetecciones nucleares.	
<i>Deshidratar</i>	
<i>Montar</i> Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania)	

Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, los controles negativos fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en reemplazo de los anticuerpos primarios.

Análisis morfométrico de la población de células lactotropas

A fin de determinar la población de células lactotropas, las inmunomarcaciones se realizaron en secciones de hipófisis incluidas en parafina. De cada una de las hipófisis de los diferentes grupos experimentales se realizaron cortes seriados y se recogieron , 5 secciones de los sectores superior, medio e inferior de la glándula.

El análisis morfométrico se realizó sobre micrografías obtenidas en un microscopio Zeiss Axioskop 20 a una magnificación de 400X. Se contaron todas las lactotropas cortadas a través del núcleo. De esta forma se determinó el porcentaje de células inmunomarcadas para PRL en relación al total de células contadas (3.600 células) y los resultados fueron agrupados para cada animal individual. Esto permitió evaluar los cambios que ocurren en esta población celular en los distintos grupos experimentales.

Detección de Apoptosis in situ

Los sitios de fragmentación del ADN que se producen durante el proceso de apoptosis, pueden ser detectados por inmunocitoquímica y localizados *in situ* mediante el método de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) descrito por Gavrieli y colaboradores [169]. La particularidad de estos fragmentos es el predominio de terminales 3'OH libres en cadenas simples o dobles de ADN, que pueden ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína por acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El heteropolímero formado se pone de manifiesto mediante la aplicación de un anticuerpo anti- fluoresceína conjugado con una enzima peroxidasa, responsable de generar la señal a partir un sustrato cromogénico (DAB) (figura 19).

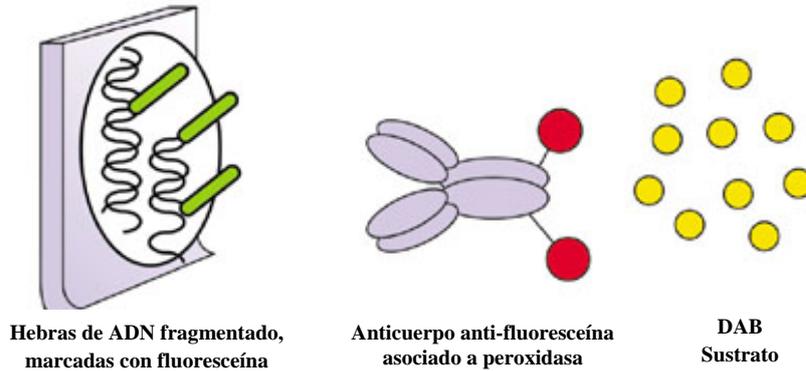


Fig. 19. Esquema extraído del protocolo del kit comercial: “In situ” Cell Death detection Kit-POD. Roche, Mannheim, Alemania.

Las secciones tisulares se desparafinaron e hidrataron. Posteriormente se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada durante 5-10 minutos. La permeabilización del tejido se realizó efectuando la digestión enzimática con Proteinasa K libre de nucleasa (Roche, Mannheim, Alemania) a una dilución de 20 µg/ml en TRIS/HCl 10mM, pH 7,4-8. Luego se lavó dos veces con PBS y se procedió a la aplicación del Kit comercial siguiendo las instrucciones sugeridas por los fabricantes (*In Situ Cell Death Detection Kit, POD*. Roche, Mannheim, Alemania). Como *control positivo* se utilizaron cortes de próstata en involución (48 horas post orquidectomía) procesados de la misma manera que las glándulas hipofisarias. Los *controles negativos* se realizaron en cortes histológicos de la glándula, sometidos a las mismas condiciones de reacción pero reemplazando la enzima TdT por agua destilada.

Las secciones histológicas fueron analizadas en un microscopio fotónico Zeiss Axioskop a una magnificación de 400X. El porcentaje de células apoptóticas de la hipófisis anterior se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de apoptosis: } \frac{\text{células TUNEL-positivas}}{\text{total de células de la hipófisis anterior}} \times 100.$$

El conteo se realizó sobre fotografías de tres secciones distintas obtenidas de cada uno de los tres niveles de la glándula, hasta completar un número de 3.600 células por cada animal.

Procesamiento para Microscopía Electrónica

Procesamiento de las glándulas hipofisarias

La ultraestructura de la población de las células adenohipofisarias y los diferentes procesos de muerte celular se estudiaron en tres hemi-hipófisis por cada modelo experimental. Los tejidos fueron fijados por inmersión en glutaraldehído al 2% (v/v) y formaldehído el 4% (w/v) en buffer cacodilato 0,1 M durante 4 horas a TA. Posteriormente fueron tratados con tetróxido de Osmio al 1%, deshidratados en una serie creciente de acetonas e incluidas en resinas epóxicas compuestas por:

- Araldita 506 (48,5%)
- Anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) (48,5%)
- Diobutilftalato (DBP) (0,5%)
- Acelerador dimetilaminobenceno (BDMA) (2,5%)

La inclusión fue realizada de la siguiente manera:

- 1- ***Infiltración*** en una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona 100%
- 2- ***Pre- inclusión*** en una mezcla de Araldita a temperatura ambiente durante 6-8 h.
- 3- ***Inclusión final*** en Araldita a 60°C durante 24 h.

Corte y coloración

Las secciones ultrafinas de 80- 100 nm de espesor, obtenidas con un ultramicrotomo JEOL JUM-7 (Nikon, Tokyo, Japón) con cuchilla de diamante, se montaron sobre grillas de níquel de 250 mesh.

Los cortes se contrastaron con solución alcohólica saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo [170]. Posteriormente fueron observados con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E equipado con una cámara digital Megaview III (Oberkochen, Alemania).

Análisis morfométrico ultraestructural

El análisis morfométrico ultraestructural fue realizado sobre micrografías electrónicas obtenidas de cortes de tres diferentes niveles de la glándula hipofisaria de cada animal, en todos los grupos experimentales. Para evitar contar por duplicado la misma célula, sólo se montó una sección grande de cada bloque en una grilla de níquel. Luego, se tomaron 20 micrografías al azar en cada sección a una magnificación de 4.500X cubriendo un total de 1.000 células por animal.

Se consideraron *células muertas* aquellas que presentaron uno o más de los siguientes signos de irreversibilidad:

- Acumulación de la cromatina con la formación de gránulos grandes (speckles)
- Pérdida de la integridad de la membrana plasmática
- Abalonamiento de las mitocondrias con disrupción de las crestas
- Evidencia de cuerpos apoptóticos en las células adyacentes

El número de células muertas fue calculado en cada animal y estas observaciones fueron consideradas estadísticamente como datos independientes para calcular la media de los grupos.

Inmunolocalización a nivel ultraestructural

Para realizar la inmunocitoquímica a nivel ultraestructural, tres hemi-hipófisis de cada grupo experimental se fijaron por inmersión con 2% (v/v) de glutaraldehído y 4% (w/v) de formaldehído en buffer cacodilato 0,1 M con pH 7,3 durante 5-6 h a TA. Se omitió la postfijación con tetróxido de Osmio. Posteriormente los tejidos se deshidrataron en etanol: 50°, 70°, 90° durante 15 min en cada uno de ellos y luego se incluyeron en resina acrílica LR White (The London Resin Co. Berkshire, Reino Unido), con previa pre-inclusión en una mezcla de partes iguales de resina y alcohol por 2 h. Los materiales se llevaron a estufa durante 24 h para que las resinas polimericen.

Técnica Inmunocitoquímica

Las hipófisis incluidas fueron seccionadas en un ultramicrotomo Jeol JUM-7 con cuchilla de diamante y se obtuvieron secciones de 80 nm de espesor (color de

interferencia de la luz dorado). Los mismos se montaron en grillas de níquel de 250 mesh. Los cortes se inmunomarcaron en cámara húmeda sobre gotas de los reactivos depositados sobre parafilm. Los anticuerpos utilizados estuvieron dirigidos para identificar PRL o las proteínas que se detallan a continuación, de acuerdo a protocolos desarrollados en nuestro laboratorio [119].

- Bloqueo con PBS/ABS al 1% por 15 min a TA.
- Incubación con anticuerpo primario toda la noche a 4°C.

anti-PRL: 1/3.000

anti-PKC δ : 1/300

anti-P-p38: 1/300

anti-P-ERK1/2: 1/300

anti-NF- κ B: 1/500

Los sitios inmunoreactivos fueron revelados con inmunoglobulinas IgG marcadas con oro coloidal anti conejo (1:20) o anti ratón (1:15) según corresponda al anticuerpo primario utilizado durante 1 h a 37° C. Para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por albúmina bovina al 1% en PBS, seguido del correspondiente anticuerpo secundario.

Radioinmunoanálisis (RIA)

Las determinaciones de PRL por RIA se practicaron en sueros de los animales estudiados de acuerdo a la técnica del doble anticuerpo desarrollada por Niswender y colaboradores [171], con modificaciones propuestas por el NIDDK. Las muestras fueron cuantificadas por duplicado y utilizando diferentes dosis de anticuerpo.

Los reactivos fueron agregados en la siguiente secuencia:

1- PBS-BSA al 0.5% pH 7.

2- Hormona estándar u hormona problema (H). Como hormona de referencia se usó PRL de rata-RP-3 (potencia biológica equivalente a 30 IU/mg.

La hormona problema procede de sueros recogidos según lo detallado en diseño experimental de materiales y métodos.

3- Anticuerpo primario (Ac1°): se utilizó γ -globulina de conejo anti-PRL de rata en concentraciones determinadas por el test de binding.

4- Hormona iodada o marcada (H*). La PRL de rata fue iodada con I¹²⁵ aplicando la técnica de cloramina T. Este agente oxidante permite la incorporación de los yoduros a grupos tirosina de la proteína antigénica.

Los reactivos especificados, PBS-BSA, H, Ac1°, H*, se mezclaron y mantuvieron a TA durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se incuban con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti- γ globulina de conejo) durante 24 h a temperatura ambiente. Al cabo de esta etapa, se elimina la H* libre por centrifugación y la radiactividad (c.p.m) residual del precipitado es referida a una curva de calibración construida con diluciones conocidas de la hormona de referencia y analizada simultáneamente con las muestras problemas.

Los resultados fueron expresados en términos de la prolactina de rata RP-3.

Todas las muestras correspondientes al mismo protocolo experimental fueron dosadas por duplicado y en forma simultánea para evitar variaciones íter-ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo fue, en todos los casos, inferior al 10%.

Los reactivos utilizados para el dosaje de PRL, a excepción del anticuerpo secundario, fueron provistos por el NIDDK, Bethesda, Estados Unidos de Norteamérica.

Inmunoensayo por Electro quimioluminiscencia (EQLIA)

Los niveles séricos de estrógenos fueron medidos para monitorear la efectividad de la estimulación inducida por los estrógenos implantados en las cápsulas subcutáneas y con el objeto de verificar que el proceso de muerte celular no se debió a variaciones en los niveles séricos de estradiol.

Para ello se cuantificaron los niveles de estradiol por EQLIA mediante un kit comercial de Laboratorios Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Alemania), utilizando el Sistema comercial Elecsys 2010 (Elecsys Corporation, Lenexa, KS). Con fines estadísticos se obtuvo el suero de tres animales por cada grupo experimental, en tres experimentos independientes.

Aislamiento de ADN y ARN

El ADN total y el ARN fueron extraídos de las hipófisis de cada grupo experimental de acuerdo a la metodología desarrollada por Chomczy [172], utilizando TRIzol (Fenol saturado 38%, Tiocianato de guanidia 0,8M, Tiocianato de amonio 0,4M, Acetato de Sodio 0,1M pH 5, glicerol 5%) de acuerdo a los protocolos del fabricante (GIBCO; Carlsbad, USA).

Las hipófisis se recogieron y se lavaron en TRIzol. Posteriormente se homogeneizaron en un homogenizador de tejidos Potter-Elvehjem de vidrio y teflón con 1ml de TRIzol. Al homogenato se le agregaron 200 µl de cloroformo se agitó vigorosamente y se dejó en reposo a TA. Luego de 5 min se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C a fin de separar la fase superior acuosa, la cual contiene el ARN de la muestra, y la interfase que corresponde al ADN.

Extracción del ARN

Se removió la fase acuosa sobrenadante y se le adicionó 1 volumen (vol) de isopropanol, dejándose en reposo 10 min a TA. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido en etanol al 80%, centrifugado a 7.000 rpm durante 15 min y resuspendido en agua bidestilada tratada con dietilpirocarbamato (DEPC).

Se diluyó convenientemente la solución de ARN total y se efectuó la medida espectrofotométrica a 260 nm a fin de cuantificar el rendimiento considerando que 1 U de absorbancia a 260 nm es equivalente a 40 µg/ml de ARN. También se determinó la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm para evaluar la calidad de la muestra. Posteriormente se realizó una electroforesis rápida en gel de agarosa al 1% (Sigma,

Chemical Co. St. Louis, MO, USA), bromuro de etidio 5×10^{-5} mg% en buffer TAE (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,001 M pH 7,2) utilizando esta misma solución como buffer de corrida suplementando con bromuro de etidio 5×10^{-5} mg% para comprobar la integridad de los ARN ribosomales 18 y 28 S de las muestras de ARN total al ser visualizados en transiluminador ultravioleta a 254 nm.

Extracción de ADN

Luego de recoger la fase acuosa para la extracción de ARN, la interfase se precipitó con etanol y centrifugó a 2.000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fenol-etanol fue removido y el pellet correspondiendo al ADN, se lavó dos veces en una solución que contiene 0,1 M de Citrato de Sodio en etanol al 10%. Durante cada lavado, el ADN fue reservado en esta solución 15 min a TA con agitación periódica y luego fue centrifugado a 2.000 rpm por 5 min a 4°C. Finalizados estos dos lavados, la muestra se trató con 6 µg ARNasa A (Roche, Mannheim, Alemania). El ADN fue resuspendido en etanol al 75%, mantenido 20 min a TA, seguido de una centrifugación de 2.000 rpm por 5 min a 4°C, y luego secado al aire 15 min y disuelto en NaOH 8 mM. Para remover el material insoluble, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 min y los sobrenadantes fueron solubilizados en NaOH 8 mM ajustando el pH con Hepes entre 7 y 8.

Las muestras de ADN de cada grupo experimental fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2% preparada en buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA) y visualizadas mediante la utilización del bromuro de etidio de la misma manera que en el caso del ARN (5×10^{-5} mg%). Como control positivo del patrón en escalera correspondiente a la apoptosis, se extrajo el ADN de extractos de próstata ventral 40 hs post orquidectomía y se corrió en paralelo a las muestras de hipófisis (figura 20).

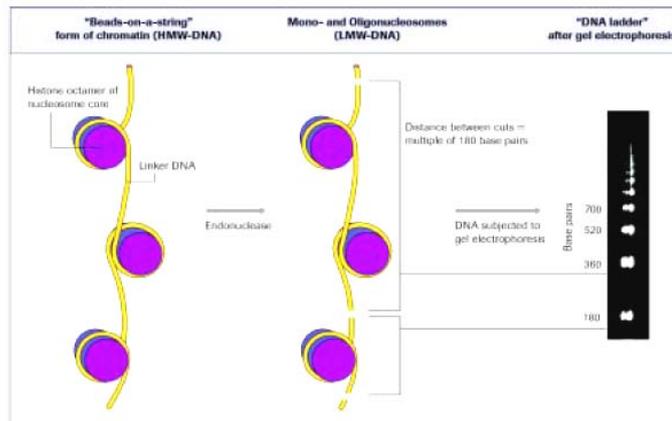


Fig. 20. Esquema extraído del manual “Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation” Roche Applied Sciences. 3ra edición. Roche, Mannheim, Alemania.

RT-PCR

La transcripción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de PKC α , β y δ y p38 MAPK fue determinada en el ARN extraído de las hipófisis normales y tumorales por el siguiente análisis de RT-PCR.

Preparación de la sonda de ADN complementario (ADNc) de isoformas de PKC y p38

El ARN total (2 μ g) fue transcrito de manera reversa en 20 μ l de una solución que contiene 0.5 μ g of Oligo (dT) 12–18 utilizado como “*primer*” (Invitrogen), 40U del inhibidor de la Ribonucleasa Recombinante (RNaseOUT, Invitrogen) y 200U de la Transcriptasa Reversa Superscript II (Invitrogen).

Amplificación del ADNc (PCR)

La PCR se realizó utilizando “*primers*” específicos (Invitrogen) diseñados en nuestro laboratorio para PKC α de rata (sentido, 5’AGG AAG CCC AAA CAG AAA ACA AAG AGA G 3’, antisentido 5’ ATT ACT GAT GGC ACC CTG GAT TGA AGA G 3’) resultando en un producto de PCR de 386 pares de bases (bp), PKC ϵ de

rata (sentido, 5' CGG AAA CAC CCT TAT CTA ACC CAA CTC T 3', antisentido 5' AGC CAT CAT CTC GTA CAT CAG CAC TC 3') cuyo producto es de 612bp y PKC δ de rata (sentido, 5' ACG AGT TCA TCG CCA CCT TCT TTG 3', antisentido 5' ATC TTG CCA TAG GTC CCG TTG TTG 3') con un producto de 417bp, p38 α de rata (sentido 5' TTT GGA CTC GGA TAA GAG GAT CAC A 3', antisentido 5' AAC GGA CAG ACA GAC AGA CAC ACA C 3'). Como un control interno se utilizaron "primers" para detectar β -actina (sentido 5' CGG AAC CGC TCA TTG CC 3'; antisentido 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'). La amplificación se realizó con 3 μ l de ADNc en 20 μ l de reacción de PCR que contiene 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM of dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos), 0,25 μ M de "primers" sentidos y antisentidos (Invitrogen) y 2U de la ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen) en buffer provisto por Invitrogen. Las muestras se corrieron en un Cyclor PCR System (Bio-Rad). El protocolo de termociclado para todos los "primers" fue el siguiente: 96°C por 4 min, 28 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 s, hibridación a 65°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min; con una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR (2 μ l) fueron separados en geles de agarosa al 1% y visualizados con bromuro de etidio. En todos los experimentos se incluyeron muestras de ARN sin transcripción reversa como controles negativos. La intensidad de las bandas a partir de los ensayos de RT-PCR fue determinada por escaneo densitométrico (Scion Image software, Scion Corp., NIH).

Preparación de extractos totales de adenohipófisis

Se recogieron cinco adenohipófisis de cada grupo experimental estudiado (en un total de tres experimentos independientes), se lavaron en 2 ml de buffer de lisis (25 mM Tris / HCl (pH 7,5), 150 mM Na/Cl, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes / KOH, 1,25% Igepal CA-630, 2mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 10 μ g/ml leupeptina, y 10 μ g/ml aprotinina) y se homogeneizaron en 2 ml de este mismo buffer en homogenizador de vidrio-teflón a 4°C. El homogenato fue centrifugado a 14.000 rpm por 20 min a 4°C para descartar el material insoluble al Igepal y se recogieron los sobrenadantes que fueron luego alicuotados y conservados a -20°C hasta su posterior utilización para la medición de proteínas y western blot.

Preparación de extractos subcelulares

Los extractos nucleares y citoplasmáticos de las glándulas adenohipofisarias de ratas machos se prepararon de acuerdo al método de Sugawara y colaboradores [173] con modificaciones. Para ello se realizó un pool de cinco glándulas de cada grupo experimental (en un total de 3 experimentos independientes).

La técnica consiste en los siguientes pasos:

Las glándulas fueron homogeneizadas a 4°C en 2 ml de un *buffer de homogeneizado* que contiene sucrosa 0,3 M, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y Hepes/KOH 10 mM (pH 7,5). El homogenato se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante, correspondiente a la *fracción citoplasmática*, se alicuotó y congeló a -20°C para posteriores cuantificaciones.

El pellet fue resuspendido en 2 ml de *buffer de lavado* compuesto por sucrosa 0,3M, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), DTT 1 mM y PMSF 0,1 mM. Luego se agregaron 75 ml de Igepal CA-630 10% y la solución fue incubada en hielo por 10 min y centrifugada a 250 rpm por 5 min. El pellet fue nuevamente lavado con el buffer de lavado y resuspendido en 2 ml de un *buffer de extracción* que contiene HEPES 20 mM (pH 7,8), KCL 0,6 M, ZnCl₂ 0,02 mM, EGTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,1 mM. La suspensión fue centrifugada a 20.000 rpm por 30 min a 4°C y el sobrenadante correspondiente al *extracto nuclear* congelado a -20°C hasta su uso en los análisis de WB.

La medición de las proteínas, tanto de los homogenatos totales como de las distintas fracciones subcelulares se basó en el método de Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad; Hercules, USA).

Western Blot

La expresión de diferentes proteínas celulares como caspasa 3, PARP, distintas isoformas de PKC, p38 y ERK1/2 fue evaluada mediante la técnica de WB, en lisados totales y en extractos nucleares y citoplasmáticos de los grupos experimentales en estudio.

Separación electroforética de proteínas por pesos moleculares en condiciones desnaturalizantes

Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, usando una concentración del 4% en el gel concentrador y 12% en el gel de corrida. Las dimensiones de los geles fueron 8,2 cm x 5 cm x 1,5 mm (Miniprotean II, Bio Rad) donde se sembraron 35 µg/ml de proteínas para las determinaciones en homogenatos totales, 20 µg/ml de la fracción nuclear y 30 µg/ml de la citoplasmática.

Por cada 100 µl de la muestra se agregaron 20 µl de buffer de muestra 6x (Tris-CIH 0,35 M pH 6,8; glicerol 30%, SDS 10%; DTT 9,3%, azul de bromofenol 0,12 mg/ml). Posteriormente, se calentaron a 100°C durante 5 min. La corrida electroforética se realizó a 30 mA utilizando la fuente de Bio-Rad Power-Pack 200.

Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó una mezcla de proteínas de peso molecular conocido (Full Range Rainbow Molecular Weight, Amersham Pharmacia Biotech).

Transferencia e inmovilización a un soporte sólido.

Completada la electroforesis se realizó la transferencia. Una porción de membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de poro. Hybond ECL Amershan.), con una dimensión similar al gel, se equilibró durante 15 min en la solución preparada de acuerdo a Towbin y colaboradores [174] compuesta por 25 mM Tris, 192 mM de Glicina y 20% de metanol. Posteriormente se pusieron en contacto la membrana con el gel de poliacrilamida y en una cuba (Bio-Rad) de 3.000 ml de capacidad se efectuó la transferencia durante 1 h a 300 mA, con agitación constante.

Formación y detección del complejo antígeno-anticuerpo

Los siguientes pasos fueron realizados sobre las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas:

- Bloqueo de sitios de unión no específica: con PBS-Tween 20 (0,1%)-leche 5%; 1h en agitación a TA.

- Incubación con **anticuerpo primario**: diluido en PBS-Tween-20 (0,1%)-leche 5% durante 2 h a 37°C, en agitación. Se emplearon los siguientes anticuerpos en las diluciones que se detallan a continuación:

- *anti-Caspasa 3*: 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- *anti-PARP-1*: 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- *anti PKC α* : 1/300 (monoclonal de ratón anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)
- *anti PKC ϵ* : 1/500 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)
- *anti PKC δ* : 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)
- *anti p38*: 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)
- *anti p38 fosforilado (P-p38)*: 1/700 (monoclonal de ratón anti-rata, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA)
- *anti ERK1/2*: 1/200 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)
- *anti ERK1/2 fosforilada (P-ERK1/2)*: 1/700 (monoclonal de ratón anti-rata, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA)
- *anti NF- κ B*: 1/700 (monoclonal de ratón anti-rata ABCam, Washington USA)
- *anti I κ B α* : 1/500 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)

- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación a TA.

- Incubación con **anticuerpos secundarios diluidos en PBS-Tween20** (0,1%)-leche 5% por 1 h en agitación a TA:

- *anti-conejo* unido a peroxidasa (Jackson Immunoresearch Labs Inc, West Grove, PA, USA) 1/5.000
- *anti-ratón* unido a peroxidasa (PIERCE, USA) 1/2.500

- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, con agitación.

- Incubación con agente de detección quimioluminiscente (Kit ECL Amersham).

- Exposición de la membrana a una placa fotográfica para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de los blots de las proteínas (Hyperfilm ECL Amersham).

- Revelado y fijación de la placa fotográfica (Kodak).

Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados obtenidos mediante western blot fueron analizados con el programa Scion Image ver. Beta 4.0.2 adaptado para PC.

A los fines estadísticos, los films fueron cuantificados densitométricamente por triplicado.

Análisis estadístico

Para cada grupo experimental se utilizaron 3 animales cuando se aplicaron métodos morfométricos, y 5 animales para los homogenatos y fraccionamientos subcelulares. Los mismos protocolos se repitieron al menos 3 veces bajo similares condiciones experimentales para verificar la reproductibilidad de los resultados.

Los datos morfométricos, serológicos y densitométricos obtenidos se analizaron utilizando el programa Infostat mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido por comparación de las diferencias entre medias aplicando el test de Tukey, aceptando valores significativos $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

Evaluación del modelo proliferativo inducido mediante estrogenización prolongada.

Cuantificación Morfométrica de la población de células lactotropas.

La población de células lactotropas de la glándula hipófisis fue evaluada a través de la inmunomarcación de PRL a nivel de microscopía fotónica (figura.21). Se contaron las células inmuno-reactivas para PRL en secciones correspondientes a 3 niveles diferentes de cada adenohipófisis (n=3/grupo).

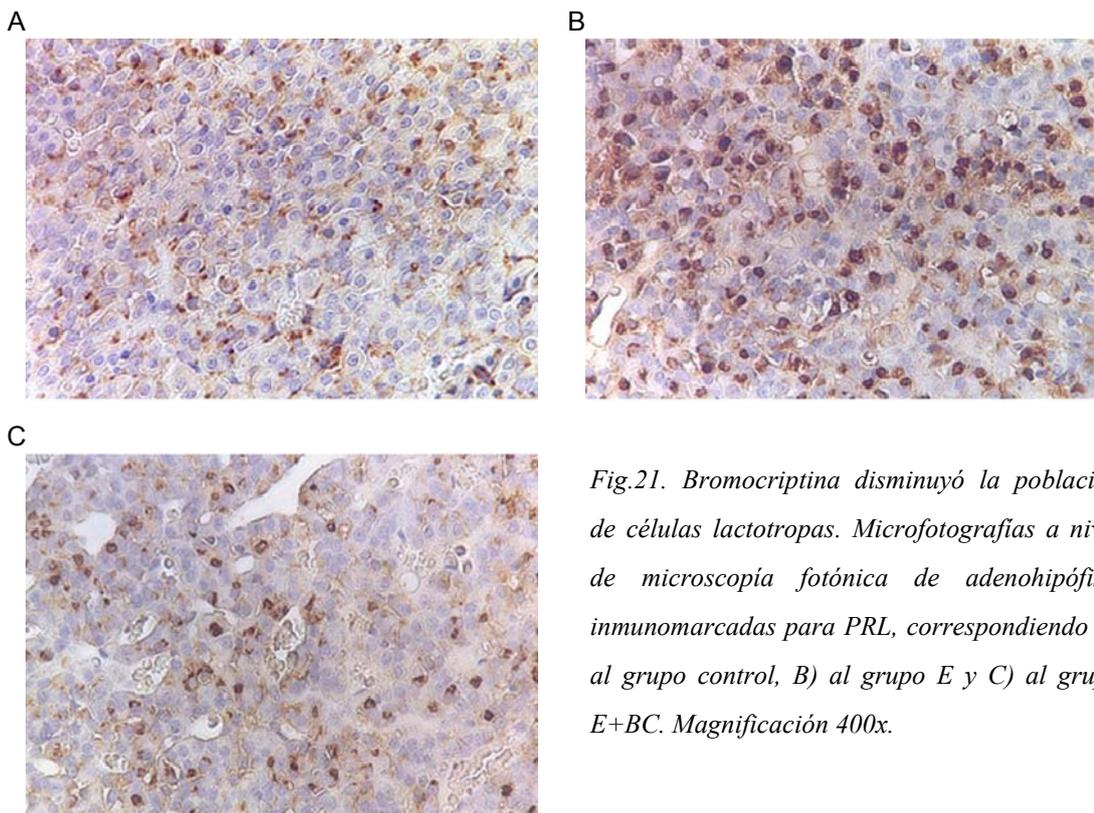


Fig.21. Bromocriptina disminuyó la población de células lactotropas. Microfotografías a nivel de microscopía fotónica de adenohipófisis inmunomarcadas para PRL, correspondiendo A) al grupo control, B) al grupo E y C) al grupo E+BC. Magnificación 400x.

El análisis morfométrico de las células inmuno-marcadas se muestra en la figura 22. El tratamiento estrogénico aumentó significativamente ($p<0,001$) el número de células lactotropas, las que correspondieron al 30% del total de células contadas. El tratamiento con BC revirtió el número de células lactotropas respecto al grupo E ($p<0,001$), alcanzando valores similares a los del grupo control.

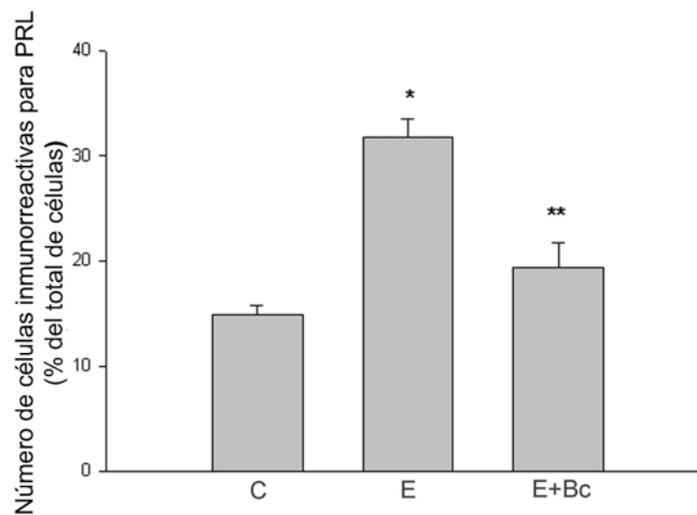


Fig.22. Bromocriptina disminuyó la población de células lactotropas. Células inmuno-reactivas contadas a nivel de microscopía óptica y expresadas como porcentaje del total de la población adenohipofisaria. El tratamiento estrogénico (E) indujo un significativo aumento en el número de células lactotropas (* $p<0,001$ versus C), la administración de BC (E+BC) produjo una marcada disminución del mismo (** $p<0,001$ versus E) el cual alcanzó valores similares al grupo control ($p>0,05$ versus C). El número de células lactotropas fue establecido de un total de 3.600 células en cada animal. Datos analizados por ANOVA seguido de Test Tukey.

Detección de PRL por radioinmunoensayo (RIA)

Para determinar los efectos de la exposición prolongada al estrógeno y del tratamiento con BC sobre la secreción de PRL los niveles séricos de esta hormona fueron determinados por RIA.

La administración de estrógeno durante 30 días indujo un aumento significativo ($p<0,001$) en la PRL sérica, alcanzando valores de $218,21 \pm 29,96$ pg/ml, en comparación a los controles, los cuales fueron de $46,14 \pm 5,85$ pg/ml. Hubo una estrecha correlación entre el incremento de la población de células lactotropas y la hiperprolactinemia en el grupo E. La BC indujo un descenso significativo ($p<0,001$) en la PRL sérica respecto a las ratas estimuladas con estrógeno alcanzando valores de $15,26 \pm 1,06$ ng/ml que fueron menores a aquellos detectados en el grupo control.

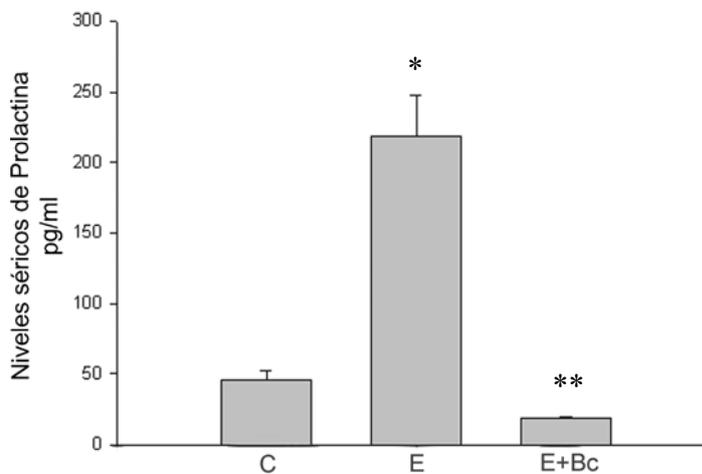


Fig. 23. Bromocriptina indujo disminución de la prolactinemia. Valores séricos de PRL determinados por RIA de los distintos grupos experimentales. La administración prolongada de estrógenos (E) indujo un aumento significativo en los niveles de PRL respecto al grupo C ($*p<0,001$), alcanzando cifras de hiperprolactinemia. La administración con BC (E+BC) provocó una significativa disminución de los mismos respecto al grupo E ($***p<0,001$).

Niveles circulantes de estradiol en los grupos experimentales.

Para asegurar que el fenómeno de muerte celular fue inducido por la administración de BC y no por fluctuaciones en los niveles séricos de estrógeno, determinamos los niveles de estradiol por EQLIA.

En las ratas controles, el valor de la media fue de $73,00 \pm 36,46$ pg/ml, mientras que en ratas tratadas con cápsulas subcutáneas de benzoato de estradiol, los niveles alcanzaron valores de $1.200,00 \pm 171,95$ pg/ml. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de estrógeno circulante entre las ratas tratadas con BC y aquellas que sólo estuvieron sometidas a la estimulación hormonal lo cual indicó que la muerte celular fue inducida por BC (figura 24).

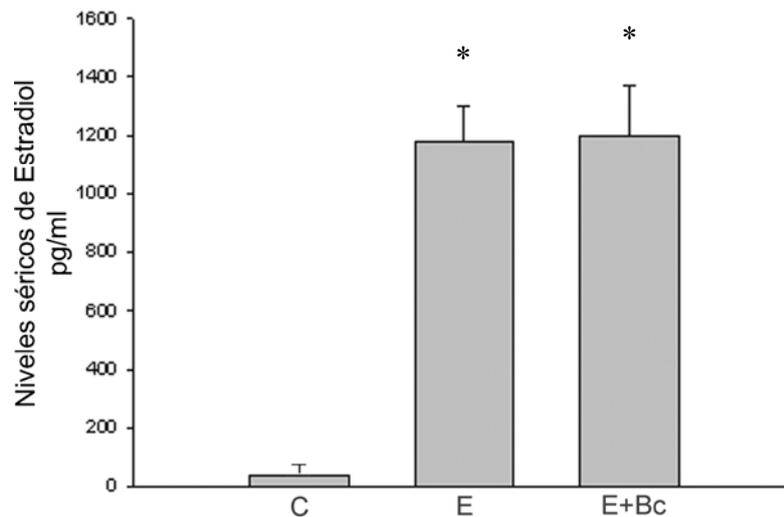


Fig. 24. Los niveles estrogénicos inducidos mediante la aplicación de benzoato de estradiol no fueron modificados por la administración de BC. Niveles séricos de estradiol determinados mediante EQLIA en sangre troncal de los distintos grupos experimentales. Los grupos E y E+BC se diferenciaron significativamente del grupo C (* $p < 0.001$) pero no se registraron diferencia entre ellos mismos.

Análisis Ultraestructural de la glándula hipofisaria. Caracterización de la lesión proliferativa y de la muerte celular inducida por BC.

La microscopía electrónica sigue siendo un excelente método para la identificación de cambios morfo-funcionales de las células y la detección de aquellas características específicas que evidencian muerte celular. El análisis ultraestructural en nuestros modelos experimentales permitió la observación de diferentes respuestas en la población de las células lactotropas, causadas tanto por el tratamiento estrogénico como por la administración de BC.

La delicada organización ultraestructural de las lactotropas ha sido descrita en detalle en trabajos previos realizados en el Centro de Microscopía Electrónica [150, 175] en donde se pusieron en evidencia las distintas sub-poblaciones de la glándula hipofisaria en diferentes contextos hormonales. Las observaciones realizadas en el siguiente trabajo fueron coincidentes con aquellas anteriormente descritas. En las ratas macho del grupo control, la subpoblación predominante de células lactotropas estuvo caracterizada por presentar gránulos secretorios esféricos de 200–250 nm (tipo II) y 100 nm (tipo III) de diámetro.

La administración de estrógenos por 30 días estimuló intensamente las células hipofisarias, especialmente a la población de las células lactotropas. Estas células exhibieron un llamativo desarrollo de organelas involucradas en la síntesis de proteínas, particularmente el retículo endoplasmático rugoso (RER) y el complejo de Golgi (CG) en estrecha asociación con gránulos secretorios inmaduros. En el citoplasma se observaron escasos gránulos maduros polimórficos de alrededor de 500–900 nm de diámetro (tipo I) (figura. 25).

