



GLORIA M. CÓNSOLE-AVEGLIANO

Glándula hipofisaria: morfología normal y patológica

 Eduip

naturales

**Glándula hipofisaria:
morfología normal y patológica**

GLORIA M. CÓNSOLE-AVEGLIANO



**Pituitary gland:
normal and pathologic morphology**

GLORIA M. CÓNSOLE-AVEGLIANO



Cónsole Avegliano, Gloria M.

Glándula hipofisaria : morfología normal y patológica / Gloria M. Cónsole Avegliano. - 1a ed. - La Plata : EDULP, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-4127-32-7

1. Medicina. I. Título.

CDD 616.4

Glándula hipofisaria: morfología normal y patológica

GLORIA M. CÓNSOLE-AVEGLIANO



EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (EDULP)

47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina

+54 221 427 3992 / 427 4898

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales de las Universidades Nacionales (REUN)

Primera edición, 2017

ISBN 978-987-4127-32-7

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11723

© 2017 - Edulp

Impreso en Argentina

A mi esposo *Hugo Avegliano*, a mis hijos *Gustavo y Guillermo*
y a mis queridos nietos *Bianca y Lorenzo...*

To my husband *Hugo Avegliano*, to my sons *Gustavo and Guillermo*
and to my dear grandchildren *Bianca and Lorenzo.*

Índice

Prefacio del Prof. Dr. Eduardo Charreau	8
Prefacio del autor	10
Agradecimientos	13
CAPÍTULO 1	
Embriología de la glándula hipofisaria.....	15
CAPÍTULO 2	
Morfología de la glándula pituitaria	39
CAPÍTULO 3	
Interacciones paracrinas adenohipofisarias.....	70
CAPÍTULO 4	
Ultraestructura de la glándula hipofisaria	91
CAPÍTULO 5	
Fisiología del eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco	113
CAPÍTULO 6	
Proceso de envejecimiento en el eje hipotálamo-hipofisario. Envejecimiento de la población lactotropa.....	134
CAPÍTULO 7	
Envejecimiento de la población somatotropa	158
CAPÍTULO 8	
Envejecimiento de la población gonadotropa	173
CAPÍTULO 9	
Envejecimiento de la población tirotrópica.....	188

Index

Preface by Prof. Eduardo Charreau, MD.	8
Preface by autor	1
Acknowledgements	13
CHAPTER 1	
Embryology of the pituitary gland.....	15
CHAPTER 2	
Morphology of the pituitary gland	39
CHAPTER 3	
Paracrine interactions in adenohipophysis.....	70
CHAPTER 4	
Ultrastructure of the pituitary gland	91
CHAPTER 5	
Physiology of the hypothalamic-pituitary-target organ axis.....	113
CHAPTER 6	
Process of ageing in the hypothalamo-pituitary axis. The ageing of lactotrope population	134
CHAPTER 7	
The ageing of somatotrope population.....	158
CHAPTER 8	
The ageing of gonadotrope population	173
CHAPTER 9	
The ageing of thyrotrope population	188

CAPÍTULO 10	
Envejecimiento de la población corticotropa.....	199
CAPÍTULO 11	
Envejecimiento de la población folículo-estelar	212
CAPÍTULO 12	
Envejecimiento hipofisario: transferencia del gen portador del factor insulino-símil tipo I.	228
CAPÍTULO 13	
Antiandrógenos no esteroides: efectos sobre la población gonadotropa de ratas machos prepuberales	271
CAPÍTULO 14	
Sialilación de la hormona folículo-estimulante: cambios en la población gonadotropa de ratas machos castrados.....	291
CAPÍTULO 15	
Malnutrición: efectos sobre las poblaciones adenohipofisarias de monos (<i>Saimiri sciureus boliviensis</i>)	305
CAPÍTULO 16	
Retardo intrauterino del crecimiento: alteraciones de la población somatotropa en ratas.....	323
CAPÍTULO 17	
Fotoperíodos: cambios en las poblaciones lactotropa y gonadotropa.....	337
CAPÍTULO 18	
Denervación hipotalámica: alteraciones en las poblaciones adenohipofisarias y en el tejido adiposo de ratas hembras.....	374
CAPÍTULO 19	
Timectomía, inmunoneutralización y transferencia génica de la timulina: efectos sobre las poblaciones adenohipofisarias de ratones	391
CAPÍTULO 20	
Prolactinomas experimentales: terapia génica con factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) en ratas.....	433

CHAPTER 10	
The ageing of corticotrope population	199
CHAPTER 11	
The ageing of folliculo-stellate population.....	212
CHAPTER 12	
Pituitary aging: transference of insulin-like I gene.....	228
CHAPTER 13	
Non-steroid antiandrogens: effects on the gonadotrope population of prepuberal male rats.....	271
CHAPTER 14	
Sialylation of the folliculo-stimulating hormone: changes in the gonadotrope population of castrated male rats.....	291
CHAPTER 15	
Undernourishment: effects on the adenohipophyseal populations of monkeys (<i>saimiri sciureus boliviensis</i>)	305
CHAPTER 16	
Intrauterine growth retardation (IUGR): alterations of the somatotrope population in rats	323
CHAPTER 17	
Photoperiods: morphological changes in the lactotrope and gonadotrope populations.....	337
CHAPTER 18	
Hypothalamic denervation: alterations in the adenohipophyseal populations and in the adipose tissue in female rats	374
CHAPTER 19	
Thymectomy, immunoneutralization and gene transference of thymulin: effects on adenohipophyseal populations in mice	391
CHAPTER 20	
Experimental prolactinomas: gene therapy with insulin-like I.....	433

CAPÍTULO 21	
Isoformas de PRL	450
CAPÍTULO 22	
Adenomas hipofisarios: caracterización morfológico-funcional y estrategias terapéuticas	487
CAPÍTULO 23	
Adenomas hipofisarios: aportes de la terapia génica experimental.....	540

CHAPTER 21	
Prolactin isoforms	450
CHAPTER 22	
Pituitary adenomas: morphological-functional characterization and therapeutical strategies	487
CHAPTER 23	
Pituitary adenomas: contributions of the experimental gene therapy	540

PREFACIO DEL PROF. DR. EDUARDO CHARREAU

Los libros pueden ayudar a clarificar ideas, tornar explícitos cursos de pensamiento implícito y enseñar técnicas particulares. Pero el adecuado enfoque de un problema de investigación y la formulación de estrategias para resolverlo, es algo que se aprende en el trabajo diario en el laboratorio, cuando se refinan y adaptan a las situaciones experimentales particulares, modos de pensar que no son ajenos al común de los científicos. Esta situación se constata en los capítulos del libro **“Glándula hipofisaria: morfología normal y patológica”** cuyas páginas tienen el acento inconfundible de la experiencia. Sus capítulos iniciales proveen un comprensivo compendio sobre embriología, morfología, interacciones paracrinas y ultraestructura hipofisaria, sólo posible de realizar por alguien que ha dedicado décadas de su actividad científica al estudio de la fisiopatología hipofisaria. No ha sido menor, el trabajo compilador realizado, donde investigadores líderes han sido especialmente invitados para brindar información actualizada sobre muy especiales tópicos de los multidisciplinarios campos considerados, marcando y haciendo notar los últimos desarrollos publicados. Sus capítulos, están colmados de avances conceptuales.

Varios capítulos de esta obra se dedican al envejecimiento de la constelación de células hipofisarias y en su conjunto ofrecen una aproximación multifacética para entender y modificar el inevitable curso del envejecimiento.

PREFACE BY PROF. EDUARDO CHARREAU, MD.

Books can help clarify ideas, make explicit courses on implicit thought and teach specific techniques. But the appropriate approach to a research problem and the formulation of strategies to solve it is something that is learnt in every day laboratory work, when these techniques are refined and adapted to specific experimental situations, ways of thinking that are not indifferent to most researchers. This situation is confirmed in the chapters of the book **“Pituitary gland: normal and pathological morphology”** whose pages possess the unmistakable accent of experience. The first chapters provide a comprehensive summary on embryology, morphology, paracrine interactions and pituitary ultrastructure, things that can only be performed by someone who has devoted decades of scientific activity to the study of pituitary physiopathology. Equally important has been the compiling work done, where leading researchers have been especially invited to provide updated information on particularly singular topics related to the multidisciplinary fields considered, determining and making noticeable the latest developments published. In these chapters there are plenty conceptual advances. Several chapters in this work are devoted to ageing of the pituitary cell constellation and together they offer a many-sided approach to understand and modify the inevitable course of ageing.

The role of nutrition on pituitary cell populations is also analyzed from different perspectives and experimental approaches, as well as the

Se analiza también el papel de la nutrición sobre las poblaciones celulares adenohipofisarias desde diferentes perspectivas y acercamientos experimentales y se contemplan los cambios observados en la adenohipófisis por antiandrógenos no esteroideos, el retardo intrauterino, la denervación hipotalámica, los fotoperíodos, la sialilación hormonal, la timectomía, la inmunoneutralización y la transferencia génica de timulina. Se completa la información con detalles sobre las isoformas de la prolactina, prolactinomas, otros adenomas hipofisarios y los aportes de la terapia génica.

En su conjunto, el libro se transforma en una herramienta importante de estudio para quienes deseen familiarizarse con la fisiopatología adenohipofisaria. Si se quiere extraer un denominador común de los esfuerzos realizados en la redacción de cada capítulo, es encontrar en ellos, la experiencia y sus imprescindibles destellos de imaginación creativa.

DR. EDUARDO H. CHARREAU
Investigador Superior Emérito del CONICET
Presidente Fundación Instituto de Biología y Medicina Experimental

changes in the adenopituitary by non steroid antiandrogens, intrauterine retard, pituitary denervation, photoperiods, hormonal sialylation, thymectomy, thymulin and gene immunoneutralization and transference. Information is completed with details on prolactin isoforms, pituitary prolactinomas and adenomas and contributions of gene therapy.

As a whole, the book becomes an important tool of study for those who wish to become familiar with adenopituitary physiopathology. If a common denominator of the efforts done to write each chapter is to be considered, it should be the finding of experience and its essential glimmering creative imagination.

EDUARDO H. CHARREAU M.D.
Emeritus Senior Investigator for CONICET
Chairman of Foundation Institute of Biology and Experimental Medicine

PREFACIO DEL AUTOR

La presente obra pretende integrar y actualizar aspectos normales y patológicos de la glándula hipofisaria, centrando el eje en el estudio embriológico, morfológico y fisiológico normal y en diversas condiciones experimentales neuroendocrinas, tales como: envejecimiento, fotoperíodos, glicosilación hormonal, isoformas de prolactina, malnutrición, retardo intrauterino del crecimiento, inmunoneutralización, denervación hipotalámica, timentomía, y terapia génica con timulina, prolactinomas experimentales tratados con IGF-I. El estudio morfológico-funcional fue complementado con determinaciones hormonales, bioensayos y terapia génica pituitaria.

El material presentado constituye una revisión actualizada de las investigaciones morfológicas neuroendocrinas desarrolladas por nuestro equipo de trabajo desde 1990 en el Laboratorio de Investigaciones Neuroendocrinas de la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Na-

PREFACE BY AUTOR

This work aims at integrating and updating normal and pathological aspects of the pituitary gland, with its axis in the normal embryological, morphological and physiological study of the pituitary gland and in diverse neuroendocrine experimental conditions such as aging, photoperiods, hormonal glycosylation, prolactin isoforms, undernourishment, growth intrauterine delay, hypothalamic denervation, thymectomy, immunoneutralization and thymulin gene therapy, prolactinomas treated with gene bearing the insulin like growth factor I (IGF-I) and a review of pituitary adenomas. The morphological-functional study was complemented with hormone determinations, bioassays and pituitary gene therapy.

An integrated presentation is done of the neuroendocrine morphological research developed by our work team since 1990 (Laboratory of Neuroendocrine Research of Department B of Cytology, Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, National University of

cional de La Plata (U.N.L.P.), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Programa de Incentivos de la U.N.L.P. y los valiosos aportes colaborativos de los respectivos equipos de investigación dirigidos por reconocidos especialistas en el campo de la Neuroendocrinología:

- 1. Envejecimiento del sistema hipotálamo-hipofisario:** *Dr. Goya R.G. y col.* (INIBIOLP: UNLP, CONICET), *Bohn M.C. y col.* (Northwestern University and Oklahoma University, U.S.A.) *Sonntag W.E. y col.* (Oklahoma University, Center of Neurosciences, U.S.A.) y *Dra. Jurado S.B.* (Departamento de Microscopía Electrónica, U.N.L.P.).
- 2. Envejecimiento hipofisario con transferencia del gen portador del factor insulino-símil tipo I (IGF-I):** *Dr. Goya R.G., Dra. Hereñú C.B., Bioq. Schwerdt J.I.* (INIBIOLP, U.N.L.P., CONICET) y *García Segura L.M. y col.* (Instituto Ramón y Cajal, Madrid).
- 3. Efectos de los antiandrógenos no esteroideos sobre la población gonadotropa en ratas:** *Dr. Calandra R.S. y col.* (IMBYCE, CONICET, CABA).
- 4. Fotoperíodos: cambios en las poblaciones lactotropa y gonadotropa de hámsteres machos:** *Dr. Calandra R.S. y Dra. Rulli S.B.* (IMBYCE, CONICET, CABA).
- 5. Glicosilación de la hormona folículo-estimulante: cambios en la población gonadotropa de ratas:** *Dr. Calandra R.S. y col., Dra. Campo S. y col.* (IMBYCE y CEDIE, CONICET, CABA).
- 6. Malnutrición: efectos sobre las poblaciones adenohipofisarias de monos (*Saimiri sciureus boliviensis*):** *Dr. Pucciarelli H.M., Dra. Oyhenart E.E. y col.* (CIGEBA, U.N.L.P., CONICET, CIC).
- 7. Retardo intrauterino del crecimiento: alteraciones de la población somatotropa en ratas:** *Dra. Oyhenart E.E. y col.; Dr. Guimarey L.M. y col.* (CIGEBA, U.N.L.P., CONICET, CIC, Hospital de Niños de La Plata).
- 8. Estudio de las poblaciones adenohipofisarias en un modelo de denervación hipotalámica de ratas:** *Dr. Spinedi E. y col.* (IMBICE, CONICET, CIC).

La Plata, Unplanned Committee of Scientific Research of the Province of Buenos Aires) and the valuable collaborative contribution of the respective research teams directed by renowned specialists in the field of Neuroendocrinology:

- 1. Aging of the hypothalamo-hypophyseal system:** *Dr. Goya R.G., Bohn M.C., Sonntag W.E., et al.* (INIBIOLP: UNLP-CONICET; Northwestern University and Oklahoma University, USA) and *Dr. Jurado S.B.* (Department de Electron Microscopy-Faculty of Veterinary Sciences-UNLP).
- 2. Pituitary aging with transference of gene bearing insulin like growth factor I (IGF-I):** *Dr. Goya R.G., Dr. Hereñú C.B., García Segura L.M., Biochemist Schwerdt J.I. et al.* (INIBIOLP: UNLP-CONICET; Institute Ramón and Cajal, Madrid).
- 3. Effects of non steroid antiandrogens on the rat gonadotrope population:** *Dr. Calandra R.S. et al.* (IMBYCE: CONICET).
- 4. Photoperiods: changes in lactotrope and gonadotrope populations of male hamsters:** *Dr. Calandra R.S., Dr. Rulli S.B. et al.* (IMBYCE: CONICET).
- 5. Glycosylation of the folliculo-stimulating hormone: changes in the rat gonadotrope population:** *Dr. Calandra R.S., Dr. Campo S. et al.* (IMBYCE-CEDIE: CONICET).
- 6. Undernourishment: effect on the monkey adenohipophyseal populations (*Saimiri sciureus boliviensis*):** *Dr. Pucciarelli H.M., Dr. Oyhenart E.E. et al.* (CIGEBA, Faculty of Veterinary Sciences: UNLP-CONICET-CIC).
- 7. Growth intrauterine delay: alterations of the rat somatotrope population:** *Dr. Oyhenart E.E., Dr. Guimarey L.M. et al.* (CIGEBA, Faculty of Veterinary Sciences: UNLP-CONICET-CIC-Children's Hospital of La Plata).
- 8. Study of the adenohipophyseal populations in a model o rat hypothalamic denervation:** *Dr. Spinedi E. et al.* (IMBICE: CONICET).
- 9. Effects of thymectomy, immunoneutralization and gene transference of thymulin on the adenohipophyseal populations in ro-**

- 9. Efectos de la timectomía, inmunoneutralización y transferencia génica de la timulina sobre las poblaciones adenohipofisarias en roedores:** *Dr. Goya R.G., Dra. Reggiani P.C. y col.* (INIBIOLP, UNLP, CONICET); *Dardenne M.* (Unidad de CNRS, del Hospital Necker de París).
- 10. Isoformas de prolactina:** *Dra. Carino M., Calandra R.S. y col.* (IMBYCE, CONICET, CABA y U.N.L.P., CIC).
- 11. Prolactinomas experimentales: terapia génica con factor IGF-I en ratas:** *Dr. Goya R.G., Dra. Hereñú C.B. y col.* (INIBIOLP, U.N.L.P., CONICET); *Castro M.G. y col.* (Gene Therapeutics Research Institute, Cedars Sinai Medical Center, Department of Molecular and Medical Pharmacology, School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA, U.S.A.).

dents: *Dr. Goya R.G., Dardenne M., and Dr. Reggiani P.C. et al.* (Unit of CNRS, Necker Hospital of Paris, INIBIOLP: UNLP-CONICET).

- 10. Prolactin isoforms:** *Dr. Carino M., Calandra R.S. et al.* (IMBYCE: CONICET and UNLP-CIC).

- 11. Experimental prolactinomas: gene therapy with IGF-I factor in rats:** *Dr. Goya R.G., Castro M.G., Dr. Hereñú C.B. et al.* (INIBIOLP, Faculty of Medical Sciences: UNLP-CONICET; Gene Therapeutics Research Institute, Cedars Sinai Medical Center, Department of Molecular and Medical Pharmacology, School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA, USA).

Agradecimientos

- A la memoria del **Premio Nobel** (1947) *Prof. Dr. Bernardo A. Houssay*, pionero en el estudio de la glándula hipófisis, quien en sus visitas al Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata sembró una pequeña semilla en los jóvenes que tuvimos la dicha de conocerlo (1967).
- A quienes despertaron mi vocación por la investigación científica: *Prof. Herberto Prieto Díaz y Prof. Dr. Ricardo R. Rodríguez*.
- A quienes me alentaron para retomar las tareas de investigación y docencia en momentos muy difíciles: *Prof. Dr. Eduardo Charreau, Prof. Dr. Horacio Cingolani, Prof. Dr. Juan Basualdo y Prof. Dr. Alberto D'Ottavio*.
- A mi querido Maestro en el estudio de la hipófisis: *Prof. Dr. César Gómez Dumm*.
- A quien me ayudó de manera incondicional en el estudio del eje hipotálamo-pituitario: *Dr. Rodolfo Goya*.
- A los Investigadores de los diferentes proyectos colaborativos: *Drs. Bohn MC, Calandra RS, Campo S, Castro MG, Dardenne M, García Segura LM, Goya RG, Guimarey LM, Hereñú CB, Jurado SB, Morel GR, Oyhenart EE, Pucciarelli HM, Reggiani PC, Rulli SB, Sonntag WE, Spinedi E*.
- A mis queridos Tesisistas, Becarios y Docentes-Investigadores que participaron en el estudio del sistema neuroendócrino: *Balestra Laura, Bellini María José, Brown Oscar, Camihort Gisela, Carino Mónica, Castelletto Elisa, Corrada Yanina, Cozzi Susana, Ferreira Renata, Galimberti Carla, Gobello Cristina, Jurado Susana, López León Micaela, Luna*

Acknowledgements

- To the memory of **Nobel Prize** (1947) *Prof. Dr. Bernardo A. Houssay*, pioneer in the study of the pituitary gland, who in his visits to the Institute of Physiology of the Faculty of Medical Sciences of the National University of La Plata sowed a small seed in the young people who had the joy to meet him.
- To those who awoke my vocation to scientific research: *Prof. Herberto Prieto Díaz and Prof. Dr. Ricardo R. Rodríguez*.
- To those who encouraged me to return to research and teaching tasks in very hard times: *Prof. Dr. Eduardo Charreau, Prof. Dr. Horacio Cingolani, Prof. Dr. Juan Basualdo and Prof. Dr. Alberto D'Ottavio*.
- To my dear teacher in the study of hypophysis: *Prof. Dr. César Gómez Dumm*.
- To that who helped me unconditionally in the study of the hypothalamus-pituitary axis: *Dr. Rodolfo G. Goya*.
- To the researchers of the different collaborative projects: *Drs. Bohn MC, Calandra RS, Campo S, Castro MG, Dardenne M, García Segura LM, Goya RG, Guimarey LM, Hereñú CB, Jurado SB, Morel GR, Oyhenart EE, Pucciarelli HM, Reggiani PC, Rulli SB, Sonntag WE, Spinedi E*.
- To my dear thesis students, research scholars and teachers-researchers who participated in the study of the neuroendocrine system: *Balestra Laura, Bellini María José, Brown Oscar, Camihort Gisela, Carino Mónica, Castelletto Elisa, Corrada Yanina, Cozzi Susana, Ferreira Renata, Galimberti Carla, Gobello Cristina, Jurado Susana, López León Micaela, Luna Georgina, Martínez Eliana, Morel Gusta-*

Georgina, Martínez Eliana, Morel Gustavo, Naumovich Diana, Pardo Joaquín, Pereyra Andrea, Piermaría Judith, Reggiani Paula, Rodríguez Silvia, Salvador Ricardo, Sanz Cecilia, Schwerdt J. Ignacio, Vesenbeckh Silvan, Zappa Villar María Florencia.

- Al Personal de Apoyo en la investigación: *Frida Winschu, Yolanda Sosa, Celia Ferese, Georgina Luna, María Bracamonte.* Al Personal de mantenimiento del Laboratorio: *Julio Clar y Rubén Paredes (UNLP).*
- A mi *Secretaria (área de Investigación): Traductora Gabriela Simonetto (UNLP).*
- A **Dios:** Generador de las fuerzas para desarrollar mi vocación docente-investigadora y vencer los numerosos obstáculos que me permitieron valorar los logros obtenidos.

vo, Naumovich Diana, Pardo Joaquín, Pereyra Andrea, Piermaría Judith, Reggiani Paula, Rodríguez Silvia, Salvador Ricardo, Sanz Cecilia, Schwerdt J. Ignacio, Vesenbeckh Silvan, Zappa Villar Florencia.

- To the Research Assistant Personnel: *Frida Winschu, Yolanda Sosa, Celia Ferese, Julio Clar, Rubén Paredes, Georgina Luna, María Bracamonte.*
- To my *Secretary (Research Area): Translator Gabriela Simonetto.*
- To my beloved husband *Hugo Avegliano*, to my sons *Gustavo* and *Guillermo* and to my dear granddaughter *Bianca.*
- To **God:** generator of the strength to develop my vocation of teacher-researcher and surpass the numerous obstacles that allowed me to value the achievements attained.

CAPÍTULO 1

Embriología de la glándula hipofisaria

Organogénesis pituitaria

La glándula hipófisis o pituitaria proviene de dos esbozos ectodérmicos: **A) Epiblastico:** evaginación ectodérmica en el techo del estomodeo (semana 3) que origina un divertículo aplanado denominado **bolsa de Rathke**. El esbozo se extiende en profundidad, se pediculiza y forma un canal hipofisario abierto en la cavidad bucal primitiva (semanas 6 a 8). **B) Neuroblástico:** en forma simultánea, se desarrolla un divertículo en el neuroectodermo del diencefalo que se extiende hacia la bolsa de Rathke y se denomina **infundíbulo (fig. 1.1)** (Gómez Dumm, 1978; Cónsole y Gómez Dumm, 1997; Gómez Dumm y col., 2003).

CHAPTER 1

Embryology of the pituitary gland

Pituitary organogenesis

The hypophysis or pituitary gland is derived from two ectoderm primordia: **A) Epiblast:** an ectodermal evagination appears during the third week on the roof of the stomodeum giving rise to a flat diverticulum transversally oriented called **Rathke's pouch**. The primordium spreads in depth, pediculizes, and forms an open hypophyseal channel in the primitive oral cavity between weeks 6 and 8. **B) Neuroblast:** at the same time, a diverticulum called **infundibulum** develops in the neuroectoderm of the diencephalon, which spreads to Rathke's pouch (**fig. 1.1**) (Gómez Dumm, 1978; Cónsole and Gómez Dumm, 1997; Gómez Dumm et al., 2003).

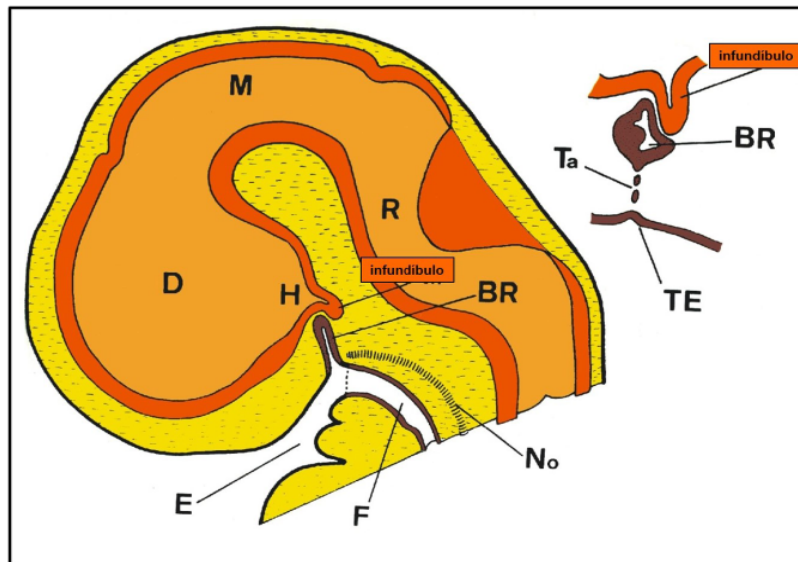


Fig. 1.1. Esbozos epiblastico y neuroblastico. *Infundíbulo y bolsa de Rathke (BR). H: hipotálamo; D: diencéfalo; M: mesencéfalo; R: rombencéfalo; No: notocorda; E: estomodeo; F: faringe; TE: techo del estomodeo; Ta: tallo infundibular (Atlas de Embriología Humana, Gómez Dumm CLA, 1978, modificado).*

La bolsa de Rathke se cierra y el canal hipofisario se transforma en el tracto faringo-hipofisario que desaparece cuando se desarrolla el hueso esfenoides. La bolsa de Rathke engrosa su pared y se separa del techo del estomodeo por una involución del tallo infundibular (semana 8) y en ese momento, ambos esbozos toman contacto. La bolsa de Rathke presenta: **A) Hoja anterior:** con dos divertículos laterales y uno ántero-medial (semana 6) que tiende a desarrollarse lateralmente y muestra gran actividad mitótica. En el curso del tercer mes de vida intrauterina, la hoja anterior proliferante constituye el **lóbulo anterior** y la hendidura residual tiende a borrarse. **B) Hoja posterior:** sus células permanecen en estado de reposo. (Girod y Trouillas, 1993). El hueso esfenoides forma una cavidad que aloja el primordio hipofisario durante la semana 11. La pared de la bolsa de Rathke origina la **pars**

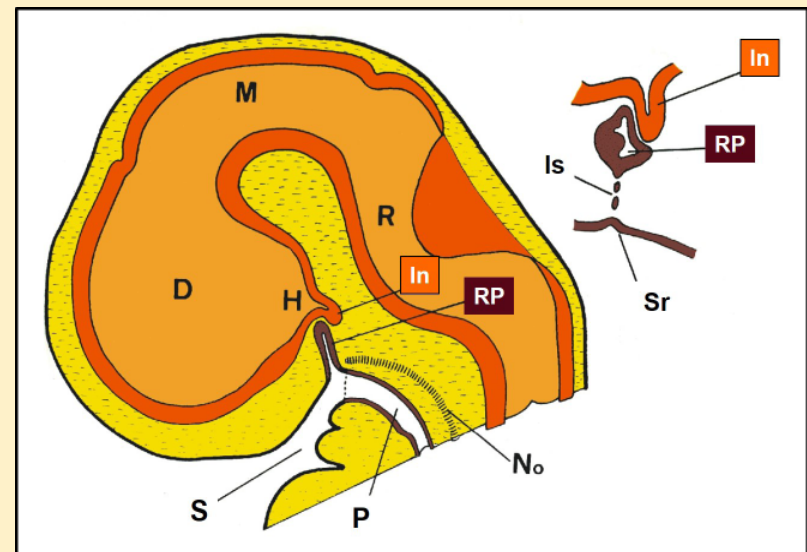


Fig. 1.1. Epiblast and neuroblast primordia. *In: infundibulum. RP: Rathke's pouch; H: hypothalamus; D: diencephalon; M: midbrain; R: rhombencephalon; No: notochord; S: stomodeum; P: pharynx; Sr: stomodeum roof; Is: infundibular stalk (from Atlas de Embriología Humana, Gómez Dumm CLA, 1978).*

Rathke's pouch closes and the hypophyseal channel transforms into the pharyngeal-hypophyseal tract, which will disappear with the development of the sphenoid bone. In a more advanced stage (week 8), Rathke's pouch presents a thickened wall and gradually detaches from the roof of the stomodeum. At that moment, both primordia come into contact.

Rathke's pouch presents two walls: **A) Anterior wall:** it undergoes important mitotic activity and tends to develop laterally. At the end of week 6, it presents two lateral diverticula and one antero-medial diverticulum. Throughout the third month of intrauterine life, the proliferating anterior wall constitutes the **anterior lobe**. The residual cavity tends to disappear. **B) Posterior wall:** it remains in a state of repose (Girod and Trouillas, 1993). Throughout week 11, the

distalis, la pars tuberalis y la pars intermedia de la glándula, cuyo conjunto comprende la **adenohipófisis**.

El esbozo neuroblástico conserva su relación con la vesícula diencefálica. La extremidad distal se elonga y toma contacto con las áreas laterales de la hoja anterior de la bolsa de Rathke. El eje está ocupado por una cavidad elongada denominada **receso infundibular**. La **neurohipófisis** se forma a partir del **infundíbulo** (Müller y O’Rahilly, 1989). El mesénquima se diferencia en el conectivo-vascular estromal y en la cápsula conjuntiva glandular (semana 12).

El **sistema portal hipofisario** comienza a formarse antes de la semana 7 de la gestación y para la semana 12, el lóbulo anterior y la eminencia media están bien vascularizados. Los vasos portales se pueden reconocer entre la 11.5 semana a la semana 14, están bien desarrollados en las semanas 15 a 16 y plenamente establecidos en las semanas 18 a 20 de la gestación.

La **neurohipófisis** está constituida ahora por la **eminencia media, el tallo infundibular y la pars nervosa**, íntimamente adosada a la **pars intermedia**. Desde los núcleos hipotalámicos **supraóptico** (1) y **paraventricular** (2) se desarrollan fibras nerviosas que terminan en la **pars nervosa** y constituyen el **haz hipotálamo-hipofisario**. En el humano, la cavidad de la bolsa de Rathke desaparece y solamente persisten restos quísticos entre la **pars distalis** y la **pars intermedia**. La glándula queda ubicada en la **silla turca** del esfenoides, concavidad que se cierra mediante una derivación meníngea denominada **diafragma selar**. Quedan conformadas las siguientes **regiones hipofisarias** (fig. 1.2).

1. Adenohipófisis:

- a) lóbulo anterior o *pars distalis* (PD).
- b) lóbulo intermedio o *pars intermedia* (PI).
- c) lóbulo infundibular-tuberal o *pars tuberalis* (PT).

sphenoid bone forms a cavity that houses the hypophyseal primordium. The wall of Rathke’s pouch originates the **pars distalis**, the **pars tuberalis** and the **pars intermedia** of the gland, which together comprise the **adenohypophysis**.

The neuroblast primordium maintains the relationship with the diencephalic vesicle. The distal end elongates and comes into contact with the lateral areas of the anterior wall of Rathke’s pouch. The axis is filled with an elongated cavity called **infundibular recess**. The **neurohypophysis** is formed from the **infundibulum** (Müller and O’Rahilly, 1989). The mesenchyme differentiates the connective-vascular tissue and the conjunctive capsule surrounding the gland is formed during week 12. The **hypophyseal portal system** starts its formation before week 7 of gestation and by week 12, the anterior lobe and the median eminence are well vascularized. The portal blood vessels can be identified between weeks 11.5 and 14, they are well developed by weeks 15 to 16 and completely evident by weeks 18 to 20 of gestation. The **neurohypophysis** is now formed by the **median eminence**, the **infundibular stalk** and the **pars nervosa**, closely attached to the **pars intermedia**. Nerve fibres leave the hypothalamic **supraoptic** (1) and **paraventricular** (2) *nuclei* and end in the **pars nervosa** constituting a **hypothalamic-hypophyseal bundle**. In human beings, the **Rathke’s pouch** cavity disappears, and only the cystic remnants remain between the **pars distalis** and the **pars intermedia**. The gland sits on the **sella turcica** of the sphenoid bone, concavity that closes by means of a meningeal derivation: the **diafragma sellar**. The **hypophyseal regions** are formed (fig. 1.2):

1. Adenohypophysis:

- a) anterior lobe or *pars distalis* (PD).
- b) intermediate lobe or *pars intermedia* (PI).
- c) infundibular-tuberal lobe or *pars tuberalis* (PT).

2. Neurohipófisis

- d) eminencia media (EM).
- e) tallo infundibular (TI).
- f) lóbulo posterior o *pars neural* (PN).

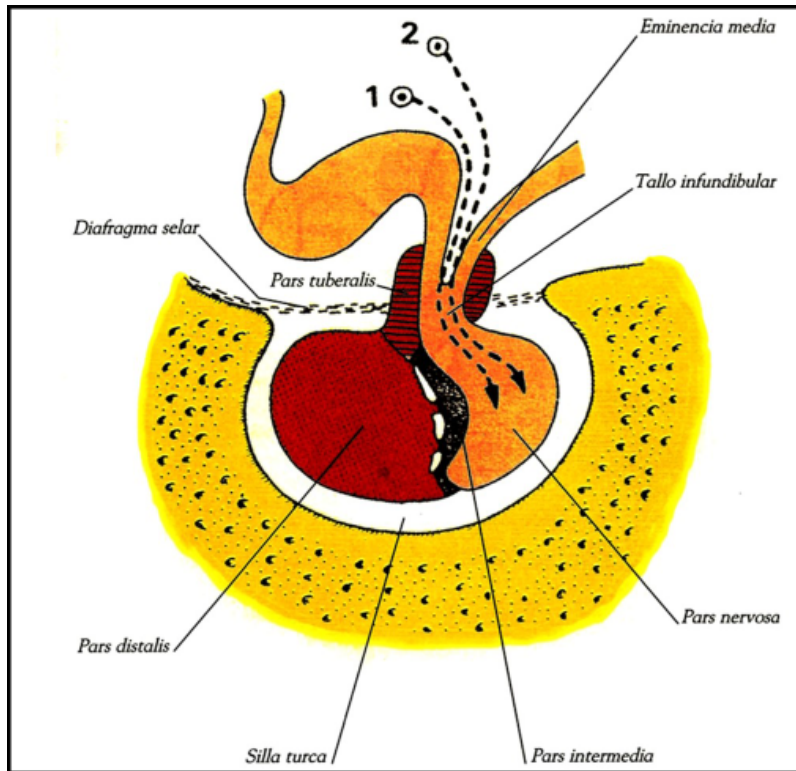


Fig. 1.2. Regiones hipofisarias (*Atlas de Embriología Humana, Gómez Dumm CLA, 1978*).

La **tabla 1** permite caracterizar las diferentes poblaciones celulares adenohipofisarias, las señales hipotalámicas y la respuesta de los tejidos blanco.

2. Neurohypophysis:

- d) *median eminence* (ME).
- e) *infundibular stalk* (IS).
- f) *posterior lobe* or *pars neural* (PN).

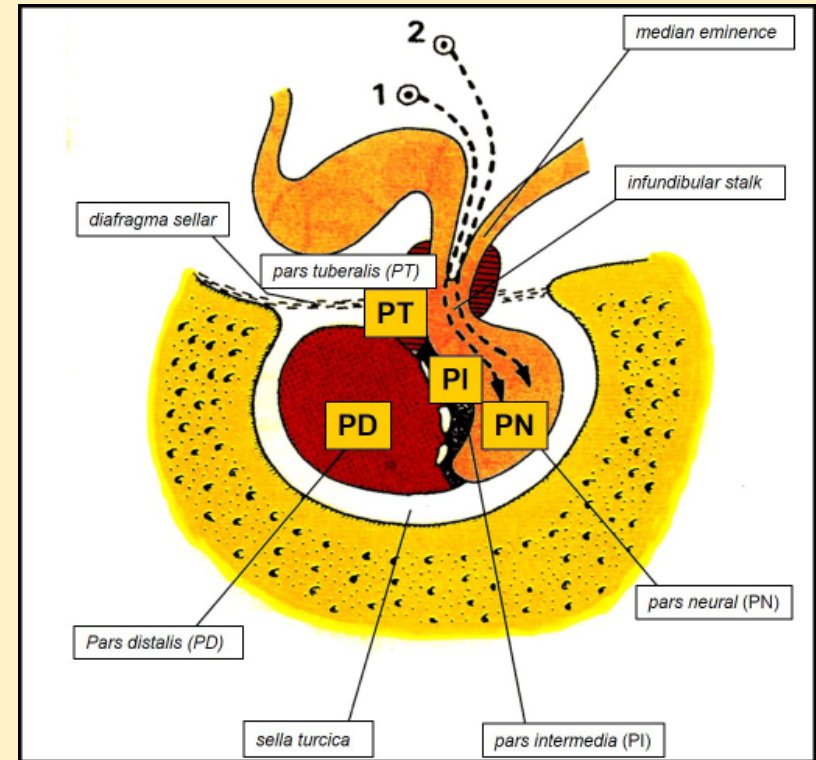


Fig. 1.2. Hypophyseal regions (*Atlas de Embriología Humana, Gómez Dumm CLA, 1978*).

Table 1 shows the characterization of different adenohipophyseal cell populations, hypothalamic signals and the responses of target tissues.

Tabla 1. Caracterización de las poblaciones adenohipofisarias

Población celular	Señal Hipotalámica	Hormona	Tejido blanco	Respuesta
Corticotropa	CRH (+)	ACTH	Corteza adrenal	Glucocorticoides
Tirotropa	TRH (+)	TSH	Tiroides	T3-T4
Somatotropa	GHRH (+) (GIH) (-)	GH → Somatomedinas	Hígado y otros tejidos	Crecimiento de huesos largos
Lactotropa	PRH (+) PIH (-)	PRL	Mama	Lactancia
Gonadotropa	GnRH (+) GnIH (-)	FSH/LH	Gónadas	Gametogénesis Ovulación

Embriogénesis molecular

El desarrollo normal del eje hipotálamo-hipofisario depende de una cascada genética de factores de transcripción y de moléculas de señalización que regulan la diferenciación tisular y el balance entre proliferación-apoptosis o muerte celular programada (Treier y Rosenfeld, 1996). Los factores de crecimiento y transcripción, así como las moléculas de señalización son fundamentales para la proliferación, diferenciación y morfogénesis temporal y espacial de la glándula pituitaria (Bazina y col., 2009). La embriogénesis hipofisaria implica **señales extrínsecas** proveedoras de morfógenos que crean un microambiente para la aparición de las células progenitoras o madres. Estas señales inductoras son mediadas a través de una familia de moléculas tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), factores de crecimiento epidérmico (EGFs), Wnts, hedgehogs, factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y retinoides. Dichas señales extrínsecas actúan sobre **programas intrínsecos** autónomos que inducen patrones de expresión en una cascada de factores de transcripción y de moléculas de señalización para cada tipo celular, creando una genealogía hipofisaria (Dasen y Rosenfeld, 1999a-b-c; Burrows y col., 1999; Sheng y Westphal, 1999). La embriogénesis molecular muestra procesos críticos como el control metabólico, la pubertad, la

Table 1. Characterization of adenohipophyseal populations

Cell population	Hypothalamic signal	Hormone	Target tissue	Response
Corticotrope	CRH (+)	ACTH	Adrenal cortex	Glucocorticoids
Thyrotrope	TRH (+)	TSH	Thyroids	T3-T4
Somatotrope	GHRH (+) GIH (-)	GH → somatomedins	Liver and other tissues	Growth long bones
Lactotrope	PRH (+) PIH (-)	PRL	Breast	Breastfeeding
Gonadotrope	GnRH (+)	LH-FSH	Gonads	Gametogenesis Ovulation

Molecular embryogenesis

The normal development of the hypothalamic-hypophyseal axis depends on a genetic cascade of transcriptional factors and signalling molecules that regulate tissue differentiation and the balance between proliferation and apoptosis (Treier and Rosenfeld, 1996). Growth and transcriptional factors, as well as signaling molecules, are essential for the proliferation, differentiation and temporal and spatial morphogenesis of the pituitary gland (Bazina et al., 2009).

Pituitary embryogenesis involves **extrinsic molecular signals** which help create a microenvironment that determines the appearance of stem cells with inductive events leading to cell proliferation or programmed cell death. These signals are mediated by a family of molecules such as the transforming growth factor (TGFβ), epidermal growth factors (EGFs), Wnts, hedgehogs, fibroblastic growth factors (FGFs) and retinoids. These extrinsic signals influence the **intrinsic determining programs** inducing expression patterns of a transcriptional factor cascade and of specific signalling molecules for each cell type creating a hypophyseal genealogy (Dasen and Rosenfeld, 1999a-b-c; Burrows et al., 1999; Sheng and Westphal, 1999). Molecular embryogenesis evidences critical processes such as metabolic control, puberty, reproduction, res-

reproducción, la respuesta al estrés y la lactancia, explicando la etiología de las deficiencias hormonales a nivel pituitario (Pfaffle y Klammt, 2011).

Las alteraciones moleculares determinan las reconocidas deficiencias hormonales que pueden ser aisladas o combinadas. Las mutaciones génicas de dichos factores y moléculas originan alteraciones en la histogénesis pituitaria, explicando el hipopituitarismo detectado en ratones y en seres humanos. Muchos genes aún no han sido identificados y es necesario aclarar el origen de las condiciones complejas que contribuirán a esclarecer el desarrollo normal de la pituitaria (Kelberman y Dattani, 2006; Kelberman y col., 2009a-b). El requerimiento de 3 cajas homeóticas (Lhx3, Lhx4 y Tif1) durante la embriogénesis se obtuvo mediante manipulación genética. Las mutaciones en ratón revelaron 2 cajas más: Pit1 y Prop1 que resultaron críticas para la especialización y proliferación de las poblaciones adenohipofisarias (Watkins y Camper, 1998). La transferencia de genes mediante vectores lentivirales podría proporcionar un aporte clave para el enfoque terapéutico de las deficiencias congénitas y de los adenomas pituitarios (Quentien y col., 2006). La **tabla 2** presenta la expresión de genes en el lóbulo anterior pituitario.

Tabla 2. Expresión de genes en el lóbulo anterior hipofisario

Gen	Bolsa de Rathke	ACTH	GH	PRL	TSH	LH/FSH
Drd2				X		
Egr1			X	x	X	X
Ftzf1						X
Gata2					X	X
Hesx1	X					
Isl-1	X					
Lbd1,3				X	X	
Lhx2.		x	x	x	X	X
Lhx3	X	X	X	X	X	X
Lhx4	X					
Msx1	X				X	

ponse to stress and breastfeeding, thus explaining the aetiology of hormonal deficiencies at pituitary level (Pfaffle and Klammt, 2011).

The requirement of three homeotic boxes of genes (Lhx3, Lhx4 and Tif1) during embryogenesis was obtained through genetic manipulation. Mutations in mice revealed two more boxes: Pit1 and Prop1, which were critical for the specialization and proliferation of adenohipophyseal populations (Watkins and Camper, 1998). The transference of genes through lentiviral vectors could provide essential contribution to the therapeutical approach of congenital deficiencies and pituitary adenomas (Quentin et al., 2006). Molecular alterations determine hormonal deficiencies, either isolated or combined. Genetic mutations in those factors and molecules originate alterations in the pituitary histogenesis, thus explaining the hypopituitarism registered in mice and human beings. Many genes have not yet been identified and it is necessary to know the origin of the complex conditions that would contribute to clarify the normal development of the pituitary (Kelberman and Datan, 2006; Kelberman et al., 2009a-b). **Table 2** presents the gene expression in the anterior pituitary.

Table 2. Expression of genes in the hypophyseal anterior lobe

Gen	Rathke's Pouch	ACTH	GH	PRL	TSH	LH/FSH
Drd2				X		
Egr1			X	x	X	X
Ftzf1						X
Gata2					X	X
Hesx1	X					
Isl-1	X					
Lbd1,3				X	X	
Lhx2,		x	x	x	X	X
Lhx3	X	X	X	X	X	X
Lhx4	X					
Msx1	X				X	

Nhlh2	X					
Nkx3.1	X					
Otx1						X
Pax6	X					
Pit1			X	X	X	
Pitx1	X	X	X	X	X	X
Pitx2	X	X	X	X	X	X
Prop1	X					
Six1	X					
Six3	X					
Tef				x		
Titf2	X					
Zfp15			X			

X: alta expresión, x: baja expresión (Burrows y col., 1999).

En el comienzo de la organogénesis se produce un engrosamiento del ectodermo del estomodeo que se invagina para formar la bolsa de Rathke epitelial, acompañándose de numerosos gradientes de señales (Ikeda y col., 1988). Se libera Sonic Hedgehog Homologus (Shh), Pitx-1 y Pitx-2 en el ectodermo oral. Luego se expresa la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) en el diencéfalo ventral y se detecta la liberación del factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) que establece la expresión de factores de transcripción, incluyendo Lhx3 y Nkx 3.1. En esta fase inicial, el Shh está excluido de la bolsa de Rathke, creándose un compartimiento molecular entre el ectodermo oral y el ectodermo de la bolsa. La BMP-2 antagoniza a la ubicada en el mesénquima caudal, manteniendo un gradiente ventro-dorsal, en el que se expresan factores de transcripción tales como GATA-2, Isl-1 y P-Frk. En la fase final, se requiere la pérdida temporal de la BMP2 para permitir la diferenciación final de las diferentes líneas celulares que se hallan determinadas en el campo de expresión de Pit-1. Los factores de transcripción Lhx3, Prop1 y Nkx3.1 se hallan en un gradiente dorso-ventral, mientras que Six1, Brn4 y P-Frk se detectan en un gradiente ventro-dorsal (Sheng y Westphal, 1999). Los seis tipos celulares secretorios adenohipofisarios están

Nhlh2	X					
Nkx3.1	X					
Otx1						X
Pax6	X					
Pit1			X	X	X	
Pitx1	X	X	X	X	X	X
Pitx2	X	X	X	X	X	X
Prop1	X					
Six1	X					
Six3	X					
Tef				x		
Titf2	X					
Zfp15			X			

X: high expression, x: low expression (Burrows et al., 1999).

The onset of organogenesis begins with the thickening of the stomodeal ectoderm, which invaginates to form Rathke's pouch, presenting numerous signalling gradients (Ikeda y col., 1988). Sonic hedgehog (Shh) and Pit-1 and Pitx-2 are released in the oral ectoderm. After that, bone morphogenetic protein (BMP4) is expressed in the ventral diencephalon, and the release of the fibroblastic growth factor (FGF8) establishes the expression of transcriptional factors including Lhx3 and Nkx 3.1. In this initial phase, Shh is excluded from the Rathke's pouch, and a molecular compartment is created between the oral ectoderm and the pouch ectoderm. BMP2 antagonizes the protein located in the caudal mesenchyme, keeping a ventrodorsal gradient, where transcriptional factors such as GATA-2, Isl-1 and P-Frk are expressed. In the final stage, the temporary loss of BMP2 is required in order to allow the final differentiation of the different cell lines that are determined in Pit-1 expression field. Transcriptional factors Lhx3, Prop1 and Nkx 3.1 are in a dorsal-ventral gradient and Isl1, while Six1, Brn4 and P-Frk are detected in a ventral-dorsal gradient (Sheng and Westphal, 1999).

espacial y temporalmente determinados durante la embriogénesis. La diferenciación de las líneas celulares pituitarias permite observar corticotropas (C) y melanotropas (MSH) que crecen dorsalmente, mientras las somatotropas (S) y lactotropas (L) lo hacen en el campo intermedio y las tirotropas (T) y gonadotropas (G) proliferan en sentido ventral (Dubois y ElAmraoui, 1995; Dasen y Rosenfeld, 1999a-b; 2001; de Moraes y col., 2012) (**fig. 1.3**).

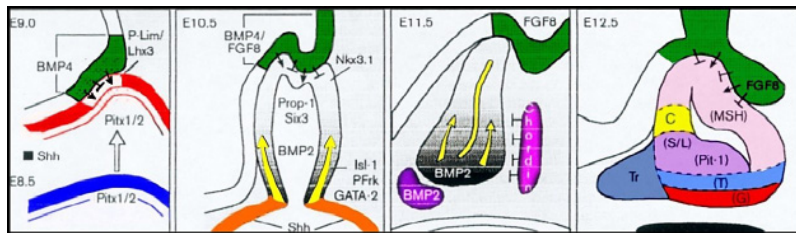


Fig. 1.3. Histoembriología pituitaria. Poblaciones: S/L: somatotropa y lactotropa, T: tirotropa, Tr: tirotropa ventral, C: corticotropa, G: gonadotropa y MSH: melanotropa (Dasen y Rosenfeld, 1999b).

La organogénesis de la pituitaria en mamíferos sigue un protocolo espacial y temporal específico a partir de un primordio ectodérmico. Existe una base molecular en la generación de los diversos fenotipos celulares pituitarios que han sido estudiados a nivel ultraestructural por Dubois y Hemming (1991). La **fig. 1.4** señala algunos de los factores de transcripción y de las moléculas señales.

Se han indicado diversas moléculas de señalización pituitaria: BMP, FGF y Wnt (Hogan, 1996; Cadigan y Nusse, 1997), BMP-4 y BMP-2 (Jones y col., 1991; Dasen y Rosenfeld, 1999 b y 2001) y FGF-8 (Crossley y Martin, 1995), Sonic Hedgehog: Shh (Basler y Struhl, 1994) y cordina (Piccolo y col., 1996).

Las diferentes líneas celulares pituitarias responden a múltiples gradientes de señalización. Las células madre pluripotenciales se caracterizan por tener capacidad de autorenovación indefinida y falta de especialización (Nassiri y col., 2013). Los modelos experimentales apoyan su participación en la regeneración celular y se sugiere su influencia en la formación

The six secreting cell types are spatially and temporally determined during embryogenesis. Corticotrope and melanotrope populations grow dorsally, while somatotropes and lactotropes do so in the intermediate field, and thyrotropes and gonadotropes proliferate ventrally (Dubois and ElAmraoui, 1995; Dasen and Rosenfeld, 1999a-b; 2001; de Moraes et al., 2012) (**fig. 1.3**).

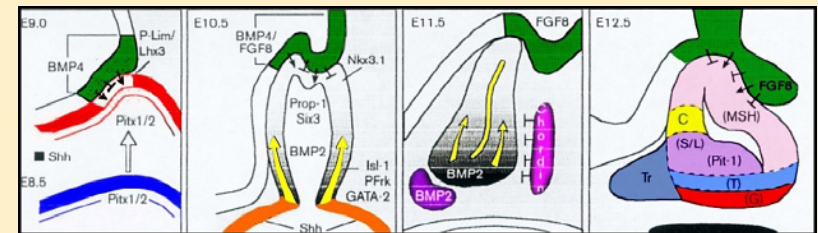


Fig. 1.3. Histoembryology of the pituitary. Populations: S/L: somatotrope and lactotrope, T: thyrotrope, Tr: rostral thyrotrope, C: corticotrope, G: gonadotrope and MSH: melanotrope (Dasen and Rosenfeld, 1999b).

The organogenesis of the pituitary gland in mammals follow a specific spatial and temporal protocol derived from an ectoderm primordium. There is a molecular basis for generating different pituitary cell phenotypes that were studied at ultrastructural level by Dubois and Hemming (1991). Several signalling molecules of the pituitary have been expressed: BMP, FGF and Wnt (Hogan, 1996; Cadigan and Nusse, 1997), BMP-4 (Jones et al., 1991) and FGF-8 (Crossley and Martin, 1995), Sonic hedgehog: Shh (Basler and Struhl, 1994) and chordin (Piccolo et al., 1996). Some transcriptional factors and signalling molecules are indicated in **fig. 1.4**.

A model of pituitary cell lines has been established in response to multiple morphogenetic gradients. Pluripotent stem cells display capacity for indefinite self-renewal and a lack of specialization (Nassiri et al, 2013). The new experimental models support stem cell involvement in cell regeneration and it is suggested that they affect the formation of pituitary tumors, since they would be able to reutilize the embryonic programs kept in their memory (Vankelekom and Chen, 2014). In human embryos during weeks

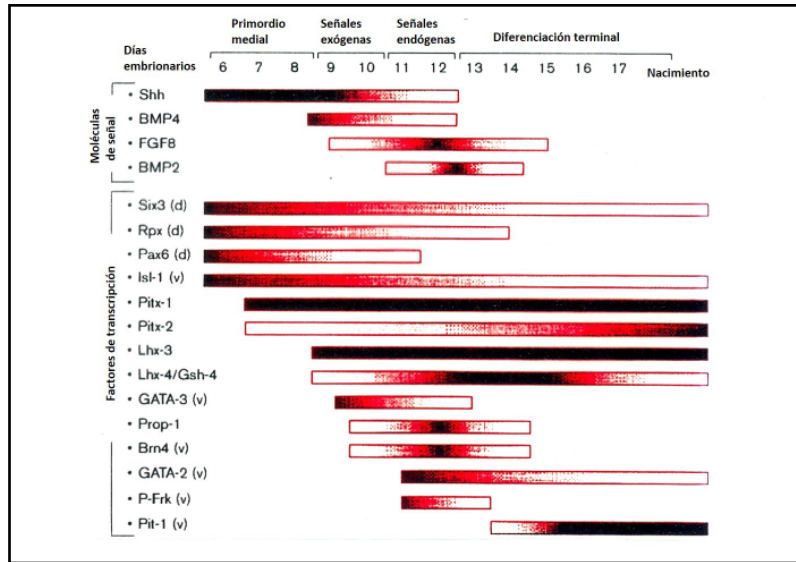


Fig. 1.4. Moléculas de señalización y factores de transcripción (Dasen y Rosenfeld, 1999b).

de los tumores hipofisarios, ya que serían capaces de reutilizar los programas embrionarios guardados en su memoria (Vankelekom y Chen, 2014).

En embriones humanos en semanas 7-8, se detectaron células utilizando antiseros para ACTH, β LPH, α y β endorfinas, γ MSH y hGH. Entre 8 a 12 semanas, se inmunomarcaron células con el antisero anti-hormonas α -glicoproteicas y entre 12-16 semanas hubo reacción con el anticuerpo β TSH. A las 15-16 semanas en hembras y 20 semanas en machos, se presentaron células inmunomarcadas con los anticuerpos anti- β FSH y anti- β LH. Entre las semanas 16-18 se reconocieron células con el anticuerpo anti-PRL. En la semana 28 se detectaron células anti-S100 y anti-GFAP (proteína gliofibrilar ácida) (Girod y Trouillas, 1993). Pope y col. (2006) estudiaron la regulación molecular en el desarrollo de las gonadotropas y tirotropas en fetos humanos, hallando FSH-LH dimérica bioactiva en las 14 semanas y TSH dimérica bioactiva en las 17 semanas. La mayor parte de las tirotropas fueron multihormonales y presentaron además de TSH: LH (40%), PRL (20%) y

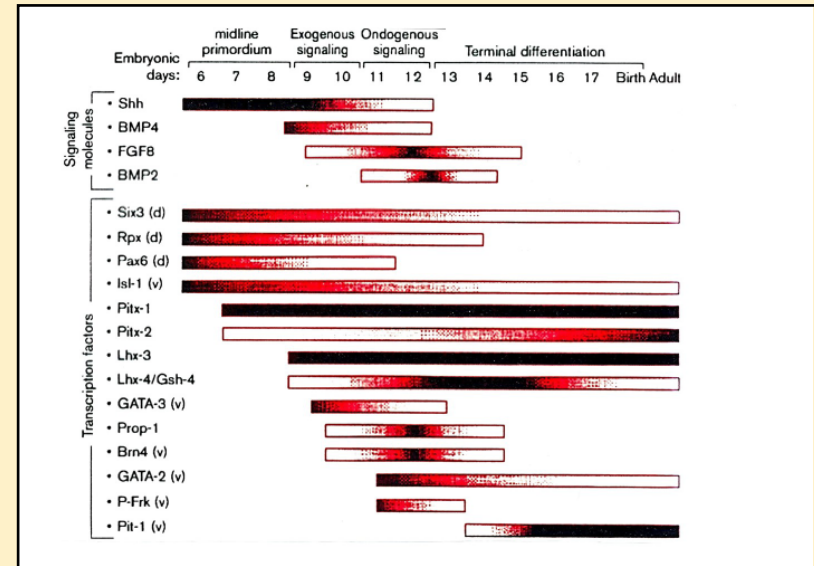


Fig. 1.4. Signalling molecules and transcriptional factors of the infundibulum and Rathke's pouch (Dasen and Rosenfeld, 1999b).

7-8 there is evidence of cells that react with anti-ACTH, anti- β LPH, α and β endorphins, anti- γ MSH and anti-hGH sera. Between weeks 8 and 12 cells stained with anti-hormones α -glycoprotein serum are detected and between weeks 12 and 16 h β TSH antibody reaction can be observed. At weeks 15 and 16 in females and at week 20 in males, cells immunostained with anti- β FSH and anti- β LH antibodies are present. Between weeks 16 and 18 cells are recognized using anti-PRL antibody. During week 28 anti-S100 and anti-GFAP cells are detected (*glial fibrillary acidic protein*) (Girod and Trouillas, 1993). Pope et al. (2006) studied the molecular regulation in the development of gonadotropes and thyrotropes in human fetuses, finding bioactive dimeric FSH-LH in week 14 and bioactive dimeric TSH in week 17. Most thyrotropes were found to be multihormonal and apart from TSH they presented: LH (40%), PRL (20%) and ACTH (24%). Thyrotropes constitute a mosaic phenotype, but paradoxical secretion would not be so frequent because the TSH releasing hormone (TRH)

ACTH (24%). Las tirotropas constituyen un mosaico de fenotipos, pero la secreción paradójica no sería tan frecuente porque la hormona liberadora de TSH (TRH) actuaría de modo débil sobre las tirotropas polihormonales (Villalobos y col., 2004). Se han detectado células polifuncionales en todos los tipos de células secretorias, con predominio en tirotropas y un claro dimorfismo a favor de las pituitarias de hembras (Núñez y col., 2003). La diferenciación celular pituitaria en embriones de ratas registró corticotropas inmunorreactivas el día E13, con un 15% de células agranulares (Nemeskery y col., 1976). La ontogénesis de las células productoras de hormonas polipeptídicas en la hipófisis de fetos de ratas inmunomarcó melanotropas y corticotropas (día 16), somatotropas (día 19) y lactotropas (día 21) (Chatelain y col., 1979). Además, Watanabe (1982) hizo estudios en cultivos pituitarios en ratas que permitieron la determinación de las células corticotropas y luteinizantes.

Las células madres se comprometen en una línea pituitaria a través de la expresión de Lhx-3/P-LIM que requieren los factores FGF-8, BMP-4 y Shh. Pitx-2 es necesario para la expansión de estos precursores en la bolsa de Rathke. El Prop-1 es requerido para la proliferación y determinación de cuatro de los tipos celulares del área ventro-intermedia. El Pit-1 determina el destino de tres tipos celulares: somatotropas, lactotropas y tirotropas, mientras que el GATA-2 diferencia las líneas tirotropa y gonadotropa, con ausencia o presencia de Pit-1, respectivamente (Dasen y Rosenfeld, 1999b) (fig. 1.5).

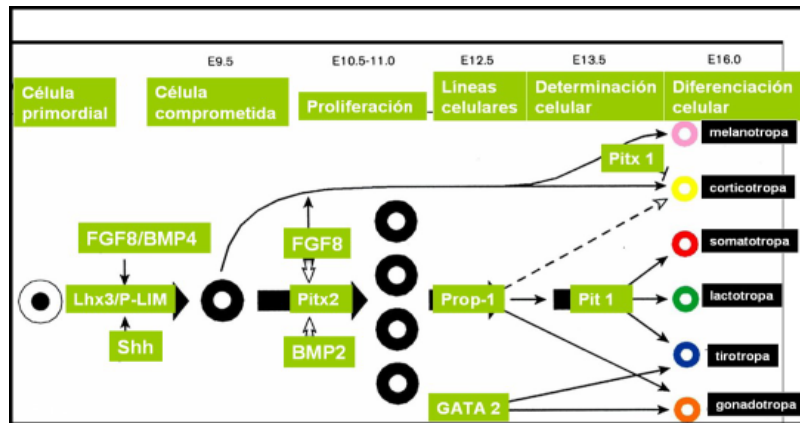


Fig. 1.5. Histoembriología adenohipofisaria (Dasen y Rosenfeld, 1999b).

would affect weakly the polihormonal thyrotropes (Villalobos et al., 2004). Polifunctional cells have been detected in all the types of secreting cells, especially in thyrotropes, as well as an evident dimorphism in favour of female pituitaries (Núñez et al., 2003). The pituitary cellular differentiation in rat embryos detected immunoreactive corticotropes on day E13 with 15% of agranular cells (Nemeskery et al., 1976). The ontogenesis of cells producing polypeptide hormones in rat fetal pituitaries immunostained melanotropes and corticotropes (day 16), somatotropes (day 19) and lactotropes (day 21) (Chatelain et al., 1979). Moreover, Watanabe's (1982) studies in rat pituitary cultures allowed the determination of corticotropes and luteinizing cells.

Stem cells would be involved in a pituitary cell line through the expression of Lh3/P-LIM, which may require factors FGF8, BMP4 and Shh. Pitx2 is necessary for the expansion of these precursors inside the Rathke's pouch, with Prophet of Pit-1 (Prop-1), a precursor required for the proliferation and determination of at least four of the cell types of the ventral-intermediate area. Pit-1 is then required for determining the fate of three cell types (somatotropes, lactotropes and thyrotropes), while GATA-2 would be necessary for thyrotrope and gonadotrope cell lines, based on the absence or presence of Pit-1, respectively (Dasen and Rosenfeld, 1999b) (fig. 1.5).

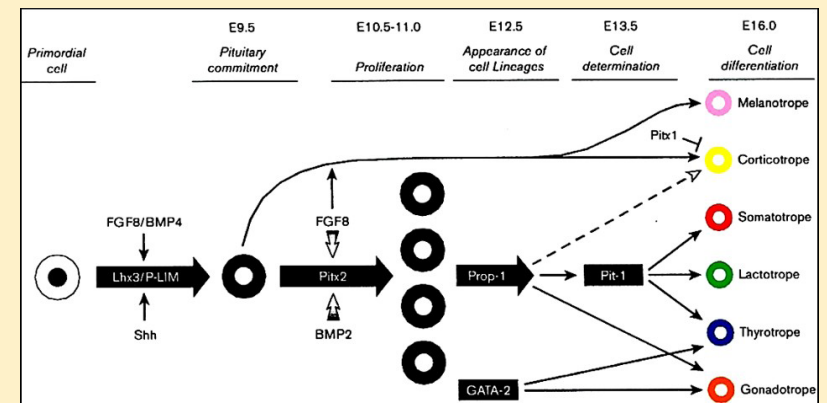


Fig. 1.5. Histoembriología de la adenohipofisis (Dasen y Rosenfeld, 1999b).

En dicho proceso se pueden señalar 3 fases: en la **fase 1** se observa la señal de la BMP en el diencéfalo ventral que expresa BMP-4, Wnt5a y FGF-8. En la **fase 2** se presenta un centro pituitario organizador ventral con señal BMP2 y expresión de Shh. La señal BMP-2 junto con la señal FGF-8 dorsal, crean gradientes de oposición generando factores de transcripción que determinan cada linaje celular pituitario, necesiéndose Wnt4 para la expansión de los fenotipos ventrales. En la **fase 3** se requiere la pérdida temporal de la señal BMP-2 para permitir la diferenciación terminal (Rosenfeld y col., 2000). Los diferentes tipos celulares pituitarios siguen un gradiente ventro-dorsal que conforman la organogénesis pituitaria (Treier y col., 1998). Dichos gradientes de señalización dan lugar a patrones de expresión de los factores de transcripción que siguen programas celulares autónomos con eventos de señalización de carácter transitorio (Dasen y Rosenfeld, 1999b y 2001).

Factores intrínsecos de la bolsa de Rathke: Lhx-3, P-Lim, Rpx, Pax-6, Six-3, Isl-1, Wnt5a.

Factores del ectodermo oral: Pitx-1, Pitx-2, Rpx/Hesx-1. Se expresan Pitx1/Pitx2 porque son requeridos para la determinación celular y los eventos proliferativos.

Moléculas de señalización: Shh, BMP-4, FGF-8, BMP-2.

A continuación se detalla la localización y la función de los principales factores de transcripción y moléculas de señalización según Sheng y Westphal (1999):

BMP-4: es una molécula de señalización detectada en la fase inicial del desarrollo pituitario a nivel del neuroepitelio diencefálico ventral (infundíbulo) que induce la formación de la bolsa rudimentaria (Dasen y Rosenfeld, 1999a; Jones y col., 1991; Hogan, 1996).

Isl1: se expresa en la bolsa de Rathke y en el ectodermo oral. Produce la diferenciación temprana de la bolsa de Rathke.

Nkx2.1: aparece en el diencéfalo y forma la bolsa definitiva.

Shh: es una molécula de señalización que se detecta entre el diencéfalo ventral y el ectodermo oral. Define límites entre bolsa de Rathke y ectodermo oral. Su expresión desaparece cuando nace la bolsa de Rathke. Se sugiere que el Shh con FGF8/10 regularía la expresión de Pax6 y Lhx-3 en la

The process presents three phases. In **phase 1**, BMP signal can be observed in the ventral diencephalon and expresses BMP-4, Wnt5a and FGF-8. In **phase 2** a ventral pituitary organizing centre with BMP2 signal and Shh expression is present. The BMP-2 signal together with a dorsal FGF-8 signal, create opposing activity gradients that generate transcriptional factors determining each pituitary cell lineage, Wnt4 being needed for the expansion of the ventral phenotypes. In **phase 3**, the temporary loss of BMP-2 signal is required to allow terminal differentiation. The different pituitary cell types follow a ventral-dorsal gradient that conform a harmonic pituitary organogenesis (Treier et al., 1998). These signaling gradients lead to patterns of transcription factor expression following autonomous cell patterns in response to transient signaling events (Dasen and Rosenfeld, 1999b and 2000).

Intrinsic factors of Rathke's pouch: Lhx-3, P-Lim, Rpx, Pax-6, Six-3, Isl-1, Wnt5a.

Oral ectoderm transcription factors: Pitx-1, Pitx-2, Rpx/Hesx-1. The expression of Pitx1/Pitx2 is required for cell determination and proliferation events.

Signaling molecules: Shh, BMP-4, FGF-8, BMP-2.

The localization and function of the main transcription factors and signaling molecules are described in detail as follows:

BMP-4: is a signaling molecule detected in the initial phase of the pituitary development at the level of the neuroepithelium of the ventral diencephalon (infundibulum) and leads to the formation of the embryonic pouch (Dasen and Rosenfeld, 1999a; Jones et al., 1991; Hogan, 1996).

Isl1: it expresses in the oral ectoderm and in Rathke's pouch and produces the early differentiation of the latter.

Nkx2.1: it appears in the diencephalon and forms the final pouch.

Shh: is a signaling molecule detected between the ventral diencephalon and the oral ectoderm and defines the boundaries between Rathke's pouch and the oral ectoderm. Its expression disappears when Rathke's pouch originates. The combination of Shh and

formación inicial de la glándula pituitaria y ejerce un papel en la diferenciación de las líneas pituitarias ventrales induciendo la expresión de BMP-2 en la bolsa de Rathke, luego regulada por GATA-2 (Treier y col., 2001).

FGF-8: se localiza en el infundíbulo e induce la formación de la bolsa definitiva y de las células pituitarias precursoras. Las células progenitoras proliferan y se diferencian debido a restricciones espacio-temporales en el FGF y por señales neurales (infundíbulo) y mesenquimáticas (mesénquima yuxtapituitario ventral) mediadas por la BMP. El infundíbulo aporta BMP-4 y FGF-8 y el mesénquima entrega BMP-2 y BMP-7. El FGF promueve la proliferación celular y el BMP controla la selección inicial de las tirotropas y las corticotropas (Crossley y Martin, 1995; Ericsson y col., 1998).

Wnt4: aparece en el ectodermo oral y en la bolsa de Rathke y determina la expansión de las células pituitarias precursoras (Hogan, 1996).

Wnt5: se expresa en diencefalo e induce la expresión de AGSO (Hogan, 1996).

Ptx1 y Pitx2: se forman en el ectodermo oral y la bolsa de Rathke. Los factores Pitx están involucrados en la activación del promotor de PRL (Quentien y col., 2002) y la identificación del Pitx2 sería la base para estudiar la expresión de PRL (Quentien y col., 2010). El Pitx-1 actúa mediando al Pit-1 y al gen promotor de la proopiomelanocortina (POMC). Su alteración lleva a una menor expresión en la diferenciación de los marcadores de gonadotropas y tirotropas (Dasen y Rosenfeld, 1999c).

Pitx-2: es un regulador transcripcional que actúa en la diferenciación de los diferentes tipos celulares pituitarios.

Lhx3: se detecta en la bolsa de Rathke y contribuye a la formación de la bolsa definitiva. Existe una vía ontogénica Lhx3 independiente para la especificación inicial del linaje celular pituitario (Sheng y col., 1996 y 1997).

Lhx4: se localiza en la bolsa de Rathke y contribuye a formarla. Además, induce la presencia de las células pituitarias precursoras (Sheng y col., 1996 y 1997).

BMP-2: es una molécula de señalización expresada dentro de la bolsa de Rathke-mesénquima ventral que permite la diferenciación temprana de los tipos celulares pituitarios. El gradiente BMP-2 (ventro-dorsal) se

FGF8/10 is suggested to regulate the expression of Plim and Lhx-3 in the early formation of the pituitary gland and to influence the differentiation of the ventral pituitary lines thus leading to BMP-2 expression in Rathke's pouch, which is then regulated by GATA-2 (Treier et al., 2001).

FGF-8: it is localized in the infundibulum and leads to the formation of the final pouch and the pituitary precursor cells. Progenitor cells proliferate and differentiate as a result of both spatial-temporal restrictions in FGF and neural (infundibulum) and mesenchymal (ventral juxtapituitary mesenchyme) signals mediated by BMP. The infundibulum provides BMP-4 and FGF-8 and the mesenchyme provides BMP-2 and BMP-7. FGF promotes cell proliferation and BMP controls the first selection of thyrotropes and corticotropes (Crossley and Martin, 1995; Ericsson et al., 1998).

Wnt4: it appears in the oral ectoderm and in Rathke's pouch. It determines the expansion of the pituitary precursor cells (Hogan, 1996).

Wnt5: it expresses in the diencephalon and induces α GSO expression (Hogan, 1996).

Lhx3: it is expressed in Rathke's pouch and contributes to the formation of the final pouch. There is an independent ontogenic way Lhx3 for the initial specification of the pituitary cellular lineage (Sheng et al., 1996 and 1997).

Lhx4: it is detected in Rathke's pouch and contributes to its formation. Also, it induces the presence of the pituitary precursor cells (Sheng et al., 1996; 1997).

BMP-2: this signaling molecule is expressed inside Rathke's pouch-ventral mesenchyme and allows the early differentiation of the pituitary cell types. Gradient BMP-2 (ventral-dorsal) is opposite gradient of the ventral diencephalon FGF-8 (dorsal-ventral) and of chordin (Basler and Struhl, 1994; Piccolo et al., 1996).

Chordin: it is a BMP-2 antagonist and is found in the caudal mesenchyme.

opone al gradiente (dorso-ventral) de FGF-8 del diencefalo ventral y de la cordina (Basler y Struhl, 1994; Piccolo y col., 1996).

Cordina: es antagonista de la BMP-2 que se halla en el mesénquima caudal.

Prop-1: se expresa en la bolsa de Rathke y activa el Pit-1. El Prop-1 es esencial para la producción de gonadotrofinas en mamíferos. Los ratones transgénicos con sobreexpresión de Prop-1 en las células gonadotropas y tirotropas presentan un cuadro clínico de hipogonadismo hipogonadotrófico, con mayor riesgo para desarrollar adenomas hipofisarios. Se sugirió que la variación en la expresión de Prop-1 podría afectar la aceleración del crecimiento y el inicio de la pubertad en seres humanos (Vesper y col., 2006). Se estudiaron ratones mutantes defectuosos en los factores de transcripción Prop-1 y Pou1F1, a fin de clarificar las vías que regulan el pasaje de la proliferación a la diferenciación celular pituitaria. Estos modelos experimentales detectaron la expresión de los genes involucrados en la hiperplasia, en el desarrollo de adenomas y en el proceso de tumorigénesis (Davis y col., 2009). El Prop-1 es un factor pituitario específico que coexiste con Sox-2 e induce células Pit-1. Se expresa en las células madre Sox-2 desde el período embrionario. El día E13.5 todas las células de la bolsa de Rathke expresan Prop-1 que tendría un rol regulador en la organogénesis pituitaria y en la conversión al linaje de células Pit-1 en ratones (Yoshida y col., 2009). También se ha hallado Prop-1 en el desarrollo temprano de la pituitaria de peces (Angotzi y col., 2011). Se estudió la proliferación en las células progenitoras indicando la expresión de un nuevo marcador denominado nestin. Las células nestin+ se hallaron en todas las etapas del desarrollo pituitario y transfirieron células de los sistemas Prop-1 y Pit-1 (Yoshida y col., 2013). Las mutaciones en Prop-1 expresan la causa más común de deficiencia de las hormonas pituitarias en seres humanos. Dichas mutaciones determinan el fracaso de la transcripción del Pit-1 (Davis y col., 2016).

Pit-1: aparece en la bolsa de Rathke y permite la diferenciación de tres tipos celulares pituitarios: somatotropas, lactotropas y tirotropas. Originalmente, fue identificado como el factor controlador de la expresión de los genes de GH y PRL. La transcripción de PRL está controlada por una serie

Prop-1: it is expressed in Rathke's pouch and activates Pit-1. Prop-1 is essential for the production of gonadotropins in mammals. Transgenic mice with over expression of Prop-1 gonadotrope and thyrotrope cells present a clinical profile of hypogonadotropic hypogonadism, with a higher risk of developing pituitary adenomas. It was suggested that the variation in the expression of Prop-1 could affect growth acceleration and pubertal onset in human beings (Vesper et al., 2006). Defective (mutant) genes were studied in Prop-1 and Pou1F1 transcription factors in order to clarify the pathways that regulate the passage from proliferation to pituitary cell differentiation. These experimental models detected the expression of the genes involved in hyperplasia, adenomas and the process of tumorigenesis (Davis et al., 2009). Prop-1 is a specific pituitary factor that coexists with Sox-2 and induces cells Pit-1. It is expressed in stem cells Sox-2 since the embryonic period. On day E13.5 all of Rathke's pouch cells express Prop-1, which would have regulating function in the pituitary organogenesis and in the conversion to Pit-1 cell line in mice (Yoshida et al., 2009). Prop-1 has also been found in the early development of the pituitary gland in fish (Angotzi et al., 2011). Proliferation in progenitor cells has been studied, thus indicating the expression of a new marker known as nestin. Nestin+ cells were found in all the stages of the pituitary development and transferred cells from Prop-1 system, as well as Pit-1 cells (Yoshida et al., 2013). Mutations in Prop-1 are the most common known cause of combined pituitary hormone deficiency in humans. These mutations result in the failure to initiate transcription of Pit-1 (Davis y col., 2016).

Pit-1: it expresses in Rathke's pouch and allows of three pituitary cell types: somatotropes, lactotropes and thyrotropes. Originally, it was identified as the controlling factor of GH and PRL genes expression. Transcription of PRL is controlled by a series of distal and proximal stimulators that contain several binding sites for Pit-1 in cooperation with the nuclear receptor of estrogens. Binding with Pit-1 is also required for the expression of the proximal promoter of gene GH in somatotro-

de estimuladores distales y proximales que contienen varios sitios de unión para el Pit-1 en cooperación con el receptor nuclear de estrógenos. También se requiere unión con Pit-1 para la expresión del promotor proximal del gen de GH en las somatotropas. Además, el Pit-1 responde a cascadas de señales y colabora con otros factores para la expresión de múltiples genes (Dasen y Rosenfeld, 1999c). El microARN26b modula la expresión del factor de transcripción Pit-1, inhibiendo el Lef-1 (Zhang y col., 2010). El linaje tirotrópico puede ser Pit-1 independiente o dependiente (Lin y col., 1994).

GATA-2: la expresión dorsal de GATA-2 es suficiente para convertir todas las líneas Pit-1 en gonadotropas. La familia GATA es esencial en los procesos de diferenciación celular y en la expresión de las gonadotropinas. El GATA-2 y el GATA-4 aumentan significativamente la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) mediada por el gen promotor del polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitario (PACAP) en la línea celular gonadotropa LH β y L β T2. Esto prueba la interacción entre GnRH y GATA en la expresión de PACAP1 para regular la función de la población gonadotropa (Lo y col., 2011; Thomas y col., 2013). Kim y col. (2011) han diseñado modelos pituitarios celulares transfiriendo un antígeno retroviral T para inmortalizar un cultivo celular primario a partir de un ratón adulto. Al exponerlo a PACAP se han logrado células gonadotropas que expresaron ARNmLH/FSH. El Pit-1 colabora funcionalmente con GATA-2 para estimular la transcripción del gen de la β TSH. Los dos tipos celulares ventrales surgen de un origen ancestral común y expresan una serie de factores inducidos por el gradiente ventro-dorsal de BMP-2. Hay Pit-1 en las tirotropas y está ausente en las gonadotropas. La expresión ventral de Pit-1 es suficiente para convertir las gonadotropas en tirotropas *in vivo* (Dasen y Rosenfeld, 1999c). Pit-1 y GATA-2 se co-expresan únicamente en las células tirotropas y se requieren múltiples dominios de Pit-1 para la plena sinergia con GATA-2 (Gordon y col., 2002). Los cuatro tipos de células pituitarias ventrales estuvieron mediados por interacciones recíprocas de Pit-1 y GATA-2 (Dasen y col., 1999c). El estudio de Zhang y col. (2010) demostró que los microARN fueron críticos para regular el desarrollo

pes. Moreover, Pit-1 responds to signal cascades and collaborates with other factors for the expression of multiple genes (Dasen and Rosenfeld, 1999c). The work by Zhang et al. (2010) showed that microARNs were critical for the regulation of the anterior pituitary development and that microARN26b would regulate Pit-1 expression when inhibiting the lymphoid enhancer-binding factor-1 (Lef-1), promoting the differentiation lineage Pit-1. The thyrotrope lineage can be Pit-1 either independent or dependent (Lin et al., 1994).

GATA-2: the dorsal expression of GATA-2 is sufficient to convert all the Pit-1 lineages in gonadotropes. GATA family is essential in the processes of cell differentiation and in the expression of gonadotropins. GATA-2 and GATA-4 significantly increase the stimulation of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) mediated by the promoter gene of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the LH β and L β T2 gonadotrope cell lineage. This proves the interaction between GnRH and GATA in PACAP1 expression to regulate the gonadotrope population function (Lo et al., 2011; Thomas et al., 2013). Kim et al. (2011) have designed pituitary cell models by transferring a retroviral antigen of T in order to immortalize a primary cell culture from an adult mouse. After it is exposed to PACAP gonadotropes expressing ARNmLH/FSH were obtained. Pit-1 collaborates functionally with GATA2 to stimulate β TSH transcription gene. The two ventral cell types have a common ancestral origin and express a series of factors induced by the ventral-dorsal gradient of BMP-2. There is Pit-1 in thyrotropes but it is absent in gonadotropes. The ventral expression of Pit-1 is sufficient to convert gonadotropes into thyrotropes *in vivo* (Dasen and Rosenfeld, 1999c). Pit-1 and GATA-2 co-express only in thyrotropes. Multiple Pit-1 domains are required for complete synergy with GATA-2 (Gordon et al., 2002). The four types of ventral pituitary cells were mediated by reciprocal interactions of Pit-1 and GATA-2 (Dasen et al., 1999c).

Pax-6: it is essential for establishing the boundaries of the ventral-dorsal cells in the development of the pituitary gland. The transitory expression of dorsal Pax-6 is the key to establish the dorsal and ventral

de la hipófisis anterior y que el microARN26b regularía la expresión del Pit-1 al inhibir el factor potenciador linfoide (Lef-1), promoviendo el linaje de diferenciación Pit-1.

Pax-6: es esencial para el establecer los límites entre las celdas ventral y dorsal en el desarrollo de la pituitaria. La expresión transitoria de Pax-6 dorsal es clave para determinar las poblaciones dorsales y ventrales, basado en la inhibición de las señales ventrales de Shh (Walther y Gruss, 1991; Kiousi y col., 1999).

Prx1 y Prx2: se han investigado sus perfiles ontogénicos en pituitarias de embriones de rata, hallando su presencia en células madre de la bolsa de Rathke en el día E13.5, con incremento en los lóbulos anterior e intermedio el día E16.5. Se detectaron células Prop-1 y Sox-2 negativas/ Prx positivas en el lóbulo anterior. Una parte de estas últimas células co-expresó todos los tipos de hormonas. Este ha sido el primer informe de la participación de los Prx-1 y Prx-2 en la organogénesis del tejido originario del ectodermo (Susa y col., 2012).

Sox-2: se observaron cinco tipos celulares que expresaron Sox-2, Prop-1 y Prx en la estructura tridimensional de la pituitaria de rata del día E21.5, realizadas a partir de mediciones en las numerosas secciones de tejidos teñidas con DAPI. En el lóbulo anterior, las células marginales fueron ocupadas por células madre Sox-2+, con co-expresión de Prop-1 y/o Prx. Las células sólo Sox-2+ estuvieron esparcidas en todo el parénquima. Las células Prx mesenquimáticas, junto con nestin+, determinaron vasculogénesis (Yako y col., 2013). La señalización de Notch en la pituitaria se ha relacionado con la expresión de Prop-1 que sería clave para el mantenimiento de la proliferación post-natal (Nantie y col., 2014). Además, se ha estudiado la capacidad de regeneración de la hipófisis adulta mediante un modelo de ratón transgénico con capacidad para destruir el linaje somatotropo usando toxina diftérica. La respuesta a la lesión activó a las células madre con aumento del Sox-2 y a las células folículo-estelares (FE) y hubo regeneración de las somatotropas (Fu y col., 2012). Los estudios sobre células madre en la glándula pituitaria muestran el papel esencial desempeñado por el factor de transcripción

populations, based on the inhibition of the ventral signals of Shh (Walther and Gruss, 1991; Kiousi et al., 1999).

Ptx1 and Pitx2: they are formed in the oral ectoderm and in the Rathke's pouch. Pitx-1 mediates Pit-1 and the proopiomelanocortin (POMC) gene promoter. The alteration of Pitx-1 leads to a lesser expression in the differentiation of the gonadotrope and thyrotrope markers (Dasen and Rosenfeld, 1999c). The PRL promoter is activated by these factors (Quentin et al., 2002) and the identification of Pitx2 would be the basis for studying the PRL expression (Quentin et al., 2010).

Prx1 and Prx2: their ontogenic profiles have been studied in pituitaries of rat embryos and found in stem cells of Rathke's pouch on day E13.5, with an increase in E16.5 at the level of the anterior and intermediate lobes. Negative Prop-1 and Sox-2/ positive Prx cells were detected in the anterior lobe. Some of these cells co-expressed all the hormone types. This has been the first record of Prx-1 and Prx-2 participation in the organogenesis of the original tissue of the ectoderm (Susa et al., 2012).

Sox2: five cell types were observed to express Sox-2, Prop-1 and Prx by a three-dimension structure of the pituitary of rats on day E21.5 and they were constructed according to the measures obtained from numerous sections dyed with DAPI. The anterior lobe of the marginal cells was occupied by Sox-2+ stem cells, with co-expression of Prop-1 and/or Prx and only Sox-2+ cells were found spread through the whole parenchyma. Mesenchymal Prx cells together with nestin+ determined vasculogenesis (Yako et al., 2013). Notch signaling in postnatal pituitary has been related to Prop-1 expression. Notch would be a key element for maintaining postnatal proliferation (Nantie et al., 2014). Moreover, the regeneration capacity of the adult pituitary gland has been studied using a model of transgenic mouse with capacity to destroy the somatotrope lineage by using diphtheria toxin. The response to the injury activated the stem cells with an increased Sox-2 and the folliculo-stellate cells (FS) and there was regeneration of somatotropes (Fu et al., 2012). The studies on stem cells in the pituitary gland evidenced the essential role of the

Sox-2, permitiendo clarificar los procesos de embriogénesis y tumorigénesis (Vankelecom y Gremeaux, 2010; Vankelecom y Chen, 2014). Se han identificado los marcadores de las células madre y los factores de transcripción de los diferentes tipos de células productoras de hormonas. Además, se detectaron genes que determinarían la aparición de hipoplasia pituitaria, neoplasia familiar endócrina y adenomas pituitarios.