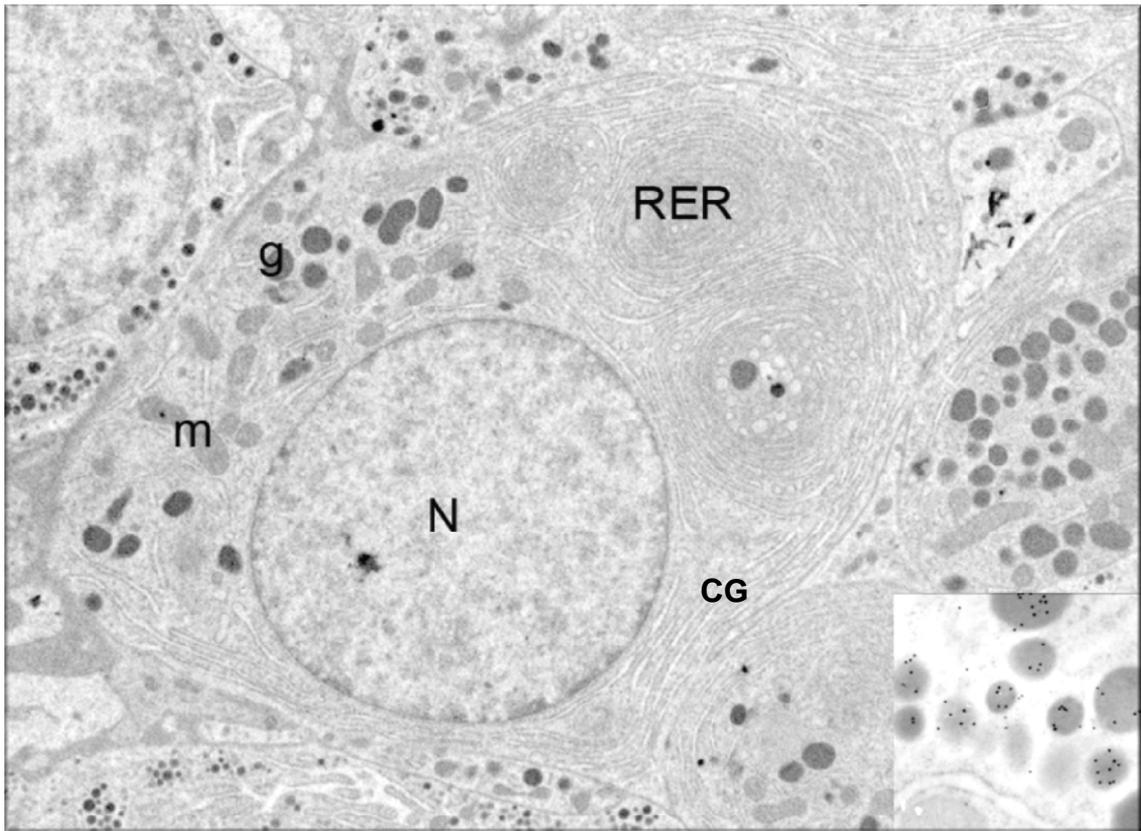


Fig. 25. Microfotografía electrónica correspondiente al grupo estimulado por 30 días con benzoato de estradiol en la cual puede observarse una célula lactotropa. La misma evidenció un importante desarrollo de las organelas relacionadas a la síntesis de proteínas. Magnificación: 4500x Inset Gránulos secretorios de la célula lactotropa específicamente identificados mediante inmunocitoquímica para PRL. N: núcleo, m: mitocondria, g: gránulo secretorio, CG: complejo de Golgi. Magnificación: 16.000x.

El tratamiento con BC indujo cambios progresivos y profundos principalmente en la ultraestructura de las células lactotropas, las cuales fueron identificadas por inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica. Una observación frecuente fue la presencia de diferentes etapas o fases del proceso involutivo, culminando con una gran proporción de células electrodensas denominadas “células negras”. La característica principal, en las células *involutivas*, fue el aumento progresivo en la densidad electrónica de la matriz citoplasmática y la vacuolización temprana del RER y del CG, con los núcleos conteniendo heterocromatina de aspecto finamente granulado. Se observó en general un incremento en el número de los gránulos secretorios en respuesta a la inhibición de la secreción hormonal inducida por BC (figura 26).

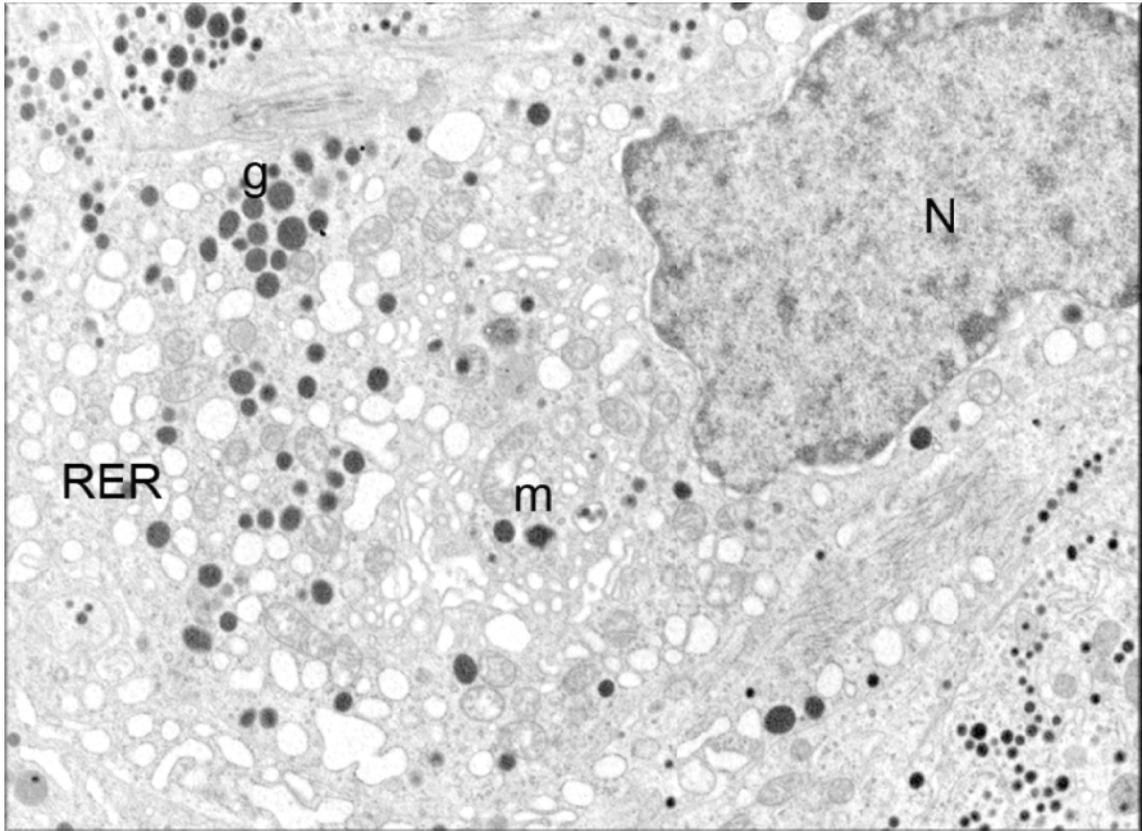


Fig. 26. Microfotografía electrónica correspondiente al grupo tratado con BC. Se observa vacuolización citoplasmática no lisosomal, conservación del patrón de la cromatina, y un incremento gradual en la electro densidad de la célula. N núcleos, m mitocondria, g gránulos secretorios, RER retículo endoplasmático rugoso. Magnificación: 4.500x.

Las “células negras” representaron un estadio irreversible de degeneración y muerte celular. La intensa alteración de las organelas citoplasmáticas fue evidente, las mitocondrias se presentaron hinchadas y tumefactas, llegando a la disrupción de las crestas de la membrana mitocondrial interna. El RER y el CG se mostraron extensamente dilatados lo cual se observó como una vacuolización citoplasmática no lisosomal. En los núcleos la cromatina se volvió más electrodensa conservando la distribución de la hetero y eucromatina y no se evidenció condensación de la misma. Tampoco se observó fragmentación nuclear, sin embargo los límites nucleares se presentaron irregulares e indefinidos en las etapas más avanzadas de la muerte celular. La membrana plasmática no reveló ningún signo de disrupción (figura. 27). Un hallazgo interesante, fue que las células muertas se dispusieron tanto en pequeños grupos como células aisladas. A su vez, las mismas estuvieron en estrecho contacto con células

degranuladas identificadas como células foliculo estrelladas (Cfe), las cuales presentaban prolongaciones citoplasmáticas que rodeaban las células muertas (figura 28). Las observaciones ultraestructurales de estas “células negras” fueron coincidentes con las características descritas en la muerte celular no apoptótica denominada paraptosis, o muerte celular tipo 3 (citoplasmática) en la clasificación establecida por Clarke [1].

Por otra parte, examinamos la presencia de signos de muerte celular autofágica y no encontramos las vesículas de doble membrana conteniendo organelas en degradación, características de este mecanismo de muerte celular.

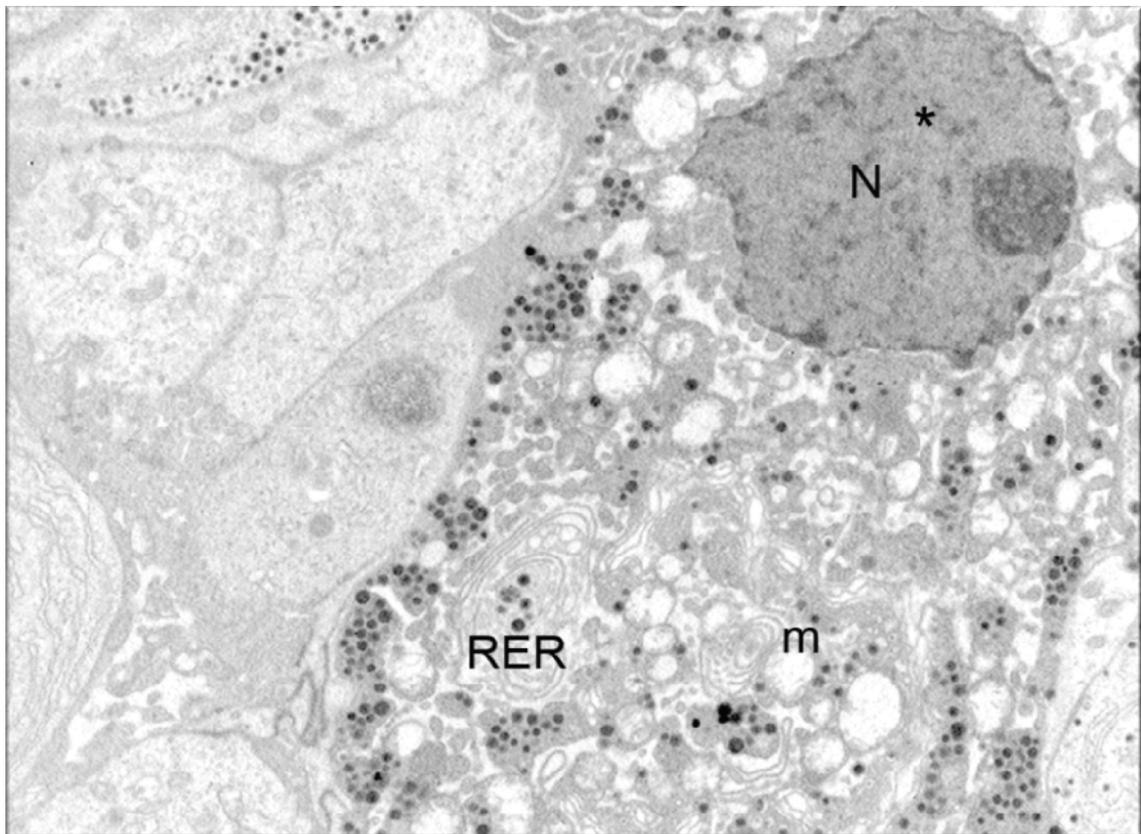


Fig.27. Bromocriptina induce paraptosis como el principal tipo de muerte celular. Micrografías electrónicas de células caracterizadas como paraptóticas (). Se observa la interrupción de las crestas mitocondriales lo que marca la irreversibilidad del proceso de muerte. N núcleos, m mitocondria, g gránulos secretorios, RER retículo endoplasmático rugoso, Cfe células foliculo estrelladas. Magnificación: 4.500x*

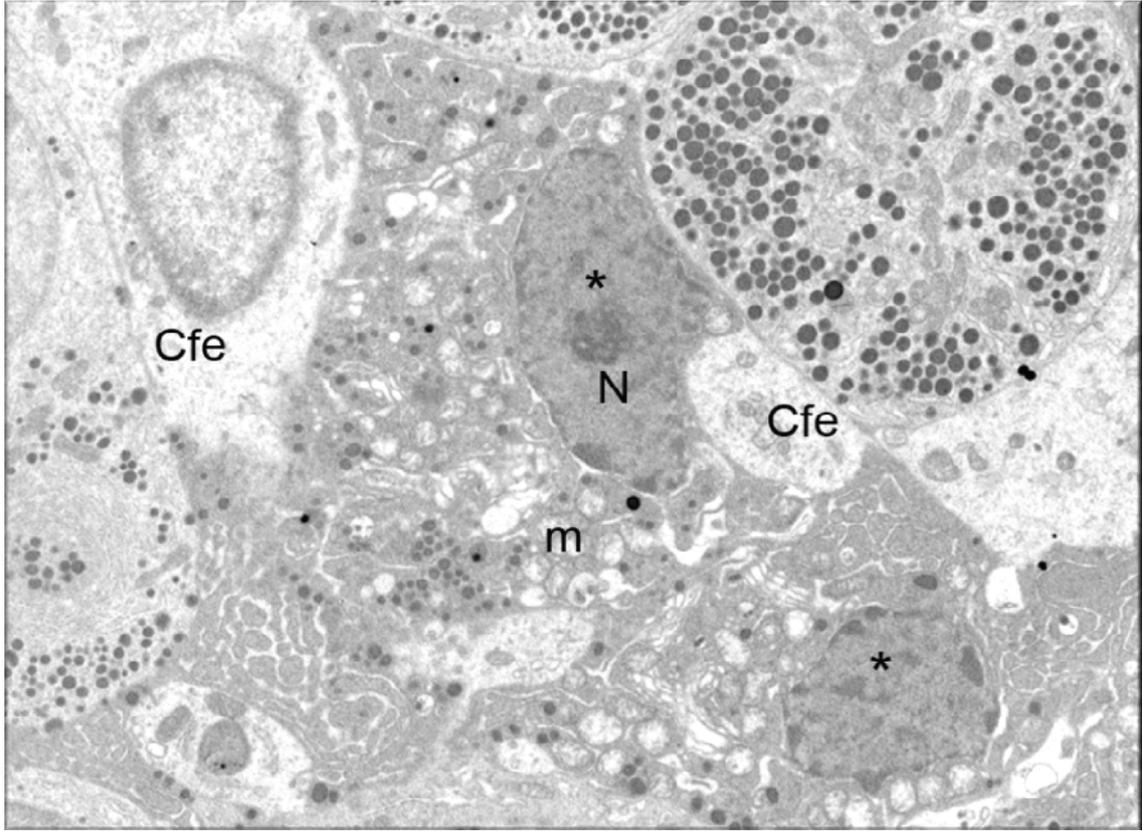


Fig.28. Bromocriptina induce paraptosis como el principal tipo de muerte celular. Micrografías electrónicas de células caracterizadas como paraptóticas (*). Se observa la ruptura de las crestas mitocondriales lo que marca la irreversibilidad del proceso de muerte. N núcleos, m mitocondria, g gránulos secretorios, RER retículo endoplasmático rugoso, Cfe células foliculo estrelladas. Magnificación: 4.500x.

El análisis morfométrico a nivel de microscopía electrónica demostró que el tratamiento con BC induce un llamativo incremento en el número de células paraptóticas, alcanzando el 25% del total de células contadas, comparadas con el 6% en el grupo E y el 2% en los animales del grupo control (Figura 29).

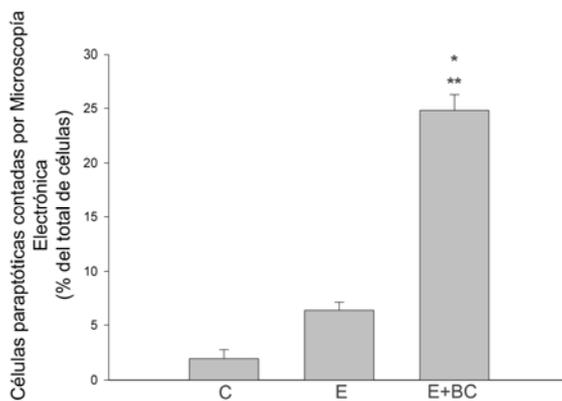


Fig. 29. Células paraptóticas a nivel de microscopía electrónica referidas como porcentaje del total de células cuantificadas (1.000 célula por animal). BC indujo un aumento significativo de esta muerte celular, comparada con los otros modelos experimentales (* $p < 0.001$ versus C; ** $p < 0,01$ versus E). Los datos fueron analizados por ANOVA- Tukey.

Las imágenes apoptóticas fueron escasamente detectadas en los grupos experimentales analizados (figura 30). Sin embargo, hubo algunas evidencias de cuerpos apoptóticos, los cuales contenían varias organelas y fragmentos de micronúcleos. Los cuerpos apoptóticos fagocitados también fueron visualizados en el citoplasma de las células foliculo-estrelladas.

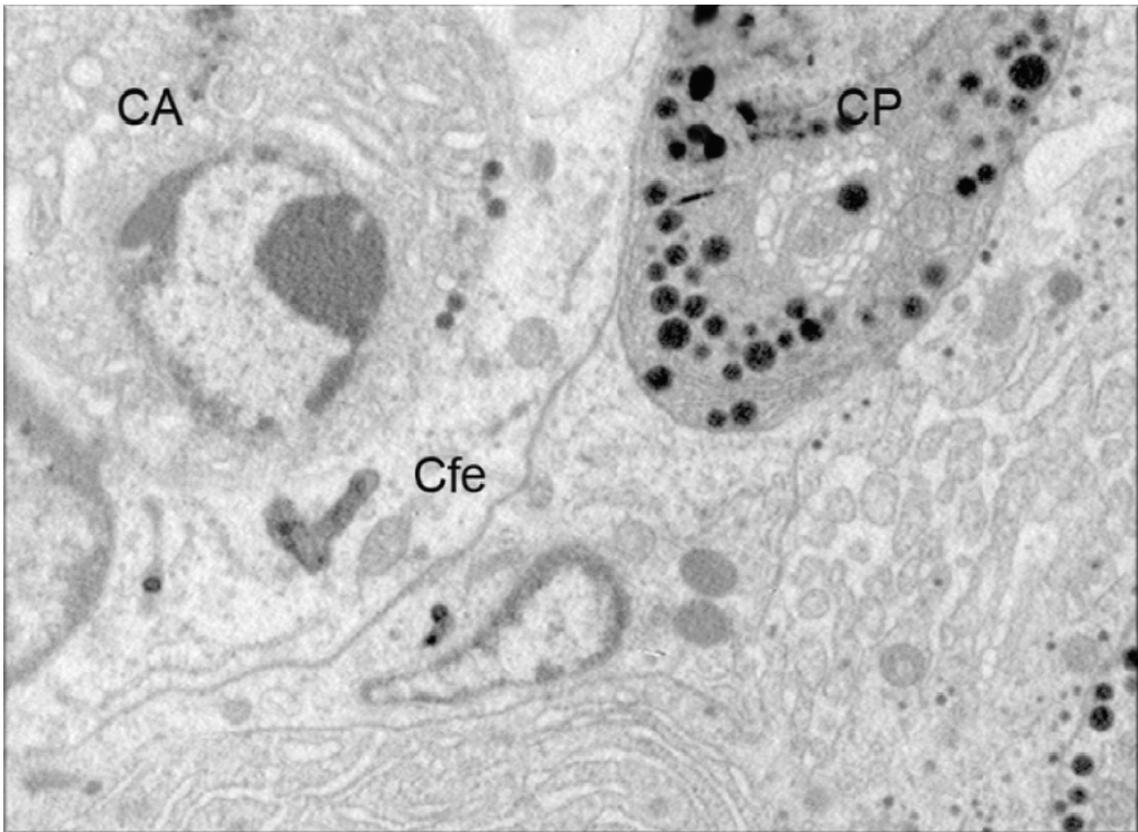
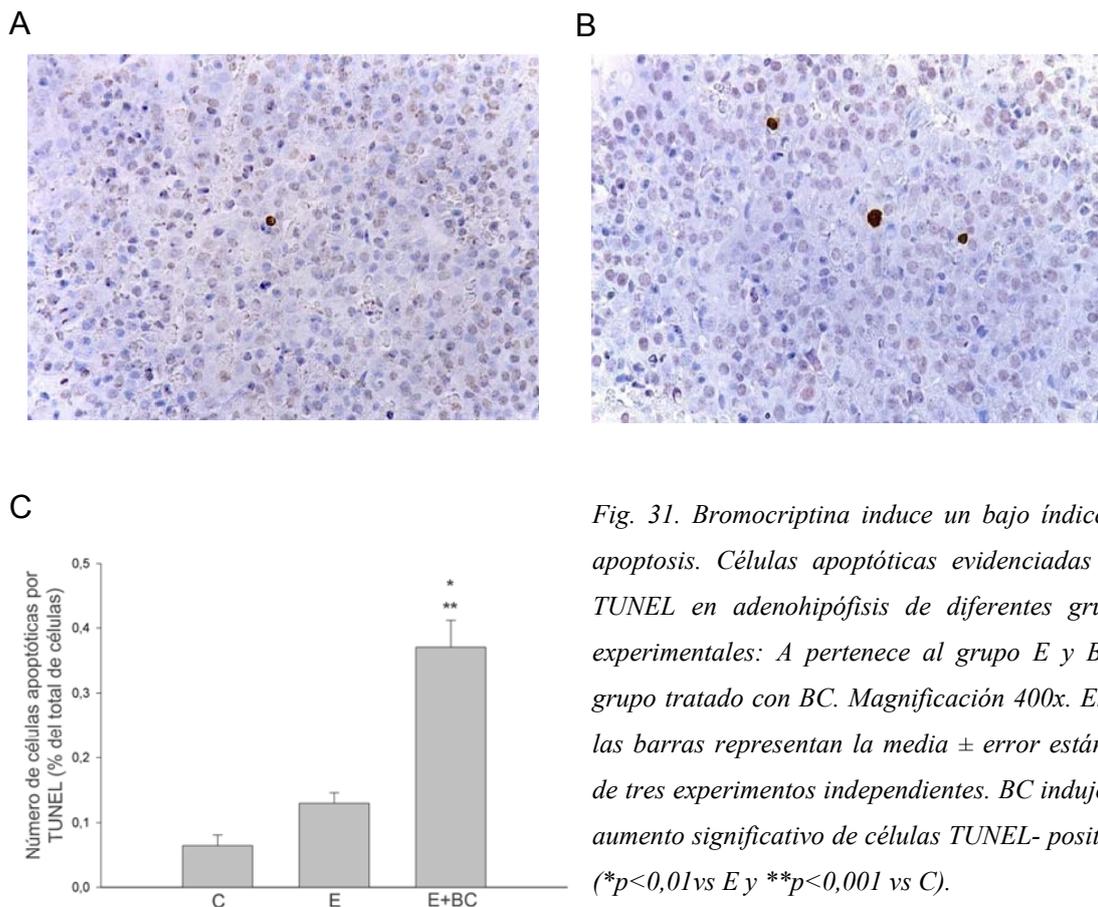


Fig. 30. Bromocriptina induce un bajo índice de apoptosis. Microfotografía electrónica de una célula apoptótica (CA). Se puede observar una acumulación de la cromatina en forma de copa dentro de uno de los polos nucleares () la cual corresponde a una fase temprana de la apoptosis. Las organelas citoplasmáticas aún no evidencian alteraciones. En este campo también puede observarse una célula paraptótica (CP). Hay marcadas diferencias entre las características morfológicas de ambas células. También se ven algunas células foliculo estrelladas (Cef), las cuales contrastan con las otras debido a su baja densidad electrónica. Magnificación: 10.000x*

Características bioquímicas de la Muerte Celular

Técnica de TUNEL

La técnica de TUNEL es el método que permite la evaluación *in situ*, de la fragmentación intranucleosomal del ADN. La apoptosis de las células hipofisarias fue evaluada sobre cortes histológicos de los distintos grupos. Se cuantificó el total de células TUNEL-positivas en los tres grupos experimentales (n=3 por grupo) examinando tres niveles diferentes de cada adenohipófisis. El tratamiento con BC provocó diferencias significativas en el número de células TUNEL-positivas respecto al grupo control ($p < 0,001$ versus C) y al grupo estrogenizado ($p < 0,01$ versus E), sin embargo el porcentaje de células apoptóticas observadas en el modelo E+BC no alcanzó el 1% de la población hipofisaria total. Este hallazgo estuvo estrechamente relacionado con lo observado en la morfometría realizada por microscopía electrónica (figura 31).



Fragmentación de ADN

Una de de las características que permite hacer el diagnóstico de apoptosis es la fragmentación intranucleosomal de la cromatina, mientras que en la necrosis este rasgo bioquímico se observa como una degradación al azar del ADN nuclear. En el presente trabajo, examinamos la integridad del genoma extrayendo el ADN de lisados de glándulas hipofisarias correspondiente a los diferentes grupos experimentales y luego realizamos la electroforesis del mismo en geles de agarosa. Como control positivo de la técnica utilizamos extractos de próstata ventral, 48 horas post-orquidectomía, donde clásicamente se ha descripto un patrón de degradación en escalera.

En nuestros modelos experimentales, no hubo evidencia de la ruptura del ADN en fragmentos oligonucleosomales, ni se observó el patrón de degradación inespecífica característico de la muerte necrótica (figura 32).

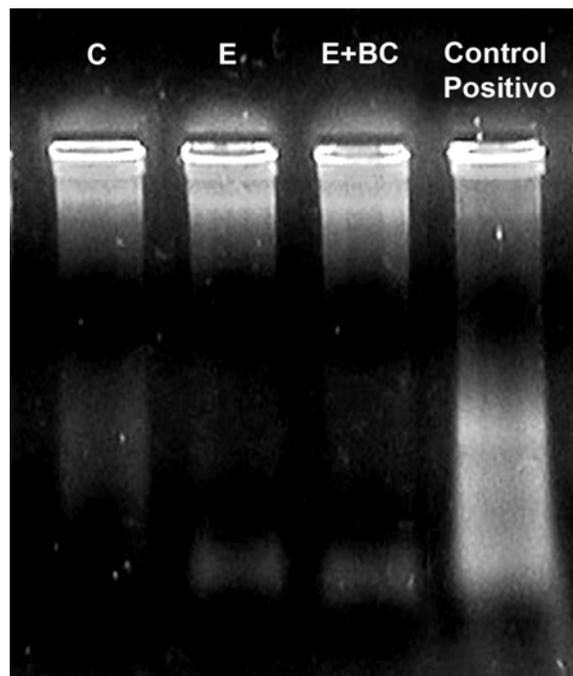


Fig 31. Bromocriptina no provocó fragmentación del ADN. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído en los diferentes grupos en estudio. Como control positivo se utilizó el ADN de homogenatos de próstata 48 hs post-orquidectomía. El ADN de próstata evidenció el clásico patrón en escalera (ladder) debido a la muerte inducida por la supresión del estímulo hormonal. En nuestros modelos experimentales (C, E y E+BC) el ADN permaneció íntegro y no se observó ningún patrón de fragmentación.

Activación de Caspasa 3

Con el objeto de estudiar si durante el proceso de muerte celular inducida por BC participa caspasa 3, analizamos la expresión y activación de esta proteína mediante WB en lisados totales de adenohipófisis. Clásicamente mediante esta técnica la forma inactiva de caspasa 3 (pro-caspasa 3) se evidencia como una proteína de 32 kDa y la subunidad activa de esta proteína como un fragmento de 17 kDa.

En los grupos E y E+BC, hubo un incremento en la expresión del precursor de 32 kDa de caspasa 3 respecto al control. Sin embargo, el fragmento de 17 kDa no fue detectado en ninguno de los grupos experimentales. Como control positivo se utilizaron homogenatos totales de próstata ventral, post-orquidectomía, en donde se demostró un aumento en la expresión del fragmento activo de caspasa 3 (figura 33).

La β actina se determinó como control de carga.

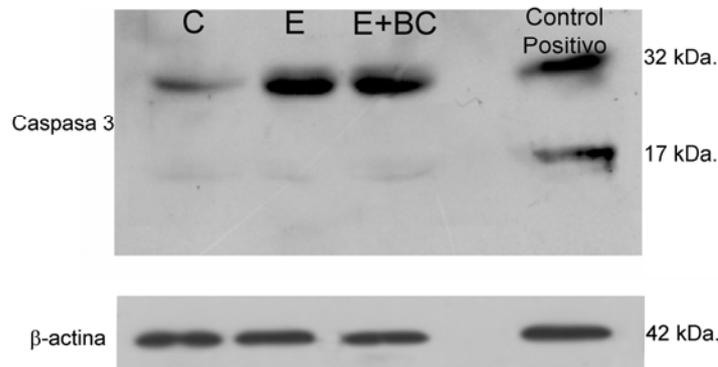


Fig.33. Bromocriptina no indujo activación de la caspasa 3. Expresión de caspasa 3 en lisados totales de adenohipófisis determinada por Western Blot. La pro caspasa inmadura (32 kDa) fue detectada en todos los grupos (C, E, y E+BC), pero no se evidenció el fragmento de 17 kDa correspondiente a la caspasa 3 madura en ninguno de los grupos experimentales. Como control positivo se utilizaron lisados de próstata ventral de animales 48hs post-orquidectomizados.

Clivaje de la PARP.

La apoptosis y la necrosis están asociadas con diferentes patrones de clivaje de distintas proteínas nucleares, una de ellas es la poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En el proceso de apoptosis esta proteína se cliva en fragmentos de diferentes pesos moleculares, siendo el más abundante el correspondiente a los 89 kDa. Durante la necrosis también hay degradación de la PARP pero en este caso el fragmento predominante corresponde a los 50 kDa

Con el objetivo de analizar el patrón de clivaje de la PARP en nuestros modelos experimentales, se identificaron por WB los diferentes fragmentos detectándose la holoenzima de 116 kDa y varios productos de 110, 80 y 75 kDa. En ningún grupo experimental se detectaron fragmentos de 50 kDa (figura 34). Estas evidencias nos permiten concluir que el fenotipo de muerte celular observado es distinto de necrosis.

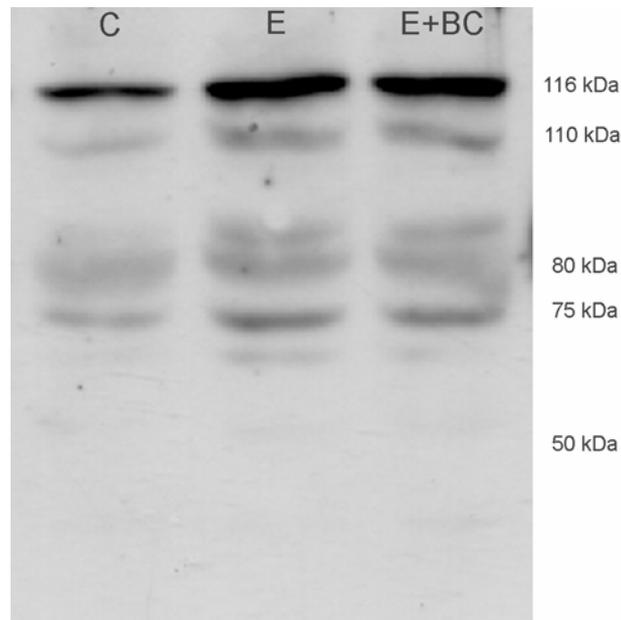


Fig. 34. Bromocriptina no indujo el clivaje diferencial de la Poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Expresión de la PARP en homogenatos totales determinada por Western Blot. En los diferentes grupos experimentales no se detectaron los fragmentos de 50-62 kDa característicos de necrosis.

Participación de las isoformas de PKC en la muerte celular inducida por BC.

Está bien establecido que numerosos estímulos apoptóticos inducen la activación de distintas isoformas de PKC, ya sea mediante la unión al dominio regulatorio o a través de una separación proteolítica del dominio catalítico. La translocación al núcleo o a la membrana mitocondrial, tanto de la holoenzima como del fragmento catalítico, desencadena una serie de eventos que culminan con la muerte celular.

Para investigar la participación de PKC α , δ y ϵ en nuestros modelos experimentales, evaluamos la expresión de las holoenzimas de estas isoformas en homogenatos totales de adenohipófisis. El estímulo estrogénico aumentó la expresión de PKC α , δ y ϵ mientras que el tratamiento con BC indujo una disminución significativa sólo de las isoformas α y δ . La isoforma ϵ no mostró cambios significativos ($p > 0,05$ versus E) en respuesta a BC (figura 35).

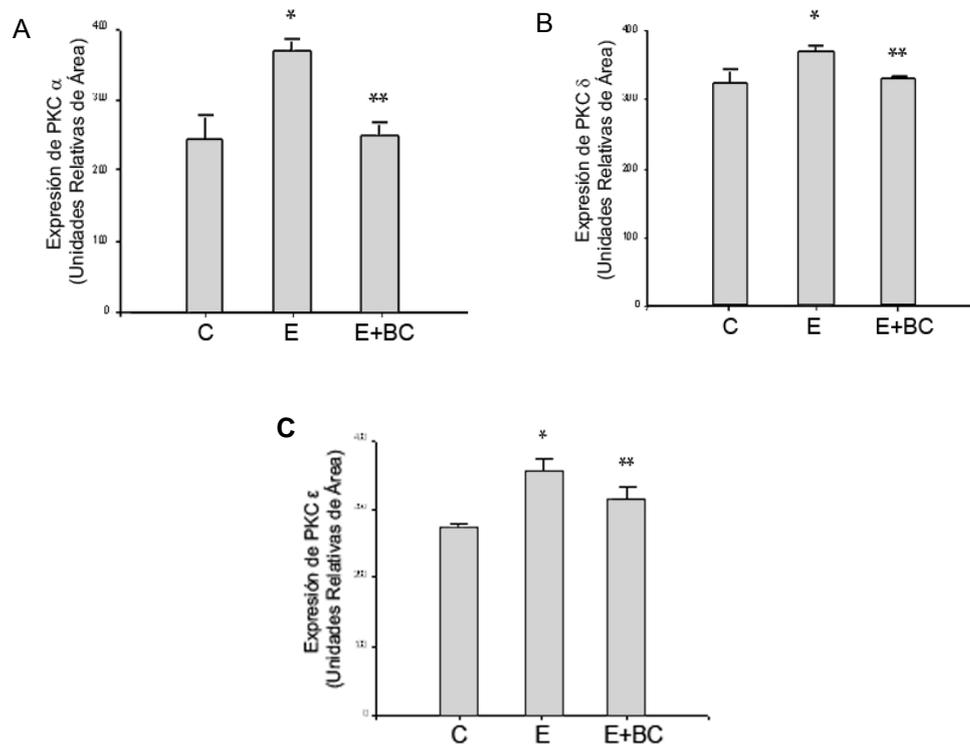


Fig.35. Expresión de PKC α , δ y ϵ en lisados totales de adenohipófisis determinada por Western Blot. El tratamiento estrogénico (E) aumentó significativamente la expresión de PKC α (A), PKC δ (B) y PKC ϵ (C) ($*p < 0,001$ versus C). La expresión de las isoformas α y δ disminuyó luego de la administración de BC (E+BC) ($**p < 0,01$ versus E). Los datos representan las medias \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguidos del Test de Tukey.

Regulación génica de PKC α , δ y ϵ en respuesta a BC.

Considerando que durante los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular, puede modificarse la expresión génica de las PKC en diferentes tipos celulares, determinamos los niveles de ARNm de PKC α , δ y ϵ en nuestros modelos experimentales mediante la técnica RT-PCR.

El ARNm de la isoforma α evidenció un comportamiento similar al observado en la expresión de proteína, es decir que el tratamiento estrogénico aumentó los niveles de ARNm y éstos disminuyeron luego de la administración de BC (figura 36A). El ARNm de la isoformas δ aumentó significativamente con 30 días de estimulación estrogénica pero el tratamiento con BC no los modificó ($p > 0,05$ versus E) (figura 36 B). El ARNm de PKC ϵ no mostró cambios significativos con la administración de estrógenos ni con el tratamiento con BC (figura 36 C).

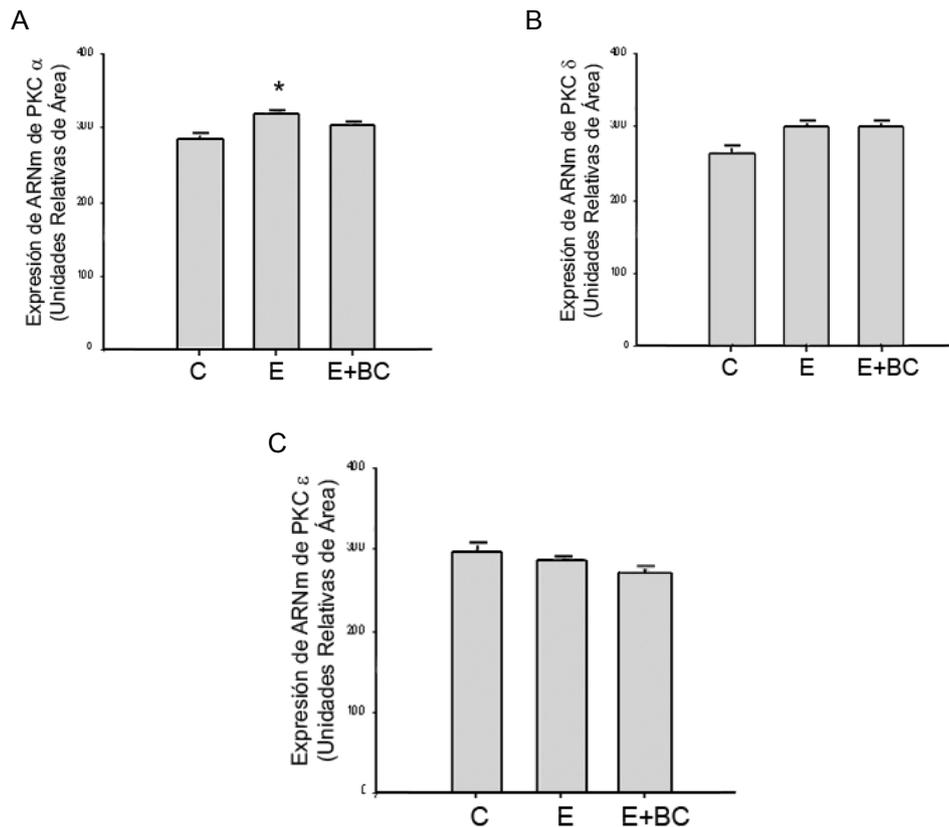


Fig. 36. Bromocriptina indujo una disminución significativa sólo de la expresión de ARNm de la PKC α . Expresión del mensajero de las isoformas de PKC α (A), δ (B) y ϵ (C) determinados mediante RT-PCR. En A, el tratamiento estrogénico indujo un aumento de la expresión del mensajero de la PKC α .

Expresión de PKC δ en fracciones subcelulares

La PKC δ es la isoforma clásicamente relacionada con los mecanismos de muerte celular y su translocación nuclear ha sido considerada como un factor fundamental en dichos procesos. Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar su expresión en fracciones citoplasmáticas y nucleares de los distintos grupos experimentales. También analizamos la expresión de los fragmentos catalíticos de 40 kDa por estar documentada su participación en la muerte celular.

El tratamiento con estrógenos incrementó la expresión de la holoenzima de PKC δ de 78 kDa en fracciones citoplasmáticas al compararlas con el grupo control y el tratamiento con BC no modificó significativamente su expresión. En ninguno de los grupos experimentales se detectó el fragmento de 40 kDa en esta fracción subcelular (Figura 37 A). En los extractos nucleares la estrogenización prolongada también provocó un aumento en la expresión de la holoenzima y se detectó el fragmento catalítico de esta quinasa. Sin embargo, los máximos niveles de expresión de la PKC δ de 78 kDa y del fragmento de 40 kDa fueron inducidas por el tratamiento con BC (figura 37).

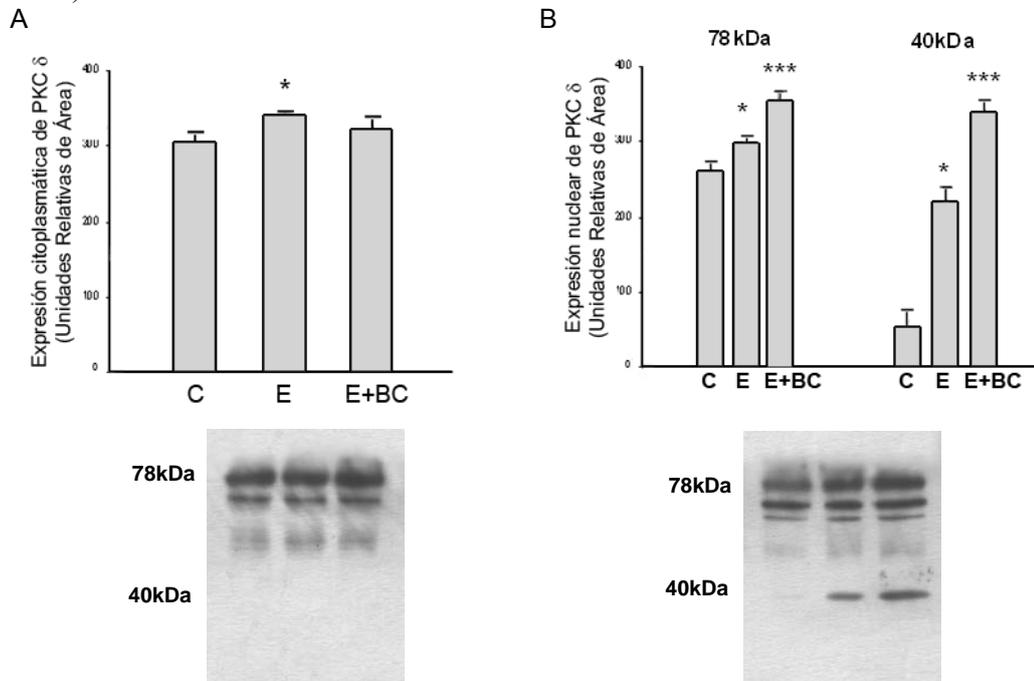


Fig.37. Expresión de la holoenzima (78 kDa) y del fragmento catalítico (40 kDa) de PKC δ en fracciones citoplasmáticas (A) y nucleares (B). En el grupo E se observó un aumento de la expresión de la holoenzima en ambas fracciones (* $p < 0,01$ versus C), mientras que el tratamiento con BC indujo mayor expresión de la forma de 78 kDa y de la de 40 kDa sólo en la fracción nuclear (***) $p < 0,001$ versus E).

Estudio de la localización subcelular de PKC δ

Las funciones de PKC δ dependen de su translocación subcelular, es por ello que nos propusimos determinar la localización ultraestructural de esta quinasa mediante inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica. Para esto se utilizó un anticuerpo primario específico identificado con un complejo de IgG marcado con oro coloidal.

En ratas macho control, la inmunomarcación de PKC δ fue detectada principalmente en la matriz citoplasmática, asociada con el RER y algunas mitocondrias aisladas. A nivel nuclear, PKC δ fue observada asociada a la eucromatina y a la membrana nuclear interna (figura 38). La estimulación estrogénica durante treinta días indujo un aumento en la inmuno-reactividad para PKC δ en el compartimiento nuclear y citoplasmático de las células lactotropas hipertróficas. En particular, el tratamiento con BC, intensificó la inmunomarcación de PKC δ en el compartimiento nuclear de diferentes células hipofisarias en distintos estadios de involución y del proceso de muerte (figura 39).

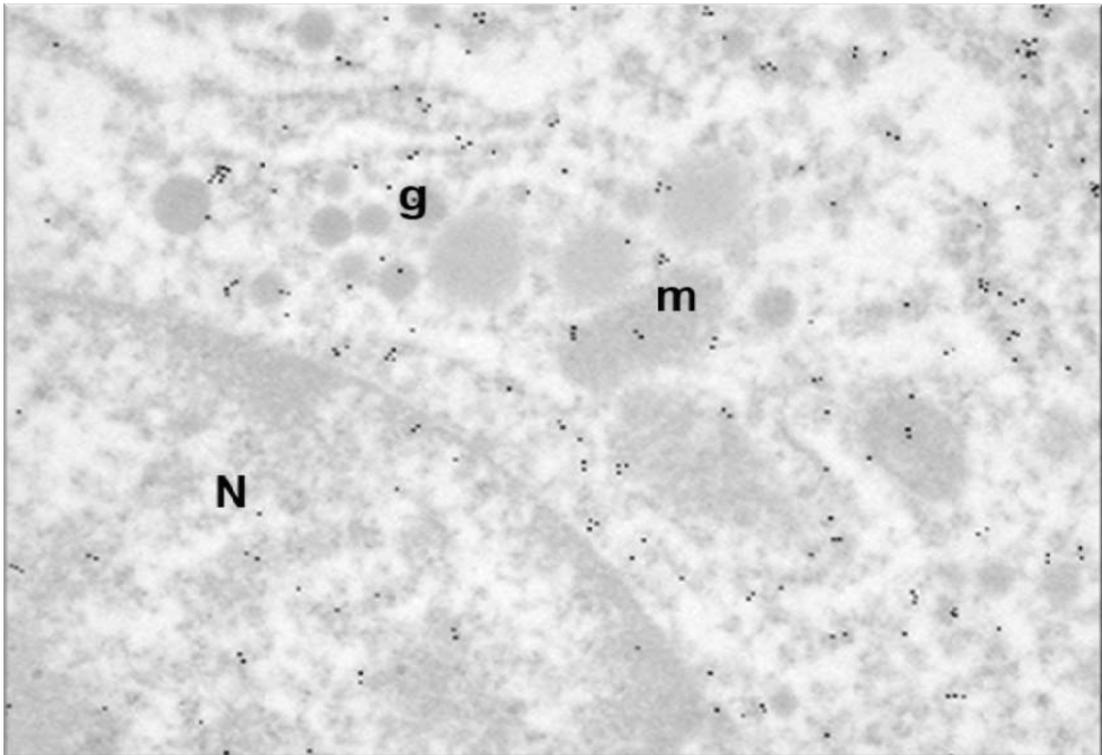
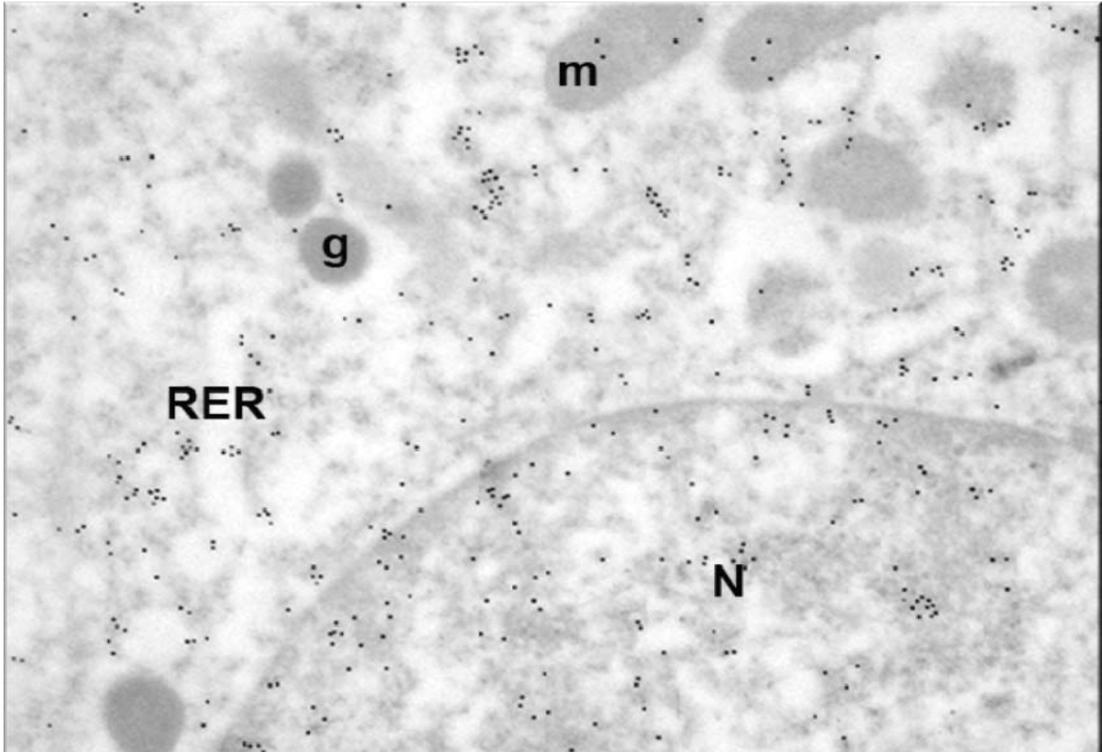


Fig. 38. Micrografía electrónica de células hipofisarias inmunomarcadas para PKC δ correspondiente a animales del grupo control. PKC δ se localizó en núcleo(N), matriz citoplasmática y en algunas mitocondrias aisladas (m). Magnificación: 20.000x.

A



B

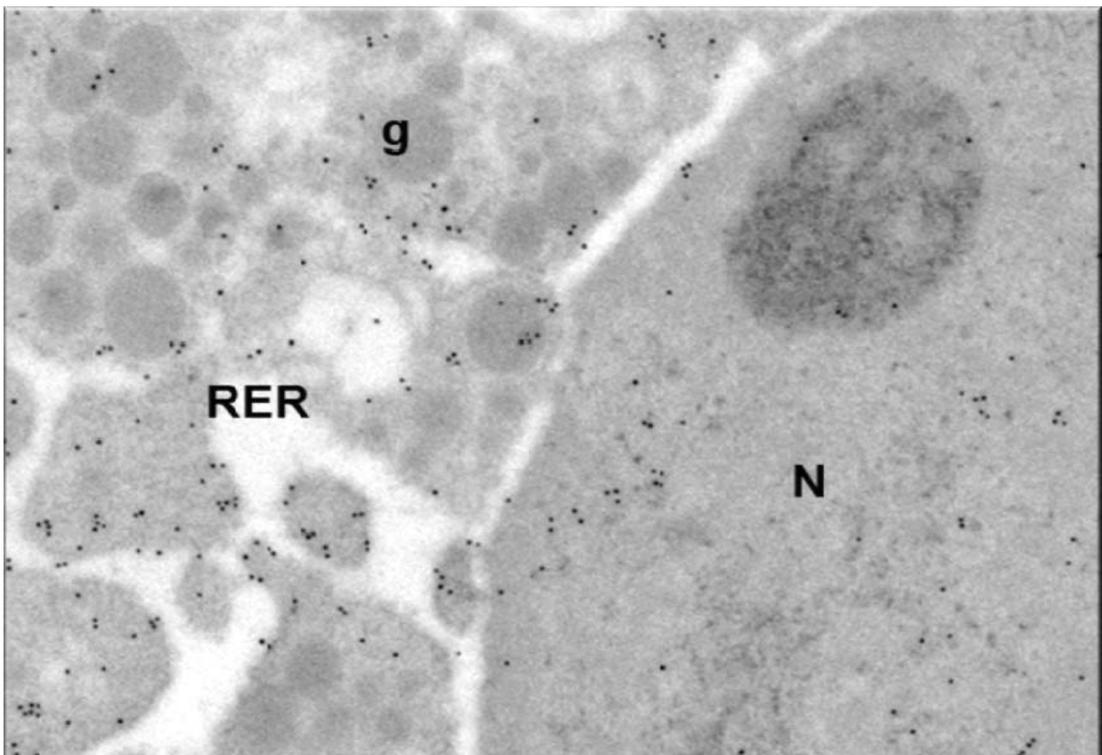


Fig. 39. Bromocriptina induce translocación nuclear de PKC δ . Micrografías electrónicas del grupo tratado con BC inmunomarcadas para PKC δ . La administración de BC intensificó la marcación de PKC δ en el núcleo (N) asociado con la eucromatina y la envoltura nuclear. También pudo observarse mayor inmuno-reactividad en el RER y mitocondrias (m) en células con signos de degeneración (A) y paraptóticas (B). No se detectó inmuno-marcación en los gránulos secretorios (g) Magnificación: 20.000x.

Participación de las MAPKs en la muerte celular inducida por BC

Muchos sistemas de señalización celular están involucrados en los procesos de supervivencia y/o de muerte celular. En particular, se ha sugerido que las MAPKs juegan un rol fundamental en la apoptosis, la paraptosis y en otras formas de muerte celular.

Rol de p38

PKC actúa a través de diversas vías de transducción de señales y la vía p38 MAPK ha sido relacionada como intermediaria en procesos de muerte en diversas condiciones. Con el objetivo de determinar la probable participación de esta quinasa en la muerte celular inducida por BC, analizamos la expresión de p38 en homogenatos totales de glándulas hipofisarias de los distintos grupos experimentales. Se detectó un aumento en la expresión de p38 total en el grupo estimulado mediante la estrogenización prolongada, que desciende luego de realizar el tratamiento con BC alcanzando los niveles del control (figura 40 A).

Para relacionar la expresión de esta quinasa con su actividad, determinamos la expresión de la forma fosforilada de p38 (P-p38). Si bien en este caso, la estrogenización indujo un cambio significativo respecto al grupo control, el tratamiento con BC indujo un aumento más marcado en la expresión de P-p38 ($p < 0,001$ vs E y C) (figura 40 B).

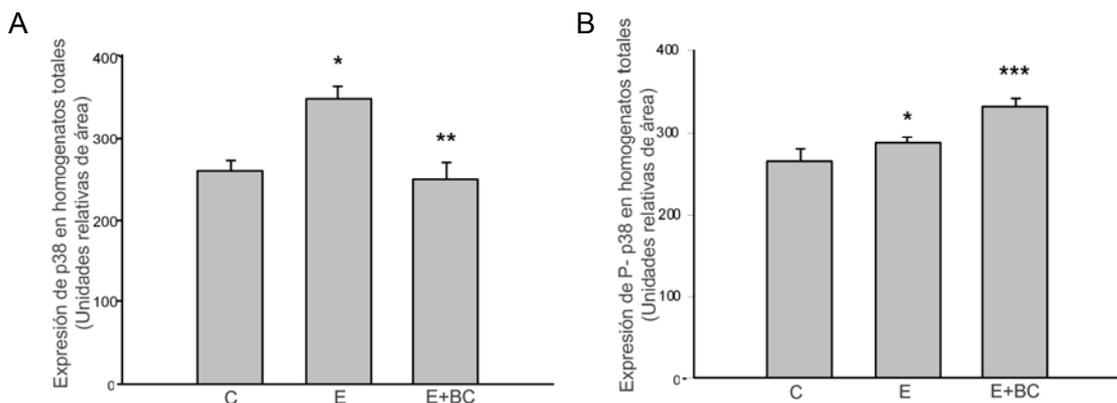


Fig. 40. Bromocriptina induce la activación de p38. Expresión de p38 (A) y P-p38 (B) en lisados totales de adenohipófisis determinada mediante WB. El tratamiento con estrógenos (E) indujo un aumento en la expresión de p38 ($*p < 0,01$ versus C) que fue revertido por el tratamiento con BC ($**p < 0,01$ versus E). Sin embargo, la administración de BC indujo un aumento significativo de la activación de p38 (P-p38) ($***p < 0,001$ versus E (B)).

Regulación génica de p38 en los procesos de muerte celular inducida por BC

Para determinar si el proceso de muerte celular inducido por BC provocaba también el aumento en la síntesis de p38 analizamos la expresión del ARNm de p38 por RT-PCR. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la expresión del ARNm de p38 en los distintos modelos (figura 41).

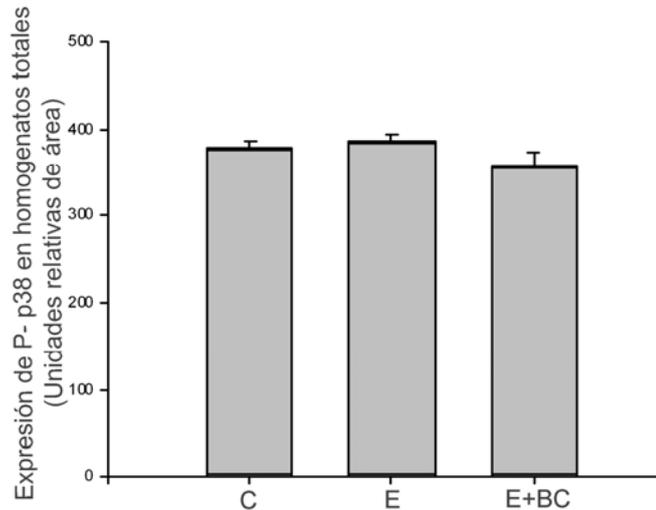


Fig. 41. Expresión de ARNm de p38. El ARNm fue detectado mediante PCR en los distintos grupos experimentales. No hubo modificaciones significativas luego de los tratamientos realizados ($p > 0,05$). Los datos representan las medias \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguidos del Test de Tukey.

Translocación de p38

Teniendo en cuenta que las funciones de las MAPKs también dependen de su translocación subcelular, nos propusimos determinar si el tratamiento con BC inducía cambios en su localización dentro de los compartimientos celulares. Para ello utilizamos diversas técnicas inmunocitoquímicas a nivel de microscopía fotónica y electrónica y analizamos su expresión en los extractos nucleares y citoplasmáticos.

Localización subcelular de p38 determinada por Inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica

Realizamos la técnica inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para p38 sobre cortes histológicos de los distintos grupos experimentales. En el grupo control, se observó p38 a nivel nuclear y citoplasmático (figura 42 A). La estimulación estrogénica provocó una intensificación de la marca, observándose la misma principalmente a nivel citoplasmático (figura 42 B). El tratamiento con BC indujo un llamativo aumento de la inmunomarcación a nivel nuclear, determinándose así un cambio en su localización subcelular luego de la administración de BC (figura 42 C).

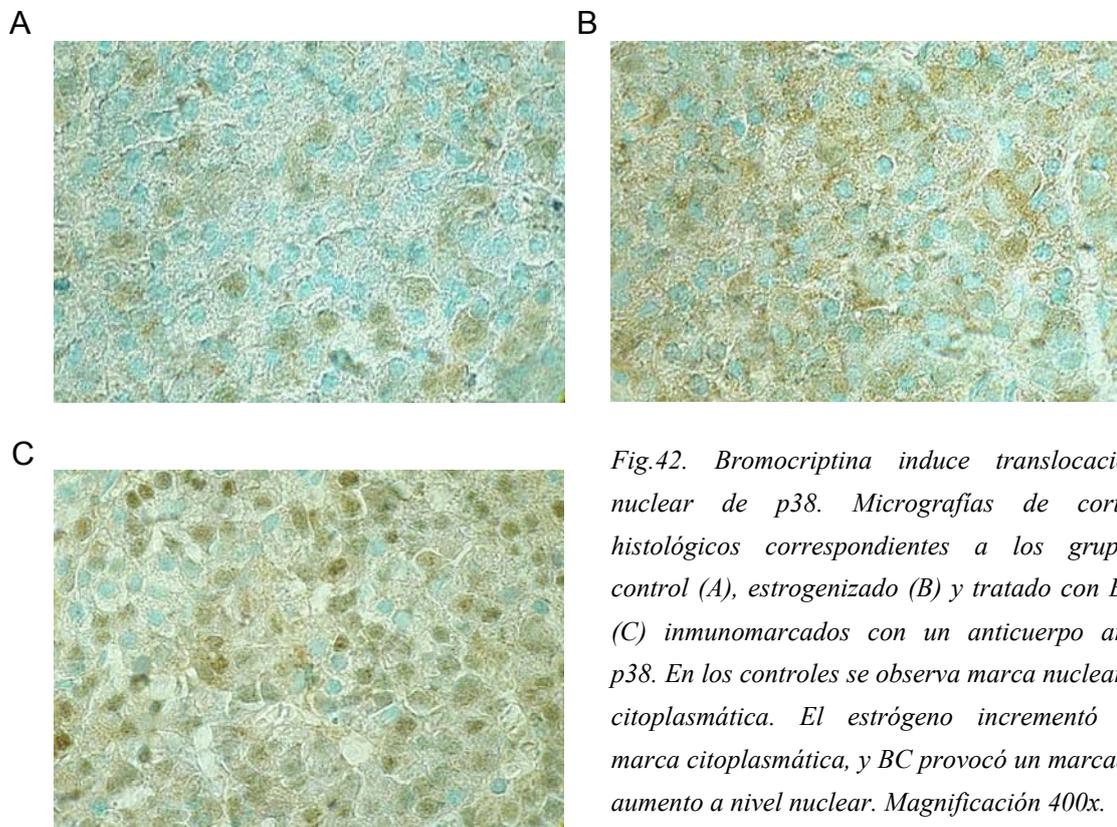


Fig.42. Bromocriptina induce translocación nuclear de p38. Micrografías de cortes histológicos correspondientes a los grupos control (A), estrogenizado (B) y tratado con BC (C) inmunomarcados con un anticuerpo anti p38. En los controles se observa marca nuclear y citoplasmática. El estrógeno incrementó la marca citoplasmática, y BC provocó un marcado aumento a nivel nuclear. Magnificación 400x.

Inmunocitoquímica para p38 fosforilado a nivel de microscopía electrónica

Para confirmar si p38 está activada cuando se transloca al núcleo, analizamos la localización subcelular de esta quinasa realizando una inmunomarcación a nivel de microscopía electrónica utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de p38.

En el grupo control, la inmunocitoquímica ultraestructural nos permitió identificar que esta proteína estaba distribuida en la matriz citoplasmática y también en los núcleos, donde se la encontró asociada con la eucromatina (figura 43). Aunque la administración crónica de estrógenos aumentó la inmunomarcación a nivel citoplasmático y nuclear, el tratamiento con BC indujo un aumento aún mayor en la intensidad de la marca de P-p38 a nivel nuclear (figuras 44 A y B).

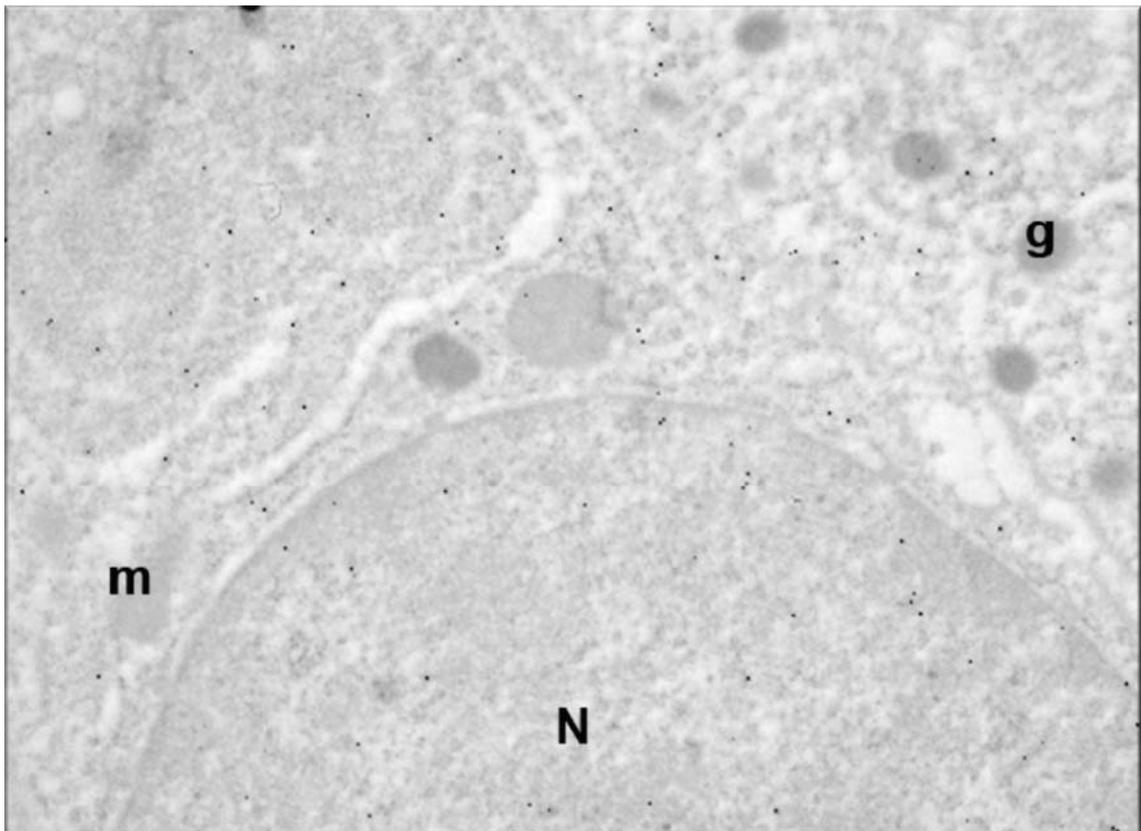


Fig. 43. Micrografía electrónica de cortes ultrafinos inmunomarcados para P-p38 representativos del grupo control. Las lactotropas evidenciaron inmunomarcación dispersa en la matriz citoplasmática y escasamente distribuida en el núcleo (N).g: gránulo secretorio, m: mitocondria. Magnificación 20.000x.

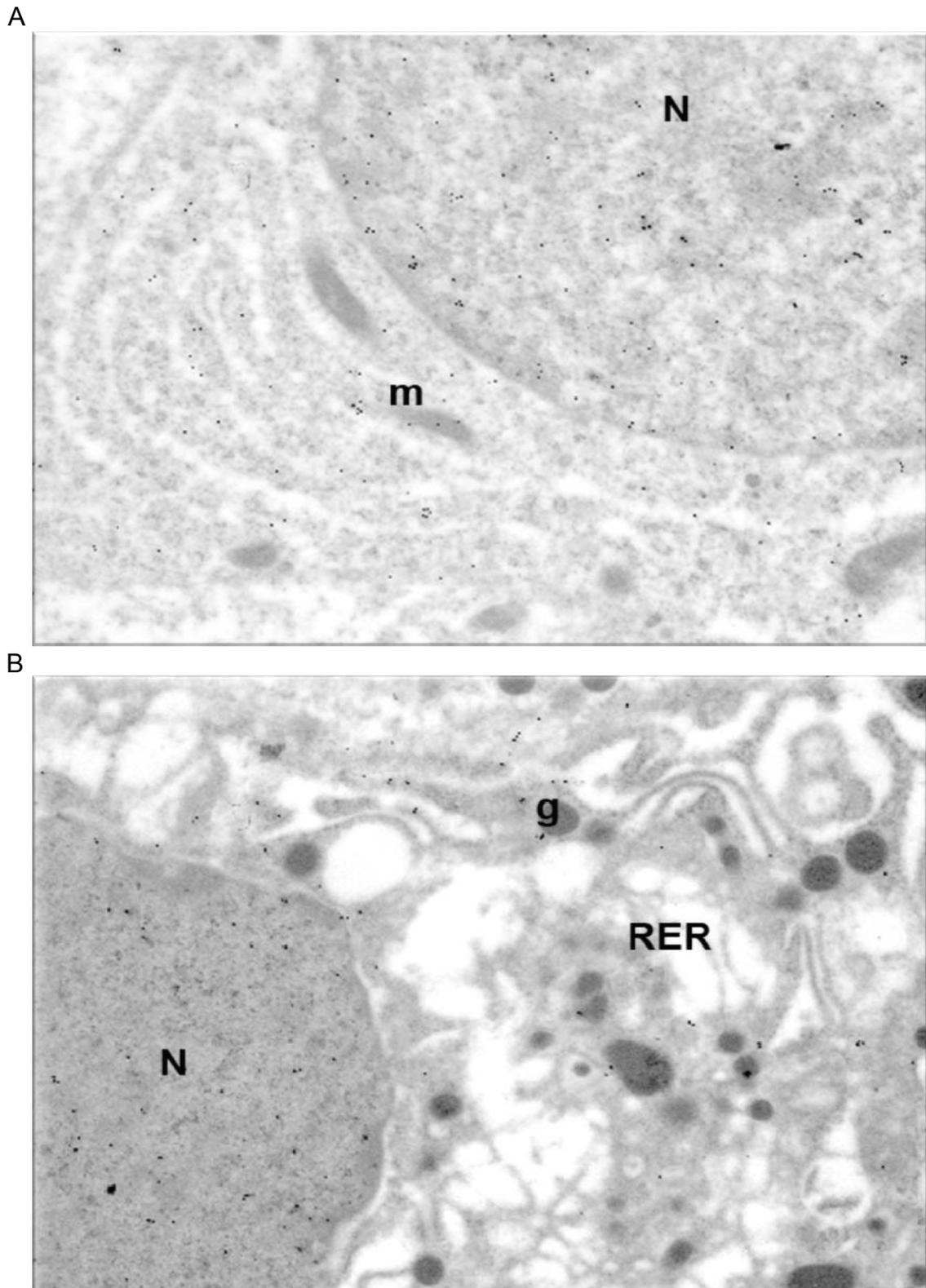


Fig. 44. Bromocriptina induce translocación nuclear de p38 activado. Micrografías electrónicas de cortes ultrafinos inmunomarcados para P-p38 correspondientes al grupo tratado con BC (A y B) donde pueden observarse células en distintos estadios involutivos. La inmunoreactividad para P-p38 incrementó luego de la administración de BC, principalmente a nivel nuclear, pero también se observó en mitocondria (m) (a y b). RER: retículo endoplasmático, g: gránulo secretorio. Magnificación: 20.000x

Expresión de P-p38 en las fracciones subcelulares.

Cuando se analiza la expresión de p38 activado en la fracción nuclear se observa que si bien el tratamiento estrogénico indujo un incremento en la fracción de P-p38 ($p < 0,01$ versus C) la mayor expresión nuclear de esta quinasa fue evidenciada luego de la administración de BC por 5 días (figura 45).

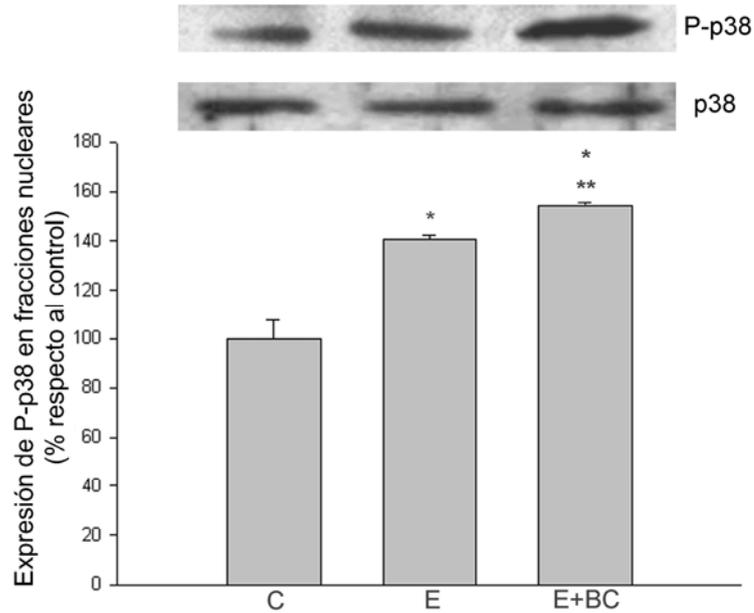


Fig. 45. Bormocriptina aumentó la expresión de p38 activada en las fracciones nucleares de adenohipófisis. WB evidenciando la presencia de P-p38 en las fracciones nucleares correspondientes a los distintos grupos en estudio. Las intensidades relativas son determinadas mediante análisis densitométricos. BC indujo un incremento en la expresión de P-p38 comparada con los animales de los grupos control y estrogenizados que no recibieron este tratamiento. * $p < 0,01$ versus C; ** $p < 0,05$ versus E. ANOVA seguido de Test de Tukey. El índice de la expresión de proteínas es representado como porcentaje relativo, considerando al grupo C como 100%.

Rol de ERK1/2

De acuerdo a los resultados publicados sobre la participación de la vía de las ERK1/2 en los procesos de muerte celular paraptóticos [16], estudiamos si en nuestras condiciones experimentales la muerte celular inducida por BC, involucra también esta quinasa. Para ello, analizamos la expresión de ERK1/2 fosforilado (P-ERK1/2) en las fracciones nucleares y la localización subcelular de esta MAPK.

Expresión de P-ERK1/2 en fracciones subcelulares

En extractos nucleares de adenohipófisis de los distintos grupos experimentales, detectamos la expresión de la forma activada de ERK1/2. El tratamiento estrogénico indujo un incremento de la expresión de P-ERK1/2, pero la mayor expresión de estas quinasas a nivel nuclear, fue producida por la administración de BC (P-ERK1/2) (figura 46). Como referencia hemos detectado la forma total de ERK1/2 en las mismas fracciones utilizando un anticuerpo específico.

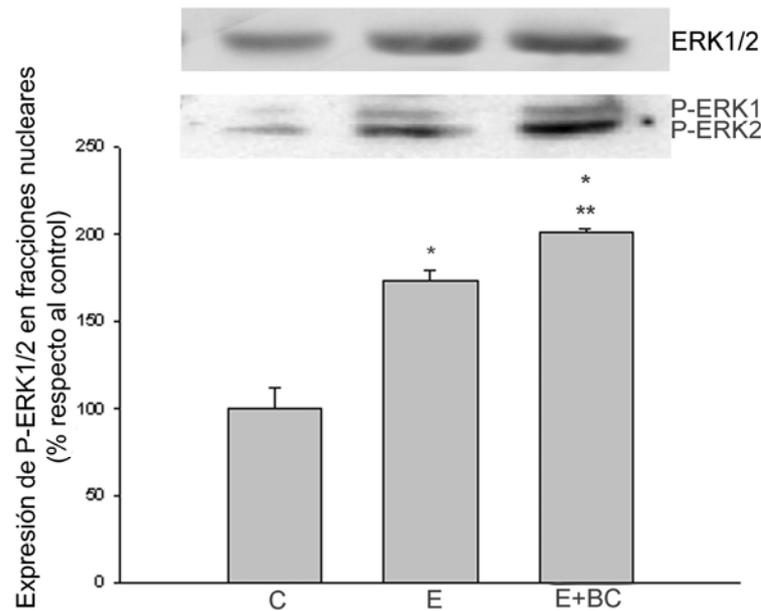


Fig. 46. Bromocriptina induce translocación de la ERK1/2 activada. Expresión de P-ERK1/2 determinada por WB en fracciones nucleares de los distintos grupos experimentales. Las bandas corresponden al peso molecular de las dos isoformas (42 y 44 kDa., respectivamente). BC provocó un aumento en la expresión de P-ERK1/2 cuando se lo compara con los grupos C y E. * $p < 0,01$ versus C; ** $p < 0,05$ versus E. El índice de la expresión de proteínas fue representado como porcentaje relativo, considerando al grupo C como 100%. ANOVA seguido de Test de Tukey.

Localización ultraestructural de P-ERK1/2

Sabiendo que, al igual que ocurre con p38, las funciones de las ERK1/2, dependen de su localización subcelular determinamos la localización ultraestructural de P-ERK1/2 utilizando la inmunomarcación con oro a nivel de microscopía electrónica.

En el grupo control, la inmunocitoquímica ultraestructural para P-ERK1/2 nos permitió identificar que estas quinasas tienen la misma distribución que p38, al estar dispersas la matriz citoplasmática y también en los núcleos de las células (figura 47). Los estrógenos aumentaron la inmunomarcación citoplasmática y mientras que BC indujo una intensificación de la marca de P-ERK1/2 a nivel nuclear. Este cambio se observó tanto en células hipertróficas, como en células involutivas (figura 48 A) y paraptóticas (figura 48 B), comparadas con las ratas control y estrogenizadas.