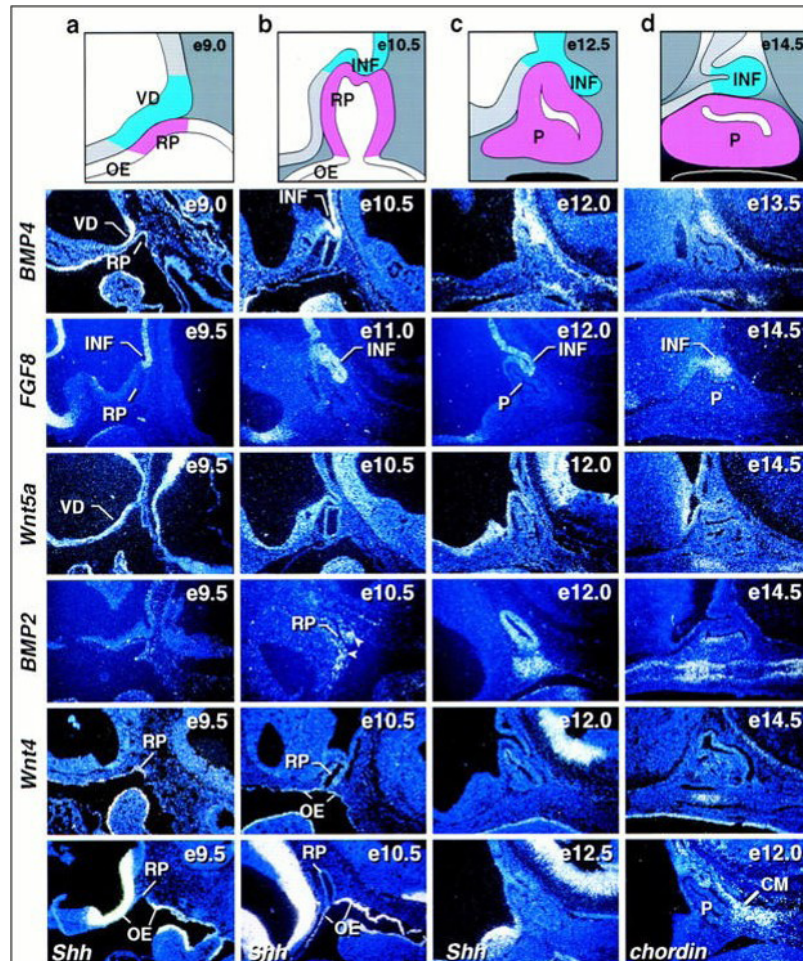


Fig. 1.6. Moléculas de señalización (Treier y col., 1998).

transcription factor Sox-2, allowing the clarification of the embryogenesis and tumorigenesis processes (Vankelecom and Gremeaux, 2010; Vankelecom and Chen, 2014). The stem cell markers and the transcription factors of the different hormone producing cell types have been identified. And genes that would determine the appearance of pituitary hypoplasia, familial endocrine neoplasia and pituitary adenomas have

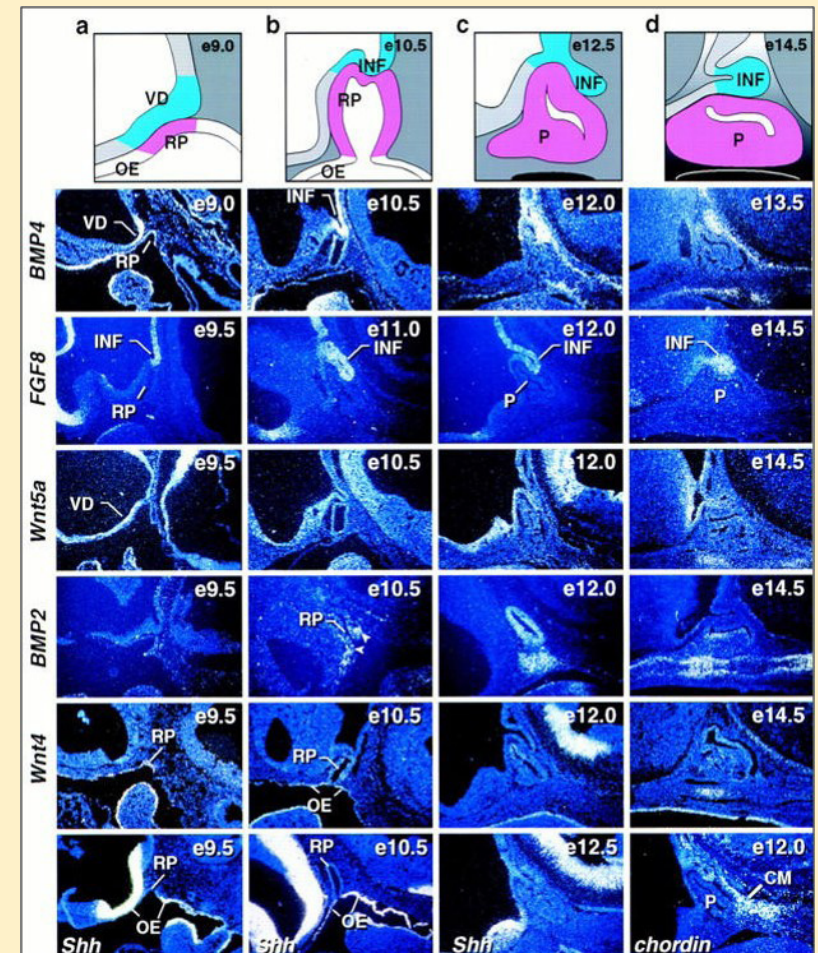


Fig. 1.6. Signalling molecules in early pituitary development (Terrier et al., 1998).

Esto abre nuevas perspectivas para el conocimiento de dichos procesos a nivel molecular (Davis y col., 2013).

INSM1: se ha documentado un factor INSM1 que actuaría a nivel transcripcional controlando la diferenciación de las células endócrinas pituitarias y requeriría un dominio Capturar para ejercer la función *in vivo* (Welcker y col., 2013).

Treier y col. (1998) investigaron la expresión de las moléculas de señalización durante el desarrollo pituitario del ratón (**fig. 1.6**).

La **fig. 1.7** muestra la inhibición de la diferenciación de las poblaciones pituitarias por acción prolongada de la BMP en embriones de ratones transgénicos α GSO-BMP4 (E17 días).

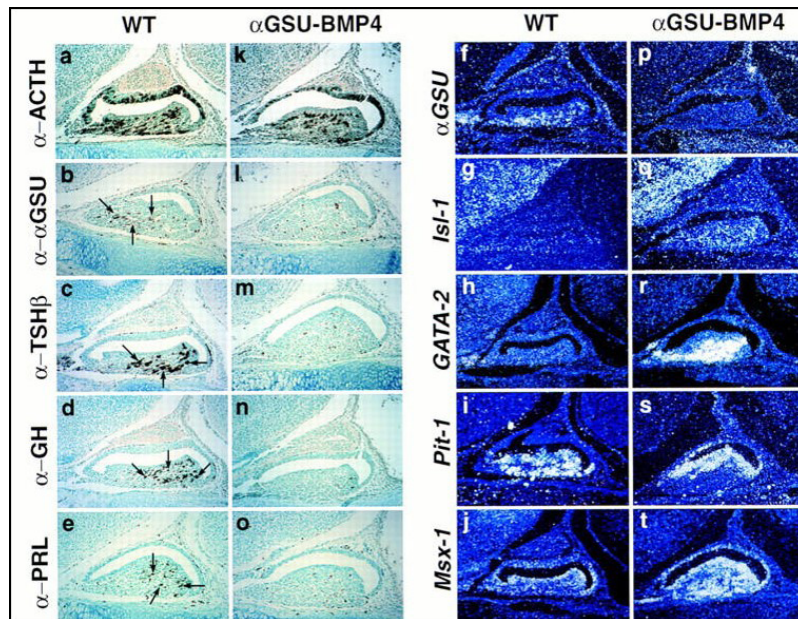


Fig. 1.7. Poblaciones adenohipofisarias y factores de transcripción en ratones transgénicos GSO-BMP4 de E17 días. Panel izquierdo: a-e: controles y k-o: experimentales. INF: infundíbulo, RP: Bolsa de Rathke, OE: ectodermo oral, VD: diencefalo ventral, P: pituitaria (Treier y col., 1998).

been detected. This opens up new perspectives for the knowledge of those processes at molecular level (Davis et al., 2013).

INSM1: it has been documented to operate at transcription level by controlling the differentiation of the pituitary endocrine cells and would require a CAPTURAR domain to function *in vivo* (Welcker et al., 2013).

Treier et al. (1998) investigated the expression of the signaling molecules during early pituitary development in mice (**fig. 1.6**).

Fig. 1.7 shows the inhibition of the differentiation in the adenohipophyseal populations produced by the extended action of BMP in embryos of α GSO-BMP4 transgenic mice E 17 days old.

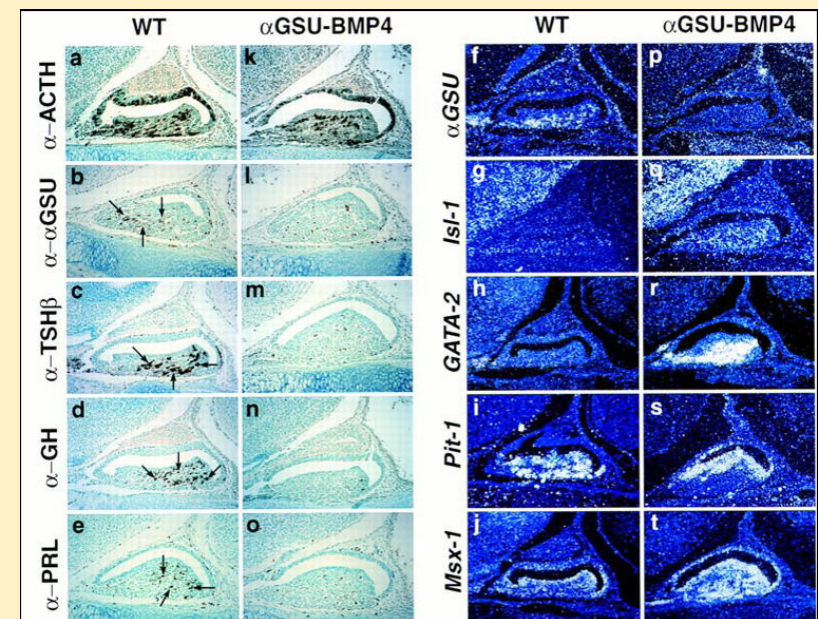


Fig. 1.7. Adenohipofyseal populations and transcription factors in GSO-BMP4 transgenic mice E17 days old. Left screen: a-e: control and k-o: experimental. INF: infundibulum, RP: Rathke's pouch, OE: oral ectoderm, VD: ventral diencephalon, P: pituitary gland (Terrier et al., 1998).

Los fenotipos celulares son establecidos como resultado de la expresión superpuesta de patrones con 2 o más factores. El código combinado involucra la inducción de homeodominios conteniendo factores que incluyen miembros de las familias Otx (Pitx-1, Pitx-2), Lim (Lhx3, Lhx4, Isl-1), Pax (Pax-6), sin oculis (Six-1, six-3), apareados (Prop-1, rpx) y POU (Pit-1, Brn-4). Los eventos de señales establecen “memorias moleculares” en los programas de transcripción que gobiernan la diferenciación de los tipos celulares pituitarios (Dasen y Rosenfeld, 1999a). Además, la embriogénesis permite inferir el desarrollo de las anomalías congénitas y de los adenomas pituitarios. Los estudios con ratones modificados genéticamente permitieron comprender las mutaciones determinantes del cuadro clínico observado en los pacientes (Davis y col., 2010).

Referencias

- Angotzi AR, Munkadee S, Stefansson S, Male R, Chourrout D. Involvement of Prop 1 homeobox in the early development of fish pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 171(3):332-340.
- Basler K, Struhl G. Compartment boundaries and control of Drosophila limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 1994; 368:208-214.
- Bazina M, Vukojevic K, Roje D, Saraga-Babic M. Influence of growth and transcriptional factors, and signaling molecules on early human pituitary development. *J Mol Histol* 2009; 40(2):277-286.
- Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. Genealogy of anterior pituitary gland: tracing a family tree. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 343-352.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes & Dev* 1997; 11:3286-3305.
- Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP. Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in fetal hypophysis of the rat: influence of hypothalamus. *Cell Tissue Res* 1979; 196:409-427.

Cell phenotypes are established as a result of the juxtaposed expression of patterns of 2 or more factors. The combined code involves the induction of homeodomains containing factors that include members of the families Otx (Pitx-1, Pitx-2), Lim (Lhx3, Lhx4, Isl-1), Pax (Pax-6), sine oculis (Six-1, six-3), paired (Prop-1, rpx) and POU (Pit-1, Brn-4). Signalling events establish “molecular memories” in the transcription factor programs that regulate the differentiation of the pituitary cell types (Dasen and Rosenfeld, 1999a). Besides, embryogenesis allows inferring the abnormal development of congenital anomalies and adenomas. Studies with genetically modified mice allowed understanding the mutations that determine the clinical profile observed in patients (Davis et al., 2010).

References

- Angotzi AR, Munkadee S, Stefansson S, Male R, Chourrout D. Involvement of Prop 1 homeobox in the early development of fish pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 171(3):332-340.
- Basler K, Struhl G. Compartment boundaries and control of Drosophila limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 1994; 368:208-214.
- Bazina M, Vukojevic K, Roje D, Saraga-Babic M. Influence of growth and transcriptional factors, and signalling molecules on early human pituitary development. *J MolHistol* 2009; 40(2):277-286.
- Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. Genealogy of anterior pituitary gland: tracing a family tree. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 343-352.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes & Dev* 1997; 11:3286-3305.
- Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP. Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in foetal hypophysis of the rat: influence of hypothalamus. *Cell Tissue Res* 1979; 196:409-427.

Cónsole GM, Gómez Dumm CLA. Histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructura de la adenohipófisis. *Temas de Histología y Embriología animal*. En: ed. Inarbite, Buenos Aires, 1997; 2:153-173.

Crossley PH, Martin GR. Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 1995; 121:439-451.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Combinatorial codes in signaling and synergy: lessons from pituitary development. *Curr Opin Genet Dev* 2001a; 9(5):566-574.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:327-355.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Biol Curr Opin Cell* 1999b; 11:669-677.

Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hosshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Reciprocal interactions of Pit-1 and GATA-2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 1999c; 97(5):587-598.

Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhorld IJ, Mendonca BB, Brue T, Camper SA. Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: in search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323(1):4-19.

Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millán MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Camper SA. Pituitary gland development and disease from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* 2013; 106:1-47.

Davis SW, Keisler JL, Pérez Millán MI, Schade V, Camper SA. All hormone-producing cell types of pituitary intermediate and anterior lobes derive from Prop-1-expressing progenitors. *Endocrinology* 2016; 157(4):1385-1396.

Davis SW, Potok MA, Brinkmeier ML, Carninci P, Lyons RH, MacDonald JW, Fleming MT, Mortensen AH, Egashira N, Ghosh D,

Cónsole GM, Gómez Dumm CLA. Histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructura de la adenohipófisis. *Temas de Histología y Embriología animal*. En: ed. Inarbite, Buenos Aires, 1997; 2:153-173.

Crossley PH, Martin GR. Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 1995; 121:439-451.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Combinatorial codes in signaling and synergy: lessons from pituitary development. *Curr Opin Genet Dev* 2001a; 9(5):566-574.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:327-355.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Biol Curr Opin Cell* 1999b; 11:669-677.

Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hosshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Reciprocal interactions of Pit-1 and GATA-2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 1999c; 97(5):587-598.

Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhorld IJ, Mendonca BB, Brue T, Camper SA. Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: in search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323(1):4-19.

Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millán MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Camper SA. Pituitary gland development and disease from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* 2013; 106:1-47.

Davis SW, Keisler JL, Pérez Millán MI, Schade V, Camper SA. All hormone-producing cell types of pituitary intermediate and anterior lobes derive from Prop-1-expressing progenitors. *Endocrinology* 2016; 157(4):1385-1396.

Davis SW, Potok MA, Brinkmeier ML, Carninci P, Lyons RH, MacDonald JW, Fleming MT, Mortensen AH, Egashira N, Ghosh D,

- Steel KP, Osamura RY, Hayashizaki Y, Camper SA. Genetics, genes expression and bioinformatics of pituitary gland. *Horm Res* 2009; 71(Suppl 2):101-115.
- de Moraes DC, Vaisman M, Conceicao FL, Ortiga-Carvalho TM. Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. *J Endocrinol* 2012; 215(2):239-245.
- Dubois PM, ElAmraoui A. Embryology of pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6:1-7.
- Dubois PM, Hemming FJ. Fetal development and regulation of pituitary cell types. *J Electron Microscop Tech* 1991; 19:2-20.
- Ericsson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998; 125(6):1005-15.
- Fu Q, Gremeaux L, Luque RM, Liekens D, Chen J, Buch T, Waisman A, Kineman R, Vankelecom H. The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable regeneration. *Endocrinology* 2012; 153(7):3224-35.
- Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition*. 1993; 10-017-A-10, 24 pp.
- Gómez Dumm CLA y col. *Texto y Atlas de Embriología*. En: ed. El Ateneo, Buenos Aires, 2003; 429 pg
- Gómez Dumm CLA. *Atlas de Embriología Humana*. En: ed. Celsius, Buenos Aires, 1978; 287 pg.
- Gordon DF, Woodmansee WW, Black JN, Dowding JM, Bendrick-Pearl J, Wood WM, Ridway CE. Domains of Pit-1 required for transcriptional synergy with GATA-2 on the beta gene. *Endocrinol Cell Mol* 2002; 196(1-2):53-66.
- Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins. *Genes & Dev* 1996; 10:1580-94.
- Ikeda H, Susuki J, Sasano N, Niizuma H. The development and morphogenesis of the pituitary gland. *Anat Embryol* 1988; 178:327-336.

- Steel KP, Osamura RY, Hayashizaki Y, Camper SA. Genetics, genes expression and bioinformatics of pituitary gland. *Horm Res* 2009; 71(Suppl 2):101-115.
- de Moraes DC, Vaisman M, Conceicao FL, Ortiga-Carvalho TM. Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. *J Endocrinol* 2012; 215(2):239-245.
- Dubois PM, ElAmraoui A. Embryology of pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6:1-7.
- Dubois PM, Hemming FJ. Fetal development and regulation of pituitary cell types. *J Electron Microscop Tech* 1991; 19:2-20.
- Ericsson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998; 125(6):1005-15.
- Fu Q, Gremeaux L, Luque RM, Liekens D, Chen J, Buch T, Waisman A, Kineman R, Vankelecom H. The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable regeneration. *Endocrinology* 2012; 153(7):3224-35.
- Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition*. 1993; 10-017-A-10, 24 pp.
- Gómez Dumm CLA y col. *Texto y Atlas de Embriología*. En: ed. El Ateneo, Buenos Aires, 2003; 429 pg
- Gómez Dumm CLA. *Atlas de Embriología Humana*. En: ed. Celsius, Buenos Aires, 1978; 287 pg.
- Gordon DF, Woodmansee WW, Black JN, Dowding JM, Bendrick-Pearl J, Wood WM, Ridway CE. Domains of Pit-1 required for transcriptional synergy with GATA-2 on the beta gene. *Endocrinol Cell Mol* 2002; 196(1-2):53-66.
- Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins. *Genes & Dev* 1996; 10:1580-94.
- Ikeda H, Susuki J, Sasano N, Niizuma H. The development and morphogenesis of the pituitary gland. *AnatEmbryol* 1988; 178:327-336.

Jones CM, Lyons KM, Hogan BLM. Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 1991; 111:531-542.

Kelberman D, Dattani MT. Role of transcription factors in midline central nervous system and pituitary defects. *Endocr Dev* 2009a; 14:67-82.

Kelberman D, Dattani MT. The role of transcription factors in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. *Ann Med* 2006; 38(8): 560-577.

Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation on pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 2009b; 30(7):790-829.

Kim GL, Wang X, Chalmers JA, Thompson DR, Dhullon SS, Kotelar MM, Belsham DD. Generation of immortal cell lines from the adult pituitary. Role of cAMP on differentiation of AOX-2 expressing progenitor cells to mature gonadotropes. *PLoS One* 2011; 6(11):27799.

Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(25):14378-82.

Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 1994; 120:515-522.

Lo A, Zheng W, Gong Y, Crochet JR, Halvorson LM. GATA transcription factors regulate LH β gene expression. *J Mol Endocrinol* 2011; 47(1):45-58.

Müller F and O' Rahilly R. The human brain at stage 16, including the initial evagination of neurohypophysis. *Anat Embryol* 1989; 179:551-569.

Nantie LB, Himes AD, Getz DR, Raetzman LT. Notch signaling pituitary expansion: proliferation, progenitors and cell specification. *Mol Endocrinol* 2014 28(5):731-744.

Nassiri F, Cusimano M, Zuccato JA, Mohamed S, Rotondo F, Horvath E, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Pituitary stem cells: candidates and implications. *Pituitaria* 2013; 16(3):413-418.

Jones CM, Lyons KM, Hogan BLM. Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 1991; 111:531-542.

Kelberman D, Dattani MT. Role of transcription factors in midline central nervous system and pituitary defects. *Endocr Dev* 2009a; 14:67-82.

Kelberman D, Dattani MT. The role of transcription factors in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. *Ann Med* 2006; 38(8): 560-577.

Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation on pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 2009b; 30(7):790-829.

Kim GL, Wang X, Chalmers JA, Thompson DR, Dhullon SS, Kotelar MM, Belsham DD. Generation of immortal cell lines from the adult pituitary. Role of cAMP on differentiation of AOX-2 expressing progenitor cells to mature gonadotropes. *PLoS One* 2011; 6(11):27799.

Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(25):14378-82.

Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 1994; 120:515-522.

Lo A, Zheng W, Gong Y, Crochet JR, Halvorson LM. GATA transcription factors regulate LH β gene expression. *J Mol Endocrinol* 2011; 47(1):45-58.

Müller F and O' Rahilly R. The human brain at stage 16, including the initial evagination of neurohypophysis. *Anat Embryol* 1989; 179:551-569.

Nantie LB, Himes AD, Getz DR, Raetzman LT. Notch signaling pituitary expansion: proliferation, progenitors and cell specification. *Mol Endocrinol* 2014 28(5):731-744.

Nassiri F, Cusimano M, Zuccato JA, Mohamed S, Rotondo F, Horvath E, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Pituitary stem cells: candidates and implications. *Pituitaria* 2013; 16(3):413-418.

Nemeskeri A, Nemeth A, Setalo G, Vigh S, Halasz B. Cell differentiation of the fetal anterior pituitary in vitro. *Cell Tissue Res* 1976; 170:263-273.

Núñez L, Villalobos C, Senovilla L, García-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 15:835-843.

Pfaffle R, Klammt J. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(1):43-60.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86:589-598.

Pope C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol* 2006; 297(1):172-181.

Quentin MH, Barlier A, Franc JL, Pellegrini I, Brue T, Enjalbert A. Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J Neuroendocrinol* 2006; 18(9):633-642.

Quentin MH, Manfroid I, Moncet D, Gunz T, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I. Pitx factors involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem* 2002; 277(46):44408-16.

Quentin MH, Vieira V, Menasche M, Dufier JL, Herman JP, Enjalbert A, Abitbol M, Brue T. Truncation of PITX2 differentially affects its activity on physiological targets. *J Mol Endocrinol* 2010; 46(1):9-19.

Rosenfeld MG, Briata P, Dasen J, Gleiberman AS, Kioussi C, Lin C, O'Connell SM, Ryan A, Szeto DP, Treier M. Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55:1-13.

Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet* 1999; 15:236-240.

Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 1997; 278:1809-12.

Nemeskeri A, Nemeth A, Setalo G, Vigh S, Halasz B. Cell differentiation of the fetal anterior pituitary in vitro. *Cell Tissue Res* 1976; 170:263-273.

Núñez L, Villalobos C, Senovilla L, García-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 15:835-843.

Pfaffle R, Klammt J. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(1):43-60.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86:589-598.

Pope C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol* 2006; 297(1):172-181.

Quentin MH, Barlier A, Franc JL, Pellegrini I, Brue T, Enjalbert A. Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J Neuroendocrinol* 2006; 18(9):633-642.

Quentin MH, Manfroid I, Moncet D, Gunz T, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I. Pitx factors involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem* 2002; 277(46):44408-16.

- Quentin MH, Vieira V, Menasche M, Dufier JL, Herman JP, Enjalbert A, Abitbol M, Brue T. Truncation of PITX2 differentially affects its activity on physiological targets. *J Mol Endocrinol* 2010; 46(1):9-19.

Rosenfeld MG, Briata P, Dasen J, Gleiberman AS, Kioussi C, Lin C, O'Connell SM, Ryan A, Szeto DP, Treier M. Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Recent ProgHorm Res* 2000; 55:1-13.

Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet* 1999; 15:236-240.

Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 1997; 278:1809-12.

Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H. Specification of pituitary cell lineages by LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 1996; 272:1004-07.

Susa T, Kato T, Yoshida S, Yako H, Higuchi M, Kato Y. Paired-related homedomain proteins PRX1 and PRX2 are expressed in embryonic pituitary stem/progenitor cells and may be involved in the early stage pituitary differentiation. *J Neuroendocrinol* 2012; 24(9):1201-12.

Thomas RL, Crawford NM, Grafer CM, Zheng W, Halvorson LM. GATA augments GnRH-mediated increases in Adcyap1 gene expression in pituitary gonadotrope cells. *J Mol Endocrinol* 2013; 51(3):313-324.

Treier M, Rosenfeld M. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:833-843.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, Mc Mahon JA, Rosenfeld MG. Multiple signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 1998; 12(11):1691-1704.

Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahan AP, Rosenfeld MG. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 2001; 128(3):377-386.

Vankelecom H and Chen J. Pituitary stem cells: Where do we stand? *Endocrinol Cell Mol* 2014; 385(1-2):2-17.

Vankelecom H and Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):478-488.

Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA. Role of prophet pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 2006; 147(4):1654-63.

Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287(6):1166-70.

Walther C and Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; 113(4):1435-49.

Watanabe YG. An organ culture study on the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 227:267-275.

Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H. Specification of pituitary cell lineages by LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 1996; 272:1004-07.

Susa T, Kato T, Yoshida S, Yako H, Higuchi M, Kato Y. Paired-related homedomain proteins PRX1 and PRX2 are expressed in embryonic pituitary stem/progenitor cells and may be involved in the early stage pituitary differentiation. *J Neuroendocrinol* 2012; 24(9):1201-12.

Thomas RL, Crawford NM, Grafer CM, Zheng W, Halvorson LM. GATA augments GnRH-mediated increases in Adcyap1 gene expression in pituitary gonadotrope cells. *J Mol Endocrinol* 2013; 51(3):313-324.

Treier M, Rosenfeld M. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:833-843.

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, Mc Mahon JA, Rosenfeld MG. Multiple signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 1998; 12(11):1691-1704.

Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahan AP, Rosenfeld MG. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 2001; 128(3):377-386.

Vankelecom H and Chen J. Pituitary stem cells: Where do we stand? *Endocrinol Cell Mol* 2014; 385(1-2):2-17.

Vankelecom H and Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):478-488.

Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA. Role of prophet pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 2006; 147(4):1654-63.

Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287(6):1166-70.

Walther C and Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; 113(4):1435-49.

Watanabe YG. An organ culture study on the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 227:267-275.

Watkins DE, Camper SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends Genet* 1998; 14:284-290.

Welcker JE, Hernández-Miranda LR, Paul FE, Jia S, Ivanov A, Selbach M, Birchmeier C. *Insm1* controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and recruitment of histone-modifying factors. *Development* 2013; 140(24):4947-58.

Yako H, Kato T, Yoshida S, Higuchi M, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y. Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary is before birth. *Cell Tissue Res* 2013; 354(3):837-847.

Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Yako H, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y. Rapid transition of NESTIN-expressing dividing cells from PROP-1positive to PIT-positive advances prenatal pituitary development. *J Neuroendocrinol* 2013; 25(9):779-791.

Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai LY, Nakayama M, Kato Y. PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(1):11-15.

Zhang Z, Florez S, Gutiérrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA. MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem* 2010; 285(45):34718-28.

Watkins DE, Camper SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends Genet* 1998; 14:284-290.

Welcker JE, Hernández-Miranda LR, Paul FE, Jia S, Ivanov A, Selbach M, Birchmeier C. *Insm1* controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and recruitment of histone-modifying factors. *Development* 2013; 140(24):4947-58.

Yako H, Kato T, Yoshida S, Higuchi M, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y. Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary is before birth. *Cell Tissue Res* 2013; 354(3):837-847.

Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Yako H, Chen M, Kanno N, Ueharu H, Kato Y. Rapid transition of NESTIN-expressing dividing cells from PROP-1positive to PIT-positive advances prenatal pituitary development. *J Neuroendocrinol* 2013; 25(9):779-791.

Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai LY, Nakayama M, Kato Y. PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(1):11-15.

Zhang Z, Florez S, Gutiérrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA. MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem* 2010; 285(45):34718-28.

CAPÍTULO 2

Morfología de la glándula hipofisaria

1. Anatomía hipofisaria

La **hipófisis (pituitaria)** cumple una función integradora neuroendocrina a la manera de una directora de orquesta endocrina y regula las glándulas endocrinas periféricas y los tejidos blanco hormono-dependientes, actuando sobre el metabolismo, la reproducción y el crecimiento tisular. La glándula pituitaria recibió dicho nombre por su conexión con la región nasofaríngea. Los griegos creyeron que las flemas del cerebro que salían por la nariz provenían de la pituitaria.

Está localizada en la zona central de la base del cerebro y se halla alojada en una concavidad del hueso esfenoides denominada **silla turca**. Está revestida por la duramadre que le forma una cápsula en la porción intraselar y una cubierta superior o **diafragma selar** por donde transcurre el **tallo infundibular** que la une al cerebro. En el humano, mide aproximadamente 13 mm en sentido transversal, 9 mm en su diámetro anteroposterior y 6-9 mm de alto. Pesa 500 a 900 mg en el adulto, con in-

CHAPTER 2

Morphology of the pituitary gland

1. Anatomy of the pituitary gland

The **pituitary gland (pituitary)** has a neuroendocrine integration function and it works like an endocrine orchestra director. It regulates the peripheral endocrine glands and the hormone-dependent target tissues, acting upon the metabolism, reproduction and tissue growth. The pituitary gland received such name due to its connection with the nasopharyngeal region. The Greeks believed that the brain phlegm coming out of the nose came from the pituitary.

It is located in the central zone of the brain base and lies within a cavity of the sphenoid bone known as the **sella turcica**. It is covered by the dura mater, which forms a capsule in the **intrasellar portion** and a superior cover that constitutes the **sellar diaphragm** through which the **infundibular stalk** connecting it to the brain runs. In human beings it is approximately 13 mm in a cross-wise fashion, 9 mm in its anteroposterior diameter and 9 mm high. It weighs 500 to 900 mg in adults,

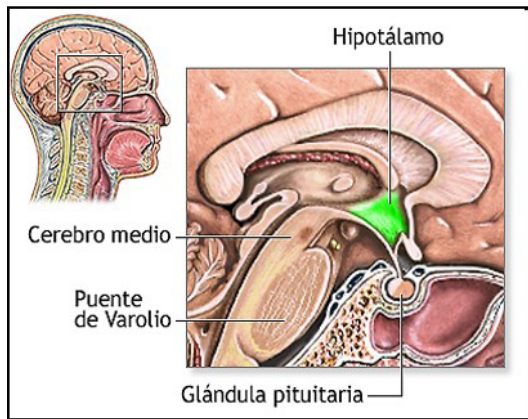


Fig. 2.1 Glándula pituitaria: nml.nih.gov/medlineplus/spanish.

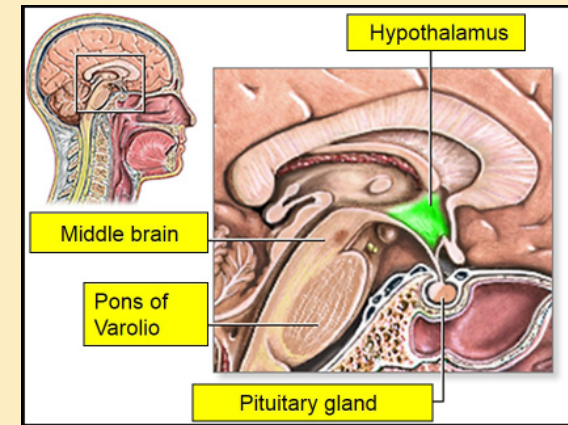


Fig. 2.1 Pituitary gland: nml.nih.gov/medlineplus/spanish

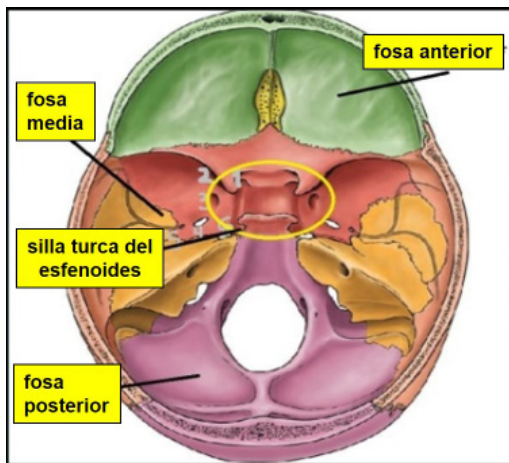


Fig. 2.2 Silla turca en el hueso esfenoides: www.slideshare.

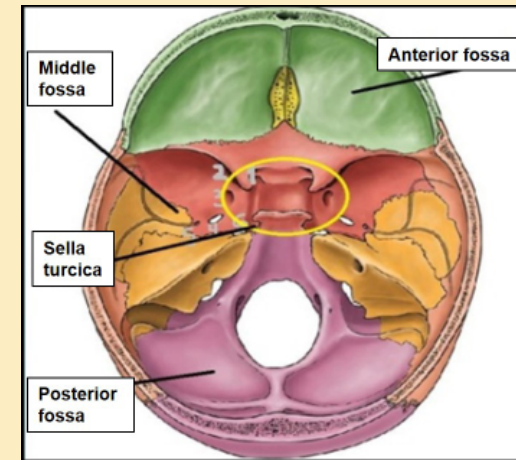


Fig. 2.2 Sella turcica in the sphenoid bone: www.slideshare.

crecimiento en los períodos de gestación/lactancia y durante los procesos patológicos (hiperplasia/tumores) (Fig. 2.1).

En la fig. 2.2 se presenta la fosa hipofisaria o silla turca del esfenoides.

Silla turca o fosa hipofisaria: hipófisis intraselar: presenta los lóbulos anterior, intermedio y posterior. La **hipófisis supraselar** contiene el tallo hipofisario con el tallo infundibular y la *pars tuberalis*.

increasing in gestation/breastfeeding periods and during the pathologic process (hyperplasia/tumors) (fig. 2.1).

In fig. 2.2 the **hypophyseal fossa** or **sella turcica** of the sphenoid bone is shown.

Contents of the hypophyseal fossa: intrasellar pituitary gland: anterior, intermediate and posterior lobes. **Suprasellar pituitary gland:** hypophyseal stalk: infundibular stalk and *pars tuberalis*.

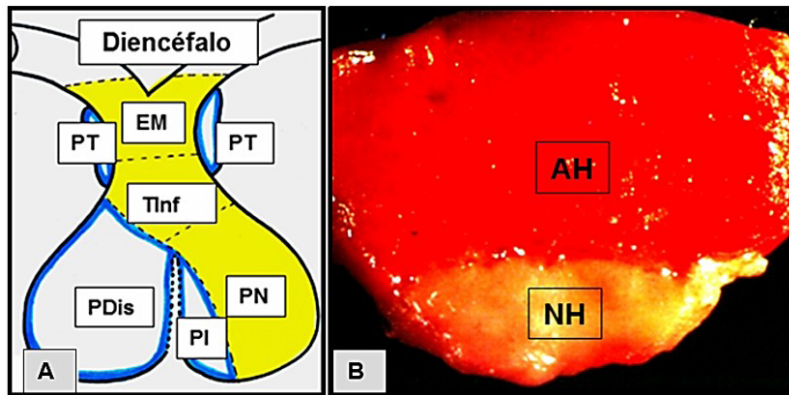


Fig. 2.3. A y B. Regiones adenohipofisarias. A. *PDis: pars distalis, PI: pars intermedia, PN: pars neural, PT: pars tuberalis, TInf: tallo infundibular, EM: eminencia media.* B. *AH: adenohipófisis y NH: neurohipófisis.*

Las relaciones de la fosa hipofisaria son:

Inferior: senos esfenoidales y techo de rinofaringe.

Anterior: parte superior del seno esfenoidal, canal óptico y duramadre con el plexo venoso subpituitario.

Posterior: fosa cerebral posterior ocupada por la protuberancia anular.

Superiores: diafragma selar, tallo hipofisario y quiasma óptico.

Caras laterales: senos cavernosos con carótida interna (Girod y Trouillas, 1993).

La hipófisis presenta dos regiones (**fig. 2.3 A y B**):

A. Adenohipófisis (AH):

a) Lóbulo anterior o *pars distalis* (PDis).

b) Lóbulo intermedio o *pars intermedia* (PI).

c) Lóbulo infundibular/tuberal o *pars tuberalis* (PT).

El hipotálamo regula la secreción de las hormonas adenohipofisarias mediante factores liberadores o inhibidores hipotalámicos que llegan a través del sistema porta.

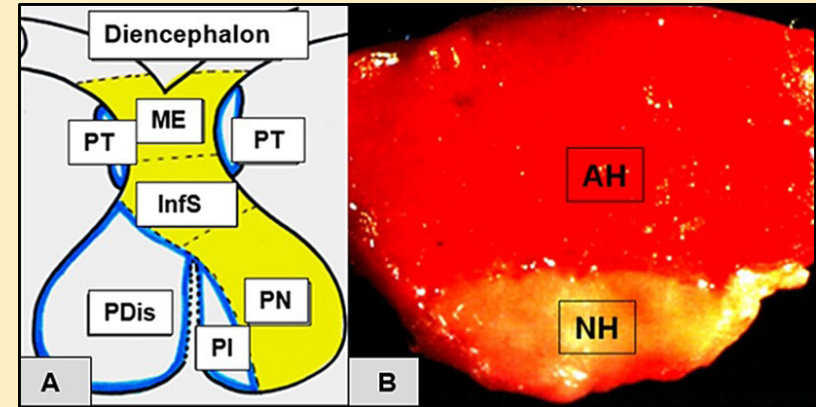


Fig. 2.3 a-b. Adenohipofyseal regions. *PDis: pars distalis, PI: pars intermedia, PN: pars neural, PT: pars tuberalis, InfS: infundibular stalk, ME: median eminence. AH: adenohipofysis. NH: neurohipofysis.*

Relationships with the pituitary gland hypophyseal fossa:

Inferior: sphenoid sinuses and roof of the rhinopharynx.

Anterior: superior part of the sphenoid sinus, optic channel, dura mater with the subpituitary venous plexus.

Posterior: posterior cranial fossa occupied by the pons.

Superior: sellar diaphragm, hypophyseal stem, optic chiasm.

Lateral sides: cavernous sinuses with internal carotid (Girod and Trouillas, 1993).

The pituitary gland presents two regions (**fig. 2.3 a-b**):

A. Adenohipofysis (AH):

a) Anterior lobe or *pars distalis* (PDis).

b) Intermediate lobe or *pars intermedia* (PI).

c) Infundibular-tuberal lobe or *pars tuberalis* (PT).

The hypothalamus regulates the secretion of adenohipofyseal hormones by means of the releasing or inhibitory hypothalamic factors that appear through the portal system.

B. Neurohipófisis (NH):

- d) Eminencia media (EM).
- e) Tallo infundibular (TInf).
- f) Lóbulo posterior o *pars neural* (PN).

La neurohipófisis envía a la sangre neurohormonas secretadas a nivel hipotalámico (zona periventricular y núcleos supraóptico y paraventricular).

Vascularización arterial (Duvernoy, 1969; Corliss y col., 1984; Gorczyca y Ardí, 1987; Antunes y Muraszko, 1990):

1. Arterias hipofisarias superiores: son ramas de la carótida interna y se dividen en las ramas anterior y posterior que se anastomosan con su homóloga del lado opuesto para formar un **plexo anular** alrededor de la parte superior del tallo hipofisario. Las ramas anteriores dan nacimiento a las **arterias trabeculares** que descienden sobre la superficie superior del lóbulo anterior, cursan hacia el tallo pituitario y terminan en una **arteria larga del tallo** a lo largo de la ***pars tuberalis***. En su breve curso a lo largo del lóbulo anterior, cada arteria trabecular da origen a una pequeña arteria denominada **arteria del centro fibroso**. Las ramas anteriores y posteriores de las arterias hipofisarias superiores son también fuente de **arterias cortas del tallo** que penetran en la porción superior del tallo hipofisario.

2. Arterias hipofisarias inferiores: se originan del tronco meníngeo-hipofisario localizado dentro del seno cavernoso; se ponen en contacto con las porciones ínfero-laterales de la glándula y se bifurcan en ramas interna y externa que se anastomosan con sus homólogas del lado opuesto, formando un **círculo arterial** alrededor del lóbulo posterior. Por lo tanto, las ramas de las arterias hipofisarias inferiores proporcionan la sangre al lóbulo posterior y la porción inferior del tallo, contribuyendo con pequeñas ramas capsulares a la periferia del lóbulo anterior. Aunque muchas ramas arteriales dentro del tallo

B. Neurohypophysis (NH):

- d) Median eminence (ME).
- e) Infundibular stalk (InfS).
- f) Posterior lobe or *pars neural* (PN).

The neurohypophysis sends to the blood neurohormones secreted at the hypothalamic level (paraventricular zone and supraoptic and paraventricular nuclei)

Arterial vascularization (Duvernoy, 1969; Corliss et al., 1984; Gorczyca and Ardí, 1987; Antunes and Muraszko, 1990).

1. Superior hypophyseal arteries: they are branches of the internal carotid artery and divide into the anterior and posterior branches, which anastomose with their counterpart on the opposite side to form an **anular plexus** surrounding the superior part of the hypophyseal stalk. The anterior branches give rise to **trabecular arteries**, which descend onto the superior surface of the anterior lobe, run towards the hypophyseal stem to end in a long artery of the stem all through the *pars tuberalis*. In its brief course throughout the anterior lobe, each trabecular artery gives rise to a small artery called **artery of the fibrous centre**. The anterior and posterior branches of the superior hypophyseal arteries also originate *short arteries of the stem*, which penetrate the superior portion of the hypophyseal stalk.

2. Inferior hypophyseal arteries: they originate from the meningeal-hypophyseal trunk situated within the cavernous sinus; they get in contact with the inferior-lateral portions of the gland and branch off into internal and external branches that anastomose with their counterparts on the opposite side to form an **arterial circle** around the posterior lobe. As a consequence, the branches of the inferior hypophyseal arteries provide the posterior lobe and the inferior portion of the stalk with blood, and the periphery of the anterior lobe with small capsular branches only. Although many arterial branches within the pituitary stalk and infundi-

pituitario e infundíbulo forman arteriolas y capilares, algunas dan origen a complejos vasculares extraordinarios llamados **gomitoli** (ovillos vasculares) que están formados por una arteria central rodeada de capilares de forma glomeruloide. La transición de arteria central a capilares está dada por arteriolas especializadas dotadas de esfínteres musculares cuya función es la de controlar el flujo sanguíneo. La red de capilares periarteriolares drenan en un extenso sistema pampiniforme portal que rodea al tallo hipofisario.

3. Sistema porta-hipofisario: conjunto vascular que comprende dos territorios capilares reunidos por vasos de mayor calibre. Los plexos capilares de la eminencia media y la porción superior del tallo drenan en

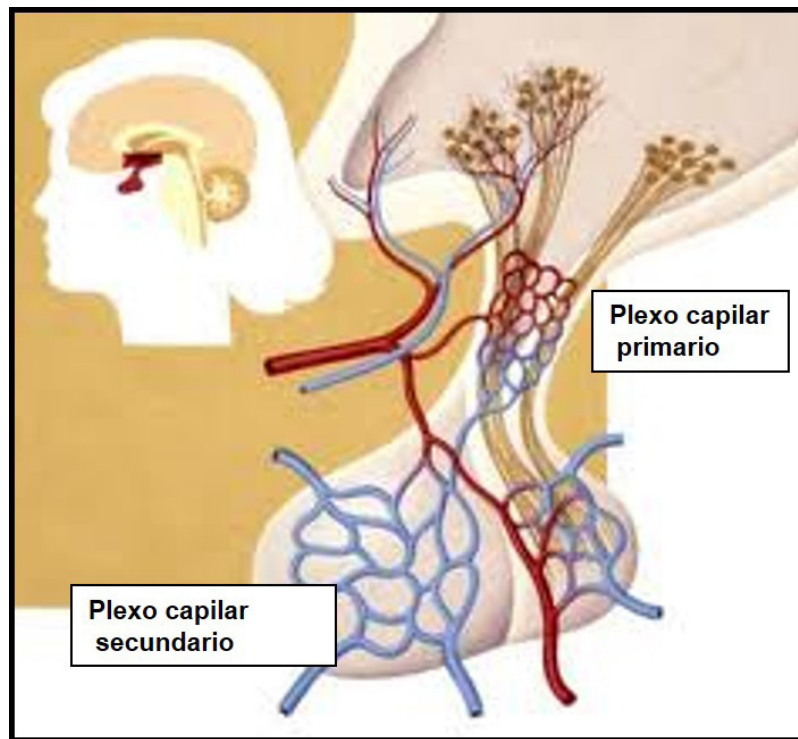


Fig. 2.4. Sistema porta-hipofisario: *biotecnoblog.es*.

bulum form arterioles and capillaries, some give rise to extraordinary vascular complexes called **gomitoli**. These 'coiled' capillary vessels are formed by a central artery surrounded by capillaries in a glomerulus-like way. The transition from the central artery to capillaries is provided by specialized arterioles supplied with thick muscular sphincters with the function of controlling blood flow. The network of periarteriolar capillaries drain into a large pampiniform portal system that envelopes the hypophyseal stalk.

3. Hypophyseal portal system: group of vessels comprising two capillary territories brought together by larger vessels. It is a crucial link between the hypothalamus and the hypophysis. The capillary plexuses

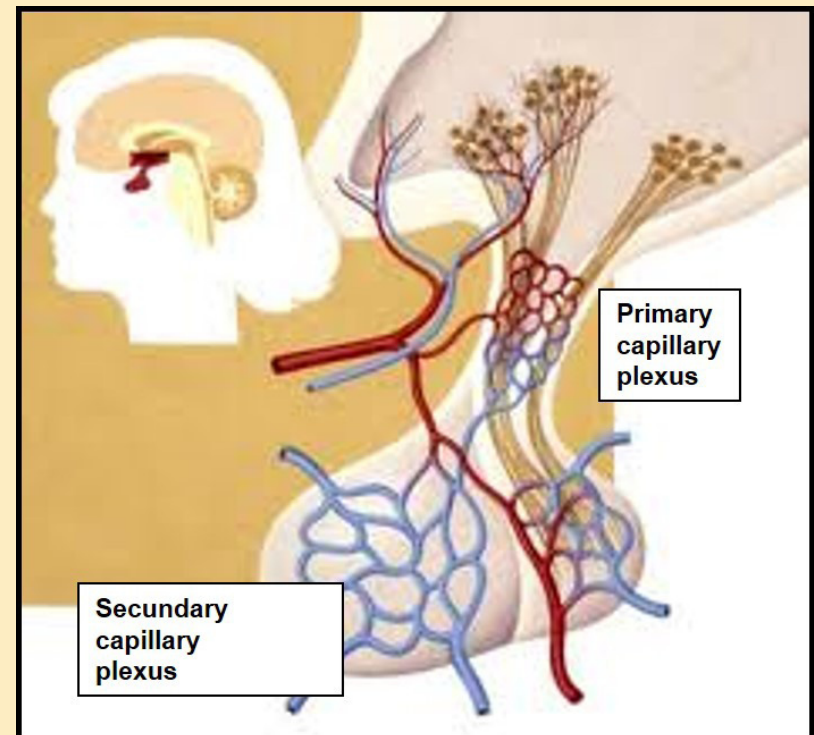


Fig. 2.4 Porta-hypophyseal system: *biotecnoblog.es*.

un largo vaso portal que cursa a lo largo de la superficie del tallo para suplir al 90% del lóbulo anterior, mientras que los plexos capilares más pequeños de la parte inferior del tallo dan origen a un vaso portal corto que desciende dentro de su porción central, para luego bordear el lóbulo posterior. Distalmente, el sistema portal se comunica con un sistema delicado de capilares en el lóbulo anterior, el cual transporta las hormonas hipofisotróficas a la glándula y las hormonas del lóbulo anterior a la circulación general. El flujo venoso de la glándula pituitaria se hace a través de los vasos colectores que drenan en los senos cavernosos, subhipofisario y circular superior.

En síntesis, las dos arterias hipofisarias inferiores se ramifican en la cápsula glandular, envían ramas al lóbulo posterior y dan pequeñas arterias cortas al lóbulo anterior. Las arterias hipofisarias superiores se anastomosan en la eminencia media y sus capilares emergentes forman el **plexo capilar primario**. Dichos capilares se hacen superficiales y forman las **vénulas portales** que rodean el tallo hipofisario y penetran dentro del lóbulo anterior para constituir el **plexo capilar secundario** (fig. 2.4).

2. Histología hipofisaria (Cónsole y Gómez Dumm, 1997a).

Las células de la pituitaria anterior regulan procesos fisiológicos tales como crecimiento, desarrollo, homeostasis, metabolismo y reproducción. La diferenciación de las células endocrinas es regulada por señales extrínsecas y por genes endógenos y sufren mitosis bajo ciertas condiciones (Yeung y col., 2006). Las hormonas hipofisarias han evolucionado a partir de genes ancestrales, por duplicación seguida de divergencia evolutiva. Por ejemplo, la hormona de crecimiento (GH) sería una hormona ancestral con una evolución molecular en los vertebrados. El otro miembro de la familia de los genes de la prolactina (PRL) apareció por duplicación. La gonadotropina cadena β y la tirotrófina se clonaron. El estudio de las lampreas detectó un solo gen de hormona de crecimiento (GH) (Kawauchi y

of the median eminence and the superior portion of the stalk, place where the hypophysiotropic factors are assimilated, drain into a large portal vessel that runs alongside the surface of the stalk to supply 90% of the anterior lobe, while the smaller capillary plexuses of the inferior part of the stalk give rise to a short portal vessel that descends into its central portion, to then surround the posterior lobe. Distally, the portal system communicates with a delicate system of capillary vessels in the anterior lobe, which carry hypophysiotropic factors into the gland and drain hormones of the anterior lobe to the general circulation system. The venous flow of the pituitary gland is through collecting vessels that drain into the subhypophyseal, cavernous, and superior circular sinuses. To sum up, both inferior hypophyseal arteries branch off at the capsule of the gland, send branches to the posterior lobe and supply the anterior lobe with short small arteries. The superior hypophyseal arteries anastomose around the median eminence and the capillaries that emerge from these vessels penetrate into the eminence to form a **primary capillary plexus**. The capillaries conforming this primary plexus later return to the surface to form *portal venules* that surround the hypophyseal stalk and penetrate into the anterior lobe to form a **secondary capillary plexus** (fig. 2.4).

2. Histology of the pituitary gland

The cells of the anterior pituitary regulate physiological processes such as growth, development, homeostasis, metabolism and reproduction. The differentiation of endocrine cells is regulated by extrinsic signals and endogen genes. After differentiation, pituitary cells undergo mitosis under certain conditions (Yeung et al., 2006). Pituitary hormones have evolved ancestral genes through duplication and divergence. For example, growth hormone (GH) would be an ancestral hormone with molecular evolution in vertebrates. The other member of the gene family of PRL appeared through gene duplication. The B-chain gonadotropins and thyrotropin were cloned. Lampreys would present only one GH gene (Kawauchi and Sower, 2006).

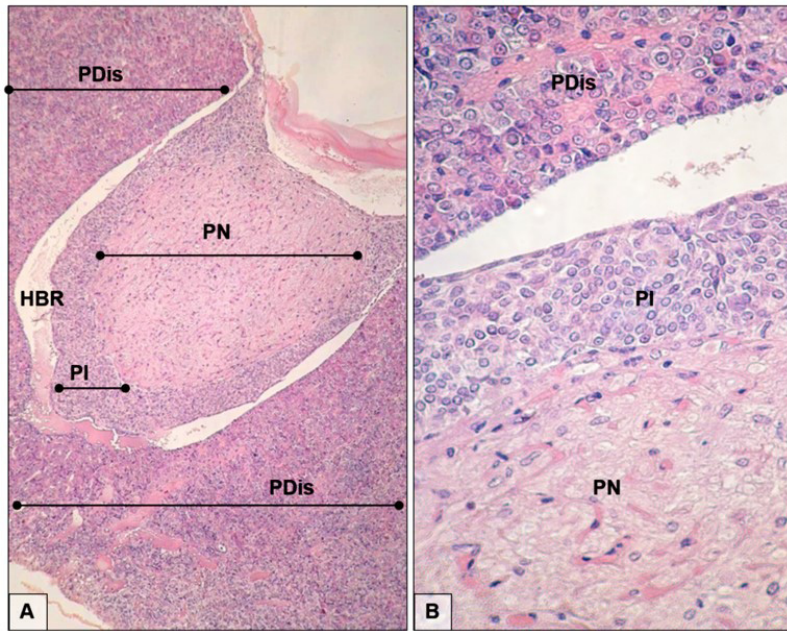


Fig. 2.5 A-B. Histología de las regiones adenohipofisarias. *PDis: pars distalis, PN: pars neural, PI: pars intermedia, HBR: hendidura de la bolsa de Rathke* (A. H-E x 200. B. H-E x 600).

Sower, 2006). El estudio inmunocitoquímico de las células adenohipofisarias en cultivo ha permitido la identificación de los diversos tipos celulares mediante la caracterización morfológica de sus gránulos secretorios (Orgnero de Gaisán y col., 1997; Kaspers y col., 2006).

A. Adenohipófisis (fig. 2.5):

I. Pars distalis: se ha documentado el estudio de las células pituitarias en numerosas especies (García-Hernández y col., 1996; Nozaki y col., 2001; Villaplana y col., 2002; Sánchez Cala y col., 2003; Laiz-Carrión y col., 2003; Grandi y Chicca, 2004; Kaspers y col., 2006; Grandi y col., 2014) y en humanos (Girod y Trouillas, 1993). Primero se clasificaron por su

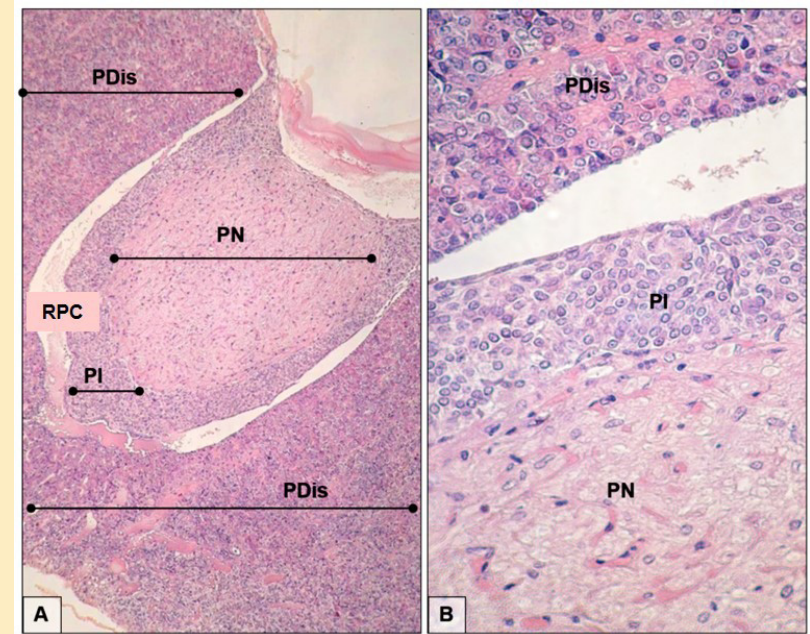


Fig. 2.5 a-b. Histology of the adenohypophyseal regions. *PDis: pars distalis, PN: pars neural, PI: pars intermedia, RPC: Rathke's pouch cleft.* (a. H-E: x 200. b. H-E x 600).

The immunocytochemical study of the pituitary cells in culture has allowed the accurate recognition of the different cell types, characterizing the secretory granules (Orgnero de Gaisán et al., 1997).

A. Adenohipofisis (fig. 2.5 a-b):

I. Pars distalis: pituitary cells have also been recorded in other species (Grandi and Chicca, 2004; Grandi et al., 2014; Sánchez Cala et al., 2003; Laiz-Carrión et al., 2003; García-Hernández et al., 1996; Kaspers et al., 2006; Nozaki et al., 2001; Vilaplana et al., 2002) and humans (Girod and Trouillas, 1993). They were first classified according to their behaviour in the presence of dying in light microscopy preparations and

comportamiento ante colorantes en las preparaciones de microscopía óptica, más tarde por el tipo de hormona que producen, luego por estudios inmunohistoquímicos enzimáticos (Nakane, 1970) y por estudios ultraestructurales con inmunohistoquímica electrónica a nivel de sus gránulos secretorios (Kurosumi, 1991). Existe gran plasticidad en las redes tridimensionales de células endocrinas pituitarias que desempeñan un rol fundamental en la liberación de hormonas, se integran con las señales hipotalámicas y provocan deficiencias hormonales si se asocian con disfunción (Hodson y Mollard, 2012; Hodson y col., 2012). Tanto las células pituitarias endocrinas como las no endocrinas están organizadas en redes estructurales y funcionales que pueden ser modificadas durante toda la vida. La pituitaria ya no se considera una glándula que responde de modo simple a un regulador externo, sino que memoriza información y se adapta constituyendo una red coordinada interna (Le Tissier y col., 2012).

En el capítulo se adjuntan microfotografías de microscopía óptica y descripciones de preparados histológicos pituitarios de controles jóvenes intactos de ambos sexos que se extrajeron de los diferentes modelos experimentales desarrollados desde 1990 (ratas, ratones, monos y hámsteres).

A. Poblaciones cromófilas:

1. Población somatotropa

a) Microscopía de luz: sus células son las más voluminosas (12 a 16 μm) y presentan forma ovoidea a esférica. Constituyen la población más numerosa: del orden del 50% en machos y 30% en hembras. Secretan hormona de crecimiento (GH), proteína de PM 21.500 Da. Su localización es difusa, de modo que el muestreo al azar resulta representativo, aunque se hallan en gran número en las porciones laterales de la *pars distalis*. Presentan núcleos redondeados y algo excéntricos. Con orange G se tiñen de color naranja y con hematoxilina-eosina se ven acidófilas (**fig. 2.6**).

b) Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ): las somatotropas presentan un patrón citoplasmático granular difuso ocre con diaminobencidina (DAB) usado como cromógeno (Cónsole y col., 1993) (**fig. 2.7**).

then according to the type of hormone they produce; after that, according to enzymatic and immunohistochemical studies (Nakane, 1970) and immunohistochemical, electron microscopy and ultrastructural studies at the level of their secretory granules (Kurosumi, 1991). There is high plasticity in the three-dimensional networks of pituitary endocrine cells that have an essential role in hormone release, they integrate the hypothalamic signals and cause hormonal deficiencies if they are associated with pituitary dysfunction (Hodson and Mollard, 2012; Hodson et al., 2012). Both endocrine and non-endocrine pituitary cells are organized into structural and functional networks that can be modified throughout life. The pituitary gland is no longer considered a gland that responds simply to external regulation, but memorizes information and adapts to an internal coordinated network (Le Tissier et al., 2012).

This chapter contains light microscopy microphotographs and descriptions of pituitary histological preparations of intact young controls of both sexes removed from the different experimental models developed from 1990 (rats, mice, hamsters and monkeys).

A. Chromophilic populations:

1. Somatotropes

a) Light microscopy: cells appear as the most voluminous (12 to 16 μm) and present an ovoid to spherical form. They constitute the most numerous population (50% males and 30% female) and secrete GH, protein of MW 21.500 Da. Showing a wide-spread distribution; random sampling is representative, although they are numerous in the lateral portions in the *pars distalis*. They present rounded and rather eccentric nuclei. Stained with hematoxylin and eosin they appear acidophilic (**fig. 2.6**), and with orange G they become orange.

b) Immunohistochemical (IHQ) techniques: somatotropes present agranular cytoplasmic ochre pattern with chromogen DAB. Reactions are highly specific when antigen and antibody get together (Cónsole et al., 1993) (**fig. 2.7**).

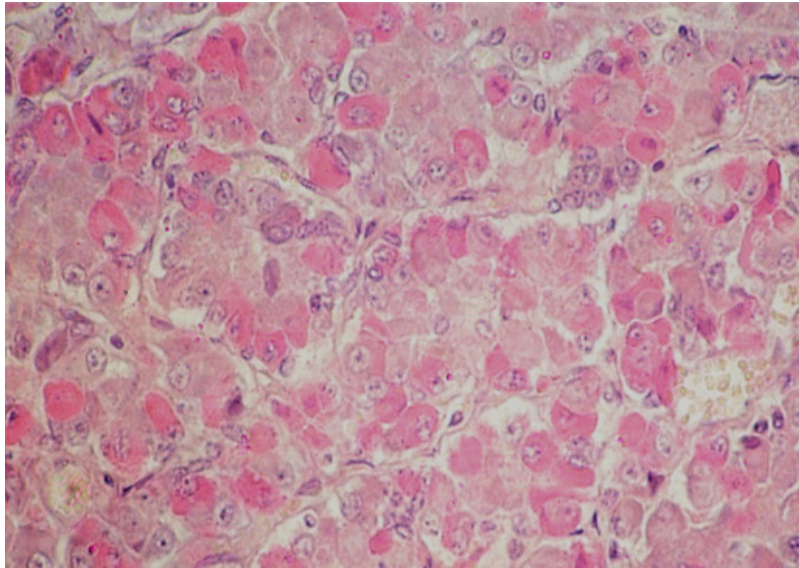


Fig. 2.6. Pars distalis. Células somatotropas: acidófilas (H-E x 400).

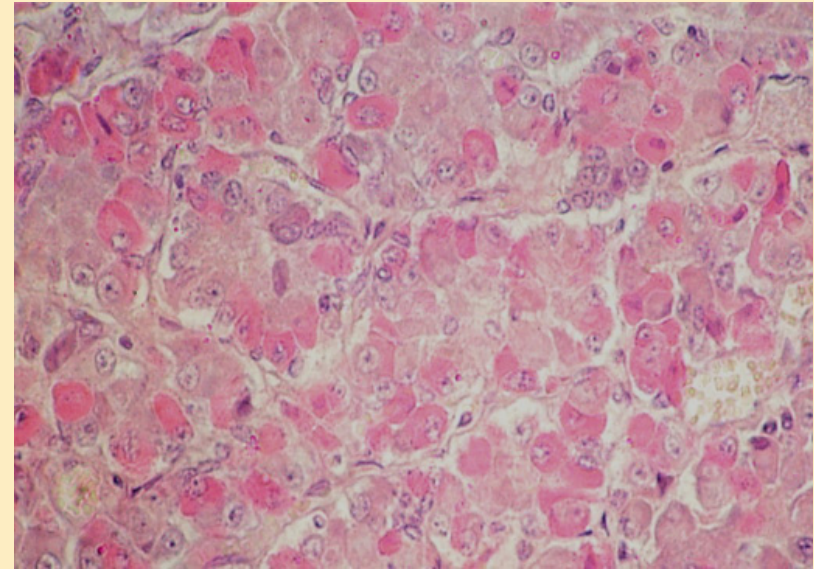


Fig. 2.6 Pars distalis. Acidophilic somatotropes (H-E x 400).

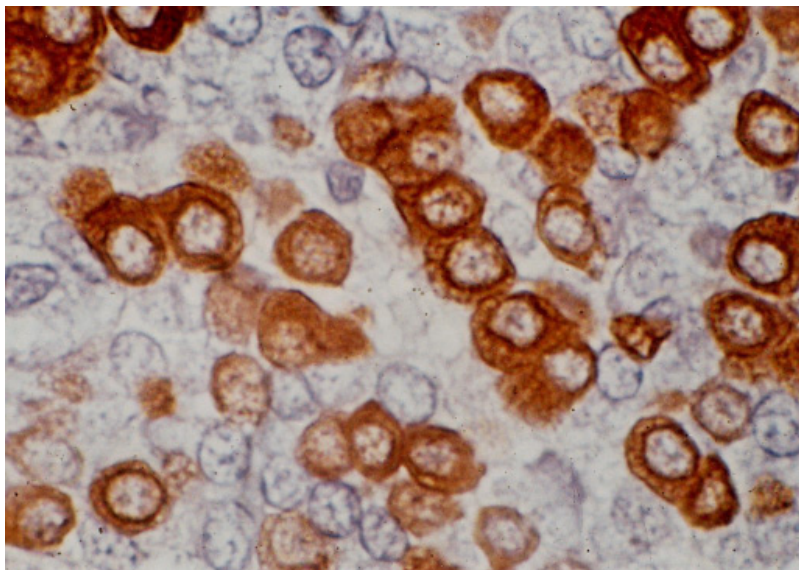


Fig. 2.7. Células GH positivas (EnVision peroxidasa, anti-GH x 1.000).

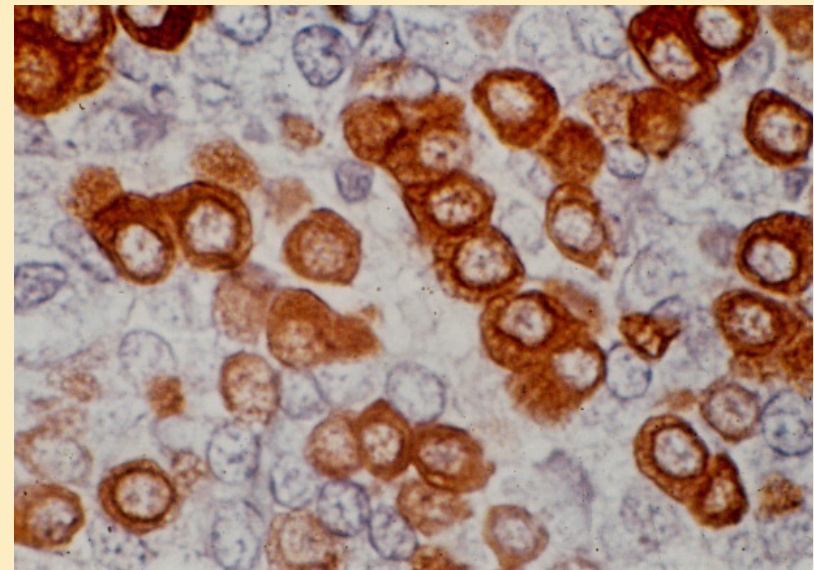


Fig. 2.7 Somatotropes (EnVision peroxidase, anti-GH x 1.000).

La reacción es específica y se logra al unirse el antígeno (GH) tisular con el anticuerpo (anti-GH) del antisuero. Las somatotropas regulan el crecimiento y el metabolismo en animales y seres humanos. Las células somatotropas pueden presentar alternancia funcional, de modo tal que las que están pobres en gránulos presentan una zona golgiana clara y otras se ven cargadas de gránulos secretorios (Girod y Trouillas, 1993). Los estudios 3D mostraron que la población somatotropa forma una red con conectividad que proporciona un impulso coordinado de la secreción de GH (Bonfont et al., 2005). Dicha red mostró dimorfismo según sexo y una respuesta dinámica a los esteroides gonadales (Sánchez-Cárdenas y col., 2010).

2. Población lactotropa

a) **Microscopía de luz:** se detecta un 40% de lactotropas en hembras y un 20% en machos. Las células son pequeñas (diámetro 12 a 14 μm), de forma poligonal alargada y presentan cortas prolongaciones. La distribución es difusa, aunque predominan en las regiones póstero-laterales de la *pars distalis*. Secretan prolactina (PRL), una proteína de PM 23.500 Da. Algunas células tienen gran número de gránulos secretorios; otras muestran gránulos dispersos y una extensa zona golgiana bien delimitada. Sus

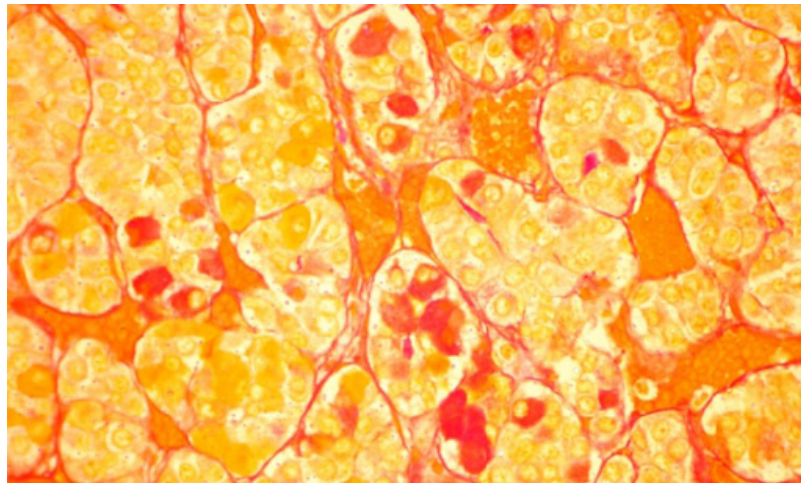


Fig. 2.8. Células lactotropas orangiófilas (PAS-Orange x 1.000).

Somatotropes regulate growth and metabolism in animals and in human beings. Somatotropes can present alternation of function, so that those which evidence granule scarcity present a clear Goljian zone and others are loaded of secretory granules (Girod and Trouillas, 1993). 3D studies reported that the somatotrope population forms a connectivity network providing a coordinated impulse of GH secretion (Bonfont et al., 2005). Network of somatotropes evidenced sex-specific dimorphism and a dynamic response to gonadal steroids (Sánchez-Cárdenas et al., 2010).

2. Lactotropes

a) Light microscopy: abundant population: 40% in females and 20% in males. The cells have two sizes: small long polygonal cells with both short and more globular prolongations (average diameter from 12 to 14 μm). Distribution is diffuse, although they are predominant in the posterior-lateral regions of the *pars distalis*. They secrete PRL: protein, MW 23.500 Da. Some cells, during their secretory activity, present a large number of granulations; others exhibit disperse granules and a clearly defined Golgi zone. Their central and large nuclei contain a voluminous

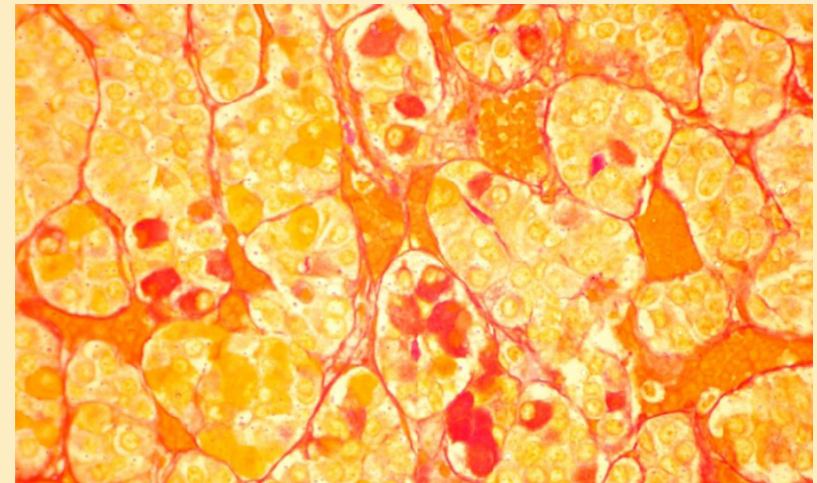


Fig. 2.8 Orangiphilic lactotropes (PAS-Orange, x 1.000).

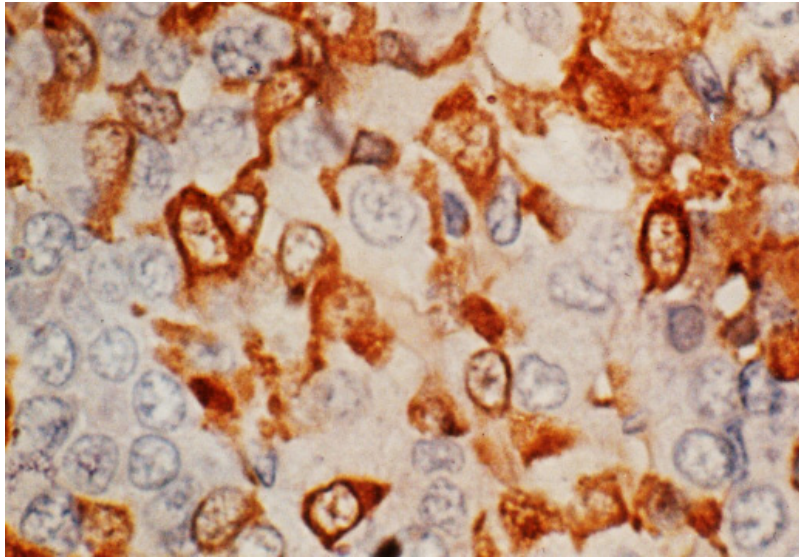


Fig. 2.9. Células PRL positivas (*EnVision peroxidasa, anti-PRL x 1.000*).

núcleos son centrales y grandes y contienen un nucléolo voluminoso. Con H-E se ven acidófilas y con orange-G se tiñen de color naranja (**fig. 2.8**).

b) Técnicas inmunohistoquímicas: las células lactotropas muestran un patrón granular citoplasmático ocre (Cónsole y col., 1997a-b y 1998) (**fig. 2.9**).

Dan reacción específica al contactarse el antígeno (PRL) y el anticuerpo (suero anti-PRL). Se detectaron lactotropas de forma oval en ratas inmaduras, poligonales en ratas maduras y células en forma de copa cuando hubo mayor diferenciación, hallando gran afinidad topográfica con las células gonadotropas (Sato, 1980). Las secciones ultrafinas inmunomarcadas permitieron distinguir 4 tipos de lactotropas: **1.** Células ovales o poligonales con gránulos esféricos pequeños (130-200 nm). **2.** Células ovales o poligonales con gránulos esféricos y polimorfos de tamaño medio (250-300 nm). **3.** Células poligonales con grandes gránulos polimorfos (300-700 nm). **4.** Lactotropas en copa con gránulos polimorfos y esféricos pequeños (Nogami y Yoshimura, 1982).

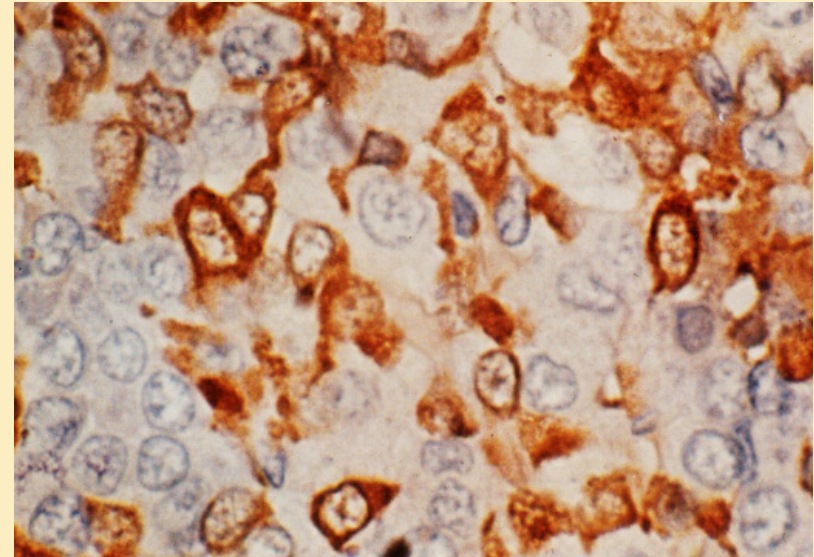


Fig. 2.9 Lactotropes (*EnVision peroxidase, anti-PRL x 1.000*).

nucleolus. Acidophilic when stained with H-E, they become orange when stained with orange G (**fig. 2.8**).

b) Immunohistochemical techniques: lactotropes show a cytoplasmic granular pattern. They react specifically to antigen (PRL) and antibody (anti-PRL serum) (Cónsole et al., 1997a-b and 1998) (**fig. 2.9**).

Oval-shaped lactotropes were detected in immature rats, polygonal-shaped in mature rats and cup-shaped when there was higher differentiation and strong topographic affinity to gonadotropes (Sato, 1980). Immunostaining of ultrathin sections allowed distinguishing 4 types of lactotropes: **1.** Oval or polygonal cells with small spherical granules (130-200 nm). **2.** Oval or polygonal cells with medium-sized spherical and polymorphic granules (250-300 nm). **3.** Polygonal cells with large polymorphic granules (300-700 nm). **4.** Cup-shaped lactotropes with small polymorphic and spherical granules (Nogami and Yoshimura, 1982). Lactotropes have been recorded to increase their volume when treated with estrogens (Scheithauber et al., 1989), as well as during pregnancy and breastfeeding (Scheithauber et al., 1990).

Se ha documentado que las células lactotropas aumentaron de tamaño bajo tratamiento con estrógenos (Scheithauer y col., 1989), así como durante el embarazo y la lactancia (Scheithauer y col., 1990). Porter y col. (1991) encontraron evidencias de conversión bidireccional entre lactotropas y somatotropas, en modelos de ratas durante la lactancia y el destete.

3. Población folículo­tropa

a) **Microscopía de luz:** junto con la población luteinizante constituyen un 10% de la población adenohipofisaria. Secretan hormona folículo-estimulante (FSH), una glicoproteína de PM 31.500 Da. Son células esféricas, tienen un diámetro promedio de 15 μm y núcleo redondeado rico en eucromatina y, a menudo, excéntrico. Se distribuyen en grupos irregulares en toda la *pars distalis*, con tendencia a la localización periférica ventral. Las células son basófilas con hematoxilina-eosina, PAS+, azul alciano+ y con el tetracromo de Herlant se tiñen de azul claro.

b) **Técnicas inmunohistoquímicas:** permiten detectar células redondeadas con cierto grado de vacuolización citoplasmática y núcleos

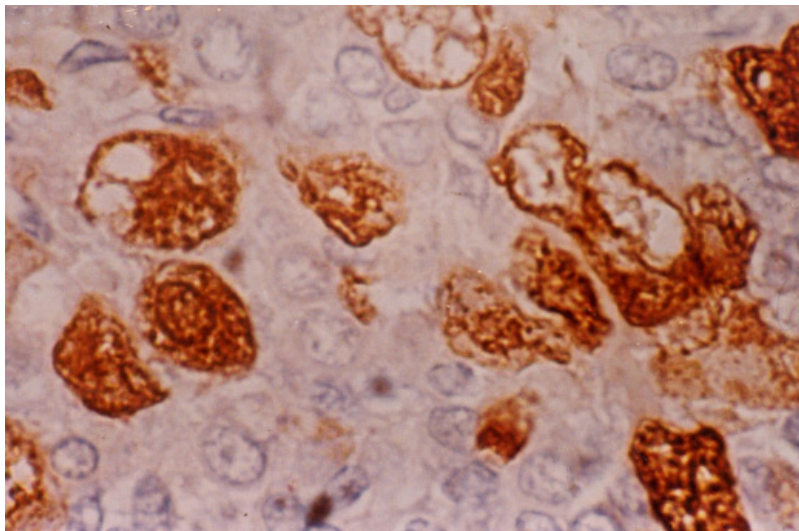


Fig. 2.10. Células FSH positivas (*EnVision peroxidasa, anti-FSH x 1.000*).

Porter et al. (1991) found evidence of bidirectional conversion between lactotropes and somatotropes, in breastfeeding and weaning rats.

3. Folliculotrope population:

a) **Light microscopy:** together with the luteinizing population they constitute 10% of the adenohipophyseal population. They secrete FSH (folliculo-stimulating hormone): glycoprotein, MW 31.500 Da. They are spherical, 15 μm average in diameter, with a rounded euchromatin-rich nucleus, usually eccentric. They are distributed in irregular groups in the whole *pars distalis*, tending to a peripheral-ventral location. Cells are basophilic when stained with hematoxylin-eosin, PAS+, alcian blue+ and light blue when stained with Herlant's tetrachrome.

b) **Immunohistochemical techniques:** they are rounded cells with some degree of cytoplasmic vacuolization and spherical nuclei. The cytoplasm evidences secretory granules with antigen (FSH) and antibody (anti-FSH β subunit) reaction (Cónsole et al., 1994 and 1997) (fig. 2.10).

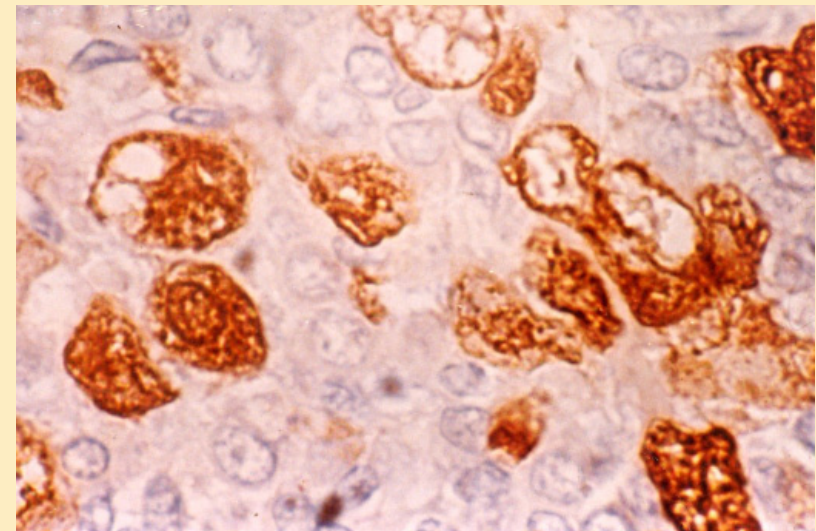


Fig. 2.10 Folliculotropes (*EnVision peroxidase, anti-FSH x 1.000*).

esféricos (Cónsole y col., 1994 y 1997c), mediante la unión del antígeno: FSH con el antisuero: anti-FSH (fig. 2.10).

4. Población luteinizante

a) **Microscopía de luz:** representan con las folículotropas un 10% del total de la *pars distalis*. Secretan hormona luteinizante (LH), una glicoproteína de PM 30.000 Da. Las células luteinizantes tienen una distribución irregular con tendencia a la localización periférica ventral. Presentan un aspecto globular, pero son más pequeñas que las folículotropas (menos de 9 μm de diámetro). Los núcleos son redondeados y, a veces, excéntricos. Se ven basófilas cuando se tiñen con hematoxilina-eosina. Son azul alcian+ y PAS+ y con el tetracromo de Herlant se tiñen de color púrpura.

b) **Técnicas inmunohistoquímicas:** son células redondeadas con cierto grado de vacuolización citoplasmática. Muestran gránulos de secreción con reacción entre el antígeno (LH) y el anticuerpo (fracción β anti-LH) (Cónsole y col., 1994 y 1997c) (fig. 2.11).

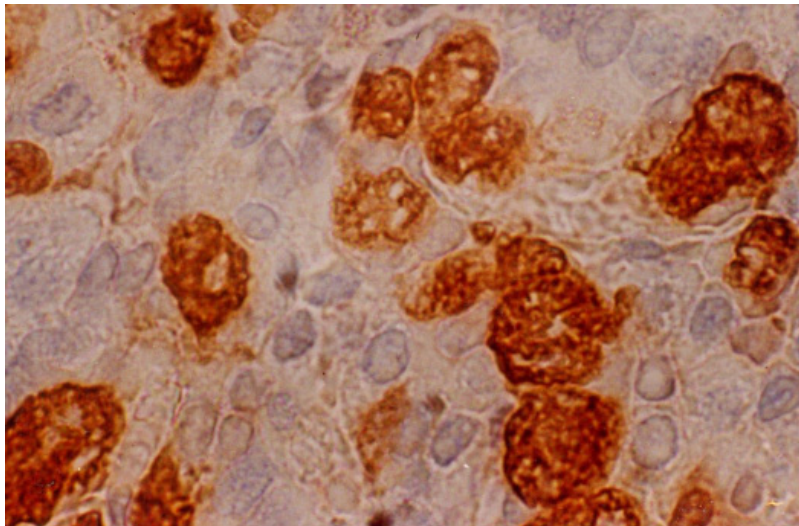


Fig. 2.11. Células LH positivas (*EnVision peroxidasa, anti-LH x 1.000*).

4. Luteinizing population

a) **Light microscopy:** together with the folliculotropic cells they constitute 10% of the whole *pars distalis*. They secrete LH (luteinizing hormone): glycoprotein, MW 30.000 Da. They are irregularly distributed, tending to a peripheral-ventral location. They present a globular aspect, but are smaller compared to folliculotropes (less than 9 μm in diameter). Nuclei are rounded and sometimes eccentric. They are basophilic when stained with hematoxylin-eosin and Alcian blue, and PAS positive. When stained with Herlant's tetrachrome they become purple.

b) **Immunohistochemical techniques:** they are rounded cells with some degree of cytoplasmic vacuolization. The cytoplasm evidences secretory granules with antigen (LH) and antibody (anti-LH β subunit) reaction (Cónsole et al., 1994 and 1997) (fig. 2.11).

Phifer et al. (1973) immunohistochemically demonstrated the presence of bihormonal gonadotropes with FSH and LH within the same cell. Dada et al. (1984) found that LH monohormonal gonadotropes are less numerous in male compared to female rats. Childs (1995) demon-

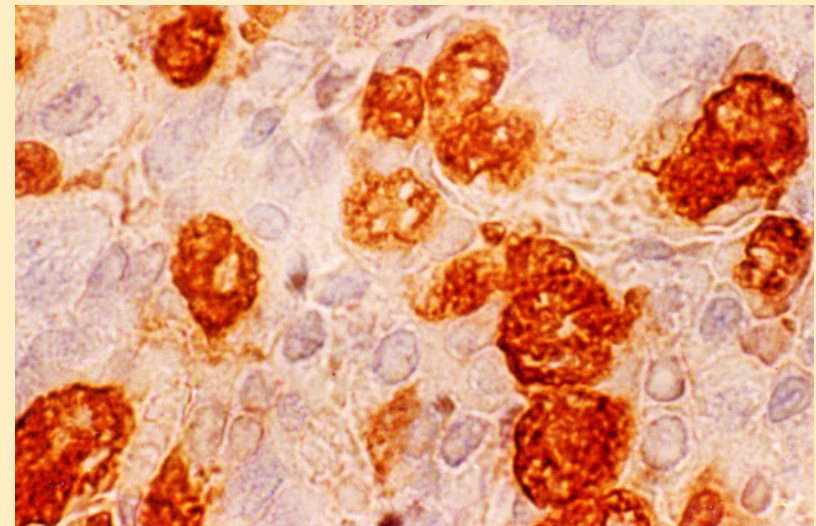


Fig. 2.11 Luteinizing cells (*EnVision peroxidase, anti-LH x 1.000*).

Phifer y col. (1973) demostraron mediante inmunohistoquímica la presencia de células gonadotropas bihormonales con FSH y LH dentro de la misma célula. Dada y col. (1984) hallaron que las células gonadotropas monohormonales LH son menos numerosas en hombres respecto a ratas hembras. Childs (1995) demostró la división del trabajo entre las gonadotropas ya que parecen reciclarse a sí mismas con autorreguladores (folistatina, activina, inhibina) y hasta coalmacenan GH para ayudar a la ovulación.

Jezirowski y col. (1997) documentaron la heterogeneidad en la población gonadotropa, mostrando que la mayor parte es inmunorreactiva para LH y FSH y también hallaron una pobre marcación con cromogranina A en las típicas células en “anillo de sello” de la gonadectomía. Las gonadotropas que exhibieron pocos gránulos de secreción de gran tamaño resultaron subtipos pobres en cromogranina y las gonadotropas con gránulos pequeños electrodensos fueron secretogranina positivas. Dichos subtipos parecen diferir en la susceptibilidad a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o podrían regularse mediante factores paracrinos. Las células gonadotropas se organizan en redes interdigitadas que se adaptan a las condiciones cambiantes del microambiente y a las diferentes etapas reproductivas. Los estudios de microscopía con video demostraron la plasticidad celular en respuesta a la GnRH y a los estrógenos (Alim y col., 2012).

5. Población tirotropa

a) Microscopía de luz: constituyen la población menos numerosa (menos del 5% del total) y secretan tirotrofina (TSH), una glicoproteína de PM 28.000 Da. Miden unos 10 µm y se localizan principalmente en la zona ventro-medial de la *pars distalis*, pero se hallan en grupos dispersos en otras regiones. Son poligonales y presentan núcleos esféricos.

Con hematoxilina-eosina aparecen basófilas. Son azul alciano+ y PAS+, con aldehído-fucsina dan tinción violeta y con el tetracromo de Herlant se tiñen de azul intenso (fig. 2.12).

trated the division of labour among gonadotropes. They apparently recycle themselves utilizing auto regulators (follistatin, activin, and inhibin) and even co-store GH to foster ovulation.

Jezirowski et al. (1997) documented both the heterogeneity in the gonadotrope population, evidencing that the majority of gonadotropes are immunoreactive for LH and FSH, and a poor staining for chromogranin A in the “signet ring” cells of gonadectomy. Those gonadotropes exhibiting scarce but large secretory granules were found to be chromogranin-poor subtypes, and those with small electron-dense granules were found to be secretogranin-positive. These subtypes appear to differ in GnRH susceptibility or else they might be regulated by means of paracrine factors.

Gonadotropes are organized in interdigitated networks that adapt to the changing conditions of the microenvironment and to the different reproduction stages. Video microscopy studies demonstrated the cell plasticity in response to GnRH and estrogens (Alim et al., 2012).

5. Thyrotropes

a) Light microscopy: they constitute the least numerous population (less than 5% of the cells). They secrete TSH (thyrotropin): glycoprotein, MW 28.000 Da. They are approximately 10 µm. They are mainly located in the ventral-medial zone of the *pars distalis*, but in isolation they are found in scattered groups in other regions. They are polygonal and present spherical nuclei. They are basophilic when stained with hematoxylin-eosin and Alcian blue and PAS positive. When stained with aldehyde-fuchsin they become violet and with Herlant’s tetrachrome they turn into a deep blue colour (fig. 2.12).

b) Immunohistochemical techniques: after immunostaining cells appear as angular and polygonal. Granulations of the diffuse cytoplasmic pattern are antigen (TSH)-antibody (anti-TSH) specific (Cónsole et al., 1995 and 1997) (fig. 2.13).

Phifer and Spicer (1973) demonstrated by means of immunohistochemistry the presence of thyrotropes in the human adenohypophysis. The study of thyrotropes in immature and mature rats allowed recognizing the modification of their morphology according to their functional phase. Day

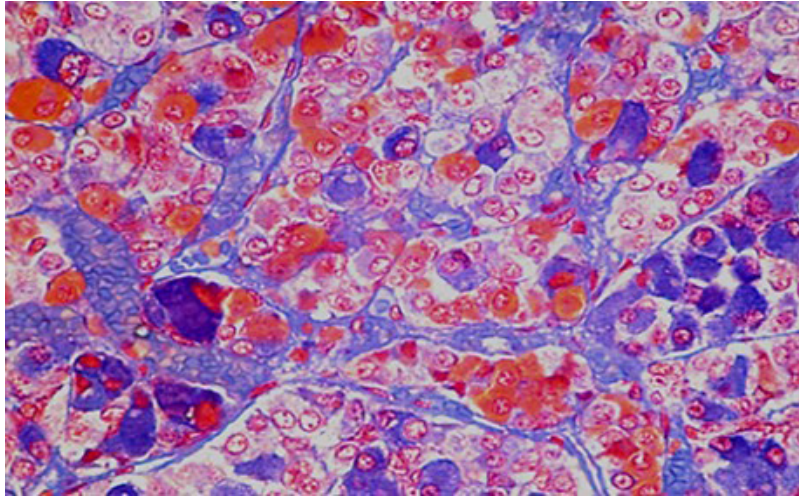


Fig. 2.12. Células tirotropas (*tetracrómico de Herlant: azul intenso, x 800*).

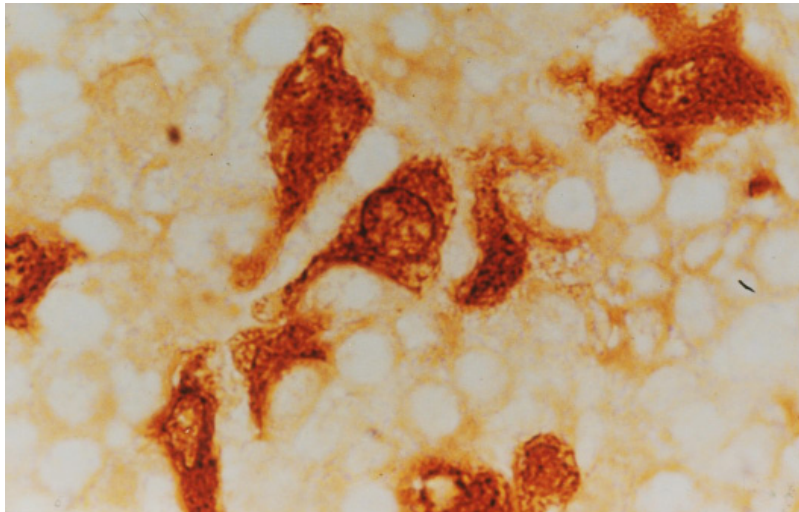


Fig. 2.13. Células TSH positivas (*EnVision peroxidasa, anti-TSH x 1.000*).

b) Técnicas inmunohistoquímicas: se inmunomarcán como células angulares poligonales. Las granulaciones del patrón citoplásmico difuso muestran especificidad ante el antígeno (TSH)-anticuerpo (anti-TSH) (Cónsole y col., 1995; 1997d) (**fig. 2.13**).

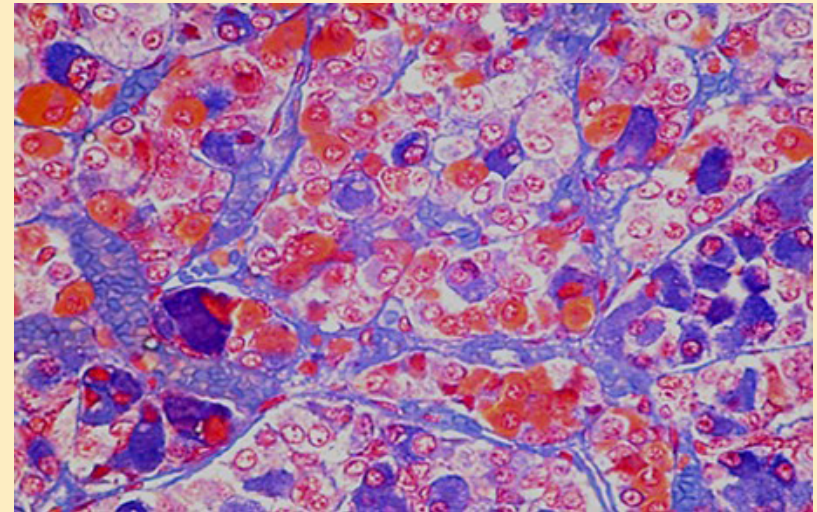


Fig. 2.12 Thyrotropes: deep blue (*Herlant's tetrachrome, x 800*).

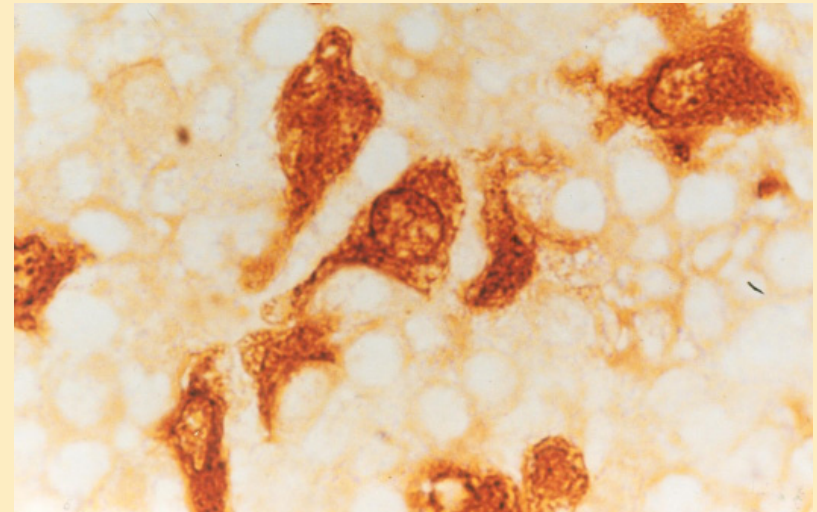


Fig. 2.13 Thyrotropes (*EnVision peroxidase, anti-TSH x 1.000*).

10-20: oval cells with 50 nm secretory granules spread throughout the whole glandular tissue and stellate cells with 50-100 nm granules; day 60: large and vesiculated stellate thyrotropes with 150-250 nm secretory granules (Yoshimura et al., 1982). Also, in a study on humans thyrotropes were observed to

Phifer y Spicer (1973) demostraron mediante inmunohistoquímica la presencia de tiotropas en la adenohipófisis humana. El estudio de las células tiotropas en ratas inmaduras y maduras permitió reconocer la modificación de su morfología, según su fase funcional: día 10-20: células ovales con gránulos secretorios de 50 nm dispersas en todo el tejido glandular y células estrelladas con gránulos 50-100 nm; día 60: tiotropas estrelladas grandes y vesiculadas con gránulos secretorios de 150-250 nm (Yoshimura y col., 1982). Además, en un estudio en humanos se observó que las tiotropas presentaron marcada hiperplasia e hipertrofia celular cerca de los 50 años de edad, con predominio en el sexo femenino (Zegarelli-Schmidt y col., 1985).

6. Población corticotropa

a) **Microscopía de luz:** constituyen el 15 a 20% de la población de la *pars distalis* y secretan corticotrofina (ACTH), proteína de PM 4.507 Da, obtenida por escisión del precursor de la proopiomelanocortina (POMC). Predominan en la zona centro-dorsal de la *pars distalis*. Son globulares con cortas prolongaciones y tienen un diámetro de 12 a 14 µm. Presentan núcleos algo excéntricos. Son basófilas con H-E, PAS+ y con tetracromo de Herlant se tiñen de azul intenso. A fin de diferenciar tiotropas de corticotropas se puede hacer una hematoxilina plúmbica que las permite ver de color púrpura (fig. 2.14).

b) **Técnicas inmunohistoquímicas:** se detectan como células positivas irregulares con prolongaciones cortas y sus gránulos secretorios se inmunomarcaban mediante antígeno (ACTH) y anticuerpo (anti-ACTH) (fig. 2.15).

Stefaneanu y col. (1991) estudiaron la expresión del gen de la proopiomelanocortina mediante hibridación *in situ* en la población corticotropa humana de hipófisis normales y de adenomas pituitarios.

B. Población cromófoba:

a) **Microscopía de luz:** sus células representan un 50% respecto a las células cromófilas descritas y se las ve irregulares, con ausencia de gránulos secretorios. Pueden ser estadios iniciales de células granulares con escasos gránulos o estadios involutivos terminales. No se tiñen frente a los diversos colorantes utilizados para explorar los distintos tipos celulares cromófilos.

present noticeable cell hyperplasia and hypertrophy reaching the age of 50, predominantly females (Zegarelli-Schmidt et al., 1985).

6. Corticotropes

a) **Light microscopy:** they constitute 15 to 20% of the *pars distalis* population. Their cells secrete ACTH (corticotropin): protein, MW 4.507 Da, obtained by removing the precursor proopiomelanocortin (POMC). They are abundant in the central-dorsal region of the *pars distalis*, although they appear as scattered groups of irregular location. They are globular with some prolongations and are approximately 12 to 14 µm in diameter. They present rather eccentric nuclei with a small nucleolus. They are basophilic when stained with hematoxylin-eosin, PAS positive, and they become deep blue when stained with Herlant's tetrachrome. In order to differentiate thyrotropes from corticotropes, staining with plumbic hematoxylin is necessary, which turns the cells into a blue-black colour (fig. 2.14).

b) **Immunohistochemical techniques:** irregular positive cells with short prolongations are detected. The cytoplasmic secretory granules are antigen ACTH and antibody anti-ACTH positive (fig. 2.15).

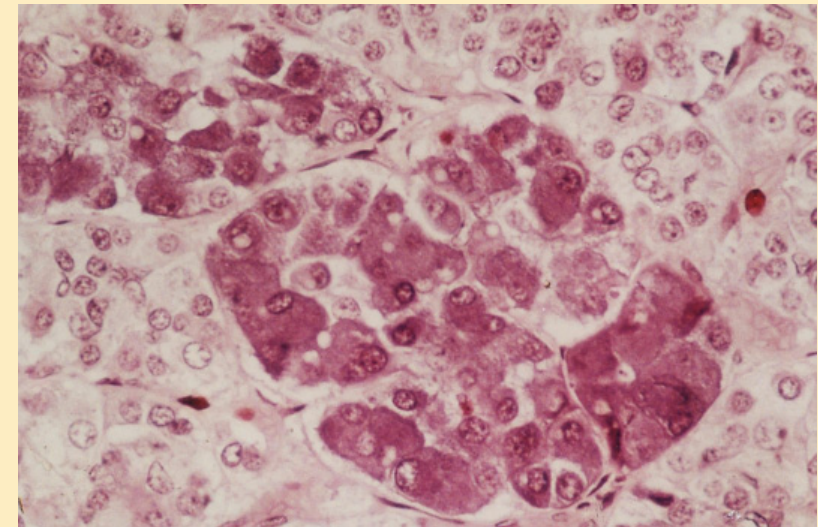


Fig. 2.14 Corticotropes (plumbic hematoxylin, x 1.000).

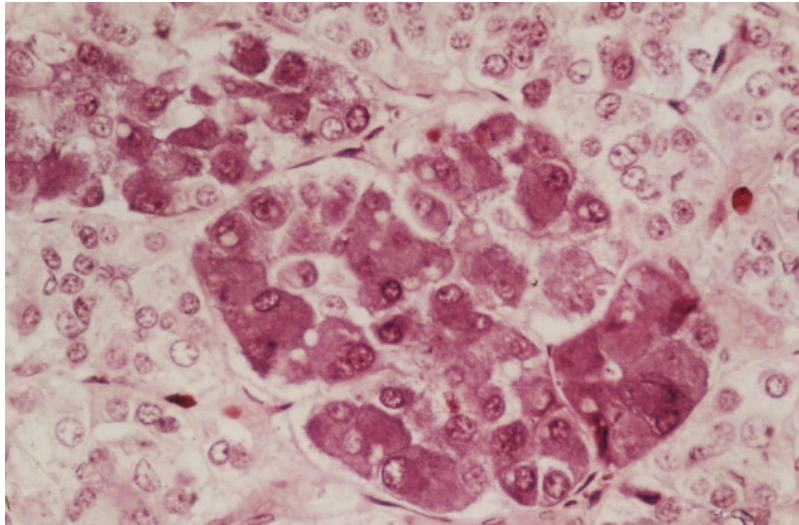


Fig. 2.14. Células corticotropas positivas (*hematoxilina plúmbica x 1.000*).

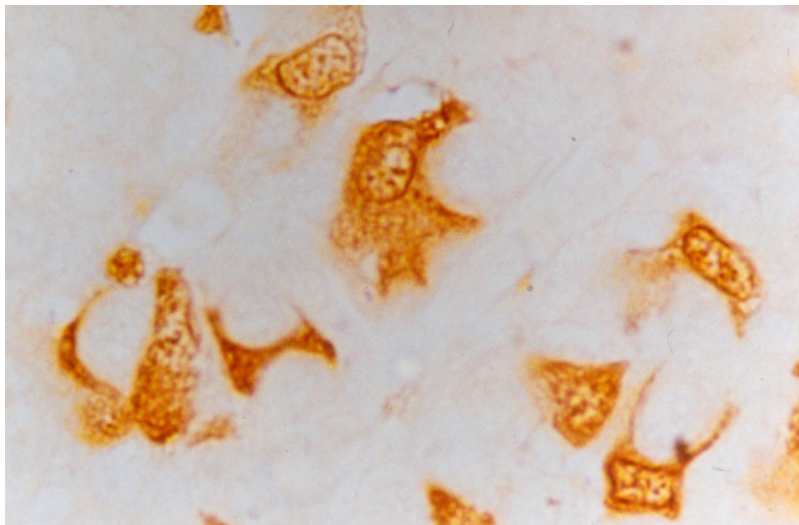


Fig. 2.15. Células ACTH positivas (*EnVision peroxidasa, anti-ACTH x 1.000*).

b) Técnicas inmunohistoquímicas: resultan negativas debido a la escasez o ausencia de gránulos secretorios.

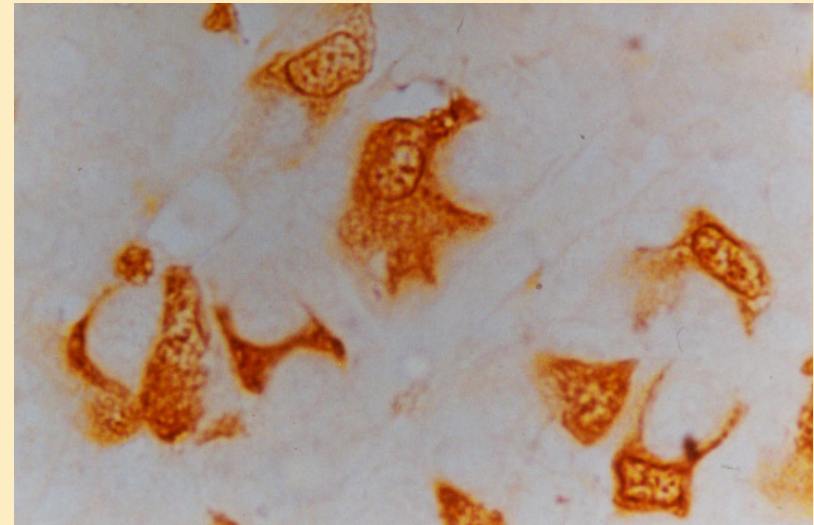


Fig. 2.15 Corticotropes (*EnVision peroxidase, anti-ACTH x 1.000*).

Stefaneanu et al. (1991) studied the expression of the POMC gene using *in situ* hybridization in the human corticotrope population with normal pituitary glands and pituitary adenomas.

B. Chromophobe population:

a) Light microscopy: chromophobe cells represent 50% of the population compared to the chromophilic cells described. They appear as irregular and lacking secretory granules. They are not positive for the different stains used to explore the various types of chromophilic cells.

b) Immunohistochemical techniques: they are negative as a consequence of the scarcity or absence of secretory granules.

7. Folliculo-stellate population:

a) Light microscopy: usual detection. They belong to the chromophobe cell group. As they do not stain with the dyes that mark chromophilic cells, they increase the chromophobe population.

7. Población folículo-estelar:

a) **Microscopía de luz:** pertenecen al grupo de las células cromóforas agranulares, ya que no se tiñen con los colorantes marcadores de células cromófilas.

b) **Técnicas inmunohistoquímicas:** se ven como células estrelladas irregulares con largas prolongaciones que envuelven a las células secretoras vecinas y presentan reacción al anticuerpo proteína S₁₀₀ y a la GFAP (proteína gliofibrilar ácida). Se relacionan con las células secretoras ya que tendrían acción paracrina (Cónsole y col., 2000) y se comunican especialmente con las células gonadotropas, corticotropas y tirotropas (Ver cap. 3) (**fig. 2.16**).

Las células FE fueron descubiertas en la rata por Rinehart y Farquhar (1953) y luego estudiadas por numerosos autores (Yoshimura y Nogami, 1980; Cocchia y Miani, 1980; Nakajima y col., 1980; Vila-Porcile y Olivier, 1984; Girod y col., 1985; Perryman, 1989; Marin y col., 1991; Girod y Trouillas, 1993).

Las células FE disminuyeron en ratas castradas mostrando procesos citoplasmáticos ramificados alrededor de las gonadotropas, mientras

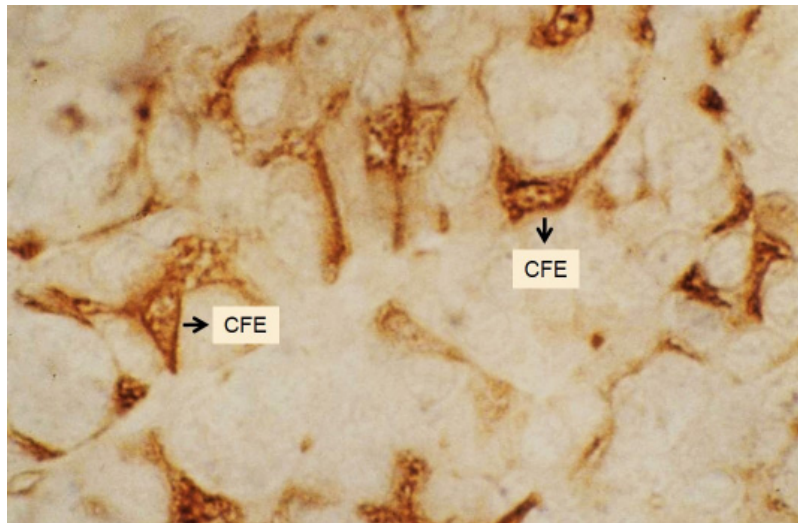


Fig. 2.16. Células S100+ (CFE) (*EnVision peroxidasa, anti-S100 x 1.000*).

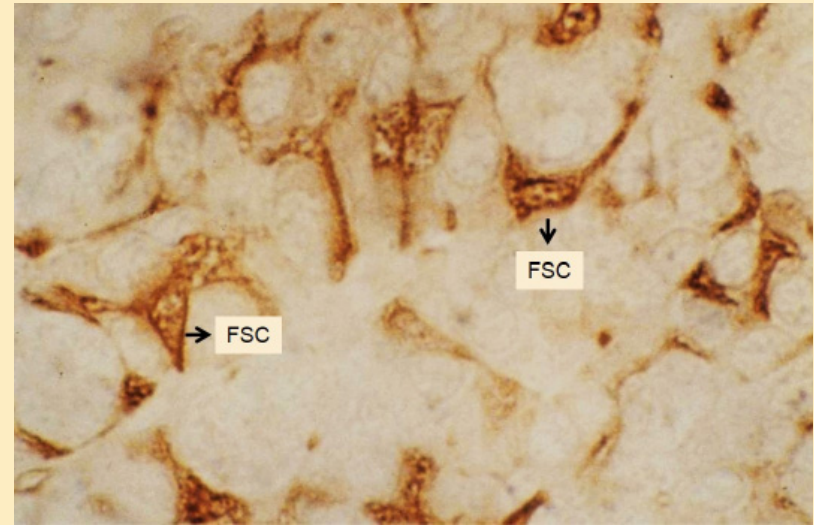


Fig. 2.16 Positive folliculo-stellate cells (FSC) (*EnVision peroxidase, anti-S100 x 1.000*).

b) **Immunohistochemical techniques:** irregular stellate cells react positively to antibody S₁₀₀ protein and to GFAP (glial fibrillary acidic protein). Some of the prolongations involve the secretory cells. (Cónsole et al., 2000). They mainly relate to gonadotrope, corticotrope and thyrotrope cells (see chapter 3) (**fig. 2.16**).

FS cells were discovered in the rat by Rinehart and Farquhar (1953) and were then studied by many authors (Yoshimura and Nogami, 1980; Cocchia and Miani, 1980; Nakajima et al., 1980; Vila-Porcile and Olivier, 1984; Girod et al., 1985; Perryman, 1989; Marin et al., 1991; Girod and Trouillas, 1993).

Castrated rats evidenced a decreased number of FS cells with branched cytoplasmic processes around the gonadotropes, while in thyroidectomized rats they lacked cytoplasmic processes and nearly had no connection with thyrotropes (Shirasawa et al., 1983). Hofler et al. (1984) detected FS cells using immunohistochemistry in normal pituitary glands and in pituitary adenomas.

Folliculo-stellate cells have different roles, such as support, metabolism and macromolecular transport (Allaerts et al., 1990). They were proved

que en ratas tiroidectomizadas carecían de procesos citoplasmáticos y casi no tenían conexión con las tiotropas (Shirasawa y col., 1983). Hoffer y col. (1984) detectaron células FE mediante inmunohistoquímica en hipófisis normales y en adenomas pituitarios.

Las células FE cumplen funciones de soporte, metabolismo y transporte macromolecular (Allaerts y col., 1990) y se comprobó que atenuaron la respuesta secretoria bifásica de la LH en respuesta a la GnRH (Allaerts y col., 1994). La población de células FE fue heterogénea a nivel inmunohistoquímico y ultraestructural, con una subpoblación que estimuló a las células T *in vivo* (tipo células dendríticas) y otra subpoblación que no fue capaz de estimularla. Ambas poblaciones fueron capaces de secretar interleuquina 6 (IL-6), pero necesitarían de estímulos intrapituitarios o exógenos para producir cantidades máximas. La inmunomarcación simultánea del S100 clásica y el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, propio de las células dendríticas (sistema fagocítico-mononuclear), ha permitido sugerir la posibilidad de que las células FE funcionen como células madre (Allaerts y col., 1997; Allaerts y Vankelecom, 2005).

Sato y col. (2005) en estudios de distribución intrapituitaria de las células FE hallaron gran número en las zonas basales y en la transición con la *pars tuberalis* e *intermedia* (50% de la población), mostrando gran conexión con los capilares sanguíneos. Acosta y col. (2010) investigaron a las células FE en vizcacha mediante inmunohistoquímica, morfometría y microscopía electrónica, hallando folículos intracelulares con coloide (PAS+), inmunomarcación citoplasmática-nuclear S100+, GFAP+ y vimentina, procesos citoplasmáticos en contacto con vasos sanguíneos, conexiones con células endocrinas (lactotropas, gonadotropas y corticotropas) y presencia de complejos de unión-desmosomas entre sus membranas laterales. Concluyeron remarcando que: **a.** La inmunomarcación diferencial podría indicar diferentes estados fisiológicos; **b.** La expresión de dichas proteínas sugeriría un origen neuroectodérmico y **c.** Su distribución espacial permitiría inferir una comunicación intercelular a nivel de la *pars distalis*.

Otros estudios de células FE ratificaron sus funciones como fagocitos, agentes de paracrinia y células madre. Además, detectaron en ratas trans-

to diminish the biphasic secretory response of LH in response to GnRH (Allaerts et al., 1994). The FS population was heterogeneous at the immunohistochemical and ultrastructural levels, with a subpopulation that stimulated *in vivo* T cells (dendritic type of cells) and another subpopulation that did not manage to stimulate it. Both populations secreted interleukin 6 (IL-6), but they would need intrapituitary or exogenous stimuli to produce the highest quantities of IL-6. Simultaneous immunostaining of classical S100 and the major histocompatibility complex class II, proper of dendritic cells (phagocytic-mononuclear system), allowed them suggesting the possibility that FS cells might work as stem cells and studied the topographic distribution, intercellular junctions and secretion of growth factors and cytokines, indicating their immunophenotypical and functional heterogeneity. The authors found overlapping immunostaining with classical S100 and the major compatibility complex class II distinctive of dendritic cells (phagocytic mononuclear system), and discussed the possible role of FS cells as stem cells (Allaerts et al., 1997; Allaerts and Vankelecom, 2005).

In studies on the intrapituitary distribution of FS cells, Sato et al. (2005) found a great number of them in the basal zones and in the transition with the *pars tuberalis* and the *pars intermedia* (50 % of the population), evidencing strong connection with blood vessels. Acosta et al. (2010) studied the FS cells in the 'vizcacha' through immunohistochemistry, morphometry and electron microscopy. They found intracellular follicles with colloid (PAS+), cytoplasmic immunostaining and nuclear S100+, GFAP+ and vimentin, cytoplasmic processes in contact with blood vessels and endocrine cells (especially, connections with lactotropes, gonadotropes and corticotropes) and junction-desmosome complexes between their lateral membranes. They concluded the following: **a.** Differential immunostaining could indicate different physiological stages; **b.** The expression of those proteins suggests a neuroectodermal origin; and **c.** Its spatial distribution would allow inferring an intercellular communication at the level of the *pars distalis*.

Other studies of FS cells ratified their roles as phagocytes, paracrinia and stem cells and detected in transgenic rats the expression of LH, TSH, PRL, GH and POMC in cells S100+, suggesting their capacity to be

génicas la expresión de LH, TSH, PRL, GH y POMC en células S100+, sugiriendo su capacidad para diferenciarse en células endocrinas productoras de hormonas pituitarias (Kikuchi y col., 2011). Las células FE secretan factores de crecimiento (fibroblástico y endotelial vascular) e IL-6 y se ha sugerido la posibilidad de que constituyan un tipo de célula madre con potencialidad para diferenciarse en células endocrinas (Inoue y col., 1999). Osuna y col. (2012) usando ratas transgénicas con regulación de la expresión de genes S100b involucrados, confirmaron la hipótesis que sustenta el potencial de diferenciación de las células FE y sus similitudes con los astrocitos cerebrales. El carácter multifuncional de las células FE se demostró en cultivos primarios con una topografía única en cuanto a los componentes de la membrana basal y de los colágenos intersticiales que tendrían un rol esencial para determinar la disposición de las células endocrinas y su matriz extracelular (Horiguchi y col., 2010).

Células multihormonales:

La pituitaria anterior contiene células multihormonales que almacenan y secretan diferentes hormonas bajo la influencia de las hormonas hipotalámicas (**tabla 1**). Dichas células responderían a una secreción paradójica, ya sea por un estímulo hipotalámico que no corresponde al eje o a una transdiferenciación por un interruptor fenotípico entre células maduras sin división celular.

Tabla 1. Células multihormonales en la pituitaria anterior

ACTH	TSH	GH	PRL	LH/FSH	Número
		X	X		Abundante
X	X			X	Abundante
X				X	Detectable
X		X			Escaso
X			X		Escaso
X	X				Escaso

Las células mamosomatotropas almacenan de modo simultáneo GH y PRL y fueron inmunomarcadas con sueros anti-GH y anti-PRL por Frawley y Boockfor (1991). Se hallaron un 5% de células mamom-

detectadas en hormona-productoras endocrinas (Kikuchi et al., 2011). FS cells secrete growth factors (fibroblastic, vascular endothelial, IL-6) and it has been suggested that FS cells could probably constitute a type of stem cell that potentially stand out in endocrine cells (Inoue et al., 1999). Osuna et al. (2012) used transgenic rats with regulation of the expression of S100 genes involved, which confirmed the hypothesis supporting the differentiation potential of FS cells and their similarities with astrocytes. In primary cultures it was demonstrated that FS cells have a multifunctional character and a unique topography as regards the components of the basement membrane and the interstitial collagen, and plays an essential role in determining the arrangement of endocrine cells and the extracellular matrix (Horiguchi et al., 2010).

Multihormonal cells:

The anterior pituitary contains multihormonal cells that store and secrete different hormones and respond to the releasing of various hypothalamic hormones (**table 1**). These cells would respond to a paradoxical secretion (hypothalamic stimulus) that does not correspond to the axis or to a transdifferentiation by means of a phenotypical interrupter among mature cells with no cell division.

Table 1. Multihormonal cells in the anterior pituitary

ACTH	TSH	GH	PRL	LH/FSH	Number
		X	X		Abundant
X	X			X	Abundant
X				X	Detectable
X		X			Scarce
X			X		Scarce
X	X				Scarce

Mamosomatotropes store GH and PRL (Frawley and Boockfor, 1991). Multihormonal corticotropes with ACTH and other adenohypophyseal hormones have also been recorded (Childs, 1991), as well as gonadotropes with GH (Childs et al., 2000) and cells with TSH and GH after thyroidectomy (Horvath et al., 1990) and primary hypothyroidism (Vidal et al., 2000).

somatotropas (Leong y col., 1985). En ratas ovariectomizadas, orquiectomizadas y machos intactos, se detectaron escasas células GH-PRL (0.1-0.2 %). Además, el tratamiento con estrógenos disminuyó la densidad de células y la densidad de volumen de las somatotropas en ratas ovariectomizadas. Estos datos no serían compatibles para considerar a las mamosomatotropas como células de transición en la presunta conversión bidireccional de células productoras de GH y PRL (Pasolli y col., 1994).

También se han documentado corticotropas multihormonales con ACTH y otras hormonas adenohipofisarias (Childs, 1991), gonadotropas con GH (Childs y col., 2000) y células con TSH y GH después de la tiroidectomía (Horvath y col., 1990) y en hipotiroidismo primario (Vidal y col., 2000). Se han comunicado múltiples receptores en las células pituitarias: gonadotropas con receptores de hormona liberadora de GH (GHRH) (Childs y col., 1999) y somatotropas con receptores de hormona liberadora de LH (LHRH) (Childs, 2000). Es decir, podría producirse una secreción paradójica que explicaría su aparición en los adenomas hipofisarios multihormonales (Barlier y col., 1997). De acuerdo con Núñez y col. (2003), son frecuentes las células multihormonales entre las corticotropas y gonadotropas, con gran dimorfismo sexual que mostró pituitarias femeninas con mayor plasticidad. Villalobos y col. (2004a) hallaron que los fenotipos mixtos (TSH-LH-PRL) entre las células tirotropas fueron la regla y no la excepción (56%). Además, en la hipófisis de feto humano de 14 semanas se observó FSH y LH bioactivas, mientras que la forma dimérica que agrega TSH bioactiva se formó a partir de la semana 17 de gestación (Pope y col., 2006). Villalobos y col. (2004a) han descrito en la pituitaria anterior células bihormonales: PRL-GH, GH-LH/FSH, FSH/LH-ACTH, FSH/LH-TSH, FSH/LH-PRL que han sido involucradas en la “secreción paradójica”.

Pars distalis: patrón de histoarquitectura: los diversos tipos celulares descritos se disponen en *nidos o cordones*, existiendo una rica red de capilares sinusoides. Su histofisiología se presenta en la **tabla 2**.

There is record of multiple receptors in pituitary cells too: gonadotropes with hormone-releasing GH (GHRH) receptors (Childs et al., 1999); somatotropes with hormone-releasing LH (LHRH) receptors (Childs, 2000). That is to say, there could be a paradoxical secretion explaining the presence of receptors in multihormonal hypophyseal adenomas (Barlier et al., 1997). According to Núñez et al. (2003) multihormonal cells among corticotropes and gonadotropes are frequent, evidencing great sexual dimorphism as a result of the higher plasticity present in female pituitaries. Among thyrotropes, mixed phenotypes (TSH-LH-PRL) were the rule and not the exception (56%) and have described bihormonal cells: PRL-GH, GH-FSH/LH, FSH/LH-ACTH, FSH/LH-TSH, and FSH-LH-PRL in the anterior pituitary involved in the so called “paradoxical secretion” according to Villalobos et al. (2004a-b).

Pars distalis: histoarchitecture: The different cell types described are arranged in *nests or cords*, originating a rich network of sinusoidal capillaries. Histophysiology is shown in **table 2**.

Table 2. Histophysiology of adenohipophyseal populations

Hormone	Population	Function
GH	Somatotrope Mamosomatotrope	It stimulates protein synthesis and lipolysis. It induces the growth of long bones and skeletal muscles. It releases somatomedins (IGF-I). It induces tissue growth.
PRL	Lactotrope Mamosomatotrope	It promotes breastfeeding. It favours intestinal calcium absorption and bone calcium mobilization.
FSH	Folliculotrope	It stimulates gametogenesis.
LH	Luteinizing	It favours ovulation. Corpus luteum maturation takes place. It stimulates steroidogenesis and androgen secretion.
TSH	Thyrotrope	It affects thyroid follicular cells in thyroglobulin and T3-T4 secretion.
ACTH	Corticotrope	It stimulates glucocorticoid and gonadocorticoid secretion.

Tabla 2. Histofisiología de las poblaciones adenohipofisarias.

Hormona	Población	Función
GH	Somatotropa-mamosomatotropa	Estimula la síntesis proteica y la lipólisis. Induce crecimiento de los huesos largos y los músculos esqueléticos. Libera somatomedinas (IGF-I). Induce el crecimiento tisular.
PRL	Lactotropa-mamosomatotropa	Promueve la lactancia. Favorece la absorción del calcio intestinal y moviliza el calcio óseo.
FSH	Folículo­tropa	Estimula la gametogénesis.
LH	Luteinizante	Favorece la ovulación. Madura el cuerpo lúteo. Estimula la esteroidogénesis y la secreción de andrógenos.
TSH	Tirotropa	Actúa sobre las células de los folículos tiroideos para la secreción de tiroglobulina y T3-T4.
ACTH	Corticotropa	Estimula la secreción de glucocorticoides y gonadocorticoides.

II. Pars intermedia: En mamíferos se hallan células epiteliales grandes y poligonales, con buen desarrollo del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi. Tienen gránulos secretorios de 200-250 nm de des-

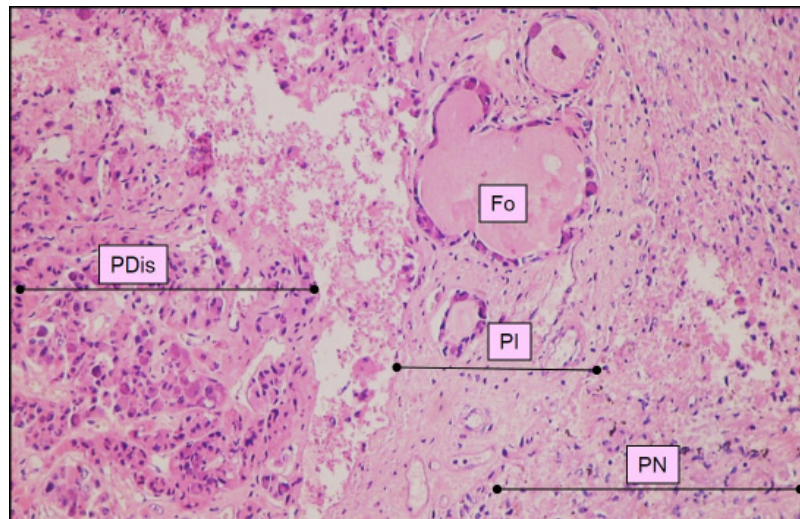


Fig. 2.17. Pars intermedia (PI). Folículos (Fo) (H-E x 600).

II. Pars intermedia: in mammals there is evidence of large and polygonal epithelial cells, with a well-developed endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. They present 200-250 nm secretory granules with different electron density. They secrete POMC, which divides to originate β -LPH (lipotropin) and two groups (α - β) of MSH (melanocyte stimulating hormone). In amphibians and reptiles MSH causes skin darkening. In mammal melanin synthesis would be induced (**fig. 2.17**).

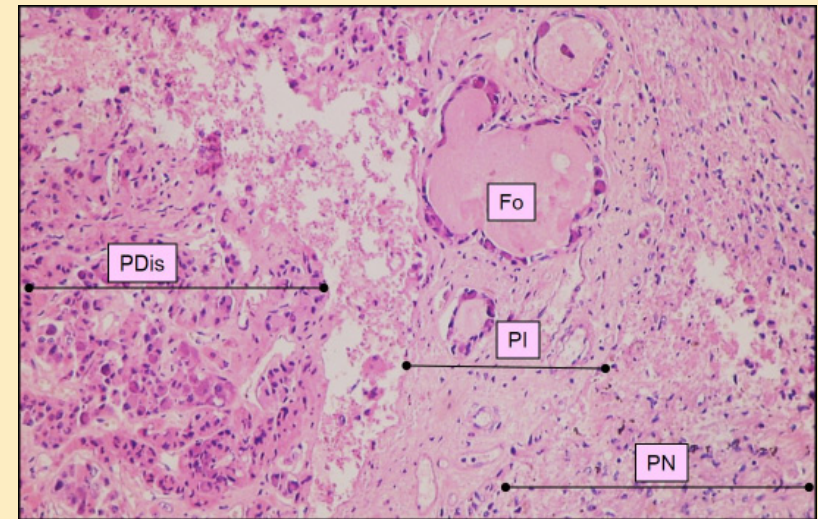


Fig. 2.17 Pars intermedia (PI). Follicles (Fo) (H-E, x 600).

Acosta and Mohamed (2009) studied the seasonal changes in the vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*), finding a decrease of morphometric parameters in melanotropes, the follicular colloid and FS cells because of the short photoperiod in the winter period. The *pars intermedia* in human regresses and acquires a cystic aspect

III. Pars tuberalis: it presents secretory cell cords longitudinally arranged with a dense capillary network. There is predominance of gonadotrope cells and a lesser number of corticotrope, thyrotrope and folliculo-stellate cells. Some squamous cell nests can be observed, which may develop into cysts.

igual densidad electrónica. Secretan POMC (pro-opiomelanocortina) que se escinde para dar β -LPH (lipotrofina) y dos formas (α y β) de MSH (hormona estimulante de melanocitos). En anfibios y reptiles, la MSH produce oscurecimiento de la piel y en mamíferos induciría la síntesis de melanina. Acosta y Mohamed (2009) estudiaron los cambios estacionales en la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*), hallando descenso de los parámetros morfométricos en las melanotropas, el coloide folicular y las células FE durante el período invernal, debidos al fotoperíodo corto. La *pars intermedia* humana involucre tomando un aspecto quístico (fig. 2.17).

III. Pars tuberalis: presenta cordones celulares secretorios en disposición longitudinal con una red capilar ricamente ramificada. Predominan las células gonadotropas y, en menor número, se ven corticotropas, tirotropas y células FE. Se observan algunos nidos de células escamosas, a partir de los cuales pueden desarrollarse quistes.

IV. Pars neural: muestra pituiticos y axones que forman el haz hipotálamo-pituitario cuyos somas neuronales están en el hipotálamo (nú-

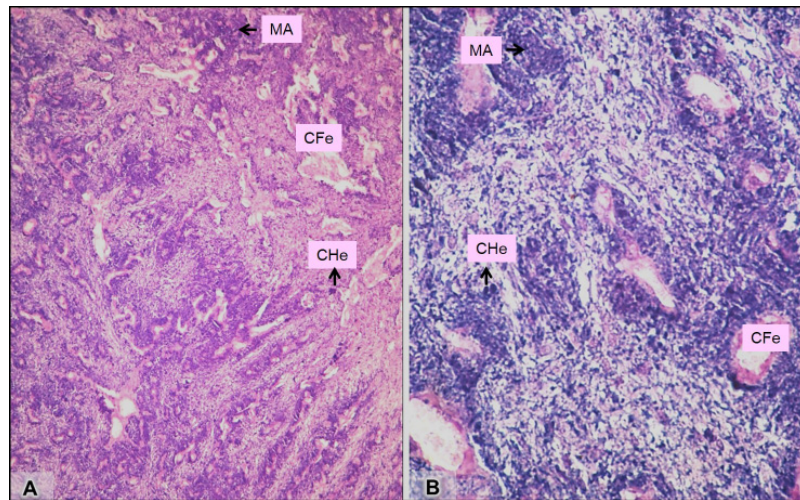


Fig. 2.18 A-B. Pars nervosa. CHe: cuerpos de Hering, MA: material almacenado; CFe: capilar fenestrado (hematoxilina crómica: A. x 200. B. x 600).

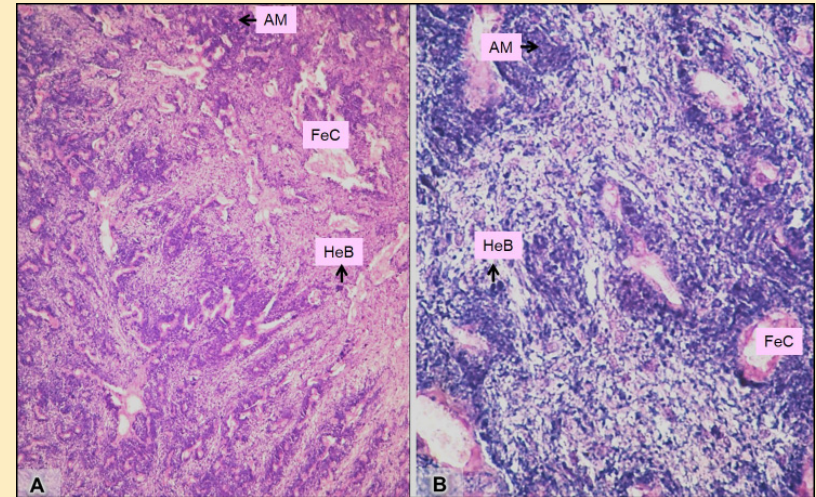


Fig. 2.18 a-b. Pars nervosa. HeB: Herring bodies, AM: accumulated material; FeC: fenestrated capillary (chromic hematoxylin, a x 200. b x 600).

IV. Pars neural: neuronal somas lay at hypothalamus level (supraoptic and paraventricular nuclei) with axons (pituitary-hypophyseal axis) that reach the *pars neural*. The secretory granules (neurocrinia) are located along the axonal pathway as Herring bodies and the accumulated material is seen as extracellular amorphous storages (Fig. 2.18 a-b).

References

- Acosta M, Mohamed F. Pituitary pars intermedia of male vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(4):219-229.
- Acosta M, Filippa V, Mohamed F. Folliculostellate cells in pituitary pars distalis of male vizcacha: an immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study. *Eur J Histochem* 2010; 54(1): e1, 2010.

cleos supraóptico y paraventricular). En el trayecto axonal se presentan los cuerpos de Hering (neurocrinia) y a nivel extracelular se observa material acumulado (fig. 2.18 A y B).

Referencias

- Acosta M, Mohamed F. Pituitary pars intermedia of male vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(4):219-229.
- Acosta M, Filippa V, Mohamed F. Folliculostellate cells in pituitary pars distalis of male vizcacha: an immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study. *Eur J Histochem* 2010; 54(1): e1, 2010.
- Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Arcilla C, Tobet S, Boehm U. Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology* 2012; 153(10):4729-39.
- Allaerts W, Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate research. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(1):1-12.
- Allaerts W, Carmeliet, Deneff C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Tijssen AM, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Antunes JL and Muraszko K. The vascular supply of the hypothalamus-pituitary axis. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990; 47: 42-47.
- Barlier A, Pellegrini-Bouiller I, Caccavelli L, Gunz G, Morange-Ramos I, Jaquet P, Enjalbert A. Abnormal transduction mechanisms in pituitary adenomas. *Horm Res* 1997; 47(4-6):227-234.

- Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Arcilla C, Tobet S, Boehm U. Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology* 2012; 153(10):4729-39.
- Allaerts W, Vankelecom H. History and perspectives of pituitary folliculo-stellate research. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(1):1-12.
- Allaerts W, Carmeliet, Deneff C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Tijssen AM, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Antunes JL and Muraszko K. The vascular supply of the hypothalamus-pituitary axis. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990; 47: 42-47.
- Barlier A, Pellegrini-Bouiller I, Caccavelli L, Gunz G, Morange-Ramos I, Jaquet P, Enjalbert A. Abnormal transduction mechanisms in pituitary adenomas. *Horm Res* 1997; 47(4-6):227-234.
- Bonnefont X, Lacampagne A, Sánchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, Smallwood S, Carmignac D, Fontanaud P, Travo P, Alonso T, Courtois-Pais N, Pincus SM, Robinson IC, Mollard P. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(46):16880-85.
- Childs GV, Unabia G, Miller BT, Collins TJ. Differential expression of gonadotropin and prolactin antigens by GHRH target cells from male and female rats. *J Endocrinol* 1999; 162:177-187.
- Childs GV. Division of labour among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50:215-286.
- Childs GV. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(5):168-175.

Bonnefont X, Lacampagne A, Sánchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, Smallwood S, Carmignac D, Fontanaud P, Travo P, Alonso T, Courtois-Pais N, Pincus SM, Robinson IC, Mollard P. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(46):16880-85.

Childs GV, Unabia G, Miller BT, Collins TJ. Differential expression of gonadotropin and prolactin antigens by GHRH target cells from male and female rats. *J Endocrinol* 1999; 162:177-187.

Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50:215-286.

Childs GV. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(5):168-175.

Childs GV. Multipotential pituitary cells that contain adrenocorticotropin (ACTH) and other pituitary hormones. *Trends Endocrinol Metab* 1991; 2(3):112-117.

Cocchia D, Miani N. Immunocytochemical localization of brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 1980; 9(6):7712-82.

Corliss CE, Wilbur DL, Worthington WC. Blood circulation of pituitary gland. Blood vessels and lymphatics in organ systems. In: Abramson DI, Dobrin PB eds. Academic Press, New York, 1984: 259-295.

Cónsole GM, Gómez Dumm CLA. Histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructura de la adenohipófisis. *Temas de Histología y Embriología animal*. Ed. Inarbite, Buenos Aires, 1997a; 2: 153-173.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997b; 95(3):157-166.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat* 1995; 152(1):28-32.

Childs GV. Multipotential pituitary cells that contain adrenocorticotropin (ACTH) and other pituitary hormones. *Trends Endocrinol Metab* 1991; 2(3):112-117.

Cocchia D, Miani N. Immunocytochemical localization of brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 1980; 9(6):7712-82.

Corliss CE, Wilbur DL, Worthington WC. Blood circulation of pituitary gland. Blood vessels and lymphatics in organ systems. In: Abramson DI, Dobrin PB eds. Academic Press, New York, 1984: 259-295.

Cónsole GM, Gómez Dumm CLA. Histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructura de la adenohipófisis. *Temas de Histología y Embriología animal*. Ed. Inarbite, Buenos Aires, 1997a; 2: 153-173.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997b; 95(3):157-166.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat* 1995; 152(1):28-32.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.

Cónsole GM, Jurado SB, Ferese C, Gómez Dumm CL. Quantitative immunohistochemical changes of pituitary gonadotrophs in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997c; 3(1):19-26.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Fluctuations of the pituitary thyrotropes in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997d; 3(1):3-8.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *BioCell* 1998; 22(3):197-205.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.

Cónsole GM, Jurado SB, Ferese C, Gómez Dumm CL. Quantitative immunohistochemical changes of pituitary gonadotrophs in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997c; 3(1):19-26.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Fluctuations of the pituitary thyrotropes in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997d; 3(1):3-8.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *BioCell* 1998; 22(3):197-205.

Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immuno-histochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1): 25-32.

Dada MO, Campbell GT, Blake CA. The localization of gonadotrophs in normal adult male and female rats. *Endocrinology* 1984; 114(2):397-406.

Duvernoy H. On the vascularization of the hypophysis. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 1969; 69(7):469-481.

Frawley LS, Boockfor FR. Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev* 1991; 12(4):337-355.

García-Hernández MP, García-Ayala A, Elbal MT, Agulleiro B. The adeno-hypophysis of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue Cell* 1996; 28(5):577-585.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France). Endocrinologie-Nutrition* 1993; 10-017-A-10: 1-24.

Girod C, Trouillas J, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (Folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3):505-511.

Gorczyca W, Hardy J. Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery* 1987; 20(3):369-378.

Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immuno-histochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1): 25-32.

Dada MO, Campbell GT, Blake CA. The localization of gonadotrophs in normal adult male and female rats. *Endocrinology* 1984; 114(2):397-406.

Duvernoy H. On the vascularization of the hypophysis. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 1969; 69(7):469-481.

Frawley LS, Boockfor FR. Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev* 1991; 12(4):337-355.

García-Hernández MP, García-Ayala A, Elbal MT, Agulleiro B. The adeno-hypophysis of Mediterranean yellowtail, *Serioladumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue Cell* 1996; 28(5):577-585.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France). Endocrinologie-Nutrition* 1993; 10-017-A-10: 1-24.

Girod C, Trouillas J, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (Folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3):505-511.

Gorczyca W, Hardy J. Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery* 1987; 20(3):369-378.

Grandi G, Chicca M. Early development of the pituitary gland in *Acipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 2004; 208(4):311-321.

Grandi G, Marchetti MG, Lanzoni M, Chicca M. Immunocytochemical and ultrastructural identification of adeno-hypophyseal cells in *Ctenopharyngodon idella* (Cypriniformes Cyprinidae) during gonadal differentiation. *Fish Physiol Biochem* 2014; 40(4):1115-1139.

Hodson DJ, Mollard P. Pituitary endocrine cells networks - 10 years and beyond. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(2):56-58.

- Grandi G, Chicca M. Early development of the pituitary gland in *Acipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 2004; 208(4):311-321.
- Grandi G, Marchetti MG, Lanzoni M, Chicca M. Immunocytochemical and ultrastructural identification of adenohypophyseal cells in *Ctenopharyngodon idella* (Cypriniformes Cyprinidae) during gonadal differentiation. *Fish Physiol Biochem* 2014; 40(4):1115-1139.
- Hodson DJ, Mollard P. Pituitary endocrine cells networks - 10 years and beyond. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(2):56-58.
- Hodson DJ, Schaeffer M, Romano N, Fontanaud P, Lafont C, Birkenstock J, Molino F, Christian H, Lockey J, Carmignac D, Fernández-Fuente M, Le Tissier P, Mollard P. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun* 2012; 3: 605.
- Hofler H, Walter GF, Denk H. Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 1984; 65(1):35-40.
- Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T. Living cells imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol* 2010; 204(2):115-123.
- Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K. Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroectomy cells. A morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1990; 63(4):511-520.
- Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 1999; 62(3):205-218.
- Jezirowski T, Watanabe T, Bargsten T, Grube D. Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch Histol Cytol* 1997; 60(4):355-370.
- Kaspers RS, Shved N, Takahashi A, Reinecke M, Eppler E. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, beta-TSH, beta-FSH, beta-LH, ACTH, and alpha-MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia. *Cell Tissue Res* 2006; 325(2):303-313.
- Kawauchi H, Sower SA. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 148(1):3-14.
- Kikuchi M, Yatabe M, Tando Y, Yashiro T. Immunohistochemical localization of anterior pituitary hormones in S-100 protein-positive cells in the rat pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2011; 345(3):425-429.
- Hodson DJ, Schaeffer M, Romano N, Fontanaud P, Lafont C, Birkenstock J, Molino F, Christian H, Lockey J, Carmignac D, Fernández-Fuente M, Le Tissier P, Mollard P. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun* 2012; 3: 605.
- Hofler H, Walter GF, Denk H. Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 1984; 65(1):35-40.
- Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T. Living cells imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol* 2010; 204(2):115-123.
- Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K. Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroectomy cells. A morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1990; 63(4):511-520.
- Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 1999; 62(3):205-218.
- Jezirowski T, Watanabe T, Bargsten T, Grube D. Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch Histol Cytol* 1997; 60(4):355-370.
- Kaspers RS, Shved N, Takahashi A, Reinecke M, Eppler E. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, beta-TSH, beta-FSH, beta-LH, ACTH, and

alpha-MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, teh Nile tilapia. *Cell Tissue Res* 2006; 325(2):303-313.

Kawauchi H, Sower SA. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 148(1):3-14.

Kikuchi M, Yatabe M, Tando Y, Yashiro T. Immunohistochemical localization of anterior pituitary hormones in S-100 protein-positive cells in the rat pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2011; 345(3):425-429.

Kurosumi K. A review: classification and ultrastructure of anterior pituitary cells and their role in function of hormone secretion. *Kaibogaku Zasshi* 1991; 66(5):421-451.

Laiz-Carrión R, del Mar Segura Noguera M, del Pilar Martín del Río M, Mancera JM. Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). *Gen Comp Endocrinol* 2003; 132(3):454-464.

Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):252-266.

Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO. Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favor of mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* 1985; 116(4):1371-78.

Marin F, Stefanescu L, Kovacs K. Folliculostellate cells of the pituitary. *Endocr Pathol* 1991; 2:180-192.

Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K. S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 1980; 191(2):523- 531.

Nakane PK. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1970; 18(1):9-20.

Nogami H and Yoshimura F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 1982; 202(2):261-274.

Nozaki M, Ominato K, Takahashi A, Kawauchi H, Sower SA. Adenohypophysial cell types in the lamprey pituitary: current state of the art. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129(2-3):303-309.

Kurosumi K. A review: classification and ultrastructure of anterior pituitary cells and their role in function of hormone secretion. *Kaibogaku Zasshi* 1991; 66(5):421-451.

Laiz-Carrión R, del Mar Segura Noguera M, del Pilar Martín del Río M, Mancera JM. Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). *Gen Comp Endocrinol* 2003; 132(3):454-464.

Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):252-266.

Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO. Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favour of mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* 1985; 116(4):1371-78.

Marin F, Stefanescu L, Kovacs K. Folliculostellate cells of the pituitary. *Endocr Pathol* 1991; 2:180-192.

Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K. S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 1980; 191(2):523- 531.

Nakane PK. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1970; 18(1):9-20.

Nogami H and Yoshimura F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 1982; 202(2):261-274.

Nozaki M, Ominato K, Takahashi A, Kawauchi H, Sower SA. Adenohypophysial cell types in the lamprey pituitary: current state of the art. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129(2-3):303-309.

Núñez L, Villalobos C, Senovilla L, García-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 549(Pt3):835-843.

Orgnero de Gaisán E, Maldonado C, Díaz Gavier MF, Aoki A. Diversity of pituitary cells in primary cell culture. An immunocytochemical study. *Ann Anat* 1997; 179(5):453-460.

Núñez L, Villalobos C, Senovilla L, García-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 549(Pt3):835-843.

Orgnero de Gaisán E, Maldonado C, Díaz Gavier MF, Aoki A. Diversity of pituitary cells in primary cell culture. An immunocytochemical study. *Ann Anat* 1997; 179(5):453-460.

Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Inoue K. Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol* 2012; 213(3):231-237.

Pasolli HA, Torres AI, Aoki A. The mammosomatotroph: a transitional cell between growth hormone and prolactin producing cells? An immuno-cytochemical study. *Histochemistry* 1994; 102(4):287-296.

Perryman EK. Folliculo-stellate cells of the pituitary gland. What role do these star-shaped cells play? *Bioscience* 1989; 39:81-88.

Phifer RF and Spicer SS. Immunohistochemical and histologic demonstration of thyrotropic cells of the human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(6):1210-21.

Phifer RF, Midgley AR, Spicer SS. Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(1):125-141.

Pope C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol* 2006; 297(1):172-181.

Porter TE, Wiles CD, Frawley LS. Evidence for bidirectional interconversion of mammatropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning. *Endocrinology* 1991; 129(3):1215-20.

Rinehart JF, Farquhar MG. Electron microscopic studies of anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1953; 1(2):93-113.

Sánchez Cala F, Portillo A, Martín del Río MP, Mancera JM. Immunocytochemical characterization of adenohypophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). *Tissue Cell* 2003; 35(3):169-178.

Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Inoue K. Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol* 2012; 213(3):231-237.

Pasolli HA, Torres AI, Aoki A. The mammosomatotroph: a transitional cell between growth hormone and prolactin producing cells? An immuno-cytochemical study. *Histochemistry* 1994; 102(4):287-296.

Perryman EK. Folliculo-stellate cells of the pituitary gland. What role do these star-shaped cells play? *Bioscience* 1989; 39:81-88.

Phifer RF and Spicer SS. Immunohistochemical and histologic demonstration of thyrotropic cells of the human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(6):1210-21.

Phifer RF, Midgley AR, Spicer SS. Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(1):125-141.

Pope C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol* 2006; 297(1):172-181.

Porter TE, Wiles CD, Frawley LS. Evidence for bidirectional interconversion of mammatropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning. *Endocrinology* 1991; 129(3):1215-20.

Rinehart JF, Farquhar MG. Electron microscopic studies of anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1953; 1(2):93-113.

Sánchez Cala F, Portillo A, Martín del Río MP, Mancera JM. Immunocytochemical characterization of adenohypophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). *Tissue Cell* 2003; 35(3):169-178.

Sánchez-Cárdenas C, Fontanaud P, El Z, Lafont C, Meunier AC, Schaeffer M, Carmignac D, Molino F, Coutry N, Bonnefont X, Gouty-Colomer LA, Gavois E, Hodson DJ, Le Tissier P, Robinson IC, Mollard P. Pituitary growth hormone network responses are sexually dimorphic and regulated by gonadal steroids in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(50): 21878-83.

- Sánchez-Cárdenas C, Fontanaud P, El Z, Lafont C, Meunier AC, Schaefer M, Carmignac D, Molino F, Coutry N, Bonnefont X, Gouty-Colomer LA, Gavois E, Hodson DJ, Le Tissier P; Robinson IC, Mollard P. Pituitary growth hormone network responses are sexually dimorphic and regulated by gonadal steroids in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(50): 21878-83.
- Sato G, Shirasawa N, Sakuma E, Sato Y, Asai Y, Wada Y, Horiuchi O, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell* 2005; 37(4):269-280.
- Sato S. Postnatal development, sexual difference and sexual cyclic variation of prolactin cells in rats: special reference to the topographic affinity to gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(5):573-583.
- Scheithauer BW, Kovacs KT, Randall RV, Ryan N. Effects of estrogen on the human pituitary: a clinicopathologic study. *Mayo Clin Proc* 1989; 64(9):1077-84.
- Scheithauer BW, Sano T, Kovacs KT, Young WF, Ryan N, Randall RV. The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clinic Proc* 1990; 65(4):461-474.
- Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F. Pituitary folliculostellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res* 1983; 231(2):235-249.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV. In situ hybridization study of pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression in human pituitary corticotrophs and their adenomas. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1991; 419(2):107-113.
- Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Cohen SM, Lloyd RV, Scheithauer BW. Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. *Virchows Arch* 2000; 436:43-51.
- Sato G, Shirasawa N, Sakuma E, Sato Y, Asai Y, Wada Y, Horiuchi O, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell* 2005; 37(4):269-280.
- Sato S. Postnatal development, sexual difference and sexual cyclic variation of prolactin cells in rats: special reference to the topographic affinity to gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(5):573-583.
- Scheithauer BW, Kovacs KT, Randall RV, Ryan N. Effects of estrogen on the human pituitary: a clinicopathologic study. *Mayo Clin Proc* 1989; 64(9):1077-84.
- Scheithauer BW, Sano T, Kovacs KT, Young WF, Ryan N, Randall RV. The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clinic Proc* 1990; 65(4):461-474.
- Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F. Pituitary folliculostellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res* 1983; 231(2):235-249.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV. In situ hybridization study of pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression in human pituitary corticotrophs and their adenomas. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1991; 419(2):107-113.
- Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Cohen SM, Lloyd RV, Scheithauer BW. Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. *Virchows Arch* 2000; 436:43-51.
- Vila-Porcile E, Olivier L. The problem of the folliculostellate cells in the pituitary gland. Ultrastructure of the endocrine cells and tissues. In Motta PM ed. *Martinus Nijhoff Publ, Boston-The Hague*, 1984:64-76.
- Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004b; 287(6):E1166-70.

Vila-Porcile E, Olivier L. The problem of the folliculo-stellate cells in the pituitary gland. Ultrastructure of the endocrine cells and tissues. In Motta PM ed. Martinus Nijhoff Publ, Boston-The Hague, 1984:64-76.

Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004b; 287(6): E1166-70.

Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch* 2004a; 449(3):257-264.

Villaplana M, García Ayala A, Agulleiro B. Immunocytochemical demonstration of melanotropic and adrenocorticotrophic cells from the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) by light and electron microscopy: an ontogenic study. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 125(3):410-425.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(9):1441-49.

Yoshimura F and Nogami H. Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rats. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(1):43-51.

Yoshimura F, Nogami H, Yashiro T. Fine structural criteria for pituitary thyrotrophs in immature and mature rats. *Anat Rec* 1982; 204(3):255-263.

Zegarelli-Schmidt E, Xu XR, Fenoglio-Preiser CM, O'Toole K, Pushparaj N, Kledzik G, King DW. Endocrine changes associated with the human aging process. II. Effect of age on the number and size of thyrotropin immunoreactive cells in the human pituitary. *Hum Pathol* 1985, 16(3):277-286.

Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch* 2004a; 449(3):257-264.

Villaplana M, García Ayala A, Agulleiro B. Immunocytochemical demonstration of melanotropic and adrenocorticotrophic cells from the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) by light and electron microscopy: an ontogenic study. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 125(3):410-425.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. Cells of anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(9):1441-49.

Yoshimura F and Nogami H. Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rats. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(1):43-51.

Yoshimura F, Nogami H, Yashiro T. Fine structural criteria for pituitary thyrotrophs in immature and mature rats. *Anat Rec* 1982; 204(3):255-263.

Zegarelli-Schmidt E, Xu XR, Fenoglio-Preiser CM, O'Toole K, Pushparaj N, Kledzik G, King DW. Endocrine changes associated with the human aging process. II. Effect of age on the number and size of thyrotropin immunoreactive cells in the human pituitary. *Hum Pathol* 1985, 16(3):277-286.

CAPÍTULO 3

Interacciones paracrinas adenohipofisarias

La hipófisis anterior es una glándula endocrina productora de seis hormonas tróficas: corticotrofina (ACTH), hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), tirotrófina (TSH), hormona foliculo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Cada una de estas hormonas es expresada por un tipo celular altamente diferenciado que se origina en una célula madre común cuya expresión fenotípica es determinada por los factores de transcripción, los receptores de superficie y las señales hipotalámicas (Rosenfeld y col., 1996; Mangalam y col., 1989; Horn y col., 1989; Theill y Karin, 1993; Ray y Melmed, 1997; Vankelecom y Gremeaux, 2010; Davis y col., 2013; Welcker y col., 2013, Vankelecom y Chen, 2014; Willems y col., 2016).

Las células endocrinas y no endocrinas (células foliculo-estelares: FE) están organizadas en redes estructurales y funcionales que se forman durante el desarrollo embrionario y que se modifican durante toda la vida. El mapeo estructural ha permitido detectar dichas redes

CHAPTER 3

Paracrine interactions in adenohipophysis

The anterior pituitary is an endocrine gland that produces six trophic hormones: corticotropin (ACTH), growth hormone (GH), prolactin (PRL), thyrotropin (TSH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). These hormones are expressed by a highly differentiated cell type that originates in a common stem cell whose phenotype expression is determined by transcription factors, surface receptors and hypothalamic signals (Rosenfeld et al., 1996; Mengalam et al., 1989; Horn et al., 1989; Theill and Karin, 1993; Ray and Melmed, 1997; Vankelecom and Gremeaux, 2010; Davis et al., 2013; Welcker et al., 2013; Vankelecom and Chen, 2014; Willems et al., 2016).

Endocrine and non-endocrine cells (folliculo-stellate cells: FS) are organized into structural and functional networks formed during the embryonic development and modified along the entire life. Structural mapping has allowed the detection of those networks that connect to blood vessels and that can recall information in order to adapt to in-

conectadas a los vasos sanguíneos y con memoria de la información para adaptarse a los cambios intrapituitarios e hipotalámicos (Le Tissier y col., 2012). Se ha comunicado un patrón de expresión de la proteína de unión adherente (cadherina) en los contactos intercelulares pituitarios que determinaría las redes celulares homotípicas (Chauvet y col., 2009). Los avances en imágenes tridimensionales (3D) han enriquecido la histología tradicional de la glándula pituitaria, mostrando diferentes linajes celulares conectados en redes, a fin de coordinar las respuestas a los diferentes secretagogos (Mollard y col., 2012).

Las poblaciones responsables de la secreción de las hormonas de la pituitaria anterior son reguladas por el sistema nervioso central a través de **factores hipotalámicos estimuladores e inhibidores**, así como por **mecanismos de retroalimentación** mediados por hormonas de las glándulas endocrinas periféricas.

Ciertas proteínas producidas a nivel intrapituitario regulan la función y la organización celular. Estos **factores de crecimiento y citoquinas**, además de mediar en la división celular, controlan la expresión de genes específicos de las hormonas tróficas. Por lo tanto, esta red de señales intrahipofisarias provee otro nivel de control integrado con señales centrales y periféricas que modulan la secreción de las hormonas tróficas y la proliferación celular. Estos factores de crecimiento pituitarios presentan una función dual: regulan la replicación celular y controlan la expresión de los genes de diferenciación. La mayoría de los factores de crecimiento parecen ser sintetizados por las células secretoras de las hormonas tróficas (Halper y col., 1992; Thapar y col., 1995). El control intrínseco intrapituitario depende de las señales autocrinas y paracrinas (Denef y col., 1989; Jones y col., 1990). Los factores activina (Ling y col., 1986), endotelina (Dymshits y col., 1992), óxido nítrico (Duvilanski y col., 1995), neuropéptidos (O'Halloran y col., 1990), citoquinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I), polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP), grelina, adenosina y otros, están implicados mediante una acción autocrina-paracrina en una compleja red de regulación intrapituitaria (Bilezikjian y Vale, 2011).

trypituitary and hypothalamic changes (Le Tissier et al., 2012). An expression pattern of the adherent junction protein (cadherin) has been reported in the pituitary intercellular contacts that would determine the networks of homotypic cells (Chauvet et al., 2009). Progress in three-dimensional (3D) images has enriched the traditional histology of the pituitary gland, evidencing the different cell lines connected in networks so as to coordinate responses with the different secretagogues (Mollard et al., 2012).

The different populations responsible for the anterior pituitary hormone secretion are regulated by the central nerve system by **stimulating and inhibiting hypothalamic factors**, as well as by **mechanisms of feedback** mediated by hormones of the peripheral endocrine cells.

Some proteins produced at the intrapituitary level regulate the cell function and organization of the anterior hypophysis. These **growth factors** and **cytokines**, apart from mediating cell division, regulate the expression of specific genes of the tropic hormones. Thus, this network of intrapituitary signals provides another level of integrated control with central and peripheral signals that modulate the secretion of tropic hormones and cell proliferation. These hypophyseal growth factors present a dual function: they regulate cell development and replication and control the expression of differentiation genes. Most hypophyseal growth factors are apparently synthesized by the secreting cells of tropic hormones (Harper et al., 1992; Thapar et al., 1995). Although the hypophysis is a gland that regulates somatic growth, there is evidence that shows that some intrapituitary chemical mediators function as regulators of the gland functions. The intrapituitary intrinsic control depends on autocrine and paracrine signals (Denef et al., 1989; Jones et al., 1990). Activin (Ling et al., 1986), endothelin (Dymshitz et al., 1992), nitric oxide (Duvilanski et al., 1995), different neuropeptides (O'Halloran et al., 1990), cytokines, fibroblastic growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor type I (IGF-I), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), ghrelin, adenosine and others are involved by

La yuxtaposición entre grupos celulares específicos está relacionada con la liberación de un gran número de agentes paracrinos al espacio intercelular (Jones y col., 1990). Además, las enzimas convertidoras de renina y angiotensina han sido inmunomarcadas a nivel de las células gonadotropas (Deschepper y col., 1986). Soji y Herbert (1990) detectaron que las comunicaciones intercelulares dentro de la pituitaria anterior cambiaron luego de la castración o de la inyección de hormona liberadora de LH (LHRH) o de testosterona y hallaron un menor desarrollo folicular con reducido número de uniones hendidura en animales castrados con/sin LHRH, respecto a los controles. En contraste, los animales que recibieron testosterona evidenciaron ultraestructura similar a los intactos. Se ratificó que las células FE agranulares inmunomarcadas con proteína S100, portadoras de receptores β adrenérgicos, podrían actuar como células progenitoras ya que muestran mitosis (Soji y col., 1997). Kurono (1996) logró aumentar el número de uniones hendidura en las células FE, bajo la influencia de los esteroides gonadales. Wada y col. (2014) comunicaron en un estudio ultraestructural que el sistema de células FE-neuronas LHRH de *pars tuberalis* regularían la secreción de LH, junto con el sistema porta hipofisario.

La angiotensina II y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) actuarían como estímulos para la liberación de PRL mediante un mecanismo autocrino (Nagy y col., 1988). Las acciones mitogénicas y anti-mitogénicas de los estrógenos sobre las lactotropas no requerirían señales paracrinas de otros tipos celulares pituitarios, ya que la acción estrogénica sería directa. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF) inhibió la proliferación lactotropa y su inmunoneutralización no pudo bloquear la proliferación inducida por los estrógenos. Además, los niveles celulares de FGF no fueron alterados por el tratamiento estrogénico (Ishida y col., 2007). Rossier y col. (1980) comunicaron que los péptidos opioides detectados en la pituitaria anterior tendrían un posible rol en la liberación paracrina de la GH. Además, el factor liberador de corticotrofina (CRH) podría estimular la liberación de LH, indicando una probable interacción paracrina entre corticotropas y gonadotropas (Blumenfeld y col., 1986). El

means of autocrine-paracrine factors in a complex network of intrapituitary regulation (Bilezikjian and Vale, 2011).

Juxtapositions among some specific cell groups could be partly related to the release of a high number of paracrine agents to the intercellular space (Jones et al., 1990). Also, the renin-angiotensin converting enzymes have been immunostained at gonadotrope level (Deschepper et al., 1986). Soji and Herbert (1990) detected that intercellular communications within the anterior pituitary changed after castration or after releasing hormone of LH (LHRH) or testosterone injection and found a minor follicular development with a reduced number of cleft junctions in castrated animals with or without LHRH compared to controls. In contrast, those animals that received testosterone evidenced an ultrastructure similar to that in intact animals. Agranular FS cells that were immunostained with S100, β -adrenergic receptor carrier, were confirmed to likely act as stem cells due to the presence of mitosis (Soji et al., 1997). Kurono (1996) managed to increase the number of cleft junctions in the FS cells under the influence of gonadal steroids. Wada et al. (2014) reported in an ultrastructural study that the system of FS cells-LHRH neurons in the *pars tuberalis* would regulate LH secretion, together with the hypophyseal portal system.

Angiotensin II and the vasoactive intestinal peptide (VIP) would be stimuli for PRL release by means of an autocrine mechanism (Nagy et al., 1988). Mitogenic and antimitogenic actions of estrogens on lactotropes would not need paracrine signals of other pituitary cell types, as the estrogenic action would be direct. The fibroblastic growth factor (FGF) inhibited lactotrope proliferation and its immunoneutralization could not block the proliferation induced by estrogens. Also, FGF cellular levels were not altered by the estrogenic treatment (Ishida et al, 2007). Rossier et al. (1980) reported that the opioid peptides detected in the anterior pituitary are likely to play a role in the paracrine release of GH. Also, the corticotropin releasing factor (CRH) might stimulate LH release, showing a possible paracrine interaction between corticotropes and gonadotropes

factor de crecimiento epidérmico estimuló la secreción de PRL y GH, mientras que el FGF potenció la liberación de TSH (Jones y col., 1990). La red tridimensional de las células endocrinas pituitarias permitió ratificar la presencia de comunicaciones célula-célula mediante uniones adherentes. Esta conectividad física mediaría las respuestas para coordinar la secreción hormonal pulsátil de la GH (Asa y Tannenbaum, 2006).

Las células FE producen factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo la folistatina que regularía la FSH uniéndose a la activina. Las células FE ejercen un control paracrino sobre la población gonadotropa, ya que el aumento del PACAP estimularía la folistatina con descenso del ARNmFSH β y la activación del gen ARNmLH β (Winters y Moore, 2007). Filippa y col. (2012) estudiaron las asociaciones entre las células pituitarias de vizcacha y hallaron gonadotropas mono y bihormonales (FSH/LH) rodeadas de lactotropas y conectadas con las células FE. Durante el fotoperíodo largo, las asociaciones más numerosas fueron entre células LH-GH y LH-TSH.

Las células adenohipofisarias no están distribuidas al azar. Por el contrario, se localizan de modo preciso dentro de la glándula (Papka y col., 1986) y muestran prevalencia de asociaciones selectivas con implicancias en los mecanismos paracrinos. Las vías de comunicación entre las células dependieron del grado de yuxtaposición entre ciertos grupos celulares específicos.

Los hallazgos morfológicos detectados mediante inmunomarcación doble proveen una herramienta útil en este campo (Falini y col., 1982). Hemos detectado frecuentes asociaciones entre células somatotropas-corticotropas y lactotropas-gonadotropas, en correlación con otros estudios (Siperstein y Miller, 1970; Jones y col., 1990).

Nuestros hallazgos inmunohistoquímicos detectaron células somatotropas dispersas por toda la *pars distalis*, siendo más numerosas en la zona centro-dorsal y estando casi ausentes cerca de la *pars intermedia*. Hemos hallado yuxtaposición de somatotropas con corticotropas (46%) (**fig. 3.1**), con células FE (19%), con tirotropas (18%) y con lactotropas (17%) (Cónsole y col., 1999).

(Blumenfeld et al., 1986). The epidermal growth factor stimulated PRL and GH secretion, while FGF increased TSH release (Jones et al., 1990). The three-dimensional pituitary endocrine cell network allowed confirming the presence of cell-cell communications with adherens junctions. This physical connectivity would influence the responses to coordinate the pulsatile secretion of GH (Asa and Tannenbaum, 2006).

FS cells produce growth factors and cytokines, including follistatin that would regulate FSH joining activin. FS cells exert a paracrine control on the gonadotrope population, since the increase of the *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) would stimulate follistatin with a decreased mARN β FSH and mARN β LH activation (Winters and Moore, 2007). Filippa et al. (2012) studied the associations between the pituitary cells of the 'vizcacha' and found mono- and bihormonal gonadotropes (FSH/LH) surrounded by lactotropes and connected with FS cells. In the long photoperiod most associations were between LH-GH and LH-TSH cells.

Adenohypophyseal cells are not randomly distributed. On the contrary, they are accurately localized within the gland (Papka et al., 1986) and show prevalence of selective associations involving the paracrine mechanisms. The communication paths among cells depended on the degree of juxtaposition among certain specific cell groups.

The morphological findings detected by means of double immunostaining make a useful tool in this field (Falini et al., 1982). We have found frequent associations between somatotropes/corticotropes and lactotropes/gonadotropes in correlation with other studies (Siperstein and Miller, 1970; Jones et al., 1990).

Our immunohistochemical findings detected somatotrope cells spread throughout the *pars distalis*, being more numerous in the central-dorsal zone, and nearly absent close to the *pars intermedia*. We have found juxtaposition of somatotropes and corticotropes (46%) (**fig. 3.1**), FS cells (19%), thyrotropes (18%) and lactotropes (17%) (Cónsole et al., 1999).

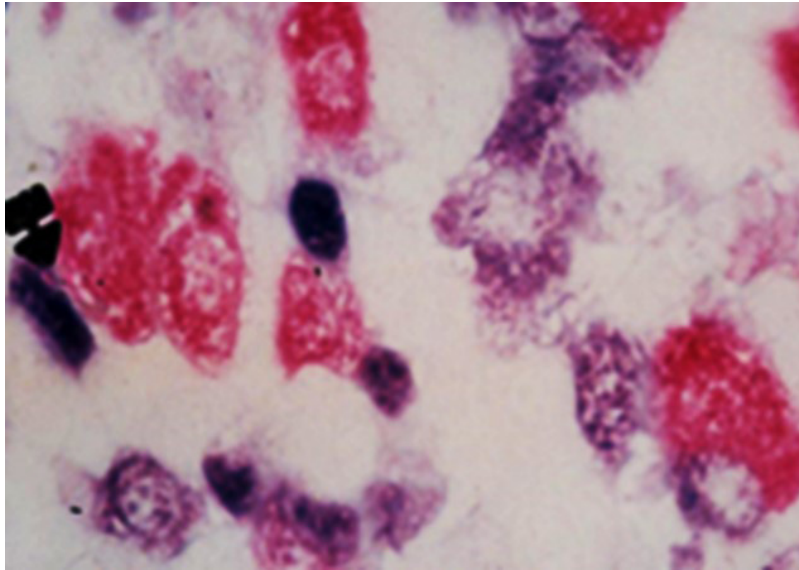


Fig. 3.1. Yuxtaposición somatotropas (azul) - corticotropas (rojo)
(En Vision peroxidasa, x 400).

Nuestras células lactotropas también aparecieron dispersas, siendo más numerosas en la región ventral de la *pars distalis*. En algunos casos, una célula lactotropa estuvo rodeada por varias gonadotropas, tal como fue comunicado por Sato (1980) y Nogami y Yoshimura (1982). Además, la afinidad entre lactotropas y gonadotropas ha sido demostrada en células pituitarias en cultivo, previamente separadas por disociación enzimática, de modo tal que al ser reagrupadas restablecieron los complejos de unión (Horvath y col., 1977). Detectamos una mayor afinidad topográfica (58%) entre lactotropas-gonadotropas (**fig. 3.2**) y un menor grado de relación con las células FE (23%) y las células somatotropas (19%) (Cónsole y col., 1999).

Se observaron escasas células mamosomatotropas (menos del 2%) que fueron inmunomarcadas de modo simultáneo con sueros anti-GH y anti-PRL (Cónsole y col., 1999). Estos datos estuvieron en concordancia con algunos autores que comunicaron 5% (Leong y col., 1985) y 0.2%

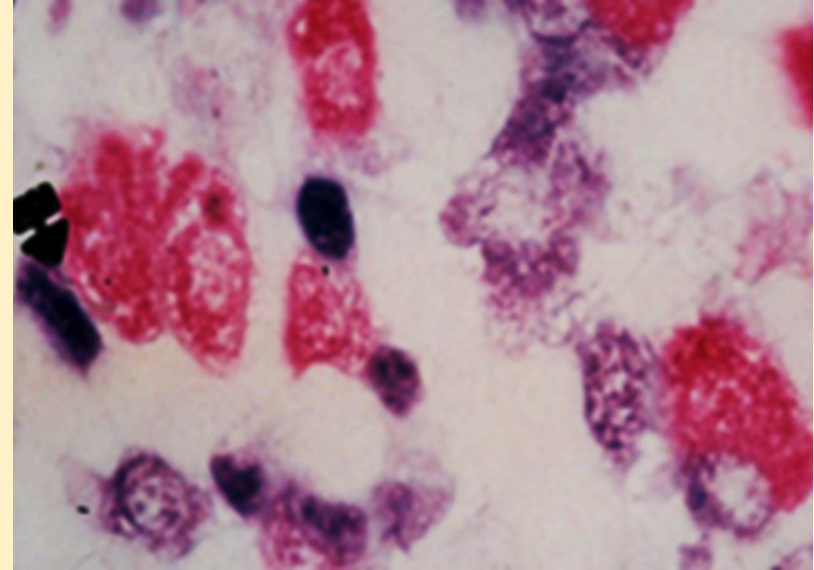


Fig. 3.1. Juxtaposition of somatotropes (blue) - corticotropes (red)
(En Vision peroxidase, x 400).

Our lactotrope cells also appeared dispersed, being more numerous in the ventral region of the *pars distalis*. In some cases, a lactotrope cell was found surrounded by various gonadotropes as reported by Sato (1980) and Nogami and Yoshimura (1982). Apart from that, the affinity between lactotropes and gonadotropes has been shown in pituitary cells in culture, previously separated by enzyme dissociation, and which after regrouping re-established the junction complexes (Horvath et al., 1977). We detected a higher topographic affinity (58%) (**fig. 3.2**) between lactotropes-gonadotropes and a minor degree of relationship with FS cells (23%) and somatotropes (19%) (Cónsole et al., 1999).

Scanty mamosomatotrope cells were observed (less than 2%), which were simultaneously immunolabeled with GH and PRL antisera (Cónsole et al., 1999). These data concurred with what was reported by some authors, 5% (Leong et al., 1985) and 0.2% of mamosomatotrope

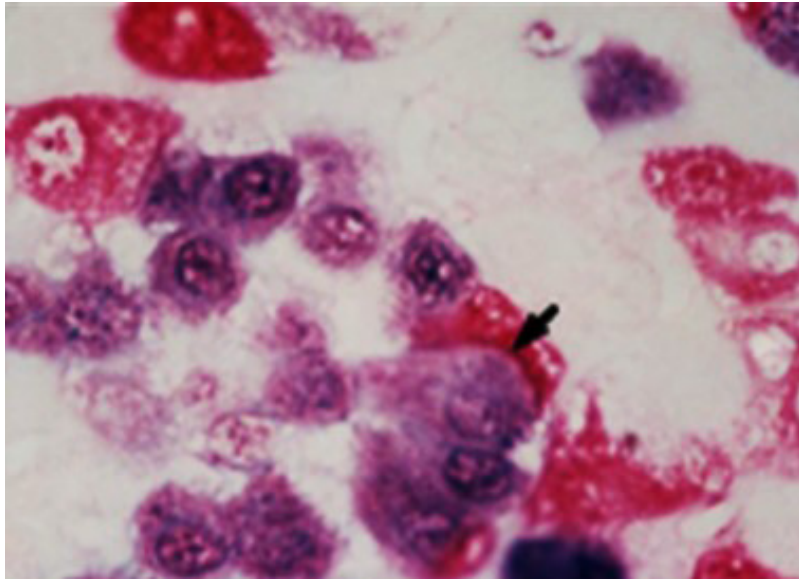


Fig. 3.2. Yuxtaposición lactotropas (azul) - luteinizantes (rojo)
(*EnVision peroxidasa, x 400*).

(Pasolli y col., 1994) de mamosomatotropas, diferenciándonos de otros autores que hallaron altos valores (15% según Frawley y col., 1985).

El estudio de nuestras células tirotropas permitió localizarlas en la región centro-ventral de la *pars distalis*, exhibiendo yuxtaposición con somatotropas (35%), con células FE (34%) (**fig. 3.3**) y con otros tipos celulares (31%) (Cónsole y col., 1999). Nuestros resultados estuvieron en concordancia con los hallazgos comunicados por Yoshimura y Nogami (1980).

Nuestro análisis inmunohistoquímico morfométrico de las gonadotropas mostró células luteinizantes y foliculotropas en grupos, principalmente en la periferia de la zona ventral de la *pars distalis*. Un gran número de células gonadotropas (78%) se tiñeron de color púrpura, por superposición del cromógeno rojo más azul. Esto se debió a que presentaron inmunomarcación simultánea con antisuero anti-LH y anti-FSH (**fig. 3.4**) (Cónsole y col., 1999).