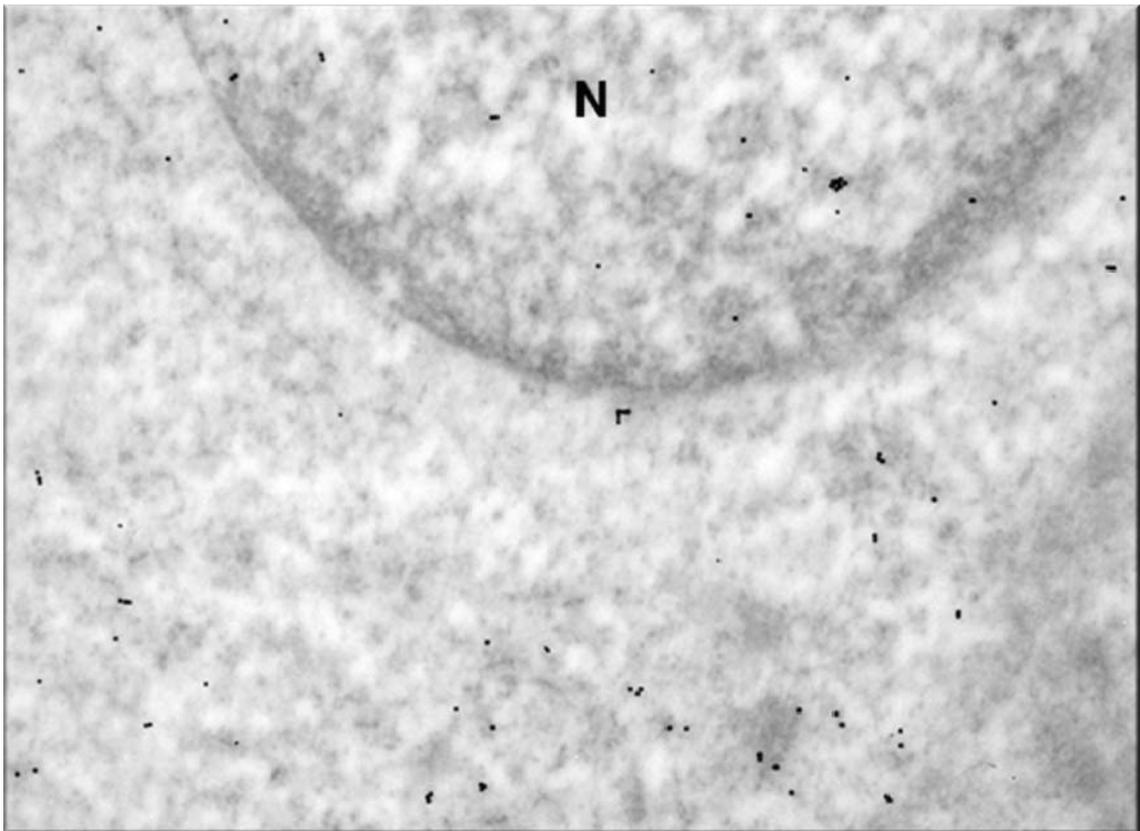


Fig. 47. Micrografía electrónica de corte ultrafino inmunomarcado para P-ERK1/2 del grupo control. Las células lactotropas evidenciaron una distribución de esta quinasa en la matriz citoplasmática y escasamente localizada en el núcleo (N). Magnificación: 20.000 x.

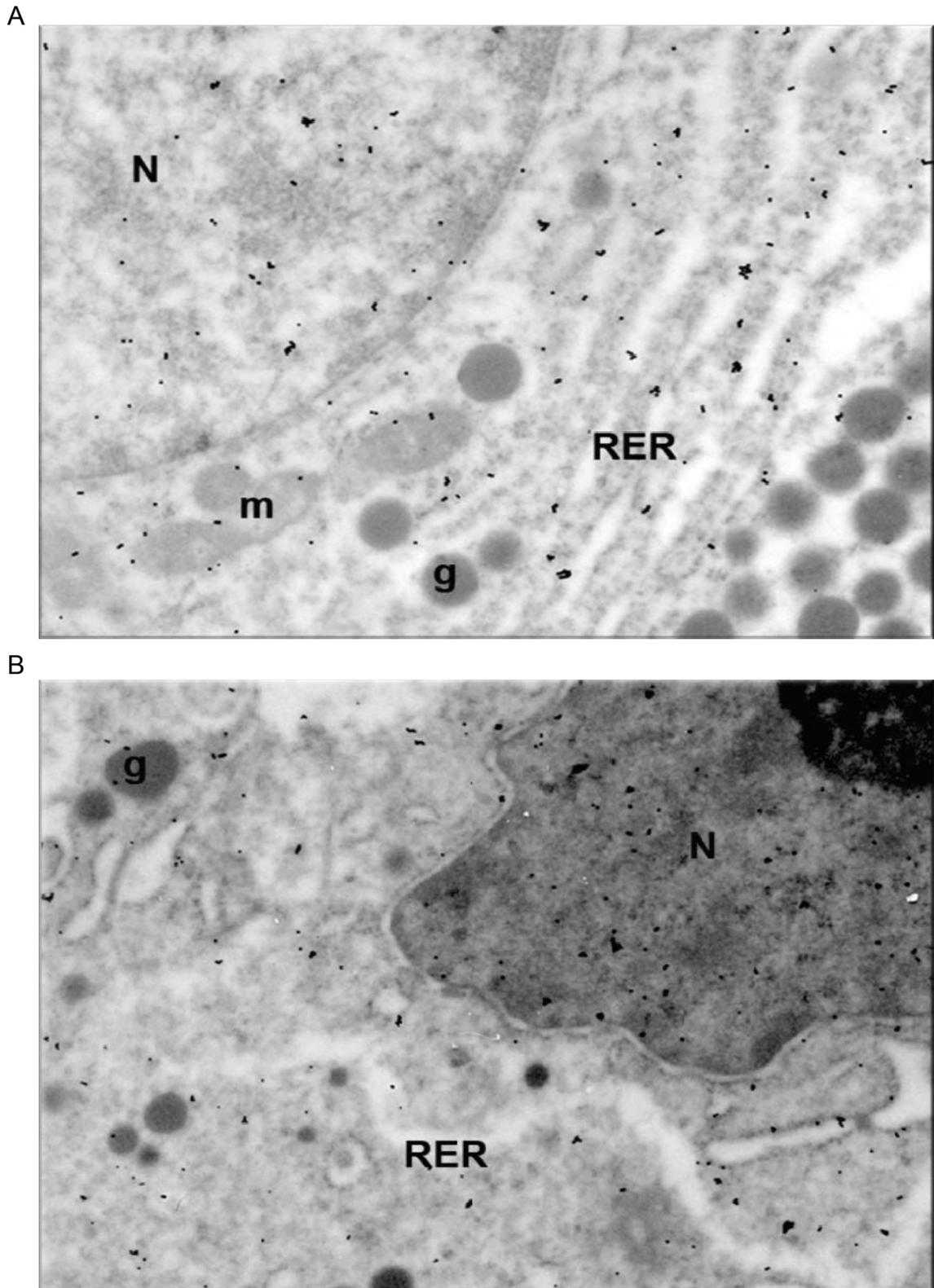


Fig. 48. Bromocriptina induce translocación nuclear de ERK1/2 activada. Micrografías electrónicas de cortes ultrafinos inmunomarcados para P-ERK1/2 del grupo tratado con BC (A y B) donde pueden verse células en distintos estadios involutivos. El tratamiento con BC aumentó la inmunorreactividad para P-ERK1/2, a nivel nuclear (N), en mitocondria (m) y en retículo endoplasmático rugoso (RER). Magnificación: 20.000 x.

Participación de NF- κ B en el proceso de muerte celular inducido por BC

El rol clásicamente descrito para NF- κ B ha sido relacionado con la expresión génica que codifica proteínas anti apoptóticas y anti oxidantes. Sin embargo, su participación en la muerte celular puede variar de acuerdo al tipo celular y a las noxas recibidas [176]. Se ha demostrado que bajo condiciones de estrés celular, el RER es capaz de inducir la muerte celular, y una de las vías que participan en dicha respuesta es la activación del NF- κ B [40]. A su vez, una de las vías de activación de este factor de transcripción requiere la disociación del mismo este, de las proteínas regulatorias I κ B α , con la consecuente translocación nuclear disparando, finalmente, el suicidio celular [177].

En nuestro modelo de estudio, el principal patrón de muerte celular refleja intenso estrés a nivel del RER y posterior alteración mitocondrial, con lo cual nos propusimos investigar si NF- κ B estaba relacionado con dicho proceso de muerte celular. Para ello analizamos la expresión de NF- κ B e I κ B α en fracciones nucleares y citoplasmáticas y determinamos la translocación de este factor de transcripción mediante inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica.

Detección de NF- κ B en fraccionamientos subcelulares.

Se detectó la expresión de NF- κ B en fracciones citoplasmáticas y nucleares de adenohipófisis provenientes de los diferentes grupos experimentales mediante WB. En las fracciones citoplasmáticas, el tratamiento estrogénico indujo un aumento en la expresión de este factor de transcripción, el cual se intensificó luego de la administración de BC (figura 49 A). En el compartimiento nuclear, BC también indujo un aumento significativo con respecto a los niveles de expresión detectados en los grupos control y estrogenizado (figura 49 B).

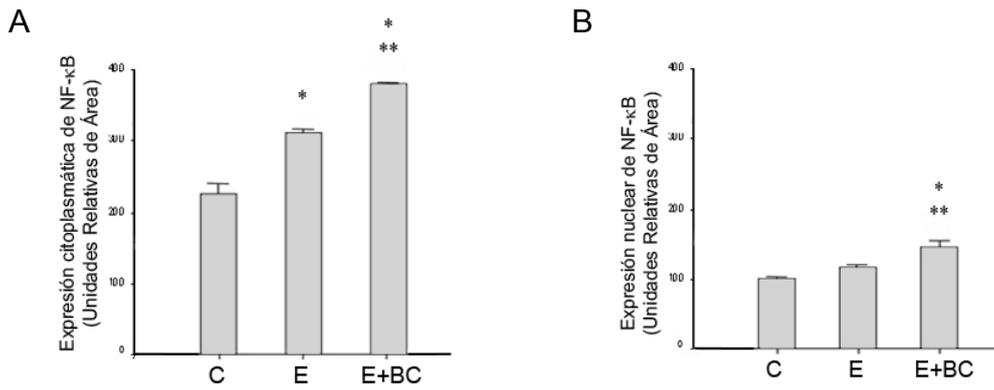


Fig. 49. Bromocriptina induce la translocación de NF-κB. Expresión de NF-κB en fracciones citoplasmáticas (A) y nucleares (B) por WB en los distintos grupos experimentales y las intensidades relativas son determinadas mediante análisis densitométricos. Los datos representan las medias ± el error estándar de tres experimentos independientes.

Expresión de IκB-α

En las fracciones citoplasmáticas detectamos la expresión de IκBα fosforilado. La administración de estrógenos indujo un aumento en la expresión de IκBα, que fue coincidente con el incremento en la expresión de NF-κB. El tratamiento con BC indujo una disminución en la cantidad de esta proteína, en comparación con el grupo estrogenizado y el control. Esto implica que IκBα se ha disociado de NF-κB con la consecuente degradación por el sistema de proteosoma (Figura 50).

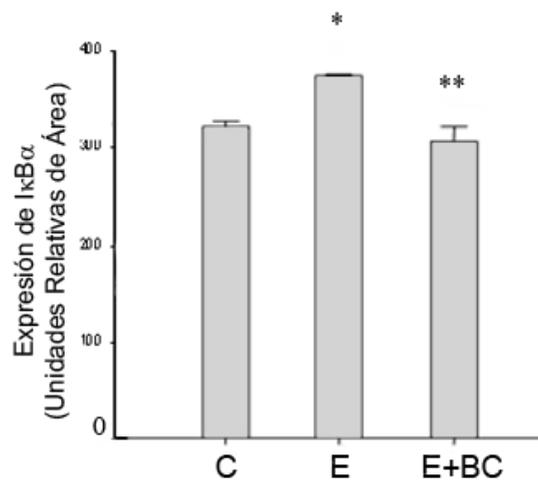


Fig. 50. Expresión de IκBα fosforilado por WB en homogenatos totales. El tratamiento con BC induce una degradación significativa de IκBα. El estrógeno induce aumento en los niveles de expresión de esta proteína, pero el tratamiento con BC disminuyó los mismos.

Localización subcelular de NF- κ B

La localización subcelular de NF- κ B fue estudiada mediante Inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica (figuras 51 y 52), utilizando un anticuerpo específico. NF- κ B se detectó en todos los grupos experimentales. A nivel del compartimiento nuclear, BC induce un aumento en la inmunomarcación de NF- κ B.

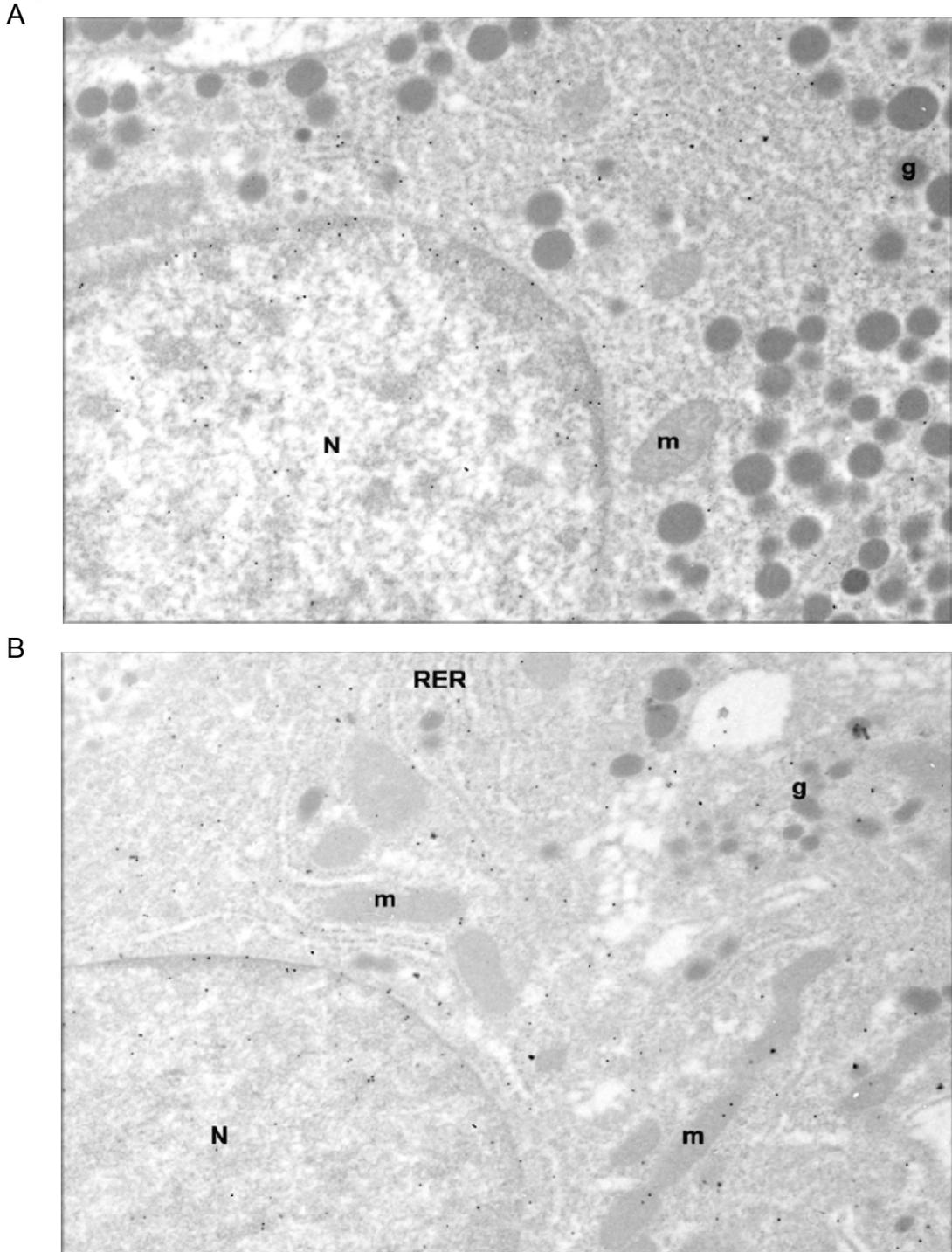
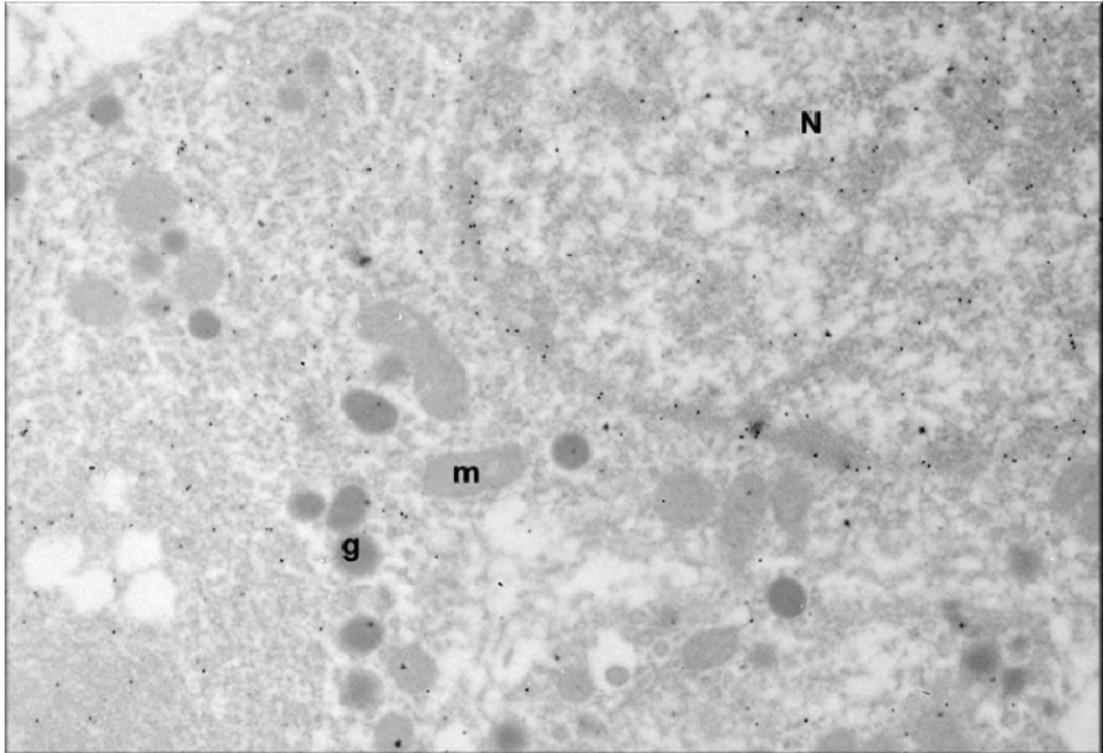


Fig. 51. Micrografías electrónicas de células hipofisarias inmunomarcadas para NF- κ B. En los animales control (A) y estrogenizados (B) se evidencia una inmunomarcación dispersa en la matriz citoplasmática y escasamente distribuida en el núcleo. Magnificación: 16.000 x.

A



B

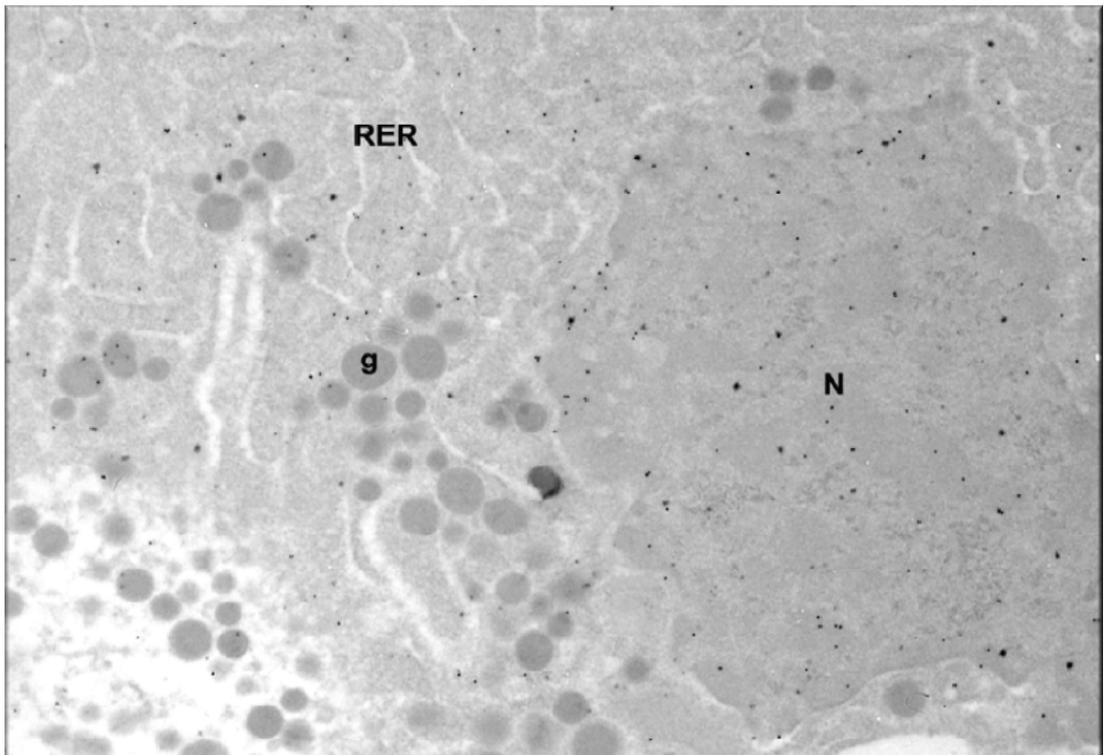


Fig 52. Bromocriptina induce translocación nuclear de NF- κ B. Micrografías electrónicas de células hipofisarias inmunomarcadas para NF- κ B del grupo tratado con BC. La BC indujo una inmunomarcación más intensa en el compartimiento nuclear de células hipertróficas (A) y células que presentan rasgos característicos de paraptosis (B). Magnificación: 16.000 x.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El balance entre la división celular y la muerte es un aspecto de gran relevancia en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. La muerte celular programada está involucrada en la optimización de las funciones de células y tejidos adultos regulando el número de células que proliferan o se diferencian. Los desórdenes en cualquiera de estos procesos tienen consecuencias patológicas repercutiendo en la embriogénesis, las enfermedades neurodegenerativas y favoreciendo el desarrollo del cáncer [18]. La muerte celular programada es un intrigante tópico en la investigación biomédica debido a que se ha asociado estrechamente con las respuestas a los tratamientos y se ha descrito que la resistencia a numerosos agentes terapéuticos se debe a la alteración en alguna de las vías que participan en la eliminación celular [167].

Siendo la hipófisis un órgano fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, la desregulación de sus funciones conduce a importantes problemas de salud que afectan a la población general. Los diferentes tipos celulares que conforman esta glándula están sujetos a considerables fluctuaciones bajo la influencia de hormonas tróficas y péptidos hipotalámicos. En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, hemos demostrado que la respuesta de la población hipofisaria a los distintos estímulos es el resultado de un proceso dinámico que involucra la proliferación de determinados tipos celulares y la posterior muerte de las células redundantes, causada por la supresión del estímulo [118, 119, 149]. Los procesos de proliferación e involución de las células hipofisarias han sido extensamente estudiados en diferentes modelos experimentales, tanto fisiológicos como patológicos en nuestro laboratorio [121, 150, 168, 178]. La glándula hipofisaria presenta una gran plasticidad tisular que es la base de su estabilidad funcional en condiciones fisiológicas. En términos generales, las células adenohipofisarias aumentan significativamente su actividad metabólica para adaptarse a los requerimientos hormonales del organismo en respuesta a diferentes estímulos. Sin embargo, cuando se excede esta capacidad de adaptación se produce una inestabilidad en la homeostasis tisular que puede llevar a un aumento en el tamaño celular, hiperplasia de sus organelas subcelulares, e incluso proliferación celular. Si el

factor que produjo este efecto proliferativo permanece en forma sostenida, la regulación de la población celular se descontrola culminando así con el desarrollo de una lesión tumoral en la glándula hipofisaria [117, 140, 155].

Uno de los tumores más frecuentes de la hipófisis es el que involucra a las células lactotropas (prolactinomas) causando una gran morbilidad debido a la hipersecreción hormonal de PRL o a la expansión del tumor [140]. Suelen detectarse principalmente en individuos jóvenes en edad reproductiva, siendo una de las primeras causas de infertilidad; en el sexo femenino produce trastornos menstruales y galactorrea. Otras manifestaciones clínicas se traducen en síndromes compresivos por el tamaño de la masa tumoral lo que puede traducirse en cefaleas intensas y alteraciones en el campo visual [131]. A pesar de su alta incidencia, hay muchos factores de los que aún no se conoce su participación en la formación del tumor [117]. Con el objetivo de aportar a estos conocimientos, en nuestro laboratorio se han desarrollado distintos trabajos de investigación experimental, los que revelaron que la exposición prolongada al estradiol conduce a la formación de prolactinomas a través de una serie de eventos que involucran factores de transcripción como Pit-1 y c-myc [150] y factores angiogénicos como el FGF-2 y VEGF-2 [154, 155]. Además, en estudios realizados más recientemente, hemos demostrado que la proliferación de células lactotropas inducida por estrógenos, factores de crecimiento y promotores tumorales está regulada por la activación de las vías de señalización PKC ϵ y ERK1/2 MAPK [179, 180].

Otro de los grandes interrogantes respecto a los prolactinomas se refiere a los mecanismos involucrados en la regresión del tumor y aquellos implicados en la recidiva de esta patología. Tiempo atrás, el único tratamiento efectivo para las neoplasias hipofisarias era la cirugía y la irradiación [181]. En el año 1978, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), aprobó el uso de la Bromocriptina (BC), un agonista de los receptores dopaminérgicos, como una alternativa terapéutica para el manejo clínico de los adenomas secretantes de PRL [129]. Desde entonces, se han producido grandes avances en el tratamiento de la hiperprolactinemia y la infertilidad, con una efectividad de alrededor del 90% [165]. Bromocriptina inhibe la transcripción del gen de PRL, la síntesis de PRL y su liberación [182] y además,

suprime la proliferación celular [183] e induce muerte celular [162]. Actualmente, la BC es utilizada como agente terapéutico en pacientes con hiperprolactinemia, prolactinomas, acromegalia, y adenomas secretantes de ACTH, debido a su potente efecto sobre la secreción de las hormonas [117, 131]. Así también, en numerosos estudios clínicos realizados en pacientes se ha documentado que la administración prolongada de BC resulta en una marcada disminución del tamaño tumoral [181]. Diversos grupos de investigación analizaron la apoptosis inducida por BC en adenohipófisis de ratas estrogenizadas y describieron que este agonista dopaminérgico producía la regresión de los adenomas hipofisarios, induciendo apoptosis como principal mecanismo de muerte celular [162, 184]. Sin embargo, en estos trabajos fue evidente que el efecto citotóxico de la BC dispara otros mecanismos no apoptóticos, que participarían también en la regresión del tumor hipofisario. Por otro lado, en estudios sistemáticos realizados en biopsias humanas se ha descrito que BC induce llamativos cambios morfológicos que han sido demostrados por microscopía electrónica e interpretados como un fenómeno necrobiótico al que denominaron “células negras” [127, 164, 165]. Este mismo fenómeno también fue observado en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, en el que se analizó la respuesta de la población de células adenohipofisarias a BC en ratas con diferentes niveles estrogénicos [168].

De acuerdo a los antecedentes descritos en la literatura, es de gran importancia caracterizar los distintos tipos de muerte celular, tanto a nivel ultraestructural como molecular, conocer cuál es la contribución de cada uno de ellos en la regresión de los tumores hipofisarios y los mecanismos de acción que participan en los mismos con el fin de optimizar la terapéutica de esta patología. Para alcanzar este objetivo central, en este trabajo hemos inducido un proceso proliferativo de la población de células lactotropas mediante la administración prolongada de estrógenos, promoviendo luego la involución del tumor mediante la administración de BC.

Es ampliamente conocido que los estrógenos son potentes estimuladores del crecimiento y la tumorigénesis en la hipófisis anterior. Las hormonas esteroideas inducen la proliferación de las células hipofisarias, principalmente lactotropas, que en general se correlaciona con una marcada hiperprolactinemia [117, 150]. Con la finalidad

de estandarizar el modelo de estudio se comprobó la respuesta proliferativa de las células lactotropas evaluando posteriormente la efectividad del tratamiento con BC. Para ello realizamos una cuantificación morfométrica de la población de células lactotropas y analizamos las características ultraestructurales de las mismas. Coincidiendo con lo descrito en trabajos previos realizados por nuestro grupo y por otros investigadores [117, 150], la administración prolongada de estrógenos exógenos durante 30 días, indujo un marcado aumento de la población de células lactotropas. Mediante técnicas de inmunocitoquímica analizadas a nivel de microscopía electrónica, pudimos identificar esta población celular la cual evidenció cambios ultraestructurales asociados con el efecto estimulador del estrógeno sobre la actividad biosintética y secretoria induciendo un estado hipertrófico e hiperplásico continuo. Esta capacidad proliferativa fue señalada en diversos estudios como un evento inicial en el desarrollo de los adenomas hipofisarios [185, 186]. La administración de BC provocó la reversión del estado proliferativo y el número de células lactotropas alcanzó los valores observados en los animales controles causando importantes cambios morfológicos en las células hipofisarias.

En los diferentes modelos de estudio las células lactotropas mostraron notables modificaciones ultraestructurales estrechamente correlacionadas con los niveles séricos de PRL. Los estrógenos produjeron un aumento en la PRL sérica, con valores compatibles con hiperprolactinemia. La administración de BC disminuyó significativamente los mismos, alcanzando valores incluso menores a los observados en el grupo control, respondiendo a su potente acción inhibitoria sobre la secreción de PRL [182].

Para verificar si los efectos causados por BC sobre la población de las células lactotropas y la secreción de PRL eran producidos solamente por el agonista dopaminérgico y no debido a fluctuaciones que pudieran existir en los niveles circulantes de estradiol, determinamos la concentración sérica del esteroide. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre los valores del grupo estrogenizado con el que además, recibió el tratamiento con BC.

Para identificar y caracterizar morfológicamente los mecanismos de muerte inducidos por BC, recurrimos a la microscopía electrónica ya que es el método indicado para estudiar los patrones ultraestructurales que definen los distintos tipos de muerte celular. Como mencionamos anteriormente, en el grupo de ratas estrogenizadas las células lactotropas se presentaron hipertróficas e hiperplásicas. El tratamiento con BC, indujo una reversión del estado proliferativo, induciendo notables diferencias en la ultraestructura nuclear y citoplasmática de las células hipofisarias. El efecto temprano de BC en las células lactotropas se relacionó con la inhibición de la secreción de PRL; observándose un aumento en el tamaño y número de los gránulos secretorios almacenados en el citoplasma. En una fase posterior, las células presentaron signos característicos de involución celular, con dilatación del retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. En estadios más avanzados, las células involutivas aumentaron progresivamente la densidad electrónica de sus citoplasmas y núcleos y los sistemas reticulares continuaron dilatándose. En esta fase aparecieron alteraciones a nivel de las mitocondrias observándose dilatadas y tumefactas. El proceso involutivo culminó con la muerte celular y la presencia de las denominadas “células negras” que se caracterizaron por su alta densidad electrónica, extensa vacuolización citoplasmática no lisosomal y disrupción de las crestas mitocondriales.

En particular, hemos observado un llamativo incremento en el número de las “células negras”. En nuestros modelos experimentales estas células representaron el principal patrón de muerte luego de la exposición a BC, con intensa picnosis nuclear y condensación citoplasmática y una severa alteración de las organelas. En estas células no se visualizaron características ultraestructurales de apoptosis, como la formación de masas densas bien delimitadas de cromatina debajo de la membrana nuclear, ni la fragmentación del núcleo [139]. Tampoco se evidenció ruptura de la membrana plasmática en ninguna de las etapas de la muerte, siendo éste un signo ultraestructural característico de la necrosis [10]. Estas observaciones fueron coincidentes con las realizadas anteriormente por otros investigadores, incluso en nuestro laboratorio, vinculando a este mecanismo de muerte no apoptótico como un factor responsable de la remodelación de la glándula hipofisaria de rata, en respuesta a diferentes estímulos

fisiológicos y farmacológicos [162, 168]. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se determinó la incidencia real del mecanismo de muerte celular observado, descrito morfológicamente como “célula negra”, ni se lo identificó con parámetros bioquímicos y moleculares para correlacionarlo con la clasificación aceptada actualmente de los diferentes tipos de muerte celular [17]. Respecto a las investigaciones realizadas en patología humana, el grupo de Vidal describió que el tratamiento prolongado de los prolactinomas con BC conduce a la acumulación de “células negras”, las cuales fueron asociadas a un proceso de senescencia [164]. Posteriormente, Kontogeorgos y colaboradores pusieron en evidencia la presencia de estas mismas células luego de tratamientos cortos con BC [165].

Ante los recientes avances en el campo de la muerte celular, es preciso definir el tipo específico de muerte caracterizado como “células negras”, ya que esto abriría nuevos horizontes en el estudio y la terapéutica de los tumores hipofisarios. En nuestros grupos experimentales, estas células con signos de involución irreversibles presentaron similitudes ultraestructurales con la muerte celular no apoptótica descrita por Sperandio y colaboradores en células 293T, que fue denominada como *paraptosis* [16, 26] y aquellas mostradas por Sheldon y colaboradores en el hipocampo de ratones neonatos post-isquemia, quienes la denominaron *parapoptosis* [187]. Desde el punto de vista etimológico *parapoptosis* [del griego *παρά* o *παρ* (para) usado para designar algo diferente o relacionado con y *αποπτωση* (apoptosis) que significa deterioro], parecería ser el término más apropiado. Sin embargo, la palabra *paraptosis* es utilizada más ampliamente en la literatura científica.

Para conocer cuantitativamente cuál fue la contribución de los diferentes tipos de muerte celular inducidos por BC en la regresión del proceso tumoral hipofisario, realizamos un estudio morfométrico a nivel de microscopía electrónica, lo que nos permitió valorar la incidencia de cada mecanismo de muerte celular. Las células paraptóticas representaron aproximadamente el 25% del total de las células cuantificadas mientras que el número de células apoptóticas no sobrepasó el 1% en los grupos que recibieron el tratamiento con BC. Este hallazgo constituye un gran aporte, ya que precisamente la paraptosis suele ser subestimada en la mayoría de los estudios en

los cuales se investiga la muerte celular, centrados en el análisis de apoptosis como mecanismo principal. Es de destacar además, que estas células paraptóticas pudieron ser identificadas en todos los modelos experimentales, incluso en aquellos grupos que no recibieron tratamiento con BC, constituyendo un proceso ubicuo que representó un 6% en los animales estrogenizados y un 2% en ratas del grupo control. El aumento de la muerte celular observada en el grupo E, respecto al grupo control, puede ser atribuido al recambio celular inducido por el tratamiento prolongado con estrógenos, proceso que ya fue descrito en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Mukdsi 2004). Respecto al rol de los estrógenos, en los últimos años se realizaron trabajos en distintos tejidos en los que se describe un cambio del dogma relacionado con la función de los mismos y su vinculación exclusiva al crecimiento y desarrollo de los cánceres hormono-dependientes. Se ha informado que las hormonas esteroideas son mediadores tanto del proceso de proliferación como de muerte celular [188, 189]. Las células lactotropas muestran un significativo recambio durante el ciclo estral. De esta forma, el estrógeno puede participar en la regulación de esta población de células adenohipofisarias sensibilizándolas tanto para señales mitogénicas como apoptóticas. Numerosos trabajos centrados en analizar la respuesta de las células adenohipofisarias a distintos factores como TNF- α , IGF y LPS aportan nuevas evidencias fundamentando que los estrógenos, dependiendo del entorno hormonal, pueden ejercer además de los clásicos efectos proliferativos, acciones antiproliferativas y pro-apoptóticas [189-191]. Éste también constituye un tópico controvertido dentro del estudio de los tumores hipofisarios ya que hay otras observaciones en sistemas “*in vivo*”, donde se aprecia un dimorfismo sexual en respuesta a estrógenos. En ratas hembra la hormona esteroidea podría desempeñar un rol protector antiapoptótico incluso ante la administración de BC [168]. En términos generales son muchas las variables que intervienen en la respuesta final de las células lactotropas, tales como el estado de diferenciación celular, la actividad metabólica de la célula previa al estímulo, el nivel circulante de estrógenos y por último la naturaleza y concentración del agente disparador del proceso que finalmente inducirá la proliferación o muerte celular.

Como expresamos anteriormente, los diferentes mecanismos de muerte no sólo se definen en base a las evidencias morfológicas ultraestructurales, sino que se exige además determinar una serie de características bioquímicas y moleculares que los identifiquen. Los mecanismos bioquímicos involucrados en las formas alternativas de la muerte celular han sido estudiados y analizados en numerosas revisiones [13, 18]. El Comité de Nomenclatura en la Muerte Celular (NCCD) ha publicado recomendaciones para unificar criterios al definir los distintos parámetros bioquímicos de la muerte celular y las distintas modalidades catabólicas que suelen presentarse [17]. Para confirmar que la muerte por “células negras” se corresponde con paraptosis fue necesario el estudio de sus características bioquímicas. Con este objetivo examinamos varios parámetros, entre ellos la degradación del ADN. Nuestros estudios demostraron que BC no indujo la típica fragmentación intranucleosomal del ADN descrita en la apoptosis (ladder), ni produjo la degradación inespecífica, observada como un chorreado (smear), compatible con necrosis, poniendo en evidencia que el genoma permaneció íntegro. También hay que considerar que la apoptosis no puede ser definida exclusivamente por la fragmentación oligonucleosomal del ADN, ya que este mecanismo de muerte celular puede suceder sin esta manifestación como ocurre en la apoptosis independiente de la activación de caspasa 3 [18]. La detección de la fragmentación del ADN se hace visible cuando la proporción de células apoptóticas alcanza valores del 10%, lo cual constituye una desventaja para su identificación. A pesar de ello sigue siendo una metodología útil para el diagnóstico de apoptosis cuando se analiza junto con otros parámetros bioquímicos [17]. En nuestros grupos experimentales, la integridad del ADN detectada mediante electroforesis luego de los tratamientos con BC, tuvo correlación con la ultraestructura nuclear de las “células negras”, ya que éstas no presentaron signos de condensación ni fragmentación de la cromatina. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Sperandio y colaboradores quienes establecen como una característica definitoria de paraptosis la ausencia de fragmentación del ADN [26].