Parece confirmarse que las diferentes características morfológicas de las gonadotropas representarían estadios funcionales de un mismo

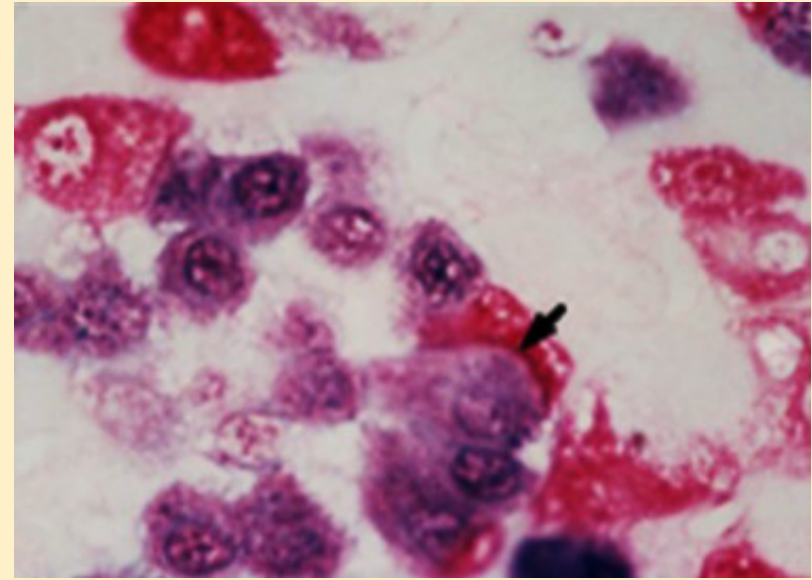


Fig. 3.2. Juxtaposition of lactotropes (blue) - luteinizing cells (red)
(*EnVision peroxidase, x 400*).

cells (Pasolli et al., 1994), differing from the high values found by other authors (15% according to Frawley et al., 1985).

The study of our thyrotropes allowed localizing them in the central-ventral region of the *pars distalis*, exhibiting juxtapposition with somatotropes (35%), FS cells (34%) (**fig. 3.3**) and other cell types (31%) (Cónsole et al., 1999). Our findings were in agreement with those reported by Yoshimura and Nogami (1980).

Our immunohistochemical morphometric analysis of gonadotropes evidenced luteinizing and folliculotrope cells in groups, mainly in the periphery of the ventral zone of the *pars distalis*. A large number of gonadotropes (78%) were purple dyed because of red and blue chromogen juxtapposition since they evidenced simultaneous immunostaining with LH and FSH antisera (**fig. 3.4**) (Cónsole et al., 1999).

It can apparently be supported that the different morphological characteristics of gonadotropes would represent functional studies

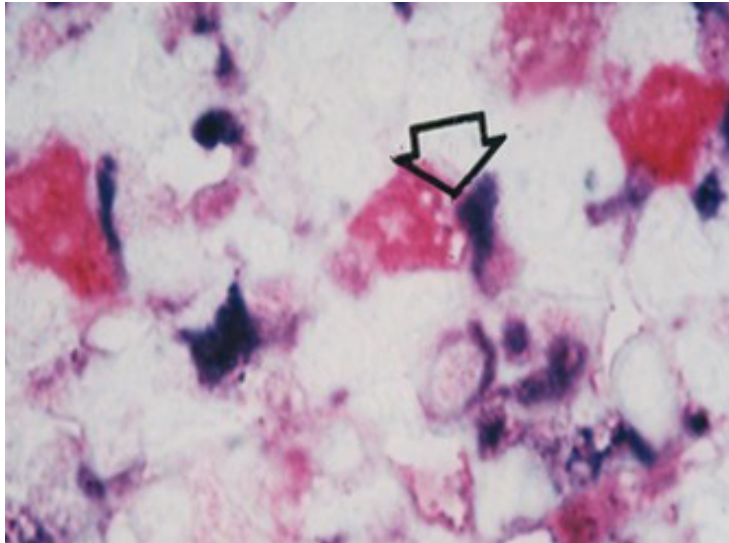


Fig. 3.3. Yuxtaposición células FE (azul) - tirotropas (rojo)
(*EnVision peroxidasa, x 400*).

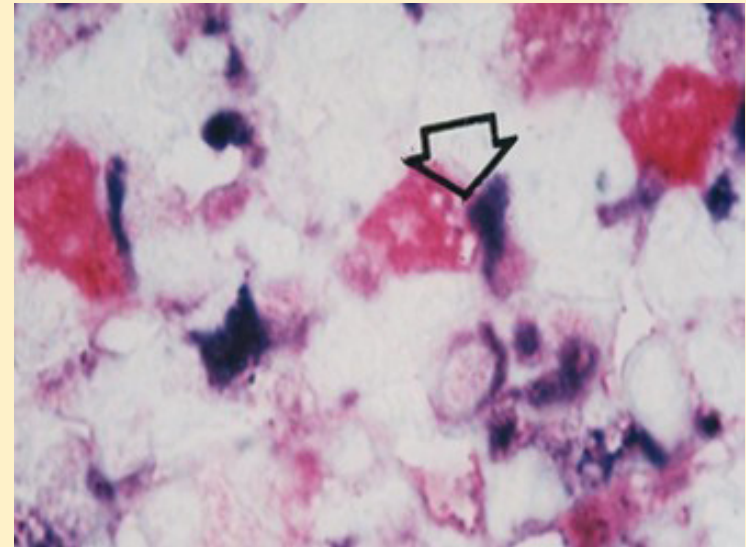


Fig. 3.3. Juxtaposition of FS cells (blue) - thyrotropes (red)
(*EnVision peroxidase, x 400*).

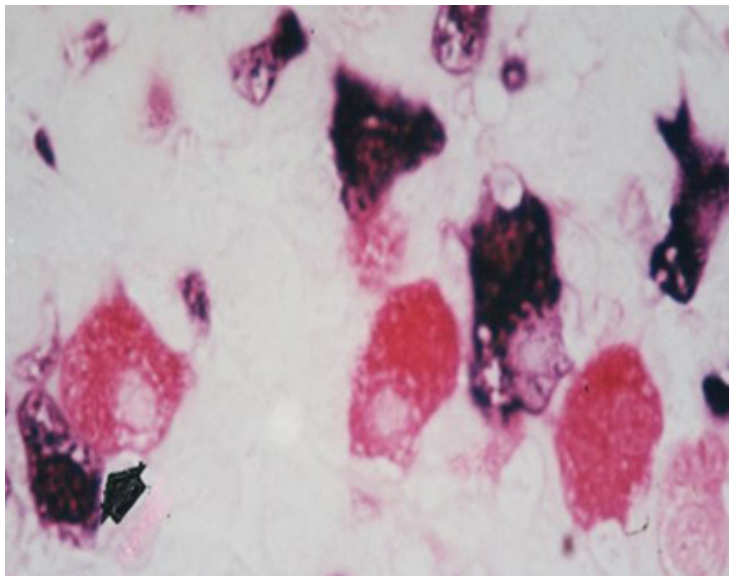


Fig. 3.4. Yuxtaposición células luteinizantes (azul) - folículotropas (rojo)
(*EnVision peroxidasa, x 400*).

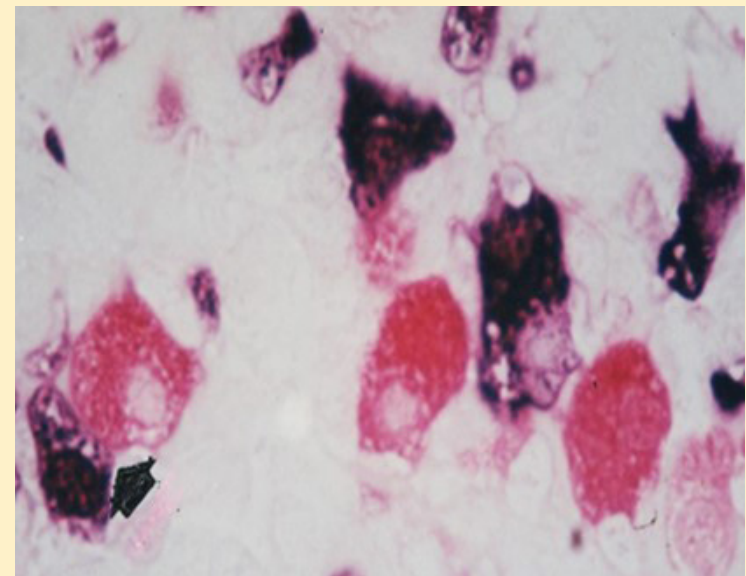
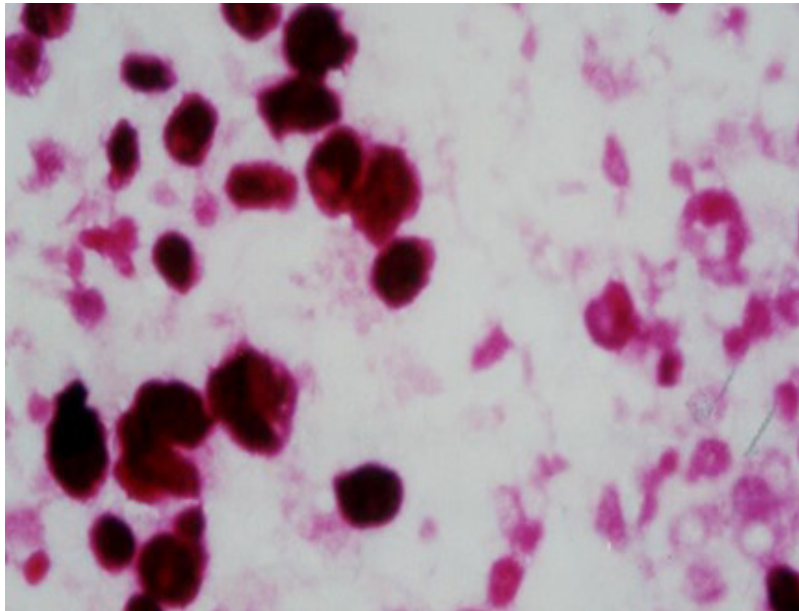


Fig. 3.4. Juxtaposition of luteinizing cells (blue) - folliculotropes (red)
(*EnVision peroxidase, x 400*).

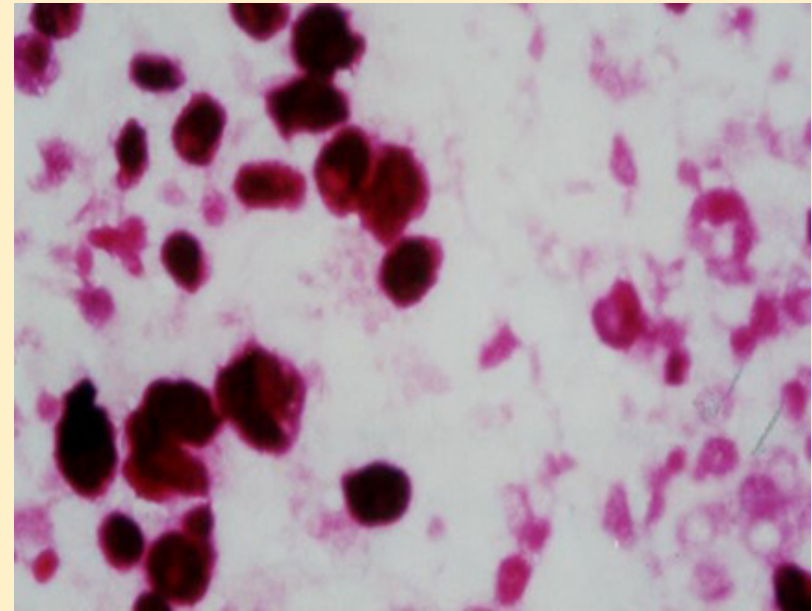


3.5. Yuxtaposición corticotropas (azul) - luteinizantes (rojo)
(*EnVision peroxidasa, x 400*).

tipo celular. Además, el concepto de división del trabajo en la población gonadotropa ha sido ratificado en estudios inmunohistoquímicos realizados por Childs (1995). Durante los picos de depósito hormonal se ha demostrado que más del 70% de las gonadotropas presentan antígenos LH y FSH (Childs y col., 1987).

Las células corticotropas inmunomarcadas en nuestro estudio aparecieron especialmente en la región centro-dorsal de la *pars distalis*. Un gran número de las mismas presentaron proyecciones citoplasmáticas cortas que rodearon a las somatotropas (58%) (**fig. 3.1**). Un menor número (18%) de corticotropas se conectaron con gonadotropas (**fig. 3.5**) (Cónsole y col., 1999).

Nuestras células FE fueron observadas en grupos o dispersas por toda la *pars distalis* y exhibieron largas prolongaciones que rodearon a los diferentes tipos de células endocrinas adyacentes, en concordancia con lo



3.5. Juxtaposition of corticotropes (blue) - luteinizing cells (red)
(*EnVision peroxidase, x 400*).

of a same cell type. Also, the concept of division of labour in the gonadotrope population has been ratified in immunohistochemical studies by Childs (1995). In the peaks of hormonal storage over 70% of gonadotropes have been shown to present LH and FSH antigens (Childs et al., 1987).

In our study immunostained corticotrope cells appeared especially in the central-dorsal region of the *pars distalis*. A large number of them presented short cytoplasmic projections around somatotropes (58%) (**fig. 3.1**), and a lesser number (18%) were connected to gonadotropes (**fig. 3.5**) (Cónsole et al., 1999).

Our FS cells were observed to appear in groups or dispersed throughout the whole *pars distalis* and to exhibit long prolongations surrounding the different types of adjacent endocrine cells, in agreement with what was reported by Vila-Porcile and Olivier (1984). We found

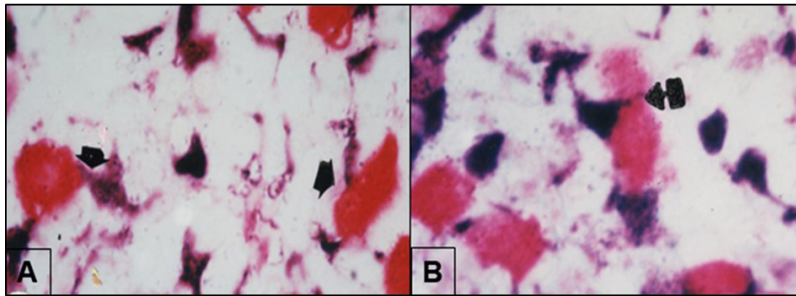


Fig. 3.6 A-B. Yuxtaposición A. Células FE (azul) - luteinizantes (rojo). B. Células FE (azul) - corticotropas (rojo) (*EnVision peroxidasa*, x 400).

documentado por Vila-Porcile y Olivier (1984). Hallamos asociaciones de células FE con: gonadotropas (32%) (**fig. 3.6 A**), lactotropas (21%), corticotropas (18%) (**fig. 3.6 B**), somatotropas (16%) y tirotropas (13%) (Cónsole y col., 1999).

Girod y col. (1985) detectaron que las células FE se relacionaban con somatotropas, lactotropas y corticotropas, al aplicar inmunocitoquímica de doble marcación. Allaerts y col. (1990) ratificaron las funciones de las células FE: sostén, trofismo, transferencia de iones-metabolitos, así como la secreción de citoquinas y factores de crecimiento. Además, se ha sugerido una función fagocítica de los restos celulares (García Navarro y col., 1989) y de los cuerpos apoptóticos (Drewett y col., 1993), así como la secreción de moléculas que actuarían como agentes paracrinos (Baes y col., 1987).

La interleuquina 6 (IL-6), secretada por las células FE, estimularía la secreción de PRL, GH y LH (Jones, 1990). El PACAP fue detectado en la línea celular TtT/FG y aumentaría la proliferación celular de las células FE, así como la producción de IL-6 y AMPc (Matsumoto y col., 1993). Además, la población FE contiene una proteína S100 que estimularía su secreción ante un descenso en la inhibición de la dopamina (Allaerts y col., 1990).

Las lactotropas, somatotropas, gonadotropas y corticotropas en cultivo modificaron su respuesta a los diferentes agentes extracelulares dependiendo de la aplicación de proporciones variables de células FE (Allaerts y col., 1994). Las interrelaciones célula a célula dentro de la

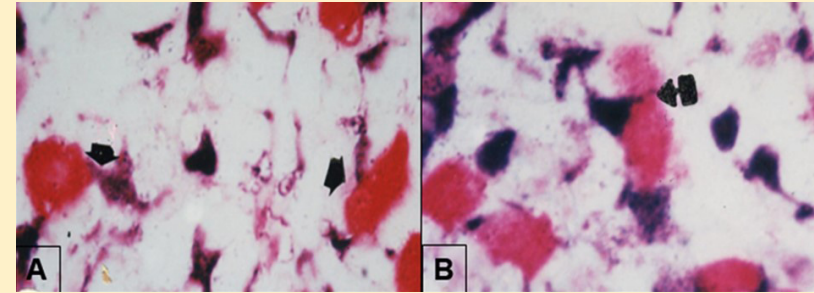


Fig. 3.6 A-B. Juxtaposition: A. FS cells (blue) - luteinizing cells (red). B. FS cells (blue) - corticotropes (red) (*EnVision peroxidase*, x 400).

associations of FS cells with gonadotropes (32 %) (**fig. 3.6A**), lactotropes (21%), corticotropes (18%) (**fig. 3.6B**), somatotropes (16%) and thyrotropes (13%) (Cónsole et al., 1999).

Girod et al. (1985) detected that FS cells were related to somatotropes, lactotropes and corticotropes after applying double staining immuno-cytochemistry. Allaerts et al. (1990) ratified FS cells functions: support, tropism, ions-metabolites transference, as well as the secretion of cytokines and growth factors. A phagocytic function has also been suggested for cell debris (García Navarro et al., 1989) and for apoptotic bodies (Drewett et al., 1993), as well as the secretion of molecules that would act as paracrine agents (Baes et al., 1987). Interleukin 6 (IL-6), secreted by FS cells, would stimulate PRL, GH and LH secretion (Jones, 1990). PACAP was detected in the TtT/FG cell lineage and would increase the cell proliferation of FS cells, as well as IL-6 production (Matsumoto et al., 1993). Besides, the FS population contains protein S-100 that would stimulate its secretion when there is a decrease in dopamine inhibition (Allaerts et al., 1990).

Lactotropes, somatotropes, gonadotropes and corticotropes in culture modified their response to the different extracellular agents depending on the application of variable proportions of FS cells (Allaerts et al., 1994). Cell-cell interrelations within the pituitary gland would apparently depend mostly on the sex steroids. Gonadectomy promoted an increased connection between FS cells and gonadotropes, whi-

glándula pituitaria parecen depender, en su mayor parte, de los esteroides sexuales. La gonadectomía promovió el aumento de las conexiones entre células FE y gonadotropas, mientras que la tiroidectomía causó un descenso en el número de células FE y una reducción de su afinidad a las células tirotropas (Shirasawa y col., 1983).

Allaerts y col. (1997a) hallaron una distribución heterogénea de las células FE, mediante estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales. Además, demostraron que las células FE producen citoquinas capaces de influenciar en la secreción hormonal (Allaerts y col., 1997b; Sato y col., 2005a-b). En la adenohipófisis aviaria se ha comunicado una relación morfológica y funcional entre tirotropas y células FE (Harrison y col., 1982). El hallazgo de hormonas adenohipofisarias en las células S100+ ha permitido sugerir que las células FE serían capaces de diferenciarse en células productoras de hormonas (Kikuchi y col., 2011). Baes y col. (1987) documentaron la comunicación funcional entre células FE y células endocrinas mediante perfusión de pituitarias.

Allaerts y col. (1994) demostraron una atenuación de las diferencias en el porcentaje de secreción en cocultivos de células gonadotropas enriquecidos con células FE, en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Además, en cultivos de pituitaria anterior, Katayama y col. (1992) sugirieron que las células FE estarían involucradas en la regulación paracrina durante la morfogénesis y en la función de las células gonadotropas por acción de la activina mediada por follistatina. Estos hallazgos podrían dar soporte a las frecuentes conexiones que hemos detectado entre ambas poblaciones mediante estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales.

Westlund y Childs (1982) comunicaron la presencia de fibras nerviosas serotoninérgicas en la pituitaria anterior y Mabuchi y col. (2008) detectaron, mediante estudios ultraestructurales, la presencia de neuronas, fibras mielínicas y amielínicas, células de sostén y células FE en la zona de transición entre *pars tuberalis*, *intermedia* y *distalis*. Shirasawa y col. (2007) presentaron un estudio inmunohistoquímico y ultraestructural sobre la relación entre células FE y neuronas GnRH de la parte dorsal de la *pars tuberalis*.

le thyroidectomy caused a decrease in the number of FS cells and in their affinity with thyrotrope cells (Shirasawa et al., 1983). Allaerts et al. (1997a) found a heterogeneous distribution of FS cells after immunohistochemical and ultrastructural studies. They also demonstrated that FS cells produce cytokines that can affect hormonal secretion (Allaerts et al., 1997b; Sato et al., 2005b). A morphological-functional relationship has been communicated in the avian adenohipophysis (Harrison et al., 1982). Finding adenohipophyseal hormones in S100+ cells has allowed suggesting that FS cells would be capable of differentiating into hormone-producing cells (Kikuchi et al., 2011). Baes et al. (1987) documented the functional communication between FS cells and endocrine cells in perfused anterior pituitary.

Allaerts et al. (1994) demonstrated in cocultures of FS cell-enriched gonadotropes a lessening of the differences in the percentage of secretion, in response to the gonadotropin releasing hormone (GnRH). Also, in cultures of the anterior pituitary, Katayama et al. (1992) suggested that FS cells would be involved in the paracrine regulation of both the morphogenesis and function of gonadotropes by the action of activin mediated by follistatin. These findings could be supportive of the frequent connections we have detected between both populations by means of immunohistochemical and ultrastructural studies.

Westlund and Childs (1982) reported the presence of serotonergic nerve fibres in the anterior pituitary and Mabuchi et al. (2008) detected, by means of ultrastructural studies, the presence of neurons, myelinated and unmyelinated nerve fibres, supporting cells and FS cells in the transition zone between *pars tuberalis*, *intermedia* and *distalis*. Shirasawa et al. (2007) presented an immunohistochemical and ultrastructural study on the relationship between FS cells and GnRH neurons in the dorsal zone of the *pars tuberalis*.

Our electron microscopy studies enabled us to confirm some immunohistochemical aspects (Cónsole et al., 1999). FS cells were found scattered within the whole area of the *pars distalis*, in close contact with the neighbouring cells by means of long cytoplasmic processes. In

Nuestros estudios de microscopía electrónica permitieron confirmar algunos aspectos inmunohistoquímicos (Cónsole y col., 1999).

Las células FE fueron halladas en toda la *pars distalis* contactando con las células vecinas. En la **fig. 3.7** se observa una célula FE conectada con varias células granulares y con un pequeño folículo intracitoplasmático central.

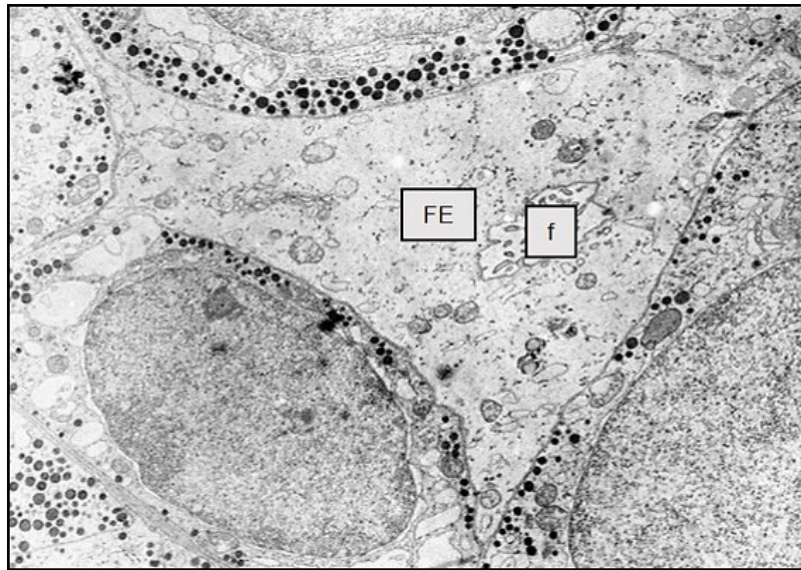


Fig. 3.7. Célula FE conectada con varias células granulares.
Se ve un folículo (f) intracitoplasmático central (x 6.000).

En la **fig. 3.8** se observa un proceso citoplasmático central que contacta con las células secretorias vecinas.

En la **fig. 3.9** se muestra un grupo de células FE que limitan un folículo de luz aplanada que contacta con las células secretorias vecinas.

Entre las células endocrinas y las células FE se detectaron algunas uniones intercelulares: desmosomas, hemidesmosomas y zonas adherentes. Estos complejos de unión también conectaban dos células endocrinas y dos células FE. Nuestras observaciones captaron frecuentes desmosomas entre las células endocrinas (**fig. 3.10A**) y también hemos detectado uniones hendidura (gap) (**fig. 3.10B**) y uniones septales entre células FE adyacentes.

fig. 3.7 a FS cell can be observed connected to several secretory granule cells that present a small central intracytoplasmic follicle.

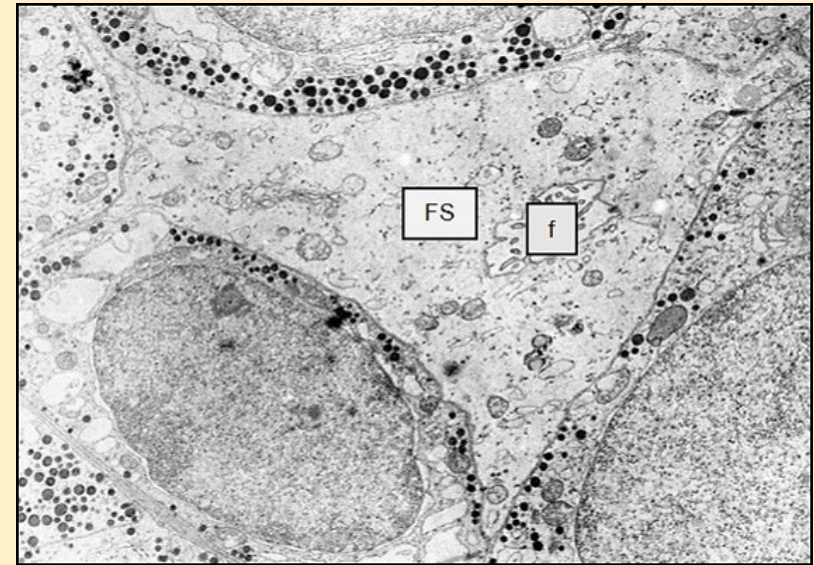


Fig. 3.7. FS cell: connected with several secretory cells. There is a central intracytoplasmic follicle (f) (x 6.000).

In **fig. 3.8** a central cytoplasmic process can be observed to contact the neighbouring secreting cells.

In **fig. 3.9** a group of FS cells is shown to limit a flattened follicle lumen that presents numerous interdigitations with microvilli in their borders.

Between endocrine and FS cells some intercellular junctions have been found: desmosomes, hemidesmosomes and *zonula adherens*. These junction complexes also connected two endocrine and two FS cells. According to our observations frequent desmosomes appeared between endocrine cells (**fig. 3.10A**). We have also detected gap and septal junctions between adjacent FS cells (**fig. 3.10B**).

Other electron microscopy studies have confirmed the presence of cell to cell communications in the anterior pituitary, supported by the appearance of different types of intercellular junctions such as desmo-

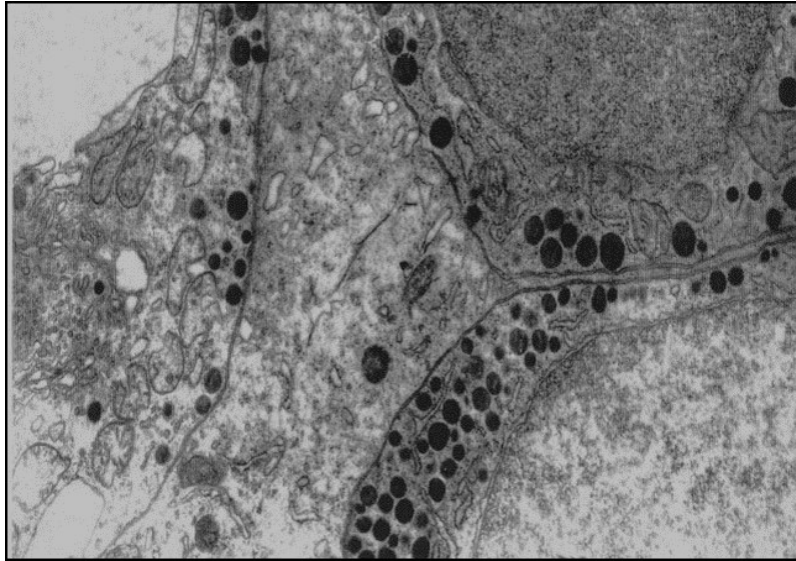


Fig. 3.8. Célula FE. *Proceso citoplasmático central en contacto con las células granulares vecinas (x 12.000).*

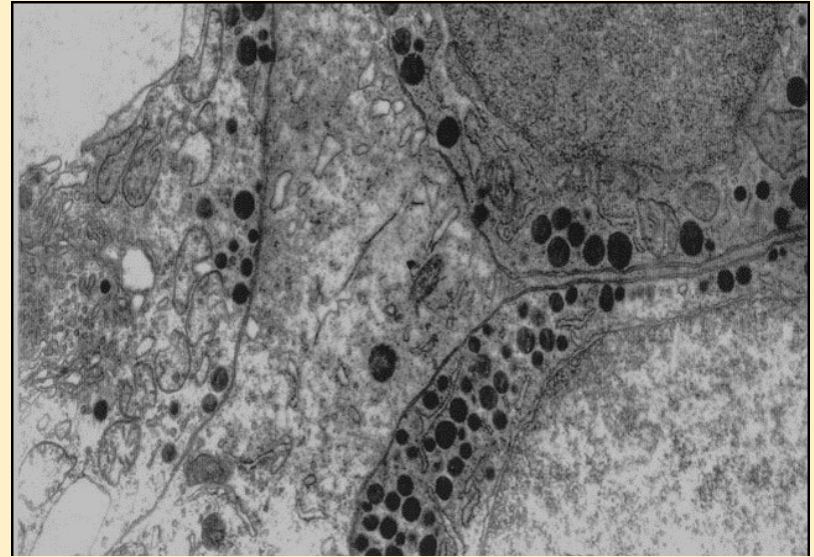


Fig. 3.8 FS cell: *central cytoplasmic process (x12.000).*

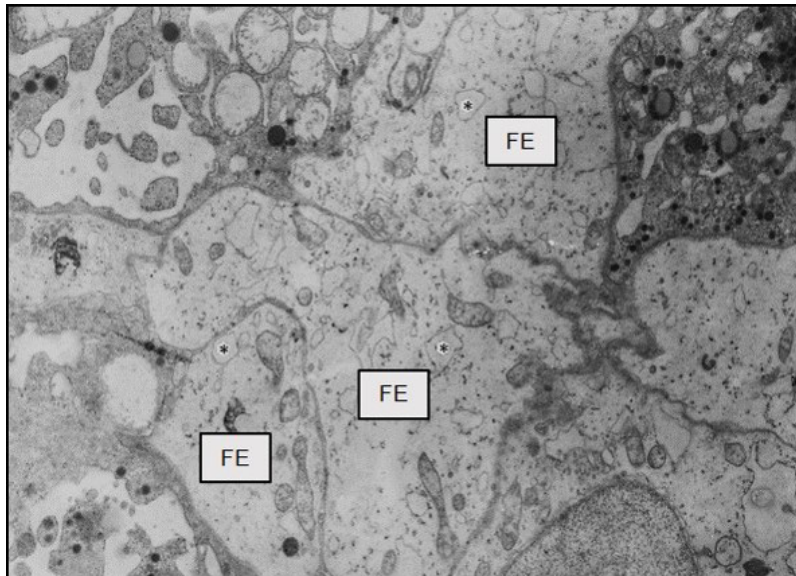


Fig. 3.9. Células FE. *Limitan un folículo de luz aplanada: se ven numerosas interdigitaciones con microvellosidades en los bordes (x 6.000).*

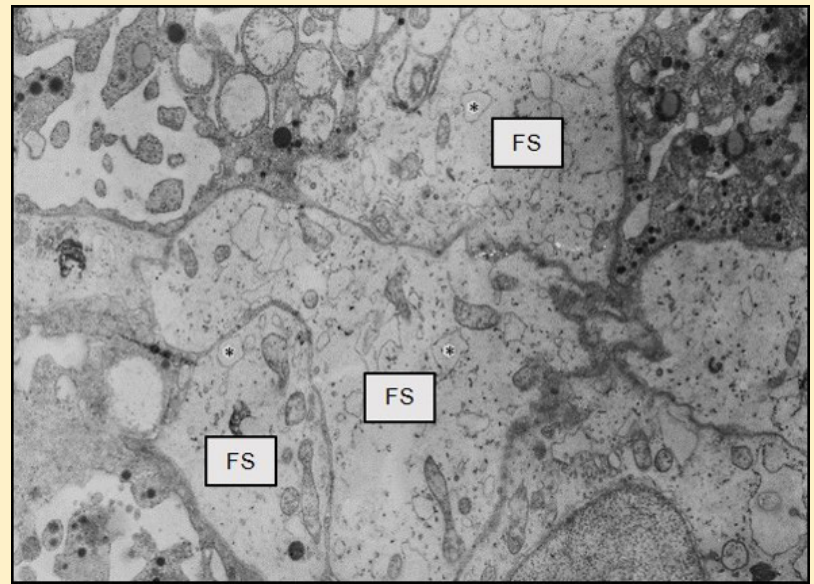


Fig. 3.9. Group of FS cells. *Follicle of flattened lumen with interdigitations and microvilli in their borders (x 6.000).*

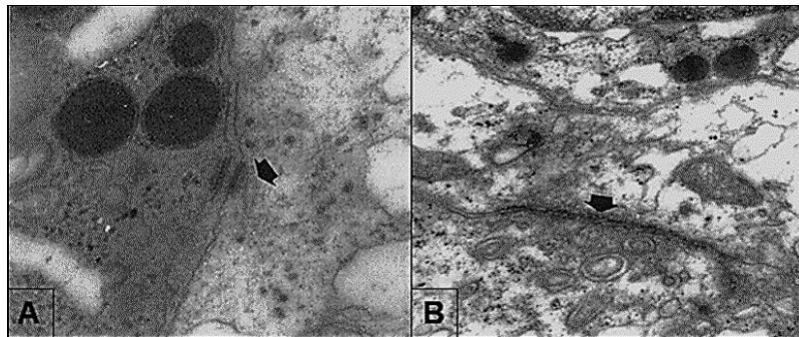


Fig. 3.10 A-B. A. Desmosoma. Conecta una célula granular con una célula FE (x 40.000). **B. Unión hendidura:** entre dos FE (x 20.000).

Otros estudios de microscopía electrónica han ratificado la existencia de comunicaciones célula a célula en la pituitaria anterior, la que se sustentó en la presencia de varios tipos de uniones intercelulares, tales como desmosomas y uniones hendidura (Fletcher y col., 1975; Herbert, 1979; García-Navarro y col., 1989; Soji y Herbert, 1989; Soji y col., 1992; Sato y col., 2005a).

La presencia de un sistema de folículos interconectados en la adenohipófisis ha sugerido la posibilidad de un sincitio con señales de transmisión a través de las uniones hendidura (Soji y col., 1992). Tales uniones metabólicas responderían a señales intracelulares específicas que podrían inducir el cierre del canal en un proceso reversible (Godwin y col., 1993). Además, aunque la existencia de complejos de unión ocluyendo la luz folicular ha sido aceptada, la peroxidasa inyectada por vía vena femoral pudo ser detectada dentro de la cavidad folicular. Los folículos adenohipofisarios podrían no siempre estar sellados por uniones cerradas (Mabuchi y col., 1996). Morand y col. (1996) usando moléculas fluorescentes en cultivos de los cinco tipos de células endocrinas y de células FE, detectaron uniones hendidura funcionantes entre células vecinas. De acuerdo con Kurono y col. (1994), hemos detectado uniones hendidura y tabicadas entre células FE adyacentes, presumiendo una función relacionada con el pasaje de metabolitos y con los soportes mecánicos foliculares.

Concluimos que los estudios inmunohistoquímicos de doble marcación han permitido la detección y cuantificación de la afinidad topo-

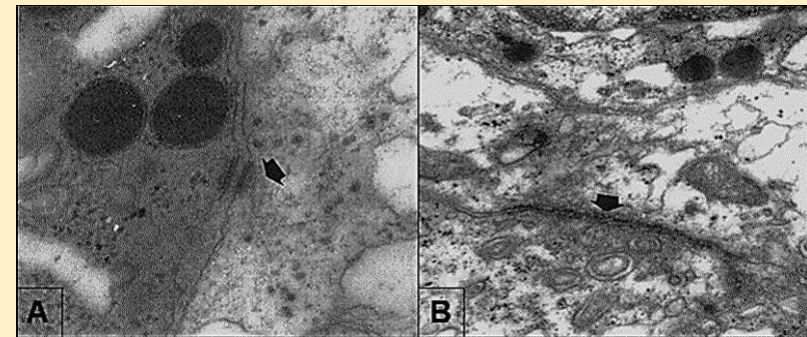


Fig. 3.10 A-B. A. Desmosome: connect a granular cell with FS cell (x 40.000). **B. Junction gap:** between two FS cells (x 20.000).

somes and gap junctions (Fletcher et al., 1975; Herbert, 1980; Soji et al., Herbert, 1989; Soji et al., 1992).

The presence of a system of intermingled follicles in the adenohypophysis has suggested a possible syncytium with signal transmission through gap junctions (Soji et al., 1992). These metabolic junctions would respond to specific intracellular signals that might induce the closure of the canal in a reversible process (Godwin et al., 1993). Although the existence of junction complexes occluding follicular light has been accepted, peroxidase injected via the femoral vein could be detected within the follicular cavity. Adenohypophyseal follicles might not always be sealed by closed junctions (Mabuchi et al., 1996). Morand et al. (1996), using fluorescent molecules in cultures of the five types of endocrine cells and FS cells, detected functioning cleft junctions between neighbouring cells. According to Kurono et al. (1994), we have detected gap and septal junctions between adjacent FS cells, which could function as mechanical support of the follicles.

We conclude that the immunohistochemical studies of double labelling have allowed the detection and quantification of the topographic affinity among the different types of adenohypophyseal cells. We have found a high degree of juxtaposition between somatotropes-corticotropes, lactotropes-gonadotropes and somatotropes-thyrotropes. FS cells evidenced frequent contact with all the types of endocrine cells and the ultrastructu-

gráfica entre los diferentes tipos de células adenohipofisarias. Hemos hallado un alto grado de yuxtaposición entre somatotropas-corticotropas, lactotropas-gonadotropas y somatotropas-tirotropas. Las células FE mostraron frecuentes contactos con todos los tipos celulares endocrinos y el estudio ultraestructural detectó diversos tipos de uniones intercelulares. Los aportes en la yuxtaposición celular permitirán contribuir a clarificar los mecanismos autocrinos y paracrinos involucrados en la actividad hormonal intrapituitaria.

Referencias

- Allaerts W, Carmeliet P, Deneef C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997a; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Salomon B, Leenen PJ, van Wijngaardt S, Jeucken PH, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage HA. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* 1997b; 78(1):184-197.
- Allaerts W, Tijssen AMI, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Asa SL, Tannenbaum GS. Cell-cell communication in the pituitary: orchestrator of pulsatile growth hormone secretion? *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(8):299-300.
- Baes M, Allaerts W, Deneef C. Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 1987; 120(2):685-691.

ral study detected different types of intercellular junctions. The contribution in cell juxtaposition will contribute to clarify the autocrine and paracrine mechanisms involved in the intrapituitary hormone activity.

References

- Allaerts W, Carmeliet P, Deneef C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997a; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Salomon B, Leenen PJ, van Wijngaardt S, Jeucken PH, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage HA. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* 1997b; 78(1):184-197.
- Allaerts W, Tijssen AMI, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Asa SL, Tannenbaum GS. Cell-cell communication in the pituitary: orchestrator of pulsatile growth hormone secretion? *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17(8):299-300.
- Baes M, Allaerts W, Deneef C. Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 1987; 120(2):685-691.
- Bilezikjian LM, Vale WW. The local control of pituitary by activin signaling and modulation. *Open Neuroendocrinol* 2011; 4:90-101.
- Blumenfeld Z, Kuhn RW, Jaffe RB. Corticotropin-releasing factor can stimulate gonadotropin secretion by human fetal pituitaries in superfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154(3):606-612.

- Bilezikjian LM, Vale WW. The local control of pituitary by activin signaling and modulation. *Open Neuroendocrinol* 2011; 4:90-101.
- Blumenfeld Z, Kuhn RW, Jaffe RB. Corticotropin-releasing factor can stimulate gonadotropin secretion by human fetal pituitaries in superfusion. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154(3):606-612.
- Chauvet N, El-Yandouzi T, Mathieu MN, Schlernitzauer A, Galibert E, Lafont C, Le Tissier P, Robinson IC, Mollard P, Coutry N. Characterization of adherens junction protein expression and localization in pituitary cell networks. *J Endocrinol* 2009; 202(3):375-387.
- Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50:215-286.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CLA. Morphologic aspects of paracrine interactions between endocrine and folliculostellate cells in the rat adenohypophysis. *Appl Immun Molec Morphol* 1999; 7(2):142-149.
- Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millán MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Camper SA. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* 2013; 106:1-47.
- Denef C, Maertens P, Allaerts W, Mignon A, Robberecht W, Swennen L, Carmeliet P. Cell-to-cell communication in peptide target cells of anterior pituitary. *Methods Enzymol* 1989; 168:47-71.
- Deschepper CF, Crumrine DA, Ganong WF. Evidence that the gonadotrophs are the likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 1986; 119(1):36-43.
- Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz M, Belova N, Rettori V, Mc Cann SM. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(1):170-174.
- Dymshitz J, Laudon M, Ben-Jonathan N. Endothelin-induced biphasic response of lactotrophs cultured under different conditions. *Neuroendocrinology* 1992; 55(6):724-729.
- Falini B, De Solas I, Halverson C, Parker JW, Taylor CR. Double-labeled antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 1982; 30(1):21-27.
- Chauvet N, El-Yandouzi T, Mathieu MN, Schlernitzauer A, Galibert E, Lafont C, Le Tissier P, Robinson IC, Mollard P, Coutry N. Characterization of adherens junction protein expression and localization in pituitary cell networks. *J Endocrinol* 2009; 202(3):375-387.
- Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50:215-286.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CLA. Morphologic aspects of paracrine interactions between endocrine and folliculostellate cells in the rat adenohypophysis. *Appl Immun Molec Morphol* 1999; 7(2):142-149.
- Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millán MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Camper SA. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* 2013; 106:1-47.
- Denef C, Maertens P, Allaerts W, Mignon A, Robberecht W, Swennen L, Carmeliet P. Cell-to-cell communication in peptide target cells of anterior pituitary. *Methods Enzymol* 1989; 168:47-71.
- Deschepper CF, Crumrine DA, Ganong WF. Evidence that the gonadotrophs are the likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 1986; 119(1):36-43.
- Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz M, Belova N, Rettori V, Mc Cann SM. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(1):170-174.
- Dymshitz J, Laudon M, Ben-Jonathan N. Endothelin-induced biphasic response of lactotrophs cultured under different conditions. *Neuroendocrinology* 1992; 55(6):724-729.
- Falini B, De Solas I, Halverson C, Parker JW, Taylor CR. Double-labeled antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 1982; 30(1):21-27.
- Filippa V, Acosta M, Mohamed F. Cellular associations of pituitary gonadotrophs in a rodent (*Lagostomus maximus maximus*) with photo-period-dependent reproduction. *Tissue Cell* 2012; 44(6):351-357.

- Filippa V, Acosta M, Mohamed F. Cellular associations of pituitary gonadotrophs in a rodent (*Lagostomus maximus maximus*) with photo-period-dependent reproduction. *Tissue Cell* 2012; 44(6):351-357.
- Fletcher WH, Anderson NC, Everett JW. Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. An in vivo and in vitro study. *J Cell Biol* 1975; 67(2PT.1):469-476.
- Frawley LS, Boockfor FR, Hoeffler JP. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 1985; 116(2):734-737.
- García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immuno-cytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.
- Girod C, Trouillas J, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe in the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3): 505-511.
- Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, Mc Donald JR, Walsh DA, Fletcher WH. In situ regulation of cell-to-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1993; 127-128:293-307.
- Halper J, Parnell PG, Carter BJ, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.
- Harrison F, van Hoof J, Vakaet L. The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 226(1):97-111.
- Herbert DC. Intercellular junctions in the rhesus monkey pars distalis. *Anat Rec* 1979; 195(1):1-6.
- Horn F, Windle JJ, Barnhart KM, Mellon PI. Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone alpha-subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12(5):2143-53.
- Horvath E, Kovacs K, Ezrin C. Junctional contact between lactotrophs and gonadotrophs in the rat pituitary. *IRCS Medical Science* 1977; 5:511.
- Fletcher WH, Anderson NC, Everett JW. Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. An in vivo and in vitro study. *J Cell Biol* 1975; 67(2PT.1):469-476.
- Frawley LS, Boockfor FR, Hoeffler JP. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 1985; 116(2):734-737.
- García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immuno-cytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.
- Girod C, Trouillas J, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe in the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3): 505-511.
- Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, Mc Donald JR, Walsh DA, Fletcher WH. In situ regulation of cell-to-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1993; 127-128:293-307.
- Halper J, Parnell PG, Carter BJ, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.
- Harrison F, van Hoof J, Vakaet L. The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 226(1):97-111.
- Herbert DC. Intercellular junctions in the rhesus monkey pars distalis. *Anat Rec* 1979; 195(1):1-6.
- Horn F, Windle JJ, Barnhart KM, Mellon PI. Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone alpha-subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12(5):2143-53.
- Horvath E, Kovacs K, Ezrin C. Junctional contact between lactotrophs and gonadotrophs in the rat pituitary. *IRCS Medical Science* 1977; 5:511.
- Ishida M, Takahashi W, Itoh S, Shimodaira S, Maeda S, Arita J. Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types: a study lactotroph-enriched cells. *Endocrinology* 2007; 148(7):3131-39.

- Ishida M, Takahashi W, Itoh S, Shimodaira S, Maeda S, Arita J. Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types: a study lactotroph-enriched cells. *Endocrinology* 2007; 148(7):3131-39.
- Jones TH, Brown BL, Dobson PRM. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion (Review). *J Endocrinology* 1990; 127(1):5-13.
- Katayama T, Shiota K, Sugino H, Takahashi M. Paracrine effect of folliculo-stellate cells on the growth factor-like action of activin A in anterior pituitary cultures. *Endocrinol Jpn* 1992; 39(3):289-297.
- Kikuchi M, Yatabe M, Tando Y, Yashiro T. Immunohistochemical localization of anterior pituitary hormones in S-100 protein-positive cells in the rat pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2011; 345(3):425-429.
- Kurono C, Nozaki M, Ohguchi H, Soji T, Herbert DC. Septate-like junctions in the normal male rat pituitary gland. *Tissue Cell* 1994; 26(6):913-916.
- Kurono C. Intercellular communications within the rat anterior pituitary: VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroids in the female rat. *Anat Rec* 1996; 24(3):366-373.
- Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):252-266.
- Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO. Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* 1985; 116(4):1371-78.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki J, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986; 321(6072):779-782.
- Mabuchi Y, Maruyama H, Yashiro T, Tanida S, Kurono C, Honda N, Kato H, Herbert DC. Sealing of the follicular lumen of the anterior pituitary gland of the male rat. *Tissue Cell* 1996; 28(6):631-635.
- Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Wada I, Horiuchi O, Kikuchi M, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Electron microscopic observations of the anterior pituitary gland. Part I. The neurons in the "transitional zone" of the anterior pituitary gland. *Tissue Cell* 2008; 40(3):157-166.
- Jones TH, Brown BL, Dobson PRM. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion (Review). *J Endocrinology* 1990; 127(1):5-13.
- Katayama T, Shiota K, Sugino H, Takahashi M. Paracrine effect of folliculo-stellate cells on the growth factor-like action of activin A in anterior pituitary cultures. *Endocrinol Jpn* 1992; 39(3):289-297.
- Kikuchi M, Yatabe M, Tando Y, Yashiro T. Immunohistochemical localization of anterior pituitary hormones in S-100 protein-positive cells in the rat pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2011; 345(3):425-429.
- Kurono C, Nozaki M, Ohguchi H, Soji T, Herbert DC. Septate-like junctions in the normal male rat pituitary gland. *Tissue Cell* 1994; 26(6):913-916.
- Kurono C. Intercellular communications within the rat anterior pituitary: VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroids in the female rat. *Anat Rec* 1996; 24(3):366-373.
- Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):252-266.
- Leong DA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO. Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* 1985; 116(4):1371-78.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki J, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986; 321(6072):779-782.
- Mabuchi Y, Maruyama H, Yashiro T, Tanida S, Kurono C, Honda N, Kato H, Herbert DC. Sealing of the follicular lumen of the anterior pituitary gland of the male rat. *Tissue Cell* 1996; 28(6):631-635.
- Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Wada I, Horiuchi O, Kikuchi M, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Electron microscopic observations of the anterior pituitary gland. Part I. The neurons in the "transitional zone" of the anterior pituitary gland. *Tissue Cell* 2008; 40(3):157-166.

- tions of the anterior pituitary gland. Part I. The neurons in the "transitional zone" of the anterior pituitary gland. *Tissue Cell* 2008; 40(3):157-166.
- Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson I, Nelson C, Elsholtz H, Rosenfeld MG. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 1989; 3(7):946-958.
- Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K. Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3', 5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 1993; 133(5):2150-55.
- Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(6):261-269.
- Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 1996; 137(8):3356-67.
- Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1988; 122(1):364-366.
- Nogami H, Yoshimura F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 1982; 202(2):261-274.
- O'Halloran CJ, Jones PM, Ghatei MA, Domin J, Bloom SR. The regulation of neuropeptide expression in rat anterior pituitary following chronic manipulation of estrogen status: a comparison between substance P, neuropeptide Y, neurotensin and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1990; 127(3):1463-69.
- Papka RE, Yu SM, Nikitovitch-Winer MB. Use of immunoperoxidase and immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *Am J Anat* 1986; 175(2-3):289-306.
- Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson I, Nelson C, Elsholtz H, Rosenfeld MG. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 1989; 3(7):946-958.
- Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K. Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3', 5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 1993; 133(5):2150-55.
- Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(6):261-269.
- Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 1996; 137(8):3356-67.
- Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1988; 122(1):364-366.
- Nogami H, Yoshimura F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 1982; 202(2):261-274.
- O'Halloran CJ, Jones PM, Ghatei MA, Domin J, Bloom SR. The regulation of neuropeptide expression in rat anterior pituitary following chronic manipulation of estrogen status: a comparison between substance P, neuropeptide Y, neurotensin and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1990; 127(3):1463-69.
- Papka RE, Yu SM, Nikitovitch-Winer MB. Use of immunoperoxidase and immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *Am J Anat* 1986; 175(2-3):289-306.
- Pasolli HA, Torres A, Aoki A. The mammosomatotroph: a transitional cell between growth hormone and prolactin producing cells? An immunocytochemical study. *Histochemistry* 1994; 102(4):287-296.

Pasolli HA, Torres A, Aoki A. The mammosomatotroph: a transitional cell between growth hormone and prolactin producing cells? An immunocytochemical study. *Histochemistry* 1994; 102(4):287-296.

Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 1997; 18(2):206-228.

Rosenfeld MG, Bach I, Erkman L, Lin P, Lin S, McEvelly R, Ryan A, Rhodes S, Schonemann M, Scully K. Transcriptional control of cell phenotypes in the neuroendocrine system. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:217-239.

Rossier J, Pittman Q, Bloom F, Guillemin R. Distribution of opioid peptides in the pituitary: a new hypothalamic-pars nervosa enkephaliner-gic pathway. *Fed Proc* 1980; 39(8):2555-60.

Sato S. Post-natal development, sexual difference and sexual cycle variation of prolactin cells in rats; special reference to the topographical affinity of a gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(5):573-583.

Sato Y, Hashitani H, Shirasawa N, Sakuma E, Naito A, Suzuki H, Asai Y, Sato G, Wada I, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XII: immunohistochemical and physiological evidences for the gap junctional coupling of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary. *Tissue Cell* 2005a; 37(4):281-291.

Sato T, Shirasawa N, Sakuma E, Sato Y, Asai Y, Wada I, Horiuchi O, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell* 2005b; 37(4):269-280.

Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F. Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in post-natal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res* 1983; 231(2):235-249.

Shirasawa N, Sakuma E, Wada I, Naito A, Horiuchi O, Mabuchi Y, Kanai M, Herbert DC, Soji T. Intercellular communication within the rat anterior pituitary. XIV: electron microscopic and immunohistochemical study on the relationship between the agranular cells and GnRH

Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 1997; 18(2):206-228.

Rosenfeld MG, Bach I, Erkman L, Lin P, Lin S, McEvelly R, Ryan A, Rhodes S, Schonemann M, Scully K. Transcriptional control of cell phenotypes in the neuroendocrine system. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:217-239.

Rossier J, Pittman Q, Bloom F, Guillemin R. Distribution of opioid peptides in the pituitary: a new hypothalamic-pars nervosa enkephaliner-gic pathway. *Fed Proc* 1980; 39(8):2555-60.

Sato S. Post-natal development, sexual difference and sexual cycle variation of prolactin cells in rats; special reference to the topographical affinity of a gonadotroph. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(5):573-583.

Sato Y, Hashitani H, Shirasawa N, Sakuma E, Naito A, Suzuki H, Asai Y, Sato G, Wada I, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XII: immunohistochemical and physiological evidences for the gap junctional coupling of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary. *Tissue Cell* 2005a; 37(4):281-291.

Sato T, Shirasawa N, Sakuma E, Sato Y, Asai Y, Wada I, Horiuchi O, Sakamoto A, Herbert DC, Soji T. Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell* 2005b; 37(4):269-280.

Shirasawa N, Kihara H, Yamaguchi S, Yoshimura F. Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res* 1983; 231(2):235-249.

Shirasawa N, Sakuma E, Wada I, Naito A, Horiuchi O, Mabuchi Y, Kanai M, Herbert DC, Soji T. Intercellular communication within the rat anterior pituitary. XIV: electron microscopic and immunohistochemical study on the relationship between the agranular cells and GnRH neurons in the dorsal pars tuberalis of the pituitary gland. *Anat Rec (Hoboken)* 2007; 290(11):1388-98.

Siperstein ER, Miller KJ. Further cytophysiologic evidence for the identity of the cells that produce adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 1970; 86(3): 451-486.

neurons in the dorsal pars tuberalis of the pituitary gland. *Anat Rec* (Hoboken) 2007; 290(11):1388-98.

Siperstein ER, Miller KJ. Further cytophysiologic evidence for the identity of the cells that produce adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 1970; 86(3): 451-486.

Soji T, Herbert D. Intercellular communications between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 1989; 224(4):523-533.

Soji T, Herbert D. Intercellular communications within the rat anterior pituitary gland. II. Castration effects and changes after injection of luteinizing hormone-releasing (LH-RH) or testosterone. *Anat Rec* 1990; 226(3):342-346.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):138-149.

Soji T, Yashiro T, Herbert D. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. IV. Changes of cell-to-cell communications during pregnancy. *Anat Rec* 1992; 233(1):97-102.

Thapar K, Kovacs K, Laws ER. The classification and molecular biology of pituitary adenomas. *Adv Techn Stand Neurosurg* 1995; 22:3-53.

Theill LE, Karin M. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* 1993; 14(6):670-689.

Vankelecom H, Chen J. Pituitary stem cells: Where do we stand? *Endocrinol Cell Mol* 2014; 385(1-2):2-17.

Vankelecom H, Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):478-488.

Vila-Porcile E, Olivier L. The problem of folliculo-stellate cells in the pituitary gland. *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissue*. In ed. P. M. Motta. Boston: Martinus Nijhoff 1984: 64.

Wada I, Sakuma E, Shirasawa N, Wakabayashi K, Otsuka T, Hattori K, Yashiro T, Herber DC, Soji T. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. XVI: postnatal changes of distribution of S-100 protein positive cells, connexin 43 and LH-RH positive sites in the pars tuberalis of the rat pituitary gland.

Soji T, Herbert D. Intercellular communications between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 1989; 224(4):523-533.

Soji T, Herbert D. Intercellular communications within the rat anterior pituitary gland. II. Castration effects and changes after injection of luteinizing hormone-releasing (LH-RH) or testosterone. *Anat Rec* 1990; 226(3):342-346.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):138-149.

Soji T, Yashiro T, Herbert D. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. IV. Changes of cell-to-cell communications during pregnancy. *Anat Rec* 1992; 233(1):97-102.

Thapar K, Kovacs K, Laws ER. The classification and molecular biology of pituitary adenomas. *Adv Techn Stand Neurosurg* 1995; 22:3-53.

Theill LE, Karin M. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* 1993; 14(6):670-689.

Vankelecom H, Chen J. Pituitary stem cells: Where do we stand? *Endocrinol Cell Mol* 2014; 385(1-2):2-17.

Vankelecom H, Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(3):478-488.

Vila-Porcile E, Olivier L. The problem of folliculo-stellate cells in the pituitary gland. *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissue*. In ed. P. M. Motta. Boston: Martinus Nijhoff 1984: 64.

Wada I, Sakuma E, Shirasawa N, Wakabayashi K, Otsuka T, Hattori K, Yashiro T, Herber DC, Soji T. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. XVI: postnatal changes of distribution of S-100 protein positive cells, connexin 43 and LH-RH positive sites in the pars tuberalis of the rat pituitary gland. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Tissue Cell* 2014; 46(1):33-39.

Welcker JE, Hernández-Miranda LR, Paul FE, Jia S, Ivanov A, Selbach M, Birchmeier C. *Insm1* controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and recruitment of histone-modifying factors. *Development* 2013; 140(24):4947-58.

An immunohistochemical and electron microscopic study. *Tissue Cell* 2014; 46(1):33-39.

Welcker JE, Hernández-Miranda LR, Paul FE, Jia S, Ivanov A, Selbach M, Birchmeier C. *Insm1* controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and recruitment of histone-modifying factors. *Development* 2013; 140(24):4947-58.

Westlund KN, Childs GV. Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis. *Endocrinology* 1982; 111(5):1761-63.

Willems C, Fu Q, Roose H, Mertens F, Cox B, Chen J, Vankelecom H. Regeneration in the pituitary after cell-ablation injury: time-related aspects and molecular analysis. *Endocrinology* 2016; 157(2):705-721.

Winters SJ, Moore JP. Paracrine control of gonadotrophs. *Semin Reprod Med* 2007; 25(5):379-387.

Yoshimura F, Nogami H. Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rats. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(1):43-51.

Westlund KN, Childs GV. Localization of serotonin fibres in the rat adenohypophysis. *Endocrinology* 1982; 111(5):1761-63.

Willems C, Fu Q, Roose H, Mertens F, Cox B, Chen J, Vankelecom H. Regeneration in the pituitary after cell-ablation injury: time-related aspects and molecular analysis. *Endocrinology* 2016; 157(2):705-721.

Winters SJ, Moore JP. Paracrine control of gonadotrophs. *Semin Reprod Med* 2007; 25(5):379-387.

Yoshimura F, Nogami H. Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rats. *Endocrinol Jpn* 1980; 27(1):43-51.

CAPÍTULO 4

Ultraestructura de la glándula hipofisaria

Balin y Broadwell (1987) estudiaron las membranas de la hipófisis anterior mediante lectina-peroxidasa. Los resultados sugirieron que la lectina se transfiere al complejo de Golgi identificando: plasmalema, sacos trans del Golgi, membranas de los gránulos secretorios y perfiles de exocitosis. Mason y col. (1988) investigaron el control de la secreción en las células lactotropas, somatotropas y gonadotropas mediante cultivos de la pituitaria anterior. Investigaron los canales iónicos (Ca^{2+} y K^+), los mensajeros y la exocitosis. Kurosumi (1991a) hizo una revisión mediante inmunoelectrónica, clasificando a las células de la pituitaria anterior, de acuerdo a su rol en la secreción hormonal y observó la síntesis de los precursores de las hormonas peptídicas en el retículo endoplásmico rugoso (RER), su transferencia al complejo de Golgi, su procesamiento a través del Golgi y la red trans-Golgi que corresponde al GERL, el movimiento de los gránulos secretorios, los mecanismos de exocitosis y la actividad de los lisosomas relacionada con la crinofagia y el reciclaje de los constitu-

CHAPTER 4

Ultrastructure of the pituitary gland

Baling and Broad well (1987) studied membranes in the anterior pituitary of mice stained with lectin-peroxidase. Results suggest that lectin is transferred to the Golgi complex identifying plasmatic membrane, trans-Golgi saccules, membranes of secretory granules and exocytosis profiles. Mason et al. (1988) studied the control of secretion in lactotropes, somatotropes and gonadotropes in cultures of anterior pituitary cells. They researched ion channels (Ca^{2+} and K^+), messengers and exocytosis. Kurosumi (1991a) did a revision using immunoelectronic microscopy, and classified anterior pituitary cells according to their role in hormonal secretion. He observed the synthesis of precursors of peptide hormones in RER, their transference to Golgi, the processing of those precursors by Golgi and the trans-Golgi network corresponding to GERL, the movement of secretory granules, exocytosis mechanisms and lysosomal activity related to crinophagy and the recycling of the plasma membrane constituents

yentes de membrana recuperados. En otra revisión de Kurosumi (1991b) se remarcó: **1.** La importancia de la inmunocitoquímica electrónica para identificar de modo categórico las células adenohipofisarias secretoras de hormonas. **2.** Su aplicación en el estudio de los mecanismos de secreción hormonal. **3.** El estudio ultraestructural de los organoides celulares. **4.** El análisis de la exocitosis, mostrando la vesiculación de la membrana alrededor de los gránulos secretorios hacia dentro o hacia fuera de la membrana plasmática. Farquhar (1982) investigó el reciclaje de la membrana de las células endocrinas de la pituitaria anterior y su camino desde el plasmalema hacia el complejo de Golgi. Yi y Tang (1991) estudiaron los lisosomas y las vacuolas autofágicas que regulan la secreción de las células endocrinas, mostrando que el aumento de los lisosomas tiene un rol esencial en la regulación del proceso de secreción por medio de la crinofagia. Dubois y Girod (1967) detectaron formaciones coloidales y células ciliadas en la hipófisis anterior del hámster dorado.

Cataldo y Broadwell (1994) investigaron el RER y el glucógeno de las células de la pituitaria anterior en ratones, mediante citoquímica enzimática hallando: **1.** La actividad de la glucosa 6 fosfatasa (G6F) resulta un marcador citoquímico fiable del RER. **2.** El RER se asocia con la cara cis del complejo de Golgi. **3.** Una parte de la G6F derivaría de las reservas de glucógeno. **4.** Las modulaciones en la actividad de la G6F y en el depósito de glucógeno durante el ayuno reflejó una alteración del metabolismo energético. Guerineau y col. (1997) analizaron cultivos organotípicos de la pituitaria anterior y estudiaron la respuesta a los neuropéptidos hipotalámicos, las comunicaciones intercelulares y la electrofisiología.

Nuestros estudios ultraestructurales en animales controles jóvenes intactos (ratas, ratones, hámsteres y monos) nos han permitido identificar las características principales de las poblaciones adenohipofisarias (*pars distalis*):

1. Población somatotropa: se documentaron tres tipos de somatotropas en la pituitaria anterior de rata, mediante inmunohistoquímica electrónica con oro coloidal: **Tipo I** con gránulos secretorios grandes (350 nm); **Tipo II** con una mezcla de gránulos grandes y pequeños y **Tipo III** con

recovered. In another revision by Kurosumi (1991b) the following was emphasized: **1.** Importance of electron immunocytochemistry to categorically identify secretory hormone pituitary cells **2.** Application in the study of hormone secretion mechanisms. **3.** Ultrastructural study of cell organoids. **4.** Analysis of exocytosis, showing membrane vesiculation around the secretory granules to the inside or outside of the plasmatic membrane. Farquhar (1982) studied the recycling of endocrine cells of the anterior pituitary and its pathway from the plasmalema to the Golgi complex. Ji and Tang (1991) studied the lysosomes and autophagocytic vacuoles that regulate endocrine cell secretion. The increase in lysosomes would be essential for the secretion process by means of crinophagy. Dubois and Girod (1967) detected colloidal formations and ciliated cells in the anterior pituitary of the gold hamster (*Mesocricetus auratus*).

Cataldo and Broadwell (1994) investigated the RER and the glycogen in anterior pituitary cells in mice by means of enzyme cytochemistry obtaining the following results: **1.** Glucose 6-phosphatase (G6Pase) activity as a reliable cytochemical marker for RER. **2.** Association of RER with the cis face of the Golgi complex. **3.** Part of G6Pase would derive from glycogen stores. **4.** Modulations in G6Pase activity and in the glycogen store during fast reflected an alteration of the energetic metabolism. Guerineau et al. (1997) analyzed organotypic cultures of the anterior pituitary by studying the morphology, the physiology by means of the analysis of the responses to hypothalamic neuropeptides, the electrophysiological properties and the intercellular communications that are similar to the conditions of the tissue *in vivo*.

Our ultrastructural studies in intact young animals (rats, mice, hamsters and monkeys) have allowed identifying the chief characteristics of adenohipophyseal populations (*pars distalis*):

1. Somatotrope population: three types of somatotropes were recorded in the anterior pituitary of rats by means of electron immunohistochemistry with colloidal gold: **Type I** with large secretory granules (350 nm). **Type II**

sólo gránulos pequeños (150 nm). En ratas machos predominaron las células tipo I (68%) y en ratas hembras se detectó un mayor porcentaje (47%) de células tipo II (Kurosumi y col., 1986). Lue y col. (1987) identificaron la GH en las pituitarias de hámster dorado mediante inmunocitoquímica. Las somatotropas se presentaron ovas, con gránulos secretorios de dos rangos (90-150 nm y 280-320 nm), RER con membranas aplanadas paralelas y complejo de Golgi moderadamente desarrollado. Tachibana y col. (1994) hicieron estudios inmunoelectrónicos de la pituitaria anterior de fetos humanos y detectaron somatotropas de tipo I, II y III. **Tipo I:** células pequeñas, redondas, con gránulos secretorios de menor tamaño (268 nm); **Tipo II:** poligonales, con gránulos secretorios de tamaño medio (347 nm), RER en laminillas paralelas y complejo de Golgi y **Tipo III:** poligonales, grandes, con numerosos y grandes gránulos secretorios esféricos (404 nm). El tipo I predominó hasta las 20 semanas de gestación y luego aumentaron los tipos II y III. Tipo I: células inmaduras. Tipo II: células intermedias. Tipo III: células maduras. Nuestros estudios ultraestructurales (Jurado y col., 1998)

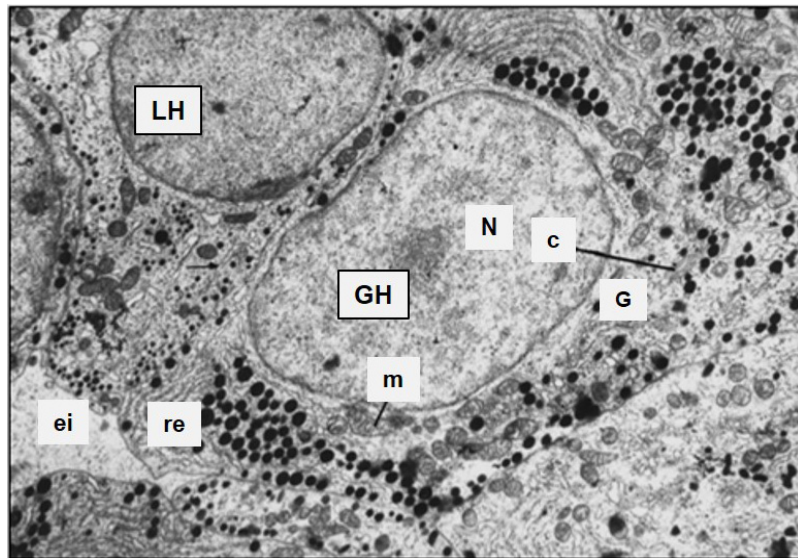


Fig. 4.1. Somatotropa (GH). Núcleo (n), Golgi (G), mitocondrias (m), c: cilia, retículo endoplásmico (re), espacio intercelular (ei) (x 9.000).

with a combination of large and small granules. **Type III** with only small granules (150 nm). In male rats type I cells were predominant (68%) and in female rats a higher percentage (47%) of type II cells was detected (Kurosumi et al., 1986). Lue et al. (1987) identified GH in the pituitaries of golden hamsters by means of immunocytochemistry. Somatotropes appeared oval-shaped, with secretory granules of two ranges (90-150 nm and 280-320 nm), RER with flat parallel membranes and a moderately developed Golgi. Tachibana et al. (1994) did immunoelectron studies of the anterior pituitary of human foetuses and detected type I, II and III somatotropes. **Type I:** small rounded cells, with secretory granules of smaller size (268 nm). Type II: polygonal cells, with secretory granules of medium size (347 nm), RER in parallel lamellas and Golgi complex. **Type III:** polygonal large cells, with numerous and large spherical secretory granules (404 nm). Type I is predominant up to week 20 of gestation and then types II and III increased. Type I: immature cells. Type II: intermediate cells. Type III: mature cells. In our ultrastructural studies (Jurado et al., 1998) we observed ovoid cells with

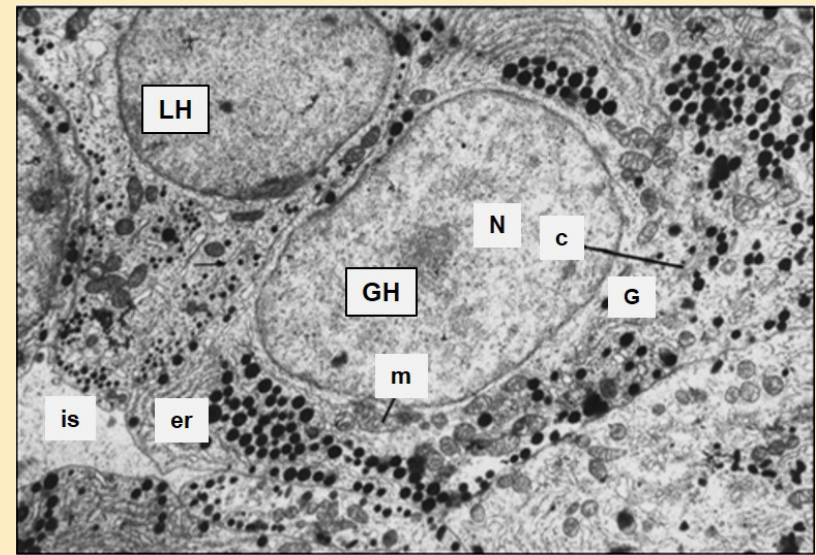


Fig. 4.1. Somatotrope cell (GH): nuclei (n), Golgi (G), mitochondria (m), cilia (c), er: endoplasmic reticulum is: intercellular space (x 9.000).

permitieron observar células ovoideas con núcleos esféricos de cromatina homogénea, finamente granular y filamentos tipo I, correspondientes a citoqueratinas, microtúbulos, centriolos, cilias y lisosomas (**fig. 4.1**).

En la **fig. 4.2** se observan dos células somatotropas junto a un capilar. Los gránulos secretorios son ovales y electrodensos, con una membrana fina íntimamente aplicada y de difícil visualización. Se distribuyen de modo uniforme en todo el citoplasma y miden de 250 a 500 nm, con un promedio de 400 nm.

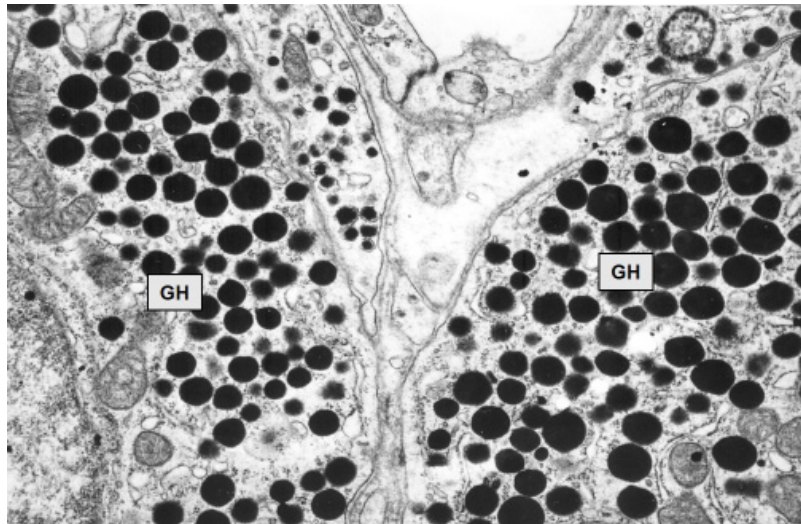


Fig. 4.2. Somatotropas (GH) junto a un capilar. *Célula endotelial, espacio intercelular y gránulos secretorios (GH) (x 18.000).*

El aparato de Golgi (**fig. 4.3**) es yuxtannuclear y está compuesto por túbulos paralelos con extremos dilatados, vacuolas de amplia luz, vesículas pequeñas y gránulos de secreción con envoltura membranosa visible.

El RER es un organoide importante en el reconocimiento de este tipo celular y está compuesto por sacos aplanados revestidos por un considerable número de ribosomas. Además, se ven abundantes ribosomas libres en la matriz citoplasmática. En regla general, se nota una relación inversa entre el desarrollo del RER-Golgi y el número de gránulos secre-

spherical nuclei of finely granular chromatin homogenously spread, with some isolated aggregates (**fig. 4.1**). Type I filaments can be observed which correspond to cytokeratins, microtubules, centrioles, cilia and lysosomes.

In **fig. 4.2** two somatotrope cells can be seen next to a capillary. Secretory granules are oval-shaped and electron-dense and have a fine membrane intimately attached that is difficult to distinguish. They are uniformly spread throughout the whole cytoplasm and are 250-500 nm, with an average size of 400 nm.

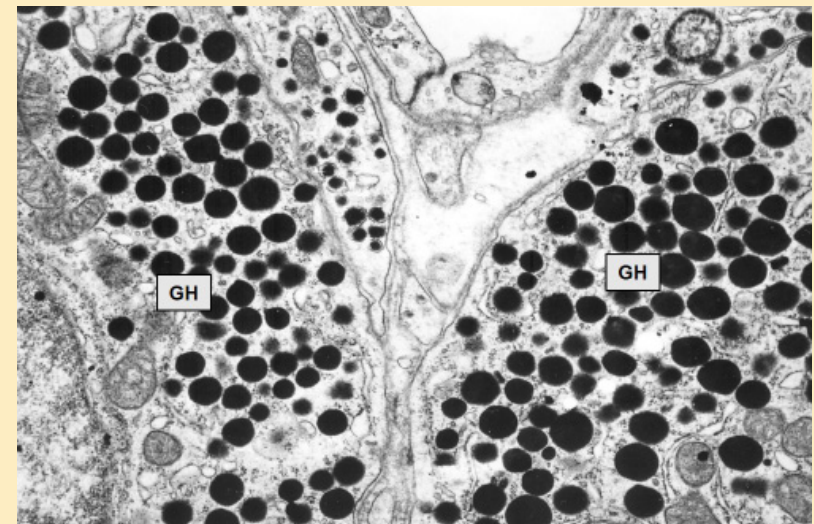


Fig. 4.2. Somatotrope cells (GH) next to a capillary. *Endothelial cell, intercellular space (is) and secretory granules (x 18.000).*

The Golgi complex (**fig. 4.3**) is located in the juxtannuclear zone and is composed of parallel tubules with enlarged ends, vacuoles of wide diameter, small vesicles and secretory granules with a visible membrane covering.

The RER is an important organelle for the recognition of this cell type and is composed of flattened sacs lined with a considerable number of ribosomes. Also, abundant free ribosomes can be observed in the cytoplasmic matrix. As a rule, an inverse relationship can be noticed between the RER-Golgi development and the amount of secretory

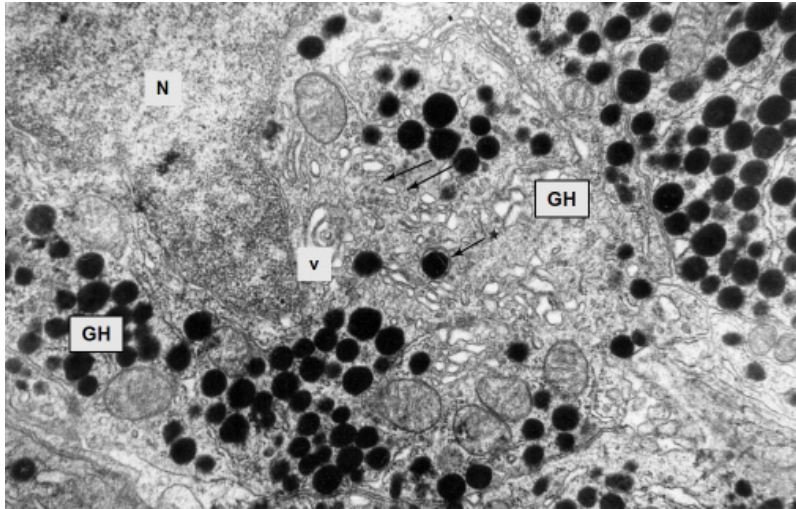


Fig. 4.3. Somatotropa (GH). Núcleo (n). Complejo de Golgi: vacuolas (v); * → Gránulos secretorios con envoltura * → y vesículas (v) (x 15.000).

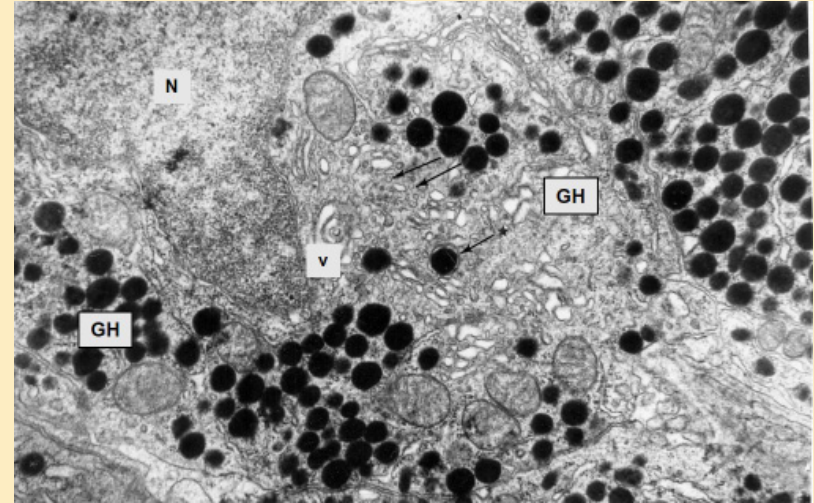


Fig. 4.3. Somatotrope cell (GH). Nuclei (n), Golgi complex: vacuoles (v); * → secretory granules with membrane and vesicles (→) (x 15.000).

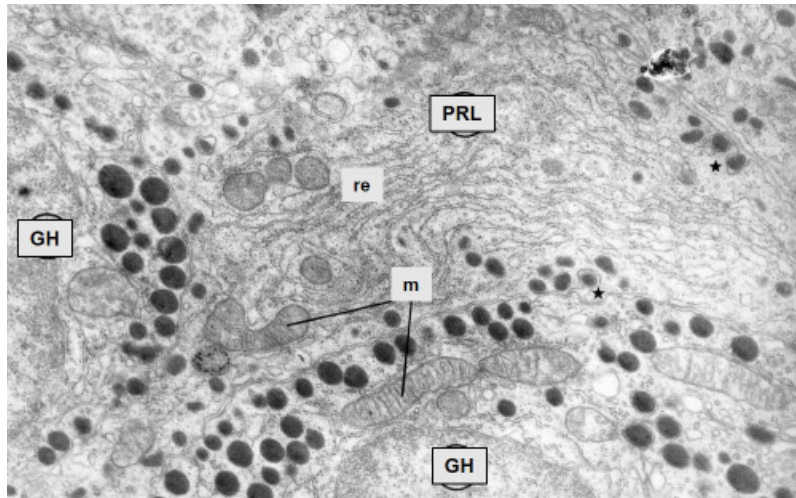


Fig. 4.4. Somatotropas (GH). Retículo endoplásmico (re) y mitocondrias (m) (x 15.000).

torios. El depósito granular se traduce en un descenso en la actividad de dichos organoides. Las mitocondrias son abundantes, alargadas o esféricas, con regular cantidad de crestas espaciadas (**fig. 4.4**).

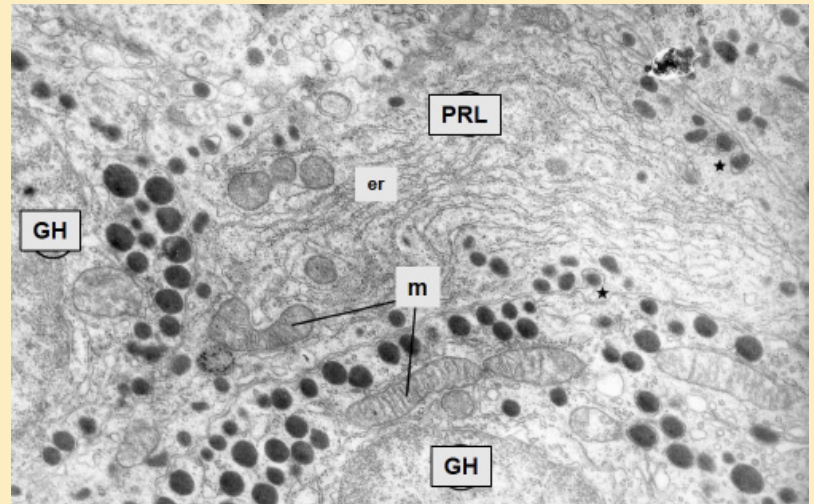


Fig. 4.4. Somatotrope cells (GH). Endoplasmic reticulum (er) and mitochondria (m) (x 15.000).

granules. The granular deposit is evidenced by a decreased activity of those organoids. Mitochondria are abundant, oblong or spherical, with a regular quantity of spaced cristae (**fig. 4.4**).

Li y col. (1977) hicieron un estudio inmunocitoquímico ultraestructural con peroxidasa en pituitarias de fetos humanos para identificar somatotropas que mostraron un RER laminar, un Golgi prominente y gránulos secretorios de 300 nm promedio.

2. Población lactotropa: Farquhar (1977) estudió la secreción y crinofagia en las lactotropas y en 1982 analizó el reciclaje de la membrana en las células endocrinas de la pituitaria anterior mediante los trazadores dextran y ferritina. Kurosumi (1979) investigó la formación y liberación de los gránulos secretorios por exocitosis en lactotropas de rata con mitosis durante el estro. Los gránulos secretorios inmaduros se mostraban como pequeñas vesículas tubulares, luego las vesículas se desprendieron del Golgi y fueron hacia la periferia celular. El RER presentó vesículas y láminas. Los trazadores fueron tomados por endocitosis, luego aparecieron en las cisternas del Golgi, en los gránulos inmaduros o vacuolas y en los lisosomas. En 1982, Sasaki y Sano hicieron un estudio morfométrico ultraestructural de las poblaciones somatotropa y lactotropa de ratón y demostraron en las hembras un rápido aumento del número de lactotropas desde el nacimiento hasta los 20 días, mientras las somatotropas aumentaron más progresivamente. A los 60-70 días hubo una meseta hasta la pubertad. Las lactotropas fueron más numerosas en las hembras adultas y las somatotropas en machos adultos. La ovariectomía indujo un patrón masculino y el estudio mostró que el aumento de lactotropas entre 10-30 días de edad no fue ovario-dependiente.

Fumagalli y Zanini (1985) investigaron la localización ultraestructural de la GH y PRL de pituitarias de vacas, mediante inmunohistoquímica con partículas de oro. Hallaron somatotropas con GH y lactotropas con PRL, así como mamosomatotropas con las dos hormonas. Las células mixtas envasaron las dos hormonas en diferentes gránulos secretorios, en los mismos gránulos con diferentes partes para cada hormona y entremezcladas en los mismos gránulos. Esto sugiere que en estas células las dos hormonas se procesan en las mismas cisternas del Golgi y que existen mecanismos para clasificarlas.

Smets y col. (1987) analizaron el desarrollo postnatal de las células lactotropas y somatotropas en ratas machos y hembras mediante inmunohistoquímica electrónica. En ratas inmaduras (4-6 semanas de edad) se detectó

2. Lactotrope population: Farquhar (1977) studied secretion and crinophagy in lactotropes and in 1982 he analyzed membrane recycling in the endocrine cells of the anterior pituitary by means of dextran and ferritin tracers. Kurosumi (1979) investigated the formation and release of secretory granules by exocytosis in rat lactotropes during mitosis in the oestrous cycle. The immature secretory granules appeared as small tubular vesicles; then vesicles detached from Golgi towards the cell periphery. RER presented vesicles and lamellae. Tracers were taken up by endocytosis, and then appeared in the Golgi cisternae, in immature granules or vacuoles and in lysosomes. In 1982, Sasaki and Sano did a morphometric-ultrastructural study of the somatotrope and lactotrope populations in mice. Females increased rectilinearly the number of lactotropes from birth to day 20, while somatotropes increased more gradually. Between days 60-70 there was a plateau up to puberty. Lactotropes were more numerous in adult females and somatotropes in adult males. Ovariectomy led to a male pattern. The study evidenced that the increase of lactotropes between 10 and 30 days of age was not ovary-dependent.

Fumagalli and Zanini (1985), using immunohistochemistry with gold particles, investigated the ultrastructural localization of GH and PRL of cow pituitaries. They found somatotropes with GH and lactotropes with PRL, as well as mamosomatotropes with both hormones. The mixed cells enveloped both hormones in different secretory granules, in the same granules with different parts for each hormone and in the same granules intermingled.

This suggests that in these cells both hormones are processed in the same Golgi cisternae and that there exist mechanisms to classify them. Smets et al. (1987) analyzed the postnatal development in lactotrope and somatotrope cells in male and female rats by means of electron immunohistochemistry. In immature rats (4-6 weeks old) high cell density of both types was detected, with the presence of immature secretory granules (200 nm). In adult rats two types of lactotropes were detected: with 500 nm polymorphic granules (prevailing in females) and with 200 nm spherical granules (prevailing in males). No changes were detected in somatotropes in the maturation period.

Sasaki and Iwama (1988) detected differences according to sex in mouse lactotropes and somatotropes in a light and electron microscopy immu-

alta densidad celular de ambos tipos, con la presencia de gránulos secretorios inmaduros (200 nm). En ratas adultas se vieron dos tipos de lactotropas: con gránulos polimorfos de 500 nm (prevalentes en hembras) y con gránulos esféricos de 200 nm (prevalentes en machos). No se detectaron cambios en las somatotropas durante la maduración.

Sasaki e Iwama (1988) demostraron diferencias según sexo en las lactotropas y las somatotropas de ratón en un estudio inmunohistoquímico por microscopía óptica y electrónica, hallando en hembras un mayor número de lactotropas tipo I (43%) y un menor porcentaje de somatotropas tipo I (33%). También detectaron lactotropas y somatotropas tipo II (con gránulos redondos pequeños de 100-200 nm), en porcentaje reducido para ambos sexos. Las somatotropas fueron muy numerosas en machos, mientras las lactotropas representaron un 10 % de las células del parénquima. Las mammosomatotropas estuvieron muy reducidas (0-0.6%) en ambos sexos.