Otro parámetro analizado fue la participación de la caspasa 3 en nuestros modelos de estudio, ya que esta proteasa de cisteína es activada durante la ejecución de

la muerte celular y conduce a cambios morfológicos típicos [35]. En nuestros grupos experimentales observamos que la muerte celular inducida por BC es un proceso independiente de caspasa 3. Si bien procaspasa 3, su forma inmadura, fue detectada en todos los modelos experimentales, no se evidenció la banda de 17 kDa correspondiente a la caspasa 3 activa en ninguno de los modelos estudiados. La activación de las caspasas no es el único determinante en las decisiones de supervivencia o muerte celular, pero en general se la describe como indispensable en la apoptosis clásica, ya sea a partir de su vía intrínseca o extrínseca [18]. Nuestros hallazgos coinciden con los del grupo de Sperandio quienes no detectaron la activación de esta caspasa en el mecanismo de muerte celular por paraptosis [26]. Esto nos brinda otro dato adicional que nos permite definir a las “células negras” como células paraptóticas, no sólo por su aspecto ultraestructural, sino también a través de esta evidencia bioquímica. En los últimos años se han descrito varias formas de muerte celular independientes de caspasas que no pudieron ser clasificadas como apoptosis o necrosis [1, 42, 192, 193]. Estos mecanismos ocurren en condiciones fisiológicas, siendo también inducidos por diferentes factores como el TNF- α o por exposición a drogas citotóxicas [14].

Paraptosis puede ser también erróneamente identificada como necrosis, principalmente por algunos cambios morfológicos ultraestructurales como la vacuolización del RE, la dilatación mitocondrial y por pérdida de la continuidad de la membrana plasmática [13, 18, 26]. En nuestros modelos experimentales, las características ultraestructurales que contribuyeron a diferenciar el proceso de muerte observado en la necrosis fueron: el aumento en la electrodensidad nuclear y citoplasmática de las células que están muriendo, lo cual no es lo esperado en la necrosis, y lo más importante la preservación de la integridad de la membrana plasmática, incluso en etapas avanzadas de la muerte celular.

Para completar la caracterización bioquímica del proceso de muerte descrito como “célula negra” en nuestro modelo de estudio, analizamos el clivaje diferencial de la PARP, enzima que presenta una fragmentación específica en apoptosis y necrosis. La PARP es una enzima nuclear de 113 kDa, que cataliza la transferencia de los polímeros ADP-ribosa en respuesta a la ruptura de las hebras de ADN [194]. Durante la apoptosis

ocurre el clivaje de PARP-1 en fragmentos de 89 y 24kDa, lo cual es considerado un importante marcador de este proceso [195]. El clivaje es ocasionado por la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 [196]. Sin embargo, la PARP-1 también es lisada durante la necrosis donde proteasas lisosomales como las catepsinas B y G son liberadas y producen fragmentos proteolíticos siendo los más abundantes los de 50 kDa y 62 kDa [197, 198]. Este clivaje diferencial, permite distinguir entre el proceso apoptótico y necrótico. En nuestros grupos experimentales se detectaron los fragmentos de 110, 87, 80 y 75 kDa pero no se visualizaron los fragmentos de 50 kDa descritos en la necrosis. Estos resultados coinciden también con los de Sperandio y colaboradores, quienes tampoco detectaron los fragmentos de 50 y 62 kDa en modelos experimentales de muerte celular paraptótica [26].

Otro aspecto a tomar en consideración con respecto a este tipo de muerte celular es que la paraptosis muestra una notoria repercusión sobre el RE. Ésta es una de las organelas celulares más desarrolladas que cumple con numerosas funciones esenciales en el metabolismo celular y la regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , siendo el sitio de producción de los componentes de las membranas celulares, proteínas, lípidos y esteroides [199]. Debido a sus importantes roles, el correcto funcionamiento del RE es fundamental para la homeostasis celular. Sin embargo, numerosas circunstancias pueden interferir con las funciones del RE llevando a una condición conocida como estrés del RE siendo las causas más conocidas alteraciones en el plegamiento de las proteínas que llevan a la acumulación de moléculas anormales dentro de la organela, perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} y las infecciones virales. Este tipo de infecciones aumentan la cantidad de proteínas no plegadas y la vinculación de este estrés del RE con el suicidio celular constituye una característica evolutiva para evitar la diseminación de los virus [40]. La respuesta del RE al estrés tiene etapas bien diferenciadas, inicialmente induce la expresión de genes específicos en un intento de restaurar las funciones normales, pero cuando la situación adversa se prolonga en el tiempo, esta organela es capaz de promover la muerte celular por apoptosis, ya sea a través de la vía mitocondrial o por activación de la caspasa 12 [36, 200, 201].

Diversos estímulos de muerte celular utilizan a la mitocondria como un punto de convergencia, causando cambios críticos que conducen a una fase degenerativa que se caracteriza por la disrupción del potencial de membrana interno, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consecuente vacuolización mitocondrial [202]. La familia de proteínas Bcl-2 y el Ca^{2+} son importantes reguladores de la supervivencia en general y las alteraciones en estas moléculas también son consideradas un vínculo importante en la intercomunicación entre el RE y la mitocondria [201]. Como fue previamente mencionado, el tratamiento con BC indujo severos cambios citoplasmáticos tempranos en las células paraptóticas, caracterizados por vacuolización, turgencia y abalonamiento del RE. Luego la vacuolización afectó también a las mitocondrias, las cuales evidenciaron disrupción de sus crestas siendo este un signo inequívoco de muerte celular. Estas observaciones coinciden con las mencionadas por otros investigadores, especialistas en el tema, quienes las consideraron como rasgo central de la paraptosis [12, 16].

Una probable explicación de por qué BC indujo las alteraciones observadas en RE y mitocondrias, sería que esta droga actúa sobre el receptor dopaminérgico D2, el cual interactúa con proteínas inhibitorias de la adenilato ciclasa Go/Gi, reduciendo la acumulación de AMPc y disminuyendo el Ca^{2+} intracitoplasmático [143]. Esta alteración podría repercutir estresando el RE y depletando los niveles de Ca^{2+} del lumen reticular [36]. Cuando el tratamiento con BC se realiza durante varios días, produce un estrés sostenido sobre el RE que culminaría desencadenando la muerte paraptótica de las células lactotropas.

La muerte celular autofágica también se caracteriza por la formación de numerosas vacuolas en el citoplasma celular debido al secuestro de porciones citoplasmáticas y organelas en vesículas autofágicas de doble o múltiples membranas, cuyo contenido luego es degradado por los lisosomas [8]. Las células que presentan un exceso de autofagia, de igual forma están destinadas a morir mediante un mecanismo de muerte celular programado no apoptótico [1]. En nuestros grupos experimentales no hemos observado la presencia de autofagosomas ni vacuolas con múltiples membranas. De acuerdo a los cambios ultraestructurales que mostraron las células tratadas con BC,

éstos no fueron compatibles con signos indicativos de un aumento en la actividad autofágica. La vacuolización citoplasmática observada en nuestros grupos de estudio, podría estar causada por desregulación iónica iniciada por el estrés del RE, la cual se acompaña del influjo y la retención de agua dentro de las organelas comenzando con la dilatación del RE y afectando luego a las mitocondrias.

A pesar de los numerosos estudios realizados en el área, aún no hay consenso para establecer la contribución de la apoptosis en la involución de los tumores hipofisarios [165]. Vidal y colaboradores, destacaron el bajo índice de apoptosis observado en la regresión de los adenomas hipofisarios luego de la administración de BC en pacientes sometidos posteriormente a cirugía [164]. De hecho, en nuestros modelos experimentales, el índice de las células apoptóticas fue extremadamente bajo. Si bien, el tratamiento con BC indujo un aumento significativo de las células apoptóticas con respecto al grupo control y al estrogenizado, el número de las mismas no sobrepasó el 1% en el estudio morfométrico realizado con microscopía electrónica, hallazgo que fue confirmado mediante la técnica de TUNEL. En conclusión, estos resultados sugieren que bajo las presentes condiciones experimentales, la regresión del tumor hipofisario inducida por el tratamiento con BC, se produce a través del mecanismo celular no apoptótico identificado como paraptosis, siendo muy escaso el aporte de la apoptosis en la involución del proceso tumoral. Esto constituye un importante aporte al conocimiento en el área de la patología adenohipofisaria, la farmacología y el desarrollo de nuevas terapias [203].

Respecto a la eliminación de las células muertas, un hallazgo ultraestructural de destacar fue la observación de células foliculo estrelladas (FS), rodeando las células paraptóticas. Esta evidencia sugiere que las células FS, cuyo rol fagocítico ha sido intensamente estudiado en nuestro laboratorio, son las responsables de la eliminación de los residuos celulares [204, 205] y podrían estar involucradas en la remoción de las células paraptóticas. Un posible mecanismo de “*clearance*” sería que las células FS internalicen el material de las células muertas mediante la formación de macropinocitomas espaciosos [206]. Por otro lado, es ampliamente conocido que las

células que mueren por apoptosis en la hipófisis anterior son rápidamente fagocitadas por las células FS y digeridas por sus enzimas lisosomales [207].

Las investigaciones en el área molecular de los procesos de muerte celular son sin duda de gran relevancia para el conocimiento de los mismos, tanto en la fisiología como en la comprensión de los mecanismos de resistencia en los tratamientos farmacológicos. Dentro de las vías de transducción de señales las PKC juegan un rol esencial en la fisiopatogenia tumoral. Esta familia de proteína quinasas está constituida por varias isoformas las cuales participan en diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular [64]. Se ha demostrado que las PKC α , β , δ , ϵ , ζ y θ se expresan en la glándula hipófisis y la línea celular GH3. Estas enzimas son activadas en respuesta a numerosos estímulos como neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas [208]. Además, se ha reportado que en células hipofisarias adenomatosas se detectaron mayores niveles basales en la expresión de PKC que en células hipofisarias normales [63]. En nuestro laboratorio se ha abordado el estudio de la vía de las PKC en cultivos primarios adenohipofisarios y en la línea celular GH3B6, demostrando que las PKC α y ϵ son las isoformas que están involucradas en la proliferación de las células lactotropas [179, 191].

Respecto al proceso de muerte celular, hay un interés particular en el estudio de la participación de distintas isoformas de PKC en la regulación del mismo, ya que hay cierta controversia en establecer un rol específico para cada isoforma. Así por ejemplo, PKC α y β , las cuales clásicamente se relacionan con la proliferación y la supervivencia, también han sido involucradas en la muerte celular [67, 69]. Con el objetivo de determinar el rol de distintas isoformas de PKC en el proceso de muerte celular inducido por BC, evaluamos la expresión de PKC α , δ y ϵ en homogenatos hipofisarios totales de los distintos grupos experimentales. La estrogenización por 30 días indujo aumento en la expresión de PKC α , δ y ϵ , mientras que el tratamiento con BC únicamente redujo la expresión de las isoformas α y δ . Al relacionar estos datos con la regulación génica de las isoformas de PKC a través del análisis de la expresión de los ARNm, observamos que la PKC α evidenció un comportamiento similar al de la expresión de la proteína, siendo ésta la única isoforma regulada positivamente a nivel

genómico por el estrógeno y que puede ser vinculada estrechamente con el proceso de proliferación inducido por la hormona esteroidea.

Desde los primeros estudios sobre los roles específicos de las PKC se ha vinculado la activación de PKC δ con la inducción de la muerte celular por distintos agentes pro-apoptóticos [73, 75, 77]. Esta isoforma de 78 kDa independiente de Ca^{2+} , regula la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y en algunas líneas celulares, la sobreexpresión de PKC δ fue suficiente para inducir la apoptosis en ausencia de estímulos adicionales [74, 77]. La activación proteolítica de PKC δ por caspasas u otras proteasas resulta en un fragmento catalítico activo de 40 kDa que indujo apoptosis incluso cuando este dominio catalítico fue transfectado en cultivos celulares [73, 166].

Está bien documentado que la activación de PKC δ y la translocación de la holoenzima y del fragmento catalítico a distintos compartimientos celulares también están relacionadas con los procesos de muerte celular. Cuando PKC δ transloca a la mitocondria, dispara la vía intrínseca de la apoptosis [82]. Si transloca al núcleo, PKC δ fosforila sustratos como lamina B, ADNasas dependientes de proteína quinasas (ADN-PK) y la tirosina quinasa c-Abl, las cuales también son requeridas en la inducción de la muerte celular [209, 210].

Nuestro interés estuvo centrado en analizar la participación de PKC δ en la muerte celular inducida por BC, debido a que son muy escasos los datos publicados en adenomas hipofisarios. Se ha sugerido que esta quinasa puede contribuir al proceso apoptótico inducido por estrés genotóxico en la línea de células somato-lactotropas GH3B6 [166], desconociéndose aún la contribución de PKC δ en otros mecanismos de muerte celular no apoptóticos. Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar la expresión de holoenzima de PKC δ y de su fragmento catalítico en las fracciones subcelulares extraídas de los distintos grupos experimentales. En la fracción citoplasmática, la expresión de la holoenzima de PKC δ aumentó con la estimulación estrogénica y luego disminuyó con el tratamiento con BC, lo que se correlacionó con lo observado en los lisados totales de adenohipófisis. No se detectó el fragmento catalítico de 40 kDa en ninguno de los grupos en estudio. A diferencia de lo observado en la

fracción citoplasmática, en los extractos nucleares se evidenció un incremento significativo en la expresión de la holoenzima de 78 kDa, y también de su fragmento catalítico de 40 kDa luego del tratamiento con BC. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores quienes trabajando en cultivos de fibroblastos y glándula parótida de rata, describieron que la translocación de PKC δ al núcleo es fundamental para regular la muerte celular [211, 212].

Para confirmar los resultados obtenidos por Western Blot sobre la expresión de PKC δ en las diferentes fracciones subcelulares, realizamos inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica utilizando un anticuerpo específico. La localización de esta quinasa fue dispersa en el citoplasma de células adenohipofisarias del grupo control. La estrogenización prolongada aumentó la inmunomarcación de PKC δ a nivel citosólico, mientras que el tratamiento con BC indujo una translocación de la misma a nivel nuclear, RE y mitocondrias en células involutivas y paraptóticas. En nuestro trabajo, la alta frecuencia de la paraptosis disparada por el tratamiento con BC, sugiere que la activación y translocación nuclear de PKC δ podría estar implicada en este proceso de muerte celular no apoptótico.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) constituyen una vía de transducción de señales que al ser activadas por diversos estímulos, permiten a las células responder a los cambios en el medioambiente coordinando diversas actividades celulares como la expresión génica, el ciclo celular, el metabolismo, la motilidad, la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular [83]. Las ERK1/2 preferiblemente se activan en respuesta a factores de crecimiento, mientras que JNK y p38 están más relacionadas con la respuesta a situaciones de estrés como shock osmótico, radiaciones ionizantes o citoquinas [84].

La proteína p38 juega un rol importante en la inflamación, la activación de la respuesta inmune, el arresto del crecimiento celular y la muerte celular [213-215]. De hecho, en la actualidad se están realizando desarrollos farmacéuticos enfocados en la activación de p38 para inducir la muerte de células cancerígenas [167]. Referido al tratamiento de patologías adenohipofisarias con BC, se ha informado que esta droga

inducía la apoptosis en la línea de prolactinoma de rata GH3 y que involucraba la activación de p38 [161]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos evaluar la participación de p38 en la involución del tumor hipofisario inducido por BC “*in vivo*”. Para ello, analizamos la expresión de esta MAPK en homogenatos totales y también de su forma fosforilada (P-p38), ya que esta última puede relacionarse con su activación. La administración prolongada de estrógenos produjo un aumento en la expresión de ambas formas de p38, mientras que el tratamiento con BC indujo niveles máximos de P-p38 con una disminución de p38 total, lo que puede interpretarse como un aumento en la activación de esta quinasa. Al evaluar la regulación génica de p38 encontramos que no había cambios significativos en el ARNm de esta proteína.

Es ampliamente conocido que la respuesta celular final ante diversos estímulos, no sólo depende de la activación de vías específicas, sino también de la localización subcelular de las quinasas activadas. La quinasa p38 es una molécula que está presente en núcleos y citoplasmas de las células quiescentes, pero luego de su estimulación la localización subcelular de p38 cambia y es aún motivo de debate [84]. Hay evidencias que sugieren que luego de su activación, p38 transloca del citoplasma al núcleo [101, 216], pero otros datos indican que p38 activado, también está presente en el citoplasma de las células estimuladas [84, 217]. En vista que en la literatura son muy escasos los antecedentes relacionados con la localización subcelular de p38 en células adenohipofisarias, nos planteamos este objetivo. Para ello realizamos la detección de esta quinasa a través de técnicas inmunohistoquímicas y pudimos establecer que p38 total está normalmente expresado en el citoplasma y el núcleo de las células adenohipofisarias normales. La estimulación prolongada con estrógenos provocó un aumento en la intensidad de la marcación citoplasmática. Se ha sugerido que la expresión de esta quinasa en citoplasma de células tiroideas estaría vinculada con funciones anti-apoptóticas ya que inhibiría la activación de las caspasas, favoreciendo la supervivencia de las células neoplásicas [213]. En nuestra investigación, posterior a la administración de BC, se produjo un llamativo aumento en la inmunomarcación de p38 en los núcleos de las células, lo que podría relacionarse con la regulación de la muerte celular en este grupo experimental. Para poder correlacionar esta translocación nuclear

de p38 con el mecanismo de muerte celular inducido por BC, caracterizado como paraptosis a nivel de microscopía electrónica, realizamos una inmunocitoquímica ultraestructural utilizando un anticuerpo específico para la forma activa de p38. De esta forma pudimos documentar que BC induce un aumento en la marcación nuclear de P-p38 en las células que presentaron alteraciones ultraestructurales tempranas, en células involutivas y en las células paraptóticas.

Para confirmar estos resultados mediante técnicas bioquímicas, realizamos extractos nucleares de los distintos grupos experimentales y estudiamos los cambios en la expresión de P-p38 en los mismos. Coincidiendo con las observaciones morfológicas, detectamos que BC induce un aumento significativo en la expresión nuclear de p38 activado. La localización de p38 en núcleo ha sido relacionada con la apoptosis en diversos sistemas celulares y está vinculada a la modulación de la transcripción de numerosos genes involucrados en este proceso [101]. Por ejemplo, p38 fosforila la proteína supresora tumoral p53, contribuyendo a la sensibilidad celular ante los estímulos que dañan el ADN y producen la muerte celular [218]. Se ha visto también que p38 estabiliza el ARNm de numerosos factores involucrados en la inducción de muerte como el factor de necrosis tumoral TNF- α [103]. Nuestros resultados aportan la primera evidencia que la activación de p38 está involucrada en la paraptosis y es una de las principales vías de transducción de señales que participan en la involución de tumores hipofisarios [203].

Las ERK1/2 fueron las primeras MAPKs en ser identificadas y son intensamente activadas por factores de crecimiento, suero, los ésteres de forbol y en menor medida por citoquinas y estrés osmótico. Generalmente se las relaciona con la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células [219, 220], pero en los últimos años también se la ha asociado con la muerte celular tanto apoptótica [221] como paraptótica [12, 16].

Estudios previos realizados en nuestro centro, documentaron que las ERK1/2 participan en la proliferación de las células lactotropas inducida por ésteres de forbol [179], estrógenos e IGF-1[191]. Revelaron además, que ERK1/2 es activada por PKC ϵ

en respuesta a los estímulos anteriormente mencionados. En términos generales las vías de señalización de supervivencia o muerte celular son activadas en paralelo ante noxas tóxicas y esto puede tener implicancias en la respuesta mutagénica o carcinogénica [222]. El balance entre estas vías será la que determine finalmente cuándo una célula sobrevive o muere. Nos propusimos entonces investigar cuál era el rol de ERK1/2 en los procesos de muerte celular inducidos por BC, para lo cual evaluamos la expresión de la forma activa de ERK1/2 (P-ERK1/2) en fracciones nucleares de los diferentes grupos experimentales, teniendo como antecedente que su estimulación induce la acumulación nuclear de esta quinasa [223, 224]. En nuestros grupos experimentales, BC indujo los más altos niveles de expresión nuclear de las P-ERK1/2, con respecto al grupo control y al estimulado con estrógenos. Estos hallazgos fueron confirmados mediante inmunocitoquímica a nivel ultraestructural con un anticuerpo específico para ERK1/2 fosforilada, observándose que en células normales la marcación de las P-ERK1/2 es difusa en citoplasmas y núcleos. Luego del tratamiento con BC, se produce una intensificación de la marca en el compartimiento nuclear de células que manifiestan distintos grados de involución celular y en las células muertas por paraptosis. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos por los grupos de Sperandio y Asare, quienes describieron que la activación de la vía de las ERK1/2 está estrechamente relacionada con el proceso de muerte celular por paraptosis [12, 16, 203]. La activación de ERK1/2 ha sido también involucrada en la apoptosis inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) [225], toxinas de la *E.coli* [226], zinc [227] y privación de factores de crecimiento [93]. Los mecanismos por los cuales la vía de las ERK1/2 mediaría la apoptosis han sido identificados en distintos sistemas. ERK1/2 puede actuar sobre la mitocondria favoreciendo la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3, como es observado en numerosos estudios induciendo la muerte celular con cis-platino [67, 228]. También se ha descrito que regula positivamente la expresión de Bax y p53, e inhibe la acción de las moléculas anti-apoptóticas mitocondriales Bcl-2 y Bcl-x1 [229].

Como mencionamos anteriormente, el estudio de las vías de señalización que controlan la vida y la muerte de las células constituye un tema de gran interés actual en Biología. Dentro de esta área, otro de los aspectos intensamente estudiados, es el rol

desempeñado por los diferentes factores de transcripción en la regulación genética de la actividad celular, la proliferación, la diferenciación y la muerte. El factor de transcripción nuclear NF- κ B ha sido generalmente descrito como un regulador de la expresión de genes que codifican proteínas anti-apotóticas y antioxidantes, aunque también se lo ha relacionado con su rol modulador de la muerte celular programada en respuesta a una gran variedad de estímulos [109]. En los últimos años se ha demostrado que ante diversas noxas que inducen estrés a nivel de RER, cuando la etapa de adaptación falla, el mismo RER inicia vías de señalización de alarma a través de la activación de NF- κ B que culminan con la muerte celular [40].

Considerando que en nuestro modelo experimental BC induce la regresión de la masa tumoral principalmente a través de paraptosis y teniendo en cuenta que uno de los eventos más tempranos de este mecanismo de muerte celular no apoptótico es una extensa vacuolización a expensas del estrés en RER y mitocondrias, evaluamos la expresión de NF- κ B en extractos nucleares y citoplasmáticos mediante la técnica de WB. La administración de estrógenos indujo un aumento en la expresión de este factor de transcripción tanto en la fracción citoplasmática como nuclear respecto al grupo de los animales control. Sin embargo, el tratamiento con BC indujo niveles de expresión aún mayores.

El aumento en la expresión nuclear de NF- κ B puede deberse a la activación de este factor de transcripción y a su posterior translocación a este compartimiento. La vía de activación clásica de NF- κ B implica su disociación del factor inhibitorio I κ B α , el cual forma un complejo con NF- κ B que lo retiene inactivo en el citoplasma. Una vez que se produce la separación de este complejo, NF- κ B transloca al núcleo donde se une a secuencias promotoras del ADN, mientras que la proteína I κ B α es degradada por vía proteosomal [113]. Para evaluar si el aumento en la expresión de NF- κ B en los extractos nucleares se debía a su activación por esta vía clásica evaluamos la expresión de I κ B α en las fracciones citoplasmáticas de los grupos experimentales. La estimulación producida por los estrógenos indujo un aumento en la expresión de esta proteína, mientras que el tratamiento con BC provocó una disminución significativa de la misma, como resultado de su degradación. Este hallazgo es indicativo de activación de NF- κ B

si consideramos además que los niveles de este factor aumentaron tanto en la fracción nuclear como citoplasmática.

Para confirmar los datos obtenidos a nivel de expresión de NF- κ B por WB, determinamos la inmunolocalización del factor de transcripción a nivel de microscopía electrónica en células adenohipofisarias de los distintos grupos experimentales. En el grupo control y estrogenizado se observó una marcación dispersa en citoplasma, con escasa distribución en el núcleo de las células. El tratamiento con BC indujo un aumento en la intensidad de la inmunomarcación en el compartimiento citoplasmático, siendo aún más destacada a nivel nuclear. Los resultados obtenidos en nuestra investigación sugieren la participación del factor de transcripción NF- κ B en el mecanismo de muerte paraptótica de células adenohipofisarias inducida por BC, hallazgo que aún no ha sido reportado en la literatura y que constituye un importante aporte al conocimiento de los mecanismos de muerte celular hipofisaria. Estas observaciones coinciden con trabajos recientes realizados en cultivos de células Beta pancreáticas donde se describe que el estrés del RER desencadena la muerte celular a través de la activación clásica de NF- κ B [230].

Este trabajo de investigación fue realizado en un modelo experimental de lesiones tumorales adenohipofisarias inducido mediante la administración prolongada de estrógenos y que cursa con hiperprolactinemia. El tratamiento de los tumores hipofisarios con el agonista dopaminérgico BC, indujo una marcada reducción de la masa tumoral y de los niveles séricos de PRL. A nivel ultraestructural evidenciamos que la regresión del prolactinoma se debió principalmente a un mecanismo de muerte celular no apoptótico que identificamos morfológica y bioquímicamente como paraptosis. Este mecanismo de muerte sería el principal responsable de la respuesta de las células adenohipofisarias al tratamiento con BC, mediando su efectividad terapéutica. A nivel molecular demostramos que paraptosis estuvo relacionada con un aumento en la activación clásica de NF- κ B siendo evidente su translocación nuclear. También pudimos establecer que la proteína quinasa PKC δ y las MAPKs p38 y ERK1/2 participan activamente en este tipo de muerte celular inducida por la administración del agonista dopaminérgico.

Datos de la literatura indican que el 10% de los pacientes con prolactinomas que reciben BC como tratamiento médico presentan resistencia a esta droga, con diferente grado de respuesta al tratamiento [136]. La resistencia a BC, si bien está asociada a una disminución en el número de receptores dopaminérgicos presentes en las células lactotropas, también involucra la desregulación de las vías de señalización que participan tanto en la inhibición de la síntesis y secreción de PRL como en la muerte celular [231]. Los resultados del presente trabajo de investigación nos permitieron comprobar que el tratamiento eficaz de los prolactinomas involucra la activación de PKC δ , p38, ERK1/2 y del factor de transcripción NF- κ B los cuales podrían constituir un punto clave para evitar la resistencia al tratamiento e inducir la muerte celular a través de programas paraptóticos.

La acción concertada de los mecanismos apoptóticos y no apoptóticos es fundamental para reducir la masa tumoral y minimizar las posibilidades de recidivas. ¿Cuáles son los factores que definen que las células tumorales mueran por apoptosis, necrosis, autofagia o paraptosis? Como se expresó anteriormente, el tipo de muerte celular desencadenado por diversas noxas se relaciona con el tipo celular, su estado metabólico y la intensidad del estímulo [42]. En las células lactotropas que evidencian una intensa actividad de síntesis proteica, el tratamiento con BC induce efectos sobre RE y las mitocondrias desencadenando la muerte a través de paraptosis. Es probable que si el compartimiento subcelular blanco del mecanismo de acción de la droga fuese otro, por ejemplo el núcleo de la célula, induciendo daño del ADN, el tipo de muerte desencadenada sería apoptosis [166].

Además, las células tumorales suelen manifestar alteraciones en alguna de las vías de señalización involucradas principalmente en un determinado tipo de muerte celular y a pesar de ello, son capaces de morir de otro modo. Por ejemplo, se ha documentado que las células del cáncer de mama MCF7, las cuales no tienen caspasa 3 ni beclina 1, son relativamente incompetentes en la apoptosis y en la autofagia y mueren por entosis [59]. Sin lugar a dudas, la respuesta clínica a los tratamientos se debe a esta redundancia de los mecanismos de muerte celular.

Otro de los interrogantes se refiere a la interacción entre los distintos mecanismos de muerte celular. ¿la apoptosis, autofagia, necrosis y paraptosis son programas completamente independientes o se superponen de alguna forma? ¿Pueden suceder de manera sucesiva o simultánea? ¿Puede un mecanismo de muerte celular compensar otro alterado? Si estos mecanismos se superponen y son modificados conjuntamente durante la progresión del tumor, los fármacos orientados a restaurar las funciones e inducir la muerte incrementarán su eficacia terapéutica si estimulan uno o más mecanismos al mismo tiempo. Si estos tipos de muerte son independientes, la identificación y el direccionamiento de la vía que más eficientemente elimine las células tumorales, permitirá el re-direccionamiento de la acción del fármaco mediante su modificación molecular.

Finalmente, la importancia de este trabajo de Tesis está centrada en la caracterización morfológica y bioquímica de un mecanismo de muerte celular denominado paraptosis en tumores adenohipofisarios experimentales en respuesta a BC, poniendo en relevancia algunos blancos moleculares que mediarían la respuesta a la terapéutica de los prolactinomas. Los resultados obtenidos aportan al conocimiento general de los diferentes procesos de muerte celular y permite vislumbrar otras moléculas diana para el desarrollo de nuevos fármacos en los casos de resistencia a la BC, temáticas de gran interés en la actualidad.

Futuras investigaciones sobre los mecanismos moleculares que participan en la paraptosis y la interdependencia con otras vías abrirán nuevos horizontes en la comprensión de los programas de muerte celular, sus roles en la fisiología y la potencial manipulación para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que la administración prolongada de estrógenos fue suficiente para producir una lesión tumoral adenohipofisaria caracterizada por la proliferación de células lactotropas e hiperprolactinemia.

El tratamiento con BC indujo un mecanismo de muerte celular no apoptótico denominado paraptosis, el cual fue el responsable de la regresión de los prolactinomas experimentales.

Las células lactotropas evidenciaron una respuesta al efecto inhibitorio de BC que fue gradual y continua culminando con signos de degeneración irreversible caracterizados como paraptosis.

La detección de la holoenzima PKC δ y su fragmento catalítico a nivel nuclear luego de la administración de BC, sería indicativo de la activación de esta quinasa participando así en el proceso de paraptosis.

Las PKC α y ϵ estarían involucradas en el proceso proliferativo inducido por la estrogenización prolongada, lo que confirma su rol en la patogenia de las lesiones tumorales.

La activación y translocación al compartimiento nuclear de las MAPKs p38 y ERK1/2 en los grupos tratados con BC podrían vincularse con su activa participación en la paraptosis inducida por BC.

El aumento de la expresión del factor de transcripción NF- κ B en los núcleos de las células hipofisarias tratados con BC correlacionado con la degradación de I κ Ba citoplasmático, indicaría su activación mediante la vía clásica.

El estrés a nivel del retículo endoplásmico de células lactotropas inducido por BC, caracterizado por la marcada dilatación de esta organela, sería mediado por la activación de la vía de NF- κ B y ERK1/2.

La importancia de este trabajo de Tesis fue la caracterización bioquímica y morfológica de la paraptosis, poniendo en relevancia ciertos enclaves moleculares que parecerían mediar la respuesta a la terapéutica de los prolactinomas. Estos hallazgos aportan al conocimiento general de la muerte celular y permiten vislumbrar otros sitios diana para el desarrollo de nuevos fármacos en casos de resistencia al tratamiento con bromocriptina.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Clarke, P.G.; *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*; Anat Embryol (Berl), 181(3); 195-213; 1990.
2. Henriquez, M., R. Armisen, A. Stutzin, and A.F. Quest; *Cell death by necrosis, a regulated way to go*; Curr Mol Med, 8(3); 187-206; 2008.
3. Degtarev, A. and J. Yuan; *Expansion and evolution of cell death programmes*; Nat Rev Mol Cell Biol, 9(5); 378-390; 2008.
4. Kroemer, G. and J.C. Reed; *Mitochondrial control of cell death*; Nat Med, 6(5); 513-519; 2000.
5. Krammer, P.H.; *CD95's deadly mission in the immune system*; Nature, 407(6805); 789-795; 2000.
6. Zakeri, Z. and R.A. Lockshin; *Cell death: history and future*; Adv Exp Med Biol, 615; 1-11; 2008.
7. Lockshin, R.A., B. Osborne, and Z. Zakeri; *Cell death in the third millennium*; Cell Death Differ, 7(1); 2-7; 2000.
8. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri; *Apoptosis, autophagy, and more*; Int J Biochem Cell Biol, 36(12); 2405-2419; 2004.
9. Zakeri, Z. and R.A. Lockshin; *Cell death during development*; J Immunol Methods, 265(1-2); 3-20; 2002.
10. Cummings, M.C., C.M. Winterford, and N.I. Walker; *Apoptosis*; Am J Surg Pathol, 21(1); 88-101; 1997.
11. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie; *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*; Br J Cancer, 26(4); 239-257; 1972.
12. Asare, N., N.E. Landvik, D. Lagadic-Gossman, M. Rissel, X. Tekpli, K. Ask, et al.; *1-Nitropyrene (1-NP) induces apoptosis and apparently a non-apoptotic programmed cell death (paraptosis) in Hepa1c1c7 cells*; Toxicol Appl Pharmacol, 230(2); 175-186; 2008.
13. Golstein, P. and G. Kroemer; *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*; Trends Biochem Sci, 32(1); 37-43; 2007.
14. Jaattela, M.; *Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression*; Oncogene, 23(16); 2746-2756; 2004.
15. Okada, H. and T.W. Mak; *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*; Nat Rev Cancer, 4(8); 592-603; 2004.
16. Sperandio, S., K. Poksay, I. de Belle, M.J. Lafuente, B. Liu, J. Nasir, et al.; *Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix*; Cell Death Differ, 11(10); 1066-1075; 2004.
17. Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, et al.; *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*; Cell Death Differ, 16(1); 3-11; 2009.
18. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone; *Cell death independent of caspases: a review*; Clin Cancer Res, 11(9); 3155-3162; 2005.
19. Schwartzman, R.A. and J.A. Cidlowski; *Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death*; Endocr Rev, 14(2); 133-151; 1993.

20. Wyllie, A.H.; *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*; Nature, 284(5756); 555-556; 1980.
21. Oberhammer, F., J.W. Wilson, C. Dive, I.D. Morris, J.A. Hickman, A.E. Wakeling, et al.; *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*; EMBO J, 12(9); 3679-3684; 1993.
22. Celis, J., *Cell Biology*; 2^o edición; San Diego; Academic Press; Vol. 1: 1998.
23. Majno, G. and I. Joris; *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*; Am J Pathol, 146(1); 3-15; 1995.
24. Fink, S.L. and B.T. Cookson; *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*; Infect Immun, 73(4); 1907-1916; 2005.
25. Fombonne, J., S. Reix, R. Rasolonjanahary, E. Danty, S. Thirion, G. Laforge-Anglade, et al.; *Epidermal growth factor triggers an original, caspase-independent pituitary cell death with heterogeneous phenotype*; Mol Biol Cell, 15(11); 4938-4948; 2004.
26. Sperandio, S., I. de Belle, and D.E. Bredesen; *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*; Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26); 14376-14381; 2000.
27. Bosman, F.T., B.C. Visser, and J. van Oeveren; *Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death*; Pathol Res Pract, 192(7); 676-683; 1996.
28. Wyllie, A.H., G.J. Beattie, and A.D. Hargreaves; *Chromatin changes in apoptosis*; Histochem J, 13(4); 681-692; 1981.
29. Wyllie, A.H.; *Apoptosis: cell death under homeostatic control*; Arch Toxicol Suppl, 11; 3-10; 1987.
30. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata; *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*; Nature, 391(6662); 96-99; 1998.
31. Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck; *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*; Anat Histol Embryol, 31(4); 214-223; 2002.
32. Horvitz, H.R.; *Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans*; Cancer Res, 59(7 Suppl); 1701s-1706s; 1999.
33. Driscoll, M.; *Cell death in C. elegans: molecular insights into mechanisms conserved between nematodes and mammals*; Brain Pathol, 6(4); 411-425; 1996.
34. Martin, S.J. and D.R. Green; *Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?*; Cell, 82(3); 349-352; 1995.
35. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan; *A decade of caspases*; Oncogene, 22(53); 8543-8567; 2003.
36. Rao, R.V., H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen; *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program*; Cell Death Differ, 11(4); 372-380; 2004.
37. Curtin, J.F. and T.G. Cotter; *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*; Cell Signal, 15(11); 983-992; 2003.
38. Thorburn, A.; *Death receptor-induced cell killing*; Cell Signal, 16(2); 139-144; 2004.
39. Skulachev, V.P.; *Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong"*; IUBMB Life, 49(5); 365-373; 2000.

40. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed; *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*; J Clin Invest, 115(10); 2656-2664; 2005.
41. van Loo, G., P. Schotte, M. van Gurp, H. Demol, B. Hoorelbeke, K. Gevaert, et al.; *Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation*; Cell Death Differ, 8(12); 1136-1142; 2001.
42. Leist, M. and M. Jaattela; *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*; Nat Rev Mol Cell Biol, 2(8); 589-598; 2001.
43. Bursch, W.; *Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades*; FEMS Yeast Res, 5(2); 101-110; 2004.
44. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri; *Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells*; Biochem Cell Biol, 72(11-12); 589-596; 1994.
45. Noda, T. and Y. Ohsumi; *Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast*; J Biol Chem, 273(7); 3963-3966; 1998.
46. Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, and D.J. Klionsky; *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*; Nature, 451(7182); 1069-1075; 2008.
47. Liang, X.H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, et al.; *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*; Nature, 402(6762); 672-676; 1999.
48. Schweichel, J.U. and H.J. Merker; *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*; Teratology, 7(3); 253-266; 1973.
49. Pilar, G. and L. Landmesser; *Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia*; J Cell Biol, 68(2); 339-356; 1976.
50. Chu-Wang, I.W. and R.W. Oppenheim; *Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development*; J Comp Neurol, 177(1); 33-57; 1978.
51. Asher, E., C.M. Payne, and C. Bernstein; *Evaluation of cell death in EBV-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy. II. Induction of non-classic apoptosis ("para-apoptosis") by tritiated thymidine*; Leuk Lymphoma, 19(1-2); 107-119; 1995.
52. Pagnussat, A.S., M.C. Faccioni-Heuser, C.A. Netto, and M. Achaval; *An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion*; J Anat, 211(5); 589-599; 2007.
53. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky; *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*; Cell Death Differ, 15(7); 1153-1162; 2008.
54. Gilmore, A.P.; *Anoikis*; Cell Death Differ, 12 Suppl 2; 1473-1477; 2005.
55. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera; *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*; Nat Rev Mol Cell Biol, 4(7); 552-565; 2003.
56. Bergsbaken, T. and B.T. Cookson; *Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis*; PLoS Pathog, 3(11); e161; 2007.
57. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson; *Pyroptosis: host cell death and inflammation*; Nat Rev Microbiol, 7(2); 99-109; 2009.
58. White, E.; *Entosis: it's a cell-eat-cell world*; Cell, 131(5); 840-842; 2007.

59. Overholtzer, M., A.A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S.J. Schnitt, R.W. King, et al.; *A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion*; Cell, 131(5); 966-979; 2007.
60. Cooper, G., *La Célula*, 2º Edición, Madrid Series, Marbán Libros. 2002.
61. Kazanietz, M., *Farmacología Molecular*, 1º Edición, Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, 2000.
62. Basu, A.; *The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment*; Pharmacol Ther, 59(3); 257-280; 1993.
63. Alvaro, V., P. Touraine, R. Raisman Vozari, F. Bai-Grenier, P. Birman, and D. Joubert; *Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries*; Int J Cancer, 50(5); 724-730; 1992.
64. Gutcher, I., P.R. Webb, and N.G. Anderson; *The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C*; Cell Mol Life Sci, 60(6); 1061-1070; 2003.
65. Ruvolo, P.P., X. Deng, B.K. Carr, and W.S. May; *A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis*; J Biol Chem, 273(39); 25436-25442; 1998.
66. Ueda, Y., S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, and S. Ohno; *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf*; J Biol Chem, 271(38); 23512-23519; 1996.
67. Nowak, G.; *Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells*; J Biol Chem, 277(45); 43377-43388; 2002.
68. Whitman, S.P., F. Civoli, and L.W. Daniel; *Protein kinase CbetaII activation by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine is antagonistic to stimulation of apoptosis and Bcl-2alpha down-regulation*; J Biol Chem, 272(38); 23481-23484; 1997.
69. Ito, Y., N.C. Mishra, K. Yoshida, S. Kharbanda, S. Saxena, and D. Kufe; *Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells*; Cell Death Differ, 8(8); 794-800; 2001.
70. Dempsey, E.C., A.C. Newton, D. Mochly-Rosen, A.P. Fields, M.E. Reyland, P.A. Insel, et al.; *Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses*; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279(3); L429-438; 2000.
71. Bertolotto, C., L. Maulon, N. Filippa, G. Baier, and P. Auberger; *Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD*; J Biol Chem, 275(47); 37246-37250; 2000.
72. Ding, L., H. Wang, W. Lang, and L. Xiao; *Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway*; J Biol Chem, 277(38); 35305-35313; 2002.
73. Mizuno, K., K. Noda, T. Araki, T. Imaoka, Y. Kobayashi, Y. Akita, et al.; *The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis*; Eur J Biochem, 250(1); 7-18; 1997.
74. Denning, M.F., Y. Wang, B.J. Nickoloff, and T. Wrone-Smith; *Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes*; J Biol Chem, 273(45); 29995-30002; 1998.
75. Reyland, M.E., S.M. Anderson, A.A. Matassa, K.A. Barzen, and D.O. Quissell; *Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells*; J Biol Chem, 274(27); 19115-19123; 1999.

76. Lu, Z., A. Hornia, Y.W. Jiang, Q. Zang, S. Ohno, and D.A. Foster; *Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta*; Mol Cell Biol, 17(6); 3418-3428; 1997.
77. Emoto, Y., Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kasaki, S. Kharbanda, M. Robertson, et al.; *Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells*; EMBO J, 14(24); 6148-6156; 1995.
78. Lord, J.M. and J. Pongracz; *Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis*; Clin Mol Pathol, 48(2); M57-M64; 1995.
79. Bharti, A., S.K. Kraeft, M. Gounder, P. Pandey, S. Jin, Z.M. Yuan, et al.; *Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis*; Mol Cell Biol, 18(11); 6719-6728; 1998.
80. Ren, J., R. Datta, H. Shioya, Y. Li, E. Oki, V. Biedermann, et al.; *p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage*; J Biol Chem, 277(37); 33758-33765; 2002.
81. Basu, A.; *Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis*; J Cell Mol Med, 7(4); 341-350; 2003.
82. Majumder, P.K., P. Pandey, X. Sun, K. Cheng, R. Datta, S. Saxena, et al.; *Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis*; J Biol Chem, 275(29); 21793-21796; 2000.
83. Krishna, M. and H. Narang; *The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple*; Cell Mol Life Sci, 65(22); 3525-3544; 2008.
84. Roux, P.P. and J. Blenis; *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*; Microbiol Mol Biol Rev, 68(2); 320-344; 2004.
85. Goldsmith, Z.G. and D.N. Dhanasekaran; *G protein regulation of MAPK networks*; Oncogene, 26(22); 3122-3142; 2007.
86. Bhat, N.R. and P. Zhang; *Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death*; J Neurochem, 72(1); 112-119; 1999.
87. Wang, X., J.L. Martindale, and N.J. Holbrook; *Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis*; J Biol Chem, 275(50); 39435-39443; 2000.
88. Lesuisse, C. and L.J. Martin; *Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway*; J Cereb Blood Flow Metab, 22(8); 935-950; 2002.
89. Pavlovic, D., N.A. Andersen, T. Mandrup-Poulsen, and D.L. Eizirik; *Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells*; Eur Cytokine Netw, 11(2); 267-274; 2000.
90. Park, B.G., C.I. Yoo, H.T. Kim, C.H. Kwon, and Y.K. Kim; *Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells*; Toxicology, 215(1-2); 115-125; 2005.
91. Wu, Z., L.J. Wu, S. Tashiro, S. Onodera, and T. Ikejima; *Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis*; Chin Med J (Engl), 118(8); 671-677; 2005.
92. Cagnol, S., E. Van Obberghen-Schilling, and J.C. Chambard; *Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death*; Apoptosis, 11(3); 337-346; 2006.

93. Sinha, D., S. Bannerjee, J.H. Schwartz, W. Lieberthal, and J.S. Levine; *Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis*; J Biol Chem, 279(12); 10962-10972; 2004.
94. Behrens, A., W. Jochum, M. Sibilica, and E.F. Wagner; *Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation*; Oncogene, 19(22); 2657-2663; 2000.
95. Barr, R.K. and M.A. Bogoyevitch; *The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs)*; Int J Biochem Cell Biol, 33(11); 1047-1063; 2001.
96. Bogoyevitch, M.A. and B. Kobe; *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases*; Microbiol Mol Biol Rev, 70(4); 1061-1095; 2006.
97. Davis, R.J.; *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*; Cell, 103(2); 239-252; 2000.
98. Fuchs, S.Y., B. Xie, V. Adler, V.A. Fried, R.J. Davis, and Z. Ronai; *c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors*; J Biol Chem, 272(51); 32163-32168; 1997.
99. Widmann, C., S. Gibson, and G.L. Johnson; *Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals*; J Biol Chem, 273(12); 7141-7147; 1998.
100. Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, et al.; *Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1*; J Biol Chem, 270(41); 23934-23936; 1995.
101. Turjanski, A.G., J.P. Vague, and J.S. Gutkind; *MAP kinases and the control of nuclear events*; Oncogene, 26(22); 3240-3253; 2007.
102. Saika, S., Y. Okada, T. Miyamoto, O. Yamanaka, Y. Ohnishi, A. Ooshima, et al.; *Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium*; Invest Ophthalmol Vis Sci, 45(1); 100-109; 2004.
103. Zarubin, T. and J. Han; *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*; Cell Res, 15(1); 11-18; 2005.
104. Kusahara, M., E. Takahashi, T.E. Peterson, J. Abe, M. Ishida, J. Han, et al.; *p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2*; Circ Res, 83(8); 824-831; 1998.
105. Juo, P., C.J. Kuo, S.E. Reynolds, R.F. Konz, J. Raingeaud, R.J. Davis, et al.; *Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases*; Mol Cell Biol, 17(1); 24-35; 1997.
106. Bradham, C. and D.R. McClay; *p38 MAPK in development and cancer*; Cell Cycle, 5(8); 824-828; 2006.
107. Perkins, N.D.; *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*; Nat Rev Mol Cell Biol, 8(1); 49-62; 2007.
108. Hoberg, J.E., A.E. Popko, C.S. Ramsey, and M.W. Mayo; *IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300*; Mol Cell Biol, 26(2); 457-471; 2006.
109. Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan, and C. Gelinas; *Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB*; Oncogene, 25(51); 6800-6816; 2006.

110. Senftleben, U. and M. Karin; *The IKK/NF-kappaB pathway*; Crit Care Med, 30(1 Supp); S18-S26; 2002.
111. Ghosh, S. and M. Karin; *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*; Cell, 109 Suppl; S81-96; 2002.
112. Karin, M. and A. Lin; *NF-kappaB at the crossroads of life and death*; Nat Immunol, 3(3); 221-227; 2002.
113. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin; *IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy*; J Clin Invest, 115(10); 2625-2632; 2005.
114. Wang, L., Y.K. Lee, D. Bundman, Y. Han, S. Thevananther, C.S. Kim, et al.; *Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production*; Dev Cell, 2(6); 721-731; 2002.
115. Hu, P., Z. Han, A.D. Couvillon, R.J. Kaufman, and J.H. Exton; *Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression*; Mol Cell Biol, 26(8); 3071-3084; 2006.
116. Denk, A., T. Wirth, and B. Baumann; *NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival*; Cytokine Growth Factor Rev, 11(4); 303-320; 2000.
117. Asa, S.L. and S. Ezzat; *The pathogenesis of pituitary tumours*; Nat Rev Cancer, 2(11); 836-849; 2002.
118. Haggi, E.S., A.I. Torres, C.A. Maldonado, and A. Aoki; *Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation*; J Endocrinol, 111(3); 367-373; 1986.
119. Torres, A.I., H.A. Pasolli, C.A. Maldonado, and A. Aoki; *Changes in thyrotroph and somatotroph cell populations induced by stimulation and inhibition of their secretory activity*; Histochem J, 27(5); 370-379; 1995.
120. Takahashi, S.; *Development and heterogeneity of prolactin cells*; Int Rev Cytol, 157; 33-98; 1995.
121. Bonaterra, M., A. De Paul, A. Aoki, and A. Torres; *Residual effects of thyroid hormone on secretory activity of somatotroph population*; Exp Clin Endocrinol Diabetes, 106(6); 494-499; 1998.
122. Takahashi, S.; *Immunocytochemical and immuno-electron-microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages*; Cell Tissue Res, 266(2); 275-284; 1991.
123. Scully, K.M. and M.G. Rosenfeld; *Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis*; Science, 295(5563); 2231-2235; 2002.
124. Farquhar, M.G., R.L. Vernier, and R.A. Good; *An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus*; J Exp Med, 106(5); 649-660; 1957.
125. Pawlikowski, M.; *Endocrine/paracrine control of pituitary cell proliferation and its involvement in pituitary tumorigenesis*; Pituitary, 1(3-4); 251-256; 1999.
126. Giannattasio, G. and M. Bassetti; *Human pituitary adenomas. Recent advances in morphological studies*; J Endocrinol Invest, 13(5); 435-454; 1990.
127. Kovacs, K., L. Stefaneanu, E. Horvath, R.V. Lloyd, I. Lancranjan, M. Buchfelder, et al.; *Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing pituitary adenomas. A morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization*; Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 418(5); 439-446; 1991.

128. Vance, M.L., M. Lipper, A. Klibanski, B.M. Biller, N.A. Samaan, and M.E. Molitch; *Treatment of prolactin-secreting pituitary macroadenomas with the long-acting non-ergot dopamine agonist CV 205-502*; Ann Intern Med, 112(9); 668-673; 1990.
129. Davis, J.R., W.E. Farrell, and R.N. Clayton; *Pituitary tumours*; Reproduction, 121(3); 363-371; 2001.
130. Asa, S.L., A.M. Bamberger, B. Cao, M. Wong, K.L. Parker, and S. Ezzat; *The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph*; J Clin Endocrinol Metab, 81(6); 2165-2170; 1996.
131. Asa, S.L. and S. Ezzat; *Medical management of pituitary adenomas: structural and ultrastructural changes*; Pituitary, 5(2); 133-139; 2002.
132. Mindermann, T., K. Kovacs, and C.B. Wilson; *Changes in the immunophenotype of recurrent pituitary adenomas*; Neurosurgery, 35(1); 39-44; 1994.
133. Ezzat, S., L. Zheng, X.F. Zhu, G.E. Wu, and S.L. Asa; *Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis*; J Clin Invest, 109(1); 69-78; 2002.
134. Spada, A., G. Mantovani, and A. Lania; *Pathogenesis of prolactinomas*; Pituitary, 8(1); 7-15; 2005.
135. Schlechte, J.A.; *Clinical practice. Prolactinoma*; N Engl J Med, 349(21); 2035-2041; 2003.
136. Liu, J.K. and W.T. Couldwell; *Contemporary management of prolactinomas*; Neurosurg Focus, 16(4); E2; 2004.
137. Delgrange, E., G. Sassolas, G. Perrin, M. Jan, and J. Trouillas; *Clinical and histological correlations in prolactinomas, with special reference to bromocriptine resistance*; Acta Neurochir (Wien), 147(7); 751-757; discussion 757-758; 2005.
138. Kontogeorgos, G.; *Molecular cytogenetics of pituitary adenomas, assessed by FISH technique*; Front Horm Res, 32; 205-216; 2004.
139. Kapranos, N., G. Kontogeorgos, E. Horvath, and K. Kovacs; *Morphology, molecular regulation and significance of apoptosis in pituitary adenomas*; Front Horm Res, 32; 217-234; 2004.
140. Sarkar, D.K.; *Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals*; Front Horm Res, 35; 32-49; 2006.
141. Ezzat, S.; *The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis*; Brain Pathol, 11(3); 356-370; 2001.
142. Korbonits, M., D.G. Morris, A. Nanzer, B. Kola, and A.B. Grossman; *Role of regulatory factors in pituitary tumour formation*; Front Horm Res, 32; 63-95; 2004.
143. Missale, C., S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, and M.G. Caron; *Dopamine receptors: from structure to function*; Physiol Rev, 78(1); 189-225; 1998.
144. Fiorentini, C., N. Guerra, M. Facchetti, A. Finardi, L. Tiberio, L. Schiaffonati, et al.; *Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB*; Mol Endocrinol, 16(2); 353-366; 2002.
145. Hinuma, S., Y. Habata, R. Fujii, Y. Kawamata, M. Hosoya, S. Fukusumi, et al.; *A prolactin-releasing peptide in the brain*; Nature, 393(6682); 272-276; 1998.

146. Takahashi, K., T. Abe, K. Matsumoto, and M. Tomita; *Does prolactin releasing peptide receptor regulate prolactin-secretion in human pituitary adenomas?*; *Neurosci Lett*, 291(3); 159-162; 2000.
147. Schuff, K.G., S.T. Hentges, M.A. Kelly, N. Binart, P.A. Kelly, P.M. Iuvone, et al.; *Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms*; *J Clin Invest*, 110(7); 973-981; 2002.
148. Jin, L., X. Qian, E. Kulig, B.W. Scheithauer, R. Calle-Rodrigue, C. Abboud, et al.; *Prolactin receptor messenger ribonucleic acid in normal and neoplastic human pituitary tissues*; *J Clin Endocrinol Metab*, 82(3); 963-968; 1997.
149. Pasolli, H.A., A.I. Torres, and A. Aoki; *Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats*; *J Endocrinol*, 134(2); 241-246; 1992.
150. Mukdsi, J.H., A.L. De Paul, S. Munoz, A. Aoki, and A.I. Torres; *Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen*; *Histochem Cell Biol*, 121(6); 453-462; 2004.
151. Wingrave, S.J., C.R. Kay, and M.P. Vessey; *Oral contraceptives and pituitary adenomas*; *Br Med J*, 280(6215); 685-686; 1980.
152. Corenblum, B. and L. Donovan; *The safety of physiological estrogen plus progestin replacement therapy and with oral contraceptive therapy in women with pathological hyperprolactinemia*; *Fertil Steril*, 59(3); 671-673; 1993.
153. Kovacs, K., L. Stefanescu, S. Ezzat, and H.S. Smyth; *Prolactin-producing pituitary adenoma in a male-to-female transsexual patient with protracted estrogen administration. A morphologic study*; *Arch Pathol Lab Med*, 118(5); 562-565; 1994.
154. Mukdsi, J.H., A.L. Paul, S. Gutierrez, F.D. Roth, A. Aoki, and A.I. Torres; *Subcellular localisation of VEGF in different pituitary cells. Changes of its expression in oestrogen induced prolactinomas*; *J Mol Histol*; 2006.
155. Mukdsi, J.H., A.L. De Paul, J.P. Petiti, S. Gutierrez, A. Aoki, and A.I. Torres; *Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas*; *Acta Neuropathol*, 112(4); 491-501; 2006.
156. Stefanescu, L., K. Kovacs, E. Horvath, R.V. Lloyd, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, et al.; *In situ hybridization study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas*; *J Clin Endocrinol Metab*, 78(1); 83-88; 1994.
157. Lee, T.Y. and J.T. Pan; *Involvement of central GABAergic neurons in basal and diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion*; *Life Sci*, 68(17); 1965-1975; 2001.
158. Rosenfeld, M.G., P. Briata, J. Dasen, A.S. Gleiberman, C. Kioussi, C. Lin, et al.; *Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo*; *Recent Prog Horm Res*, 55; 1-13; discussion 13-14; 2000.
159. Paez-Pereda, M., F. Kuchenbauer, E. Arzt, and G.K. Stalla; *Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix*; *Braz J Med Biol Res*, 38(10); 1487-1494; 2005.
160. Vaudry, D., B.J. Gonzalez, M. Basille, L. Yon, A. Fournier, and H. Vaudry; *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions*; *Pharmacol Rev*, 52(2); 269-324; 2000.

161. Kanasaki, H., K. Fukunaga, K. Takahashi, K. Miyazaki, and E. Miyamoto; *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH3 cells*; Biol Reprod, 62(6); 1486-1494; 2000.
162. Drewett, N., J.M. Jacobi, D.A. Willgoss, and H.M. Lloyd; *Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine*; Neuroendocrinology, 57(1); 89-95; 1993.
163. Gruszka, A., J. Kunert-Radek, and M. Pawlikowski; *The effect of octreotide and bromocriptine on expression of a pro-apoptotic Bax protein in rat prolactinoma*; Folia Histochem Cytobiol, 42(1); 35-39; 2004.
164. Vidal, S., E. Horvath, K. Kovacs, B.W. Scheithauer, R.V. Lloyd, and G. Kontogeorgos; *Ultrastructural features of apoptosis in human pituitary adenomas*; Ultrastruct Pathol, 25(2); 85-92; 2001.
165. Kontogeorgos, G., E. Horvath, K. Kovacs, C. Coire, R.V. Lloyd, B.W. Scheithauer, et al.; *Morphologic changes of prolactin-producing pituitary adenomas after short treatment with dopamine agonists*; Acta Neuropathol, 111(1); 46-52; 2006.
166. Leverrier, S., A. Vallentin, and D. Joubert; *Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis*; Biochem J, 368(Pt 3); 905-913; 2002.
167. Olson, J.M. and A.R. Hallahan; *p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy*; Trends Mol Med, 10(3); 125-129; 2004.
168. Aoki, M.P., A. Aoki, and C.A. Maldonado; *Sexual dimorphism of apoptosis in lactotrophs induced by bromocriptine*; Histochem Cell Biol, 116(3); 215-222; 2001.
169. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson; *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*; J Cell Biol, 119(3); 493-501; 1992.
170. Venable, J.H. and R. Coggeshall; *A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy*; J Cell Biol, 25; 407-408; 1965.
171. Niswender, G.D., C.L. Chen, A.R. Midgley, Jr., J. Meites, and S. Ellis; *Radioimmunoassay for rat prolactin*; Proc Soc Exp Biol Med, 130(3); 793-797; 1969.
172. Chomczynski, P.; *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*; Biotechniques, 15(3); 532-534, 536-537; 1993.
173. Sugawara, A., P.M. Yen, D.S. Darling, and W.W. Chin; *Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X-receptors*; Endocrinology, 133(3); 965-971; 1993.
174. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon; *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*; Proc Natl Acad Sci U S A, 76(9); 4350-4354; 1979.
175. Torres, A.I. and A. Aoki; *Subcellular compartmentation of prolactin in rat lactotrophs*; J Endocrinol, 105(2); 219-225; 1985.
176. Lawless, M.W., A.K. Mankan, S.G. Gray, and S. Norris; *Endoplasmic reticulum stress--a double edged sword for Z alpha-1 antitrypsin deficiency hepatotoxicity*; Int J Biochem Cell Biol, 40(8); 1403-1414; 2008.

177. Hsu, B.L., S.M. Harless, R.C. Lindsley, D.M. Hilbert, and M.P. Cancro; *Cutting edge: BLYS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators*; J Immunol, 168(12); 5993-5996; 2002.
178. Aoki, A., E.O. de Gaisan, H.A. Pasolli, and A.I. Torres; *Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland*; Exp Clin Endocrinol Diabetes, 104(3); 256-262; 1996.
179. Petiti, J.P., A.L. De Paul, S. Gutierrez, C.M. Palmeri, J.H. Mukdsi, and A.I. Torres; *Activation of PKC epsilon induces lactotroph proliferation through ERK1/2 in response to phorbol ester*; Mol Cell Endocrinol, 289(1-2); 77-84; 2008.
180. Gutierrez, S., J.H. Mukdsi, A. Aoki, A.I. Torres, A.P. Soler, and E.M. Orgnero; *Ultrastructural immunolocalization of IGF-1 and insulin receptors in rat pituitary culture: evidence of a functional interaction between gonadotroph and lactotroph cells*; Cell Tissue Res, 327(1); 121-132; 2007.
181. Kovacs, K. and E. Horvath; *Effects of medical therapy on pituitary tumors*; Ultrastruct Pathol, 29(3-4); 163-167; 2005.
182. Wood, D.F., J.M. Johnston, and D.G. Johnston; *Dopamine, the dopamine D2 receptor and pituitary tumours*; Clin Endocrinol (Oxf), 35(6); 455-466; 1991.
183. Stefanescu, L., K. Kovacs, B.W. Scheithauer, G. Kontogeorgos, D.L. Riehle, T.J. Sebo, et al.; *Effect of Dopamine Agonists on Lactotroph Adenomas of the Human Pituitary*; Endocr Pathol, 11(4); 341-352; 2000.
184. Aoki, M.P., C.A. Maldonado, and A. Aoki; *Apoptotic and non-apoptotic cell death in hormone-dependent glands*; Cell Tissue Res, 291(3); 571-574; 1998.
185. Yonezawa, K., N. Tamaki, and T. Kokunai; *Effects of bromocriptine and terguride on cell proliferation and apoptosis in the estrogen-stimulated anterior pituitary gland of the rat*; Neurol Med Chir (Tokyo), 37(12); 901-906; 1997.
186. Ekramullah, S.M., Y. Saitoh, T. Ohnishi, N. Arita, T. Taki, and T. Hayakawa; *Effects of bromocriptine on staining indices of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen, and nucleolar organizer region number in pituitary adenomas*; Neurol Med Chir (Tokyo), 35(4); 221-226; 1995.
187. Sheldon, R.A., J.J. Hall, L.J. Noble, and D.M. Ferriero; *Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic*; Neurosci Lett, 304(3); 165-168; 2001.
188. Soto, A.M. and C. Sonnenschein; *The two faces of janus: sex steroids as mediators of both cell proliferation and cell death*; J Natl Cancer Inst, 93(22); 1673-1675; 2001.
189. Candolfi, M., V. Zaldivar, A. De Laurentiis, G. Jaita, D. Pisera, and A. Seilicovich; *TNF-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats*; Endocrinology, 143(9); 3611-3617; 2002.
190. Pisera, D., M. Candolfi, S. Navarra, J. Ferraris, V. Zaldivar, G. Jaita, et al.; *Estrogens sensitize anterior pituitary gland to apoptosis*; Am J Physiol Endocrinol Metab, 287(4); E767-771; 2004.
191. Gutierrez, S., J.P. Petiti, A.L. De Paul, J.H. Mukdsi, A. Aoki, A.I. Torres, et al.; *Antagonic effects of oestradiol in interaction with IGF-1 on proliferation of lactotroph cells in vitro*; Histochem Cell Biol, 124(3-4); 291-301; 2005.
192. Kitanaka, C. and Y. Kuchino; *Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology*; Cell Death Differ, 6(6); 508-515; 1999.
193. Wyllie, A.H. and P. Golstein; *More than one way to go*; Proc Natl Acad Sci U S A, 98(1); 11-13; 2001.

194. D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G.G. Poirier; *Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions*; Biochem J, 342 (Pt 2); 249-268; 1999.
195. Kaufmann, S.H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson, and G.G. Poirier; *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis*; Cancer Res, 53(17); 3976-3985; 1993.
196. Germain, M., E.B. Affar, D. D'Amours, V.M. Dixit, G.S. Salvesen, and G.G. Poirier; *Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7*; J Biol Chem, 274(40); 28379-28384; 1999.
197. Casiano, C.A., R.L. Ochs, and E.M. Tan; *Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes*; Cell Death Differ, 5(2); 183-190; 1998.
198. Gobeil, S., C.C. Boucher, D. Nadeau, and G.G. Poirier; *Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases*; Cell Death Differ, 8(6); 588-594; 2001.
199. Ron, D. and P. Walter; *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*; Nat Rev Mol Cell Biol, 8(7); 519-529; 2007.
200. Jimbo, A., E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, et al.; *ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation*; Exp Cell Res, 283(2); 156-166; 2003.
201. Rong, Y. and C.W. Distelhorst; *Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis*; Annu Rev Physiol, 70; 73-91; 2008.
202. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll; *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*; J Biol Chem, 275(21); 16202-16212; 2000.
203. Palmeri, C.M., J.P. Petiti, L. Del Valle Sosa, S. Gutierrez, A.L. De Paul, J.H. Mukdsi, et al.; *Bromocriptine induces paraptosis as the main type of cell death responsible for experimental pituitary tumor shrinkage*; Toxicol Appl Pharmacol; 2009.
204. Orgnero de Gaisan, E.M., C.A. Maldonado, and A. Aoki; *Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study*; Histochem J, 25(2); 150-165; 1993.
205. Aoki, A., E. Orgnero de Gaisan, H. Amalia Pasolli, and A.I. Torres; *An alternative pathway for clearance of dead lactotropes from rat pituitary gland*; Tissue Cell, 28(6); 645-649; 1996.
206. Krysko, D.V., T. Vanden Berghe, E. Parthoens, K. D'Herde, and P. Vandenabeele; *Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance*; Methods Enzymol, 442; 307-341; 2008.
207. Claudius, L., Y. Yoshimi, H. Yoichiro, M. Gabriel, and M. Koichi; *Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (Numida meleagris)*; Acta Histochem, 108(1); 69-80; 2006.
208. MacEwan, D.J., M.S. Johnson, and R. Mitchell; *Protein kinase C isoforms in pituitary cells displaying differential sensitivity to phorbol ester*; Mol Cell Biochem, 202(1-2); 85-90; 1999.
209. Cross, T., G. Griffiths, E. Deacon, R. Sallis, M. Gough, D. Watters, et al.; *PKC-delta is an apoptotic lamin kinase*; Oncogene, 19(19); 2331-2337; 2000.

210. Sun, X., F. Wu, R. Datta, S. Kharbanda, and D. Kufe; *Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress*; J Biol Chem, 275(11); 7470-7473; 2000.
211. Dal Pra, I., J.F. Whitfield, A. Chiarini, and U. Armato; *Changes in nuclear protein kinase C-delta holoenzyme, its catalytic fragments, and its activity in polyomavirus-transformed pyF111 rat fibroblasts while proliferating and following exposure to apoptogenic topoisomerase-II inhibitors*; Exp Cell Res, 249(1); 147-160; 1999.
212. DeVries, T.A., M.C. Neville, and M.E. Reyland; *Nuclear import of PKCdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence*; EMBO J, 21(22); 6050-6060; 2002.
213. Pomerance, M., J. Quillard, F. Chantoux, J. Young, and J.P. Blondeau; *High-level expression, activation, and subcellular localization of p38-MAP kinase in thyroid neoplasms*; J Pathol, 209(3); 298-306; 2006.
214. Wang, Y., S. Huang, V.P. Sah, J. Ross, Jr., J.H. Brown, J. Han, et al.; *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family*; J Biol Chem, 273(4); 2161-2168; 1998.
215. Nemoto, S., J. Xiang, S. Huang, and A. Lin; *Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase*; J Biol Chem, 273(26); 16415-16420; 1998.
216. Raingeaud, J., S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, et al.; *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*; J Biol Chem, 270(13); 7420-7426; 1995.
217. Ben-Levy, R., S. Hooper, R. Wilson, H.F. Paterson, and C.J. Marshall; *Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2*; Curr Biol, 8(19); 1049-1057; 1998.
218. Sanchez-Prieto, R., J.M. Rojas, Y. Taya, and J.S. Gutkind; *A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents*; Cancer Res, 60(9); 2464-2472; 2000.
219. Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, et al.; *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*; Endocr Rev, 22(2); 153-183; 2001.
220. Harper, S.J. and N. Wilkie; *MAPKs: new targets for neurodegeneration*; Expert Opin Ther Targets, 7(2); 187-200; 2003.
221. Caughlan, A., K. Newhouse, U. Namgung, and Z. Xia; *Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases*; Toxicol Sci, 78(1); 125-134; 2004.
222. Landvik, N.E., M. Gorria, V.M. Arlt, N. Asare, A. Solhaug, D. Lagadic-Gossmann, et al.; *Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects*; Toxicology, 231(2-3); 159-174; 2007.
223. Chen, R.H., R. Tung, C. Abate, and J. Blenis; *Cytoplasmic to nuclear signal transduction by mitogen-activated protein kinase and 90 kDa ribosomal S6 kinase*; Biochem Soc Trans, 21(4); 895-900; 1993.
224. Lenormand, P., C. Sardet, G. Pages, G. L'Allemain, A. Brunet, and J. Pouyssegur; *Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases*

- (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts; *J Cell Biol*, 122(5); 1079-1088; 1993.
225. Tikoo, K., S.S. Lau, and T.J. Monks; *Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells*; *Mol Pharmacol*, 60(2); 394-402; 2001.
226. Chen, M., W. Bao, R. Aizman, P. Huang, O. Aspevall, L.E. Gustafsson, et al.; *Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis induced by uropathogenic Escherichia coli toxins via nitric oxide synthase: protective role of heme oxygenase-1*; *J Infect Dis*, 190(1); 127-135; 2004.
227. Matsunaga, Y., Y. Kawai, Y. Kohda, and M. Gemba; *Involvement of activation of NADPH oxidase and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in renal cell injury induced by zinc*; *J Toxicol Sci*, 30(2); 135-144; 2005.
228. Kim, G.S., J.S. Hong, S.W. Kim, J.M. Koh, C.S. An, J.Y. Choi, et al.; *Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells*; *J Biol Chem*, 278(24); 21920-21929; 2003.
229. Brown, L. and S. Benchimol; *The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis*; *J Biol Chem*, 281(7); 3832-3840; 2006.
230. Tonnesen, M.F., L.G. Grunnet, J. Friberg, A.K. Cardozo, N. Billestrup, D.L. Eizirik, et al.; *Inhibition of NF κ B or Bax prevents Endoplasmic Reticulum Stress- but not Nitric Oxide-mediated Apoptosis in INS-1E cells*; *Endocrinology*; 2009.
231. Molitch, M.E.; *Disorders of prolactin secretion*; *Endocrinol Metab Clin North Am*, 30(3); 585-610; 2001.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS EMPLEADOS

Unidades

°C: grado centígrado

µg: microgramo

µl : microlitro

µm: micrometro

µM: micromolar

g: gramo

h: hora

IU/mg: unidades internacionales/ miligramo

M: molar

Kb: kilobase

kDa: kilodalton

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

ml: mililitros

mm: milímetro

mM: milimolar

ng: nanogramo

nm: nanometro

nM: nanomolar

pg: picogramo

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

t: tiempo

TA: temperatura ambiente

Vol: volumen

Técnicas y reactivos

ABC (avidin-biotin complex): complejo avidina-biotina

AC: anticuerpo

BDMA: acelerador dimetilamino benceno

BSA: albúmina sérica bovina

DAB: diaminobencidina

DBP: dibutilftalato

DDSA: anhídrido dodecenilsulfónico

DEPC: dietilpirocarbamato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EQLIA: electro quimioluminiscencia

ICQ: inmunocitoquímica

IgG: inmunoglobulina G

ME: microscopía electrónica

MO: microscopía óptica

PBS: buffer fosfato salino

PBS-BSA: buffer fosfato salino- albúmina sérica bovina

RIA: radioinmunoanálisis

RT-PCR: transcriptasa Reversa-PCR

SDS: dodesilsulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

TAE: TRIS acetato EDTA

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling)

WB: western blot

Hormonas, factores de crecimiento y fármacos

ACTH: adrenocorticotrofina

BC: bromocriptina

BE: benzoato de estradiol

DA: dopamina

EGF (epidermal growth factor): factor de crecimiento epidermal

GABA: ácido gamma-aminobutírico
GH: hormona de crecimiento
GHRH: hormona liberadora de GH
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
IGF 2: factor de crecimiento insulino similar tipo 2
IGF1: factor de crecimiento insulino-similar tipo 1
LH: hormona luteinizante
PRL: prolactina
TNF (Tumoral necrosis factor): factor de necrosis tumoral
TRH: hormona liberadora de tirotrófina
TRH: hormona liberadora de tirotrófinas
TSH: hormona tirotrófina
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

Componentes celulares

ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
CG: complejo de golgi
g: gránulo secretorio
m: mitocondria
N: núcleo
RER: retículo endoplasmático rugoso

Otros

AMPC: adenosina monofosfato cíclico
ATG (autophagy related genes): genes relacionados a la autofagia
AIF (apoptosis initiation factor): factor iniciador de apoptosis.
CAD (Caspasa activated DNase): deoxirribonucleasa dependiente de caspasa
Ced (C. elegans death): genes de muerte
C-terminal: carboxilo terminal

DAG: diacilglicerol

DISC (*death-induced signalling complex*): complejo de señalización inductor de muerte

DNA-PK (DNA-dependent protein kinase): Proteína quinasa dependiente de ADN

ERK1/2 (extracellular response kinase): quinasas reguladas por señales extracelulares

FasL: Fas ligando

Gi : subunidad G inhibidora de la adenilato ciclasa

Gs: subunidad G estimuladora de la adenilato ciclasa

GTP: guanosina trifosfato

ICAD: inhibidor de la CAD

ICE: enzima convertidora de Interleuquina (Interleukin conversor enzyme)

IKK: quinasas dependientes de I κ B

IL-6: Interleucina 6

I κ B: proteínas inhibidoras del NF- κ B

JNK: quinasas terminales NH₂ Jun

MCP: muerte celular programada

MAPK (mitogen-activated protein kinase): Proteína quinasa activada por mitógenos

NF- κ B (Nuclear factor κ B): factor de transcripción nuclear κ B

ON: óxido nítrico

PACAP: polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria

PDGF (platelet derived growth factor): factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

RE α : receptor estrogénico α

RE β : receptor estrogénico β

VIH 1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

TLR (Toll-like receptor): Receptor Toll like

APÉNDICE

APÉNDICE

Parte de los resultados del presente Trabajo de Tesis Doctoral fueron publicados y presentados en reuniones científicas locales, nacionales e internacionales.

Publicaciones

Palmeri, C.M., J.P. Petiti, L. Del Valle Sosa, S. Gutierrez, A.L. De Paul, J.H. Mukdsi, et al.; *Bromocriptine induces paraptosis as the main type of cell death responsible for experimental pituitary tumor shrinkage*; Toxicol Appl Pharmacol; 2009

Comunicaciones en congresos

LA REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (SAIC) 2005

- *Muerte Celular Inducida por Bromocriptina en Prolactinomas Experimentales: Expresión de p38 MAPK. Palmeri CM; Mukdsi JH; Petiti JP; De Paul AL; Aoki A; Torres AI*: Revista Medicina 65 (Supl. II): 149. Editorial: Estudio Sigma S.R.L. ISSN 0025.7680. Buenos Aires, Argentina 2005.

LA REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (SAIC) 2006

- *Caracterización de la muerte celular inducida por bromocriptina en modelos proliferativos de células lactotropa y participación de PKC delta. Palmeri CM; Petiti JP; Alvin G; De Paul AL; Torres AI*. Revista Medicina 66 (Supl. II): 153. Editorial: Estudio Sigma S.R.L. ISSN 0025.7680. Buenos Aires, Argentina 2006

LII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (SAIC) 2007

- *Bromocriptina induce un mecanismo de muerte celular independiente de caspasa 3. Participación de PKC delta y P38MAPK. Palmeri CM; Petiti JP; Gutiérrez S; Sosa LV; De Paul AL; Torres AI. Revista Medicina 67 (Supl. III): 153. Editorial: Estudio Sigma S.R.L. ISSN 0025.7680. Buenos Aires, Argentina. 2007.*

I CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS. XI CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS. I CONGRESO DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MORFOLÓGICAS. I ENCUENTRO DE HISTOTECNÓLOGOS. 2008

- *Caracterización Morfológica y Bioquímica de un mecanismo de muerte celular inducido por Bromocriptina. Palmeri CM, Petiti JP, Gutiérrez S, Sosa LV, De Paul AL, Torres AI. Int. J. Morphol. 26 (Supl. 3): 731 Temuco. Chile. 2008.*

- *Disertante en el Curso Pre-Congreso: "Técnica y Aplicaciones de la Microscopía Electrónica de Transmisión". I Congreso Internacional de Ciencias Morfológicas. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Centro de Microscopía Electrónica 16 de Mayo de 2008*

X JORNADAS ANUALES DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOLOGÍA. 2008

- *Translocación y activación de ERK1/2 y p38 en la muerte celular no apoptótica inducida por bromocriptina. Palmeri CM; Petiti J; Sosa LV; Gutiérrez S; De Paul AL; Mukdsi JH; Torres AI. Revista Biocell, ISSN 0327-9545 en prensa.*

III IBEROAMERICAN CONGRESS ON NEUROIMMUNOMODULATION. 2009

- *Nuclear translocation and activation of NF- κ B in paraptotic cell death induced by Bromocriptine in hyperplastic pituitary. Palmeri CM, Petiti JP, Sosa L, Mukdsi J, Gutiérrez S, De Paul A, Torres A. Abril de 2009 - Buenos Aires, Argentina*

- *El estrés de retículo endoplásmico inducido por bromocriptina promueve la activación de ERK1/2/NF-KB desencadenando paraptosis de células adenohipofisarias.* Palmeri C, Petiti JP, Sosa L, Mukdsi J, Gutiérrez S, De Paul A, Torres A. Resumen publicado en la Revista Medicina 69 (Supl I): 67, 2009.

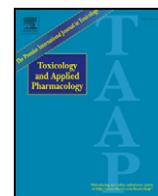
Otras Publicaciones

Durante el transcurso de esta Tesis de Doctorado he colaborado en otros proyectos realizados por nuestro grupo de trabajo que resultaron en publicaciones en revistas internacionales.

- Petiti, J.P., De Paul AL, Gutierrez S., **Palmeri, CM**, Mukdsi, JH, y Torres AI.; *Activation of PKC epsilon induces lactotroph proliferation through ERK1/2 in response to phorbol ester*; Mol Cell Endocrinol, 289(1-2); 77-84; 2008.

- Gutiérrez S, De Paul AL, Petiti JP, del Valle Sosa L, **Palmeri CM**, Soaje M, Orgnero EM, Torres AI.; *Estradiol interacts with insulin through membrane receptors to induce an antimitogenic effect on lactotroph cells.* Steroids; 73: 515-27; 2008.

- Quintar AA, Doll A, Leimgruber C, **Palmeri CM**, Roth FD, Maccioni M, Maldonado CA; *Acute Inflammation promotes early cellular stimulation of the epithelial and stromal compartments of the Rat Prostate.* The Prostate. 2010. En prensa



Bromocriptine induces paraptosis as the main type of cell death responsible for experimental pituitary tumor shrinkage

Claudia Mariela Palmeri ^{*}, Juan Pablo Petiti, Liliana del Valle Sosa, Silvina Gutiérrez, Ana Lucía De Paul, Jorge Humberto Mukdsi, Alicia Inés Torres

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2009

Revised 30 June 2009

Accepted 2 July 2009

Available online 10 July 2009

Keywords:

Bromocriptine

Estradiol

Paraptosis

Pituitary

MAPK

PKC δ

ABSTRACT

Bromocriptine (Bc) produces pituitary tumoral mass regression which induces the cellular death that was classically described as apoptosis. However, recent works have related that other mechanisms of cell death could also be involved in the maintenance of physiological and pathological pituitary homeostasis. The aim of this study was to evaluate and characterize the different types of cell death in the involution induced by Bc in experimental rat pituitary tumors.

The current study demonstrated that Bc induced an effective regression of estrogen induced pituitary tumors by a mechanism identified as paraptosis. This alternative cell death was ultrastructurally recognized by extensive cytoplasmic vacuolization and an increased cell electron density, represented around 25% of the total pituitary cells counted. Furthermore, the results obtained from biochemical assays did not correspond to the criteria of apoptosis or necrosis.

We also investigated the participation of p38, ERK1/2 and PKC δ in the paraptotic pathway. An important observation was the significant increase in phosphorylated forms of these MAPKs, the holoenzyme and catalytic fragments of PKC δ in nuclear fractions after Bc administration compared to control and estrogen treated rats. Furthermore, the immunolocalization at ultrastructural level of these kinases showed a similar distribution pattern, with a prevalent localization at nuclear level in lactotrophs from Bc treated rats.

In summary, we determined that paraptosis is the predominant cell death type involved in the regression of pituitary tumors in response to Bc treatment, and may cause the activation of PKC δ , ERK1/2 and p38.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Bromocriptine (Bc) is an ergot derivative that binds to dopamine D2 receptors of anterior pituitary cells, particularly on lactotrophs, thereby reducing prolactin (PRL) secretion through the inhibition of cAMP production and/or cytosolic Ca²⁺ elevation. Since its approval by the US Food and Drug Administration in 1978, the introduction of Bc as a therapeutic alternative has allowed the clinical management of PRL secreting adenoma (prolactinoma) and produced major advances in the treatment of hyperprolactinemia and infertility, with an effectiveness now approaching 90% (Kontogeorgos et al., 2006). Bromocriptine inhibits PRL gene transcription, PRL synthesis, and release (Wood et al., 1991), with cytotoxic and antiproliferative effects

of Bc on pituitary cells also being reported (Stefaneanu et al., 2000; Kanasaki et al., 2000). Although classical investigations have demonstrated that Bc provokes apoptotic cell death (Drewett et al., 1993), recent reports have described that Bc induces striking morphological changes, which have been shown by electron microscopy to be a necrobiotic phenomena dubbed “dark cells” (Vidal et al., 2001; Kontogeorgos et al., 2006).

In previous reports, we have demonstrated that the response of the pituitary cell population to stimuli is the outcome of a dynamic process involving the mitosis and death of redundant cells (Haggi et al., 1986; Pasolli et al., 1992; Torres et al., 1995). In addition, the proliferation and degeneration of pituitary cells have been thoroughly studied in different physiological and pathological experimental models in our laboratory (Aoki et al., 1996; Bonaterra et al., 1998; Mukdsi et al., 2004, 2006), with the apoptogenic action of Bc also having been investigated in rat pituitary experimental models (Aoki et al., 1998, 2001). However the different types of non apoptotic cell deaths triggered by Bc cytotoxic effect have not been fully clarified.

Cell death can be classified according to different criteria, its morphological appearance, enzymological features, immunological characteristics, and functional aspects (Kroemer et al., 2009). In

Abbreviations: Bc, Bromocriptine; ERK, Extracellular Signal Regulated Kinase; JNK, Stress Related c-jun NH₂-terminal kinase; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PCD, Programmed Cell Death; P-ERK1/2, phosphorylated ERK1/2; PKC δ , Protein Kinase C δ ; P-p38, phosphorylated p38 MAPK; PRL, Prolactin.

^{*} Corresponding author. Enrique Barros y Enfermera Gordillo, Pabellón de Biología Celular, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina. Fax: +54 351 4333021.

E-mail address: cpalmeri@cmefcm.uncor.edu (C.M. Palmeri).

programmed cell death (PCD), the cell plays an active role in its own demise, and a passive role in necrotic cell death (Lockshin and Zakeri, 2004; Bröker et al., 2005). Necrosis is characterized by cytoplasmic swelling, nuclear pyknosis and the progressive loss of the cytoplasmic membrane integrity, thus releasing lysosomal contents into the surrounding extracellular space with subsequent inflammation (Wyllie et al., 1980). On the other hand, PCD presents different morphological features, distinct from necrosis, which have been classified into three main types (Clarke, 1990): type 1, also known as nuclear cell death or apoptosis; type 2, which corresponds to autophagy, and type 3, a non lysosomal vacuolated degeneration also called also called *parapoptosis* (Asher et al., 1995; Sheldon et al., 2001; Pagnussat et al., 2007), or *paraptosis* (Sperandio et al., 2000). Parapoptosis is the appropriate term considering its etymological origin from the Greek “para” used to designate something different and “apoptosis” that means “falling off”.

Of these, apoptosis is the best characterized type of PCD, being defined by cytoplasmic and nuclear shrinkage, few or non ultra-structural modifications of cytoplasmic organelles, and the breakdown of the cell into multiple spherical bodies. A central mechanism in apoptosis is the activation of caspases (Okada and Mak, 2004). Related to this, autophagy is characterized by the autophagic degradation of organelles, which precedes nuclear destruction (Bursch, 2004). However, in parapoptosis, there is cytoplasmic vacuolization of the endoplasmic reticulum and mitochondria, without any involvement of the lysosomal system. This latter type of cell death typically lacks apoptotic morphology, and does not involve the activation of caspases (a Cys protease family) (Bröker et al., 2005; Asare et al., 2008).

The molecular mechanisms involved in PCD remain less well known. Various extracellular signals induce the activation of Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways to cause distinct types of cell death, such as apoptosis (Liu et al., 2007) and parapoptosis (Sperandio et al., 2004). The MAPKs belong to a group of serine/threonine protein kinases that shares many structural similarities and includes three major sub families; the extracellular signal regulated kinases (ERKs), the stress related c-jun NH₂-terminal kinases (JNKs), and p38 kinases. After injuries, a significant proportion of these MAPKs is accumulated in the nucleus (Krishna and Narang, 2008), where they phosphorylate a large number of substrates (Saika et al., 2004). p38 activation has been described to be related to the apoptosis induced by Bc in several cell lines, such as GH3 and PC12 (Kanasaki et al., 2000). Although ERK1/2 has been related to survival signalling (Treisman, 1996), recent works on 293T and Hepa1c1c7 cell lines have shown that these kinases promote cell death by parapoptosis (Sperandio et al., 2004; Asare et al., 2008). As well as these features, many researchers have reported that both p38 and ERK1/2 play a critical role as effectors of some PKC isoforms for different cell models (Basu, 2003; Tanaka et al., 2003; Petiti et al., 2008), while some studies have focused attention on determining the involvement of PKC δ in the control of apoptosis, based on its target substrates and actions on different cell types (Gutcher et al., 2003). It has been well established that numerous apoptotic stimuli can lead to PKC δ activation through the binding of cofactors to the regulatory domain, or through the proteolysis of the hinge region, thus generating a C-terminal catalytic fragment of 40 kDa (Basu, 2003). Both the holoenzyme and the catalytic fragment of PKC δ can translocate to distinct cellular compartments, and their nuclear distribution may have a significant impact on cell death (Dal Pra et al., 1999; Basu, 2003). Furthermore, some studies carried out on rat GH3B6 cells have revealed that PKC δ may participate in the cell death of pituitary adenoma cells (Leverrier et al., 2002).

The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic effect of Bc in the regression of estrogen induced pituitary tumors by characterizing and assessing the different types of cell death, and determining the involvement of p38, ERK1/2 and PKC δ .

Materials and methods

Animals and experimental models. Three months old Wistar strain male rats, were maintained at controlled temperature (21 ± 3 °C) and lighting conditions (14 h light/10 h dark), with free access to commercial laboratory chow and tap water. Considering that exogenous estrogen excess induces pituitary tumors (Asa and Ezzat, 2002a,b; Mukdsi et al., 2004), intact animals were treated with estradiol benzoate (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) for 30 days. Estrogen was implanted subcutaneously in slow releasing capsules made of Silastic tubing (Dow Corning, Medical grade, Midland, MI, USA) filled with 10 mg of estrogen crystals and sealed with Silastic cement.

Twenty five days after estrogen administration, the rats were divided into two groups: 1) (E): rats that received the vehicle of corn starch; 2) (E+Bc): rats treated with Bromocriptine (Parlodel, Novartis, Argentina) for 5 days (3 mg/kg body weight/day, po). The Bc dose was selected according to previous works done in prolonged estrogenized rats (Aoki et al., 2001; Gruszka et al., 2004).

The control group (C) was constituted by animals implanted with empty capsules and receiving only the vehicle.

Rats were decapitated within 10 s after removal from their cage, avoiding any stress or external stimuli. Animal conditions were kept in compliance with the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals published by the University's Federation for Animal Welfare, and the local Institutional Animal Care Committee.

Antibodies. Antiserum raised against rat prolactin (PRL) used in our experiments was obtained from National Institute of Health (NIH) Hormone Program (Bethesda, USA). Rabbit polyclonal anti caspase 3, anti PARP, anti p38, anti ERK1/2 and anti PKC δ were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Mouse monoclonal anti phosphorylated p38 MAPK (P-p38) and anti phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2), anti β actin, colloidal gold-antirabbit IgG and gold antimouse IgG complex were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). As secondary antibody for Western Blot immunoblottings we used peroxidase conjugated (HRP) goat anti rabbit from Jackson (West Grove, USA) and goat anti mouse secondary antibody Pierce (Rockford, USA).

Morphometry of lactotroph cell population by light microscopy. Three pituitary glands per experimental group, from a total of three independent experiments were fixed in 4% buffered formaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin. These pituitaries were then cut (3 μ m in thickness), deparaffined, rehydrated and washed in 0.1 M phosphate buffer (PBS). Before applying the primary antibody, they were previously treated with 3% H₂O₂ for 15 min to inhibit the endogenous peroxidase activity. This was followed by 1% goat serum applied for 30 min to block non specific binding of the secondary antibody. Thereafter, pituitary sections were incubated overnight in a 1:1000 solution containing anti PRL. After incubating, the slides were washed with PBS, exposed to a biotin labelled secondary antibody against rabbit IgG, at room temperature (RT) for 30 min, and then to a preformed ABC complex for 30 min (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Subsequently, the slides were immersed in a solution containing 3-3'-diaminobenzidine (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) in 0.1 M Tris buffer, pH 7.2, containing 0.03% H₂O₂. The slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and cover slipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Three different levels of pituitary were sampled from each rat, and sections were used for morphometry. In a previous work (Mukdsi et al., 2004), there were no significant differences among the lactotroph cell numbers determined at three levels (upper, middle, and lower). Therefore, results were pooled for each individual animal. Immunoreactive cells were observed using a Zeiss Axioskop 20 microscope at a magnification of $\times 400$. The number of PRL immunoreactive cells was counted from a total of 3600 cells for each rat.

Prolactin radioimmunoassay. Serum prolactin was measured by RIA, by applying a double antibody technique performed at two dose levels. These results were expressed in terms of rat prolactin-RP-3 (biological potency equivalent to 30 IU/mg). All samples were processed simultaneously to avoid interassay variations. Reagents for the RIA used (r-PRL-I-6, anti-r-PRL-S-9, and r-PRL-RP-3) were provided by the National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). The intra assay coefficient of variations was lower than 10%.

Circulating levels of estrogen. Estrogen serum levels were measured by electrochemiluminescence immunoassay (EQLIA) from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, using the commercial Elecsys System 2010 (Elecsys Corporation, Lenexa, KS). For statistical purposes, the serum analyzed was obtained from three rats for each experimental group, in three independent experiments.

Electron microscopy and immunogold labelling. The ultrastructure of the lactotroph population and different cell death processes were studied in three hemi pituitaries from each experimental group, fixed by immersion in 2% (v/v) glutaraldehyde, and 4% (w/v) formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, treated with 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in Araldite. Thin sections were cut with a diamond knife on a JEOL JUM-7 ultramicrotome (Nikon, Tokyo, Japan) and examined using a Zeiss Leo 906 E electron microscope equipped with the digital camera Megaview III (Oberkochen, Germany).

Ultrastructural morphometric analysis was performed on electron micrographs for three different levels of pituitary glands from each animal in all experimental groups. To avoid duplicate counting of the same cell, only one large section from each block was mounted on a clean 200 mesh nickel grid. Then, 20 electron micrographs were taken at random from each section at a magnification of $\times 4500$ that covered 1000 cells per animal. *Dead cells* were defined to be when they presented the following signs of irreversibility; such as chromatin clustering forming speckles, loss of plasma membrane integrity, mitochondrial disruption or engulfed bodies by adjacent cells. The number of dead cells was calculated for each animal, and these observations were considered to be independent ones in the calculation of the group means.

For immunocytochemistry, three hemi pituitaries from each experimental group were fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde and 4% (w/v) formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.3, at RT for 5–6 h, with osmium fixation being omitted. The hemi pituitaries were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol, and embedded in LR White (London Resin Corporation, Berkshire, UK). Rabbit polyclonal anti PKC δ (1:400), mouse monoclonal anti P-p38 (1:100) or anti P-ERK1/2 (1:100) were used as primary antiserum. To identify lactotroph cells, serial thin sections were incubated in parallel, with anti PRL (1:3000). The immunoreactive sites were labelled with colloidal gold–antirabbit IgG (1:20), and gold antimouse IgG (1:15). To validate the specificity of the immunostaining, negative controls were performed, and the primary antibody was replaced with either 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS or diluted preimmune serum followed by the corresponding secondary antibody.

Detection of apoptosis by DNA nick-end labelling. Nick-end labelling was detected with the TUNEL technique. Briefly, specimens fixed in 4% buffered formaldehyde were washed twice in PBS and embedded in paraffin. Sections fixed on silane (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) pre treated glass slides were processed as per the manufacturer's protocol (*in situ* Cell Death Detection kit. Roche, Mannheim, Germany).

Slides were observed using a Zeiss Axioskop 20 microscope at a magnification of $\times 400$. The percentage of apoptotic anterior pituitary cells was calculated as (TUNEL-positive cells/total anterior pituitary cells counted) $\times 100$. These cells were counted from photographs

corresponding to three pituitary sections obtained at different levels, polling 3600 cells for each animal.

DNA isolation and detection of DNA fragments. Total DNA was extracted from individual hypophyses with TRIZOL (Gibco; Carlsbad, USA), according to the manufacturer's protocol. The aqueous phase overlying the interphase was removed, and the DNA was precipitated from the interphase and organic phase with ethanol. This was sedimented by centrifugation at 2000 g for 5 min at 4 °C. Then, the phenol ethanol supernatant was removed, and the DNA was washed twice in a solution containing 0.1 M Sodium Citrate in 10% ethanol. For each wash, DNA was stored in the washing solution for 15 min at RT, with periodical mixing performed, before being centrifuged at 2000 g for 5 min at 4 °C. Following these two washes, the mixture was treated with 6 μ g RNase A (Roche, Mannheim, Germany). Then, the DNA was suspended in 75% ethanol, kept for 20 min at RT and centrifuged at 2000 g for 5 min at 4 °C, before being air dried for 15 min and dissolved in 8 mM of NaOH. To remove the insoluble material, samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and the supernatants were solubilized in 8 mM NaOH, with the pH being adjusted with Hepes to 7–8.

The samples from the experimental groups were electrophoresed in 2% agarose gel (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA), with the DNA visualized using ethidium bromide (0.5 g/ml). DNA extracts from 48 h post orchidectomized ventral prostate were run in parallel as a positive control.

Preparation of total cell extracts. Five pituitaries per experimental group (out of a total of 3 independent experiments) were minced and homogenized with a teflon glass Potter Elvehjem tissue grinder in 2 ml of lysis buffer containing 25 mM Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes/KOH, 1.25% Igepal CA-630, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml aprotinin at 4 °C. The homogenate was centrifuged at 14,000 g for 15 min at 4 °C to pellet the Igepal CA-630 insoluble material, and the supernatant was frozen in aliquots and stored at -20 °C until required for quantifications.

Subcellular fractionation. The nuclear extracts from male rat pituitary glands were prepared according to the method of Sugawara et al. (1993), with some modifications (Mukdsi et al., 2004). Briefly, five pituitaries per experimental group (out of total of three independent experiments) were minced and homogenized with a teflon glass Potter Elvehjem tissue grinder in 2 ml 0.3 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and 10 mM Hepes/KOH (pH 7.5) at 4 °C. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 10 min and the supernatant was removed. The pellet was resuspended in 2 ml solution of 0.3 M sucrose, 1 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF. Then, 75 μ l of 10% Igepal CA-630 were added, and the solution was incubated on ice for 10 min and centrifuged at 250 g for 5 min. The pellet was washed once with the same buffer and resuspended in 2 vol 20 mM Hepes (pH 7.8), 0.6 M KCl, 0.02 mM ZnCl₂, 0.2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF and incubated on ice for 30 min. These suspension was centrifuged at 20,000 g at 4 °C for 30 min. Aliquots were stored frozen at -20 °C until used in protein and western blot assays.

Western Blot analysis. The total protein concentration was measured using Bio-Rad kit (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad; Hercules, USA). Thirty micrograms from the total homogenate and nuclear fractions were run in 12% acrylamide gel (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA). To estimate the corresponding molecular weights, the Full Range Rainbow molecular weight marker was used (Amersham, Buckinghamshire, England). The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with blocking buffer containing PBS, 5% non fat dried milk, and 0.1% Tween 20 at RT to avoid non specific binding. The membranes were rinsed and

incubated for 2 h with the corresponding primary antibody: rabbit polyclonal anti caspase 3 (1:300), anti PARP (1:300), anti p38 (1:300), anti ERK1/2 (1:300), anti PKC δ , anti P-p38 (1:700) or anti P-ERK (1:700). The blots were incubated with a peroxidase conjugated (HRP) goat anti rabbit (1:5000) and goat anti mouse (1:2500) diluted in blocking buffer. The membranes were thoroughly rinsed in PBS/0.1% Tween 20, and the HRP coupled secondary antibody was revealed with an Enhanced Chemiluminescence detection system (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Emitted light was captured on Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Signals were scanned and quantified using Scion Image software (V. beta 4.0.2, Scion Image Corp., Frederick, MD, USA) at three different exposure times.

As a positive control, 48 h post orchidectomized ventral prostate homogenates were used to evaluate the expression and cleavage of caspase 3. The β actin expression was detected with mouse monoclonal antibody (1:500) and used as an internal control to confirm the equivalent total protein loading.

Statistical analysis. Values were expressed as the mean \pm SEM per group. The data obtained from three replicates measured for three independent experiments were analyzed by one way ANOVA, followed by the Tukey test using the InfoStat program. Significance levels were chosen as $p < 0.05$ for the Tukey test.

Results

Characterization of experimental models

Morphometry of PRL cell population

The population of lactotrophs in rat pituitary gland was evaluated through the number of PRL immunoreactive cells using light microscope. The morphometric analysis of the immunolabelled lactotroph cell population is shown in Fig. 1. The proportion of PRL immunoreactive cells was significantly higher ($p < 0.001$) after estrogenic treatment than in the control group. The lactotroph cell population increased two fold in the E group in comparison to the control group, reaching 30% of lactotroph cells of the total cells counted. Bromocriptine treatment reversed the number of lactotroph cells respect to the E group ($p < 0.001$), with values, similar to those of the control.

Prolactin radioimmunoassay

To determine the effect of prolonged estrogen exposure on PRL secretion and the normalization of them after Bc treatment, the PRL serum levels were determined by radioimmunoassay.

Estrogen administration for 30 days led to a significant increase ($p < 0.001$) of serum PRL, reaching 218.21 ± 29.96 ng/ml, in comparison to controls which had a value of 46.14 ± 5.85 ng/ml. There was a correlation between the increase of lactotroph cell population and striking hyperprolactinemia in the E group. Bromocriptine induced a significant decrease ($p < 0.01$) in serum PRL levels respect to estrogen stimulated rats, reaching a value of 15.26 ± 1.06 ng/ml.

Circulating levels of estradiol in experimental groups

To assess whether cell death phenomena was induced by Bc and not by a reduction of serum estrogen, we determined the estrogen levels through EQLIA. In control rats, the mean value of serum estradiol level was 73.00 ± 36.46 pg/ml, whereas subcutaneous capsules of estradiol

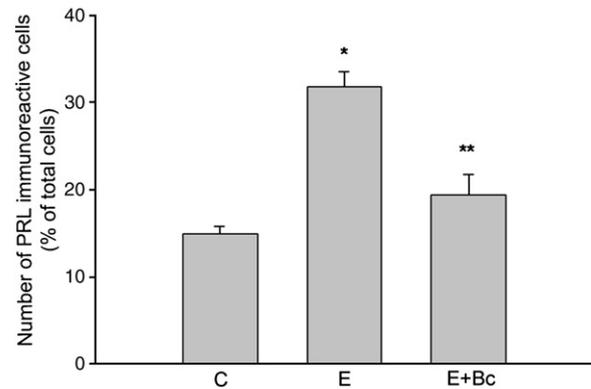


Fig. 1. Bromocriptine decrease the lactotroph cell population. The number of PRL immunoreactive cells expressed as a percentage of total pituitary cells under different experimental conditions and identified at the light microscope level. Estrogenic treatment (E) induced a significant increase in PRL immunoreactive cells ($*p < 0.001$ versus Control, C), and Bc administration (E+Bc) produced a marked decrease ($**p < 0.001$ versus E) reaching values similar to those of the control group ($p > 0.05$ versus C). The number of PRL immunoreactive cells was counted from a total of 3600 cells for each rat. ANOVA followed by Tukey's test.

benzoate increased their levels to 1200.00 ± 171.95 pg/ml. No significant difference of circulating estrogen was found between Bc treated rats and those animals which only received hormonal stimulation.

Ultrastructural analysis of pituitary gland

Electron microscopy is still a good method to identify changes in the morphofunctional cellular state and the specific features of cells undergoing death. The ultrastructural analysis of our experimental models permitted the observation of differential responses in the lactotroph cell population, caused by estrogenic or Bc treatment.

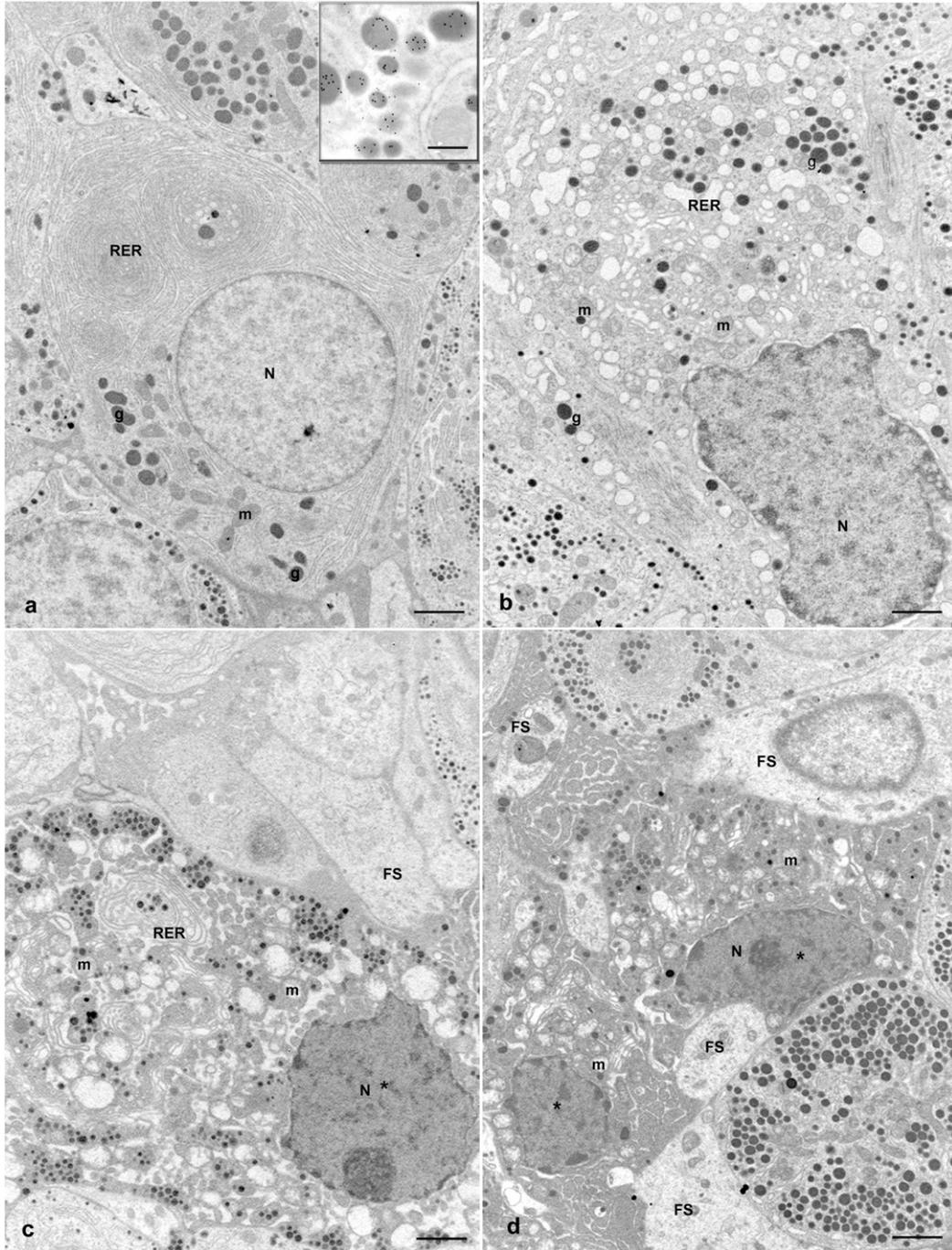
The fine structural organization of lactotrophs has been described in detail in our previous studies (Mukdsi et al., 2004; Torres and Aoki, 1985) and was similar with observations made in the present work. In control male rats, the predominant lactotroph subpopulation was characterized by spherical secretory granules of diameter 200–250 nm (type II) and 100 nm (type III).

Estrogen administration for 30 days strongly stimulated lactotroph cells. Their cytoplasm showed a striking development of organelles which were involved in protein synthesis, particularly the rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (GC) with associated immature secretory granules. The scarce mature secretory granules observed in the cytoplasm were larger and more polymorphic up to 500–900 nm in diameter (type I). All of these ultrastructural characteristics are indicative of an active protein synthesis and secretion (Fig. 2A-a).

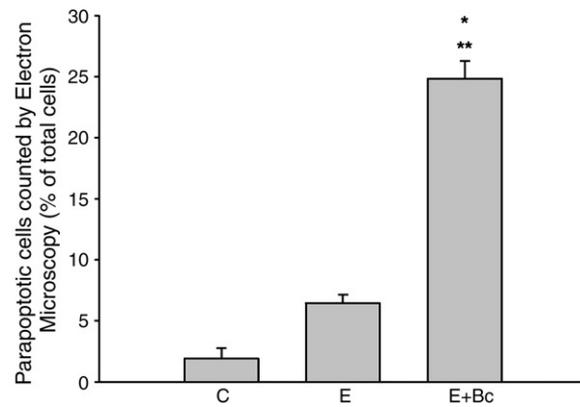
Bromocriptine treatment induced progressive and profound morphological alterations, principally in lactotroph cells identified by immunocytochemistry and in over other pituitary populations. A frequent observation was the presence of various different phases of the involution process, which culminated in a high proportion of cells displaying irregular shapes and presenting signs of the dubbed "dark cell" degeneration. The main feature in involutive cells was the progressive increase in the electron density of the cytoplasmic matrix and the early vacuolization of RER and GC, with the nuclei containing stippled heterochromatin. The increased number of secretory granules in some cells could reflect inhibition of hormone secretion

Fig. 2. Bromocriptine induced paraptotic cell death. (A) Electron micrographs of pituitary cells corresponding to different experimental groups. In field a, a healthy lactotroph cell stimulated for 30 days with estradiol benzoate showed well developed organelles involved in protein synthesis. *Inset* Secretory granules from lactotroph cell specifically identified by immunocytochemistry for PRL. Bar = 0.5 μ m. Bc administration (b, c, d) induced a gradual increase in the electron density, non lysosomal cytoplasmic vacuolization and the maintenance of the chromatin pattern. Paraptotic cells can be visualized in c and d (*). N nucleus, m mitochondria, g secretory granules, RER rough endoplasmic reticulum, FS folliculo stellated cell. Bar = 2 μ m. (B) The number of dead cells identified at the electron microscope level as paraptotic cells. This is expressed as the percentage of total pituitary cells corresponding to different experimental conditions. Bc induced a striking and significant increase in this non apoptotic cell death compared to the other experimental models ($*p < 0.001$ versus C; $**p < 0.01$ versus E). No significant differences were found between estrogen treatment and control. ANOVA followed by Tukey's test. The bars represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments, with 1000 cells being counted for each rat.

A



B



(Fig. 2A–b). “Dark cells” were considered to be an irreversible stage of degeneration and cell death. At cytoplasmic level, these underwent marked alterations of organelles, with grossly swollen mitochondria and late disruption of the inner mitochondrial membrane. The RER and GC presented progressive and intense swelling, characteristic of cytoplasmic vacuolization. Nuclear chromatin became more electron dense, but the distribution of hetero and euchromatin was maintained even at late stages, although the nuclear edges were irregular and ill defined. No nuclear fragmentation was observed in these dark cells and the plasma membrane did not show signs of disruption (Fig. 2A–c). A remarkable finding was the presence of frequent clusters of dark cells as well as scattered solitary cells with this type of cell death. These latter non apoptotic cells were in strong contact with degranulated cells, identified as folliculo stellated cells (FS), which seemed to have cytoplasmic prolongations and rounded up dark cells (Fig. 2A–d). The ultrastructural observations of dark cells were coincident with those described in the non apoptotic cell death named paraptosis or type 3 (cytoplasmic) cell death, according to Clarke’s classification.

The morphometric analysis by electron microscopy showed that the Bc treatment induced a striking increase in the number of paraptotic cells, reaching a 25% of the total cells counted, compared to 6% in the E group and 2% in control animals (Fig. 2B).

Therefore, we examined the signs of autophagic cell death and there were not observed two membrane vesicles containing autophagic degradation of organelles that are characteristics of this cell death type.

Apoptotic images were rarely detected (Fig. 3A) in the experimental groups analyzed. However, there was some evidence of cytoplasmic apoptotic bodies, which contained various organelles and fragmented micronuclei. Phagocytosed apoptotic bodies were also visualized in the cytoplasm of folliculo stellated cells.

Biochemical features of cell death

TUNEL staining

The TUNEL method is valuable for examining DNA fragmentation *in situ*. Apoptosis of pituitary cells was evaluated over histological samples of each experimental group, and the total number of apoptotic cells was quantified. Although there were significant differences in the number of TUNEL-positive cells after Bc treatment compared with control ($p < 0.001$ versus C) and estrogenized groups ($p < 0.01$ versus E), in the E+Bc group the percentage of apoptotic cells did not reach 1% of the total pituitary cells population, a finding closely related to that of electron microscopic morphometry (Fig. 3B).

DNA fragmentation

One of the biochemical analyses extensively used to characterize cell death has been based on the DNA intranucleosomal fragmentation. Although this method should not be employed as an exclusive means to define apoptosis, it may be helpful in diagnosing this type of cell death. We examined genome integrity by agarose gel electrophoresis of DNA extracts obtained from control, E and E+Bc groups. As a positive control of the technique, we used DNA extracts from 48 h post orchidectomized ventral prostate, where the characteristic “ladder” pattern was shown.

In our experimental models, neither evidence of DNA breakdown into oligonucleosomal fragments nor an apparent smeared pattern, were observed (Fig. 4A).