Nuestro estudio ultraestructural permitió detectar células poligonales elongadas con prolongaciones cortas. Sus núcleos muestran acúmulos de heterocromatina y un nucléolo denso. Se observan gránulos de secreción pleomorfos que pueden ser alargados (en forma de maní) y su tamaño puede oscilar entre 200 y 800 nm, con un promedio de 600 nm (Cónsole y col., 1998) (**fig. 4.5**).

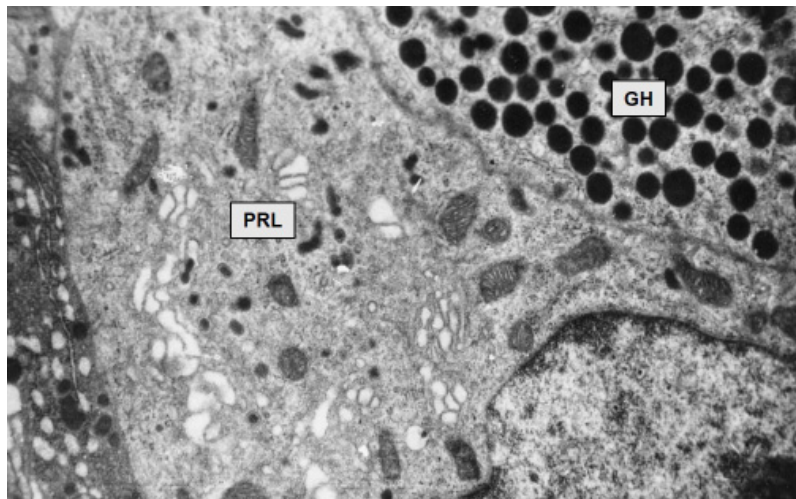


Fig. 4.5. Lactotropa (PRL) (*x 10.000*).

no-histochemical study, finding a larger number of type I lactotropes (43%) and a lesser percentage of type I somatotropes (33%) in females. Type II lactotropes and somatotropes (with small round granules: 100-200 nm) were also found in a small percentage for both sexes. Somatotropes were highly numerous in males, while lactotropes represented a 10 % of the parenchyma cells.

Mammosomatotropes were highly reduced (0-0.6%) in both sexes. Our ultrastructural study allows detecting oblong polygonal cells with short protrusions and their nuclei evidence accumulations of heterochromatin and dense nucleolus.

In **fig. 4.5** pleomorphic secretory granules can be observed in the cytoplasm. The most typical ones are oblong (peanut-shaped) and are less electron dense than somatotropes. They can vary in size from 200 to 800 nm, with an average of 600 nm.

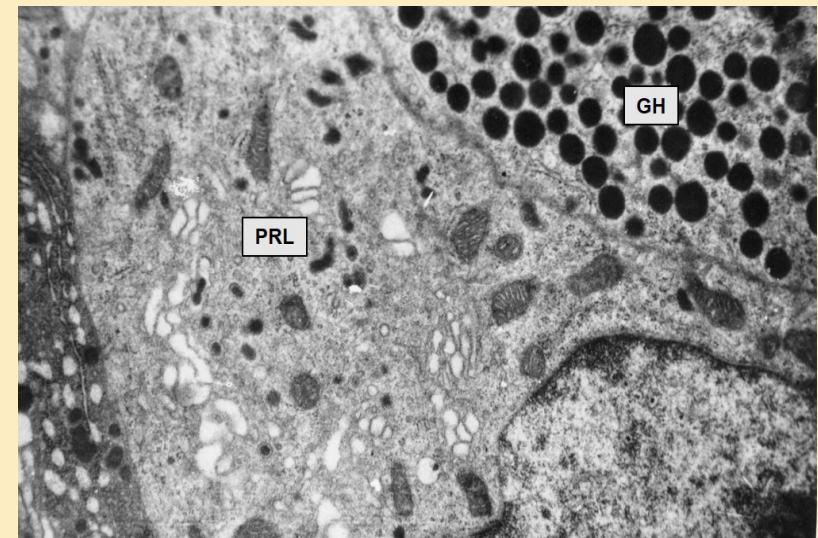


Fig. 4.5. Lactotrope cell (PRL) (*x 10.000*).

The Golgi complex evidences sacs, vacuoles, microvesicles and secretory granules. Vacuoles can undergo dilation and microvesicles are quite abundant. The immature secretory granules are irregular. Also, microtubules, centrioles, cilia, type I intermediate filaments and lysosomes can be observed (**fig. 4.6**).

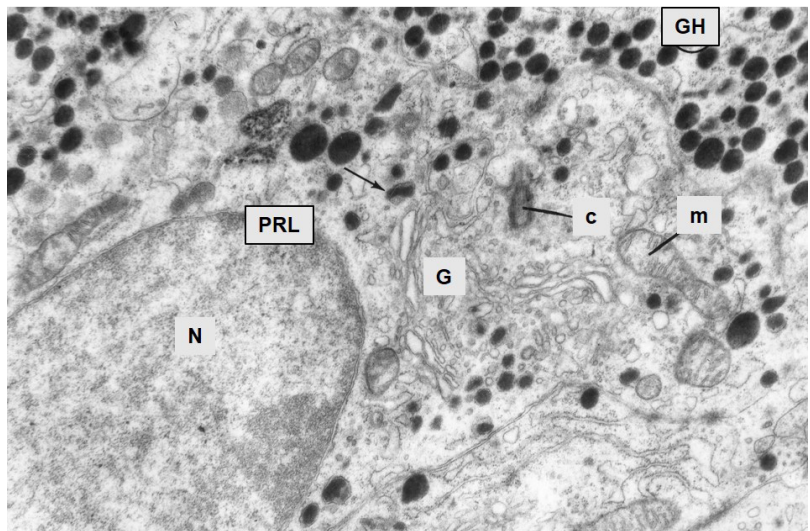


Fig. 4.6. Lactotropa (PRL). Aparato de Golgi (G): gránulos secretorios (→), mitocondrias (m), n: núcleo (n) y cilia (c) (x 15.000).

El aparato de Golgi muestra sacos, vacuolas, microvesículas y gránulos secretorios. Hay vacuolas dilatadas, numerosas microvesículas y gránulos

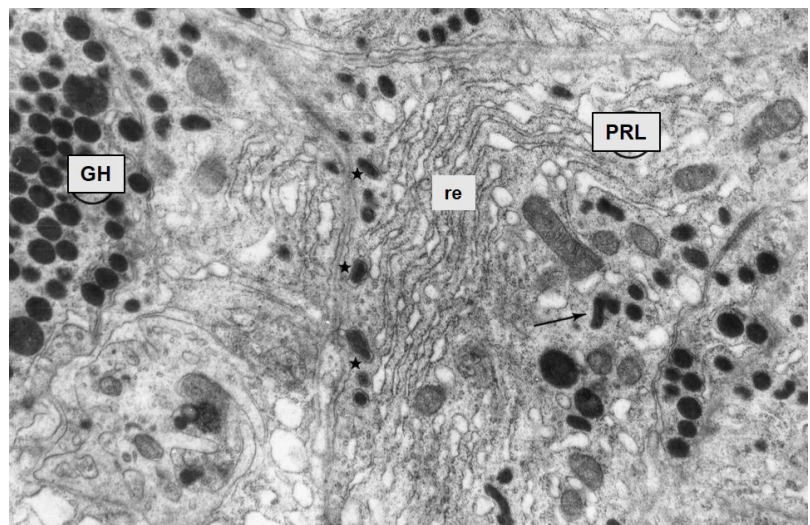


Fig. 4.7. Lactotropa (PRL). Aparato de Golgi (G): gránulos secretorios (→), mitocondrias (m), n: núcleo (n) y cilia (c) (x 15.000).

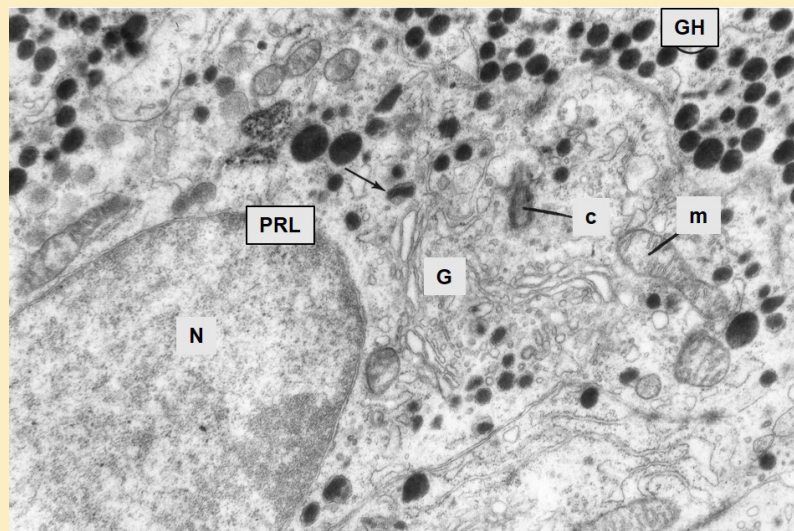


Fig. 4.6. Lactotrope cell (PRL). Golgi complex (G), secretory granules (→), m: mitocondria (m), nuclei (n), cilia (c) (x 15.000).

The RER is similar to the one described for somatotrope cells. It is formed by parallel flat cisternae, in groups located laterally next to the

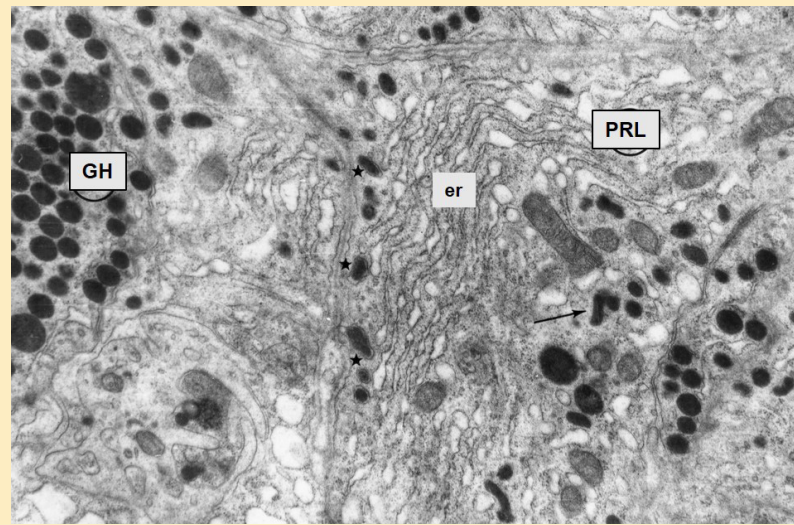


Fig. 4.7. Lactotrope cell (PRL). Endoplasmic reticulum (er) and secretory granules (→*) (x 16.000).

secretorios inmaduros irregulares en la zona golgiana. La **fig. 4.6** presenta microtúbulos, centríolos, cilias, filamentos intermedios de tipo I y lisosomas.

El RER está constituido por cisternas aplanadas paralelas, en grupos ubicados lateralmente junto a la membrana plasmática y presenta numerosos ribosomas adheridos y libres en el citoplasma. Las mitocondrias muestran crestas espaciadas y matriz densa (**fig. 4.7**).

3. Población gonadotropa: en época temprana, Kurosumi y Oota (1968) comunicaron dos tipos de gonadotropas en la pituitaria anterior de rata. Inoue y Kurosumi (1984), usando un método de ferritina para localizar la LH y FSH en la hipófisis de ratas machos, hallaron: **a.** La LH en pequeños gránulos secretorios (250-300 nm); **b.** La FSH estuvo presente en gránulos secretorios más grandes (500 nm). Algunas células fueron ricas en LH y otras en FSH.

La mayor parte de las gonadotropas contuvieron ambas gonadotropinas (LH y FSH). Inoue y Kurosumi (1989) observaron elementos del Golgi-trans con una cisterna placa de 33 nm de espesor en células secretoras pituitarias hipertrofiadas como las gonadotropas luego de la castración. Kurosumi y col. (1968) analizaron la población gonadotropa mediante inmunocitoquímica electrónica en pituitaria anterior de ratas machos y hembras, identificando un **Tipo I**, con gránulos secretorios grandes (300-700 nm) y pequeños (150-200 nm) y un **Tipo II**, con gránulos secretorios pequeños (100-200 nm). Los adultos jóvenes machos contuvieron gran número de células Tipo I (90%), mientras que las hembras presentaron más células Tipo II (70%). Estos valores disminuyeron con la edad en machos, en correlación con los valores séricos de FSH y LH. La célula Tipo I contuvo FSH y la Tipo II: LH. Corroborando nuestras observaciones, García-Ayala y col. (1998) documentaron la presencia de gonadotropas y tirotropas en el pez limón (*Seriola dumerlii*) mediante estudio inmunocitoquímico y ultraestructural.

Jezirowski y col. (1997) estudiaron la heterogeneidad morfológica y funcional de las gonadotropas de ratas machos, hallando un gran porcentaje de células LH+, FSH+, cromogranina+; un segundo grupo LH+ con pocos granos; un tercer grupo FSH+ pobre en granos y un cuarto grupo de células en anillo de sello (gonadectomía) pobres en cromo-

plasmatic membrane. It presents numerous ribosomes adhered to those cisternae and also free in the cytoplasmic matrix. Mitochondria present spaced cristae and dense matrix (**fig. 4.7**).

3. Gonadotrope population: earlier, Kurosumi and Oota (1968) reported two types of gonadotropes in the anterior pituitary of rats. Li et al. (1977), by means of an immuno-cytochemical-ultrastructural study using peroxidase in pituitaries of human fetuses identified somatotropes that showed a laminar RER, a prominent Golgi and secretory granules of 300 nm in average. Inoue and Kurosumi (1984), using a ferritin method to localize LH and FSH in male rat pituitaries, found the following: **a.** LH in small secretory granules (250-300 nm); **b.** FSH was present in larger secretory granules (500 nm). Some cells were rich in LH and others in FSH.

Most gonadotropes contained both gonadotropins (LH and FSH). Inoue and Kurosumi (1989) observed elements of the Golgi-trans with a 33 nm thick plate-like cisterna in hypertrophied pituitary secretory cells such as gonadotropes after castration. Kurosumi et al. (1991) analyzed the gonadotrope population by means of electron immunocytochemistry in anterior pituitaries of male and female rats, identifying a **Type I**, with large (300-700 nm) and small (150-200 nm) secretory granules and a **Type II**, with small secretory granules (100-200 nm). Young male adults evidenced a large number of Type I cells (90%), while females presented more Type II cells (70%). These values decreased with age in males, compared to the serum levels of FSH and LH. Type I cell contained FSH and Type II cell contained LH. García-Ayala et al. (1998) documented the presence of gonadotropes and thyrotropes in the *Seriola dumerlii* by immunocytochemical and ultrastructural studies, corroborating our observations.

Jezirowski et al. (1997) studied the morphological and functional gonadotrope heterogeneity of male rats, finding a large percentage of LH+, FSH+, chromogranin+; a second LH+ group with a few granules; a third FSH+ group with scanty granules and a fourth group of signet-ring cells (gonadectomy) poor in chromogranin A. Large granules were chromogranin A positive and the small ones were secretogranin II positive. The Golgi

granina A. Los gránulos grandes fueron cromogranina A positivos y los pequeños se presentaron secretogranina II positivos. El aparato de Golgi en las células exocrinas polarizadas tiene una forma de copa y sus caras cóncava y convexa se designan como *cis* y *trans*, respectivamente.

Watanabe y col. (2012 y 2014) hallaron un Golgi que no presentó forma de copa sino esférica y su superficie exterior e interior serían *cis* y *trans*, respectivamente. El par de centriolos centrales actuarían como un centro organizador de los microtúbulos que se extienden hacia la periferia celular. El seguimiento de la estructura del Golgi de las gonadotropas en diferentes condiciones experimentales sería un método novedoso.

3.1. Población folículotropa: muestra células grandes con núcleos esféricos y ligeramente excéntricos (**fig. 4.8**).



Fig. 4.8. Folículotropa (FSH) (x 9.000).

complex in the polarized exocrine cells is cup-shaped and its concave and convex faces are referred to as *cis* and *trans* respectively. On the contrary, in gonadotropes it was spherical-shaped and its outer and inner surfaces were *cis* and *trans* respectively. The couple of central centrioles would work as a microtubule-organizing centre extending outward towards the cell periphery. The monitoring of the Golgi structure of gonadotropes under different experimental conditions would be a novel method (Watanabe et al., 2012; 2014).

3.1. Folliculotrope population: this electron microscopy study detects a folliculotrope population with large rounded cells with spherical and slightly eccentric nuclei (**fig. 4.8**).



Fig. 4.8. Folliculotrope cell (FSH) (x 9.000).

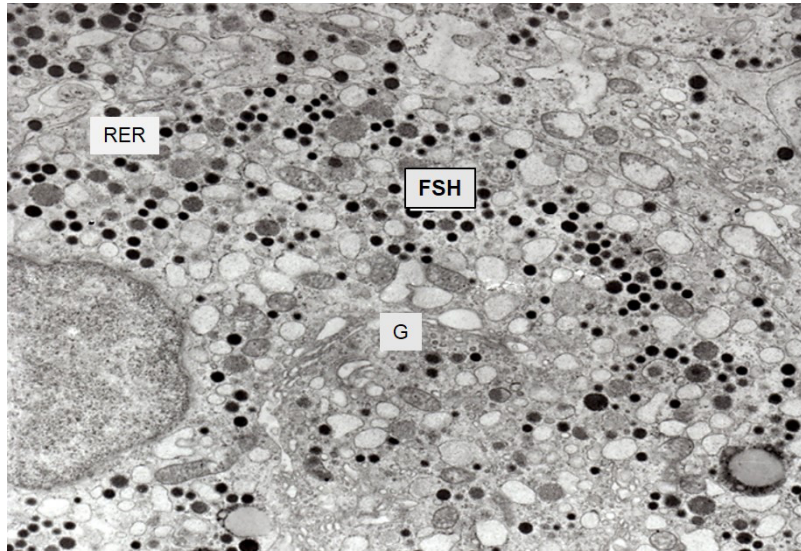


Fig. 4.9. Folliculotropa (FSH). RER y Golgi (G) (x 15.000).

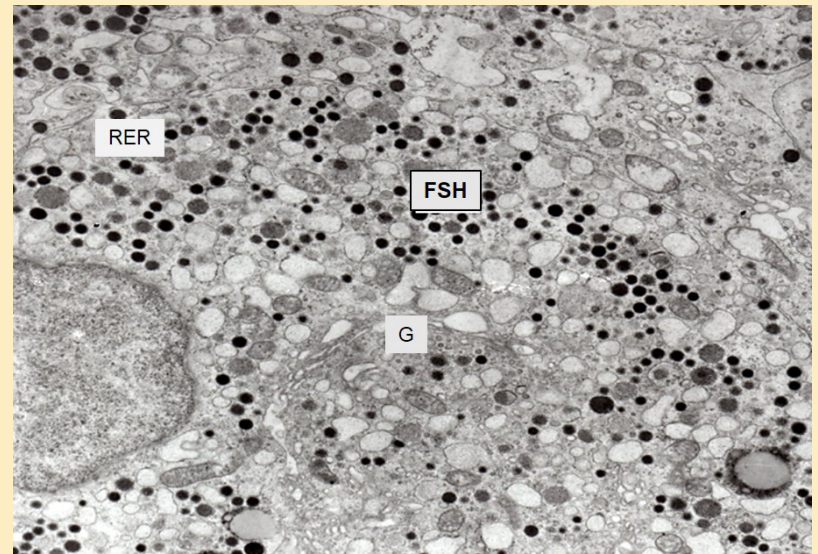


Fig. 4.9. Folliculotrope cell (FSH). RER and Golgi (G) (x 15.000).

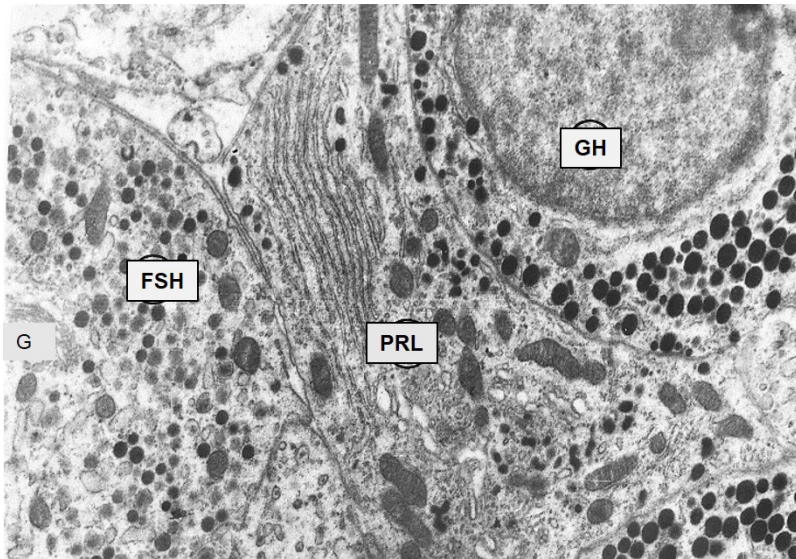


Fig. 4.10. Folliculotropa (FSH). Golgi (G). Somatotrope (GH) y lactotrope (PRL) (x 12.000).

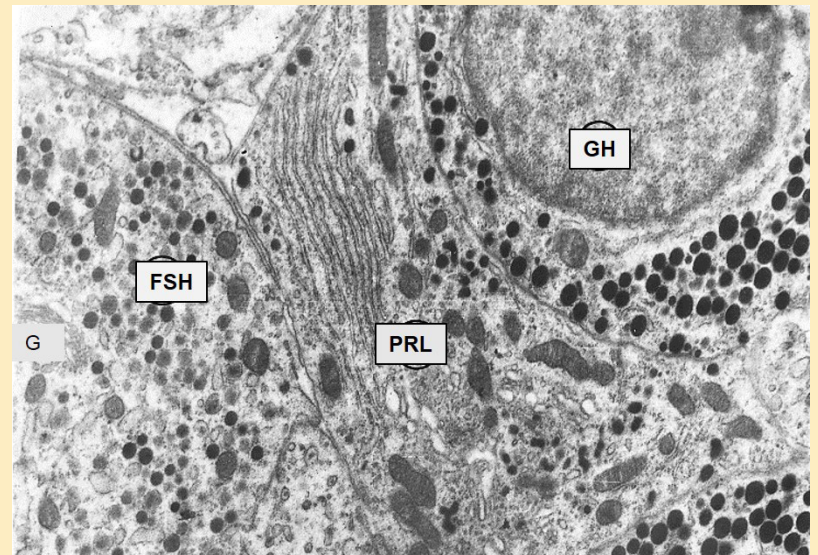


Fig. 4.10. Folliculotrope cell (FSH). Golgi (G). Somatotrope (GH) and lactotrope (PRL) cells (x 12.000).

Los gránulos de secreción (diámetro promedio de 250 nm) son redondeados y tienen desigual densidad electrónica. El RER presenta sacos dilatados o cisternas redondeadas, con escasos ribosomas y vesículas. El complejo de Golgi es discreto y las mitocondrias son alargadas, densas y con crestas en serrucho (Jurado, 2003) (**fig. 4.9**).

En la **fig. 4.10** se ve una célula folículo­tropa junto a una somatotropa una y una lactotropa.

3.2. Población luteinizante: muestra células LH de forma esférica, pero más pequeñas que las células folículo­tropas, con núcleos redondeados y gránulos de secreción electro­densos (diámetro promedio de 250 nm), de menor tamaño que los de las somatotropas (**fig. 4.11**).

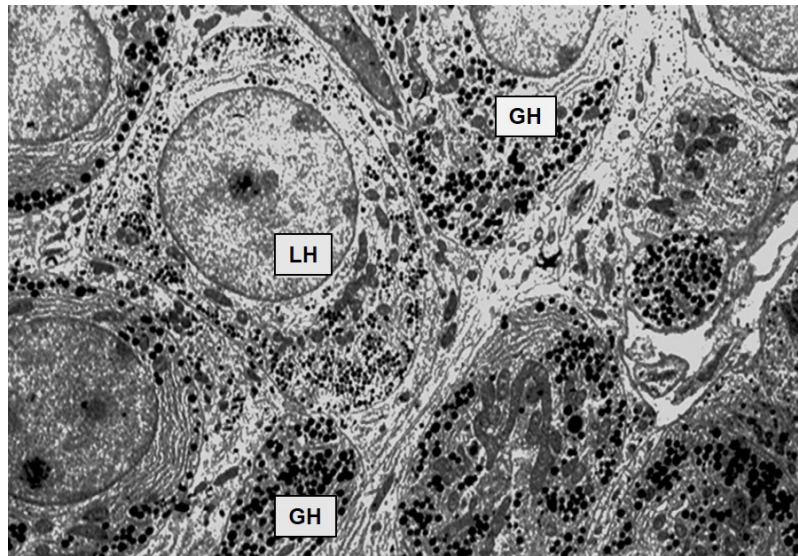


Fig. 4.11. Célula luteinizante (LH). Célula LH entre somatotropas (GH) (x 5.000).

El complejo de Golgi posee un discreto desarrollo y el RER presenta canaliculos irregulares (**fig. 4.12**) (Jurado, 2003).

Rounded granules (average diameter: 250 nm) are unequally electron-dense. The RER presents dilated sacs or rounded cisternae, with scanty ribosomes and vesicles. The Golgi complex does not stand out in size; mitochondria are oblong, dense and with cristae with a saw-tooth appearance (Jurado, 2003) (**Fig. 4.9 - 4.10**).

3.2. Luteinizing population: in **fig. 4.11** a LH cell can be observed.

The nuclei are rounded nuclei and the electron-dense secretory granules are electron-dense (250 nm average). They are smaller than

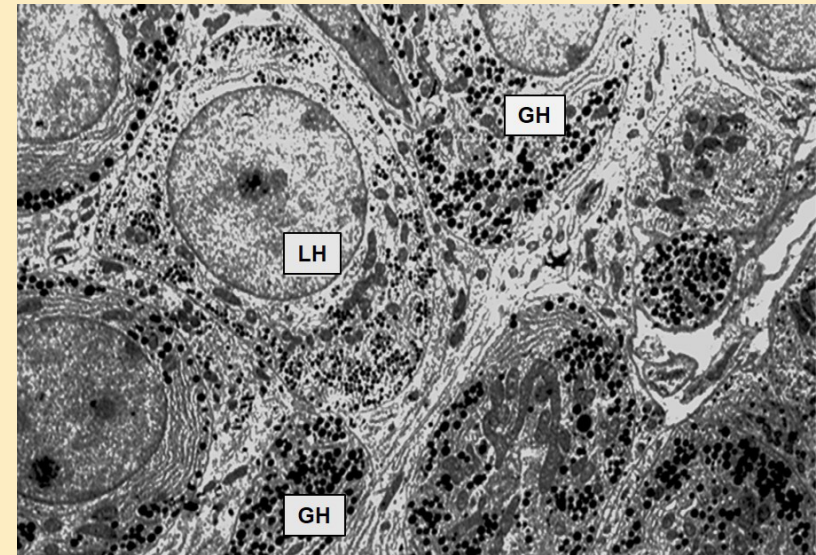


Fig. 4.11. Luteinizing cell (LH). LH cell is between somatotropes (GH) (x 5.000).

somatotrope granules. The Golgi complex evidences a moderate development and the rough endoplasmic reticulum presents irregular canaliculi (**fig. 4.12**) (Jurado, 2003).

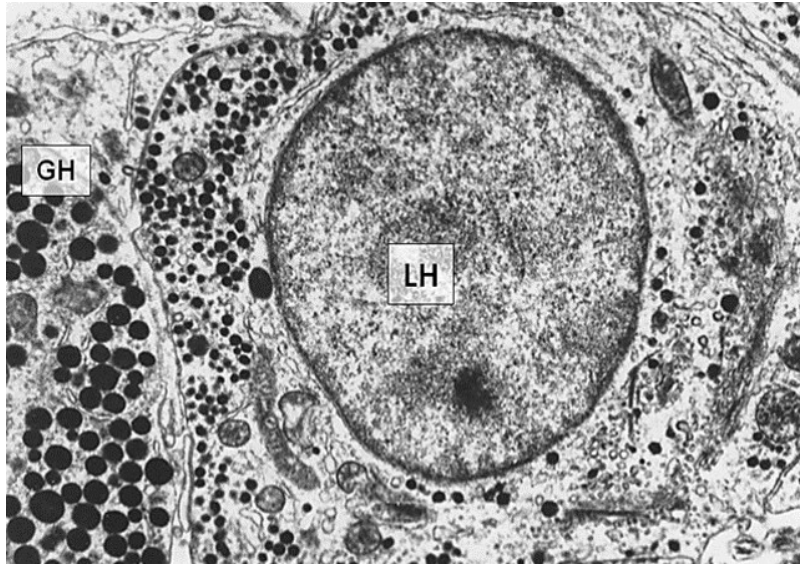


Fig. 4.12. Célula luteinizante (LH) (gránulos pequeños) y somatotropa (GH) (gránulos grandes) (x 8.000).

4. Población tirotropa: Girod y Trouillas (1993) describieron las características principales de las células tirotropas y, en especial, sus gránulos secretorios de diámetro medio de 100-150 nm y su hipertrofia en pacientes tiroidectomizados. Nuestros estudios ultraestructurales muestran células poligonales angulares, pequeñas y escasas. Los gránulos de secreción presentan densidad variable, membrana visible y pueden aparecer cercanos a la membrana plasmática. Tienen un diámetro de 50 a 100 nm, por lo que resultan los gránulos más pequeños entre los diversos tipos celulares. El RER está formado por sacos aplanados o cisternas con ribosomas adheridos y el complejo de Golgi está reducido. Hay escasas mitocondrias y frecuentes lisosomas de gran tamaño (Jurado, 2003) (**fig. 4.13**).

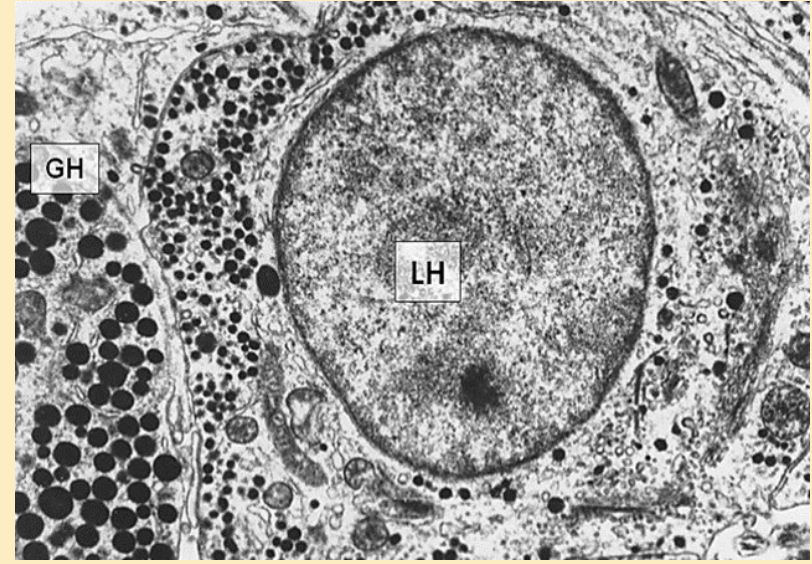


Fig. 4.12. Luteinizing cell (LH) (small granules) and somatotrope (GH) (big granules) (x 8.000).

4. Thyrotrope population: Girod and Trouillas (1993) describe the main characteristics of thyrotrope cells and, particularly, their medium-sized secretory granules of 100-150 nm and their hypertrophy in thyroidectomized patients.

Our ultrastructural studies show small and scanty angular polygonal cells. Secretory granules evidence variable density, a visible membrane and can be found near the plasmatic membrane. They are 50-100 nm in diameter, thus becoming the smallest granules among the different cell types. The RER is formed by flattened sacs or cisternae, and ribosomes. The Golgi complex is reduced, mitochondria are scanty and lysosomes are voluminous and frequent (Jurado, 2003) (**fig. 4.13**).

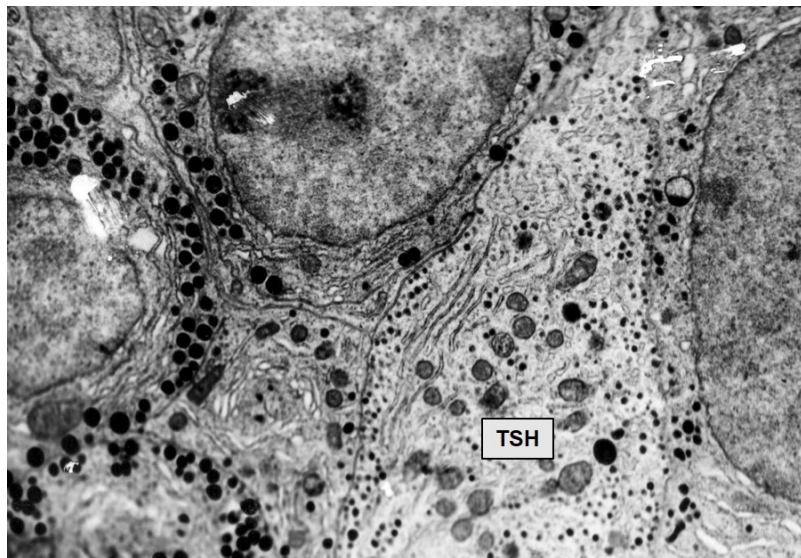


Fig. 4.13. Tirotrona (TSH) ($\times 11.000$).

5. Población corticotropa: Wang y col. (1990) investigaron las corticotropas en hámster dorado mediante inmunoelectrónica. Se hallaron corticotropas A, B y C. **Tipo A:** células ovales con gránulos secretorios pequeños (158 nm). **Tipo B:** células poligonales con gránulos medianos (250 nm). Los gránulos de células A y B se dispusieron en una sola fila junto a la membrana plasmática. **Tipo C:** células irregulares con grandes gránulos (380 nm). Las células tipo A representan el tipo inmaduro y evolucionarán hasta convertirse en células tipo C. Una semana después de la adrenalectomía se observó el incremento drástico de las células de tipo C, con dilatación de las cisternas del RER. Nuestro estudio muestra células grandes, electrolúcidas, irregulares, con prolongaciones y núcleos redondeados con algunas invaginaciones. Los gránulos de secreción son abundantes y están dispuestos en fila junto a la membrana plasmática, siendo de regular electrointensidad y con un diámetro promedio de 250 nm. Están envueltos por una membrana que toma contacto con la membrana plasmática. También pueden observarse vesículas vacías en dicha locali-

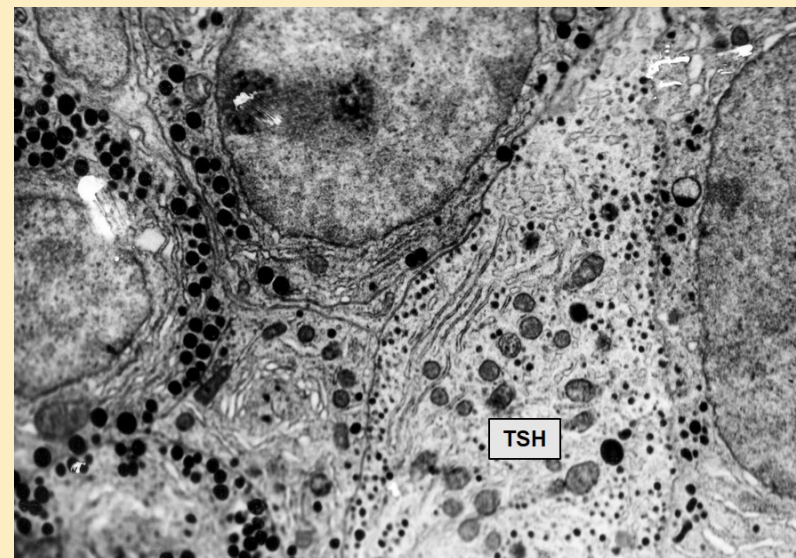


Fig. 4.13. Thyrotrope cell (TSH) ($\times 11.000$).

5. Corticotrope population: Wang et al. (1990) investigated corticotropes in the golden hamster using immunoelectronic microscopy. Corticotrope types A, B and C were found. **Type A:** oval cells with small secretory granules (158 nm). **Type B:** polygonal cells with medium-sized granules (250 nm). The granules of types A and B were arranged in a single row next to the plasmatic membrane. **Type C:** irregular cells with large granules (380 nm). Type A cells are immature and will develop to become type C cells. A week after adrenalectomy a sharp increase was observed in type C cells, with dilated cisternae in RER.

Our electron microscopy study evidences large electron-lucid irregular cells with prolongations and rounded nuclei with some invaginations. Secretory granules are abundant and are arranged in rows next to the plasmatic membrane, they evidence regular electron intensity and an average diameter of 250 nm. They are enveloped by a membrane that contacts the plasmatic membrane and empty vesicles can be observed in that localization. The RER presents irregular sacs and

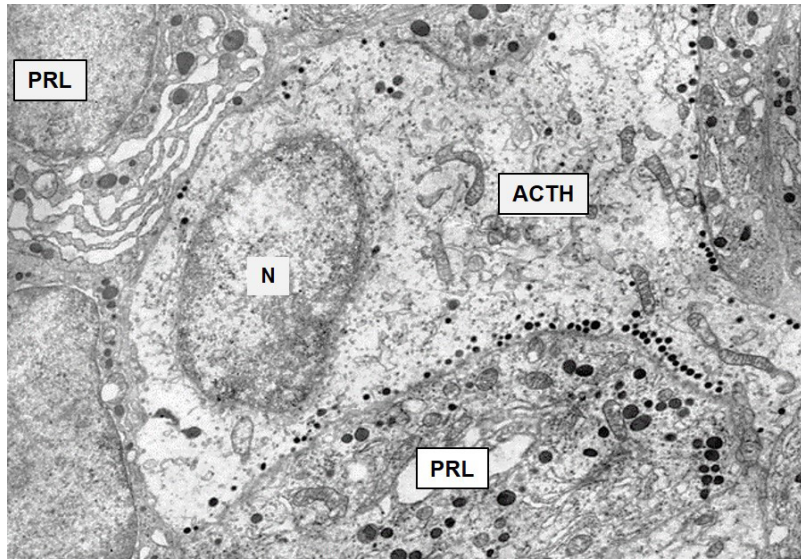


Fig. 4.14. Corticotropa (ACTH). Núcleo (N) (x 15.000).

zación. El RER presenta sacos irregulares y existe considerable cantidad de ribosomas libres que forman rosetas. El complejo de Golgi ocupa una extensa área con túbulos, vacuolas y microvesículas. Las mitocondrias son esféricas o alargadas y tienen crestas espaciadas (Jurado, 2003) (fig. 4.14).

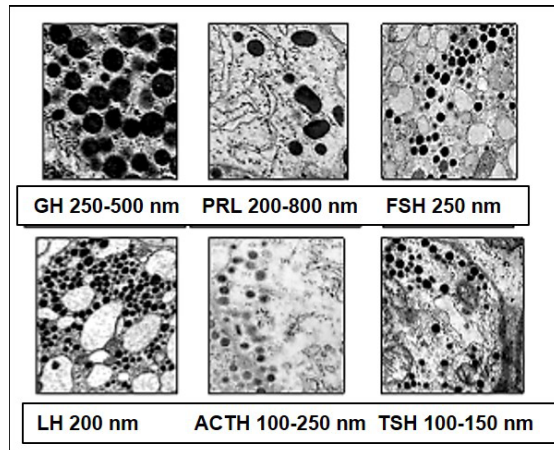


Fig. 4.15. Tamaño y forma de los gránulos secretorios adenohipofisarios.

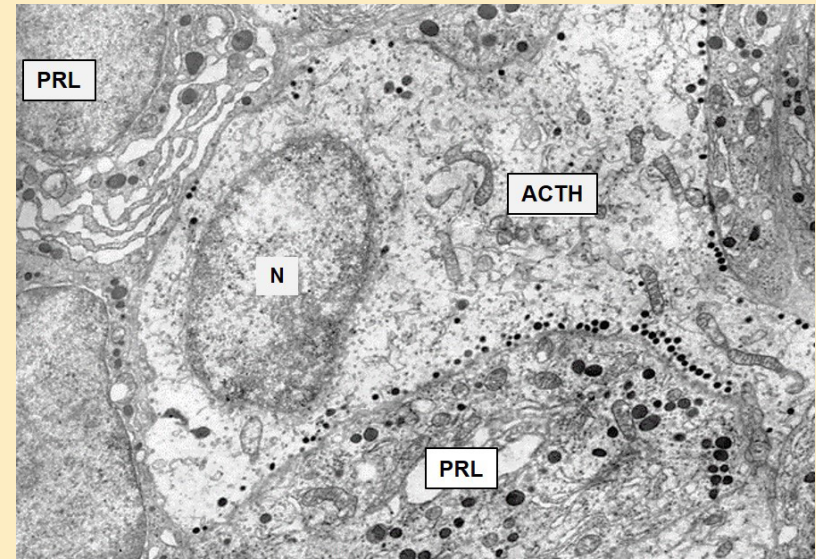


Fig. 4.14. Corticotrope cell (ACTH). Nuclei (N) (x 15.000).

there is a noteworthy amount of rosette-forming free ribosomes. The Golgi complex occupies an extended area with tubules, vacuoles and microvesicles. Mitochondria are spherical or oblong and present spaced cristae (Jurado, 2003) (fig. 4.14).

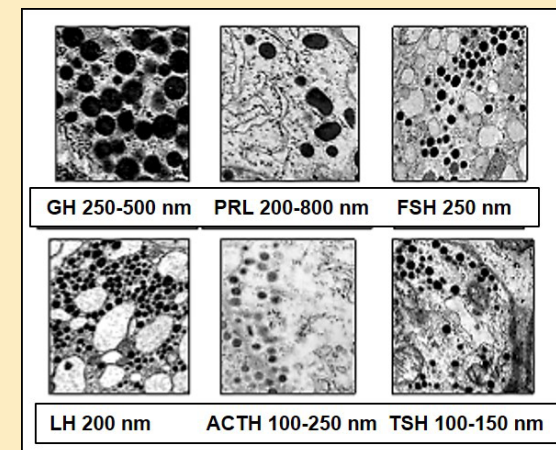


Fig. 4.15. Size and shape of adenohipophysial secretory granules.

En la **fig. 4.15** se esquematizan los diferentes gránulos secretorios adenohipofisarios, según forma y tamaño.

6. Población cromófoba: presenta células irregulares con núcleos que ocupan la mayor parte de la célula. El citoplasma es escaso y pobre en organoides. Se caracterizan por la ausencia o escasez de gránulos secretorios. Es probable que las células identificadas antiguamente como cromóforas sean realmente acidófilas o basófilas parcialmente degranuladas. Podrían representar estadios inmaduros o formas involutivas de células granulares. Presentan Golgi y retículo endoplásmico rudimentarios, con escasas mitocondrias y lisosomas. Las auténticas cromóforas serían las células madre inespecíficas.

7. Población foliculo-estelar: la técnica inmunocitoquímica de oro coloidal fue aplicada por García-Navarro y col. (1989) durante la perfusión *in vitro* de la *pars distalis* de rana, hallando células FE con numerosos lisosomas, RE-Golgi poco desarrollados y vacuolas fagocíticas con restos de células secretorias. Girod y Trouillas (1993) describieron su morfología ultraestructural y Mabuchi y col. (1996) estudiaron las células FE inyectando peroxidasa marcada a través de la vena femoral de ratas y observaron sustancia marcada en la luz folicular, entre las microvellosidades y alrededor de las cilia. Estos hallazgos sugirieron que las células FE tienen funciones de fagocitosis.

Nuestro estudio ultraestructural (Cónsole y col., 2000) muestra células estrelladas irregulares y sus finas prolongaciones se extienden entre los diversos tipos de células secretorias vecinas. El cuerpo celular contiene un núcleo ovoideo, rico en eucromatina. No presentan gránulos de secreción, el RE es escaso, el Golgi está ligeramente aumentado y las mitocondrias son pequeñas y escasas. Se ven ribosomas libres y lisosomas abundantes. En el polo apical de las células vecinas se encuentran *zónulas occludens*. Las células FE pueden presentar filamentos intermedios y vacuolas lipídicas, tienden a unirse y delimitan espacios denominados **microfoliculos** hacia donde emiten numerosas **microvellosidades**. Se comunicarían entre sí mediante uniones en hendidura (gap) que facilitarían las interconexiones (**fig. 4.16**).

In **fig. 4.15** the different adenohipophyseal secretory granules are schematized according to shape and size.

6. Chromophobe population: it presents irregular cells with nuclei occupying most part of the cells. The cytoplasm is scarce and organoid-poor. Absence or scarcity of secretory granules is characteristic. It appears probable that those cells previously identified as chromophobe are actually partially degranulated acidophilic or basophilic pituitary cells. They could represent immature stages or involution forms of granular cells. The real chromophobes would be the non-specific stem cells. They present rudimentary Golgi and RE, with scarce mitochondria and lysosomes.

7. Folliculo-stellate population: the colloidal gold immunocytochemical technique was used by García-Navarro et al. (1989) in the *in vitro* perfusion of the frog's *pars distalis*, where they found FS cells with numerous lysosomes, poorly developed *endoplasmic reticulum* - Golgi and phagocytic vacuoles with secretory cell debris. Girod and Trouillas (1993) described their ultrastructural morphology and Mabuchi et al. (1996) studied FS cells by injecting peroxidase-labelled antibody in the femoral vein of rats and observed an evident substance in the follicular light, between the microvilli and around the cilia. These findings suggested the phagocytic role of FS cells.

Our ultrastructural findings (Cónsole et al., 2000) show irregular stellate cells with their fine prolongations spreading among the different types of neighbouring secretory cells. The cell body contains a euchromatin-rich ovoid nucleus. The endoplasmic reticulum is scarce, the Golgi is slightly increased and mitochondria are small and scanty. Free ribosomes and abundant lysosomes can be seen. In the apical pole of the neighbouring cells there appear *zonulae occludens*.

They can present intermediate filaments and lipid vacuoles and they not present secretory granules. FS cells tend to join and delimit spaces in a **microfollicular pattern**, towards which FS cells emit numerous **microvilli**. They would communicate by means of gap junctions that would make interconnections easier (**fig. 4.16A-B**).

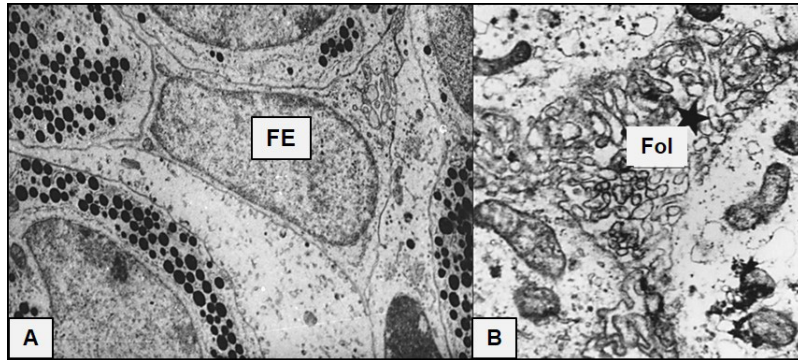


Fig. 4.16 A-B. Célula foliculo-estelar (FE). A. (x 18.000). B. F*: folículo, (x 25.000).

Células plurihormonales: Horvath y Kovacs (1988) identificaron células pituitarias de rata y humanas mediante inmunoelectrónica, detectando células plurihormonales que confirmaron la existencia de mecanismos autocrinos y paracrinos intrapituitarios. Losinski y col. (1991) utilizaron la técnica de doble marcación con partículas de oro de diferente tamaño y evidenciaron las mammosomatotropas (GH-PRL) en pituitarias intactas, adenomas de ratas y de fetos y adultos humanos. Slater (1991) detectó gránulos monohormonales en la glándula pituitaria humana mediante inmunoelectrónica y gránulos plurihormonales de mayor diámetro. Hirano y Shiino (1993) demostraron mediante inmunocitoquímica electrónica la coexistencia de las gonadotropinas (LH y FSH) con tirotrófina (TSH) en una misma célula. Shino (1993) sintetizó los caracteres ultraestructurales de las células pituitarias, remarcando la morfología de los gránulos secretorios y la colocalización de dos o más hormonas.

Pars intermedia: Saland y col. (1990) comunicaron su ultraestructura en ratas envejecidas hallando terminales nerviosas, lisosomas, células con gránulos secretorios con proopiomelanocortina y gran número de quistes.

Pars tuberalis: el estudio ultraestructural permitió identificar diferentes células: gonadotropas, tirotropas, células FE y células epiteliales (Asa y col., 1983).

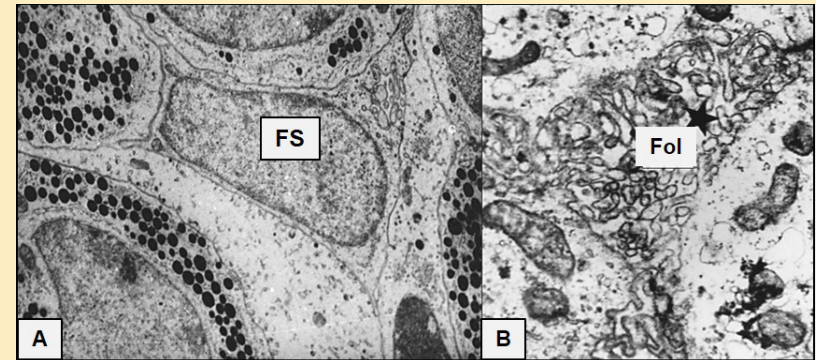


Fig. 4.16 A-B. Folliculo-stellate cells (FS). A. (x 18.000). B. Fol*: follicle (x 25.000).

Plurihormonal cells: Horvath and Kovacs (1988) identified rat and human pituitary cells using immunoelectron microscopy and detected plurihormonal cells that reinforce the existence of intrapituitary autocrine and paracrine mechanisms. Losinski et al. (1991) used the double staining technique with gold particles of different sizes and evidenced mammosomatotropes (GH-PRL) in intact pituitaries and adenomas of human foetuses and humans, as well as in rats. They demonstrated the presence of both hormones in the same secretory granules. Slater (1991) detected monohormonal granules and plurihormonal granules of a larger diameter in the human pituitary gland by means of immunoelectron microscopy. Hirano and Shiino (1993) demonstrated by means of electron immunocytochemistry the coexistence of gonadotropins (LH and FSH) and thyrotropin (TSH) in one same cell. Shino (1993) synthesized the ultrastructural characteristics of pituitary glands emphasizing the morphology of secretory granules and the colocalization of two or more hormones.

Pars intermedia: Saland et al. (1990) documented the ultrastructure of the pituitary intermediate lobe in aging rats detecting nerve terminals, lysosomes, cells with secretory granules (pro-opiomelanocortin) and a number of cysts.

Pars tuberalis: the ultrastructural study allowed identifying different cells: gonadotropes, tirotropes, FS cells and epithelial cells (Asa et al., 1983).

Pars neural: Scheithauer y col. (1992) presentó una revisión de la ultraestructura de la neurohipófisis humana que mostró axones que almacenan y liberan hormonas producidas a nivel de las neuronas de los núcleos hipotalámicos (vasopresina, oxitocina y otras “hormonas neurohipofisarias”) mediante el mecanismo de **neurocrinia**.

Referencias

- Asa SL, Kovacs K, Bilbao JM. The pars tuberalis of the human pituitary. A histologic, immunohistochemical, ultrastructural and immunoelectron- microscopic analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 399(1):49-59.
- Balin BJ, Broadwell RD. Lectin-labeled membrane is transferred to the Golgi complex in mouse pituitary cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(4):489-498.
- Cataldo AM, Broadwell RD. Cytochemical staining of the endoplasmic reticulum and glycogen in mouse anterior pituitary cells. *J Histochem Cytochem* 1984; 32(12):1285-94.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.
- Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immuno-histochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1):25-32.
- Dubois P, Girod C. Colloidal formations and ciliated cells in the anterior pituitary of the gold hamster (*Mesocricetus auratus* Waterh.). *C R Seances Soc Biol* 1967; 161(12):2496-2499.
- Farquhard MG. Membrane recycling in secretory cells: pathway to the Golgi complex. *Ciba Found Symp* 1982; 92:157-183.
- Farquhard MG. Secretion and crinophagy in prolactin cells. *Adv Exp Med Biol* 1977; 80:37-94.

Pars neural: Scheithauer et al. (1992) presented a review of the ultrastructure of human neurohypophysis evidencing axons that store and release hormones produced at the level of the neurons of hypothalamic nuclei (vasopressin, oxytocin and other “neurohypophyseal hormones”) by means of the **neurocrinia** mechanism.

References

- Asa SL, Kovacs K, Bilbao JM. The pars tuberalis of the human pituitary. A histologic, immunohistochemical, ultrastructural and immunoelectron- microscopic analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 399(1):49-59.
- Baling BJ, Broad well RD. Lectin-labelled membrane is transferred to the Golgi complex in mouse pituitary cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(4):489-498.
- Cataldo AM, Broad well RD. Cytochemical staining of the endoplasmic reticulum and glycogen in mouse anterior pituitary cells. *J Histochem Cytochem* 1984; 32(12):1285-94.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.
- Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immuno-histochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1):25-32.
- Dubois P, Girod C. Colloidal formations and ciliated cells in the anterior pituitary of the gold hamster (*Mesocricetus auratus* Waterh.). *C R Seances Soc Biol* 1967; 161(12):2496-2499.
- Farquhard MG. Membrane recycling in secretory cells: pathway to the Golgi complex. *Ciba Found Symp* 1982; 92:157-183.
- Farquhard MG. Secretion and crinophagy in prolactin cells. *Adv Exp Med Biol* 1977; 80:37-94.

Fumagalli T, Zanini A. A cow anterior pituitary, growth hormone and prolactin can be packed in separate granules of the same cell. *J Cell Biol* 1985; 100(6):2019-24.

García-Ayala A, García-Hernández MP, Quesada JA, Agulleiro B. Gonadotropic and thyrotropic cells from Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*; Risso 1810) immunocytochemical and ultrastructural characterization. *Anat Rec* 1998; 250(4):448-458.

García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immunocytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition* 10-017-A-10, 1993, 1:1-24.

Guerineau NC, McKinney RA, Debanne D, Mollard P, Gahwiler BH. Organotypic cultures of the anterior pituitary: morphology, physiology and cell-to-cell communication. *J Neurosci Methods* 1997; 73(2):169-176.

Hirano N, Shiino M. Co-existence of gonadotrophins (FSH, LH) and thyrotrophin (TSH) in single anterior pituitary cell of the musk shrew. *Suncus murinus*. *Cell Tissue Res* 1993; 272(2):315-320.

Horvath E, Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 1988; 8(4):401-432.

Inoue K, Kurosumi K. Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat. *Cell Tissue Res* 1984; 235(1):77-83.

Inoue K, Kurosumi K. Ultrastructural observation of trans-Golgi associated plate-like cisterna in the secretory cells of the rat anterior pituitary gland with special reference to the intracisternal skeleton. *Anat Rec* 1989; 225(4):272-278.

Jezirowski T, Watanabe T, Bargsten T, Grube D. Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch Histol Cytol* 1997; 60(4):355-370.

Fumagalli T, Zanini A. A cow anterior pituitary, growth hormone and prolactin can be packed in separate granules of the same cell. *J Cell Biol* 1985; 100(6):2019-24.

García-Ayala A, García-Hernández MP, Quesada JA, Agulleiro B. Gonadotropic and thyrotropic cells from Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*; Risso 1810) immunocytochemical and ultrastructural characterization. *Anat Rec* 1998; 250(4):448-458.

García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immunocytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition* 10-017-A-10, 1993, 1:1-24.

Guerineau NC, McKinney RA, Debanne D, Mollard P, Gahwiler BH. Organotypic cultures of the anterior pituitary: morphology, physiology and cell-to-cell communication. *J Neurosci Methods* 1997; 73(2):169-176.

Hirano N, Shiino M. Co-existence of gonadotrophins (FSH, LH) and thyrotrophin (TSH) in single anterior pituitary cell of the musk shrew. *Suncus murinus*. *Cell Tissue Res* 1993; 272(2):315-320.

Horvath E, Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 1988; 8(4):401-432.

Inoue K, Kurosumi K. Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat. *Cell Tissue Res* 1984; 235(1):77-83.

Inoue K, Kurosumi K. Ultrastructural observation of trans-Golgi associated plate-like cisterna in the secretory cells of the rat anterior pituitary gland with special reference to the intracisternal skeleton. *Anat Rec* 1989; 225(4):272-278.

Jezirowski T, Watanabe T, Bargsten T, Grube D. Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch Histol Cytol* 1997; 60(4):355-370.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci (Japan)* 1998; 60(6):705-711.

Jurado SB. Impacto del envejecimiento sobre las poblaciones adenohipofisarias de la rata. Estudio inmunocitoquímico y ultraestructural. Tesis doctoral. Directores: Dres. Gómez Dumm CLA - Cónsole GM, 2003.

Kurosumi K, Oota Y. Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent estrous and diestrous rats. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968; 85(1):34-46.

Kurosumi K, Koyama T, Tosaka H. Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 1986; 49(2):227-242.

Kurosumi K. A review: classification and ultrastructure of the anterior pituitary cells and their role in function of hormone secretion. *Kaibogaku Zasshi* 1991a; 66(5):421-451.

Kurosumi K. Formation and release of secretory granules during mitosis in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Jpn* 1979; 42(4):481-486.

Kurosumi K. Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohipofisis in the rat: a review. *J Electron Microsc Tech* 1991b; 19(1):42-56.

Li JY, Dubois MP, Dubois PM. Somatotrophs in the human fetal anterior pituitary. An electron microscopic-immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1977; 181(4):545-552.

Losinski NE, Horvath E, Kovacs K, Asa SL. Immunoelectron microscopic evidence of mammosomatotrophs in human adult and fetal adenohipofyses, rat adenohipofyses, and human and rat pituitary adenomas. *Anat Anz* 1991; 172(1):11-16.

Lue CM, Wang SM, Lu KS, Lin SA. Immunocytochemical identification of growth hormone cells in the adenohipofysis of golden hamster. *Proc Natl Sci Counc Repub China* 1987; 11(3):253-259.

Mabuchi Y, Maruyama H, Yashiro T, Tanida S, Kurono C, Honda N, Kato H, Herbert DC. Sealing of follicular lumen of the anterior pituitary gland of the male rat. *Tissue Cell* 1996; 28(6):631-635.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci (Japan)* 1998; 60(6):705-711.

Jurado SB. Impact of ageing on the adenohipofyseal populations in the rat. An immunocytochemical and ultrastructural study. Doctoral thesis: Directors: PhD Gómez Dumm CLA - PhD Cónsole GM, 2003.

Kurosumi K, Oota Y. Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent oestrous and diestrous rats. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968; 85(1):34-46.

Kurosumi K, Koyama T, Tosaka H. Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 1986; 49(2):227-242.

Kurosumi K. A review: classification and ultrastructure of the anterior pituitary cells and their role in function of hormone secretion. *Kaibogaku Zasshi* 1991a; 66(5):421-451.

Kurosumi K. Formation and release of secretory granules during mitosis in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Jpn* 1979; 42(4):481-486.

Kurosumi K. Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohipofysis in the rat: a review. *J Electron Microsc Tech* 1991b; 19(1):42-56.

Li JY, Dubois MP, Dubois PM. Somatotrophs in the human foetal anterior pituitary. An electron microscopic-immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1977; 181(4):545-552.

Losinski NE, Horvath E, Kovacs K, Asa SL. Immunoelectron microscopic evidence of mammosomatotrophs in human adult and foetal adenohipofyses, rat adenohipofyses, and human and rat pituitary adenomas. *Anat Anz* 1991; 172(1):11-16.

Lue CM, Wang SM, Lu KS, Lin SA. Immunocytochemical identification of growth hormone cells in the adenohipofysis of golden hamster. *Proc Natl Sci Counc Repub China* 1987; 11(3):253-259.

Mabuchi Y, Maruyama H, Yashiro T, Tanida S, Kurono C, Honda N, Kato H, Herbert DC. Sealing of follicular lumen of the anterior pituitary gland of the male rat. *Tissue Cell* 1996; 28(6):631-635.

Mason WT, Rawlings SR, Cobbett P, Sikdar SK, Zorec R, Akerman SN, Benham CD, Berridge MJ, Cheek T, Moreton RB. Control of secretion in anterior pituitary cells-linking ion channels, messengers and exocytosis. *J Exp Biol* 1988; 139:287-316.

Saland LC, Samora A, Desai S. Ultrastructure of the pituitary intermediate lobe in aging rats. *Anat Rec* 1990; 227(1):97-103.

Sasaki F, Iwama Y. Sex difference in prolactin and growth hormone cells in mouse adenohypophysis: stereological, morphometric, and immuno-histochemical studies by light and electron microscopy. *Endocrinology* 1988; 123(2):905-912.

Sasaki F, Sano M. Role of the ovary in the sexual differentiation of prolactin and growth hormone cells in the mouse adenohypophysis: a stereological morphometric study by electron microscopy. *J Endocrinol* 1982; 93(1):117-121.

Scheithauer BW, Horvath E, Kovacs K. Ultrastructure of the neuro-hypophysis. *Microsc Res Tech* 1992; 20(2):177-186.

Shiino M. Morphology and electron microscopic structures of pituitary gland. *Nihon Rinsho* 1993; 51(10):2517-2523.

Slater M. Plurihormonality in the secretory granules of the normal human pituitary. An immunoelectron microscopic study. *Experientia* 1991; 47(3):267-270.

Smets T, Velkeniers B, Finne E, Baldys A, Gepts W, Vanhaelst L. Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(3):335-341.

Tachibana T, Ito T, Kwon OC. Immunoelectron microscopic study of the GH cells in the anterior pituitary gland of normal human fetus. *Anat Rec* 1994; 239(2):177-184.

Wang SM, Wu JC, Lue CM, Liu CL, Lin SA. An immunoelectron microscopic study of corticotrophs in the golden hamster. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 182(6):539-545.

Mason WT, Rawlings SR, Cobbett P, Sikdar SK, Zorec R, Akerman SN, Benham CD, Berridge MJ, Cheek T, Moreton RB. Control of secretion in anterior pituitary cells-linking ion channels, messengers and exocytosis. *J Exp Biol* 1988; 139:287-316.

Saland LC, Samora A, Desai S. Ultrastructure of the pituitary intermediate lobe in aging rats. *Anat Rec* 1990; 227(1):97-103.

Sasaki F, Iwama Y. Sex difference in prolactin and growth hormone cells in mouse adenohypophysis: stereological, morphometric, and immuno-histochemical studies by light and electron microscopy. *Endocrinology* 1988; 123(2):905-912.

Sasaki F, Sano M. Role of the ovary in the sexual differentiation of prolactin and growth hormone cells in the mouse adenohypophysis: a stereological morphometric study by electron microscopy. *J Endocrinol* 1982; 93(1):117-121.

Scheithauer BW, Horvath E, Kovacs K. Ultrastructure of the neuro-hypophysis. *Microsc Res Tech* 1992; 20(2):177-186.

Shiino M. Morphology and electron microscopic structures of pituitary gland. *Nihon Rinsho* 1993; 51(10):2517-2523.

Slater M. Plurihormonality in the secretory granules of the normal human pituitary. An immunoelectron microscopic study. *Experientia* 1991; 47(3):267-270.

Smets T, Velkeniers B, Finne E, Baldys A, Gepts W, Vanhaelst L. Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(3):335-341.

Tachibana T, Ito T, Kwon OC. Immunoelectron microscopic study of the GH cells in the anterior pituitary gland of normal human foetus. *Anat Rec* 1994; 239(2):177-184.

Wang SM, Wu JC, Lue CM, Liu CL, Lin SA. An immunoelectron microscopic study of corticotrophs in the golden hamster. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 182(6):539-545.

Watanabe T, Bochimoto H, Koga D, Hosaka M, Ushiki T. Functional implications of the Golgi and microtubular network in gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):88-96.

Watanabe T, Sakai Y, Koga D, Bochimoto H, Hira Y, Hosaka M, Ushiki T. A unique ball-shaped Golgi apparatus in the rat pituitary gonadotrope: its functional implications in relation to the arrangement of the microtubule network. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(8):588-602.

Yi J, Tang XM. Lysosomes in the regulation of hormone secretion in endocrine cells. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 1991; 24(3):203-213.

Watanabe T, Bochimoto H, Koga D, Hosaka M, Ushiki T. Functional implications of the Golgi and microtubular network in gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):88-96.

Watanabe T, Sakai Y, Koga D, Bochimoto H, Hira Y, Hosaka M, Ushiki T. A unique ball-shaped Golgi apparatus in the rat pituitary gonadotrope: its functional implications in relation to the arrangement of the microtubule network. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(8):588-602.

Yi J, Tang XM. Lysosomes in the regulation of hormone secretion in endocrine cells. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 1991; 24(3):203-213.

CAPÍTULO 5

Fisiología del eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco

A nivel hipotalámico se secretan los **neurotransmisores** y las **hormonas hipotalámicas hipofisotróficas** (HHH). Entre los neurotransmisores se hallan: dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), histamina, opiáceos y péptidos. Las HHH comprenden: hormona liberadora de la secreción de GH (GHRH), hormona inhibidora de la secreción de GH (GHI), hormona liberadora de PRL (PRH), hormona inhibidora de PRL (PIH), hormona liberadora de TSH (TRH), hormona liberadora de las gonadotropinas (LH y FSH) (GnRH), hormona inhibidora de las gonadotropinas, (GnIH) y hormona liberadora de ACTH (CRH). Algunas de las hormonas hipofisotróficas no han sido aisladas aún, pero se conocen sus efectos regulatorios. En el hipotálamo existen dos formas de GHRH: GHRH (1-44) y (1-40). Se produce en las neuronas del núcleo arcuato y de la región tuberoinfundibular con axones que llegan a la eminencia media y vuelcan su contenido en el sistema porta. La GHRH produce secreción de GH entre 15 y 45 minutos. Los estrógenos, el ayuno y los glucocorticoides

CHAPTER 5

Physiology of the hypothalamic-pituitary-target organ axis

At the hypothalamic level there is secretion of **neurotransmitters** and **hypophysiotropic hypothalamic hormones**. The following neurotransmitters can be found: dopamine, adrenalin, noradrenalin, serotonin, γ -aminobutyric acid (GABA), histamine, opiates and peptides. HHH comprise: GH releasing hormone (GHRH), GH inhibiting hormone (GHIH), PRL releasing hormone (PRH), PRL inhibiting hormone (PIH), TSH releasing hormone (TRH), gonadotropin releasing hormones (LH and FSH) (GnRH), gonadotropin inhibiting hormone (GnIH) and ACTH releasing hormone (CRH). Some of the hypophysiotropic hormones have not been isolated yet, but their regulatory effects have already been known. Two forms of GHRH: GHRH (1-44) and (1-40) exist in the hypothalamus. This is generated in the neurons of the arcuate nucleus and of the tuberoinfundibular region with axons reaching the median eminence and pouring its content in the portal system. GHRH secretes GH for a period of 15 and 45 minutes. Estrogens, fasting and

aumentan la respuesta de la GH a la GHRH. Por el contrario, la GHI (somatostatina), la obesidad y el envejecimiento disminuyen dicha respuesta. La GHI es una molécula de 14 AA (SST-14). Se origina en neuronas del arcuato y paraventricular. A dosis fisiológicas inhibe la GH y la TSH. A dosis altas ejerce acción inhibitoria sobre PRL y ACTH.

A nivel hipofisario se produce síntesis, depósito y liberación de las diversas hormonas hipofisarias (HH): hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), gonadotropinas: hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), tirotrofina (TSH) y corticotrofina (ACTH) que actúan sobre los órganos blanco hormono-dependientes. Se han documentado mecanismos intrapituitarios paracrinos y autocrinos (Nagy y col., 1988; Jones y col., 1990). En la **tabla 5.1** se sintetizan las principales características de las hormonas adenohipofisarias.

Tabla 5.1. Características de las hormonas adenohipofisarias

	TSH	LH	FSH	GH	PRL	ACTH
Tipo	Glicoproteica	Glicoproteica	Glicoproteica	Proteica	Proteica	POMC: Glicoproteico
Componentes	αa1b - βTSH	αa1b - βLH	αa1b - βFSH	Cadena proteica	Cadena proteica	Deriva de POMC
Población Secretora	Tirotropa	Luteinizante	Foliculotropa	Somatotropa	Lactotropa	Corticotropa
Estimulador hipotalámico	TRH	GnRH	GnRH	GHRH	TRH PRH	CRH Vasopresina
Inhibidor Hipotalámico	Somatostatina (GHI) Dopamina	GnIH	GnIH	GHI	PRI (dopamina)	CRI?
Blanco	Células foliculares tiroideas	Células tecaes y granulosa. Células de Leydig	Células granulosa. Células de Sertoli	Hígado: IGF-I y tejidos en general	Glándula mamaria y tejidos en general	Corteza suprarrenal
Función	Secreción de hormonas tiroideas	Estimula secreción de estrógenos y testosterona	Regula células tecaes y células de Sertoli	Crecimiento de huesos largos y Tejidos (IGF-I)	Lactancia y equilibrio hidrosalino	Secreción de glucocorticoides. Menor grado: Mineralocorticoides

glucocorticoids increase the response of GH to GHRH. On the contrary, GHI (somatostatin), obesity and ageing decreases such response. GHI is a molecule of 14 AA (SST-14). It originates in arcuate and paraventricular neurons. At physiological doses it inhibits GH and TSH. At high doses it exerts inhibitory action on PRL and ACTH.

At the hypophyseal level there is synthesis, deposit and release of the different hypophyseal hormones (HH): growth hormone (GH), prolactin (PRL), gonadotropins, folliculo-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), thyrotropin (TSH) and corticotropin (ACTH), which affect the hormone-dependent target organs. Paracrine and autocrine intrapituitary mechanisms have been recorded (Nagy et al., 1988; Jones et al., 1990). In table 5.1 the main characteristics of adenohipophyseal hormones are summarized.

Table 5.1. Characteristics of adenohipophyseal hormones.

	TSH	LH	FSH	GH	PRL	ACTH
Type	Glycoprotein	Glycoprotein	Glycoprotein	Protein	Protein	POMC: glycoprotein
Components	αa1b - βTSH	αa1b - βLH	αa1b - βFSH	protein chain	protein chain	Derives from POMC
Secretory population	Thyrotrope	Luteinizing	Folliculotrope	Somatotrope	Lactotrope	Corticotrope
Hypothalamic stimulator	TRH	GnRH	GnRH	GHRH	TRH PRH	CRH Vasopresin
Hypothalamic inhibitor	Somatostatin (GHI) dopamine	GnIH	GnIH	GHI	PRI (dopamine)	CRI?
Target	Thyroid follicular cells	Theca and granulosa ovarian cells Leydig cells	Granulosa ovarian cells Sertoli cells	Liver: IGF-I and tissues in general	Mammary gland and tissues in general	Adrenal cortex
Function	Secretion of thyroid hormones	Stimulation of estrogen and testosterone secretion	Regulation of the function of theca and Sertoli cells	Growth of long bones and tissues (IGF-I)	Lactation and hydrosaline balance	Secretion of glucocorticoids: Minor degree mineralocorticoids

Existen **vías de retroalimentación negativa** desde las glándulas endocrinas periféricas hacia el eje hipotálamo-pituitario que regula funciones como crecimiento, metabolismo, reproducción, lactancia, nutrición y equilibrio hidrosalino (Peillon y col., 1996) (**fig. 5.1**).

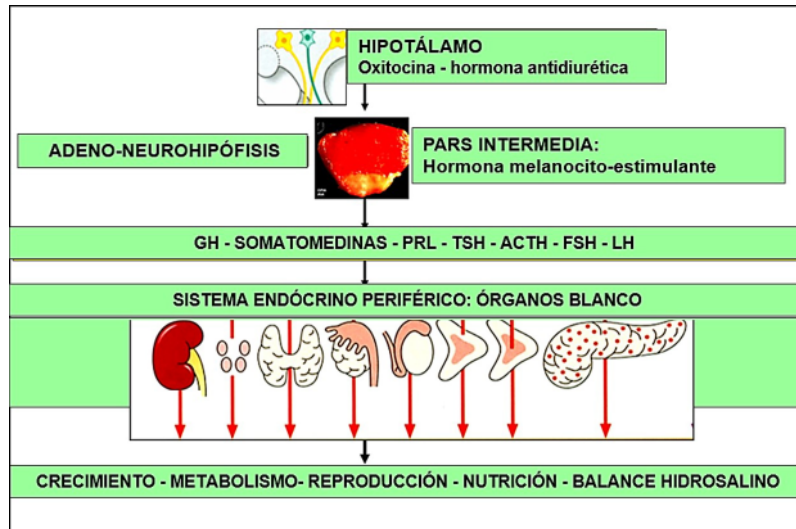


Fig. 5.1 Eje hipotálamo-hipofisario-órgano blanco.

La pituitaria responde a señales centrales y periféricas que se integran mediante interacciones celulares y moleculares específicas, formando redes de regulación transcripcional que determinan la secreción de las hormonas pituitarias esenciales para una respuesta fisiológica adecuada (Pérez-Castro y col., 2012). La microscopía electrónica ha clarificado la función de las poblaciones pituitarias. Asa y Kovacs (1992) realizaron estudios que han permitido correlacionar la estructura con la función, hallando una hipertrofia del RER ante un aumento en la síntesis de las hormonas adenohipofisarias. Esto tiene implicancias en la valoración terapéutica de la estimulación o la inhibición de los ejes cuando se administran hormonas y drogas. Aunque se conocen muchos estímulos fisiológicos asociados con cambios en la actividad trófica, la diferenciación y en los perfiles de secreción de las subpo-

Also, **negative feedback pathways** from the peripheral endocrine glands towards the hypothalamic-pituitary axis regulate functions such as growth, metabolism, reproduction, breast feeding, nutrition and hydrosaline balance (Peillon et al., 1996) (**fig. 5.1**).

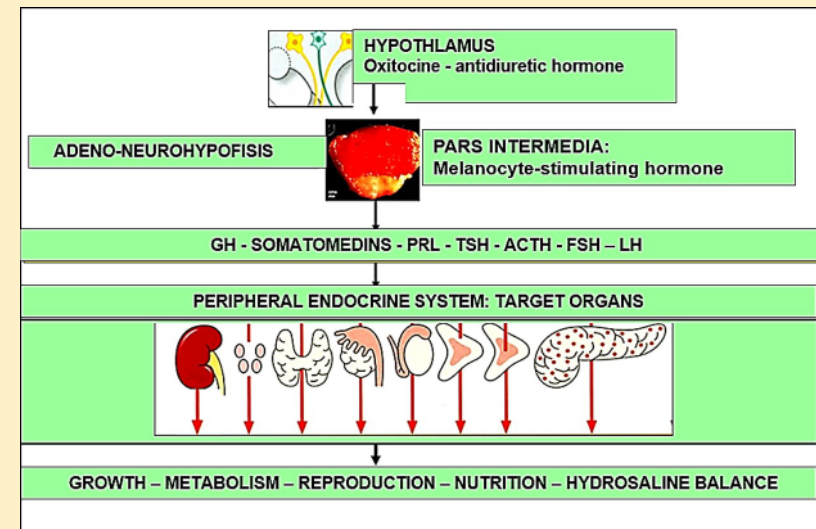


Fig. 5.1 Hypothalamic-pituitary-target organ axis.

The pituitary responds to central and peripheral signalling that integrate by means of specific cellular and molecular interactions, forming transcriptional regulation networks that determine the secretion of essential pituitary hormones for an appropriate physiological response (Pérez-Castro et al., 2012).

Electron microscopy has allowed clarifying the function of the pituitary populations. Asa and Kovacs (1992) performed studies that allowed correlating structure and function, finding hypertrophy of RER in the presence of an increase of adenohipophyseal hormone synthesis. This is important for the therapeutic appraisal of stimulation or the inhibition of axes when hormones and drugs are administered.

blaciones hipofisarias, los mecanismos precisos y sus consecuencias siguen siendo oscuros. Por ejemplo, las corticotropas en condiciones basales varían más del doble y no se sabe si el incremento de tres veces en las lactotropas durante el embarazo es el resultado de la maduración de las células no comprometidas, la transdiferenciación de las somatotropas, la división celular o una combinación de las tres opciones (Levy, 2002).

1. Eje somatotropo: a nivel hipotalámico se presentan los factores liberadores (GHRH) e inhibidores (GHI) de la hormona de crecimiento (GH). En el hipotálamo existen dos formas de GHRH: GHRH (1-44) y (1-40). Se produce en las neuronas del núcleo arcuato y de la región tuberoinfundibular con axones que llegan a la eminencia media y vuelcan su contenido en el sistema porta. La GHRH produce secreción de GH

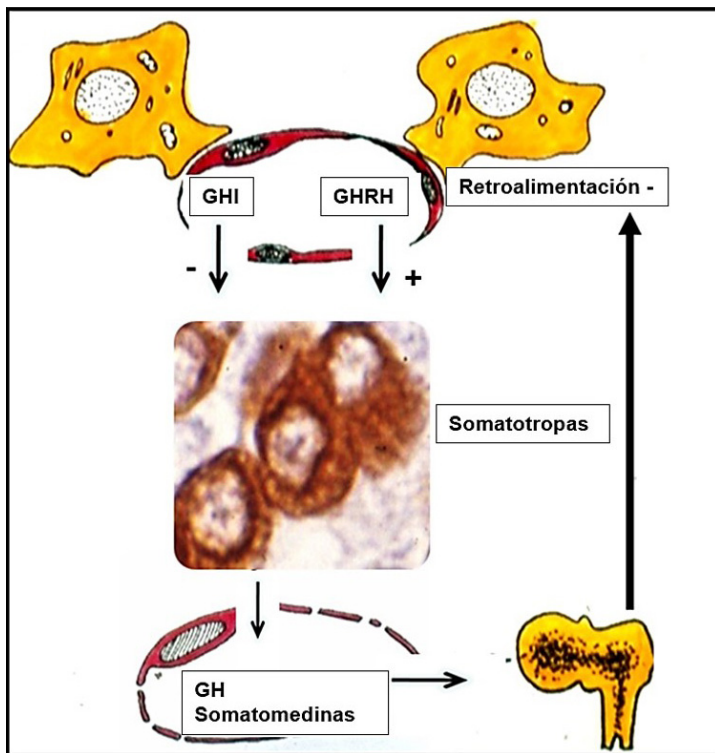


Fig. 5.2 Eje somatotropo.

Although it is known that there are many physiologic stimuli associated to changes in the trophic activity, differentiation and variation in the secretory profiles of hypophyseal subpopulations, accurate mechanisms and their consequences are not still clear. For example, corticotrope variations in basal conditions is more than twofold and it is not known if the threefold increase in lactotropes during pregnancy is the result of the maturation of cells that are not involved, somatotrope transdifferentiation, cellular division or a combination of the three options (Levy, 2002).

1. Somatotrope axis: at the hypothalamic level the growth hormone (GH) releasing (GHRH) and inhibiting (GHI) factors are found. At the second hypophyseal level there exists a somatotrope population

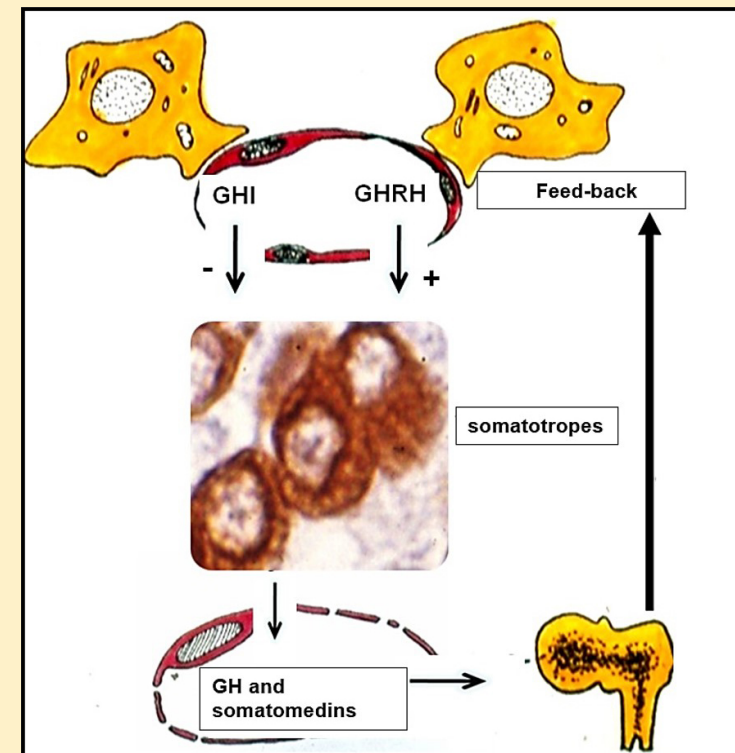


Fig. 5.2 Somatotrope axis.

entre 15 y 45 minutos. Los estrógenos, el ayuno y los glucocorticoides aumentan la respuesta de la GH a la GHRH. Por el contrario, la GHI (somatostatina), la obesidad y el envejecimiento disminuyen dicha respuesta. La GHI es una molécula de 14 AA (SST-14). Se origina en neuronas del arcuato y paraventricular. A dosis fisiológicas inhibe la GH y la TSH. A dosis altas ejerce acción inhibitoria sobre PRL y ACTH.

En el segundo nivel hipofisario existe una población somatotropa secretora de GH y en un tercer nivel sérico la GH y las somatomedinas actúan favoreciendo el crecimiento de los huesos largos y de los tejidos en general. Existe un mecanismo de retroalimentación negativo que inhibe el nivel hipotálamo-hipofisario (fig. 5.2).

Hormona de crecimiento (GH) o somatotrofina (STH): está constituida por una cadena polipeptídica de 191 residuos aminoácidos (PM 21.500 Da). Circula unida a una proteína transportadora de GH (GHBP). Es una hormona anabólica que promueve el crecimiento tisular y regula el metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Muchos de sus efectos son ejercidos a través de las somatomedinas sintetizadas a nivel hepático y renal. Además, la GH activa la lipasa triglicéridica en adipocitos y aumenta las mitosis en el tejido hemocitopoyético. En humanos de edad avanzada se halló reducción de la GH y del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I), con pérdida de la masa corporal, aumento de la masa adiposa, descenso de la función renal y del índice mitótico (Rudman y col., 1981).

Entre los efectos de la GH mediados por las **somatomedinas** están: el crecimiento cartilaginoso articular, la incorporación de glucosa a los adipocitos y la estimulación de la síntesis de lípidos con inhibición de lipólisis. En la actualidad, se consideran somatomedinas (ej: IGFs) todas las sustancias que cumplan los siguientes requisitos: **a.** Concentración sérica regulada por GH; **b.** Acción estimulante de la incorporación de sulfatos al cartílago; **c.** Acción mitogénica sobre los fibroblastos y **d.** Actividad insulínica sobre los tejidos adiposo y muscular.

La GH y las somatomedinas tienen su blanco en el hueso, el cartílago, el músculo y el tejido adiposo. Existen receptores específicos que permiten

that releases GH and at a third serum level GH and somatomedins favour the growth of long bones and tissues in general. The existence of a negative feedback mechanism inhibits the hypothalamo-hypophyseal level (fig. 5.2).

Growth (GH) or somatotropin (STH) hormone: it is constituted by a polypeptide chain of 191 amino acid residues (MW 21.500 Da). It circulates bound to a GH binding protein (GHBP). It is an anabolic hormone that promotes tissue growth and regulates the metabolism of proteins, lipids and carbohydrates. Many effects of this hormone are produced via somatomedins synthesized at liver and kidney level. Also, it activates the adipose triglyceride lipase and increases mitosis in the hematopoietic tissue. In humans of advanced age reduced GH and insulin-like growth factor type I (IGF-I) were found, with loss of body mass, increased body fat, reduced kidney function and mitotic index (Rudman, 1981). Among GH effects mediated by somatomedins we can find: growth of articular cartilage, incorporation of glucose into adipocytes and stimulation of lipid synthesis and inhibition of lipolysis. These days, somatomedins are considered to comprise all those substances that meet the following requirements (for example: insulin-like growth factors: IGFs): **a.** Serum concentration regulated by GH; **b.** Stimulation of sulphate incorporation into cartilage; **c.** Mitogenic action on fibroblasts and **d.** Insulin activity on adipose and muscular tissue.

Target tissues in GH and **somatomedins** are found in bones, cartilage, muscles and adipose tissue. There are specific receptors that allow an anabolic response and a metabolic regulation. GH and IGF-I are capable of determining lineal growth before puberty and affect growth-cellular differentiation in adult life. Enzyme kinase promotes changes in growth, differentiation and metabolism and influences the somatotrope axis (Tulipano et al., 2012).

Three peptides have been obtained to which somatomedin activity has been attributed: **a. Somatomedin A:** neutral, MW 7.000, responsible of sulphur incorporation into cartilage; **b. Somatomedin B:** slight-

una respuesta anabólica y una regulación metabólica. La GH y el IGF-I son capaces de determinar el crecimiento lineal antes de la pubertad afectando el crecimiento y la diferenciación celular en la vida adulta. La enzima quinasa promueve cambios en el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo, actuando sobre el eje somatotropo (Tulipano y col., 2012).

Se han obtenido tres péptidos a los que se les atribuye actividad somatomédica: **a. Somatomedina A:** neutra, PM 7.000, responsable de la incorporación de azufre en el cartílago; **b. Somatomedina B:** ligeramente ácida, PM 5.000 que estimula la incorporación de timidina en los fibroblastos y en las células gliales y **c. Somatomedina C:** básica, incrementa la incorporación de azufre, glucosamina y timidina a nivel cartilaginosa.

La GH aumenta con el ejercicio, el sueño, el estrés y los agonistas dopaminérgicos. La vida media de la hormona circulante es de 15 minutos (Santomé y col., 1976). La GH se libera de modo pulsátil y la amplitud del pulso es mayor en machos que en hembras (Clark y col., 1987). La secreción de GH en humanos presenta un pico nocturno en las primeras 4 horas del sueño (Prinz y col., 1983).