Caspase 3 activation

In order to study caspase 3 activation, we determined both immature pro caspase 3 (32 kDa) and its mature subunit (17 kDa) by Western Blot. In E and E+Bc groups there was an increase in the expression of the caspase 3 precursor of 32 kDa. However, the active proteolytic product of 17 kDa was never detected in any of the experimental groups. As a positive control, the total lysates of ventral prostate from 48 h post

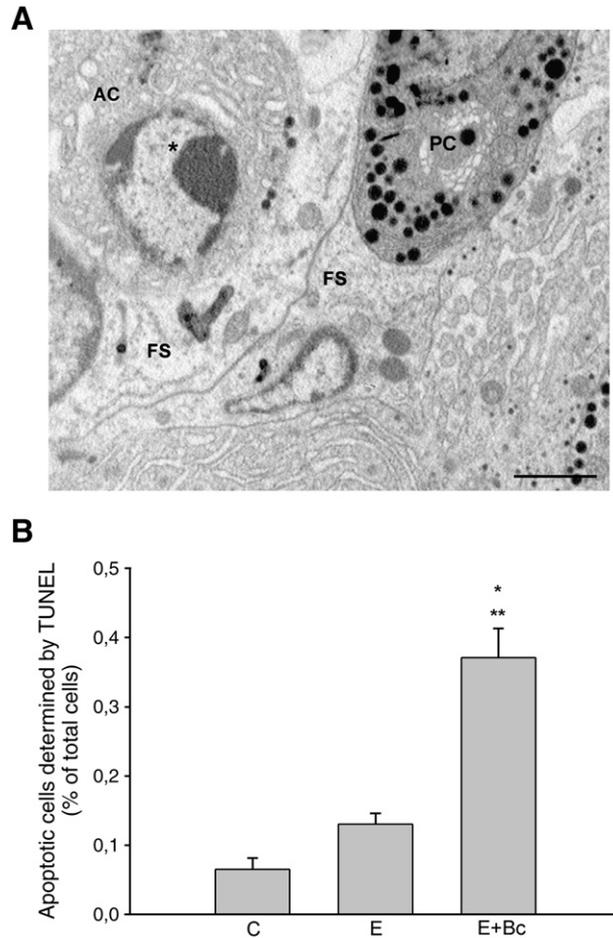


Fig. 3. Bromocriptine induced a low rate of apoptotic cell death. (A) Electron micrograph of apoptotic pituitary cell (AC). Cup shaped accumulation of chromatin substance within one pole of nucleus (*) is shown in early phase of apoptosis. The cytoplasmic organelles are still unaltered. In this field a paraptotic cell (PC) can be seen. Marked differences occurred between the morphological appearance of AC and PC. There are some folliculo stellated cells (FS), which contrast because of their lower electron density. Bar = 2 μ m. (B) The number of apoptotic cells exposed by the TUNEL technique in anterior pituitary of male rats of experimental models. The bars represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments with 3600 cells being counted for each animal. Bromocriptine treatment induced a significant increase in TUNEL-positive cells (* $p < 0.01$ versus E and ** $p < 0.001$ versus C). ANOVA followed by Tukey’s test.

orchidectomized rats were run in parallel, demonstrating an the increase in the mature caspase 3 expression level (Fig. 4B).

PARP cleavage

Apoptosis and necrosis are associated with selective but distinctively different patterns of nuclear proteins cleavage, with one of these being the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). During necrosis, the PARP cleavage produces several products, exhibiting a predominant band of approximately 50 kDa (Casciola-Rosen et al., 1995; Casiano et al., 1998). Further evidence that the paraptosis phenotype observed in our experimental models was distinct from necrosis, was provided when the cleavage of PARP was analyzed by Western Blotting, using a specific antibody that detected different molecular weight cleavage products. In all experimental groups, we observed the holoenzyme of 116 kDa and several fragments of 110, 80, and 75 kDa, without the typical fragments (50 to 62 kDa) of PARP, characteristic of the necrosis process being detected (Fig. 4C).

MAPKs and PKC δ expression

Several cell signalling systems are known to be involved in cell survival and/or cell death processes. In particular, MAPKs have been

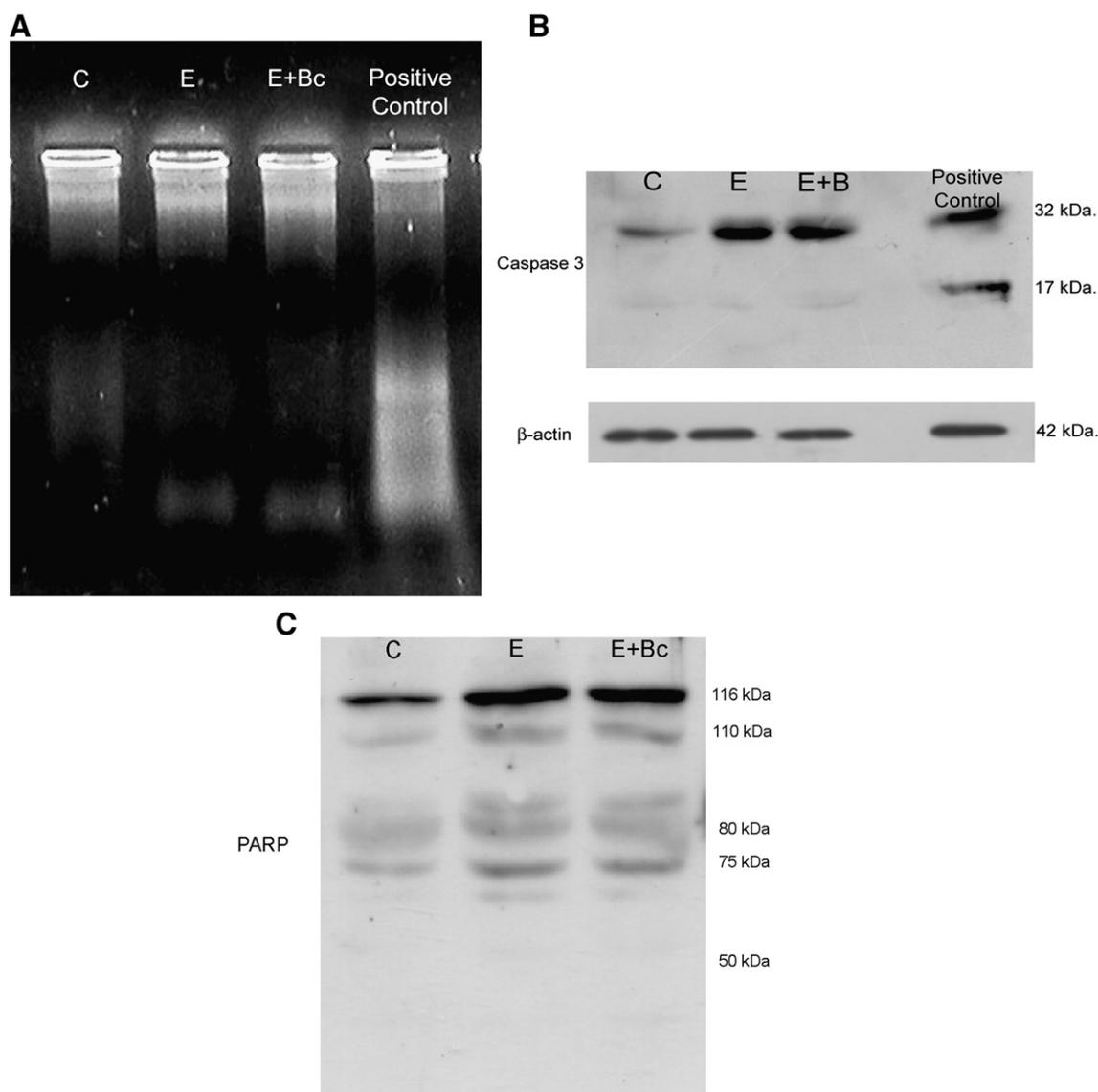


Fig. 4. Bromocriptine effects on DNA fragmentation, caspase 3 activation, and PARP cleavage. (A) Electrophoresis in agarose gel to examine the intranucleosomal fragmentation of DNA extracted from studied groups, using 48 h post orchidectomized prostate as a positive control. Whereas in prostate extracts there is intranucleosomal fragmentation, no ladder pattern could be observed in any of the experimental groups (C, E and E+Bc). (B) Caspase 3 expression in total lysates of experimental groups by Western Blot. Immature pro caspase 3 (32 kDa) was detected in all groups (C, E and E+Bc), but there was no active caspase 3 (17 kDa) fragment. Ventral prostate after 48 h post orchidectomy was used as a positive control. (C) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) expression in pituitary homogenates by Western Blot. In the different experimental models, there was no detection of 50 kDa specifically observed in the necrosis.

suggested to play a role in apoptosis, paraptosis as well as in other forms of cell death and cell survival reactions.

With the aim of analyzing the possible participation of phosphorylated p38 and ERK1/2 in cell death induced by Bc, the expression of these kinases was determined by Western Blot in nuclear fractions. Even though estrogen stimulation led to an increase in P-p38 ($p < 0.01$ versus C) and P-ERK1/2 ($p < 0.05$ versus C) expression, the highest nuclear expression of these kinases was observed after Bc treatment (P-p38 $p < 0.05$ versus E and P-ERK1/2 $p < 0.05$ versus E) (Fig. 5).

Considering that nuclear translocation of PKC δ has been related with cell death, we investigated the role of PKC δ in cell death process induced by Bc evaluating the expression of holoenzyme (78 kDa) and its catalytical fragment (40 kDa) in nuclear extracts. Estrogen treatment increased the expression of both forms of PKC δ when compared to control group, but Bc provoked the highest expression of 78 kDa PKC δ ($p < 0.001$ versus C and E) and its catalytic fragment (40 kDa) ($p < 0.001$ versus C and E) (Fig. 6).

Ultrastructural localization of MAPKs and PKC δ

Bearing in mind that the biological functions of MAPKs and PKC depend on their spatial localization, we attempted to determine the fine localization of P-p38, P-ERK1/2 and PKC δ by means of electron microscopy immunogold labelling.

In control groups, the ultrastructural immunocytochemistry of P-p38, P-ERK1/2 led us to identify these proteins, which were sparsely dispersed in the cytoplasmic matrix and also in the nucleus associated with euchromatin (Figs. 7A and D). Although chronic administration of estrogen enhanced nuclear and cytoplasmic immunoreactivity, Bc treatment induced an increase of the labelling intensity for P-p38 (Figs. 7B and C) and P-ERK1/2 at the nuclear level (Figs. 7E and F). These changes were shown in pituitary cells that displayed different inhibitory stages, as well as in hypertrophic cells with early morphological alterations, *involutive* cells and *paraptotic cells*, compared to control and estrogenic treated rats.

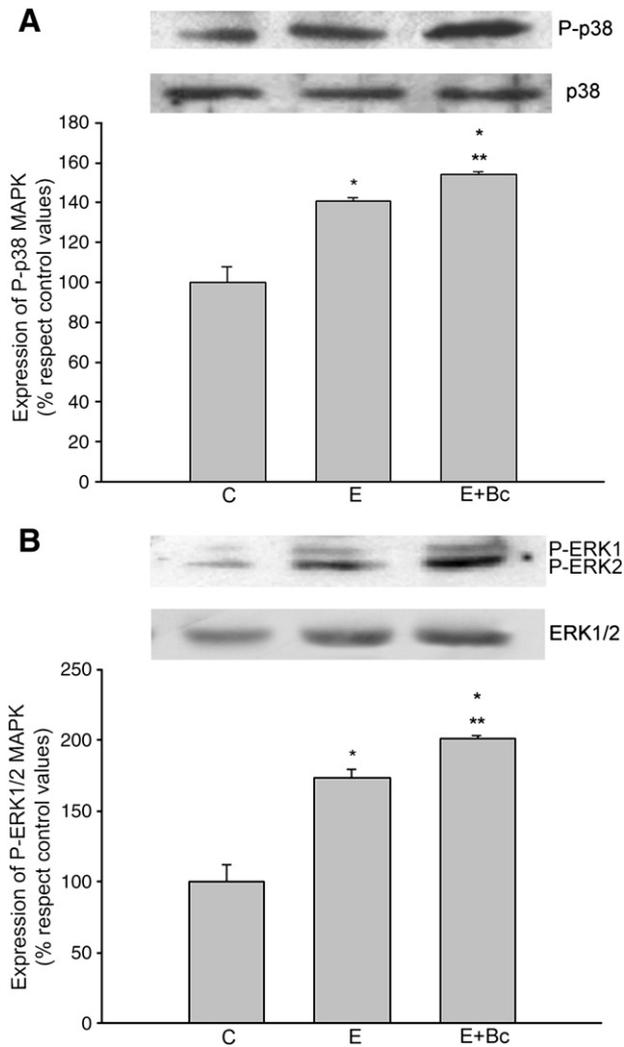


Fig. 5. Bromocriptine increased the expression of activated MAPKs in nuclear fractions of pituitary gland. (A) Western Blots showing the presence of phosphorylated p38 (P-p38). The relative intensities are determined by densitometric analysis. Bc induced an increase in P-p38 expression when compared with control and estrogenized animals * $p < 0.01$ versus C; ** $p < 0.05$ versus E. ANOVA followed by Tukey's test. (B) Expression of phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2). Bc induced an increase in P-ERK1/2 expression when compared with control and estrogenized animals. The bands detected correspond to the molecular weight of the isoforms (42 and 44 kDa, respectively). * $p < 0.01$ versus C; ** $p < 0.05$ versus E. ANOVA followed by Tukey's test. The protein expression index is represented as a percentage relative to the untreated control (control data were set to 100%). Data are from a representative experiment from three independent experiments with similar results expressed as mean \pm S.E.M.

In intact male rats, the PKC δ immunolabelling was detected mainly in the cytosolic matrix, associated with RER and some isolated mitochondria. At the nuclear level, PKC δ was found in the euchromatin and internal nuclear membrane (Fig. 8A). Estrogen stimulation for 30 days provoked an increase in the PKC δ immunoreactivity in both the nuclear and cytoplasmic compartments of the hypertrophic lactotroph cells. In particular, Bc treatment enhanced the immunolabelling of PKC δ in the nuclear compartment of pituitary cells at different involutive and dying stages (Figs. 8B and C).

Discussion

Bromocriptine, a dopaminergic agonist, has been used as a therapeutic agent in patients with hyperprolactinemia, prolactinoma, acromegaly and ACTH secreting adenoma, due to its potent hormone lowering effect (Asa and Ezzat, 2002a,b). Moreover, it has been well documented that prolonged administration of Bc

results in remarkable tumor shrinkage in patients (Kovacs and Horvath, 2005). Although the induction of apoptosis is the classical event reported in tumor regression, the cytotoxic effect of Bc triggers other non apoptotic mechanisms, whose real relevance is not well understood (Vidal et al., 2001; Kontogeorgos et al., 2006). In order to characterize the types of cell death, not only ultrastructurally, but also by trying to find molecular evidence that can clearly define them, we provoked a tumoral process in male pituitaries rats by prolonged estrogen administration (Asa and Ezzat, 2002a,b; Mukdsi et al., 2004) before inducing its reversion through Bc treatment.

Electron microscopy is the most appropriate method to study the morphological features of cells, as it reveals different types of cell death that may be underestimated by other techniques. The ultrastructural observations of the pituitary cell population in the E group showed hypertrophic lactotroph cells having a major secretory activity, which correlated with an increase in the PRL serum levels. Bromocriptine administration led to a reversion of the proliferative state, returning to control values, and inducing remarkable differences in the nuclear and cytoplasmic ultrastructure of pituitary cells. In

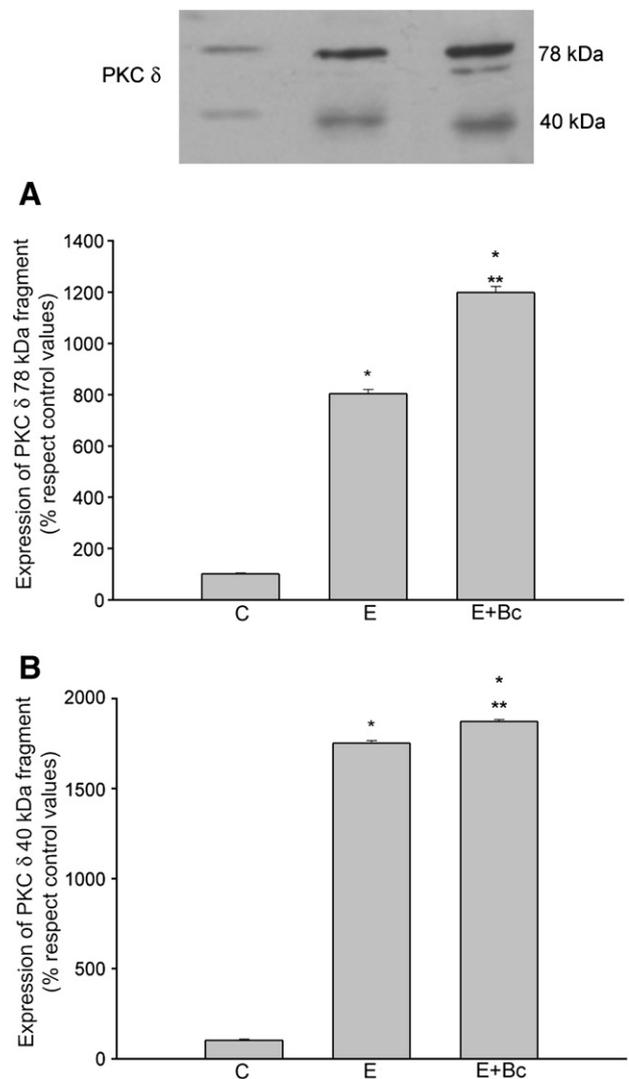


Fig. 6. Bromocriptine increased the expression of the holoenzyme of PKC δ and its catalytic fragment in nuclear extracts of pituitary gland. (A) Corresponds to levels of 78 kDa holoenzyme. The catalytic fragment of 40 kDa is shown in (B) Bromocriptine induced the highest levels in both PKC δ forms. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of three independent experiments * $p < 0.001$ versus C, ** $p < 0.01$ versus E. ANOVA followed by Tukey's test.

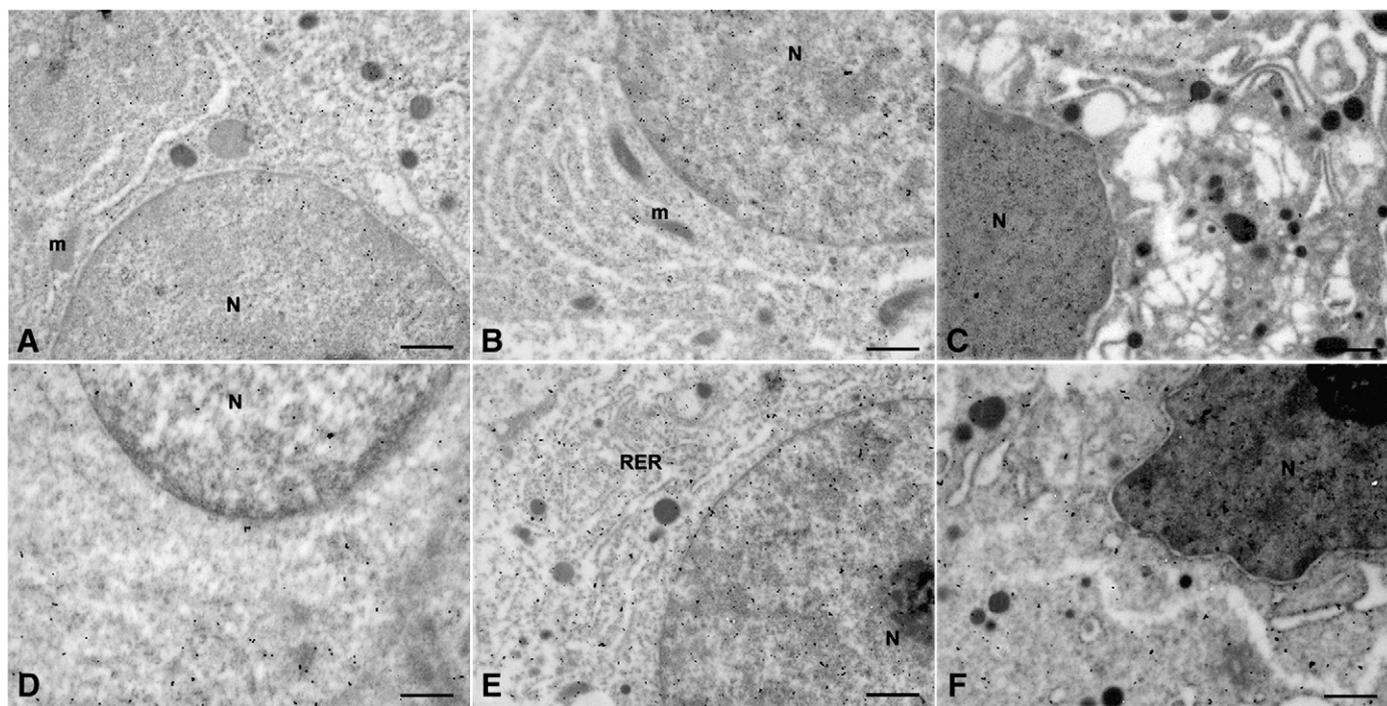


Fig. 7. Bromocriptine induced nuclear translocation of activated MAPKs. Immunogold labelling for P-p38 (A–C) and P-ERK1/2 (D–F) on representative transmission electron micrographs of thin sections of control and Bc treated lactotroph cells, where different inhibitory stages can be seen: hypertrophic cells with early morphological alterations (B and E) and paraptotic cell (C and F). Lactotrophs from control groups (A and D) show sparse immunogold labelling in cytoplasmic matrix and scarcely distributed in the nucleus (N). Immunoreactivity for P-p38 (B and C) and P-ERK1/2 (E and F) increased after Bc administration, mainly at the nuclear level but was also observed in the mitochondria (m) and rough endoplasmic reticulum (RER). Bar = 1 μ m.

particular, we observed a striking increase in the number of the so called “dark cells”, which represented the main pattern of cell death after Bc exposition. A nuclear and cytoplasmic pyknosis was presented, with severe alterations of cell organelles, characteristic of a non lysosomal vacuolization. There was also a conspicuous swelling of the mitochondria and late disruption. No chromatin clusters forming speckles, nuclear fragmentation or plasma membrane rupture were noted until advanced stages. These observations are in agreement with Aoki et al. (2001), who described non apoptotic cell death as an important factor in the tissue remodelling of functional pituitary glands. Moreover, Vidal et al. (2001) described that long term treatment on human prolactinomas with Bc led to an accumulation of “dark cells”, which was thought to be a senescence process. However, these “dark cells” had interesting ultrastructural similarities to the features of the non apoptotic cell death described by Sperandio et al. (2000, 2004) in 293T cells, which was dubbed paraptosis, and those paraptotic cells shown by Sheldon et al. (2001) in neonatal mouse hippocampus.

Another aspect to take into consideration with respect to this type of cell death is the state of the endoplasmic reticulum. It was demonstrated that under stress conditions, the ER is able to promote the induction of mitochondrial membrane permeabilization, culminating in mitochondrial crest disruption and activating different death pathways (Asare et al., 2008; Rong and Distelhorst, 2008). As previously mentioned, Bc induced severe cytoplasmic changes, characterized by vacuolization, and swelling of the ER and mitochondria, with these features being documented as central characteristics of paraptosis (Hoa et al., 2007).

To quantify the occurrence of the different types of cell death induced by the Bc treatment, we carried out a morphometric study at electron microscopy level. Paraptotic cells were found to represent approximately 25% of the total cells counted. Remarkably, this process of cell death was ubiquitous and evident in all the experimental models studied, rising to 2% in intact males, and 6% in estrogenized animals that did not receive the Bc treatment. The increase in cell

death found in the E group with respect to control could be attributed to the rise in cell rechange induced by long term estrogen treatment.

The biochemical mechanisms involved in the alternative forms of cell death have been previously studied (Bröker et al., 2005; Golstein and Kroemer, 2006). To characterize the prevalent paraptotic cell death, we examined the DNA integrity. It was observed that Bc was neither able to induce the typical intranucleosomal fragmentation of DNA described for apoptosis, nor produce an unspecific smear compatible with necrosis. We also analyzed the independence of caspase 3 participation in the “dark cell” process (Sperandio et al., 2000) by studying caspase 3 activation. However, the active fragment of caspase 3 was not detected in any of the experimental groups. These results provide additional biochemical evidence to suggest that this cell death was paraptosis. Nevertheless, paraptosis may sometimes have been erroneously assumed to be a necrosis due to its morphological features of vacuolization and mitochondrial swelling, and also because of the damage found along the plasma membrane (Sperandio et al., 2000; Bröker et al., 2005). In our experimental models, the nuclei and the cytoplasm of the dying cells became more electron dense than was expected from its necrotic characteristics, with the plasma membrane remaining well preserved until the advanced stages. In order to demonstrate in a biochemical way that the “dark cells” were not necrotic cells, we evaluated the differential cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Casiano et al., 1998). We neither detected the typical 50–62 kDa fragments produced by necrosis, nor a disruption in the plasma membrane at ultrastructural level.

There is no consensus regarding the frequency of the occurrence of apoptosis in the involution of pituitary adenomas (Kontogeorgos et al., 2006). Vidal et al. (2001) stressed the low rate of apoptosis in human pituitary adenomas after Bc administration. Indeed, in our experimental models, the rate of cells dying by apoptosis was extremely low. Although this subsequently increased with Bc treatment, it still did not exceed 1% when the pituitaries were examined by electron microscopy, a finding that was confirmed by the TUNEL technique. In

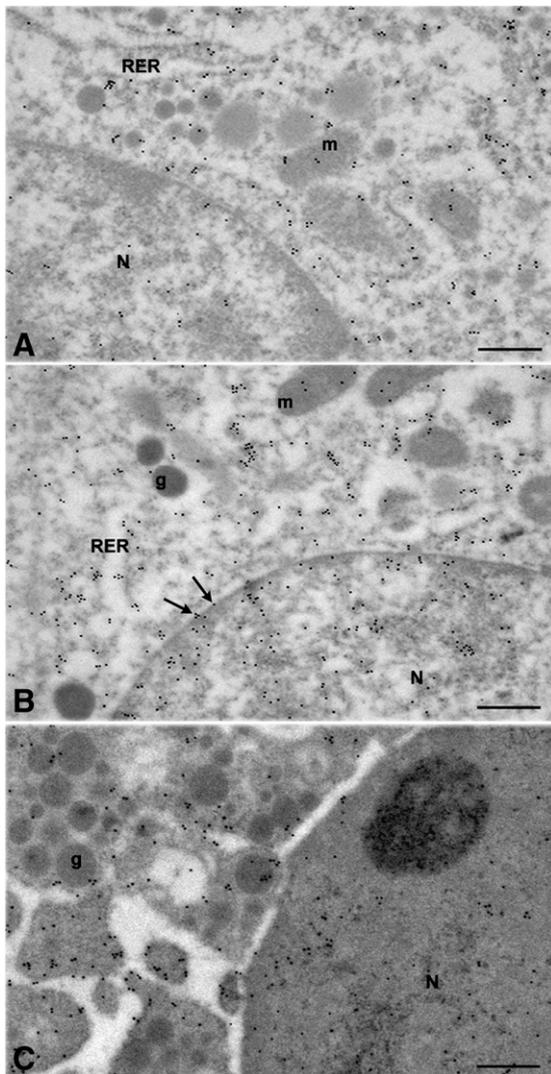


Fig. 8. Bromocriptine induced translocation to nucleus of PKC δ . Transmission electron micrographs of pituitary cells immunogold labelled for PKC δ . In control animals (A) PKC δ was located in the cytosolic matrix, some isolated mitochondria (m) and also in cells that presented early signs of degeneration (B) as well as in parapoptotic cells (C). Bc treatment enhanced PKC δ labelling in the nuclear compartment associated with euchromatin and nuclear envelope (arrows). There was also more immunoreactivity in rough the endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (m) than that observed in the control. There was no immunolabel in secretion granules (g). Bar = 1 μ m.

conclusion, these results suggest that under the present experimental conditions, Bc caused mainly parapoptosis, with apoptotic cell death rarely being found.

A striking ultrastructural finding was the observation of FS cells rounding up parapoptotic cells. This evidence suggests that FS cells, which are responsible for the subordinated processing of cell residues (Orgnero de Gaisán et al., 1993; Aoki et al., 1996), could be involved in the engulfment of death cells by phagocytosis. A possible clearance mechanism could be that the FS cells internalize dead cell material by the formation of spacious macropinosomes (Krysko et al., 2008). On the other hand, it is well known that the cells that die by apoptosis in the anterior pituitary are quickly phagocytosed by FS cells and digested by their lysosomal enzymes (Claudius et al., 2006).

Further investigations into the molecular mechanisms of non apoptotic cell death should yield fresh insights into their roles in physiological cell death and their potential for manipulation by new anti tumoral drugs. MAPKs play an essential role in signal transduction by modulating the gene transcription in the nucleus in response to changes in the cellular environment (Turjanski et al., 2007). The

molecular events of the MAPK functions can be separated into: activation of MAPK by their upstream kinases, changes in their subcellular localization, and phosphorylation of downstream targets. In the present study, the highest activation of ERK1/2 and p38 was obtained after Bc treatment and was directly related to the increase in the phosphorylation of the ERK1/2 and p38 levels in nuclear fractions. The increase in MAPK phosphorylation and its nuclear localization implies that ERK1/2 and p38 are involved in the lactotroph cell death induced by Bc. Related to this, it has also been reported that MAPKs modulate apoptotic as well as parapoptotic cell signalling (Sperandio et al., 2004; Asare et al., 2008).

There are kinases that have been shown to regulate the MAPK pathways through phosphorylation or dephosphorylation, and these signals may converge with MAPK at downstream components such as transcription factors and kinases. Some examples of these are PI3K-PDK1-Akt, NIK-IKK-NF κ B (Hayden and Ghosh, 2004), and PKC (Basu, 2003). PKC δ plays an important role in the programmed cell death of pituitary adenoma, with there being strong evidence that this kinase may contribute to the apoptotic process in the GH3B6 tumoral somatolactotrophic cells (Leverrier et al., 2002). In our experimental models, Bc induced a significant increase in the expression of the 78 kDa PKC δ holoenzyme and its 40 kDa catalytic fragment in the nuclear fraction. This finding could be explained by the fact that the translocation of PKCs to the nuclear envelope is believed to be part of their activation mechanism (Dal Pra et al., 1999). It is well known that the activation of PKC δ and translocation of the holoenzyme and its catalytic fragment to the nuclei are related to cell death. In the present study, the high occurrence of parapoptosis triggered by Bc, suggests that the activation of PKC δ , ERK1/2 and p38 signalling pathways are implicated in this process. However, further work will be required to characterize the upstream activators and the downstream targets of MAPK involved in the parapoptotic cell death induced by Bc.

Summing up, the present investigation has enabled us to characterize ultrastructurally and biochemically the prevalence of parapoptosis as a final cytotoxic event induced by Bc in estrogen induced pituitary tumors, with the participation of PKC δ , ERK1/2 and p38 pathways. Therefore, this cell death mechanism triggered by Bc, may be the main cause of pituitary tumor involution.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgments

We are especially grateful to the technical assistance of Mrs. Mercedes Guevara, Mrs. María Elena Pereyra and Mrs. Lucía Artino for their excellent technical assistance, and native speaker Dr. Paul Hobson for revising the English of the manuscript.

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondos para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) and the Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT).

References

- Aoki, A., De Gaisán, E.O., Pasolli, H.A., Torres, A.I., 1996. Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104, 256–262.
- Aoki, M.P., Maldonado, C.A., Aoki, A., 1998. Apoptotic and non-apoptotic cell death in hormone-dependent glands. *Cell Tissue Res.* 291, 571–574.
- Aoki, M.P., Aoki, A., Maldonado, C.A., 2001. Sexual dimorphism of apoptosis in lactotrophs induced by bromocriptine. *Histochem. Cell Biol.* 116, 215–222.
- Asa, S.L., Ezzat, S., 2002a. Medical management of pituitary adenomas: structural and ultrastructural changes. *Pituitary* 5, 133–139.
- Asa, S.L., Ezzat, S., 2002b. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat. Rev., Cancer* 2, 836–849.
- Asare, N., Landvik, N.E., Lagadic-Gossman, D., Rissel, M., Tekpli, X., Ask, K., Låg, M., Holme, J.A., 2008. 1-Nitropyrene (1-NP) induces apoptosis and apparently a non-apoptotic programmed cell death (parapoptosis) in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 175–186.

- Asher, E., Payne, C.M., Bernstein, C., 1995. Evaluation of cell death in EBV-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy. II. Induction of non-classic apoptosis ("para-apoptosis") by tritiated thymidine. *Leuk. Lymphoma* 19, 107–119.
- Basu, A., 2003. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 7, 341–350.
- Bonaterrea, M., De Paul, A., Aoki, A., Torres, A., 1998. Residual effects of thyroid hormone on secretory activity of somatotroph population. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106, 399–494.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155–3162.
- Bursch, W., 2004. Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Res.* 5, 101–110.
- Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G.J., Rosen, A., 1995. DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J. Exp. Med.* 182, 1625–1634.
- Casiano, C.A., Ochs, R.L., Tan, E.M., 1998. Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes. *Cell Death Differ.* 5, 183–190.
- Clarke, P.G., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181, 195–213.
- Claudius, L., Yoshimi, Y., Yoichiro, H., Gabriel, M., Koichi, M., 2006. Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Acta Histochem.* 108, 69–80.
- Dal Pra, I., Whitfield, J.F., Chiarini, A., Armato, U., 1999. Changes in nuclear protein kinase C-delta holoenzyme, its catalytic fragments, and its activity in polyomavirus-transformed pyF111 rat fibroblasts while proliferating and following exposure to apoptogenic topoisomerase-II inhibitors. *Exp. Cell Res.* 249, 147–160.
- Drewett, N., Jacobi, J.M., Willgoss, D.A., Lloyd, H.M., 1993. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 57, 89–95.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2006. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.
- Gruszka, A., Kunert-Radek, J., Pawlikowski, M., 2004. The effect of octreotide and bromocriptine on expression of a pro-apoptotic Bax protein in rat prolactinoma. *Folia Histochem. Cytobiol.* 42, 35–39.
- Gutcher, I., Webb, P.R., Anderson, N.G., 2003. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1061–1070.
- Haggi, E.S., Torres, A.I., Maldonado, C.A., Aoki, A., 1986. Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *J. Endocrinol.* 111, 367–373.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195–2224.
- Hoa, N.T., Zhang, J.G., Delgado, C., Myers, M.P., Callahan, L.L., Vandeusen, G., Schiltz, P.M., Wepsic, H.T., Jadus, M.R., 2007. Human monocytes kill M-CSF-expressing glioma cells by BK channel activation. *Lab. Invest.* 87, 115–129.
- 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. *Biol. Reprod.* 62, 1486–1494.
- Kontogeorgos, G., Horvath, E., Kovacs, K., Coire, C., Lloyd, R.V., Scheithauer, B.W., Smyth, H.S., 2006. Morphologic changes of prolactin-producing pituitary adenomas after short treatment with dopamine agonists. *Acta Neuropathol.* 111, 46–52.
- Kovacs, K., Horvath, E., 2005. Effects of medical therapy on pituitary tumors. *Ultrastruct. Pathol.* 29, 163–167.
- Krishna, M., Narang, H., 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3525–3544.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piccentini, M., Zhivotovskiy, B., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell Death, 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., Parthoens, E., D'Herde, K., Vandenabeele, P., 2008. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol.* 442, 307–341.
- Leverrier, S., Vallentin, A., Joubert, D., 2002. Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem. J.* 368, 905–913.
- Liu, Y., Shepherd, E.G., Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nat. Rev., Immunol.* 7, 202–212.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2405–2419.
- Mukdsi, J.H., De Paul, A.L., Muñoz, S., Aoki, A., Torres, A.I., 2004. Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen. *Histochem. Cell Biol.* 121, 453–462.
- Mukdsi, J.H., De Paul, A.L., Petiti, J.P., Gutiérrez, S., Aoki, A., Torres, A.I., 2006. Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta Neuropathol.* 112, 491–501.
- Okada, H., Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev., Cancer* 4, 592–603.
- Orgero de Gaisán, E.M., Maldonado, C.A., Aoki, A., 1993. Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study. *Histochem. J.* 25, 150–165.
- Pagnussat, A.S., Faccioni-Heuser, M.C., Netto, C.A., Achaval, M., 2007. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J. Anat.* 211, 589–599.
- Pasolli, H.A., Torres, A.I., Aoki, A., 1992. Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats. *J. Endocrinol.* 134, 241–246.
- Petiti, J.P., De Paul, A.L., Gutiérrez, S., Palmeri, C.M., Mukdsi, J.H., Torres, A.I., 2008. Activation of PKC epsilon induces lactotroph proliferation through ERK1/2 in response to phorbol ester. *Mol. Cell. Endocrinol.* 289, 77–84.
- Rong, Y., Distelhorst, C.W., 2008. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 73–91.
- Saika, S., Okada, Y., Miyamoto, T., Yamanaka, O., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Liu, C.Y., Weng, D., Kao, W.W., 2004. Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 100–109.
- Sheldon, R.A., Hall, J.J., Noble, L.J., Ferriero, D.M., 2001. Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci. Lett.* 304, 165–168.
- Sperandio, S., De Belle, I., Bredesen, D.E., 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14376–14381.
- Sperandio, S., Poksay, K., De Belle, I., Lafuente, M.J., Liu, B., Nasir, J., Bredesen, D.E., 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* 11, 1066–1075.
- Stefaneanu, L., Kovacs, K., Scheithauer, B.W., 2000. Effect of Dopamine Agonists on Lactotroph Adenomas of the Human Pituitary. *Endocr. Pathol.* 11, 341–352.
- Sugawara, A., Yen, P.M., Darling, D.S., Chin, W.W., 1993. Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X-receptors. *Endocrinology* 133, 965–971.
- Tanaka, Y., Gavrielides, M.V., Mitsuchi, Y., Fujii, T., Kazanietz, M.G., 2003. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 33753–33762.
- Torres, A.I., Aoki, A., 1985. Subcellular compartmentation of prolactin in rat lactotrophs. *J. Endocrinol.* 105, 219–225.
- Torres, A.I., Pasolli, H.A., Maldonado, C.A., Aoki, A., 1995. Changes in thyrotroph and somatotroph cell populations induced by stimulation and inhibition of their secretory activity. *Histochem. J.* 27, 370–379.
- Treisman, R., 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205–215.
- Turjanski, A.G., Vaqué, J.P., Gutkind, J.S., 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240–3253.
- Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K., Scheithauer, B.W., Lloyd, R.V., Kontogeorgos, G., 2001. Ultrastructural features of apoptosis in human pituitary adenomas. *Ultrastruct. Pathol.* 25, 85–92.
- Wood, D.F., Johnston, J.M., Johnston, D.G., 1991. Dopamine, the dopamine D2 receptor and pituitary tumours. *Clin. Endocrinol.* 35, 455–466.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cyt.* 68, 251–306.