Los esteroides sexuales están implicados en el control del crecimiento. El receptor de estrógeno α (RE α) actuaría sobre las lactotropas y ambos receptores (RE α y RE β) controlarían la transcripción de la GH en las somatotropas (Avtanski y col., 2014). La secreción de GH en hombres es estimulada por el estradiol derivado de la aromatización de la testosterona y en las mujeres por el estrógeno local. La secreción de GH en mujeres descendió por el tamoxifeno, pero en los hombres estimuló el eje gonadal. El descenso de la secreción de GH en los hombres fue contrarrestado mediante la estimulación central de la secreción de GH por la testosterona (Birzniece y col, 2012). Además, el receptor de dopamina 2 (RD2) que falta en los ratones transgénicos, produjo una hiperprolactinemia y una hiperplasia lactotropa, mostrando una alteración en la secreción pulsátil de GH que depende de un equilibrio entre GHRH y somatostatina, con descenso del IGF-I. El modelo permitiría clarificar la modulación del eje somatotropo mediante receptores dopaminérgicos que controlarían la liberación de GH (García-Tornadu y col., 2010).

ly acid, MW 5.000, stimulates thymidine incorporation into fibroblasts and glial cells and **c. Somatomedin C:** basic, increases the incorporation of sulphur, glucosamine and thymidine at cartilage level.

GH increases with exercise, sleep, stress and dopamine agonists. The circulating hormone half-life is 15 minutes (Santomé et al., 1976). GH has pulsatile release and pulse amplitude is higher in males than in females (Clark et al., 1987). GH secretion in human evidence peaks during the first 4 hours of sleep at night (Prinz et al., 1983).

Sex steroids are involved in growth control. Estrogen receptor- α (ER- α) would act on lactotropes and both (ER- α -ER- β) would control GH transcription in somatotropes (Avtanski et al., 2014). GH secretion in males is stimulated by estradiol derived from aromatization of testosterone and in women by local estrogen. Tamoxifen diminishes GH secretion in women but stimulates the gonadal axis in men. The decrease of GH secretion in men was counteracted by central stimulation of GH secretion by testosterone (Birzniece et al., 2012). Also, dopamine 2 receptor (D2R) lacking in transgenic mice, led to hyperprolactinemia and lactotrope hyperplasia, evidencing an alteration in the pulsatile secretion of GH that depends on a balance between GHRH and somatostatin, with decrease of IGF-I. The model would allow clarifying GHRH axis modulation by means of dopamine receptors that would control GH release (García-Tornadu et al., 2010).

In children, GH deficiency produces **dwarfism** and an excessive secretion leads to **gigantism**. In adults, GH excess (caused, for example, by a secreting adenoma) causes **acromegaly**, which is characterized by an increase in size at the level of the limbs and viscera (see chapter 20).

2. Lactotrope axis: we can find a hypothalamic level with prolactin (PRL) releasing (PRH) and inhibiting (PIH) factors. There is a second hypophyseal level with the PRL-secreting lactotrope population and a third serum level with circulating PRL acting on the mammary gland to favour breast feeding and which also regulates hydrosaline meta-

En niños, la deficiencia de GH produce **enanismo** y una secreción excesiva da lugar a **gigantismo**. En el adulto, el exceso de GH (debido, por ejemplo, a un adenoma secretante) provoca una **acromegalia**, caracterizada por un aumento de tamaño a nivel de las extremidades y de las vísceras (ver cap. 22).

2. Eje lactotropo: presenta un nivel hipotalámico con factores liberadores (PRH) e inhibidores (PIH) de la prolactina (PRL). Hay un segundo nivel hipofisario representado por la población lactotropa secretora de PRL y un tercer nivel sérico con PRL circulante que actúa sobre la glándula mamaria para favorecer la lactancia y que, además, controla el metabolismo hidrosalino. Existe un mecanismo de retroalimentación negativo que regula los niveles hipotalámico y pituitario (**fig. 5.3**).

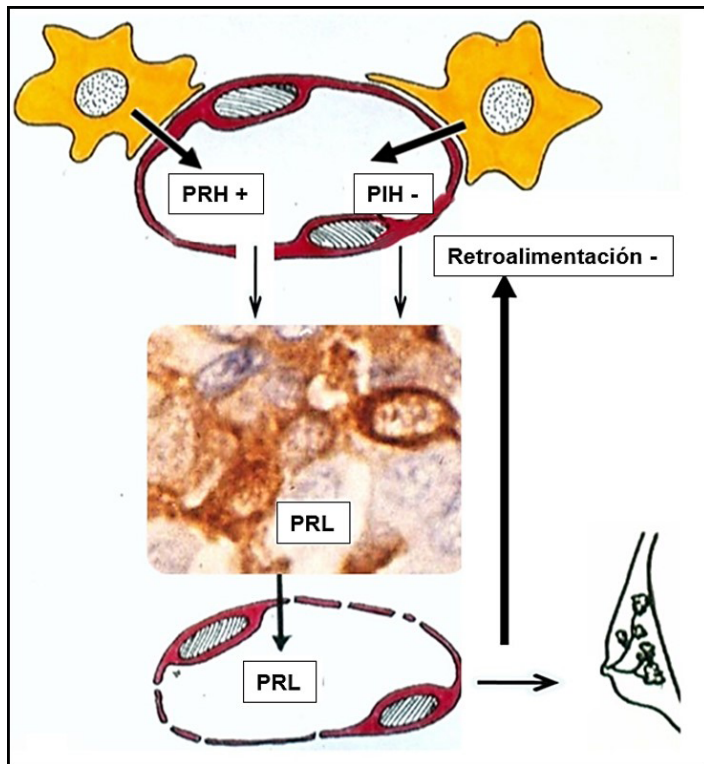


Fig. 5.3 Eje lactotropo.

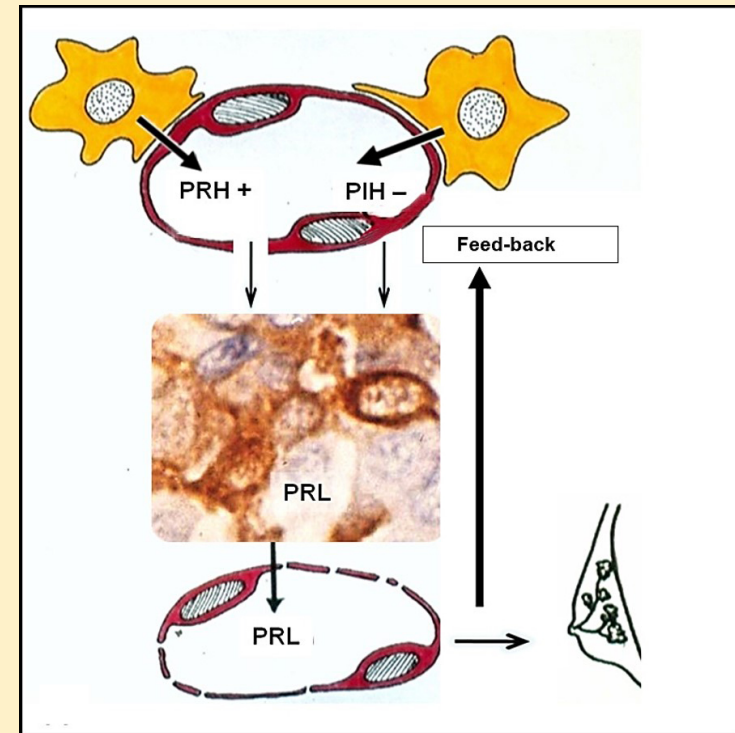


Fig. 5.3 Lactotrope axis.

bolism. There exists a negative feedback mechanism that regulates the hypothalamic and pituitary levels (**fig. 5.3**).

Prolactin (PRL): the PRL has a short lifetime (minutes) and it is responsible for the initiation and maintenance of breastfeeding (MW 23.500 Da). GH and PRL would derive from a common ancestral gene and are regulated by a same transcription factor. It is a 199 AA polypeptide with three disulphide bridges. Three forms with different molecular weight are detected in circulation: monomeric (23 Da), dimer (48 to 56 Da) and polymer (100 Da). It is secreted in a pulsatile way and suffers circadian variations, with a maximum at the end of sleep/first morning hours and a minimum between 12 to 15 h.

Prolactina (PRL): la PRL tiene una vida media corta (minutos) y es responsable de la iniciación y mantenimiento de la lactancia (PM 23.500 Da). La GH y la PRL derivarían de un gen ancestral común y estarían reguladas por un mismo factor de transcripción. Es un polipéptido de 199 AA con tres puentes disulfuro. En la circulación se detectan 3 formas con diferente peso molecular: monomérica (23 kd), dímero (48 a 56 kd) y polímero (100 kd). Se secreta en forma pulsátil y sufre variaciones circadianas, con un máximo al final del sueño/primeras horas de la mañana y mínimo entre 12 a 15 hs.

La PRL actúa sobre la glándula mamaria, provocando: **mamogénesis** (crecimiento y desarrollo), **lactogénesis** (síntesis de leche) y **galactogénesis** (mantenimiento de la secreción de la leche). En roedores se ha demostrado que el crecimiento y desarrollo alveolar requiere la acción complementaria de estrógenos, progesterona y glucocorticoides (Imagawa y col., 1994). La PRL estimula la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos de la leche.

Además, la PRL prolonga la vida del cuerpo lúteo, posee varias de las acciones metabólicas de la GH, estimula el desarrollo de los órganos sexuales masculinos y tiene acción gonadotrófica sobre los ovarios de algunos mamíferos. Durante el embarazo se produce un aumento de la PRL.

La PRL en los roedores es crucial en el mantenimiento y actividad secretora del cuerpo lúteo después del apareamiento (Morishige y Rothchild, 1974) y regula el comportamiento reproductivo, influencia la construcción de nidos, la limpieza de las crías y la postura durante la alimentación (Bridges, 1985; Bridges y col., 1996, Lucas y col., 1998). En el humano, los niveles elevados de la PRL se asocian con reacciones psicósomáticas como la pseudo-preñez (Sobrinho, 1993), estimulan la función testicular en la mayoría de los mamíferos, regulan el metabolismo de las células de Leydig (Nag y col., 1981) y aumentan el número de receptores de LH (Dombrowicz y col., 1992). PRL y LH disminuyen la actividad de la aromatasa (Papadopoulos y col., 1986), aumentando la esteroidogénesis y el número de receptores de andrógenos (Purvis y col., 1979; Calandra y col., 1982; Barañao y col., 1981). La PRL incrementa el número de receptores de FSH en las células de Sertoli (Guillaumot y col., 1996) y de los lípidos totales en las células germinales (Gunasekar y col., 1991). En la rata, la PRL junto a los andrógenos, aumenta

PRL has an effect on the mammary gland causing **mammogenesis** (growth and development), **lactogenesis** (milk synthesis) and **galactogenesis** (maintenance of milk secretion). It has been demonstrated that in rodents the alveolar growth and development requires the complementary action of estrogens, progesterone and glucocorticoids (Imagawa et al., 1994). PRL stimulates the synthesis of milk proteins, lipids and carbohydrates.

Also PRL extends corpus luteum lifespan, possesses several of the metabolic actions of GH, stimulates the development of male sexual organs, exerts a gonadotrope action on some mammals' ovaries and affects hydro-electrolytic metabolism. During pregnancy PRL increases.

Particularly in rodents, PRL is vital in the maintenance and secretory activity of the corpus luteum after mating (Morishige and Rothchild, 1974). PRL affects the reproductive behaviour by influencing the formation of nests, offspring cleaning and posture while breeding (Bridges, 1985; Bridges et al., 1996, Lucas et al., 1998). In humans elevated levels of PRL are associated to psychosomatic reactions such as pseudo pregnancy (Sobrinho, 1993). In males it stimulates the testicular function in most of mammals, it regulates the metabolism of Leydig cells (Nag et al., 1981) and increases the number of LH receptors (Dombrowicz et al., 1992). PRL and LH diminish aromatase activity (Papadopoulos et al., 1986), increase steroidogenesis and the number of androgen receptors (Purvis et al., 1979; Calandra et al., 1982; Barañao et al., 1981). In Sertoli cells PRL increases the number of FSH receptors (Guillaumot et al., 1996) and total lipids of germinal cells (Gunasekar et al., 1991). In rats PRL together with androgens increases the weight of the prostate and of the seminal vesicles (Thomas et al., 1976; Negro-Villar et al., 1977). Also, PRL modulates the activity of ornithine decarboxylase in seminal vesicles (Gonzalez et al., 1994). The neuroendocrine processes associated to inhibitory photoperiods and the role of FSH and PRL in the control of the testicular function have been described in hamsters (Steger and Bartke, 1991; Chandrashekar et al., 1994).

el peso de la próstata y de las vesículas seminales (Thomas y col., 1976; Negro-Villar y col., 1977). Además, la PRL modula la actividad de la ornitina decarboxilasa en las vesículas seminales (González y col., 1994). En hámsteres han sido descritos procesos neuroendocrinos asociados a los fotoperíodos inhibitorios y el rol de FSH/PRL en el control de la función testicular (Steger y Bartke, 1991; Chandrashekar y col., 1994).

Los estrógenos afectan la función lactotropa mediante dos mecanismos: **a.** Acción mitogénica directa sobre la pituitaria (Welsch y col., 1971) y **b.** Depresión de la actividad de las neuronas dopaminérgicas tubero-infundibulares (TIDA) del núcleo arcuato que ejercen un control inhibitorio tónico sobre la secreción de PRL (Sarkar y col., 1982). Se ha documentado que el estradiol y la progesterona inhibieron la actividad transcripcional del promotor de PRL en células mammosomatotropas GH3 de ratas (Mijiddorj y col., 2012). La dopamina inhibió los cambios producidos por los estrógenos en la síntesis-secreción de PRL y en la proliferación de lactotropas. La bromocriptina, un agonista dopaminérgico, suprimió la proliferación de las lactotropas. Además, la activación de receptores de dopamina D2 inhibió la función de las lactotropas dependientes de los estrógenos, a través de la atenuación de la transactivación mediada por el receptor estrogénico (Ishida y col., 2013).

La interleuquina 6 (IL-6) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) se sintetizan en la pituitaria y estimulan la secreción de PRL. Se halló que la IL-6 está implicada en la regulación de la actividad y proliferación de las células VIP y controlaría la PRL actuando sobre el VIP pituitario (Blanco y col., 2013).

La PRL participa en la regulación del transporte de solutos y agua a través de la membrana plasmática (Shennan, 1994). En los peces y sapos reduce la pérdida de iones sodio y la captación de agua (Maetz, 1970; Lüthy y col., 1985). El extremo N-terminal de la PRL genera una familia de péptidos de diferentes PM que actúan en las células endoteliales vasculares, inhibiendo la vasodilatación y la angiogénesis (Clapp, 1987; Clapp y col., 2006). La PRL y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), con inducción de Stat-5, actúan como reguladores autocrinos de las células endoteliales favoreciendo la migración, la invasión y la formación de vasos sanguíneos (Yang y col., 2013).

Estrogens affect the lactotrope function by two mechanisms: a) direct mitogenic action on the pituitary (Welsch et al., 1971) and b) depression of the tuberoinfundibular dopamine neurons (TIDA) activity of the arcuate nucleus that exert a tonic inhibiting control on PRL secretion (Sarkar et al., 1982). Estradiol and progesterone have been reported to inhibit PRL transcriptional activity in rat mammosomatotrope GH3 cells (Mijiddorj et al., 2012). Dopamine inhibited estrogen-induced changes in the synthesis and secretion of PRL and lactotrope proliferation. Bromocriptine, a dopamine agonist, suppressed lactotrope proliferation. The activation of dopamine D2 receptors inhibited the function of estrogen-dependent lactotropes, via attenuation of estrogen receptor mediated transactivation (Ishida et al., 2013).

IL-6 and the vasoactive intestinal peptide (VIP) are synthesized in the pituitary and stimulate PRL secretion. IL-6 has been found to be involved in the regulation of the activity and proliferation of VIP cells and would control PRL by acting on the pituitary VIP (Blanco et al., 2013).

PRL participates in the regulation of solutes and water transportation through the plasmatic membrane (Shennan, 1994). In fish and toad reduce sodium ion loss and water collection (Maetz, 1970; Lüthy et al., 1985). The N-terminal end of PRL generates a family of peptides of different MW that act in the vascular endothelial cells inhibiting vasodilation and angiogenesis (Clapp, 1987; Clapp et al., 2006). PRL and the vascular endothelial growth factor (VEGF), with induction of STAT-5, act as autocrine regulators of endothelial cells favouring migration, invasion and tube formation (Yang et al., 2013).

PRL has a key role in the homeostasis of the internal milieu regulating the humoral and cellular response of the immune system in physiological or pathological conditions such as autoimmune diseases (Neidhart, 1998; Buskila and Shoenfeld, 1996; Shelly et al., 2012). Even though PRL stimulates T, B, NK lymphocytes and macrophages, it is not essential for the normal development of the immune system. This has been demonstrated in mice lacking the gene codifying the PRL receptor

La PRL tiene un rol clave en la homeostasis del medio interno regulando la respuesta humoral y celular del sistema inmune en condiciones fisiológicas o patológicas, tales como las enfermedades autoinmunes (Neidhart, 1998; Buskila y Shoenfeld, 1996; Shelly y col., 2012). Si bien la PRL estimula los linfocitos T, B, NK y macrófagos, no es esencial para el desarrollo normal del sistema inmune, según lo demostrado en ratones que carecían del gen que codifica el receptor de PRL (Bouchard y col., 1999). La PRL actuaría como un importante mediador en el sistema inmunoneuroendocrino (Goffin y col., 1998).

3. Eje gonadotropo: se observa un nivel hipotalámico con factores liberadores (GnRH) e inhibidores (GnIH) de gonadotropinas: hormonas

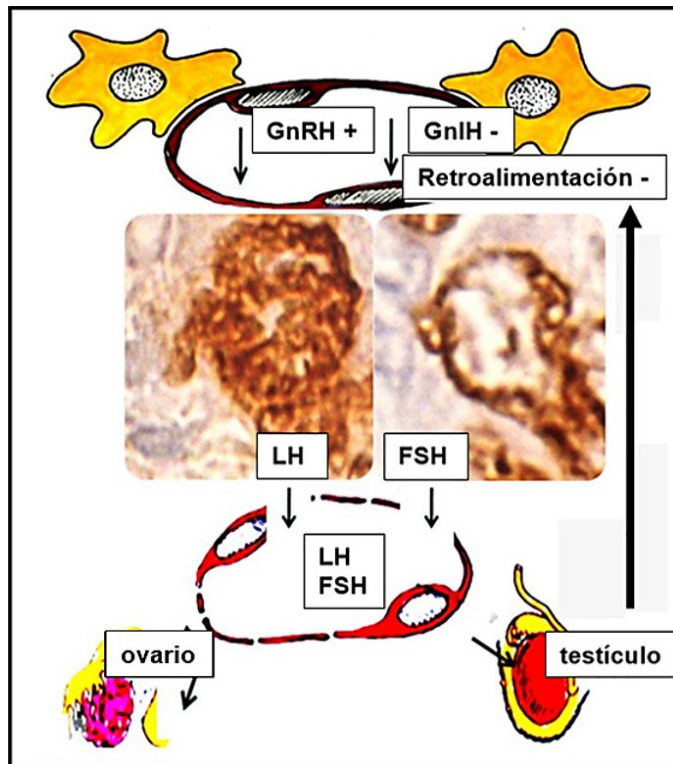


Fig. 5.4 Eje gonadotropo.

(Bouchard et al., 1999). PRL would act as an important mediator in the immune-neuroendocrine system (Goffin et al., 1998).

3. Gonadotrope axis: a hypothalamic level with gonadotropin releasing (GnRH) and inhibiting (GnIH) factors can be observed: folliculo-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones. GnRH is a 10 AA neuropeptide that appears from a molecule of higher molecular weight. By means of a decapeptide the nervous system regulates the secretion of gonadotropins. In primates, GnRH secretory neurons are located in the arcuate and ventromedial nuclei.

There is a second hypophyseal level with the folliculotrope-luteinizing FSH- and LH-secreting populations, and a third serum level with

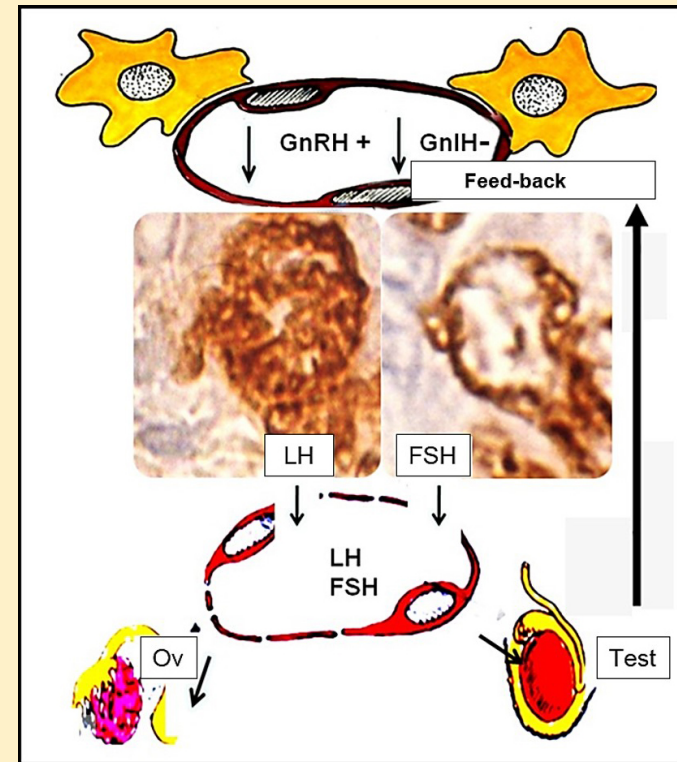


Fig. 5.4 Gonadotrope axis.

folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH). La GnRH es un neuropéptido de 10 AA que proviene de una molécula de mayor peso molecular. A través de un decapeptido, el sistema nervioso regula la secreción de las gonadotropinas. En los primates, las neuronas secretoras de GnRH se ubican en los núcleos arcuato y ventromedial.

Hay un segundo nivel hipofisario representado por las poblaciones folículo-tropa-luteinizante secretoras de FSH/LH y un tercer nivel sérico con gonadotropinas circulantes que actúan sobre las gónadas para favorecer la gametogénesis y la secreción de estrógenos, progesterona y andrógenos. Existe un mecanismo de retroalimentación negativo que regula el nivel central (**fig. 5.4**).

Hormona folículo-estimulante (FSH): es una glicoproteína (PM 31.500 Da) que posee subunidad α (92 AA) y β (117-121 AA). Los carbohidratos juegan un rol importante en las propiedades de unión y en la activación de fenómenos intracelulares. La FSH estimula la espermatogénesis y ovogénesis. En los ovarios actúa sobre las células de la granulosa, estimulando la síntesis de los estrógenos y el desarrollo folicular. A nivel testicular, la FSH cumple una secuencia de acción: **a.** Unión a la membrana plasmática; **b.** Activación de la adenilciclase; **c.** Acumulación de AMPc intracelular; **d.** Activación de la proteína-quinasa; **e.** Fosforilación de las proteínas y **f.** Transcripción: con la secuencia: ARN, síntesis proteica y actividad mitótica. La proteína transportadora de andrógenos (ABP) depende de la FSH.

Hormona luteinizante (LH): glicoproteína (PM 28.260 Da) que está constituida por dos cadenas polipeptídicas α (92 AA) y β (110-111 AA). Es denominada la hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) de Leydig secretoras de testosterona. A nivel ovárico, estimula la secreción de estrógenos en las células de la granulosa y provoca la ruptura folicular con luteinización. La LH desencadena la ovulación e induce el ciclo secretorio, estimulando la secreción de hormonas esteroideas en las células intersticiales ováricas y testiculares.

circulating gonadotropins acting on the gonads to favour gametogenesis and the secretion of estrogens, progesterone and androgens. A mechanism of negative feedback regulates the central level (**fig. 5.4**).

Folliculo-stimulating hormone (FSH): it is a glycoprotein (MW 31.500 Da) that consists of two subunits, α with (92 AA) and β (117-121 AA). Carbohydrates play an important role in the junction properties and the activation of intracellular phenomena. FSH stimulates spermatogenesis and oogenesis. In the ovaries it plays a role on the granule cells, stimulating estrogen synthesis and follicular development. At the testis level, FSH exerts a sequence of actions: **a.** Union to the plasmatic membrane; **b.** Activation of the adenylate cyclase; **c.** Intracellular accumulation of AMPc; **d.** Activation of protein-kinase; **e.** Protein phosphorylation and **f.** Transcription: RNA, protein synthesis and mitotic activity. The androgen-binding protein (ABP) depends on FSH.

Luteinizing hormone (LH): glycoprotein (MW 28.260 Da) formed by two polypeptide units α (92 AA) and β (110-111 AA). It is known as interstitial cell-stimulating hormone (ICSH) and stimulates Leydig cell production of testosterone. At ovarian level, it stimulates estrogen secretion in granulosa cells and causes luteinized follicular rupture. LH triggers ovulation and induces the secreting cycle, stimulating the secretion of steroid hormones in the ovarian and testicular interstitial cells.

GnRH induces the proliferation of partially differentiated gonadotropes and reduces the number of fully differentiated cells. The proapoptotic protein, prohibitin (PHB) is mainly expressed in partially differentiated gonadotrope cells and it would be necessary for the GnRH-induced apoptosis (Savulescu et al., 2013). Differences have been reported in LH-FSH pituitary and serum contents in normal and mutant mice. Those changes were associated to alterations in the transcriptional activity of gonadotropin subunit genes reflected in RER and gonadotrope secreting granule structures (Abel et al., 2013). GnRH cell signalling led to the activation of extracellular signal-regulated kinases, and fertility changes (Bliss et al., 2010). Straightforward effects of PRL and dopamine were

La GnRH induce la proliferación de las gonadotropas poco diferenciadas y reduce el número de las células muy diferenciadas. La proteína pro-apotótica prohibitina (PHB) se expresó sobre todo en las células gonadotropas poco diferenciadas y sería necesaria para la apoptosis inducida por GnRH (Savulescu y col., 2013). Se han documentado diferencias en el contenido pituitario y sérico de LH/FSH entre ratones normales y mutantes. Dichos cambios estuvieron asociados a alteraciones en la actividad transcripcional de los genes de las subunidades de gonadotropina que se reflejaron en la estructura del RER y de los gránulos secretorios de las gonadotropas (Abel y col., 2013). La señalización celular de la GnRH condujo a la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares que provocan cambios en la fertilidad (Bliss y col., 2010). Se hallaron efectos directos de la PRL y de la dopamina a nivel de las células gonadotropas y sus interacciones regularon la secreción de las gonadotropinas (Henderson y col., 2008).

Las células FE y gonadotropas son la fuente principal del polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) que actuaría como un regulador autocrino-paracrino de la población gonadotropa. Los cambios en los niveles de expresión del PACAP pituitario podrían contribuir al aumento selectivo de la FSH antes del estro (Winters y Moore, 2011). La GnRH hipotalámica regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas en las gonadotropas. Un control adicional es ejercido por el mecanismo de retroalimentación de los esteroides gonadales y los factores intrapituitarios como activina y folistatina. A su vez, el PACAP regula la expresión de las gonadotropinas a través de la modulación de la GnRH y estimula la secreción de la folistatina en las células FE. A la inversa, la GnRH aumenta la capacidad del PACAP para regular la función gonadotropa (Halvorson, 2014; Zheng y col., 2014).

El tratamiento neonatal con dietilestilbestrol afectó la función reproductiva de los ratones machos y hembras, pudiendo masculinizar el hipotálamo de los ratones hembras, al actuar sobre la secreción de LH en las gonadotropas (Ishikawa y col., 2014). Las activinas son proteínas

found at the level of gonadotrope cells and their interactions regulated the secretion of gonadotropins (Henderson et al., 2008).

FS cells and gonadotropes are the main source of the *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) that would act as an autocrine-paracrine regulator of the gonadotrope population. The changes in PACAP expression levels could contribute to the selective increase of FSH before oestrous (Winters and Moore, 2011). The hypothalamic GnRH regulates the synthesis and secretion of gonadotropins in gonadotropes. An additional control is exerted by the feedback mechanism of gonad steroids and intrapituitary factors such as activin and follistatin. In turn, PACAP regulate the expression of gonadotropins via GnRH modulation and stimulate the secretion of follistatin in FS cells. On the contrary, GnRH increases PACAP capacity to regulate the gonadotrope function (Halvorson, 2014; Zheng et al., 2014).

Neonatal treatment with diethylstilbestrol affected the reproductive function of male and female mice, and it was able to masculinize female mice hypothalamus when acting on LH secretion in gonadotropes (Ishikawa et al., 2014). Activins are multifunctional proteins and members of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily. They are involved in the regulation of gonadotrope functions and in the growth of tumoral cells, being modulated by local follistatin and by gonadal inhibin that follows feedback pathways (Bilezikjian et al., 2012).

The gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) has been identified as an inhibitory *hypothalamic neuropeptide* for *gonadotropin secretion*. It is found in the neuronal bodies of the dorsomedial nucleus in mammals. GnIH expression is regulated by melatonin and stress, which give environmental information to the reproductive axis. GnIH has therapeutic potential in the treatment of reproductive cycle diseases, such as precocious puberty, endometriosis, uterine fibromas, and prostatic and breast cancers. (Ubuka et al., 2012; Clarke and Parkington, 2014).

4. Thyrotrope axis: a hypothalamic level with thyrotropin (TSH) releasing (TRH) and inhibitory (TIH) factors can be observed. TRH is a tripeptide originated by hydrolysis and enzyme action of a pre-hormone

multifuncionales y miembros de la superfamilia del factor transformante β (TGF- β). Están implicadas en la regulación de las funciones de las gonadotropas y en el crecimiento de las células tumorales, siendo moduladas por la folistatina local y por la inhibina gonadal que sigue las vías de la retroalimentación (Bilezikjian y col., 2012).

La hormona gonadotrofina inhibitoria (GnIH) fue identificada como un neuropéptido hipotalámico inhibidor de la secreción de gonadotropinas. Se halla en los cuerpos neuronales del núcleo dorso-medial de los mamíferos y su expresión está regulada por la melatonina y el estrés, dando información ambiental al eje reproductivo. Tiene potencial terapéutico en enfermedades del ciclo reproductivo: pubertad precoz, endometriosis, fibromas uterinos y neoplasias de próstata y mama (Ubuka y col., 2012; Clarke y Parkington, 2014).

4. Eje tirotrópico: presenta un nivel hipotalámico con factores liberadores (TRH) e inhibidores (TIH) de tirotrófina (TSH). La TRH es un tripéptido originado por hidrólisis y acción enzimática de una pre-prohormona de alto peso molecular. Dicho péptido es filogenéticamente muy antiguo. Estimula la secreción de TSH e inhibe la liberación de ACTH. Tiene una secreción pulsátil con picos entre 90 y 180 minutos. La hipertermia ambiental inhibe el eje tiroideo y el frío lo estimula. Los cuerpos neuronales con TRH se ubican en el núcleo paraventricular y recibe conexiones desde un complejo que regula el apetito. Hay un segundo nivel hipofisario representado por la población tirotrópa secretora de TSH y un tercer nivel sérico con TSH circulante que actúa sobre los folículos tiroideos para favorecer la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T3-T4) que activan el metabolismo basal. La estimulación de los receptores en las células foliculares estimula: **a.** La síntesis de la tiroglobulina; **b.** La secreción de la tiroglobulina hacia la luz folicular; **c.** La iodinación de la tiroglobulina del coloide; **d.** La reabsorción de la tiroglobulina iodada hacia las células foliculares y su escisión por acción lisosómica y **e.** La secreción de T3 y T4 que son transportadas hacia los capilares sanguíneos. Además, existe un mecanismo de retroalimentación negativo que regula el nivel hipotálamo-hipofisario (fig. 5.5).

of high molecular weight. Such peptide is very old from a phylogenetic point of view. It stimulates secretion of TSH and inhibits release of ACTH. It evidences a pulsatile secretion with peaks between 90 and 180 minutes. Environmental hyperthermia inhibites the thyroid axis whereas cold stimulates it. Neuronal bodies with TRH are located in the paraventricular nucleus and receives connections from a complex that regulates appetite.

A second hypophyseal level presents a TSH releasing thyrotrope population and a third serum level with circulating TSH acting on the thyroid follicles to promote thyroid hormone (T3-T4) synthe-

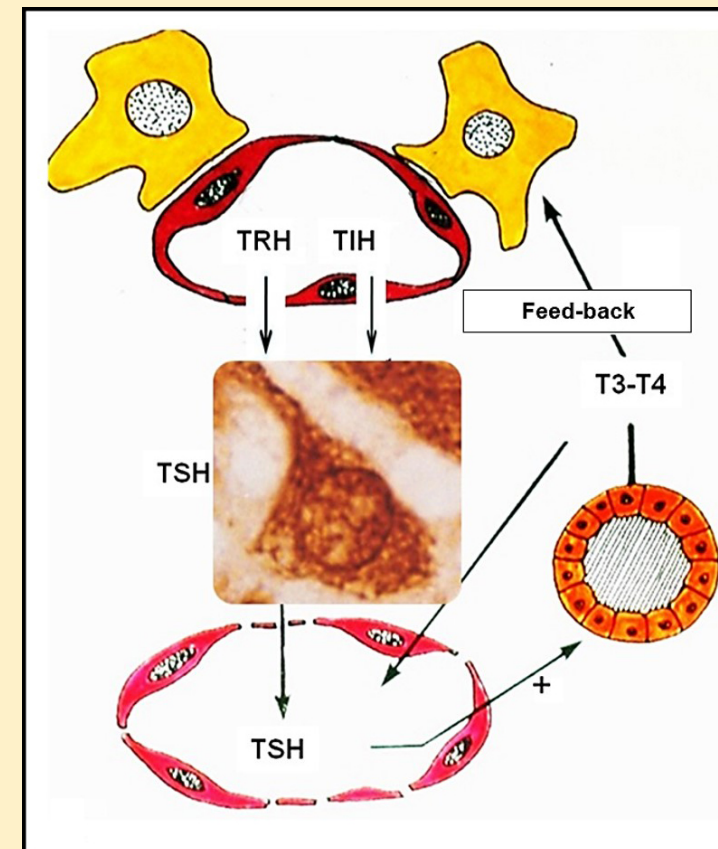


Fig. 5.5 Thyrotrope axis.

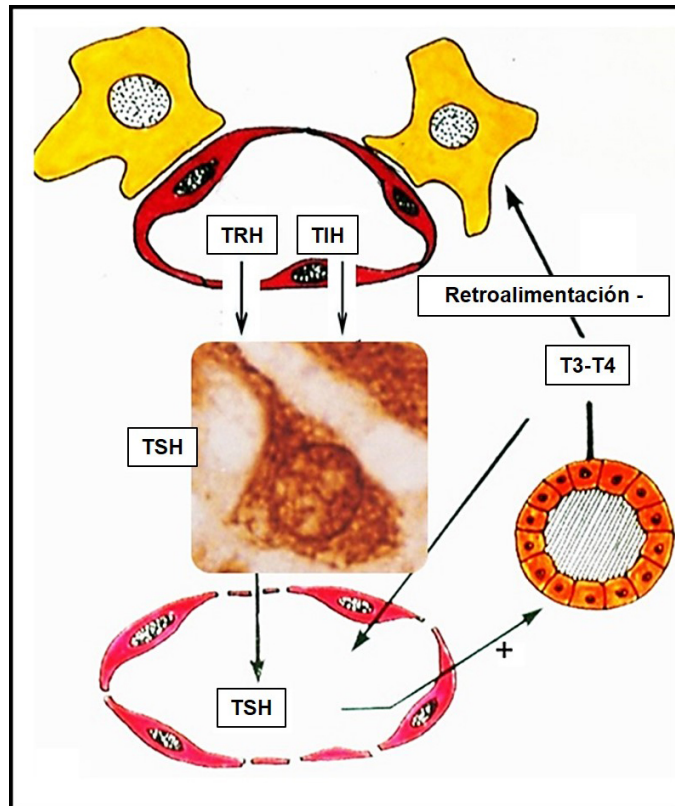


Fig. 5.5 Eje tirotrópico.

Tirotrofina (TSH): glicoproteína de PM 28.000 Da, constituida por 2 subunidades (α - β). Los grupos determinantes de la especificidad inmunológica residen en la subunidad β . Actúa sobre las células del folículo tiroideo: **a.** Induce aumento de la vascularización y del tamaño glandular que determina incremento de la altura de las células del epitelio folicular y descenso de la tiroglobulina; **b.** Libera hormonas tiroideas por proteólisis y **c.** Incrementa la presencia de vesículas de reabsorción en la periferia del coloide folicular.

Su secreción es pulsátil pero debido a la escasa magnitud de los picos, sus variaciones circulantes son poco marcadas. La somatostatina inhibe el pulso de TSH y los glucocorticoides suprimen la secreción de β TSH.

sis and release that activate the basal metabolism. Receptor stimulation in follicular cells activates: **a)** thyroglobulin synthesis; **b)** thyroglobulin secretion towards follicular lumen; **c)** iodination of colloid thyroglobulin; **d)** reabsorption of iodinated thyroglobulin into the follicular cells and excision by lysosomal action and **e)** T3 and T4 secretion transported to capillaries. Also, there is a negative feedback mechanism that regulates the hypothalamus-hypophyseal level (fig. 5.5).

Thyrotropin (TSH): glycoprotein of 28.000 Da MW, with two subunits (α - β) and those groups determining immunologic specificity are in subunit β . Thyrotropin acts on follicular thyroid cells: **a.** It induces size and thyroid vascularization increase. Follicular epithelium cells increase in height and decrease in follicular colloid quantity; **b.** It increases iodine transportation and thyroglobulin synthesis with proteolysis that releases thyroid hormones and **c.** It enlarges the presence reabsorption vesicles in the follicular colloid periphery.

Its secretion is pulsatile but due to the scarce magnitude of peaks, its circulating variations are slightly marked. Somatostatin inhibits TSH pulse and glucocorticoids suppress β TSH secretion.

Fliers et al. (2006) studied the response of the pituitary gland applied to functional anatomy and they analyzed the thyroid hormone receptor isoforms in the hypothalamus and in the human pituitary gland. Their studies have suggested an innovative model as regards the feedback mechanism of thyroid glands.

5. Corticotrope axis: a hypothalamic level with corticotropin releasing (CRH) and inhibiting (ACTH) factors (factor not identified yet) can be observed. CRH is important in response to stress. Neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei send axons to the median eminence to release CRH to the portal system, thus leading to secretion of ACTH at a secondary hypophyseal level represented by the corticotrope population.

Fliers y col. (2006) estudiaron la respuesta de la tiroides aplicada a la anatomía funcional y analizaron los receptores de las isoformas de hormona tiroidea en el hipotálamo y en la glándula pituitaria humana y sus estudios han sugerido un modelo innovador respecto al mecanismo de retroalimentación de las hormonas tiroideas.

5. Eje corticotropo: se observa un nivel hipotalámico con factores liberadores (CRH) e inhibidores de corticotrofina (ACTH) (factor aún no identificado). La CRH es muy importante en la respuesta al estrés. Las

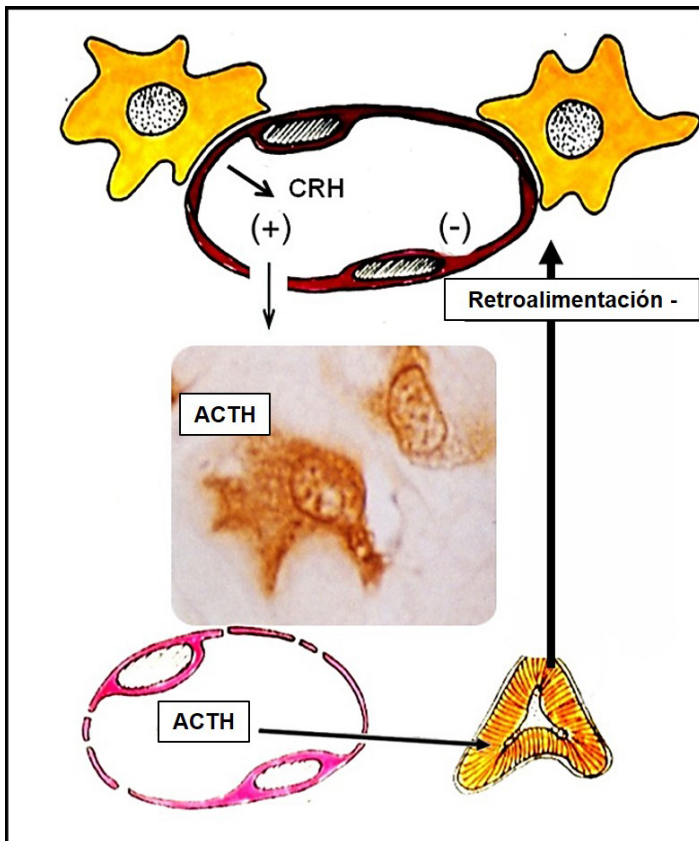


Fig. 5.6 Eje corticotropo.

There is a second hypophyseal level with ACTH-secreting corticotrope population and a third serum level with circulating ACTH that acts on the adrenal cortex to promote corticoid synthesis and release. Glucocorticoids act on the metabolism increasing protein synthesis and hepatic gluconeogenesis. There is also a negative feedback mechanism that regulates the higher level (fig. 5.6).

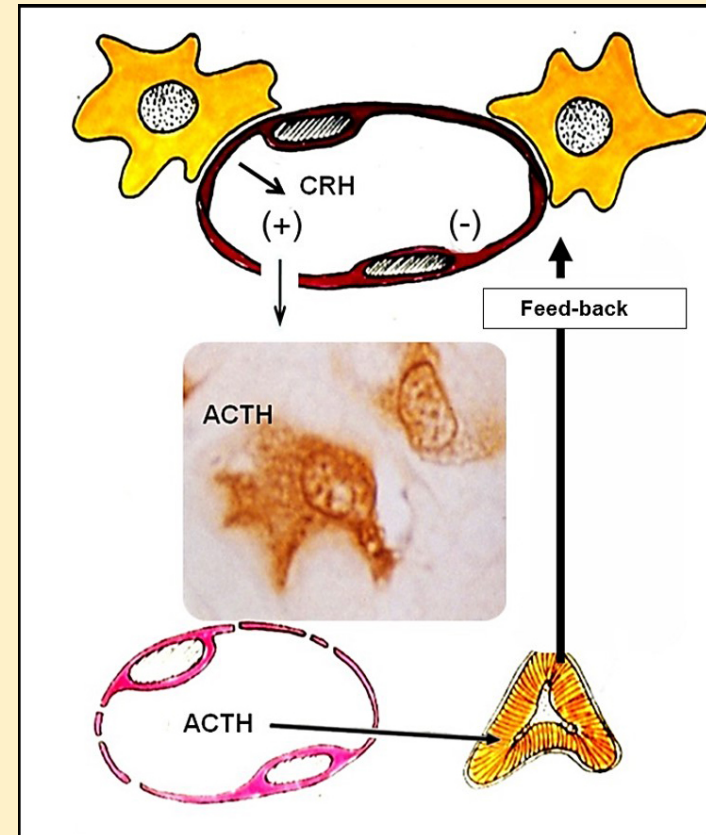


Fig. 5.6 Corticotrope axis.

Corticotropin (ACTH): it is a protein constituted by 39 amino acids (MW 4.507 Da) and is produced by cleavage of proopiomelanocortin

neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular envían axones a la eminencia media para liberar CRH al sistema porta, provocando la secreción de ACTH en un segundo nivel hipofisario representado por la población corticotropa. Existe un segundo nivel hipofisario formado por la población corticotropa secretora de ACTH y un tercer nivel sérico con ACTH circulante que actúa sobre la corteza adrenal para favorecer la síntesis y liberación de corticoides. Los glucocorticoides actúan sobre el metabolismo aumentando la síntesis proteica y la gluconeogénesis hepática. Además, existe un mecanismo de retroalimentación negativo que regula el nivel superior (fig. 5.6).

Corticotrofina (ACTH): es una proteína constituida por 39 aminoácidos (PM 4.507 Da) y se produce por clivaje de la proopiomelanocortina (POMC). La porción amino terminal de la molécula de ACTH contiene la información necesaria para ejercer su acción biológica. Tiene ritmo circadiano y comienza a elevarse después de las 4 de la mañana y sus valores mínimos se presentan al final de la tarde.

La ACTH: **a.** Estimula la conversión del colesterol en pregnenolona en la corteza suprarrenal; **b.** Incrementa la síntesis de glucocorticoides; **c.** Promueve la lipólisis en las células adiposas; **d.** Permite la captación de glucosa y aminoácidos en las células musculares y **e.** Activa la secreción de insulina/GH con blanco en la corteza adrenal, estimulando la síntesis de glucocorticoides.

Un estímulo intenso que llega a la corteza cerebral relaja la inhibición de la formación reticular o del sistema límbico sobre los centros hipotalámicos y secreta factor liberador de ACTH (CRF) que actúa sobre las corticotropas. La ACTH y las lipoproteínas se generan de un precursor común de alto PM, con características de una glicoproteína: la proopiomelanocortina (POMC). Las lipoproteínas se relacionan con las endorfinas y las encefalinas. Gracias a la ingeniería genética y a la biología molecular se han estudiado los mecanismos de síntesis y regulación del receptor de ACTH. En la enfermedad de Addison (insuficiencia córtico-suprarrenal crónica primaria) se hallan altos valores de ACTH. La pigmentación de la piel en dicha enfermedad se produce porque ACTH, α y γ lipotrofina actúan sobre receptores de melanocortina tipo 1 y se expresan en melanocitos y queratinocitos.

(POMC). The N-terminal portion of the ACTH molecule contains the necessary information for its biological action. It evidences circadian rhythm and it begins to peak after 4 in the morning, and its minimal values appear to the end of the afternoon.

ACTH: **a.** It stimulates the conversion of cholesterol to pregnenolone in the adrenal cortex; **b.** It increases glucocorticoid synthesis; **c.** It promotes lipolysis in adipose cells; **d.** It allows glucose and amino acids uptake in muscular cells and **e.** It activates insulin and GH secretion. Its target is in the adrenal cortex and stimulates glucocorticoid synthesis.

An intense stimulus that reaches the brain cortex relaxes the inhibition of the reticular or limbic system formation on the hypothalamus centres and releases ACTH releasing factor (CRF) that acts on corticotropes. ACTH and lipoproteins originate from a common precursor of high MW, with glycoprotein characteristics: proopiomelanocortin (POMC). Lipoproteins are related to endorphins and enkephalins. Thanks to genetic engineering and molecular biology, synthesis and regulation mechanisms of ACTH receptor have been studied. In the case of Addison's disease (primary chronic adrenocortical insufficiency) high ACTH values were found. Skin pigmentation in such a disease is produced because ACTH, α and γ lipotropin act on type 1 melanocortin receptors and are expressed in melanocytes and keratinocytes. Cortisol, main adrenocortical glucocorticoid, plays a key role in ACTH regulation. Se demostró el ritmo circadiano de la ACTH sérica en pacientes (Lakotua y col., 1984) y se comunicó un aumento de los glucocorticoides séricos durante la senectud (Tang y Phillips, 1978; Brett y col., 1983).

Serum ACTH circadian rhythm has been reported in patients (Lakotua et al., 1984) as well as increased serum glucocorticoids senescence (Tang et al., 1978; Brett et al., 1983). Corticotropin releasing hormone (CRH) plays an essential role in the adjustment capacity of the adrenal axis which affects the corticotrope cells. Accurate molecular mechanisms have been clarified in CRH action which will allow the pharmacologic intervention on neuroendocrine tissues (Bon-

El cortisol, principal glucocorticoide adrenal, tiene un rol clave en la regulación de la ACTH. Se demostró el ritmo circadiano de la ACTH sérica en pacientes (Lakata y col., 1984) y se comunicó un aumento de los glucocorticoides séricos durante la senectud (Tang y Phillips, 1978; Brett y col., 1983).

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) desempeña un papel esencial en el ajuste del eje adrenal y actúa sobre las células corticotropas. Se han clarificado mecanismos moleculares precisos en la acción de la CRH que permitirán la intervención farmacológica sobre los tejidos neuroendocrinos (Bonfiglio y col., 2011). Los glucocorticoides resultan fundamentales para responder al estrés físico o emocional. El hipotálamo detecta los cambios en el entorno interno o externo que alterarían la homeostasis y responde liberando CRH y vasopresina a nivel de las neuronas parvocelulares que se proyectan luego a la eminencia media. Estas neurohormonas se liberan en la hipófisis anterior y las corticotropas liberan ACTH a la circulación sistémica para actuar sobre la corteza suprarrenal iniciando la síntesis de cortisol (Papadimitriou y Priftis, 2009). La leptina, secretada en el tejido adiposo, controlaría la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en el estrés (Roubos y col., 2012).

Población foliculo-estelar: tienen acciones paracrinas sobre las células secretoras de las hormonas hipofisarias, con liberación de IL-6 y de factores de crecimiento endotelial y fibroblástico. También se las asocia con funciones de sostén, fagocitosis, respuesta inmune y control de iones y líquido intersticial. Esta población celular resulta muy interesante para el estudio de las interconexiones paracrinas intrapituitarias (ver Cap. 3).

Referencias

Abel MH, Charlton HM, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Christian HC. An investigation into pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell struc-

figlio et al., 2011). Glucocorticoids are essential in the response of physical or emotional stress. The hypothalamus detects those changes in the internal or external environment that would alter homeostasis and responds by releasing CRH and vasopressin at the level of the parvocellular neurons that later project to the median eminence. These neurohormones are released in the anterior hypophysis and corticotropes release ACTH to the systemic circulation to act on the adrenal cortex thus initiating the synthesis of cortisol (Papadimitriou and Priftis, 2009). Leptin, secreted in the adipose tissue, would control the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in stress (Roubos et al., 2012).

Folliculo-stellate population: these cells exert paracrine actions on hypophyseal hormone secreting cells, releasing IL-6 and endothelial and fibroblastic growth factors. Also, they are associated to the functions of support, phagocytosis, immune response and control of interstitial liquids and ions. This cell population is highly interesting for the study of intrapituitary paracrine interconnections (see Chapter 3).

References

Abel MH, Charlton HM, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Christian HC. An investigation into pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and mutant male mice. *J Neuroendocrinol* 2013; 25(10):863-875.

Asa SL, Kovacs K. Utilization of electron microscopic techniques in the in vitro study of adenohypophysial function and regulation. *Microsc Res Tech* 1992; 20(2):136-151.

Avtanski D, Novaira HJ, Wu S, Romero CJ, Kineman R, Luque RM, Wondisford F, Radovick S. Both estrogen receptor α and β stimulate pituitary GH gene expression. *Mol Endocrinol* 2014; 28(1):40-52.

ture in normal and mutant male mice. *J Neuroendocrinol* 2013; 25(10):863-875.

Asa SL, Kovacs K. Utilization of electron microscopic techniques in the in vitro study of adeno-hypophysial function and regulation. *Microsc Res Tech* 1992; 20(2):136-151.

Avtanski D, Novaira HJ, Wu S, Romero CJ, Kineman R, Luque RM, Wondisford F, Radovick S. Both estrogen receptor α and β stimulate pituitary GH gene expression. *Mol Endocrinol* 2014; 28(1):40-52.

Bilezikjian LM, Justice NJ, Blackler AN, Wiater E, Vale WW. Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359(1-2):43-52.

Birzniece V, Zutanto S, Ho KK. Gender difference in the neuroendocrine regulation of growth hormone axis by selective estrogen receptor modulators. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(4): E521-527.

Blanco EJ, Carretero-Hernández M, García-Barrado J, Iglesias-Osma MC, Carretero M, Herrero JJ, Rubio M, Riesco JM, Carretero J. The activity and proliferation of pituitary prolactin-positive cells and pituitary VIP-positive cells are regulated by interleukin 6. *Histol Histopathol* 2013; 28(12):1595-1604.

Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31(3):322-340.

Bonfiglio JJ, Inda C, Refojo D, Holsboer F, Arzt E, Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology* 2011; 94(1):12-20.

Brett LP, Chong G, Coyle S, Levine S. The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 1983; 4(2):133-138.

Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC. Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinology* 1987; 114(3):399-407.

Clarke IJ, Parkington HC. Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):36-44.

Bilezikjian LM, Justice NJ, Blackler AN, Wiater E, Vale WW. Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359(1-2):43-52.

Birzniece V, Zutanto S, Ho KK. Gender difference in the neuroendocrine regulation of growth hormone axis by selective estrogen receptor modulators. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(4): E521-527.

Blanco EJ, Carretero-Hernández M, García-Barrado J, Iglesias-Osma MC, Carretero M, Herrero JJ, Rubio M, Riesco JM, Carretero J. The activity and proliferation of pituitary prolactin-positive cells and pituitary VIP-positive cells are regulated by interleukin 6. *Histol Histopathol* 2013; 28(12):1595-1604.

Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signalling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31(3):322-340.

Bonfiglio JJ, Inda C, Refojo D, Holsboer F, Arzt E, Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology* 2011; 94(1):12-20.

Brett LP, Chong G, Coyle S, Levine S. The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 1983; 4(2):133-138.

Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC. Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinology* 1987; 114(3):399-407.

Clarke IJ, Parkington HC. Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):36-44.

Fliers E, Unmehopa UA, Alkemade A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 251(1-2):1-8.

García-Tornadu I, Risso T, Perez-Millan MI, Noain D, Díaz-Torga G, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. Neurotransmitter modulation of the GHRH-GH axis. *Front Horm Res* 2010; 38:59-69.

Halvorson LM. PACAP modulates GnRH signalling in gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):45-55.

Fliers E, Unmehopa UA, Alkemade A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 251(1-2):1-8.

García-Tornadu I, Risso T, Perez-Millan MI, Noain D, Díaz-Torga G, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. Neurotransmitter modulation of the GHRH-GH axis. *Front Horm Res* 2010; 38:59-69.

Halvorson LM. PACAP modulates GnRH signaling in gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 385(1-2):45-55.

Henderson HL, Townsend J, Tortonese DJ. Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response to GnRH. *J Endocrinol* 2008; 197(2):343-350.

Ishida M, Mitsui T, Izawa M, Arita J. Activation of D2 dopamine receptors inhibits estrogen response element-mediated estrogen receptor transactivation in rat pituitary lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 375(1-2):58-67.

Ishikawa M, Murai E, Hashiguchi Y, Iguchi T, Sato T. Effects of diethylstilbestrol on luteinizing hormone-producing cells in the mouse anterior pituitary. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239(3):311-319.

Jones TH, Brown BL, Dobson PR. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion. *J Endocrinol* 1990; 127(1):5-13.

Lakatua DJ, Nicolau GY, Bodgan C, Petrescu E, Sackett-Lundeen LL, Irvine PW, Haus E. Circadian endocrine time structure in humans above 80 years of age. *J Gerontol* 1984; 39(6):648-654.

Levy A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *J Endocrinol* 2002; 174(2):147-155.

Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana I, Unurjargal S, Oride A, Miyazaki K. Effects of estradiol and progesterone on prolactin transcriptional activity in somatolactotrophic cells. *Endocr J* 2012; 59(10):867-879.

Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1988; 122(1):364-366.

Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16(5):265-271.

Henderson HL, Townsend J, Tortonese DJ. Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response to GnRH. *J Endocrinol* 2008; 197(2):343-350.

Ishida M, Mitsui T, Izawa M, Arita J. Activation of D2 dopamine receptors inhibits estrogen response element-mediated estrogen receptor transactivation in rat pituitary lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 375(1-2):58-67.

Ishikawa M, Murai E, Hashiguchi Y, Iguchi T, Sato T. Effects of diethylstilbestrol on luteinizing hormone-producing cells in the mouse anterior pituitary. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239(3):311-319.

Jones TH, Brown BL, Dobson PR. Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion. *J Endocrinol* 1990; 127(1):5-13.

Lakatua DJ, Nicolau GY, Bodgan C, Petrescu E, Sackett-Lundeen LL, Irvine PW, Haus E. Circadian endocrine time structure in humans above 80 years of age. *J Gerontol* 1984; 39(6):648-654.

Levy A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *J Endocrinol* 2002; 174(2):147-155.

Mijiddorj T, Kanasaki H, Purwana I, Unurjargal S, Oride A, Miyazaki K. Effects of estradiol and progesterone on prolactin transcriptional activity in somatolactotrophic cells. *Endocr J* 2012; 59(10):867-879.

Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1988; 122(1):364-366.

Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16(5):265-271.

Peillon F, Yuan Li J, Croissandeau G, Schussler N. Physiology of the anterior pituitary gland. *Rev Prat* 1996; 46(12):1466-71.

Pérez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev* 2012; 92(1):1-38.

Prinz PN, Weitzman ED, Cunningham GR, Karacan I. Plasma growth hormone during sleep in young and aged men. *J Gerontol* 1983; 38(5):519-524.

- Peillon F, Yuan Li J, Croissandeau G, Schussler N. Physiology of the anterior pituitary gland. *Rev Prat* 1996; 46(12):1466-71.
- Pérez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev* 2012; 92(1):1-38.
- Prinz PN, Weitzman ED, Cunningham GR, Karacan I. Plasma growth hormone during sleep in young and aged men. *J Gerontol* 1983; 38(5):519-524.
- Roubos EW, Dahmen M, Kozicz T, Xu L. Leptin and hypothalamo-pituitary stress axis. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 177(1):28-36.
- Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 1981; 67(5):1361-69.
- Santomé JA, Dellacha J, Paladini AC. Chemistry of growth hormone. *Pharmacol Therap B* 1976; 2(3):571-590.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage of hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982; 218(4573):684-686.
- Savulescu D, Feng J, Ping YS, Mai O, Boehm U, He B, O'Malley BW, Melamed P. Gonadotropin-releasing hormone-regulated prohibitin mediates apoptosis of gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2013; 27(11):1856-70.
- Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7): A465-470.
- Tang G, Phillips JG. Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *J Gerontol* 1978; 33(3):377-382.
- Tulipano T, Faggi L, Sibilía V, Giustina A. Points of integration between the intracellular energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and somatotroph axis function. *Endocrine* 2012; 42(2):292-298.
- Ubuka T, Son YL, Tobarí Y, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:148.
- Welsch CW, Jenkins T, Amenomori Y, Meites J. Tumorous development of in situ and grafted anterior pituitaries in female rats treated with diethylstilbestrol. *Experientia* 1971; 27(11):1350-52.
- Roubos EW, Dahmen M, Kozicz T, Xu L. Leptin and hypothalamo-pituitary stress axis. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 177(1):28-36.
- Rudman D, Kutner MH, Rogers CM, Lubin MF, Fleming GA, Bain RP. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J Clin Invest* 1981; 67(5):1361-69.
- Santomé JA, Dellacha J, Paladini AC. Chemistry of growth hormone. *Pharmacol Therap B* 1976; 2(3):571-590.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage of hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumours. *Science* 1982; 218(4573):684-686.
- Savulescu D, Feng J, Ping YS, Mai O, Boehm U, He B, O'Malley BW, Melamed P. Gonadotropin-releasing hormone-regulated prohibitin mediates apoptosis of gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2013; 27(11):1856-70.
- Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7): A465-470.
- Tang G, Phillips JG. Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *J Gerontol* 1978; 33(3):377-382.
- Tulipano T, Faggi L, Sibilía V, Giustina A. Points of integration between the intracellular energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and somatotroph axis function. *Endocrine* 2012; 42(2):292-298.
- Ubuka T, Son YL, Tobarí Y, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3:148.
- Welsch CW, Jenkins T, Amenomori Y, Meites J. Tumorous development of in situ and grafted anterior pituitaries in female rats treated with diethylstilbestrol. *Experientia* 1971; 27(11):1350-52.
- Winters SJ, Moore JP. PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biol Reprod* 2011; 84(5):844-850.
- Yang X, Meyer K, Friedl A. STAT-5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promote angiogenesis. *J Biol Chem* 2013; 288(29):21284-96.

Winters SJ, Moore JP. PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biol Reprod* 2011; 84(5):844-850.

Yang X, Meyer K, Field A. STAT-5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promote angiogenesis. *J Biol Chem* 2013; 288(29):21284-96.

Zheng W, Grafer CM, Halvorson LM. Interaction of gonadal steroids and gonadotropin-releasing hormone on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor expression in cultured rat anterior pituitary cells. *Reprod Sci* 2014; 21(1):41-51.

Zheng W, Grafer CM, Halvorson LM. Interaction of gonadal steroids and gonadotropin-releasing hormone on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor expression in cultured rat anterior pituitary cells. *Reprod Sci* 2014; 21(1):41-51.

CAPÍTULO 6

Proceso de envejecimiento en el eje hipotálamo-hipofisario. Envejecimiento de la población lactotropa

El envejecimiento induce cambios morfológicos y funcionales a nivel del eje hipotálamo-pituitario-órgano blanco, determinando una declinación en la integridad de la capacidad morfológica y funcional de los sistemas nervioso, inmune y endocrino, junto con un descenso en su habilidad para mantener la homeostasis (Meites y col., 1987).

Los procesos de envejecimiento celular están regulados por el programa genético y el medio ambiente. Uno de los factores externos de importancia es el estrés (Sapolsky, 1992a-b). El descenso de las señales hipotálamo-hipofisarias, la alteración de las glándulas endocrinas periféricas y el daño en los tejidos blanco hormono-dependientes, inducen una declinación de la capacidad homeostática y aumentan la vulnerabilidad frente a los cambios ambientales (Strelher, 1977; Meites, 1991). Se crea una compleja red homeostática que emite y recibe señales bidireccionales, con un reloj biológico que se ubicaría a nivel hipotalámico (Samorajski, 1977). La homeostasis es dinámica y se ajusta en cada etapa

CHAPTER 6

Process of ageing in the hypothalamo-pituitary axis. Ageing of lactotrope population

Ageing induces morphological and functional changes at the level of the hypothalamo-pituitary-target organ axis and determines a decline in the integrity of morphological and functional capacity of the endocrine, immune and nervous systems, together with a decrease in its ability to maintain homeostasis (Meites et al., 1987).

The processes of cellular aging are regulated by the genetic program and the environment. One of the important external factors is stress (Sapolsky, 1992a-b). The decrease of the hypothalamo-hypophyseal signals, the alteration of the peripheral endocrine glands and the damage to the hormone-dependent target tissues, induce a decline of the homeostatic capacity and increase the vulnerability against the environmental changes (Strelher, 1977; Meites, 1991). A complex homeostatic network that emits and receives bidirectional signals is created, and it has a biological clock that would be found at the level of the hypothalamus (Samorajski, 1977). Homeostasis is dynamic and

de la vida. El objetivo de la **Gerontología** moderna es **agregar calidad de vida a los años y no simplemente años a la vida.**

La senescencia celular implica la activación de una serie de programas efectores desencadenantes (Salama y col., 2014). **La senescencia es definida como la pérdida de las funciones fisiológicas que se producen con el envejecimiento, mientras que la longevidad sería la fuerza que actúa para impedir o retrasar el inicio de la senescencia.** El balance entre los mecanismos de longevidad y senescencia fundamenta la variabilidad del envejecimiento. **La longevidad es la resistencia al deterioro relacionado con la edad** que se mide mediante parámetros fisiológicos como la fuerza muscular y la actividad física o la incidencia de marcadores patológicos como las neoplasias y la degeneración del sistema neuroendocrino.

El envejecimiento presenta un determinismo ya que el individuo está programado para envejecer de acuerdo a etapas bien definidas para su propia especie y es un proceso multifactorial, ya que la programación inicial (factores genéticos) puede ser influenciada por el medio ambiente (factores epigenéticos). A nivel evolutivo, no se acepta que el envejecimiento pueda ser seleccionado a favor o en contra de una población, ya que la muerte por enfermedad, accidentes y depredación, se produce antes de que los organismos comiencen a envejecer. Mientras la senescencia podría producirse por acumulación de genes deletéreos, la longevidad se debería a la alteración de los sistemas genéticos que controlan los mecanismos enzimáticos reparadores (Sacher, 1978).

El envejecimiento no es simplemente una acumulación de daño o de señalización, aunque implique ambos mecanismos y se produce como una respuesta a la falta de información genómica adaptativa, por disminución de las fuerzas de la selección natural durante la vida adulta. El envejecimiento sería producido por fuerzas evolutivas que actuarían sobre la variabilidad genética propia de cada especie. La propuesta evolutiva sugiere que no hay causas fisiológicas capaces de evitar el envejecimiento, sino una falla en la selección natural (Rose, 2009).

La edad provoca alteraciones en el eje hipotálamo-pituitario-órgano blanco. A nivel hipotalámico, la pérdida de neuronas determina

adjusts to each period of life. The objective of modern **Gerontology** is **to add quality of life to years and not just years to life.**

Cellular senescence implies the activation of a series of triggering effector programs (Salama et al., 2014). **Senescence is defined as the loss of the physiologic functions produced with ageing and longevity would be the force acting to prevent or delay the onset of senescence.** The balance between longevity and senescence mechanisms supports ageing variability. **Longevity is the resistance to age-related deterioration measured with physiologic parameters** such as muscle strength and physical activity or the incidence of pathologic markers such as neoplasias and degeneration of the neuroendocrine system.

Determinism is present in ageing since individuals are programmed to age according to well-defined stages for their own species and ageing is a multifactorial process since initial programming (genetic factors) can be influenced by the environment (epigenetic factors). At the evolution level it is not accepted that ageing could be selected in favour or against a population, since death due to disease, accidents and depredation take place before organisms begin to age. While senescence might occur as the result of deleterious gene accumulation, longevity would be the result of the alteration of the genetic systems that control the repairing enzymatic (Sacher, 1978).

Ageing is not only a damaging or signalling accumulation, although both mechanisms are implied, and is produced as a response to the lack of adaptive genomic information, due to the declining forces of natural selection during adult life. Ageing would be produced by evolutionary forces acting on the genetic variability proper of each species. The evolutionary theory proposed suggests there are no physiologic causes capable of avoiding ageing, but some failure in natural selection (Rose, 2009).

Age causes alterations in the hypothalamo-pituitary-target organ axis. At hypothalamic level, the loss of neurons determines a decreased level of neurotransmitters and hypophysiotropic hormones (Meites, 1992). At hypophyseal level, the diminished number of receptors

un descenso en los niveles de los neurotransmisores y de las hormonas hipofisotróficas (Meites, 1992). A nivel hipofisario, la disminución del número de receptores crea una hiposensibilidad ante los estímulos hipotalámicos. A nivel sérico, la menor síntesis-liberación de las hormonas hipofisarias determina variaciones en los niveles hormonales, con alteración de los ritmos circadianos y presencia de isoformas que pierden su potencial bioactivo. A nivel de los órganos blanco, el descenso de los receptores periféricos causa hiposensibilidad, menor síntesis de hormonas y alteración de los mecanismos de retroalimentación.

Strehler (1977) distinguió tres categorías de individuos: **a.** Los que nunca tienen oportunidad de envejecer porque se dividen y producen dos individuos nuevos; **b.** Los que envejecen porque no reemplazan las partes dañadas y **c.** Los que se protegen del envejecimiento porque tienen un régimen de sustitución continuo, como los organismos unicelulares o los grupos de células de organismos pluricelulares.

Las **teorías sobre el envejecimiento** se agrupan en **moleculares, celulares y sistémicas** (Timiras y col., 1995). Las teorías son interdependientes y exponen distintos puntos de impacto sobre el proceso de envejecimiento, considerando la interacción de factores predeterminados y estocásticos. Una sola teoría aislada no satisface todos los cuestionamientos. Las teorías buscan una sincronización de los **factores genéticos y epigenéticos** que impactan sobre el complejo proceso de envejecimiento.

1. Teoría de la mutación genética y reparación del ADN (agentes mutantes: radiaciones, químicos, drogas, radicales libres, virus) (Szilard, 1959).

2. Teoría de la capacidad celular proliferativa ilimitada: se basa en la pérdida del potencial proliferativo de los fibroblastos humanos normales en cultivo. Sólo dos líneas celulares podrían escapar al envejecimiento: las células neoplásicas y las células germinales (Hayflick y col., 1961).

creates hyposensitivity in the presence of hypothalamic stimuli. At serum level, the lesser synthesis-release of hypophyseal hormones determines variations in the hormonal levels, with alterations in the circadian rhythms and presence of isoforms that lose their bioactive potential. At the level of the target organs, the decrease of peripheral receptors causes hyposensitivity, less hormone synthesis and alteration of feedback mechanisms.

Strehler (1977) distinguished three categories of individuals: a. Those who never have the opportunity of getting old because they divide and produce two new individuals; b. Those who get old because they do not replace their damaged parts and c. Those who protect themselves from ageing because they have a regime of continuous substitution, such as unicellular organisms or groups of multicellular organism cells.

Theories on ageing are grouped into **molecular, cellular and systemic** (Timiras et al., 1995). The theories are interdependent and expose different impact points on the ageing process considering the interaction of predetermined and stochastic factors.

1. Theory of genetic mutation and DNA repair (mutant agents: radiations, chemicals, drugs, free radicals, viruses) (Szilard, 1959).

2. Theory of the unlimited proliferative capacity of cells: it is based on the loss of the proliferative potential of normal human fibroblasts in culture. Only two cell lineages could escape ageing: neoplastic cells and germinal cells (Hayflick et al., 1961).

3. Error catastrophe theory: damages in the synthesis of proteins due to errors messenger RNA (Orgel, 1963).

4. Theory of molecular crosslinkage: numerous biologic molecules intercross with other molecules, altering their physicochemical properties and cause cell damage (Bjorksten, 1968 y 1990).

5. Immunologic theory: it is based on the declination of the immune system that becomes more vulnerable in the presence of infectious agents and allows the development of autoimmune and neoplastic diseases (Walford, 1974).

3. Teoría del error-catástrofe: daños en la síntesis de proteínas por fallas en el ARN mensajero (Orgel, 1963).

4. Teoría del entrecruzamiento molecular: numerosas moléculas biológicas se entrecruzan con otras, alteran sus propiedades físico-químicas y provocan daño celular (Bjorksten, 1968 y 1990).

5. Teoría inmunológica: se sustenta en la declinación del sistema inmune que se vuelve más vulnerable frente a diversos agentes y permite el desarrollo de enfermedades autoinmunes y neoplásicas (Walford, 1974).

6. Teoría de “usar y descartar”: los seres vivos serían como maquinarias que fallan en sus funciones (Sacher, 1977).

7. Teoría neuroendocrina: la expresión génica de las células comando de los sistemas nervioso, endocrino e inmune resultan críticas en la senectud (Meites y col., 1987).

8. Teoría de los radicales libres: varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-peroxidasa) y vitaminas (E, C, carotenos) protegen contra el daño oxidativo (Harman, 1956 y 1992). La melatonina, hormona secretada por la glándula pineal, disminuye con el envejecimiento y es un captador de radicales libres (Reiter, 1995 y 1997).

9. Teoría de la regulación genética: los gerontogenes podrían promover o inhibir la proliferación celular (Danner, 1992).

Los **biomarcadores del envejecimiento** son: **a.** Disminución de la capacidad reproductiva; **b.** Declinación de GH y somatomedinas que determina una menor síntesis proteica; **c.** Descenso de la respuesta inmune y **d.** Desarrollo de prolactinomas y neoplasias mamarias con hiperprolactinemia (Meites, 1988).

A nivel fisiológico, la nutrición modifica el desarrollo orgánico, el envejecimiento y el inicio de las enfermedades. La depleción de nutrientes altera el índice de envejecimiento y los animales de laboratorio sometidos a restricción nutricional retardan su senescencia (Masoro, 1988).

A nivel celular, Pearl (1922) propuso que todos los tejidos esenciales de los metazoos son inmortales y sostuvo que la causa de muerte se debería a la diferenciación celular que lleva a la especialización fisiológica. Además, hay evidencias de que el patrón de expresión génica cambia

6. Theory of “usage and discard”: living beings would be like machines that fail in their functions (Sacher, 1977).

7. Neuroendocrine theory: the gene expression of command cells of the nervous, endocrine and immune systems is found critical in senescence (Meites et al., 1987).

8. Theory of free radicals: several enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathion-peroxidase) and vitamins (E, C, carotenes) protect against oxidative damage (Hartman, 1956 and 1992). Melatonin, a hormone secreted by the pineal gland, decreases with ageing and is a captor of free radicals (Reiter, 1995 and 1997).

9. Theory of genetic regulation: gerontogenes could foster or inhibit cell proliferation (Danner, 1992).

The **biomarkers of ageing** are: **a)** Decrease in the reproductive capacity; **b)** Decline of GH and somatomedins that determines a minor protein synthesis; **c)** Decrease of the immune response and **d)** Development of prolactinomas and breast neoplasias with hyperprolactinemia (Meites, 1988).

At physiologic level, nutrition modifies organic development, aging and the onset of diseases. The depletion of nutrients alters the ageing index. Laboratory animals subjected to nutritional restriction present ageing retard (Masoro, 1988).

At cellular level, Pearl (1922) proposed that all the essential tissues from metazoa are immortal and stated that the cause of death would be due to cell differentiation that leads to physiologic specialization. Also, there is evidence that the genetic expression pattern changes with cell differentiation. Cell senescence and apoptosis refer to the response of the mitotically competent cells in the presence of a stimulus with neoplastic potential, influencing ageing phenotypes (Campisi, 2003). Senescence-inducing stimuli have been identified, including dysfunctional telomeres, DNA damage and the expression of some oncogenes. Cell senescence is controlled by several tumour-suppressing genes such as p53 (Ithana et al., 2001). In contrast with apoptosis, cell senescence does not eliminate dysfunctional, dama-

con la diferenciación celular. La senescencia celular y la apoptosis hacen referencia a la respuesta de las células mitóticamente competentes frente a un estímulo con potencial neoplásico, ejerciendo influencia sobre los fenotipos del envejecimiento (Campisi, 2003). Se han identificado estímulos que inducen senescencia, incluyendo los telómeros disfuncionales, el daño del ADN y la expresión de ciertos oncogenes. La senescencia celular está controlada por varios genes supresores de tumores como el p53 (Ithana y col., 2001). En contraste con la apoptosis, la senescencia celular no elimina células disfuncionales, dañadas o neoplásicas, sino que impide su proliferación. Las células se someten a un número finito de divisiones mitóticas y al final entran en senescencia replicativa. El acortamiento de los telómeros es el reloj molecular que desencadena la senescencia. La extensión de la vida se podría lograr con el uso de la telomerasa en las células humanas normales (Bodnar y col., 1998; Fossel, 1998). La replicación se produce por acortamiento de los telómeros debido a que no se expresa la telomerasa mediante la ribonucleoproteína de la transcriptasa inversa que sintetiza los extremos 3' de los cromosomas lineales. Dicha enzima es responsable del envejecimiento celular, la tumorigénesis y la renovación celular. Se ha documentado su ultraestructura, la organización del dímero y sus dominios (Miracco y col., 2014). La telomerasa contiene proteínas con una señal de localización nuclear bipartita y una secuencia de direccionamiento mitocondrial que previene la erosión de los telómeros e impide la senescencia replicativa. Además, la telomerasa regularía el ciclo celular, la expresión génica y la respuesta al daño en el ADN (Ale-Agha y col., 2014).

A nivel molecular, los organismos declinan la síntesis proteica con la edad (Maynard Smith y col., 1970) y presentan deterioro por acumulación de proteínas alteradas en su estructura (Nagy y Nagy, 1980; Tollfsboll y Gracy, 1983). También hay descenso o desregulación de la fosforilación oxidativa que involucra a los genes nucleares y al ADN mitocondrial (Wallace, 1992). El daño en la fosforilación oxidativa explica las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer.

ged or neoplastic cells, but it avoids their proliferation. Cells divide into a finite number of mitotic divisions and finally undergo replicative senescence. The shortening of telomeres is the molecular clock that triggers senescence. Life span might be extended with the use of telomerase in normal human cells (Bodnar et al., 1998; Fossel, 1998). Replication is produced by the shortening of telomeres since telomerase is not expressed by the ribonucleoprotein of the reverse transcriptase that synthesizes the 3' ends of the linear chromosomes.

Telomerase, the ribonucleoprotein reverse transcriptase responsible for synthesizing the 3' ends of linear chromosomes, play a critical role in cellular aging, tumorigenesis and cell renewal. Ultrastructure, dimer organization and domains of telomerase have been reported (Miracco et al., 2014). Telomerase contains proteins with a bipartite nuclear localization signal and a mitochondrial addressing sequence that prevents telomere erosion and the development of replicative senescence. Also, telomerase would regulate the cell cycle, gene expression and DNA damage response (Ale-Agha et al., 2014).

At molecular level, an age-related decline of protein synthesis has been observed in many organisms (Maynard Smith et al., 1970) which deteriorate due to accumulation of altered proteins in their structure (Nagy and Nagy, 1980; Tollfsboll and Gracy, 1983). There is also a decrease or deregulation of oxidative phosphorylation that involves nuclear genes and mitochondrial DNA (Wallace, 1992). Oxidative phosphorylation damage explains the neuro-degenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer.

At hypothalamic level, the decline in catecholamines led to a lesser secretion of GHRH, GnRH and TRH that at pituitary level was reflected in a decrease of GH, TSH, LH and FSH secretion (Sonntag et al., 1988). The decline in hypothalamic catecholamines is produced due to: **A.** Damage and neuronal loss that result from toxins and estrogen and glucocorticoid chronic action; **B.** Enzyme changes in noradrenaline and dopamine synthesis due to the action of free radicals and toxins, with lipofuscin accumulation (Meites, 1988). Parkinson's disease is associated to a decreased

A nivel hipotalámico, la declinación de las catecolaminas provoca una menor secreción de hormonas hipotalámicas estimuladoras (GHRH, GnRH y TRH) que a nivel pituitario se refleja en un descenso de la secreción de GH, TSH, LH y FSH (Sonntag y col., 1988). La reducción de las catecolaminas hipotalámicas se produce por: **a.** Daño y pérdida neuronal por tóxicos y por acción crónica de estrógenos y glucocorticoides y **b.** Cambios enzimáticos en la síntesis de noradrenalina y dopamina, por acción de radicales libres y toxinas, con acúmulo de lipofuscina (Meites, 1988). La enfermedad de Parkinson se asocia con un descenso de la dopamina hipotalámica y la enfermedad de Alzheimer con alteraciones colinérgicas (Jodko y Litwinienko, 2010; Szot, 2012; Hong y col., 2014). Se hallaron neuronas dopaminérgicas agrupadas en las áreas A12 y A14 (Tillet y Kitahama, 1998). El área A12 está ubicada en el núcleo arcuato-zona periventricular y sus axones, liberadores de dopamina, se proyectan hacia la eminencia media, ejerciendo su acción sobre el lóbulo pituitario anterior (Kawano y Daikoku, 1997). Este sistema túbero-infundibular dopaminérgico (TIDA) regula la secreción de PRL ejerciendo un control inhibitorio sobre la población lactotropa (Ben-Jonathan y col., 1989), con mayor liberación de PRL (Chuknyiska y col., 1986; Reymond y col., 1989 y 1990). El sistema TIDA está alterado en las ratas envejecidas (Cocchi y col., 1984; Fernández Ruiz y col., 1992; Rossi y col., 1992). Además, se ha comunicado que la concentración de dopamina sanguínea en el sistema portal pituitario estuvo descendida con la edad en ratas de ambos sexos (Gudelsky, 1981; Reymond y col., 1981). Se analizó la ritmicidad de la PRL sérica y del contenido de dopamina en la eminencia media durante 24 hs, hallándose un aumento de la PRL y un descenso de la dopamina en ratas envejecidas que provocó la interrupción de los mecanismos de regulación de la PRL (Esquifino y col., 2004).

La mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas llevaría a un envejecimiento del eje lactotrofo con aumento en la incidencia de la enfermedad de Parkinson. La dopamina modularía el estrés oxidativo a través del sistema renina-angiotensina a nivel de la sustan-

hypothalamic dopamine, and Alzheimer's disease to cholinergic alterations (Jodko and Litwinienko, 2010; Szot, 2012; Hong et al., 2014).

The level of dopaminergic neurons was found grouped in areas A12 and A14 (Tillet and Kitahama, 1998). Area A12 is located in the arcuate nucleus-paraventricular zone and its axons, which release dopamine, are projected into the median eminence, acting on the anterior pituitary lobe (Kawano and Daikoku, 1997).

This tuberoinfundibular dopaminergic system (TIDA) regulates PRL secretion exerting an inhibiting control on the lactotrope population (Ben-Jonathan et al., 1989) with higher release of PRL (Chuknyiska et al., 1986; Reymond et al., 1989 and 1990). The TIDA system is altered in aged rats (Cocchi et al., 1984; Fernández Ruiz et al., 1992; Rossi et al., 1992). Also, it has been reported that the dopamine concentration in the hypophyseal portal blood system decreased with age in rats of both sexes (Gudelsky, 1981; Reymond et al., 1981; 1990). The rhythm of serum PRL and dopamine contents (median eminence) was analyzed for 24 h, and the PRL increase and dopamine decrease found in aged rats caused the interruption of mechanisms regulating PRL (Esquifino et al., 2004).

A higher vulnerability of the dopamine neurons would lead to ageing of the lactotroph axis and an increase of Parkinson's disease. Dopamine would modulate oxidative stress via the rennin-angiotensin system at the level of the substantia nigra and corpus striatum, evidencing dysregulation during ageing (Villar-Cheda et al., 2014). Ageing is associated to deficiencies in hypothalamic hypophysiotropic hormones (HHH), neurotransmitters, neuronal loss, receptor function decrease and catabolic process (Meites, 1992). Noradrenalin stimulated the release of the luteinizing hormone (LH), folliculo-stimulating hormone (FSH), growth hormone (GH) and thyrotropin hormone (TSH), while dopamine inhibited prolactin (PRL) and TSH release, but promoted GH release (Weiner et al., 1978). Dopamine would act directly on the pituitary to regulate PRL release, while its effects on GH, TSH, LH and FSH release would be via HHH. The excessive loss of TIDA neurons during ageing was associated to progressive hyperprolactinemia and higher incidence of microprolactinomas in aged female

cia nigra y del cuerpo estriado, mostrando una desregulación con la edad (Villar-Cheda y col., 2014). El envejecimiento se asocia a deficiencias en las hormonas hipofisotróficas hipotalámicas (HHH), los neurotransmisores, la pérdida neuronal, el descenso de los receptores y los procesos catabólicos (Meites, 1992). La noradrenalina estimuló la liberación de la hormona luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH), hormona de crecimiento (GH) y tirotrófina (TSH), mientras que la dopamina inhibió la liberación de prolactina (PRL) y TSH, pero promovió la liberación de GH (Weiner y Ganong, 1978). La dopamina actuaría directamente sobre la pituitaria para regular la liberación de PRL, mientras sus efectos sobre la liberación de GH, TSH, LH y FSH serían ejercidos por vía de las HHH.

La pérdida excesiva de neuronas TIDA durante el envejecimiento estuvo asociada a una progresiva hiperprolactinemia y a una mayor incidencia de prolactinomas en ratas hembras envejecidas (Ito y col., 1972; Kovacs, 1977; Berkvens y col., 1980; Sarkar y col., 1982; Chuknjiska, 1986) que se asociaron a hiperprolactinemia (van Putten y col., 1988). Se consideró la posibilidad de una alteración de la función TIDA en ratas machos y una supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos de las lactotropas, sustentada en un incremento del número de receptores sobre los sitios de unión (Govoni y col., 1980) que podría tener un rol en el descenso de la población lactotropa detectado en ratas viejas y seniles machos.

A nivel hipofisario el envejecimiento fue documentado desde el comienzo del siglo pasado por numerosos autores (Simmonds, 1914; Ascheleim y Zondek, 1927; Pribram, 1927; Lucien, 1929; Aschoff, 1937).

En nuestros estudios de envejecimiento hemos dado especial atención al segmento terminal de vida denominado **senescencia** y para ello, hemos diseñado un modelo experimental equivalente al envejecimiento de un ser humano de 80-100 años.

En la **fig. 6.1** se ven áreas de lactotropas inmunomarcadas en ratas hembras jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y seniles (29 meses). En la rata senil puede observarse un microprolactinoma cromóforo con

rats (Ito et al., 1972; Kovacs, 1977; Berkvens et al., 1980; Sarkar et al., 1982; Chuknjiska, 1986) which were related to hyperprolactinemia (van Putten et al., 1988). Both the possibility of an alteration of TIDA function in male rats and supersensitivity of lactotrope dopamine receptors were considered, on the basis of an increased number of receptors on the junction sites (Govoni et al., 1980) that might play a role in the decrease of the lactotrope population detected in old and senescent male rats.

At hypophyseal level, aging has been reported since the beginning of last century by many authors (Simmonds, 1914; Ascheleim and Zondek, 1927; Pribram, 1927; Lucien (1929); Aschoff, 1937). In our studies on ageing we have especially considered the last life period of mammals referred to as *senescence* for which we have designed an experimental model equivalent to ageing of an 80-to-100-year-old human being.

In **fig. 6.1** areas of immunolabelled lactotropes are seen in female young (3 months), old (20 months) and senescent (29 months) rats. In

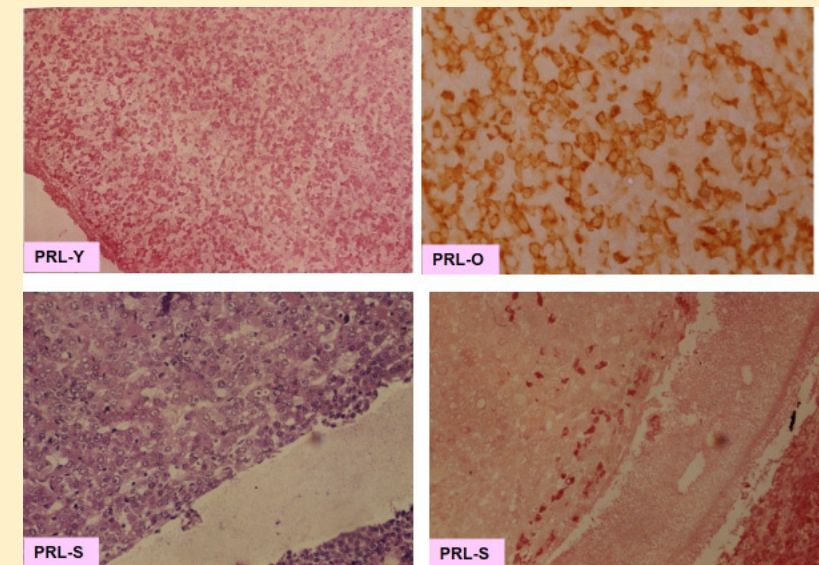


Fig. 6.1. Lactotropes from young (Y), old (O) and senescent (S) rats with microprolactinoma (HE and EnVision peroxidase anti-PRL, chromogen red, x 400).

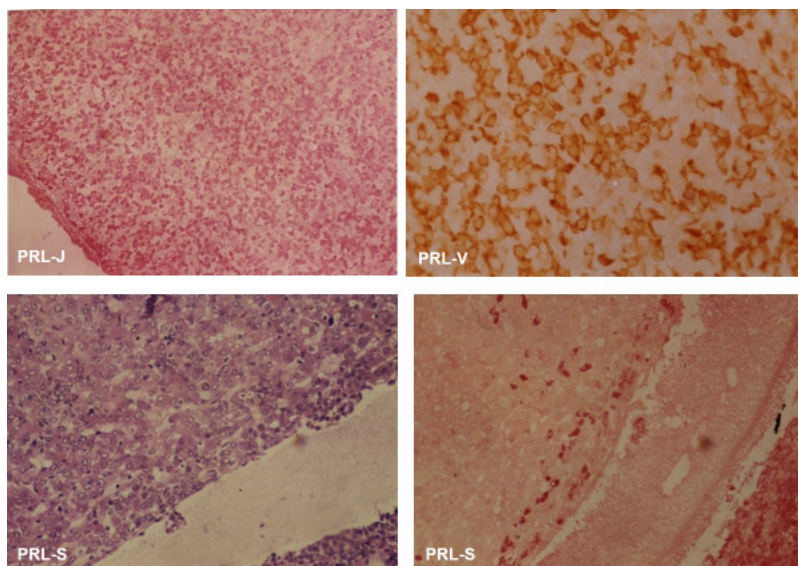


Fig. 6.1. Lactotropas. Ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) hembras con microprolactinoma (H-E, EnVision peroxidasa anti-PRL con red, x 400).

algunas lactotropas teñidas de rojo (red) (Cónsole y col., 1997). Este hallazgo se halla en concordancia con lo comunicado por la mayoría de los autores acerca de la presencia de adenomas pituitarios coexistentes con altos niveles de PRL sérica (Rossi y col., 1992; Mc Comb y col., 1984; Voogt y col., 1990).

La ausencia de inmunorreactividad en los prolactinomas cromóforos estaría asociada ya sea a una rápida liberación de la PRL sin un depósito detectable de hormona (Kovacks y col., 1977; Mc Comb y col., 1984) o a la presencia de isoformas de PRL no reconocibles por el antisuero anti-PRL (Rogol y Rosen, 1974; Lawson y col., 1980). Las áreas de hiperplasia lactotropa en ratas seniles permiten explicar los elevados niveles plasmáticos de PRL.

Nuestro análisis de los parámetros morfométricos reveló cambios en relación con la edad en ratas de ambos sexos, con un claro dimorfismo sexual. Los parámetros morfométricos fueron evaluados sólo en las

senescent rats a chromophobe microprolactinoma with some lactotropes stained with red chromogen can be observed (Cónsole et al., 1997). This finding is in accordance with what has been reported by most authors about the presence of coexisting pituitary adenomas with high levels of serum PRL (Rossi et al., 1992; Mc Comb et al., 1984; Voogt et al., 1990).

The absence of immunoreactivity in chromophobe prolactinomas would be related to a fast releasing of PRL with no noticeable deposit of hormone (Kovacks et al., 1977; Mc Comb et al., 1984) or to the presence of PRL isoforms unrecognizable by anti-PRL antiserum (Rogol and Rosen, 1974; Lawson et al., 1980). The areas of lactotrope hyperplasia in senescent rats would contribute to raise PRL plasmatic levels.

Our analysis of morphometric parameters revealed changes related to the age of rats of both sexes, with a clear sexual dimorphism. The morphometric parameters were evaluated only in the hyperplastic areas, as the chromophobe reaction of adenomas did not allow detecting immunostaining. Cell density (CD) and volume density (VD) decreased significantly ($p < 0.01$) with age in male rats. Also, CD evidenced a significant ($p < 0.01$) reduction in old female rats, but this parameter increased in senescent female animals. A significant increased VD was present in senescent animals. Neither cell area (A), nor cell perimeter (P) showed a significant variation (Cónsole et al., 1998) (**table 1**).

Table 1. Morphometry of lactotrope population

	Young (n = 10)	Old (n = 9)	Senescent (n = 8)
VD (x 10⁻³)			
Males	122 (± 7) (a)	94 (± 5) (b)	46 (± 3) (c)
Females	141 (± 6) (d)	131 (± 5) (e)	196 (± 6) (f)
CD (x 10⁻⁴)			
Males	86 (± 2) (a)	46 (± 2) (b)	14 (± 1) (c)
Females	110 (± 5) (d)	88 (± 3) (e)	189 (± 4) (f)

VD: Intragroup *p* values: a vs. b and b vs. c: < 0.01; d vs. e: NS; e vs. f: < 0.01. Intergroup *p* values: a vs. d: NS; b vs. e and c vs. f: < 0.01. **CD:** Intragroup *p* values: a vs. b, b vs. c, d vs. e and e vs. f: < 0.01. Intergroup *p* values: a vs. d: < 0.05; b vs. e: < 0.01; c vs. f: < 0.01. Values represent S.E.M. ± S.E.

áreas hiperplásicas, ya que la reacción cromofóbica de los adenomas no permitió detectar inmunomarcación. La densidad de células (DC) y la densidad de volumen (DV) mostraron una significativa ($p < 0.01$) reducción en ratas hembras viejas, pero este parámetro aumentó ($p < 0.01$) en animales hembras seniles. Ni el área (A), ni el perímetro (P) celulares mostraron una variación significativa en los grupos experimentales estudiados (Cónsole y col., 1998) (tabla 1).

Tabla 1. Morfometría de la población lactotropa

	Joven (n = 10)	Vieja (n = 9)	Senil (n = 8)
Machos	122 (± 7) (a)	94 (± 5) (b)	46 (± 3) (c)
DV ($\times 10^{-3}$)			
Hembras	141 (± 6) (d)	131 (± 5) (e)	196 (± 6) (f)
DC ($\times 10^{-4}$)			
Machos	86 (± 2) (a)	46 (± 2) (b)	14 (± 1) (c)
Hembras	110 (± 5) (d)	88 (± 3) (e)	189 (± 4) (f)

DV: Valores *p* intragrupos: a vs b and b vs c: < 0.01 ; d vs e: NS; e vs f: $p < 0.01$. Valores *p* intergrupos DV: a vs d: NS; b vs e and c vs f: $p < 0.01$. **DC:** Valores *p* intragrupos: a vs b, b vs c, d vs e and e vs f: < 0.01 . Valores *p* intergrupos: a vs d: < 0.05 ; b vs e: $p < 0.01$; c vs f: $p < 0.01$. Valores: \pm ES.

Se cuantificaron las lactotropas en pituitarias de ratas machos en diferentes edades durante la vida media y se halló un incremento en la densidad de volumen (DV) seguido de un descenso de tal parámetro luego del 50% de la edad de sobrevivida (van Putten y col., 1988). Este hallazgo está de acuerdo con resultados previos en ratas seniles, en los que no hubo cambios en los niveles de PRL (Cónsole y col., 1997). Rossi y col. (1991) documentaron sólo un ligero aumento de la PRL inmunorreactiva en pituitarias de ratas machos de 20 a 22 meses, mientras Takahashi y Kawashima (1983) no hallaron ningún cambio significativo en la población lactotropa en ratas machos de 20 meses de edad. En agregado, Drewet y col. (1993) mostraron en ratas machos un incremento de las apoptosis en la hiperplasia lactotropa inducida mediante estrógenos. Las alteraciones morfológicas en la población lactotropa en ratas seniles podría explicarse

Lactotropes in pituitaries of male rats were assessed in different age stages during half-life, and an increased VD was found followed by the decrease of the same parameter after 50% of the survival rate age (van Putten et al., 1988). This finding agrees with previous results in senescent rats, where no changes were evidenced in PRL levels (Cónsole et al., 1997).

Rossi et al. (1991) documented only a slight increase of the immunoreactive PRL in pituitaries of 20-to-22-month-old male rats, whereas Takahashi and Kawashima (1983) did not find any significant change in the lactotrope population labelled in 20-month aged male rats. Also, Drewet et al. (1993) found male rats with increased apoptosis in lactotrope hyperplasia induced by estrogens. Morphologic alterations in the lactotrope population in senescent rats might be explained by a pituitary desensitization to nucleoproteins and to hypophysiotropic molecules (Brown et al., 1996).

Contradictory results have been recorded in PRL serum levels in aged male rats (Shaar et al., 1975; Takahashi et al., 1980; Gudelsky et al., 1981). The increased serum levels (Simpkins et al., 1977; Takahashi et al., 1980; Gudelsky et al., 1981), as well as the unchanged ones (Shaar et al., 1975; Rigle and Meites, 1976; Van Putten et al., 1988) have been reported in male rats during ageing. In our female senescent animals, we found high levels of PRL ($p < 0.01$) compared to young animals (Bolzan et al., 1997) (fig. 6.2).

Electron microscopy has allowed describing two subtypes of secretory granules in lactotropes (Smets et al., 1987; Girod y Trouillas, 1993) or more than two (Nogami and Yoshima, 1982 and 1984; Takahashi,

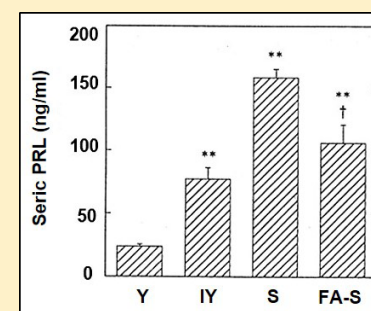


Fig. 6.2. Serum levels of PRL. Yc: young control, Yg: young grafted, Sh: senescent, Sf: senescent with fibroadenoma, ** $p < 0.01$.

por una desensibilización de la pituitaria a las nucleoproteínas y a otras moléculas hipofisotróficas (Brown y col., 1996).

Se han registrado resultados contradictorios en los niveles séricos de PRL en ratas machos envejecidas (Shaar y col., 1975; Takahashi y col., 1980; Gudelsky y col., 1981). Los niveles séricos incrementados (Simpkins y col., 1977; Takahashi y col., 1980; Gudelsky y col., 1981), así como los no cambiados (Shaar y col., 1975; Rigne y Meites, 1976; Van Putten y col., 1988) han sido comunicados en ratas machos durante el envejecimiento.

En nuestros animales seniles hembras hallamos altos niveles de PRL ($p < 0.01$) respecto a ratas jóvenes (Bolzán y col., 1997) (fig. 6.2).

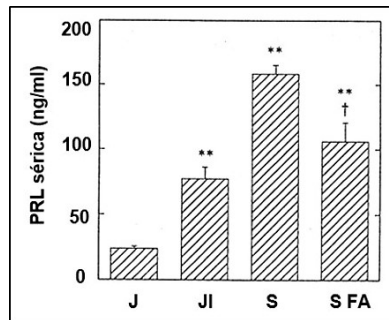


Fig. 6.2. Niveles séricos de PRL. J: joven, JI: joven injertada, S: senil, SFA: senil con fibroadenoma, ** $p < 0.01$.

La microscopía electrónica ha permitido describir en las lactotropas dos subtipos de gránulos secretorios (Smets y col., 1987; Girod y Trouillas, 1993) o más de dos (Nogami and Yoshima, 1982 y 1984; Takahashi, 1992). La proporción relativa de cada subtipo estaría asociada con los diferentes estadios del ciclo secretorio.

Takahashi (1992) observó tres tipos de células lactotropas en la pituitaria de rata, sobre la base de estudios de inmunohistoquímica electrónica. Lactotropa **Tipo I**: los gránulos secretorios aparecieron irregulares en forma y tamaño (300-700 nm); lactotropa **Tipo II**: gránulos secretorios redondos y de tamaño intermedio (150-250 nm) y lactotropa **Tipo III**: gránulos secretorios redondeados y pequeños (100 nm). El Tipo I es

1992). The relative proportion of each subtype would be associated to the different stages of the secretory cycle.

Takahashi (1992) observed three types of lactotrope cells in the rat pituitary studied under electron immunohistochemistry. **Type I** lactotrope: secretory granules were irregular in shape and size (300-700 nm); **Type II** lactotrope: secretory granules were rounded and average sized (150-250 nm); and **Type III** lactotrope: secretory granules were rounded and very small (100 nm). Type I is considered a mature cell stage and was predominant in young and middle-aged rats; Type II would belong to an intermediate cell stage and Type III would be associated to an immature stage that increases with age.

In our ultrastructural study lactotropes of young rats of both sexes exhibited habitual characteristics, they evidenced polygonal sized cells with numerous pleomorphic secretory granules in a 100-to-600 nm range (Cónsole et al. 1998).

A developed Golgi complex was observed, as well as a rough endoplasmic reticulum (RER) composed of long flattened sacs. Rounded or oval mitochondria, occasional lysosomes and abundant free ribosomes were also seen (fig. 6.3).

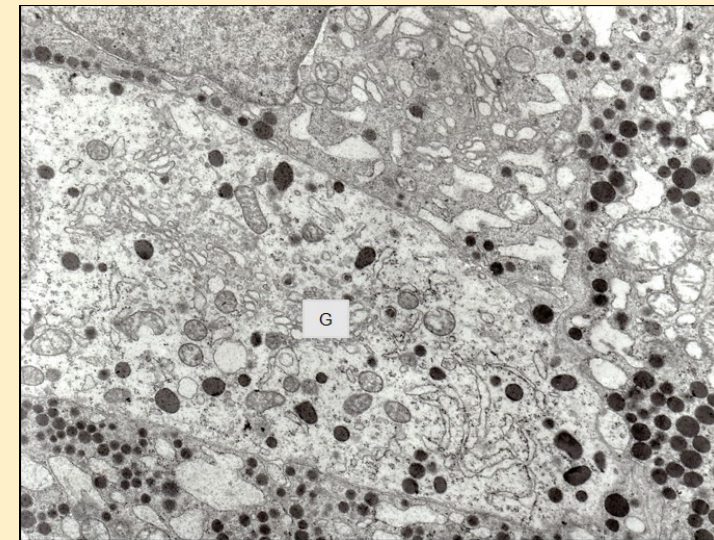


Fig. 6.3. Young rat lactotrope. Golgi (g) (x 16.000).

considerado como un estadio celular maduro y predominó en las ratas jóvenes y de edad media; el Tipo II correspondería a un estadio celular intermedio y el Tipo III se asociaría con un estadio inmaduro que aumenta con la edad.

En nuestro estudio ultraestructural las lactotropas de ratas jóvenes de ambos sexos exhiben células de forma poligonal con numerosos gránulos secretorios pleomórficos en un rango de 100 a 600 nm (Cónsole y col. 1998). En concordancia con lo documentado por Takahashi (1982 y 1992), nuestro estudio inmunohistoquímico ultraestructural revela dos tipos celulares de lactotropas.

En la **fig. 6.3** se ve un complejo de Golgi bien desarrollado, un retículo endoplásmico rugoso (RER) compuesto por largos sacos aplanados, mitocondrias, lisosomas y abundantes ribosomas libres.

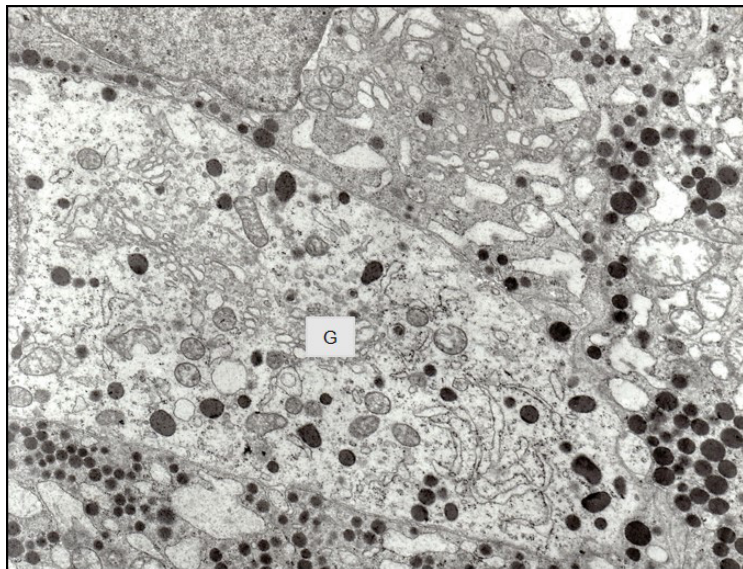


Fig. 6.3. Lactotropa de rata macho joven: Golgi (g) (x 16.000).

La **fig. 6.4** muestra una lactotropa Tipo I con gránulos secretorios grandes (200-600 nm). El Tipo II presenta gránulos secretorios de me-

In agreement with Takahashi (1992), our ultrastructural immuno-histochemical study revealed two types of lactotrope cells: Type I contained large secretory granules (200-600 nm) (**fig. 6.4**) (Cónsole et al., 1998).

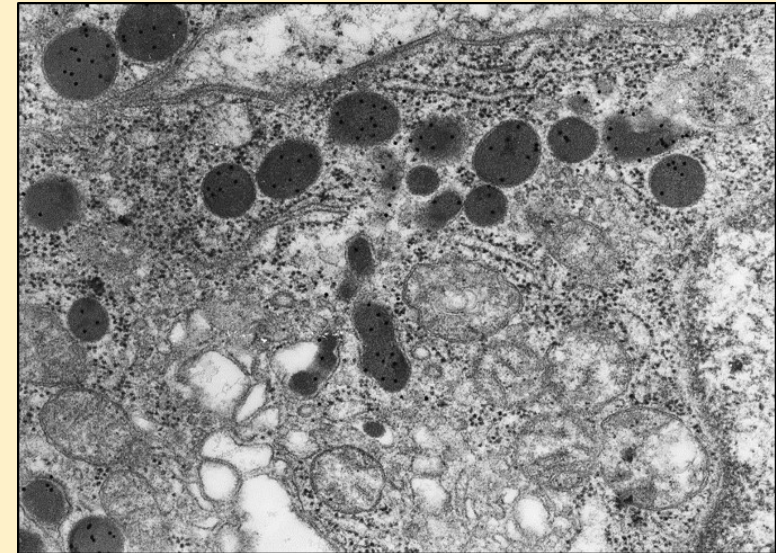


Fig. 6.4. Young rat: type I lactotrope. Electron IHC with gold particles (x 40.000)

Figures 6.5-6.6 show in the same microphotograph type I and II lactotropes. A considerable difference can be seen in the size of the gold-particle bearing immunostained secretory granules. In **fig. 6.6** a dilated RER with membrane sacs and lined by ribosomes can be seen as well as an involutive cell with irregular nucleus. Also, it presents a regressive process that becomes evident in the presence of a dark cell with irregular nucleus and condensed chromatin in the upper right side of the microphotograph.

In old rats a highly extended and dilated Golgi complex with immature granules were found. Highly dilated irregular cisterna and free ribosomes were shown in RER. Secretory granules appeared diminished in number and those medium-to-small-sized predominated.

nor tamaño (100-200 nm). El Tipo I (maduro) fue más frecuente en las ratas jóvenes, mientras el Tipo II predominó en los animales viejos y seniles (Cónsole y col., 1998).

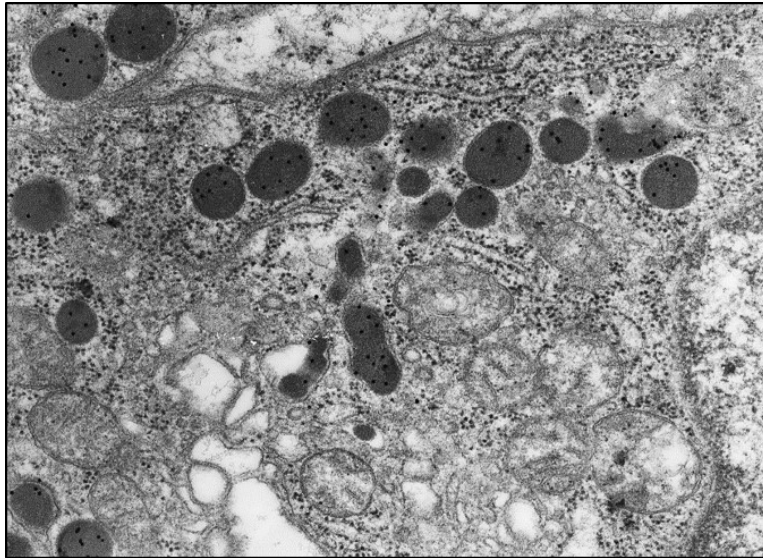


Fig. 6.4. Lactotropa tipo I de rata macho joven. IHQ-ME con partículas de oro (x 40.000).

La **fig. 6.5** muestra lactotropas de tipo I y II en la misma microfotografía. Se puede apreciar la diferencia notable en el tamaño de los gránulos secretorios inmunomarcados portadores de partículas de oro. Tipo I: 200-600 nm y tipo II: 100-200 nm.

En las ratas viejas de ambos sexos hallamos cambios marcados en el 75% de la población lactotropa, con un complejo de Golgi muy extendido y dilatado en el que detectamos gránulos inmaduros. El RER mostró cisternas aplanadas irregularmente dilatadas y ribosomas libres. Los gránulos secretorios aparecieron en menor número y predominaron los de tamaño mediano a pequeño. Se detectaron algunas lactotropas en proceso involutivo: células oscuras con núcleo irregular y cromatina condensada (Cónsole y col., 1998).

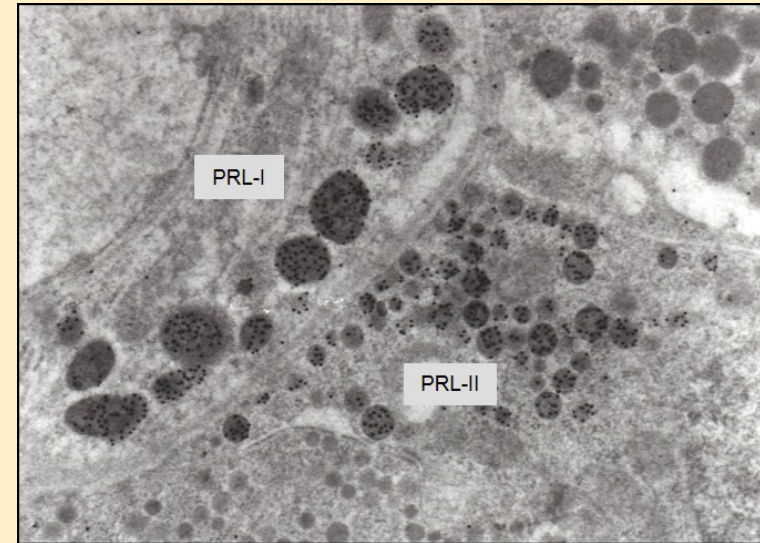


Fig. 6.5. Young rat: types I and II lactotropes. Electron IHC with gold particles (x 30.000).



Fig. 6.6. Old rat lactotrope. Secretory granules (SG), dilated RER and Golgi (G). Involutionary lactotrope (PRL) (x 23.000).

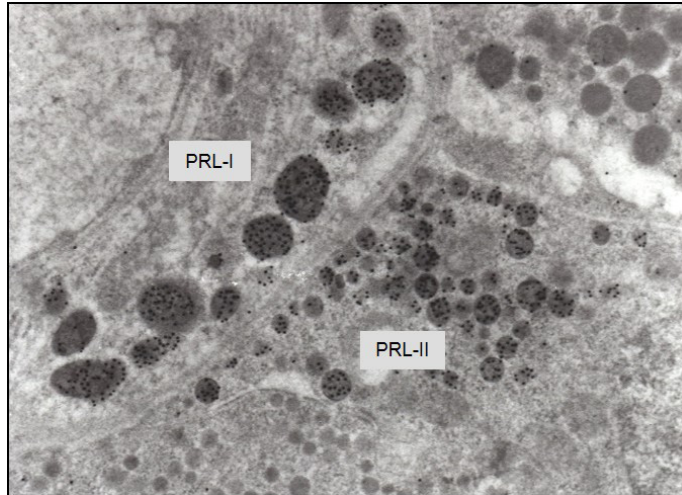


Fig. 6.5. Lactotropas tipos I y II de rata hembra joven. IHQ-ME con partículas de oro (x 30.000).

La **fig. 6.6** corresponde a una rata hembra vieja y muestra una lactotropa hipertrófica e involutiva con un Golgi dilatado y un RER vesiculoso.

La **fig. 6.6** muestra una célula oscura involutiva con núcleo irregular y cromatina condensada y la **fig. 6.7** presenta una dilatación marcada del RER.

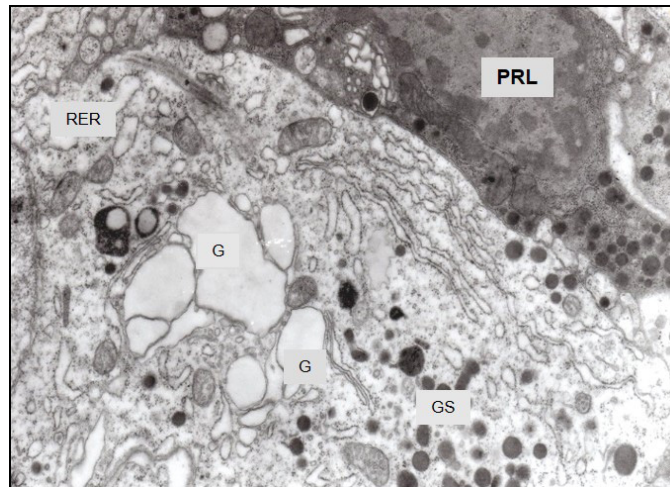


Fig. 6.6. Lactotropa de rata hembra vieja. Gránulos secretorios (GS), RER y Golgi (G) dilatados. PRL involutiva oscura (x 23.000).

In **fig. 6.7** the lactotrope shows a markedly dilated RER. The ultrastructural changes in senescent rats of both sexes were detected in 50% of the lactotrope population. In old rats of both sexes we found marked changes in 75% of the lactotrope population with a highly extended and dilated Golgi complex where immature granules were found.

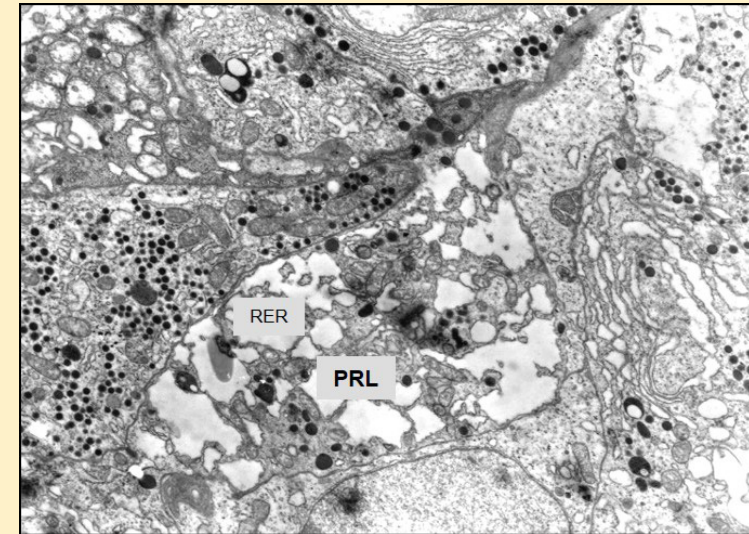


Fig. 6.7. Old rat lactotrope. Dilated RER and scarce number of secretory granules (x 15.000).

Fig. 6.8 shows an involutive lactotrope. Those alterations described for old rats were increased in intensity.

In **fig. 6.9** a senescent rat lactotrope with an extremely dilated RER and mitochondria (m) with obvious swelling can be noticed. The cytoarchitecture appears highly modified and the nucleus seems to be isolated among irregular islands of the dilated RER.

Fig. 6.10 presents a lactotrope cell of senescent rat with perinuclear cisternae, swollen mitochondria and dilated RER.

Torres and Aoki (1987) communicated the presence of a PRL polymeric isoform (high MW) that would be deposited on the se-

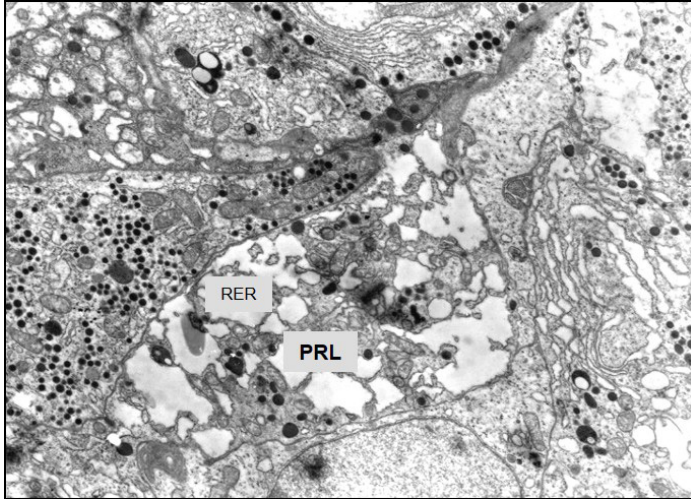


Fig. 6.7. Lactotropa de rata hembra vieja. RER dilatado y escasos gránulos secretorios (x 15.000).

La **fig. 6.8** muestra una lactotropa involutiva. Las alteraciones descritas para las ratas viejas se incrementaron en intensidad.

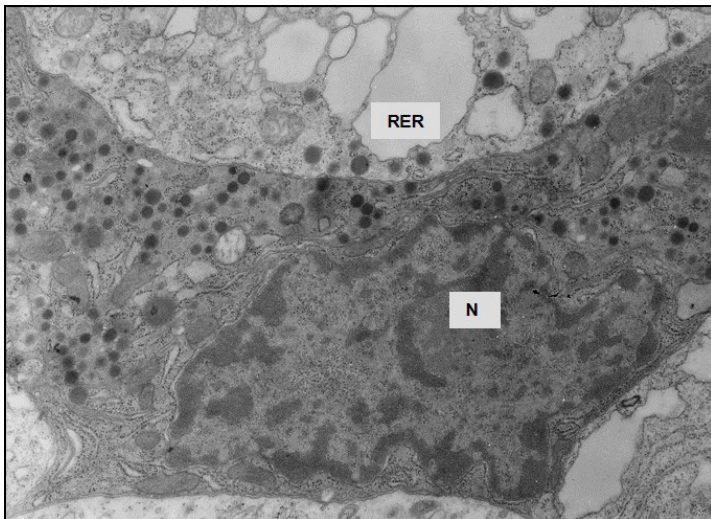


Fig. 6.8. Lactotropa de rata hembra vieja. RER dilatado y PRL involutiva con organelas que conservan morfología (x 20.000).

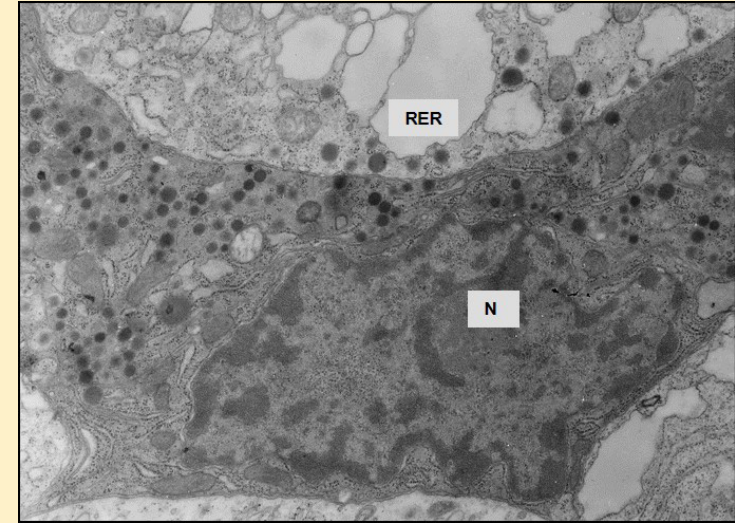


Fig. 6.8. Senile rat lactotrope. Dilated RER and involutive PRL (x 20.000).

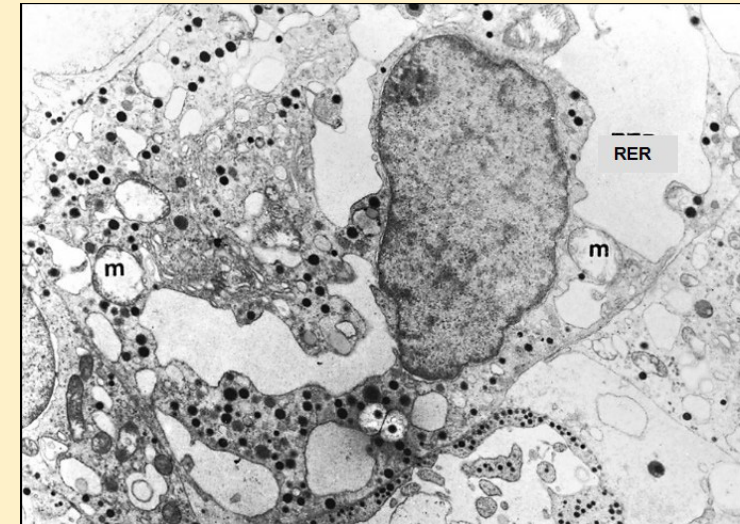


Fig. 6.9. Senile rat lactotrope. RER and swollen mitochondria (m) (x 10.000).

cretory granules adjacent to the membrane, while the monomeric isoform (low MW) would represent a newly synthesized hormone

Los cambios ultraestructurales en las ratas seniles de ambos sexos se detectaron en un 50% de la población lactotropa.

En la **fig. 6.9** se ve una lactotropa de rata senil con una mayor dilatación del RER y se detectan mitocondrias (m) con una clara tumefacción. La citoarquitectura está muy alterada y el núcleo queda como aislado entre las islas irregulares del RER dilatado (Cónsole y col., 1998).

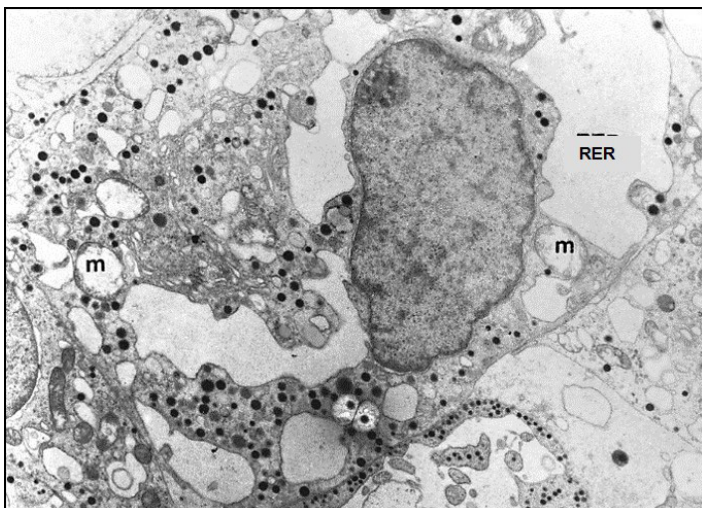


Fig. 6.9. Lactotropa de rata macho senil. RER y mitocondrias tumefactas (m) (x 10.000).

En la **fig. 6.10** se observa una lactotropa de rata senil con mitocondrias tumefactas y RER dilatado.

Torres y Aoki (1987) comunicaron la presencia de una isoforma de PRL polimérica (alto PM) que sería depositada en los gránulos secretorios vecinos a la membrana, mientras la isoforma monomérica (bajo PM) representaría una hormona recién sintetizada que se ubica a nivel de los organoides. Estos autores describieron tres patrones secretorios en las lactotropas: **1. Estimulación:** la síntesis y secreción está aumentada y la mayor parte de la PRL polimérica es liberada por los gránulos secretorios mediante exocytosis. **2. Inhibición o bloqueo:** es la acumulación de gránulos secretorios con PRL monomérica y liberación basal por exocytosis. **3. Hiperestimula-**

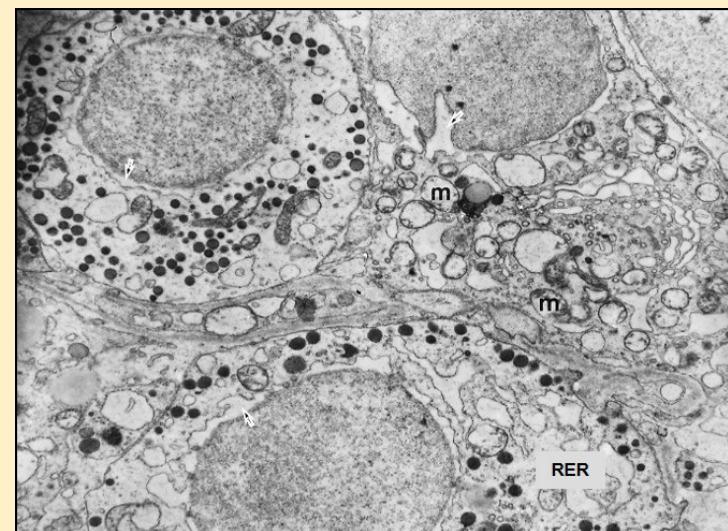


Fig. 6.10. Senile rat lactotrope. Dilated RER with perinuclear cisternae and swollen mitochondria (m) (x 16.000).

located at the level the organoids. These authors described three secretory patterns in lactotropes: **1. Stimulation:** synthesis and secretion are increased and most polymeric PRL is released from the secretory granules via exocytosis. **2. Inhibition:** it is the accumulation of secretory granules with monomeric PRL and basal release via exocytosis. **3. Hyperstimulation:** monomeric PRL is secreted in large quantity, with no storage within the granules, while the polymeric form is released by exocytosis. This pattern leads to hypertrophy of the RER and Golgi complex. The ultrastructural changes found in the lactotrope population of old and senile rats of both sexes might reflect the secretory pattern of hyperstimulation described by Torres and Aoki, with a remarkable hypertrophy of the RER and Golgi complex, a diminished number of secretory granules and scarce exocytic profiles.

To conclude, ageing in the senescent stage caused well defined quantitative immunohistochemical changes in the lactotrope popu-

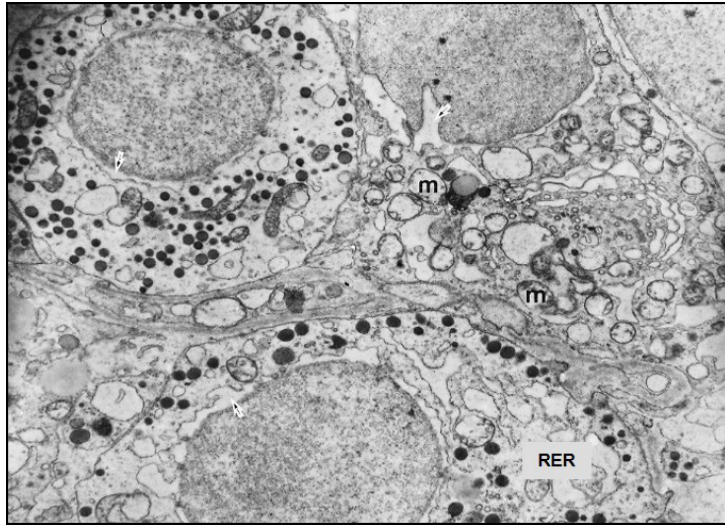


Fig. 6.10. Lactotropa de rata macho senil. RER dilatado con cisterna perinuclear y mitocondrias tumefactas (m) (x 16.000).

ción: la PRL monomérica es secretada en grandes cantidades, sin almacenamiento dentro de los gránulos, mientras la forma polimérica es liberada por exocitosis. Este patrón lleva a la hipertrofia del RER y del complejo de Golgi. Los cambios ultraestructurales hallados en la población lactotropa de ratas viejas y seniles de ambos sexos podrían reflejar el patrón secretorio de hiperestimulación descrito por Torres y Aoki, con una remarcable hipertrofia del RER y del complejo de Golgi, un número disminuido de gránulos secretorios y escasos perfiles exocíticos.

En conclusión, el envejecimiento en etapa de senescencia causó cambios inmunohistoquímicos cuantitativos bien definidos en la población lactotropa con dimorfismo sexual, un ascenso en los niveles séricos de PRL y alteraciones ultraestructurales que explicarían un patrón secretorio de hiperestimulación.

Referencias

Ale-Agha N, Dyballa-Rukes N, Jakob S, Altschmied J, Haendeler J. Cellular functions of the dual-targeted catalytic subunit of telomerase,

lation with sexual dimorphism, an increase in the PRL serum levels and ultrastructural alterations that might explain a hyperstimulation secretory pattern.

References

- Ale-Agha N, Dyballa-Rukes N, Jakob S, Altschmied J, Haendeler J. Cellular functions of the dual-targeted catalytic subunit of telomerase, telomerase reverse transcriptase - Potential role in senescence and aging. *Exp Gerontol* 2014; S0531-5565(14)00068-0.
- Ascheleim S, Zondek B. Hypophys envorderlappen und ovarium. In *Beziehung der endokrinen drüsen zur ovarialfunktion*. *Arch Gynaekol* 1927; 130:1.
- Aschoff L. Zur normalen and pathologischen anatomie des geisenalters. *Med Klin* 1937, 33:291.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 1989; 33(5-6):399-447.
- Berkvens JM, van Nesselrooy JH, Kroes R. Spontaneous tumors in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. *J Pathol* 1980; 130:179-191.
- Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging-added evidence. *Exp Gerontol* 1990; 25(2):91-95.
- Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 1968; 16(4):408-427.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279(5349):349-352.
- Bolzán AD, Bianchi MS, Cónsole GM, Goya RG. Relationship between pituitary hormones, antioxidant enzymes, and histopathological changes in the mammary gland of senescent rats. *Exp Gerontol* 1997; 32(3):297-304.

- telomerase reverse transcriptase - Potential role in senescence and aging. *Exp Gerontol* 2014; S0531-5565(14)00068-0.
- Ascheleim S, Zondek B. Hypophys envorderlappen und ovarium. In Beziehung des endokrin drusen zur ovarial funktion. *Arch Gynaekol* 1927; 130:1.
- Aschoff L. Zur normalen and pathologischen anatomie des geisenalters. *Med Klin* 1937, 33:291.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 1989; 33(5-6):399-447.
- Berkvens JM, van Nesselrooy JH, Kroes R. Spontaneous tumors in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. *J Pathol* 1980; 130:179-191.
- Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging-added evidence. *Exp Gerontol* 1990; 25(2):91-95.
- Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 1968; 16(4):408-427.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279(5349):349-352.
- Bolzán AD, Bianchi MS, Cónsole GM, Goya RG. Relationship between pituitary hormones, antioxidant enzymes, and histopathological changes in the mamary gland of senescent rats. *Exp Gerontol* 1997; 32(3):297-304.
- Brown OA, Sosa YE, Cónsole GM, Goya RG. Age-dependent prolactin-releasing activity of nucleoproteins. *Mech Ageing Dev* 1996; 89(2):103-111.
- Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 2003; 38(1-2):5-11.
- Chuknyiska RS, Blackman MR, Hymer WC, Roth GS. Age-related alterations in the number and function of pituitary lactotrophic cells from intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 1986; 118(5):1856-62.
- Cocchi D, Novelli A, Ganzetti I, Muller EE. In vivo supersensitivity of the anterior pituitary of old female rats to dopaminergic inhibition of prolactin secretion. *Gerontology* 1984; 30(6):345-349.
- Brown OA, Sosa YE, Cónsole GM, Goya RG. Age-dependent prolactin-releasing activity of nucleoproteins. *Mech Ageing Dev* 1996; 89(2):103-111.
- Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 2003; 38(1-2):5-11.
- Chuknyiska RS, Blackman MR, Hymer WC, Roth GS. Age-related alterations in the number and function of pituitary lactotrophic cells from intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 1986; 118(5):1856-62.
- Cocchi D, Novelli A, Ganzetti I, Muller EE. In vivo supersensitivity of the anterior pituitary of old female rats to dopaminergic inhibition of prolactin secretion. *Gerontology* 1984; 30(6):345-349.
- Brown OA, Sosa YE, Cónsole GM, Goya RG. Age-dependent prolactin-releasing activity of nucleoproteins. *Mech Ageing Dev* 1996; 89(2):103-111.
- Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 2003; 38(1-2):5-11.
- Chuknyiska RS, Blackman MR, Hymer WC, Roth GS. Age-related alterations in the number and function of pituitary lactotrophic cells from intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 1986; 118(5):1856-62.
- Cocchi D, Novelli A, Ganzetti I, Muller EE. In vivo supersensitivity of the anterior pituitary of old female rats to dopaminergic inhibition of prolactin secretion. *Gerontology* 1984; 30(6):345-349.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.
- Danner DB. The proliferation theory of rejuvenation. *Mech Ageing Dev* 1992; 65(1):85-107.
- Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.
- Esquifino AI, Cano P, Jiménez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. Changes of prolactin regulatory mechanisms in aging: 24-h rhythms of serum prolactin and median eminence and adenohipophysial concentration of dopamine, serotonin, gamma-aminobutyric acid, taurine and somatostatin in young and aged rats. *Exp Gerontol* 2004; 39(1):45-52.
- Fernández-Ruiz J, De Miguel R, Hernández ML, Cebeira M, Ramos JA. Comparisons between brain dopaminergic neurons of juvenile and aged rats: sex-related differences. *Mech Ageing Dev* 1992; 63(1):45-55.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.

Danner DB. The proliferation theory of rejuvenation. *Mech Ageing Dev* 1992; 65(1):85-107.

Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.

Esquifino AI, Cano P, Jiménez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. Changes of prolactin regulatory mechanisms in aging: 24-h rhythms of serum prolactin and median eminence and adenohipophysial concentration of dopamine, serotonin, gamma-aminobutyric acid, taurine and somatostatin in young and aged rats. *Exp Gerontol* 2004; 39(1):45-52.

Fernández-Ruiz J, De Miguel R, Hernández ML, Cebeira M, Ramos JA. Comparisons between brain dopaminergic neurons of juvenile and aged rats: sex-related differences. *Mech Ageing Dev* 1992; 63(1):45-55.

Fossel M. Telomerase and aging cell: implications for human health. *JAMA* 1998; 279(21):1732-1735.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Méd Chir (Paris-France), Endocrinologie-Nutrition*, 1993; 10-017-A-10, 1: 1-24.

Govoni S, Memo M, Saiani L, Spano PF, Trabucci M. Impairment of brain neurotransmitter receptors in aged rats. *Mech Ageing Dev* 1980; 12(1):39-46.

Gudelsky GA, Mansel DD, Porter JC. Dopaminergic control of prolactin secretion in the aging male rat. *Brain Res* 1981; 204(2):446-450.

Harman D. Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11:298-301.

Harman D. Free radical theory of aging. *Mut Res* 1992; 275(3-6):257-266.

Fossel M. Telomerase and aging cell: implications for human health. *JAMA* 1998; 279(21):1732-1735.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Méd Chir (Paris-France), Endocrinologie-Nutrition*, 1993; 10-017-A-10, 1: 1-24.

Govoni S, Memo M, Saiani L, Spano PF, Trabucci M. Impairment of brain neurotransmitter receptors in aged rats. *Mech Ageing Dev* 1980; 12(1):39-46.

Gudelsky GA, Mansel DD, Porter JC. Dopaminergic control of prolactin secretion in the aging male rat. *Brain Res* 1981; 204(2):446-450.

Harman D. Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11:298-301.

Harman D. Free radical theory of aging. *Mut Res* 1992; 275(3-6):257-266.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585-621.

Hong JY, Oh JS, Lee I, Sunwoo MK, Jam JH, Lee JE, Sohn YH, Kim JS, Lee PH. Presynaptic dopamine depletion predicts levodopa-induced dyskinesia in the novo Parkinson disease. *Neurology* 2014; 82(18):1597-1604.

Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268(10):2784-91.

Ito A, Moy P, Kaunitz H, Kortwright K, Clarke S, Furth J, Meites J. Incidence and character of the spontaneous pituitary tumors in strain CR and W/Fu male rats. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49(3):701-711.

Jodko K, Litwinienko T. Oxidative stress in the neurodegenerative diseases-potential antioxidant activity of catecholamines. *Postepy Biochem* 2010; 56(3):248-259.

Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuri Endocrinol Lett* 2002; 23 (Suppl 1):14-16.

- Meites J, Goya RG, Takahashi S. Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 1987; 22(1):1-15.
- Meites J. Aging of endocrine brain. *Brain Endocrinology*, Second Edition, In: ed. Marcella Motta. Raven. Press, Ltd., New York, 1991.
- Meites J. Neuroendocrine basis old aging in the rat. Regulation of neuroendocrine aging. In: Everitt AV, Walton JR eds. Basel, Karger, 1988:34-50.
- Meites J. Remembrance: Neuroendocrinology and aging. A perspective. *Endocrinology* 1992; 130(6):3107-08.
- Miracco EJ, Jiang J, Cash DD, Feigon J. Progress in structural studies of telomerase. *Curr Opin Struct Biol* 2014; 24C:115-124.
- Nagy I, Nagy K. On role of cross-linking of cellular proteins in aging. *Mech Ageing Dev* 1980; 14(1-2):245-251.
- Nogami H, Yoshimura F. Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 1982; 202(2):261-274.
- Nogami H. Fine-structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Res* 1984; 237(2):195-202.
- Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 49:517-521.
- Pearl R. The biology of death. Lowell Institute, Boston. In: Lippincott JB. Philadelphia, 1922.
- Pribram BO. Zur frage des alterns. Destructive hypophyseo-thyroeditis. *Virch Arch (Pathol Anat)* 1927; 264:498.
- Reiter RJ. Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age (Omaha)* 1997; 20(4):201-213.
- Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995; 30(3-4):199-212.
- Reymond MJ, Porter JC. Secretion of hypothalamic dopamine into pituitary stalk blood of aged female rats. *Brain Res Bull* 1981; 7(1):69-73.
- Reymond MJ, Donda A, Lemarchand-Béraud T. Neuroendocrine aspects of aging: experimental data. *Horm Res* 1989; 31(1-2):32-38.
- Reymond MJ. Age-related loss of the responsiveness of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin in the female rat. *Neuroendocrinology* 1990; 52(5):490-496.
- Riegle GD, Meites J. The effect of stress on serum prolactin in the female rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 152(3):441-448.
- Rogol AD, Rosen SW. Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumour. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38(4):714-717.
- Rose MR. Adaptation, aging and genomic information. *Aging (Albany, NY)* 2009; 1(5):444-450.

- Reymond MJ. Age-related loss of the responsiveness of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin in the female rat. *Neuroendocrinology* 1990; 52(5):490-496.
- Riegler GD, Meites J. The effect of stress on serum prolactin in the female rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 152(3):441-448.
- Rogol AD, Rosen SW. Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38(4):714-717.
- Rose MR. Adaptation, aging and genomic information. *Aging (Albany, NY)* 2009; 1(5):444-450.
- Rossi GL, Bestetti GE, Galbiati E, Muller EE, Cocchi D. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol* 1991; 46(1): B152-158.
- Rossi GL, Bestetti GE, Neiger R. Sexually dimorphic effects of aging on tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes of rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 72(2):129-143.
- Rossi GL, Bestetti GE, Reymond MJ. Tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes in young and old female rats. *Neurobiol Aging* 1992; 13(2):275-281.
- Sacher GA. Aging and biological rhythms: concluding comments. *Adv Exp Med Biol* 1978; 108:325-327.
- Sacher GA. Life table modification and life prolongation. *Handbook of the Biology of Aging*. In: Finch CE and Hayflick L (eds.), New York, 1977:582.
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 2014; 28(2):99-114.
- Sapolsky RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging* 1992b; 13(1):171-174.
- Salpolsky RM. Stress, the aging brain and mechanisms of neuron death. In: MIT Press, Cambridge, MA, 1992a.
- Samorajski T. Central neurotransmitter substances and aging: a review. *J Am Geriatr Soc* 1977; 25(8):337-348.
- Rossi GL, Bestetti GE, Galbiati E, Muller EE, Cocchi D. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol* 1991; 46(1): B152-158.
- Rossi GL, Bestetti GE, Neiger R. Sexually dimorphic effects of aging on tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes of rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 72(2):129-143.
- Rossi GL, Bestetti GE, Reymond MJ. Tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes in young and old female rats. *Neurobiol Aging* 1992; 13(2):275-281.
- Sacher GA. Aging and biological rhythms: concluding comments. *Adv Exp Med Biol* 1978; 108:325-327.
- Sacher GA. Life table modification and life prolongation. *Handbook of the Biology of Aging*. In: Finch CE and Hayflick L (eds.), New York, 1977:582.
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 2014; 28(2):99-114.
- Sapolsky RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging* 1992b; 13(1):171-174.
- Salpolsky RM. Stress, the aging brain and mechanisms of neuron death. In: MIT Press, Cambridge, MA, 1992a.
- Samorajski T. Central neurotransmitter substances and aging: a review. *J Am Geriatr Soc* 1977; 25(8):337-348.
- Rossi GL, Bestetti GE, Galbiati E, Muller EE, Cocchi D. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol* 1991; 46(1): B152-158.
- Rossi GL, Bestetti GE, Neiger R. Sexually dimorphic effects of aging on tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes of rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 72(2):129-143.
- Rossi GL, Bestetti GE, Reymond MJ. Tuberoinfundibular dopaminergic neurons and lactotropes in young and old female rats. *Neurobiol Aging* 1992; 13(2):275-281.
- Sacher GA. Aging and biological rhythms: concluding comments. *Adv Exp Med Biol* 1978; 108:325-327.
- Sacher GA. Life table modification and life prolongation. *Handbook of the Biology of Aging*. In: Finch CE and Hayflick L (eds.), New York, 1977:582.
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 2014; 28(2):99-114.
- Sapolsky RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging* 1992b; 13(1):171-174.
- Salpolsky RM. Stress, the aging brain and mechanisms of neuron death. In: MIT Press, Cambridge, MA, 1992a.
- Samorajski T. Central neurotransmitter substances and aging: a review. *J Am Geriatr Soc* 1977; 25(8):337-348.
- Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol* 2003; 458(4):319-325.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982; 218(4573):684-686.
- Shaar CJ, Euker JS, Riegler GD, Meites J. Effects of castration and gonadal steroids on serum luteinizing hormone and prolactin in old and young rats. *J Endocrinol* 1975; 66(1):45-51.

Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol* 2003; 458(4):319-325.

Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982; 218(4573):684-686.

Shaar CJ, Euker JS, Riegler GD, Meites J. Effects of castration and gonadal steroids on serum luteinizing hormone and prolactin in old and young rats. *J Endocrinol* 1975; 66(1):45-51.

Simmonds M. Uber embolische prozesse in des hypophysis. *Virch Arch (Pathol Anat)* 1914; 217:226.

Simpkins JW, Mueller GP, Huang HH, Meites J. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1977; 100(6):1672-78.

Smets G, Velkeniers B, Finne E, Baldys A, Gepts W, Vanhaelst L. Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(3):335-341.

Sonntag WE, Gough MA. Growth hormone releasing hormone induced release of growth hormone in aging male rats: dependence on pharmacological manipulation and endogenous somatostatin release. *Neuroendocrinology* 1988; 47:482-488.

Strelher BL. Time, cells and aging. In: Academic Press, 1977: 356-360.

- Szilard L. On the nature of aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45(1):30-45.

Szot P. Common factors among Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and epilepsy: possible role of the noradrenergic nervous system. *Epilepsia* 2012; 53(Suppl 1):61-66.

Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats. *Acta Anat (Basel)* 1982; 113(3):211-217.

Simmonds M. Uber embolische prozesse in des hypophysis. *Virch Arch (Pathol Anat)* 1914; 217:226.

Simpkins JW, Mueller GP, Huang HH, Meites J. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1977; 100(6):1672-78.

Smets G, Velkeniers B, Finne E, Baldys A, Gepts W, Vanhaelst L. Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(3):335-341.

Sonntag WE, Gough MA. Growth hormone releasing hormone induced release of growth hormone in aging male rats: dependence on pharmacological manipulation and endogenous somatostatin release. *Neuroendocrinology* 1988; 47:482-488.

Strelher BL. Time, cells and aging. In: Academic Press, 1977: 356-360.

Szilard L. On the nature of aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45(1):30-45.

Szot P. Common factors among Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and epilepsy: possible role of the noradrenergic nervous system. *Epilepsia* 2012; 53(Suppl 1):61-66.

Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats. *Acta Anat (Basel)* 1982; 113(3):211-217.

Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima University Serie B Div 1*, 1983; 31:185-191.

Takahashi S, Kawashima, Wakabayashi K. Effects of gonadectomy and chlorpromazine treatment on prolactin, LH, and FSH secretion in young and old rats of both sexes. *Exp Gerontol* 1980; 15(3):185-194.

Takahashi S. Heterogeneity and development of somatotrophs and mamatotrophs in the rat. *Zool Sc* 1992; 9:901-914.

- Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima University Serie B Div 1*, 1983; 31:185-191.
- Takahashi S, Kawashima, Wakabayashi K. Effects of gonadectomy and chlorpromazine treatment on prolactin, LH, and FSH secretion in young and old rats of both sexes. *Exp Gerontol* 1980; 15(3):185-194.
- Takahashi S. Heterogeneity and development of somatotrophs and mamatotrophs in the rat. *Zool Sc* 1992; 9:901-914.
- Tillet Y, Kitahama K. Distribution of central catecholaminergic neurons: a comparison between ungulates, humans and other species. *Histol Histopathol* 1998; 13(4):1163-77.
- Timiras PS, Quay WD, Vernadakis A. Hormones and aging. In: CRC Press Inc., 1995:17.
- Tollefsboll T, Gracy RW. Premature aging diseases: cellular and molecular changes. *Bioscience* 1983; 33:624-638.
- Torres AI, Aoki A. Release of big and small molecular forms of prolactin: dependence upon dynamic state of the lactotroph. *J Endocrinol* 1987; 114(2):213-220.
- van Nesselrooij JH, Kuper CF, Bosland MC. Correlations between presence of spontaneous lesions of the pituitary (adenohypophysis) and plasma prolactin concentration in aged Wistar rats. *Vet Pathol* 1992; 29(4):288-300.
- van Putten LJ, Kiliaan AJ. Immuno-electron-microscopic study of the prolactin cells in the pituitary gland of male Wistar rats during aging. *Cell Tissue Res* 1988; 251(2):353-358.
- van Putten LJ, van Zwieten MJ, Mattheij JA, van Kemenade JA. Studies on prolactin-secreting cells in aging rats of different strains. I. Alterations in pituitary histology and serum prolactin levels as related to aging. *Mech Ageing Dev* 1988; 42(1):75-90.
- Villar-Cheda B, Domínguez-Meijide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-García JL. Ageing-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* 2014; 35(7):1726-38.
- Tillet Y, Kitahama K. Distribution of central catecholaminergic neurons: a comparison between ungulates, humans and other species. *Histol Histopathol* 1998; 13(4):1163-77.
- Timiras PS, Quay WD, Vernadakis A. Hormones and aging. In: CRC Press Inc., 1995:17.
- Tollefsboll T, Gracy RW. Premature aging diseases: cellular and molecular changes. *Bioscience* 1983; 33:624-638.
- Torres AI, Aoki A. Release of big and small molecular forms of prolactin: dependence upon dynamic state of the lactotroph. *J Endocrinol* 1987; 114(2):213-220.
- van Nesselrooij JH, Kuper CF, Bosland MC. Correlations between presence of spontaneous lesions of the pituitary (adenohypophysis) and plasma prolactin concentration in aged Wistar rats. *Vet Pathol* 1992; 29(4):288-300.
- van Putten LJ, Kiliaan AJ. Immuno-electron-microscopic study of the prolactin cells in the pituitary gland of male Wistar rats during aging. *Cell Tissue Res* 1988; 251(2):353-358.
- van Putten LJ, van Zwieten MJ, Mattheij JA, van Kemenade JA. Studies on prolactin-secreting cells in aging rats of different strains. I. Alterations in pituitary histology and serum prolactin levels as related to aging. *Mech Ageing Dev* 1988; 42(1):75-90.
- Villar-Cheda B, Domínguez-Meijide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-García JL. Ageing-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* 2014; 35(7):1726-38.
- Voogt JL, Arbogast LA, Quadri SK, Andrews G. Tyrosine hydroxylase messenger RNA in the hypothalamus, substantia nigra and adrenal medulla of old female rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 8(1):55-62.
- Walford RL. Immunologic theory of ageing: current status. *Fed Proc* 1974; 3:2020-27.

Voogt JL, Arbogast LA, Quadri SK, Andrews G. Tyrosine hydroxylase messenger RNA in the hypothalamus, substantia nigra and adrenal medulla of old female rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 8(1):55-62.

Walford RL. Immunologic theory of ageing: current status. *Fed Proc* 1974; 3:2020-27.

Wallace DC. Diseases of mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:1175-1212.

Weiner RI, Ganong WF. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev* 1978; 58(4):905-976.

Wallace DC. Diseases of mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:1175-1212.

Weiner RI, Ganong WF. Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol Rev* 1978; 58(4):905-976.

CAPÍTULO 7

Envejecimiento de la población somatotropa

La edad determina un descenso en la secreción de neurotransmisores y un desbalance en la síntesis hipotalámica de la hormona liberadora de GH (GHRH) e inhibidora de GH (somatostatina, GIH). La GH es clave en el crecimiento postnatal y en el control del metabolismo corporal. La disminución de los niveles de dopamina y noradrenalina causó una reducción de la secreción pulsátil de GH en ratas machos viejas (Sonntag y col., 1983), con un incremento en la secreción de GIH a nivel de la eminencia media (Sonntag y col., 1985 y 1988). En agregado, las pituitarias de ratas envejecidas fueron más sensibles a los efectos inhibitorios de la GIH (Spik y Sonntag, 1989). Morimoto y col. (1988) comunicaron que la síntesis/liberación de GHRH en neuronas disminuye en ratas envejecidas y Müller y col. (1993) detectaron cambios en las neuronas catecolaminérgicas/acetilcolinérgicas que determinaron una relación alterada entre GHRH y GIH en ratas viejas. Finalmente, la respuesta reducida de la GH a la GHRH detectada con la edad en mamíferos fue atribuida en

CHAPTER 7

The ageing of somatotrope population

Age determined a decrease in neurotransmitters release and an unbalanced hypothalamic synthesis of the growth hormone-releasing hormone (GHRH) and the GH inhibiting hormone (somatostatin, GIH). GH is a key hormone in postnatal growth and in the control of body metabolism. The diminished levels of dopamine and noradrenalin led to a reduced GH pulsatile secretion in aged male rats (Sonntag et al., 1983), with increased GIH secretion at the level of the median eminence of old rats (Sonntag et al., 1985 and 1988). In addition to this, old rat pituitaries were found to be more sensitive to the GIH inhibiting effects (Spik and Sonntag, 1989). Morimoto et al. (1988) reported that GHRH synthesis/release in neurons diminishes in aged rats and Müller et al. (1993) detected changes in the catecholaminergic/acetylcholinergic neurons that determined an altered relationship between GHRH and GIH in aged rats. Finally, GH reduced response to GHRH detected in aged mammals was partly

parte a una lesión intrínseca en las células somatotropas, con un posible control colinérgico hipotalámico como factor determinante (De Gennaro Colonna y col., 1989).

Numerosos factores biológicos y ambientales impactan en la duración de la vida. La GH y el factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) han estado a la vanguardia para investigar el proceso de envejecimiento mediante ingeniería genética. El envejecimiento estaría regulado por genes que codifican proteínas a partir del eje somatotropo (GH/IGF-I). Cuando hay baja en la regulación del eje se enlentece el envejecimiento y cuando se administra GH sintética se podrían restaurar algunos rasgos fenotípicos relacionados con la juventud (Holzenberger, 2004a). La inactivación de IGF-I puede ampliar la duración de la vida y el aumento de la esperanza de vida en ratones mutantes podría basarse en la resistencia al estrés oxidativo (Holzenberger, 2004b). Los efectos moduladores de la genética se demostraron al detectar la prolongación de la vida en ratones enanos Snell y knockout. Xu y col. (2014) clarificaron el efecto de la mutación genética del receptor de IGF-I (RIGF-I) en la longevidad de diferentes cepas de ratones. La inactivación del RIGF-I extendió la vida útil de los ratones hembras, pero no queda claro si esta mutación produce efectos similares en otros contextos genéticos. En ratones con envejecimiento prematuro, por alteraciones en la transcripción génica que regula el eje somatotropo, se hallaron altos niveles de GH y drástica reducción del IGF-I. El tratamiento con IGF-I recombinante fue restaurador y esto podría aplicarse en los síndromes progeroides humanos asociados a alteraciones de la envoltura nuclear (Mariño y col., 2010). Se han comunicado cambios histopatológicos en las hipófisis de ancianos con aumento de fibrosis y descenso de la población somatotropa, asociado a un aumento de las células S100+ (Ishikawa y col., 2005).

La hipofunción del eje GH/IGF-I en el envejecimiento lleva a la **somatopausia** con implicancias clínicas, ya que representaría una esperanza de vida prolongada que sustenta la intervención de las drogas anti-envejecimiento (Giordano y col., 2005; Junnila y col., 2013). Los altos niveles séricos de GH en animales longevos se asociaron con mayor tamaño cor-

atribuido a una lesión intrínseca en somatotropes, con posible hipotalámico colinérgico control como factor determinante (De Gennaro Colonna et al., 1989).

Numerous biological and environmental factors have an impact on lifetime. GH and the insulin-like growth factor I (IGF-I) have been at the vanguard in order to investigate the ageing process using genetic engineering. Ageing would be regulated by genes that encode proteins from the somatotrope axis (GH/IGF-I). When there is a downregulation of the somatotrope axis ageing also becomes slower and when synthetic GH is administered some phenotypic features related to youth might be restored (Holzenberger, 2004a). Inactivation of IGF-I may extend lifetime. The increase of lifespan in mutant mice might be based on the resistance to oxidative stress (Holzenberger, 2004b). The modulating effects of genetics were demonstrated when detecting lifespan prolongation in Snell and knockout dwarf mice. Xu et al. (2014) clarified the effect of IGF-I receptor (IGF-IR) genetic mutation on the longevity of different mouse lineages. Inactivation of IGF-IR extended female mice life span but it remains uncertain whether this mutation produces similar effects in other genetic contexts.

Alterations that regulate the somatotrope axis high GH levels and drastic reduction of IGF-I were found in mice with premature ageing due to gene transcription. The treatment with recombinant IGF-I was repairing and this could be applied in progeroid syndrome in humans associated to alterations in the nuclear membrane (Mariño et al., 2010). Histopathological changes have been reported in the pituitaries of elderly subjects with increased fibrosis and decreased somatotroph population, related to a rise in the number of S100+ cells (Ishikawa et al., 2005).

The hypofunction of GH-IGF-I axis in ageing leads to **somatopause** with clinical consequences, since it would represent an extensive lifespan supporting intervention of anti-ageing drugs (Giordano et al., 2005; Junnila et al., 2013). The high GH serum levels in long-lived animals determined larger body size, premature puberty,

poral, pubertad precoz, senescencia reproductiva y alta incidencia de neoplasias (Brown-Borg, 2007 y 2009). Los ancianos muestran somatopausia con descenso de la GHRH en hombres de mediana edad y la respuesta plasmática de la GH fue significativamente más baja (30, 60 y 90 min). Esto permitió ratificar que las somatotropas se volvieron menos sensibles a la GHRH durante el envejecimiento. Se abriría la posibilidad de un uso terapéutico de la GHRH en lugar de GH recombinante humana, si bien debería tenerse en cuenta la acción de estas moléculas sobre la tumorigénesis y la promoción del crecimiento tumoral (Iovino y col., 2011).

El tamaño corporal reducido y la menor fertilidad pueden ser vistos en ratones con deficiencia de GH o GH-resistentes. Además, se detectó que los ratones mutantes en un gen de GH retrasan el envejecimiento (Bartke y col., 2013; 2016). La GH indujo acciones metabólicas periféricas directas y mediadas por IGF-I. Se ha demostrado que la GH intrapituitaria actúa como un interruptor de la apoptosis en la senescencia mediada por p53, pero ejercería en las células no pituitarias una acción anti-apoptótica (Chesnokova y col., 2013). El eje GH-IGF-I ha sido reconocido como fundamental para el estudio de la longevidad. Los ratones GH transgénicos presentaron vida corta, mientras que la falta de GH o IGF-I amplió la longevidad. Los estudios de proteómica en plasma indicaron la sobreexpresión crónica de GH o su falta completa. Dicho enfoque en cepas transgénicas y ratones knockout abre nuevas líneas de investigación en el envejecimiento (Ding y col., 2013). Los miméticos de la GH, en especial la grelina, constituyen un tratamiento potencial para la prevención del deterioro músculo-esquelético con la edad, pero se requieren más investigaciones para su aplicación (Nass, 2013). La somatopausia con descenso de GH/IGF-I estuvo asociada a la pérdida de la vitalidad, descenso de la masa muscular, mayor fragilidad ósea, adiposidad central, complicaciones cardiovasculares y deterioro de la función mental. El agonista GHRH restauró la pulsatilidad y amplitud de los pulsos de la GH, redujo la grasa visceral y mejoró la función cognitiva (Sattler, 2013). En la somatopausia, el IGF-I bioactivo tiende a disminuir menos que el IGF-I total, por lo que no sería un mejor biomarcador de envejecimiento que el IGF-I total (Vestergaard y col., 2013).

reproductive senescence and high incidence of neoplasias (Brown-Borg, 2007 and 2009). Elderly individuals evidence somatopause and GHRH has been proved to be reduced in middle-aged men and GH plasmatic response being significantly lower (30, 60 and 90 min). This allowed confirming that somatotropes became less sensitive to GHRH during ageing. It is likely that a therapeutic use of GHRH may replace that of human recombinant GH, though the effect of these molecules on tumorigenesis and fostering of tumour growth should not be disregarded (Iovino et al., 2011).

Reduced body size and lower fertility can be seen in GH-deficient or GH-resistant mice. Also, mutant mice have been reported to possess a GH gene that delays ageing (Bartke et al., 2013; 2016). GH induced peripheral metabolic actions, either direct or via IGF-I. Intrapituitary GH has been reported to act as an apoptosis switch for p53-mediated senescence, but it would exert anti-apoptotic properties in nonpituitary cells (Chesnokova et al., 2013). The GH/IGF-I axis has been considered essential for studying longevity. GH transgenic mice evidenced short life, while the lack of GH or IGF-I extended longevity. Studies on proteomic in plasma showed chronic GH overexpression or total lack of it implying insulin sensitivity, lipid metabolism, swelling and ageing. The proteomic approach on transgenic lineages and knockout mice open new lines of research on ageing (Ding et al., 2013). GH mimetics, especially ghrelin, constitute a potential treatment to prevent musculoskeletal deterioration in ageing, but further research is required for its application (Nass, 2013). Age-dependant decrease of GH and IGF-I factor (somatopause) are associated to loss of vitality, decrease of muscular mass, more bone fragility, central adiposity, cardiovascular complications and mental function decay. GHRH agonist restored GH pulsatility and amplitude, reduced visceral fat and improved the cognitive function (Sattler, 2013). In somatopause, bioactive IGF-I tends to diminish less than total IGF-I, so it would not be a better ageing biomarker than total IGF-I (Vestergaard et al., 2013).

Se han comunicado estudios inmunohistoquímicos cuantitativos a nivel de la pituitaria anterior en ratas viejas (Spik y Sonntag, 1989), pero ningún intento ha sido hecho para cuantificar los cambios progresivos que ocurren en las somatotropas de ratas hembras y machos a lo largo de todo el proceso de envejecimiento, en especial en estadios avanzados de senescencia. En nuestro estudio, las somatotropas exhibieron un patrón citoplasmático bien definido y una distribución homogénea en todas las secciones de la *pars distalis*.

La población somatotropa mostró variaciones asociadas a la edad y al sexo. Se halló un descenso en el número de somatotropas en animales viejos y seniles en relación a los jóvenes, pero esta disminución fue más marcada en hembras respecto a machos (**fig. 7.1**) (Cónsole y col., 1993).

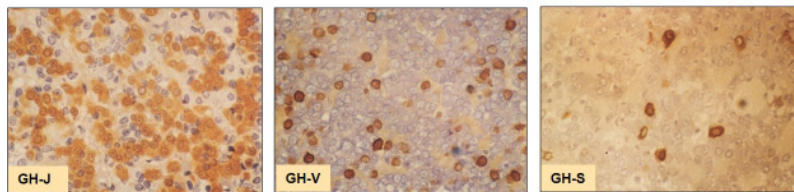


Fig. 7.1. Población somatotropa. Ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) machos. (EnVision peroxidasa, anti-GH, x 400).

El análisis de los parámetros morfométricos reveló cambios en las células somatotropas en animales de ambos sexos. La densidad de volumen (DV) y la densidad de células (DC) disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) en los animales viejos y seniles comparados con los jóvenes. Los valores de área (A) y perímetro (P) se incrementaron en machos y hembras seniles. Además, cuando el efecto del envejecimiento fue comparado entre sexos, hubo un evidente dimorfismo en la población somatotropa. Los parámetros DV y DC dentro de cada grupo etáreo fue menor en hembras respecto a machos. Los valores de A y P para animales seniles fueron mayores en hembras respecto a machos (**fig. 7.2**) (Cónsole y col., 1993).

Although the quantitative immunohistochemical studies have been reported at the level of the anterior pituitary in old rats (Spik and Sonntag, 1989), no attempt has been made in order to assess the progressive changes that occur in the somatotropes of female and male rats throughout the whole process of ageing or in advanced stages of senescence.

In our study, the somatotropes exhibited a well defined cytoplasmic pattern and a homogeneous distribution in all the sections of the *pars distalis*. The somatotrope population evidenced variations associated to age and sex. In both sexes a decreased number of somatotropes was found in old and senescent animals compared to young ones, but this decline appeared more marked in females than in males (**fig. 7.1**) (Cónsole et al., 1993).

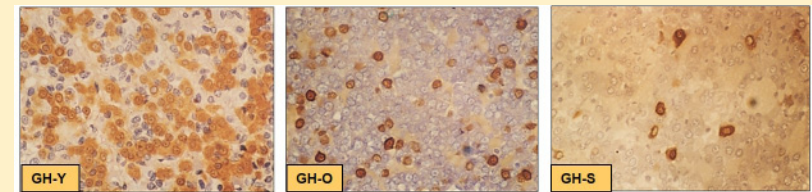


Fig. 7.1. Somatotrope population. Young (Y), old (O) and senescent (S) male rats (EnVision peroxidase, anti-GH, x 400).

The analysis of the morphometric parameters revealed changes in the somatotropes of animals of both sexes (Cónsole et al., 1993). Volume density (VD) and cell density (CD) diminished significantly ($p < 0.01$) in old and senescent compared to young animals. Area (A) and perimeter (P) values increased in senescent male and female rats. Besides, when the effect of ageing was compared between sexes, an evident dimorphism in the somatotroph population was seen. The parameters for DV and DC within each age group were lower in females with respect to males. Values A and P for senescent animals were higher in females and not in males (**fig. 7.2**).

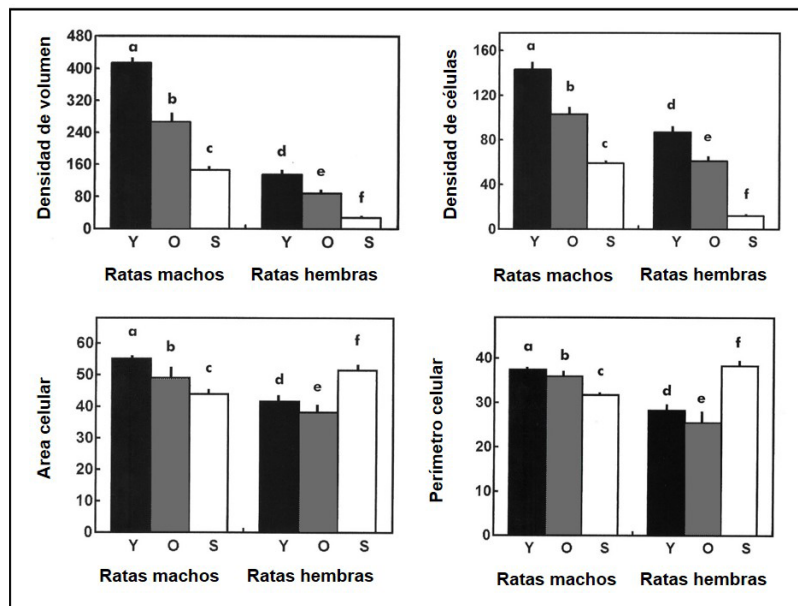


Fig. 7.2. Densidad de volumen ($DV \times 10^{-3}$); densidad de células ($DC \times 10^{-4}$); área celular (μm^2) y perímetro celular (μm) de las somatotropas en ratas hembras y machos envejecidas. J: jóvenes, V: viejas y S: seniles. DV y DC: valores *p* intragrupos: (a vs b; b vs c; d vs e; e vs f) o intergrupos (a vs d; b vs e; c vs f): *p* < 0.01 (Cónsole y col., 1993).

Nuestros resultados morfométricos han revelado una clara línea de corte de la DV y DC de las somatotropas de ratas viejas y seniles de ambos sexos cuando se comparó con los datos obtenidos en animales jóvenes. Además, entre estos parámetros, los valores medidos en hembras fueron menores a los vistos en machos en iguales grupos etáreos, hallazgo que constituyó un bien definido dimorfismo sexual. Los valores de área (A) y perímetro (P) celulares fueron observados descendidos de modo no significativo en animales machos seniles, mientras que estos valores fueron mayores en hembras, indicando una hipertrofia como probable compensación al pronunciado descenso observado en el número de somatotropas. Los diferentes parámetros descritos en nuestro estudio no han sido previamente investigados en animales seniles, sólo

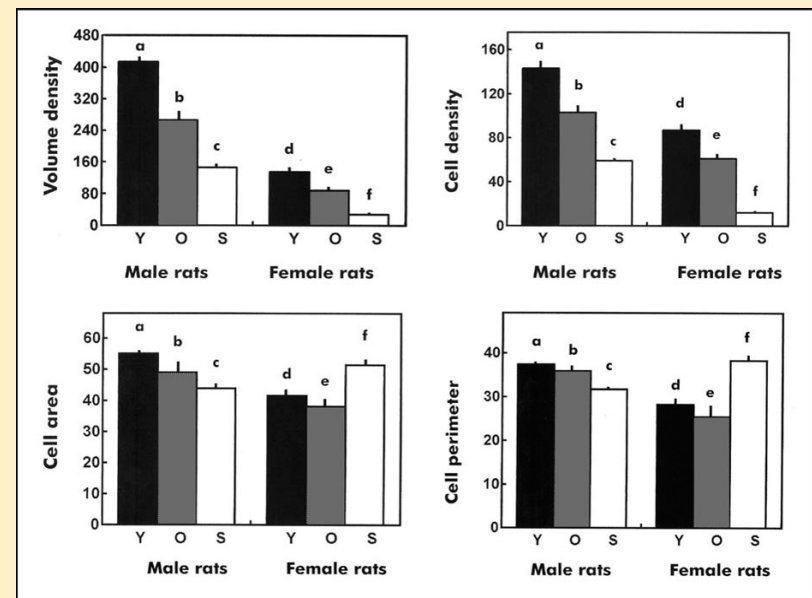


Fig. 7.2. Volume density ($VD \times 10^{-3}$); cell density ($CD \times 10^{-4}$); cell area (μm^2) and cell perimeter (μm) of somatotropes in male and female aging rats. Y: young, O: old and S: senescent. VD and CD: *p* intragroups: (a vs. b; b vs. c; d vs. e; e vs. f) or intergroups (a vs. d; b vs. e; c vs. f): *p* < 0.01 (Cónsole et al., 1993).

Our morphometric results have revealed a clear cutting line of VD and CD of somatotropes from old and senescent rats of both sexes when compared with the data obtained from young animals. Moreover, among these parameters, the values measured in females were lower than those appreciated in males of the same age groups, finding that showed a well defined sexual dimorphism. Area (A) and perimeter (P) cell values were not observed to be significantly decreased in senescent male animals, whereas these values were found to be higher in females, evidencing hypertrophy as probable compensation for the marked decline in the number of somatotropes.

The different parameters described have been already investigated only in young and old rats, but not in senescent animals (Rossi

en ratas jóvenes y viejas (Rossi y col., 1991; Takahashi, 1991 y 1992). El número de somatotropas inmunomarcadas y su DV han estado reducidos en las ratas de 12 y 18 meses (Takahashi y col., 1990; Takahashi, 1992). Este descenso apareció más marcado en machos respecto a hembras, en desacuerdo con nuestros hallazgos. En humanos, el envejecimiento mostró mayores valores en el tamaño celular y en el porcentaje de somatotropas, con diferencias según sexo que dieron datos más altos en hombres respecto a mujeres (Sun y col., 1984).

Kurosumi y col. (1986) describieron tres tipos de somatotropas en rata: **I, II y III**. Los Tipos II y III, intermedios e inmaduros respectivamente, estuvieron gradualmente aumentados con la edad (Takahashi, 1991 y 1992). Nuestros resultados revelaron sólo somatotropas de Tipo I y II, siendo las últimas las predominantes en las ratas seniles. Es posible que una reducida estimulación de la GHRH cause con la edad un descenso de las somatotropas Tipo I y que este efecto sea más pronunciado en hembras respecto a machos. Las variaciones en los porcentajes relativos con la edad entre estos subtipos de somatotropas fueron distintos en ratas machos respecto a hembras (Takahashi, 1992).

Nuestro análisis ultraestructural revela dos tipos de somatotropas (Jurado y col., 1998). En los animales jóvenes de ambos sexos, se observan células ovoideas con núcleos excéntricos. Los gránulos secretorios son numerosos y muy densos (rango: 100-400 nm) y están distribuidos por todo el citoplasma. Las exocitosis no son hallazgos comunes. Se ve un complejo de Golgi yuxtannuclear expandido y el RER está formado por sacos aplanados paralelos. Se observan mitocondrias ovales, lisosomas ocasionales y abundantes ribosomas libres.

La somatotropa tipo I muestra grandes gránulos secretorios de 250-400 nm (**fig. 7.3**). La somatotropa tipo II (**fig. 7.4**) presenta gránulos de menor tamaño (100-150 nm). El Tipo I prevaleció en las ratas machos jóvenes, mientras el Tipo II predominó en animales seniles de ambos sexos.

et al., 1991; Takahashi, 1991 and 1992). The number of immunostained somatotropes and their VD were reduced in 12 and 18 month-old rats (Takahashi et al., 1990; Takahashi, 1992). This decrease appeared more marked in males compared to females, in disagreement with our findings. In humans, ageing evidenced higher cell size values and somatotrope percentage, with sex-dependant differences that showed higher data for men when compared to women (Sun et al., 1984).

Kurosumi et al., (1986) described three types of somatotropes in the rat: **I, II and III**. Types II and III, intermediate and immature respectively, gradually increased with age (Takahashi, 1991 and 1992). Our results revealed only Type I and II somatotropes, the latter being predominant in senescent rats. It is possible that a reduced stimulation of GHRH dependent on age may cause a decrease of Type I somatotropes and that this effect may be more marked in females than in males. Kurosumi et al., (1986) classified rat somatotropes into three subtypes according to the degree of maturation. The variations in the percentages related to age among these subtypes of somatotropes apparently differed in male and female rats (Takahashi, 1992).

Our ultrastructural analysis revealed two types of somatotropes (Jurado et al., 1998). In young animals of both sexes ovoid cells and eccentric nuclei are observed. Secretory granules appear abundant and very dense with a 100-to-400 nm range and are spread throughout the whole cytoplasm. Exocytosis is no common finding. A developed Golgi complex occupy a clear juxtannuclear zone and RER is composed of parallel flattened long sacs and oval shaped mitochondria. Occasional lysosomes and abundant free ribosomes are observed. Type I somatotropes evidence large secretory granules of 250-400 nm in size (**fig. 7.3**), whereas Type II present smaller granules (100-150 nm) (**fig. 7.4**). Type I prevailed in young male rats, while Type II predominated in senescent animals of both sexes.

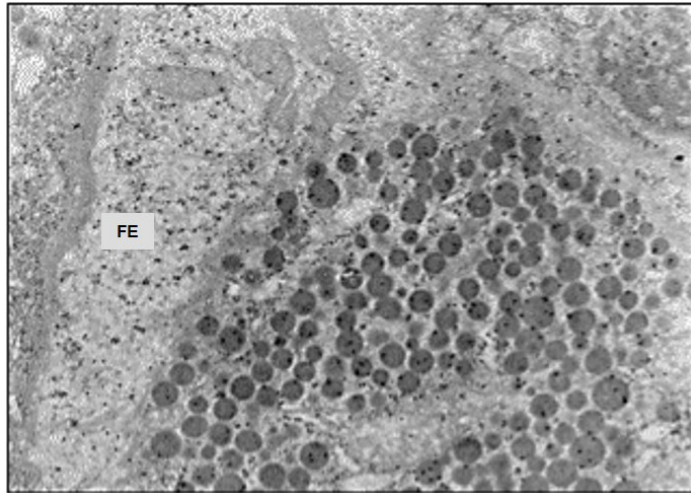


Fig. 7.3. Somatotropa Tipo I de rata macho joven. Gránulos secretorios grandes con partículas de oro (x 20.000).

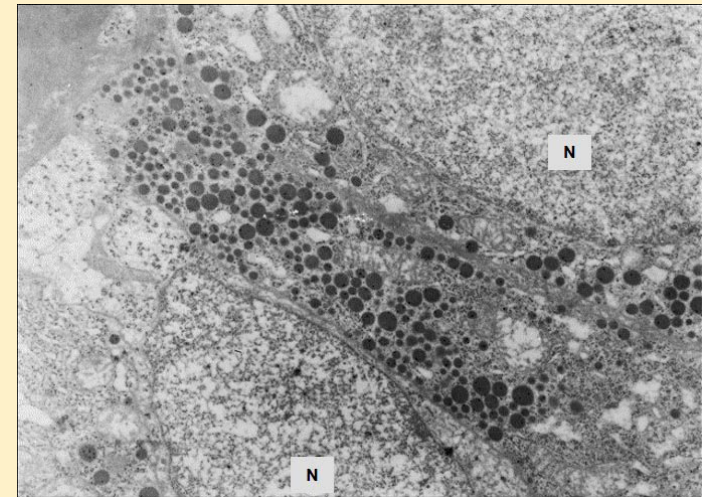


Fig. 7.3. Type I somatotrope from young male rat. Large secretory granules can be seen with gold particles (x 20.000).

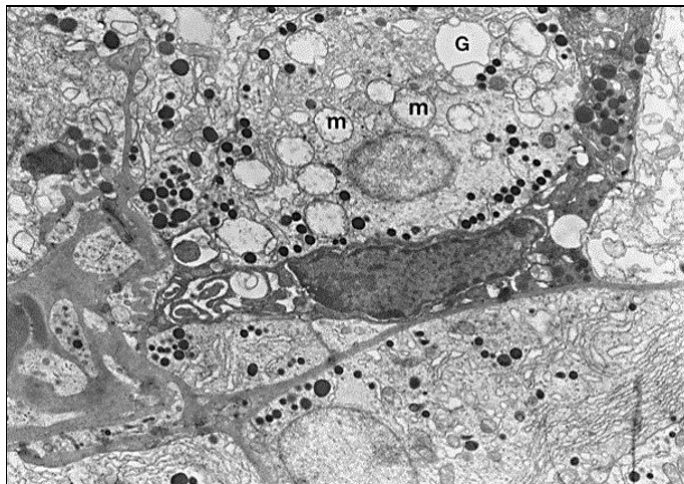


Fig. 7.4. Somatotropa Tipo II de rata macho joven. Gránulos secretorios grandes y pequeños. Núcleos (N) (x 24.000).

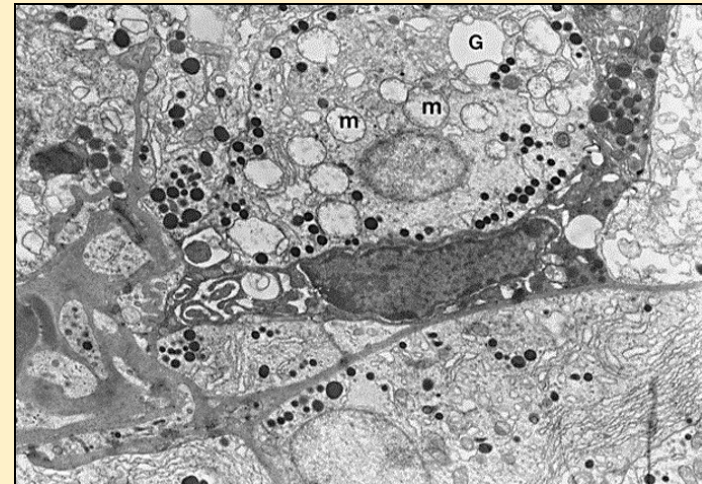


Fig. 7.4. Type II somatotrope from young male rat. Large and small secretory granules can be seen. Nuclei (N) (x 24.000).

En las ratas viejas, se observan cambios distintivos en un buen número de somatotropas (figs. 7.5-7.6). El complejo de Golgi aparece ampliamente extendido, con cisternas dilatadas y gránulos inmaduros de variable intensidad,

In old rats, distinctive changes can be found in a large number of somatotropes (figs. 7.5-7.6). The Golgi complex appears widely extended, with dilated cisternae and immature granules of varied

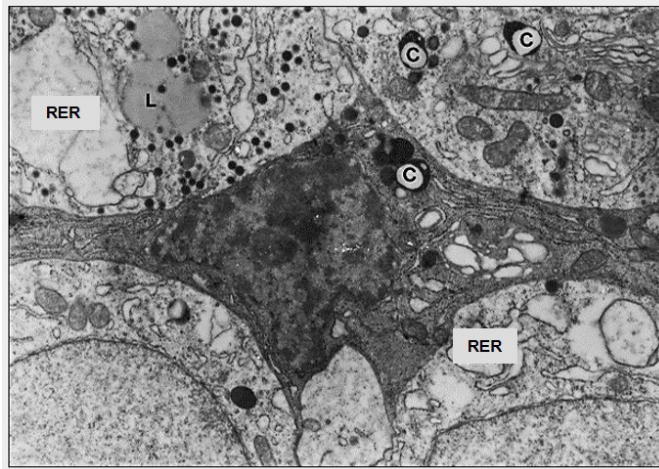


Fig. 7.5. Somatotropa de rata macho vieja. Mitochondrias (m) tumefactas, Golgi (G) dilatado, escasos gránulos secretorios y una célula involutiva oscura (x 10.000).

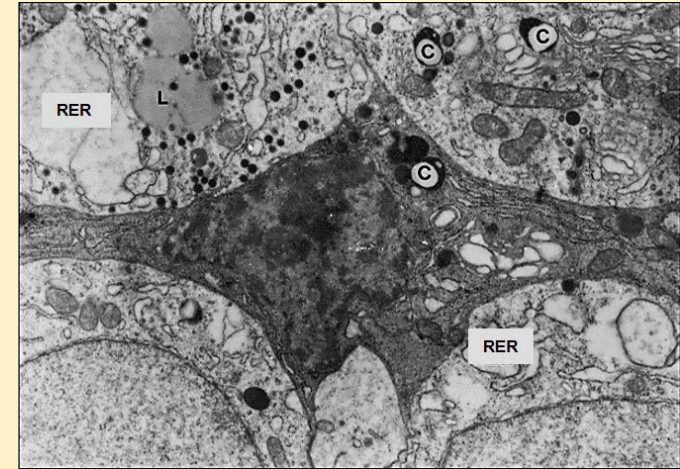


Fig. 7.5. Somatotrope from old male rat. Swollen mitochondria (m), dilated Golgi (G), scarce secretory granules and a dark involutive cell (x 10.000).

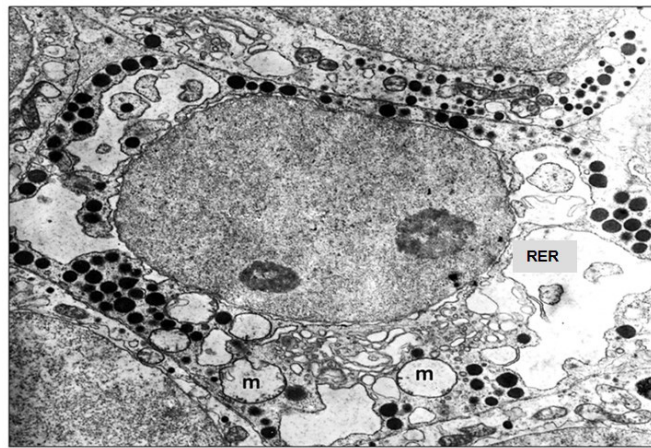


Fig. 7.6. Somatotropa de rata hembra vieja. Célula involutiva oscura, con RER dilatado y crinofagia (C) (x 16.000).

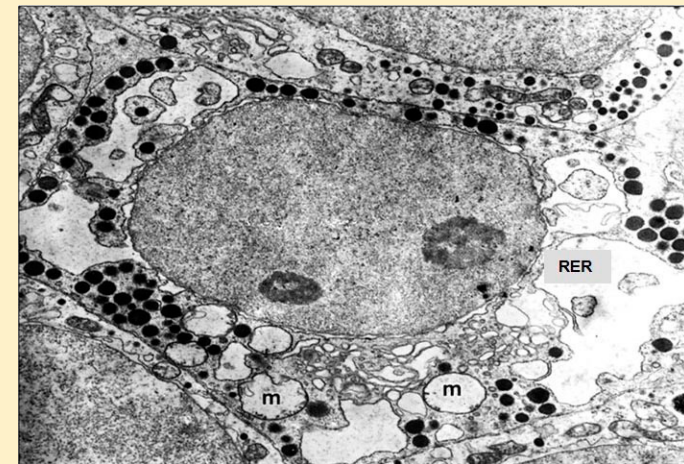


Fig. 7.6. Somatotrope from old male rat. A dark involutive cell can be seen. Dilated RER and crinophagy (C) (x 16.000).

así como gotas con lípidos y el RER muestra cisternas muy dilatadas con un material visible en su interior. Los gránulos secretorios son menos numerosos y se localizan cerca de la membrana plasmática. Algunas células somatotropas desarrollan procesos involutivos que consisten en células oscuras con

intensity, as well as drops with lipids. RER display highly dilated cisternae containing visible material in their interior. Secretory granules are less numerous and localize near the plasmatic membrane. Some somatotropes develop involution processes consisting

núcleos electrodensos e imágenes de crinofagia que representa una autofagia de los gránulos de secreción por actividad lisosómica (Jurado y col. 1998).

Los cambios ultraestructurales descritos en la población somatotropa de ratas seniles (**figs. 7.7-7.8**) aumentaron en frecuencia e intensidad con la edad. Las más marcadas características son: 1. Complejo de

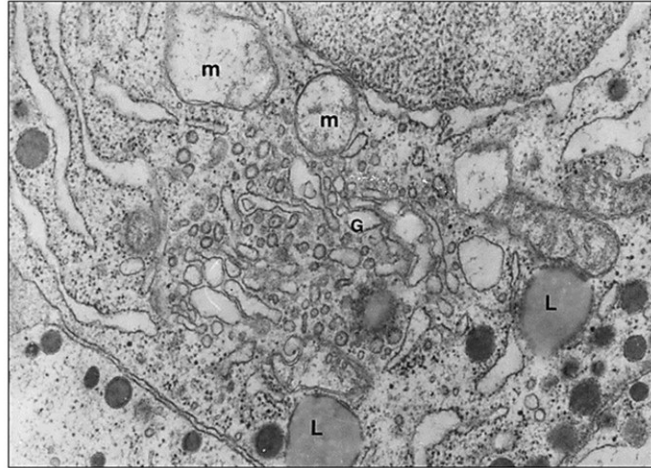


Fig. 7.7. Somatotropa de rata hembra senil. Mitochondrias tumefactas (m), RER dilatado y escasos gránulos secretorios (x 19.000).

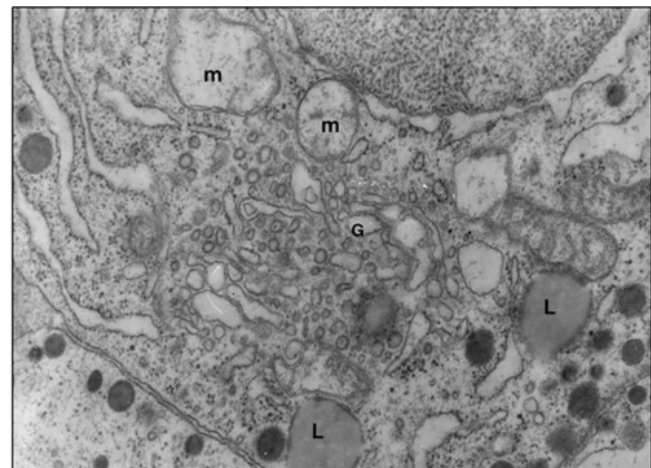


Fig. 7.8. Somatotropa de rata hembra senil. Lisosomas (L), Golgi (G) y mitochondrias (m) (x 40.000).

of dark cells with electrodense nuclei and crinophagy images (Jurado et al. 1998).

The ultrastructural changes described in the somatotrope population of senescent rats (**figs. 7.7-7.8**) increased their frequency and intensity with age. The most marked characteristics are: 1. Golgi

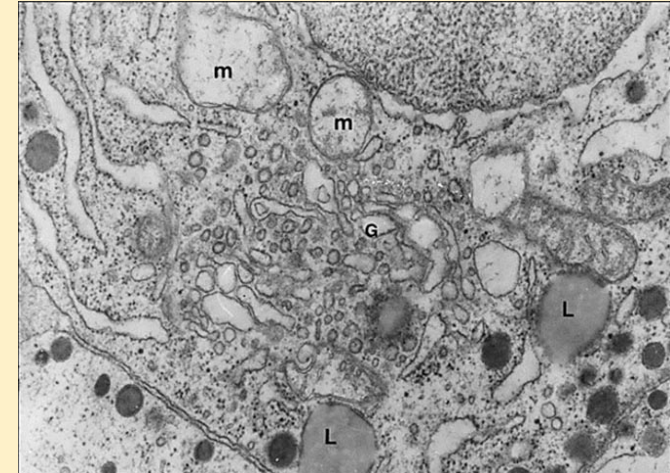


Fig. 7.7. Somatotrope from a senescent female rat. Swollen mitochondria (m), dilated RER, scarce secretory granules (x 19.000).

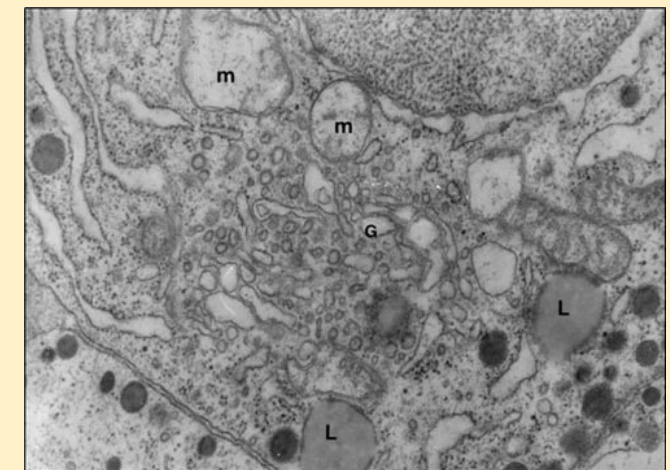


Fig. 7.8. Somatotrope of female senescent rat. Lysosomes (L), Golgi (G) and mitochondria (m) (x 40.000).

Golgi con cisternas dilatadas y aumento de los gránulos inmaduros. 2. RER expandido y dilatado. 3. Tumefacción mitocondrial. 4. Aumento de la actividad lisosómica con crinofagia. 5. Células involutivas oscuras (Jurado y col., 1998).

Respecto a nuestros datos séricos, las hembras seniles registraron una reducción en la frecuencia y amplitud de los pulsos de la GH, con un descenso de los niveles basales ($p < 0.01$) (ng/ml) (Goya y col., 1990; Cónsole y col., 1993). Estos datos se correlacionaron con lo documentado por Sonntag y col. (1980 y 1988). La secreción promedio de GH en 24 hs es aproximadamente un tercio en viejos respecto a jóvenes (Sonntag y col., 1980; Takahashi y col., 1987). Los datos de perfusión hipofisaria mostraron una menor liberación de GH en ratas seniles hembras respecto a jóvenes (Brown y col., 1999). La secreción pulsátil de GH, los valores promedio de GH liberada en 24 hs y la respuesta de la GH a la administración de GHRH en animales de edad avanzada y en humanos son más bajos que en los adultos jóvenes (Müller y col., 1993).

Un desbalance hormonal, caracterizado por un descenso de GHRH y un incremento en GIH, se presentó en ratas envejecidas de ambos sexos (Rossi y col., 1991; Sonntag y Gough, 1988; Sun y col., 1984). En agregado, la respuesta reducida a la GHRH con respecto a la cantidad de GH que ha sido observada en ratas viejas probablemente resulta de un limitado contenido de GH pituitaria y de una secreción disminuida de tal hormona (Ceda y col., 1986; Sonntag y col., 1983). El contenido hipotalámico de GHRH y su expresión génica han sido comunicados reducidos en ratas envejecidas (De Gennaro Colonna y col., 1989). Este neuropéptido, el principal mitógeno de las somatotropas (Billestrup y col., 1986), sería un potencial regulador del tamaño de la población somatotropa durante el envejecimiento. Además, los cambios en la respuesta pituitaria al receptor también contribuyeron al descenso de la sensibilidad a la GHRH con la edad (Spik y Sonntag, 1989). Dobado-Berrios y col. (1996) demostraron que el contenido reducido de la GH

complex with dilated cisterna and increased immature granules. 2. Expanded and dilated RER. 3. Swollen mitochondria. 4. Increase of the lysosomal activity with crinophagy. 5. Dark involution cells (Jurado et al., 1998).

In relation to our serum data, senescent females recorded reduced frequency and amplitude of GH pulse, with decreased basal levels ($p < 0.01$) (ng/ml) (Goya et al., 1990; Cónsole et al., 1993). These data agree with what was reported by Sonntag et al. (1980 and 1988). The average secretion of GH in 24 h is approximately one third in old compared to young animals (Sonntag et al., 1980; Takahashi et al., 1987). The data on pituitary perfusion evidenced a lower release of GH in female senescent rats with respect to young rats (Brown et al., 1999). GH pulsatile secretion, the average values of GH released in 24 h and GH response to GHRH administration are greater in young adults compared to aged mammals (Müller et al., 1993).

A hormonal imbalance characterized by a decrease in GHRH and an increase in GIH was present in aged rats of both sexes (Rossi et al., 1991; Sonntag and Gough, 1988; Sun et al., 1984). In addition to this, the reduced response to GH-RH with respect to the quantity of GH observed in old rats is probably the result of a limited content of pituitary GH and of diminished secretion of such hormone (Ceda et al., 1986; Sonntag et al., 1983). Dobado-Berrios et al. (1996) demonstrated that the reduced GH content in the pituitaries of aged male rats is due to the low density somatotropes predominance, to a decreased capacity of GH synthesis and to a chronic inhibition in GH release.

We conclude that the ageing process in rats produced a well defined impact on the pituitary morphology of somatotropes, with marked decrease of number of somatotropes in senescent and old animals and ultrastructural changes suggesting compensatory hyperstimulation that appeared more marked in senescence.

pituitaria en ratas machos envejecidas se debe al predominio de somatotropas de baja densidad, a un descenso en la capacidad de síntesis de GH y a una inhibición crónica en la liberación de GH.

Concluimos que el proceso de envejecimiento en ratas produjo cambios sobre la morfología de la población somatotropa adenohipofisaria, con marcado descenso del número de somatotropas en los animales viejos y seniles y cambios ultraestructurales sugerentes de un patrón secretorio de hiperestimulación compensatoria en la senescencia.

Referencias

- Bartke A, List EO, Kopchick JJ. The somatotrophic axis and aging: Benefits of endocrine defects. *Growth Horm IGF Res* 2016; 27:41-45.
- Bartke A, Sun LY, Longo V. Somatotrophic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity. *Physiol Rev* 2013; 93(2):571-598.
- Billestrup N, Swanson LW, Vale W. Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(18):6854-57.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. 1999. Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* 1999; 69(1):20-27.
- Brown-Borg HM. Hormonal control of aging in rodents: the somatotrophic axis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 299(1):64-71.
- Brown-Borg HM. Hormonal regulation of longevity in mammals. *Ageing Res Rev* 2007; 6(1):28-45.
- Ceda GP, Valenti G, Butturini V, Hoffman AR. Diminished pituitary responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 1986; 118(5):2109-14.
- Chesnokova V, Zhou C, Ben-Shlomo A, Zonis S, Tani Y, Ren SG, Melmed S. Growth hormone is a cellular senescence target in

References

- Bartke A, List EO, Kopchick JJ. The somatotrophic axis and aging: Benefits of endocrine defects. *Growth Horm IGF Res* 2016; 27:41-45.
- Bartke A, Sun LY, Longo V. Somatotrophic signalling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity. *Physiol Rev* 2013; 93(2):571-598.
- Billestrup N, Swanson LW, Vale W. Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(18):6854-57.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. 1999. Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* 1999; 69(1):20-27.
- Brown-Borg HM. Hormonal control of aging in rodents: the somatotrophic axis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 299(1):64-71.
- Brown-Borg HM. Hormonal regulation of longevity in mammals. *Ageing Res Rev* 2007; 6(1):28-45.
- Ceda GP, Valenti G, Butturini V, Hoffman AR. Diminished pituitary responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 1986; 118(5):2109-14.
- Chesnokova V, Zhou C, Ben-Shlomo A, Zonis S, Tani Y, Ren SG, Melmed S. Growth hormone is a cellular senescence target in pituitary and nonpituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(35): E3331-39.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.
- De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati LF, Müller EE. Reduced growth hormone releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 1989; 10(3):705-708.

- pituitary and nonpituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(35): E3331-39.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.
- De Gennaro Colonna V, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati LF, Müller EE. Reduced growth hormone releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 1989; 10(3):705-708.
- Ding J, Sackmann-Sala L, Kopchick JJ. Mouse models of growth hormone action and aging: a proteomic perspective. *Proteomics* 2013; 13(3-4):674-685.
- Dobado-Berrios PM, Ruiz-Navarro A, Alamdén Y, Malagón MM, Garrido JC, Ramírez-Gutiérrez JL, García-Navarro F. Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: ultrastructure and GH gene expression in somatotrope subpopulations. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 118(1-2):181-191.
- Giordano R, Lanfranco F, Bo M, Pellegrino M, Picu A, Baldi M, Balbo M, Bonelli L, Grottoli S, Ghigo E, Arvat E. Somatopause reflects age-related changes in the neural control GH/IGF-I axis. *J Endocrinol Invest* 2005; 28 (Suppl 3):94-98.
- Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Sosa YE, Meites J. Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in aging rats. *Neurobiol Aging* 1990; 11(6):625-630.
- Holzenberger M. The GH/IGF-I axis and longevity. *Eur J Endocrinol* 2004a; 151(Suppl 1): S23-27.
- Holzenberger M. The role of insulin-like signaling in the regulation of ageing. *Horm Res* 2004b; 62(Suppl 1):89-92.
- Iovino M, Triggiani V, Giagulli VA, Iovine N, Licchelli B, Resta F, Sabba C, Tafaro E, Solimando A, Tommasicchio A, Guastamacchia E. Difference in growth hormone response to growth-releasing hormone (GHRH) testing following GHRH subacute treatment in normal aging and growth hormone-deficient adults: possible perspectives
- Ding J, Sackmann-Sala L, Kopchick JJ. Mouse models of growth hormone action and aging: a proteomic perspective. *Proteomics* 2013; 13(3-4):674-685.
- Dobado-Berrios PM, Ruiz-Navarro A, Alamdén Y, Malagón MM, Garrido JC, Ramírez-Gutiérrez JL, García-Navarro F. Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: ultrastructure and GH gene expression in somatotrope subpopulations. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 118(1-2):181-191.
- Giordano R, Lanfranco F, Bo M, Pellegrino M, Picu A, Baldi M, Balbo M, Bonelli L, Grottoli S, Ghigo E, Arvat E. Somatopause reflects age-related changes in the neural control GH/IGF-I axis. *J Endocrinol Invest* 2005; 28 (Suppl 3):94-98.
- Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Sosa YE, Meites J. Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in aging rats. *Neurobiol Aging* 1990; 11(6):625-630.
- Holzenberger M. The GH/IGF-I axis and longevity. *Eur J Endocrinol* 2004a; 151(Suppl 1): S23-27.
- Holzenberger M. The role of insulin-like signalling in the regulation of ageing. *Horm Res* 2004b; 62(Suppl 1):89-92.
- Iovino M, Triggiani V, Giagulli VA, Iovine N, Licchelli B, Resta F, Sabba C, Tafaro E, Solimando A, Tommasicchio A, Guastamacchia E. Difference in growth hormone response to growth-releasing hormone (GHRH) testing following GHRH subacute treatment in normal aging and growth hormone-deficient adults: possible perspectives for therapeutic use of GHRH or its analogs in elderly subjects? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011; 33(2):334-337.
- Ishikawa T, Zhu BL, Miyaishi S, Ishizu H, Maeda H. Histopathological changes of the hypophysis in malnutrition in elderly subjects. *Hum Cell* 2005; 18(3):157-162.
- Junnila RK, Lista EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(6):366-376.

for therapeutic use of GHRH or its analogs in elderly subjects? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011; 33(2):334-337.

Ishikawa T, Zhu BL, Miyaishi S, Ishizu H, Maeda H. Histopathological changes of the hypophysis in malnutrition in elderly subjects. *Hum Cell* 2005; 18(3):157-162.

Junnila RK, Lista EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(6):366-376.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci* 1998; 60(6):705-711.

Kurosumi K, Koyama T, Tosaka, H. Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 1986; 49(2):227-242.

Mariño G, Ugalde AP, Fernández AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JM, López-Otín C. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(37):16238-73.

Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chihara K, Hasegawa M, Iбата Y. Age-related changes in growth hormone releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1988; 47(5):459-464.

Müller EE, Cella SG, De Gennaro Colonna V, Parenti M, Cocchi D, Locatelli V. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 46:99-114.

Nass R. Growth hormone axis and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013; 42(2):187-199.

Parenti M, Cocchi D, Ceresoli G, Marcozzi C, Müller EE. Age-related changes of growth hormone secretory mechanisms in the rat pituitary gland. *J Endocrinol* 1991; 131(2):251-257.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci* 1998; 60(6):705-711.

Kurosumi K, Koyama T, Tosaka, H. Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-antibody method. *Arch Histol Jpn* 1986; 49(2):227-242.

Mariño G, Ugalde AP, Fernández AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JM, López-Otín C. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(37):16238-73.

Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chihara K, Hasegawa M, Iбата Y. Age-related changes in growth hormone releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1988; 47(5):459-464.

Müller EE, Cella SG, De Gennaro Colonna V, Parenti M, Cocchi D, Locatelli V. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 46:99-114.

Nass R. Growth hormone axis and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013; 42(2):187-199.

Parenti M, Cocchi D, Ceresoli G, Marcozzi C, Müller EE. Age-related changes of growth hormone secretory mechanisms in the rat pituitary gland. *J Endocrinol* 1991; 131(2):251-257.

Rossi GL, Bestetti GE, Glabiati E, Muller EE, Cocchi D. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes. *J Gerontol* 1991; 46(4): B152-158.

Sasaki F, Iwama Y. Sex difference in prolactin and growth hormone cells in mouse adenohypophysis: stereological, morphometric, and immuno-histochemical studies by light and electron microscopy. *Endocrinology* 1988; 123(2):905-912.

Sattler FR. Growth hormone in the aging male. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(4): 541-555.

Sun YK, Xi YP, Fenoglio CM, Pushparaj N, O'Toole KM, Kledizik GS, Nette GD, King DW. The effect of age on the number of pituitary cells immunoreactive to growth hormone and prolactin. *Hum Pathol* 1984; 15(2):169-180.

Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N. Age-related changes in growth hormone and prolactin messenger RNA levels in the rat. *Endocrinol Jpn* 1990; 37(6):827-840.

Takahashi S. Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology* 1987; 46(2):137-142.

Takahashi S. Heterogeneity and development of somatotrophs and mammotrophs in the rat. *Zool Sci* 1992; 9:901-924.

Takahashi S. Immunocytochemical and immunoelectron microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cell Tissue Res* 1991; 266(2):275-284.

Vestergaard PF, Hansen M, Frystyk J, Espelund U, Christiansen JS, Jorgensen JO, Fisker S. Serum levels of bioactive IGF1 and physiological markers of ageing in healthy adults. *Eur J Endocrinol* 2013; 170(2):229-236.

Xu J, Gontier T, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R (+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell* 2014; 13(1):19-28.

Takahashi S. Immunocytochemical and immunoelectron microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cell Tissue Res* 1991; 266(2):275-284.

Vestergaard PF, Hansen M, Frystyk J, Espelund U, Christiansen JS, Jorgensen JO, Fisker S. Serum levels of bioactive IGF1 and physiological markers of ageing in healthy adults. *Eur J Endocrinol* 2013; 170(2):229-236.

Xu J, Gontier T, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R (+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell* 2014; 13(1):19-28.

CAPÍTULO 8

Envejecimiento de la población gonadotropa

A nivel hipotalámico, numerosos autores han detectado una disfunción durante el proceso de envejecimiento (Clemens y col., 1969; Aschheim, 1976; Meites y col., 1980 y 1982; Peng, 1983b; Harman y Talbert, 1985; Meites y col., 1986), con una declinación en la secreción de las hormonas hipofisotróficas hipotalámicas (HHH) y de los neurotransmisores (noradrenalina y dopamina) (Simpkins y col., 1977).

La neuroendocrinología del envejecimiento modifica el eje hipotálamo-pituitario-órgano blanco (gónadas, hígado, músculo, grasa y cerebro) en las dos vías: somatotropa y gonadal (Veldhuis, 2008). La secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) disminuyó durante el envejecimiento (Jarjour y col., 1986; Gruenewald y col., 2000). La noradrenalina indujo la secreción de GnRH con estimulación pituitaria (Sarkar y col., 1979) y controló la función reproductiva en los mamíferos (Thiery y Martin, 1991). El descenso de la dopamina y noradrenalina hipotalámicas fueron particularmente importantes ya que influenciaron al eje gonado-

CHAPTER 8

The ageing of gonadotrope population

At the hypothalamic level, numerous authors have detected a dysfunction during the ageing process (Clemens et al., 1969; Aschheim, 1976; Meites et al., 1980 and 1982; Peng, 1983b; Harman and Talbert, 1985), with a decline in hypothalamic hypophysiotropic hormones (HHH) and neurotransmitters (noradrenalin and dopamine) secretion (Simpkins et al., 1977).

Neuroendocrinology of ageing would modify the hypothalamo-pituitary-target organ (gonads, liver, muscle, fat and brain) axis in both pathways: somatotrope and gonadal (Veldhuis, 2008). The secretion of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) diminished during ageing (Jarjour et al., 1986; Gruenewald et al., 2000). Noradrenalin induced GnRH secretion with pituitary stimulation (Sarkar et al., 1979) and controlled the reproductive function in mammals (Thiery and Martin, 1991). The decrease of hypothalamic dopamine and adrenalin were particularly important since they influenced the gonadotrope

tropo provocando la declinación de la función reproductiva. El aumento de la relación entre serotonina y noradrenalina contribuyó a crear fallas en la liberación cíclica de la GnRH durante el envejecimiento (Walker, 1980). Esto llevó a la finalización del ciclo estral en ratas hembras y a un descenso en la secreción de testosterona en ratas machos (Simpkins, 1983; Meites, 1991). Un estudio ultraestructural en las neuronas de la GnRH en ratas envejecidas mostró un descenso en la fracción de volumen del RER y del Golgi, sugerentes de una menor actividad neuronal (Romero y col., 1994).

A nivel pituitario, se ha descrito una hiposensibilidad a la GnRH y una menor síntesis de las hormonas luteinizante (LH) y foliculo-estimulante (FSH) (Huang y col., 1976) con un menor número de gonadotropas (Meites, 1991). El descenso de la población gonadotropa fue demostrado en ratas envejecidas machos y hembras (Huang y col., 1978; Cónsole y col., 1994 y 1997). La reducción de la expresión génica en la pituitaria anterior contribuyó a la senescencia reproductiva en las ratas hembras (Zheng y col., 2007).

En estudios séricos, el envejecimiento estuvo relacionado con una disminución en la amplitud de los pulsos de LH y FSH, en ratas de ambos sexos y un aumento de la respuesta de la LH a la retroalimentación ejercida por los gonadoesteroides (Lu, 1979 y 1983; Steiner y col., 1984; Deslypere y col., 1987). Peng y col. (1983a) hallaron en ratas machos seniles: **1.** Deficiencias en la regulación de la LH en respuesta a la eliminación de los esteroides gonadales. **2.** La capacidad de depuración de LH y FSH circulantes no es diferente en viejos respecto a jóvenes si los tamaños moleculares son similares. **3.** El nivel sérico elevado de FSH en ratas machos envejecidas no se debe a una vida media prolongada.

A nivel gonadal, el envejecimiento determinó una hiposensibilidad de los receptores a las gonadotropinas que provocó hipotrofia progresiva asociada a aterosclerosis y fibrosis (Canivenc y col., 1979). Se demostró que el trasplante hipofisario de ratas viejas a jóvenes hipofisectomizadas no logró ordenar los ciclos, por lo que la pituitaria no sería responsable del envejecimiento (Peng, 1983b) y tampoco las gónadas, ya que el trasplante ovárico de ratas viejas a jóvenes ovariectomizadas no logró restablecer el reciclado (Ascheim, 1976; Peng, 1983a). La falla en

axis leading to the decline of the reproductive function. The increased relationship between serotonin and noradrenalin contributed to the production of failures in the cyclic release of GnRH during ageing (Walker, 1980). This led to the end of the estrous cycle in female rats and a decrease of testosterone secretion in males (Simpkins, 1983; Meites, 1991). An ultrastructural study of (GnRH) neurons in aged rats evidenced a decrease in the volume fraction in RER and Golgi suggestive of a lower neuronal activity (Romero et al., 1994).

At the pituitary level, hyposensitivity to GnRH has been described as well as a minor synthesis of the luteinizing and folliculo-stimulating (FSH) hormones (Huang et al., 1976) with a smaller number of gonadotropes (Meites, 1991). The decrease of gonadotrope population was evidenced in male and female aged rats (Huang et al., 1978; Cónsole et al., 1994 and 1997). The reduction of the gene expression in the anterior pituitary contributed to the reproductive senescence in female rats (Zheng et al., 2007).

Serum studies revealed that ageing was associated to a decrease of the amplitude of LH and FSH pulses in rats of both sexes and an increase in LH response to gonadal steroids feedback (Lu, 1979 and 1983; Steiner et al., 1984; Deslypere et al., 1987). Peng et al. (1983a) found the following in senescent male rats: **1.** Deficiencies in LH regulation in response to gonadal steroids elimination. **2.** The purification capacity in circulating LH and FSH is not different in old compared to young animals if molecular weight is similar in both and **3.** Elevated serum level of FSH in aged male rats is not due to a prolonged half life.

At gonadal level, ageing determined hyposensitivity of receptors to gonadotropins that caused progressive hypotrophy related to atherosclerosis and fibrosis (Canivenc et al., 1979). The pituitary transplant from old to hypophysectomized young rats was proved to fail in arranging the cycles, for what neither the pituitary nor the gonads would be responsible for ageing (Peng, 1983b), since the transplant of ovaries from old rats to young ovariectomized ones did not ma-

la síntesis de progesterona es uno de los cambios endocrinos más tempranos del envejecimiento ovárico y se relaciona con el incremento de los ciclos anovulatorios y el descenso del número de cuerpos lúteos. Una constelación de eventos en el eje hipotálamo-pituitario-ovárico lleva a una inexorable declinación de la ciclicidad y anuncia la **menopausia** (Wise y col., 1989; 1994 y 1997; Wise, 1993). En machos, la edad produce descenso del peso testicular, del número de células de Leydig (Neaves y col., 1984) y de la cantidad de testosterona bioactiva (Nankin, 1986).

La **teoría del ciclo reproductivo celular** postula que las hormonas regulan la reproducción para controlar el envejecimiento a través de la señalización del ciclo celular con: **1.** Regulación simultánea de la tasa de envejecimiento y de reproducción. **2.** Ajuste de la tasa de crecimiento-desarrollo y del tamaño final del animal. **3.** Aparente paradoja: el tamaño es directamente proporcional a la vida útil e inversamente proporcional a la fertilidad. **4.** Las diferentes tasas de reproducción se asocian con diferencias en la vida media. **5.** Desarrollo de las enfermedades del envejecimiento. **6.** La evolución promueve el crecimiento-desarrollo en la vida temprana y el vano intento de mantener la reproducción con la edad. En esencia, el ciclo reproductivo celular se puede explicar en todas las formas reproductivas (Atwood y Bowen, 2011).

En síntesis, durante el envejecimiento en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal hay: **a.** Menor respuesta hipotalámica con descenso de las HHH y de los neurotransmisores debido a degeneración neuronal. **b.** Hiposensibilidad hipofisaria a las HHH. **c.** Baja en los niveles séricos de LH, FSH, estrógenos, progesterona y testosterona bioactivos y menor amplitud de los pulsos de LH-FSH. **d.** Cambios en el número y afinidad de los receptores hormonales gonadales.

Nuestros estudios inmunohistoquímicos (Cónsole y col., 1994 y 1997) detectaron una población gonadotropa que representó un 10% de la población total, distribuida de en toda la *pars distalis*, pero con preferencia por la zona ventral periférica.

La inmunomarcación evidenció un patrón citoplasmático granular, con cierto grado de vacuolización citoplasmática. Las gonadotropas

nage to restore recycling (Ascheim, 1976; Peng, 1983a). The failure of progesterone synthesis is one of the earliest endocrine changes of ovary ageing and is related to the increased anovulant cycles and the decreased number of corpus luteum. A constellation of hypothalamo-pituitary-ovarian events leads to the inexorable decline of cyclicity and announces menopause (Wise et al., 1989; 1994 and 1997; Wise, 1993). In males, age produced a decreased testicular weight, number of Leydig cells (Neaves et al., 1984) and quantity of bioactive testosterone (Nankin, 1986).

The **theory of the cell reproductive cycle** proposes that hormones regulate the production to control ageing by means of the cell cycle signaling. The theory would explain the following: **1.** Simultaneous regulation of ageing and reproduction rate. **2.** Growth-development rate and the final size of the animal. **3.** The apparent paradox is that the size is directly proportional to useful life and indirectly proportional to fertility. **4.** The different fertility rates related to differences in half-life. **5.** The development of ageing diseases. **6.** The purpose of an evolution fostering growth-development in early life and the pointless attempt of maintaining reproduction during ageing. Essentially, the cell reproductive cycle can be explained in all forms of cell reproduction (Atwood and Bowen, 2011).

In summary, during ageing in the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis there is: **a.** Lower hypothalamic response with HHH and neurotransmitters decrease as a result of neuronal degeneration. **b.** Pituitary hyposensitivity to HHH. **c.** Lowered serum levels of bioactive LH, FSH, estrogen, progesterone and testosterone and smaller amplitude of LH-FSH pulses and **d.** Changes in the number and affinity of the gonadal hormone receptors.

Our immunohistochemical studies (Cónsole et al., 1994, 1997) detected a gonadotrope population that represented a 10% of the whole population with preference for peripheral ventral zone of the *pars distalis*. Immunolabeling evidenced a granular cytoplasmic pattern, with some degree of vacuolization. Luteinizing and folliculotrope cells

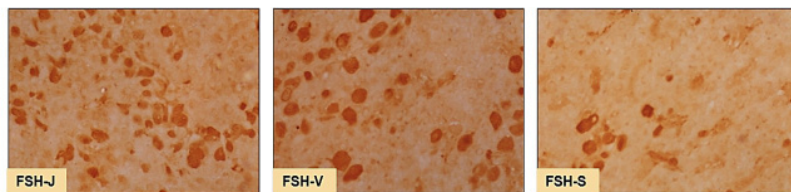


Fig. 8.1. Población luteinizante. Ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) machos (EnVision peroxidasa, anti-LH, x 400).

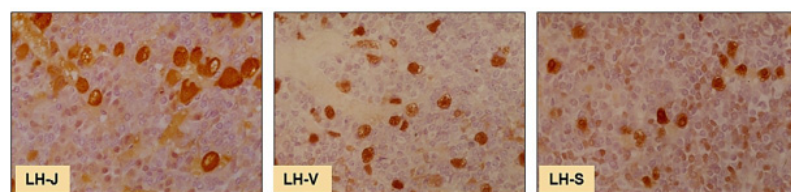


Fig. 8.2. Población folículo­tropa. Ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) machos (EnVision peroxidasa, anti-FSH, x 400).

mostraron una progresiva declinación en las ratas viejas y seniles de ambos sexos respecto a los animales jóvenes (**figs. 8.1 - 8.2**).

En acuerdo con nuestros resultados, Goldman y col. (1988) observaron una declinación de las células inmunorreactivas LH y FSH en la región medio-ventral de las pituitarias de ratas envejecidas de ambos sexos.

El estudio morfométrico de la población folículo­tropa y luteinizante registró una reducción ($p < 0.01$) en la densidad de células (DC) y en la densidad de volumen (DV) en ratas viejas y seniles, comparadas con sus contrapartes jóvenes de ambos sexos (Cónsole y col., 1997) (**tablas 1 y 2**).

Tabla 1. Morfometría de la población folículo­tropa

	Jóvenes (n = 10)	Viejos (n = 9)	Seniles (n = 8)
DV ($\times 10^{-3}$)			
Machos	5 (± 1) (a)	2.6 (± 0.6) (b)	2.1 (± 0.7) (c)
Hembras	5.8 (± 1) (d)	3.0 (± 1) (e)	2.3 (± 0.9) (f)
DC ($\times 10^{-4}$)			
Machos	12 (± 2) (a)	6 (± 1) (b)	6 (± 1) (c)
Hembras	20 (± 3) (d)	10 (± 1) (e)	7 (± 1) (f)

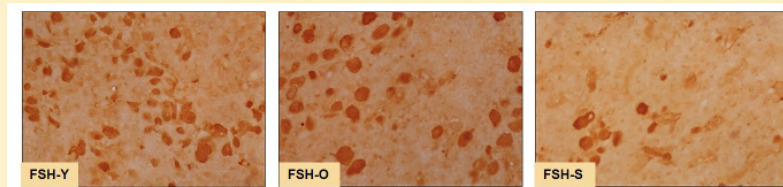


Fig. 8.1. Luteinizing population from young (Y), old (O) and senescent (S) male rats (EnVision peroxidase, anti-LH, x 400).

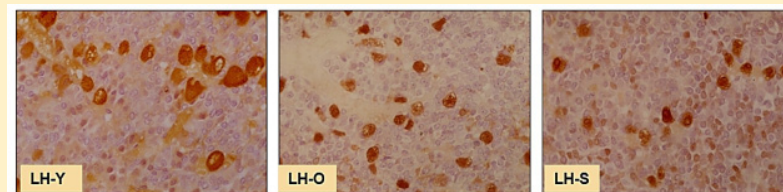


Fig. 8.2. Folliculotrope population from young (Y), old (O) and senescent (S) male rats (EnVision peroxidase, anti-FSH, x 400).

showed a progressive decline in old and senile rats of both sexes compared to young animals (**figs. 8.1-8.2**).

In accord with our results, Goldman et al. (1988) observed a decline in immunoreactive LH and FSH cells in the medioventral region of old rat pituitaries of both sexes.

The morphometric study of gonadotropes (folliculotropes and luteinizing cells) documented a reduction ($p < 0.01$) in cell density (CD) and in volume density (VD) in old and senile rats compared to their young counterparts of both sexes (Cónsole et al., 1997) (**tables 1 and 2**).

Table 1. Morphometry of folliculotrope population in ageing rats

	Young (n = 10)	Old (n = 9)	Senescent (n = 8)
DV ($\times 10^{-3}$)			
Males	5 (± 1) (a)	2.6 (± 0.6) (b)	2.1 (± 0.7) (c)
Females	5.8 (± 1) (d)	3.0 (± 1) (e)	2.3 (± 0.9) (f)
DC ($\times 10^{-4}$)			
Males	12 (± 2) (a)	6 (± 1) (b)	6 (± 1) (c)
Females	20 (± 3) (d)	10 (± 1) (e)	7 (± 1) (f)

Tabla 2. Morfometría de la población luteinizante

	Jóvenes (n = 10)	Viejos (n = 9)	Seniles (n = 8)
DV (x 10⁻³)			
Machos	15 (± 3) (a)	6 (± 0.8) (b)	5 (± 1) (c)
Hembras	10 (± 1) (d)	5 (± 0.7) (e)	3 (± 0.5) (f)
DC (x 10⁻⁴)			
Machos	26 (± 3) (a)	15 (± 1) (b)	10 (± 2) (c)
Hembras	110 (± 5) (d)	88 (± 3) (e)	89 (± 4) (f)

Valores: *p* intragrupos: *a* vs *b* and *b* vs *c*: < 0.01; *d* vs *e*: NS; *e* vs *f*: < 0.01; *p* intergrupos: *a* vs *d*: NS; *b* vs *e* and *c* vs *f*: < 0.01. Número de ratas entre paréntesis. Valores ± ES.

Los datos séricos basales de FSH (ng/ml) mostraron un incremento significativo (*p* < 0.05) desde los 4 a los 20 meses y luego permanecieron estables. Los niveles de LH sérica (ng/ml) registraron descenso en seniles respecto a jóvenes (Cónsole y col., 1994).

Desde el punto de vista ultraestructural, las gonadotropas han sido clasificadas en dos tipos: células folículo tropas (**Tipo I**) y luteinizantes (**Tipo II**). Las folículo tropas se caracterizaron por contener dos tipos de gránulos secretorios: grandes y pequeños, mientras las células luteinizantes contuvieron sólo pequeños gránulos. La co-localización simultánea para FSH y LH fue hallada en un considerable número de gonadotropas (Kurosumi, 1974; Kurosumi y col., 1991).

En nuestros estudios ultraestructurales en ratas jóvenes machos y hembras identificamos los dos tipos de gonadotropas (Tipo I y Tipo II) (Jurado, 2003). Las células Tipo I (FSH) muestran un mayor tamaño y formas variables: ovales, redondeadas o poligonales; se observan núcleos esféricos con un borde dentado y gránulos secretorios de diferentes tamaños: grandes (200-300 nm) y pequeños (150-200 nm) con electrodensidad variable.

El complejo de Golgi se ve hipertrófico con sacos dilatados y el RER está bien desarrollado mostrando cisternas redondeadas (**fig. 8.3**).

Table 2. Morphometry of luteinizing population in ageing rats

	Young (n = 10)	Old (n = 9)	Senescent (n = 8)
DV (x 10⁻³)			
Males	15 (± 3) (a)	6 (± 0.8) (b)	5 (± 1) (c)
Females	10 (± 1) (d)	5 (± 0.7) (e)	3 (± 0.5) (f)
DC (x 10⁻⁴)			
Males	26 (± 3) (a)	15 (± 1) (b)	10 (± 2) (c)
Females	110 (± 5) (d)	88 (± 3) (e)	89 (± 4) (f)

Intragroup p values: *a* vs. *b* and *b* vs. *c*: < 0.01; *d* vs. *e*: NS; *e* vs. *f*: < 0.01. *Intergroup p values:* *a* vs. *d*: NS; *b* vs. *e* and *c* vs. *f*: < 0.01. Values represent S.E.M. ± S.E.

Basal serum data of FSH (ng/ml) showed a significant increase (*p* < 0.05) from 4 to 20 months of age and then remained stable. Serum LH levels (ng/ml) were recorded to be diminished in senile with respect to young animals (Cónsole et al., 1994).

From the ultrastructural point of view, gonadotropes have been classified into two types: folliculotrope (**Type I**) and luteinizing (**Type II**) cells. Folliculotropes are characterized for containing two types of secretory granules: large (300-700 nm) and small (150-200 nm), whereas the luteinizing cells contained only small granules. The simultaneous co-localization for FSH and LH was found in a considerable number of lactotropes (Kurosumi, 1974; Kurosumi et al., 1991).

In our ultrastructural studies in male and female young rats we identified both types of gonadotropes (Type I and Type II) (Jurado, 2003). Type I cells (FSH) evidenced a larger size and variable forms (oval shaped, rounded or polygonal). Spherical nuclei with a jagged border are observed. Differently sized secretory granules are seen: large (200-300 nm) and small (150-200 nm) of variable density.

The Golgi complex appears hypertrophic with dilated sacs and the RER is developed evidencing dilated cisternae (**fig. 8.3**).

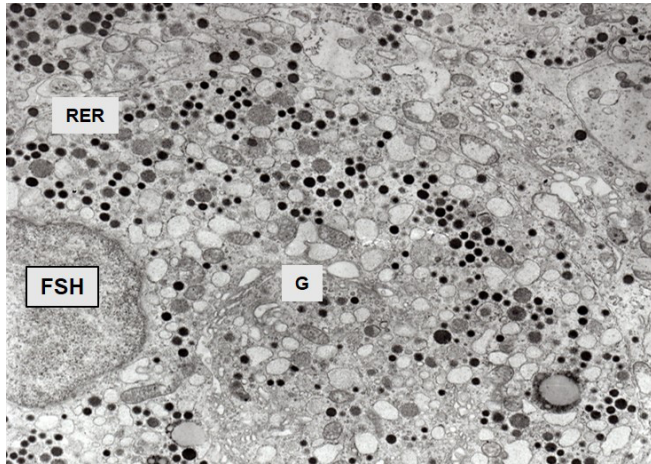


Fig. 8.3. Folliculotropa (FSH) tipo I de rata macho joven. RER y Golgi (G) (x 12.000).

Las células Tipo II (LH) son de menor tamaño y presentan sólo gránulos secretorios pequeños (100-200 nm) esparcidos por todo el citoplasma.

El RER está bien desarrollado y muestra cisternas bien delimitadas (fig. 8.4). Ambos tipos de células gonadotropas están en contacto con los capilares sanguíneos.

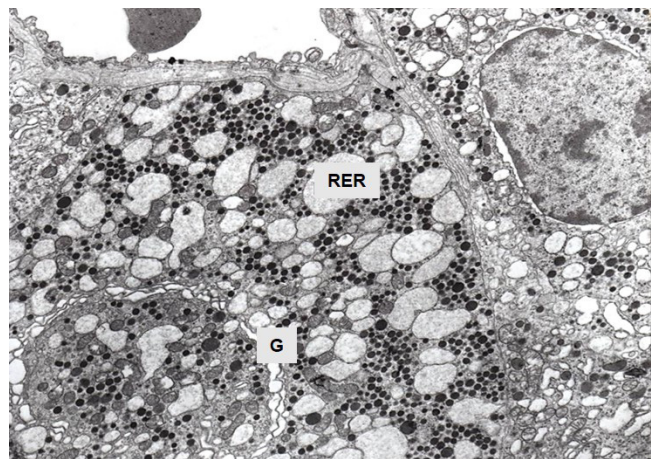


Fig. 8.4. Célula luteinizante (LH) tipo II de rata macho joven. RER y Golgi (G) (x 10.000).

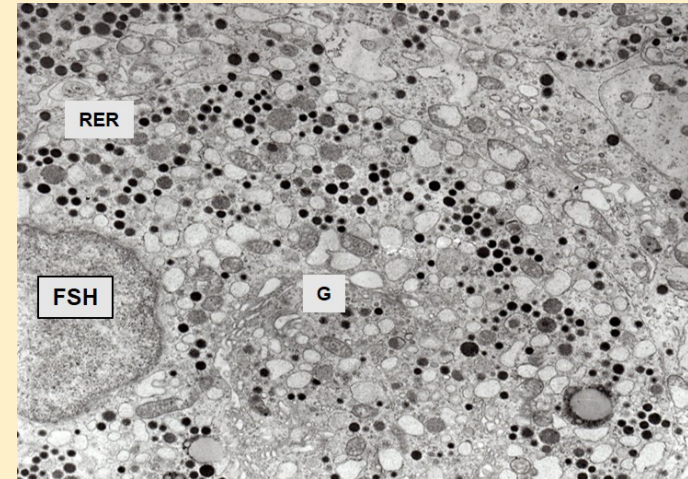


Fig. 8.3. Type I cell (FSH) from young rat. RER and Golgi (G) (x 12.000).

Type II cells (LH) are smaller. They present only small secretory granules (100-200 nm) spread throughout the whole cytoplasm. The RER, well developed, evidences dilated cisternae (fig. 8.4). Both types of gonadotropes are in contact with blood capillaries.

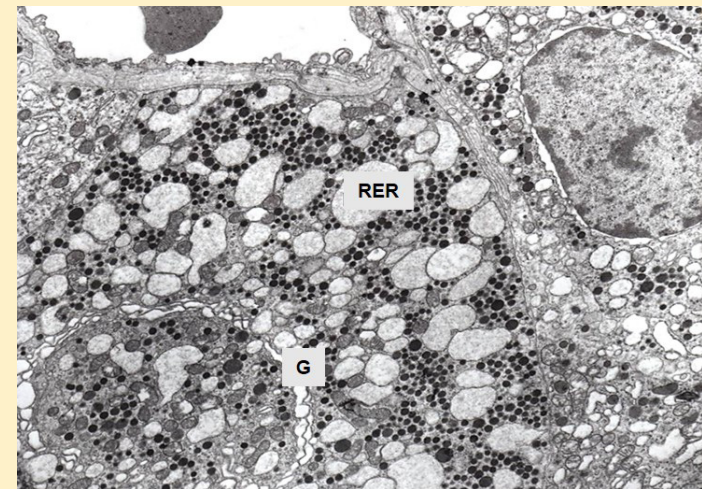


Fig. 8.4. Type II cell (LH) from young rat. RER and Golgi (G) (x 10.000).

Las gonadotropas Tipo I de ratas viejas presentan unos pocos gránulos secretorios pequeños. Se observa RER dilatado con material homogéneo de baja densidad y lisosomas con vacuolas claras (Jurado, 2003) (figs. 8.5-8.6).

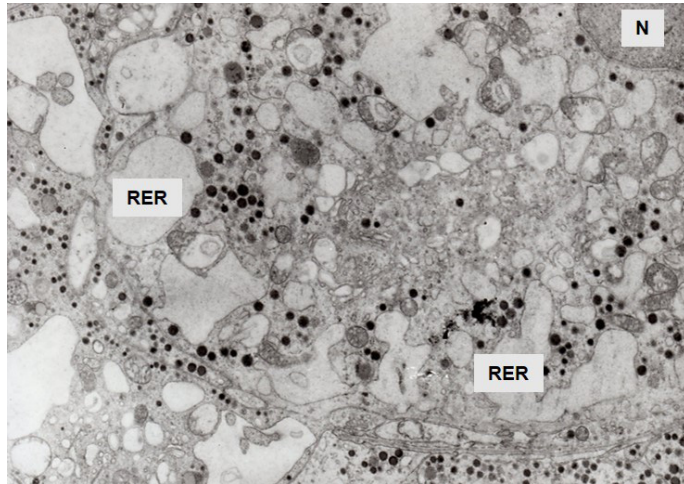


Fig. 8.5. Folículotropa (FSH) de rata macho vieja. RER dilatado y núcleo (N) (x 20.000).

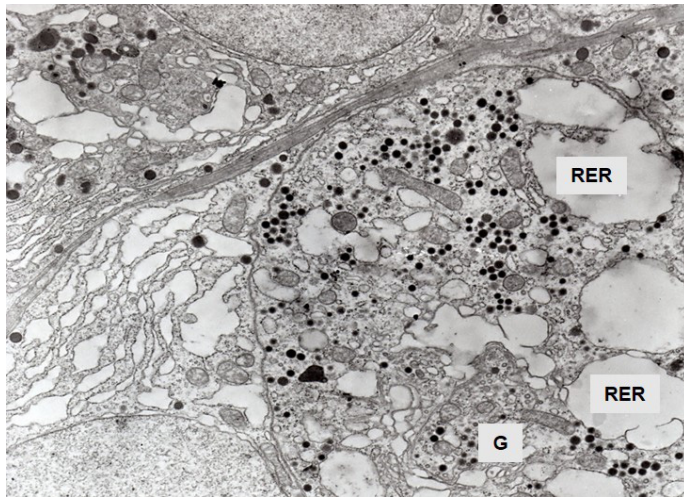


Fig. 8.6. Célula FSH de rata hembra vieja. RER muy dilatado y Golgi (G) expandido (x 12.000).

Old rat gonadotropes present significant changes. Type I cells contain only a few small secretory granules. The RER appears highly dilated and shows in the inside homogeneous material of low density. Lysosomes containing clear vacuoles similar to lipid drops are observed (Jurado, 2003) (figs. 8.5-8.6).

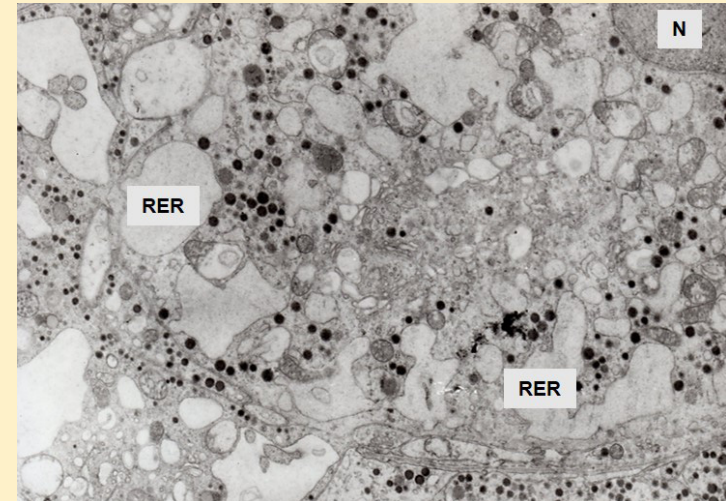


Fig. 8.5. Old rat FSH cell. Dilated RER and nucleus (N) (x 20.000).

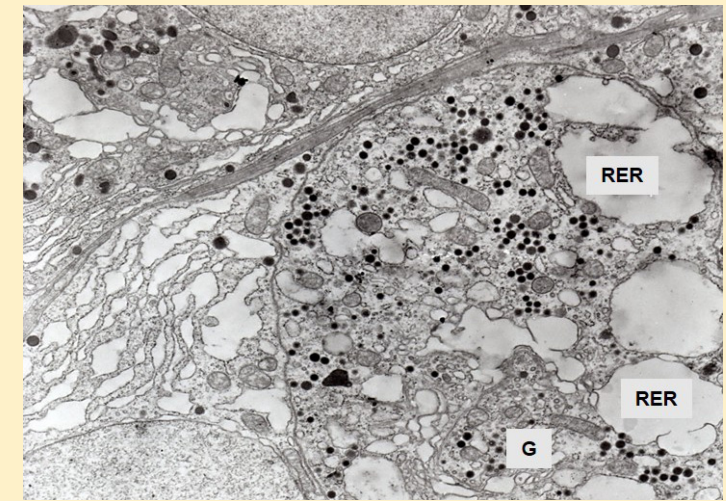


Fig. 8.6. Old rat FSH cell. Dilated RER and expanded Golgi (G) (x 12.000).

En las ratas seniles los cambios ultraestructurales aumentaron en frecuencia e intensidad (Jurado, 2003). Se observan núcleos pequeños, oscuros y excentricos. El citoplasma está vacuolado y con un aumento de lisosomas. El Golgi presenta cisternas dilatadas coalescentes a partir de vacuolas y con material homogéneo de baja densidad. El RER muestra hipertrofia y numerosos gránulos secretorios inmaduros. Hay mayor actividad lisosómica y células involutivas con organoides preservados que sugieren apoptosis (figs. 8.7-8.8).

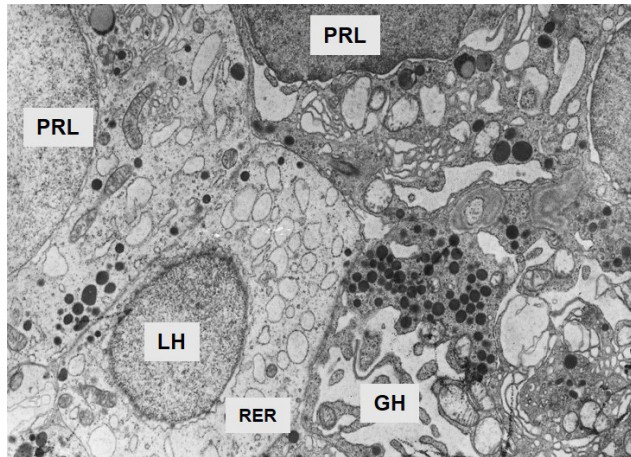


Fig. 8.7. Célula luteinizante (LH) de rata macho senil. Escasos gránulos secretorios y cisternas de RER moderadamente dilatadas (x 12.000).

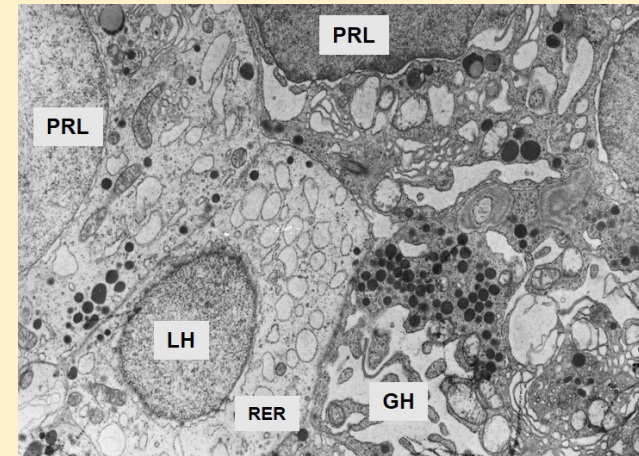


Fig. 8.7. Senescent rat LH cell. Scarce number of secretory granules and dilated cisternae of RER (x 12.000).

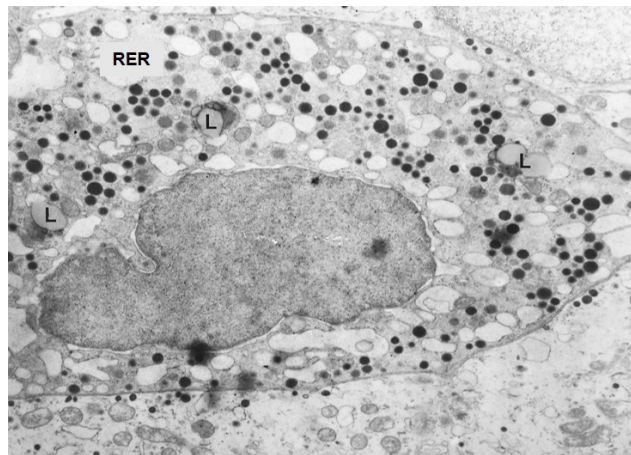


Fig. 8.8. Folículotropa (FSH) de rata hembra senil. Lisosomas (L) y RER (x 12.000).

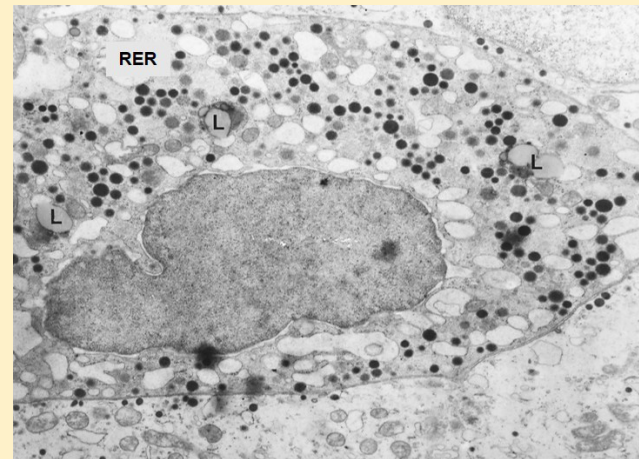


Fig. 8.8. Senescent rat FSH cell. Lysosomes (L) and RER (x 12.000).

Kurosumi y col. (1991) hallaron que las células Tipo I (FSH) eran más numerosas en ratas machos, mientras que las Tipo II (LH) predominaban en hembras y demostraron mediante radioinmunoensayo que las pituitarias de ratas machos envejecidas disminuyeron su contenido en FSH e incrementaron el contenido de LH. Además, en ratas hembras viejas el contenido pituitario de FSH no varió, mientras que aumentó el de LH. Estos hallazgos sugieren que existe una fuerte correlación entre el contenido de gonadotropinas y el número de gonadotropas de ambos tipos. También detectaron una menor cantidad de células FSH en machos envejecidos, mientras las células LH aumentaron. En hembras envejecidas la incidencia de ambos tipos no cambió.

A nivel pituitario, la glándula fue menos sensible a los estímulos de la GnRH. Sonntag y col. (1984) demostraron que la capacidad disminuida de la GnRH para inducir la secreción de LH en ratas machos viejas no fue consecuencia de la reducción del número de receptores pituitarios para GnRH, ya que este número fue similar en ratas viejas y jóvenes. La hiposensibilidad pituitaria podría explicarse en diferentes sentidos: **1.** Menor número de gonadotropas; **2.** Células luteinizantes menos sensibles a la acción de la GnRH (Krieg y col., 1995) y **3.** Alteraciones subcelulares como las descritas a nivel ultraestructural por Kurosumi y col. (1991) y el aporte de nuestras observaciones. La glándula pituitaria podría disminuir marcadamente su capacidad para secretar LH y FSH, llevando a la pérdida de los ciclos estrales en ratas hembras, así como a una declinación de la testosterona en ratas machos envejecidas (Everitt y Meites, 1989).

El envejecimiento reproductivo en machos y hembras llevó a un descenso en el rango y/o frecuencia de LH y FSH, junto con una disminución de las isoformas bioactivas (Lu, 1983; Steiner y col., 1984; Cónsole y col., 1994). La reducida liberación de LH en gonadotropas de ratas viejas podría determinar el descenso de la síntesis de LH o la

Kurosumi et al. (1991) found that Type I cells (FSH) were more numerous in male rats, while Type II cells (LH) were predominant in females. Using radioimmunoassays, they demonstrated that the pituitaries from aged old rats diminished their FSH content and increased their LH content.

Also, the pituitary content of FSH did not vary in old female rats, whereas the LH content did. These findings suggest that there is a strong correlation between the content of gonadotropins and the number of gonadotropes of both types with ageing a diminished quantity of FSH cells in males was reported, whereas LH cells were increased. In aged females both types of cells presented no changes.

At pituitary level, the gland was less sensitive to GnRH stimuli. Sonntag et al., (1984) demonstrated that the diminished capacity of GnRH to induce LH secretion in old male rats was not a consequence of the reduced number of pituitary receptors for GnRH, since this number was similar in old and young rats. Pituitary hyposensitivity might be explained in two senses: **1.** Small number of gonadotropes; **2.** Luteinizing hormones that are less hyposensitive to GnRH action (Krieg et al., 1995) and **3.** Subcellular alterations like those described at ultrastructural level by Kurosumi et al. (1991) and the contribution of our observations. The pituitary capacity to secrete LH and FSH could be markedly diminished, leading to the loss of estrous cycles in female rats as well as a decline in testosterone in aged male rats (Everitt and Meites, 1989).

Aged reproduction in males and females led to a decrease in the range and/or frequency of LH and FSH, together with a decline of the bioactive isoforms (Lu, 1983; Steiner et al., 1984; Cónsole et al., 1994). The reduced release of LH in old rat gonadotropes might determine the decrease of either LH synthesis or the number of gonadotropes during ageing (Liu et al., 1993), according to our findings.

We conclude that ageing had a clear impact on the gonadotrope population of rats, causing a significant decrease in the number of

disminución del número de gonadotropas durante el envejecimiento (Liu y col., 1993), en concordancia con nuestros hallazgos.

Concluimos que el envejecimiento tuvo un claro impacto sobre la población gonadotropa de rata, causando un significativo descenso en el número de células y provocando cambios ultraestructurales sugerentes de hiperestimulación compensatoria que estuvieron más marcados en la etapa de senescencia.

Referencias

- Aschheim P. Aging of the hypothalamic-hypophyseal ovarian axis in the rat. Hypothalamus, pituitary and aging. In: Everitt AV and Burgess JA, eds. CC Thomas, Springfield, Illinois, 1976: 376-418.
- Atwood CS, Bowen RL. The reproductive-cell cycle theory of aging: an update. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3):100-107.
- Canivenc R, Lobry JR, Scholler R. Histophysiology of the ovary at the peri and postmenopause. *Proc J Endocrinol Cl (France)* 1979:43.
- Clemens JA, Amenomori J, Jenkins T, Meites J. Effects of hypothalamic stimulation, hormones and drugs on ovarian function in old female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132(2):561-563.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.
- Cónsole GM, Jurado SB, Ferese C, Gómez Dumm CL. Quantitative immunohistochemical changes of pituitary gonadotrophs in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997; 3(1):19-26.
- Dada MO, Campbell GT, Balke CA. The localization of gonadotrophs in normal adult and female rats. *Endocrinology* 1984; 114(2):397-406.

gonadotropes and ultrastructural changes suggesting compensatory hyperstimulation that appeared more marked in senescence.

References

- Aschheim P. Aging of the hypothalamic-hypophyseal ovarian axis in the rat. Hypothalamus, pituitary and aging. In: Everitt AV and Burgess JA, eds. CC Thomas, Springfield, Illinois, 1976: 376-418.
- Atwood CS, Bowen RL. The reproductive-cell cycle theory of aging: an update. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3):100-107.
- Canivenc R, Lobry JR, Scholler R. Histophysiology of the ovary at the peri and postmenopause. *Proc J Endocrinol Cl (France)* 1979:43.
- Clemens JA, Amenomori J, Jenkins T, Meites J. Effects of hypothalamic stimulation, hormones and drugs on ovarian function in old female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132(2):561-563.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.
- Cónsole GM, Jurado SB, Ferese C, Gómez Dumm CL. Quantitative immunohistochemical changes of pituitary gonadotrophs in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997; 3(1):19-26.
- Dada MO, Campbell GT, Balke CA. The localization of gonadotrophs in normal adult and female rats. *Endocrinology* 1984; 114(2):397-406.
- Deslypere JP, Kaufman JM, Vermeulen T, Vogelaers D, Vandalem JL, Vermeulen A. Influence of age on pulsatile luteinizing hormone release and responsiveness of the gonadotrophs to sex hormone feedback in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(1):68-73.

Deslypere JP, Kaufman JM, Vermeulen T, Vogelaers D, Vandalem JL, Vermeulen A. Influence of age on pulsatile luteinizing hormone release and responsiveness of the gonadotrophs to sex hormone feedback in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(1):68-73.

Estes KS, Simpkins JW. Age-related alterations in catecholamine concentrations in discrete preoptic area and hypothalamic regions in the male rat. *Brain Res* 1989; 194(2):556-560.

Estes KS, Simpkins JW. Age-related changes in dopamine and norepinephrine activity within microdissected brain regions of ovariectomized Long Evans rats. *Brain Res* 1984; 298(2):209-218.

Everitt AV, Meites J. Aging and anti-aging effects of hormones. *J Gerontol* 1989; 44(6): B139-147.

Goldman JM, Cooper RL, Rehnberg GL, Mc Elroy WK, Hein JF, Booth KC. Age-related changes in the regional distribution of hormones in the male rat anterior pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152(3):1213-20.

Gruenewald DA, Naai MA, Marck BT, Matsumoto AM. Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to GnRH, in the male Brown Norway rat. *J Androl* 2000; 21(1):72-84.

Harman SM, Talbert GB. In *Reproductive aging. Handbook of biology aging*. In: Finch CE and Scheneider EL (eds). New York, Van Nostrand Reinhold, 1985:457-520.

Huang HH, Marshall S, Meites J. Capacity of old versus young female rats to secrete LH, FSH and prolactin. *Biol Reprod* 1976; 14(5):538-543.

Huang HH, Steger RW, Bruni JF, Meites J. Patterns of sex steroid and gonadotropin secretion in aging female rats. *Endocrinology* 1978; 103(5):1855-59.

Jarjour LT, Handelsman DJ, Swerdloff RS. Effects of aging on the in vitro release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986; 119(3):1113-17.

Estes KS, Simpkins JW. Age-related alterations in catecholamine concentrations in discrete preoptic area and hypothalamic regions in the male rat. *Brain Res* 1989; 194(2):556-560.

Estes KS, Simpkins JW. Age-related changes in dopamine and norepinephrine activity within microdissected brain regions of ovariectomized Long Evans rats. *Brain Res* 1984; 298(2):209-218.

Everitt AV, Meites J. Aging and anti-aging effects of hormones. *J Gerontol* 1989; 44(6): B139-147.

Goldman JM, Cooper RL, Rehnberg GL, Mc Elroy WK, Hein JF, Booth KC. Age-related changes in the regional distribution of hormones in the male rat anterior pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152(3):1213-20.

Gruenewald DA, Naai MA, Marck BT, Matsumoto AM. Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to GnRH, in the male Brown Norway rat. *J Androl* 2000; 21(1):72-84.

Harman SM, Talbert GB. In *Reproductive aging. Handbook of biology aging*. In: Finch CE, Scheneider EL (eds). New York, Van Nostrand Reinhold, 1985:457-520.

Huang HH, Marshall S, Meites J. Capacity of old versus young female rats to secrete LH, FSH and prolactin. *Biol Reprod* 1976; 14(5):538-543.

Huang HH, Steger RW, Bruni JF, Meites J. Patterns of sex steroid and gonadotropin secretion in aging female rats. *Endocrinology* 1978; 103(5):1855-59.

Jarjour LT, Handelsman DJ, Swerdloff RS. Effects of aging on the in vitro release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986; 119(3):1113-17.

Jurado SB. Impact of ageing on the adenohipophyseal populations in the rat. An immunocytochemical and ultrastructural study. Doctoral thesis: Directors: PhD Gómez Dumm CLA - PhD Cónsole GM, 2003.

- Jurado SB. Impacto del envejecimiento sobre las poblaciones adenohipofisarias en rata. Un estudio inmunohistoquímico y ultraestructural. Tesis doctoral. Directores: Dr. Gómez Dumm CLA - Dra. Cónsole GM, 2003.
- Krieg RJ, Brito AN, Sayles TE, Matt DW. Luteinizing hormone secretion by dispersed pituitary gland cells from middle-aged rats. *Neuroendocrinology* 1995; 61(3):318-325.
- Kurosumi K, Ozawa H, Akiyama K, Senshu T. Immunoelectron microscopic studies of gonadotrophs in the male and female rat anterior pituitaries, with special reference to their changes with aging. *Arch Histol Cytol* 1991; 54(5):559-571.
- Kurosumi K. Adenohypophysis. Atlas of electron micrographs: functional morphology of endocrine glands. In: Kurosumi K and Fujita H (eds.), Igaku-Shoin, Tokyo, 1974:1-100.
- Liu TC, Pu HF, Wang PS. Unimpaired postreceptor regulation of luteinizing hormone secretion by gonadotropin-releasing and estrogen in aged rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1993; 132(3):1189-94.
- Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS. Chronological changes in sex steroids, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 1979; 21(1):193-203.
- Lu KH. Changes in ovarian secretion and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J. ed., Plenum Press, New York, 1983:103-122.
- Meites J, Steger RW, Huang HH. Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects. *Fed Proc* 1980; 39(14):3168-72.
- Meites J. Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology* 1982; 34(2):151-156.
- Krieg RJ, Brito AN, Sayles TE, Matt DW. Luteinizing hormone secretion by dispersed pituitary gland cells from middle-aged rats. *Neuroendocrinology* 1995; 61(3):318-325.
- Kurosumi K, Ozawa H, Akiyama K, Senshu T. Immunoelectron microscopic studies of gonadotrophs in the male and female rat anterior pituitaries, with special reference to their changes with aging. *Arch Histol Cytol* 1991; 54(5):559-571.
- Kurosumi K. Adenohypophysis. Atlas of electron micrographs: functional morphology of endocrine glands. In: Kurosumi K and Fujita H (eds.), Igaku-Shoin, Tokyo, 1974:1-100.
- Liu TC, Pu HF, Wang PS. Unimpaired postreceptor regulation of luteinizing hormone secretion by gonadotropin-releasing and estrogen in aged rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1993; 132(3):1189-94.
- Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS. Chronological changes in sex steroids, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 1979; 21(1):193-203.
- Lu KH. Changes in ovarian secretion and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J. ed., Plenum Press, New York, 1983:103-122.
- Meites J, Steger RW, Huang HH. Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects. *Fed Proc* 1980; 39(14):3168-72.
- Meites J. Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology* 1982; 34(2):151-156.
- Meites J. Role of hypothalamic catecholamines in aging process. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 125(Suppl 1):98-103.
- Meites J. The neuroendocrinology of hypothalamic aging. *Neuroendocrine perspectives*. In: Muller EE and MacLeod RM eds., Elsevier. Amsterdam, 1986:179-190.

Meites J. Role of hypothalamic catecholamines in aging process. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 125(Suppl 1):98-103.

Meites J. The neuroendocrinology of hypothalamic aging. *Neuroendocrine perspectives*. In: Muller EE and MacLeod RM eds., Elsevier. Amsterdam, 1986:179-190.

Nankin HR and Calkins JH. Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(6):1418-20.

- Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker CR, Petty CS. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(4):756-763.

Peng MT. Changes in hormone uptake and receptors in the hypothalamus during aging. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J, ed., Plenum Press, New York, 1983:61-72.

Phifer RF, Midgley AR, Spicer SS. Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(1):125-141.

Riegle GD, Meites J. Effects of aging on LH and prolactin after LHRH-L-dopa, methyl dopa, and stress in male rat. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1976; 151(3):507-511.

Romero MT, Silverman AJ, Wise PM, Witkin JW. Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience* 1994; 58(1):217-225.

Sarkar DK, Fink G. Effects of gonadal steroids on output of luteinizing hormone releasing factor into pituitary stalk blood in female rat. *J Endocrinol* 1975; 80(3):303-313.

Shaar CJ, Euker JS, Riegle GD, Meites J. Effects of castration and gonadal steroids on serum luteinizing hormone and prolactin in old and young rats. *J Endocrinol* 1975; 66(1):45-51.

Nankin HR and Calkins JH. Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(6):1418-20.

Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker CR, Petty CS. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(4):756-763.

Peng MT. Changes in hormone uptake and receptors in the hypothalamus during aging. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J, ed., Plenum Press, New York, 1983:61-72.

Phifer RF, Midgley AR, Spicer SS. Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the human pars distalis. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(1):125-141.

Riegle GD, Meites J. Effects of aging on LH and prolactin after LHRH-L-dopa, methyl dopa, and stress in male rat. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1976; 151(3):507-511.

Romero MT, Silverman AJ, Wise PM, Witkin JW. Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience* 1994; 58(1):217-225.

Sarkar DK, Fink G. Effects of gonadal steroids on output of luteinizing hormone releasing factor into pituitary stalk blood in female rat. *J Endocrinol* 1975; 80(3):303-313.

Shaar CJ, Euker JS, Riegle GD, Meites J. Effects of castration and gonadal steroids on serum luteinizing hormone and prolactin in old and young rats. *J Endocrinol* 1975; 66(1):45-51.

Simpkins JW, Mueller GP, Huang HH, Meites J. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1977; 100(6):1672-78.

Simpkins JW, Mueller GP, Huang HH, Meites J. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1977; 100(6):1672-78.

- Simpkins JW. Changes in hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitters during aging. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J (ed.) New York. Plenum Press, 1983:41-60.

Sonntag W, Forman LJ, Fiori JM, Hylka VW, Meites J. Decreased ability of old male rats to secrete luteinizing hormone (LH) is not due to alterations in pituitary LH-secreting hormone receptors. *Endocrinology* 1984; 114(5):1657-64.

Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK, Dorsa DM. Reduced pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion with aging in the male rat. *Biol Reprod* 1984; 31(2):251-258.

Thiery JC, Martin GB. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. A review. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3(2):137-173.

Veldhuis JD. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. *Ageing Res Rev* 2008; 7(3):189-208.

Walker RF. Serotonin neuroleptics change patterns of preovulatory secretion of luteinizing hormone in rats. *Life Sci* 1980; 27(12):1063-68.

Wise PM, Kashon ML, Krajnak KM, Rosewell KL, Cai A, Scarbrough K, Harney JP, McSane T, Lloyd JM, Weiland NG. Aging of female reproductive system: a window into brain aging. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:279-303.

Wise PM, Scarbrough K, Lloyd J, Cai A, Harney J, Chiu S, Hinkle D, McShane T. Neuroendocrine concomitants of reproductive aging. *Exp Gerontol* 1994; 29(3-4):275-283.

Simpkins JW. Changes in hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitters during aging. *Neuroendocrinology of aging*. In: Meites J ed. New York. Plenum Press, 1983:41-60.

Sonntag W, Forman LJ, Fiori JM, Hylka VW, Meites J. Decreased ability of old male rats to secrete luteinizing hormone (LH) is not due to alterations in pituitary LH-secreting hormone receptors. *Endocrinology* 1984; 114(5):1657-64.

Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK, Dorsa DM. Reduced pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion with aging in the male rat. *Biol Reprod* 1984; 31(2):251-258.

Thiery JC, Martin GB. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. A review. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3(2):137-173.

Veldhuis JD. Aging and hormones of the hypothalamo-pituitary axis: gonadotropic axis in men and somatotropic axes in men and women. *Ageing Res Rev* 2008; 7(3):189-208.

Walker RF. Serotonin neuroleptics change patterns of preovulatory secretion of luteinizing hormone in rats. *Life Sci* 1980; 27(12):1063-68.

Wise PM, Kashon ML, Krajnak KM, Rosewell KL, Cai A, Scarbrough K, Harney JP, McSane T, Lloyd JM, Weiland NG. Aging of female reproductive system: a window into brain aging. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:279-303.

Wise PM, Scarbrough K, Lloyd J, Cai A, Harney J, Chiu S, Hinkle D, McShane T. Neuroendocrine concomitants of reproductive aging. *Exp Gerontol* 1994; 29(3-4):275-283.

Wise PM, Weiland NG, Scarbrough K, Sortino MA, Cohen IR, Larson GH. Changing hypothalamo pituitary function: its role in aging of the female reproductive system. *Horm Res* 1989; 31(1-2):39-44.

Wise PM, Weiland NG, Scarbrough K, Sortino MA, Cohen IR, Larson GH. Changing hypothalamo pituitary function: its role in aging of the female reproductive system. *Horm Res* 1989; 31(1-2):39-44.

Wise PM. Neuroendocrine ageing: its impact on the reproductive system of female rat. *J Reprod Fert Suppl* 1993; 46:35-46.

Zheng W, Jiménez-Liñán M, Rubin BS, Halvorson LM. Anterior pituitary gene expression with reproductive aging in the female rat. *Biol Reprod* 2007; 76(6):1091-1102.

Wise PM. Neuroendocrine ageing: its impact on the reproductive system of female rat. *J Reprod Fert Suppl* 1993; 46:35-46.

Zheng W, Jiménez-Liñán M, Rubin BS, Halvorson LM. Anterior pituitary gene expression with reproductive aging in the female rat. *Biol Reprod* 2007; 76(6):1091-1102.

CAPÍTULO 9

Envejecimiento de la población tirotrópica

El proceso de envejecimiento altera el eje hipotálamo-hipofisario-sé-rico-órgano blanco (glándula tiroides).

A nivel hipotalámico, se describieron cambios en los neurotransmisores y un déficit de la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) (Pekary y col, 1984). La TRH es reguladora del eje tiroideo y con la edad se ha documentado el descenso en su síntesis, expresión y actividad. También estaría implicada en las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson y las drogas sintéticas podrían ser efectivas en su tratamiento (Daimon y col., 2013).

A nivel adenohipofisario, se detectó una menor respuesta de la población tirotrópica al estímulo de TRH (Snyder y Utiger, 1972), un descenso del contenido de la tirotrófina (TSH) glandular (Donda y col., 1989) y variaciones morfométricas en la población tirotrópica (Zegarelli-Schmidt y col., 1985). Con la edad se produjo acumulación de TSH de alto PM y una crítica alteración entre TSH-inmunorreactiva y bioactiva (Aizawa y col., 1989). Las somatotropas y tirotrópicas comparten una célula precursora común, expresando el factor de transcripción Pit1 en la

CHAPTER 9

The ageing of thyrotrope population

The ageing process altered the hypothalamo-hypophyseal-serum-target organ (thyroid gland) axis.

At hypothalamus level, changes in neurotransmitters and a shortage of thyrotropin releasing hormone (TRH) have been described (Pekary et al., 1984). The thyroid axis is regulated by TRH, which registered a decrease in synthesis, expression and activity. This hormone would also be involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Parkinson, synthetics being probably effective in their treatments (Daimon et al., 2013).

At adenohipophyseal level, a lower response of the thyrotrope population to TRH stimulus has been detected (Snyder and Utiger, 1972), as well as a decreased content of gland thyrotropin (TSH) (Donda et al., 1989) and morphometric variations in the thyrotrope population (Zegarelli-Schmidt et al., 1985). Ageing led to accumulation of TSH and a critical alteration between immunoreactive and bioactive TSH (Aizawa et al., 1989). Somatotropes and thyrotropes

ontogenia. La TRH y sus receptores se detectaron en los adenomas hipofisarios humanos con acromegalia. Se sugirió una transdiferenciación de somatotropas a tiotropas que explicaría la patogenia de los adenomas secretores de GH multihormonales (Radian y col., 2003).

A nivel de la glándula tiroides, existiría una hiposensibilidad de los receptores foliculares a la TSH y un incremento de los anticuerpos anti-tiroideos que compiten por dichos receptores (Klug y Adelman, 1977). La glándula tiroides presentó durante el envejecimiento numerosas alteraciones (Blumenthal y Perlstein, 1987): **a.** Distensión de los folículos; **b.** Decoloración del coloide; **c.** Aplanamiento del epitelio folicular, sugerente de reducción de la actividad secretoria; **d.** Escasez de mitosis; **e.** Marcada fibrosis y **f.** Aterosclerosis de los vasos sanguíneos tiroideos. En algunos casos se produjo un agrandamiento glandular (bocio) debido a la presencia de nódulos (Hintze y col., 1991).

Nuestros estudios analizaron las fluctuaciones inmunohistoquímicas cuantitativas y los cambios ultraestructurales de la población tirotrópa adenohipofisaria durante el envejecimiento, así como los niveles séricos de las hormonas TSH y T4 (Cónsole 1995 y 1997).

Las células tirotropas se presentaron irregulares mostrando un patrón citoplásmico granular difuso y una gran afinidad topográfica por la zona ventro-medial de la *pars distalis*.

Se detectó un porcentaje menor al 5% respecto a la población celular total, mostrando una inmunomarcación específica para el anticuerpo anti-TSH. El envejecimiento produjo descenso del número de tirotropas en ratas viejas y seniles, respecto a sus contrapartes jóvenes.

La **fig. 9.1** muestra áreas representativas de la población tirotrópa en ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y seniles (29 meses).

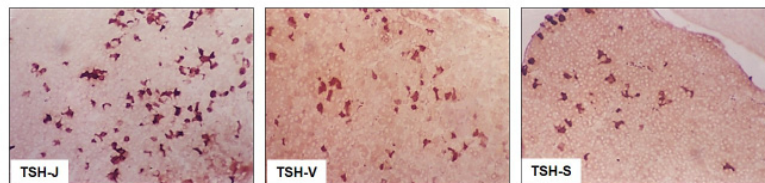


Fig. 9.1. Población tirotrópa. Ratas jóvenes, viejas y seniles machos (EnVision peroxidasa, anti-TSH, red, x 400).

share a common precursor cell, expressing the transcription factor Pit1 in ontogeny. TRH and its receptors were detected in pituitary adenomas of individuals with acromegaly. A transdifferentiation of somatotropes to thyrotropes is suggested, what explains the pathogeny of multihormonal GH secreting adenomas (Radian et al., 2003).

At the level of the thyroid gland, there might be hyposensitivity of follicular receptors to TSH and an increase of anti-thyroid antibodies that competed for those receptors (Klug and Adelman, 1977). During ageing the thyroid gland presented numerous alterations (Blumenthal and Perlstein, 1987): **a.** Distension of follicles; **b.** Pallid colloid; **c.** Flattening of the follicular epithelium, suggestive of reduced secretory activity; **d.** Scarce mitosis; **e.** Marked fibrosis and **f.** Atherosclerosis of thyroid blood vessels. In some cases, gland enlargement occurred, consequence of the presence of nodules (Hintze et al., 1991).

Our studies analyzed the quantitative immunohistochemical fluctuations and the ultrastructural changes of the adenohypophyseal thyrotrope population during ageing, as well as the serum levels of hormones TSH and T4 (Cónsole 1995 and 1997).

Thyrotropes appeared irregular and evidenced a diffuse granular cytoplasmic pattern and high topographic affinity around the ventromedial zone of the *pars distalis*. A smaller percentage than 5% was detected when compared to the whole cell population and specific immunolabeling was shown for anti-TSH antibody. Ageing caused a decreased number of thyrotropes in old and senile rats compared to their counterparts. In **fig. 9.1** representative areas of the thyrotrope population in young, old and senescent rats are shown.

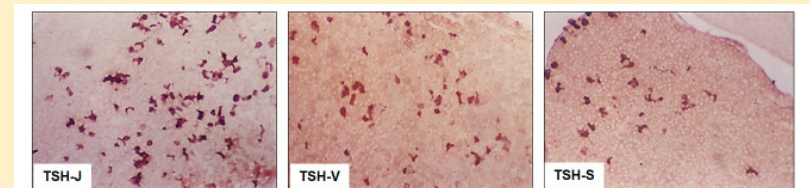


Fig. 9.1. Thyrotrope population from young (Y), old (O) and senescent (S) rats (EnVision peroxidase, anti-TSH, red chromogen, x 400).

Nuestro análisis morfométrico halló un descenso significativo ($p < 0.01$) de la densidad de volumen (DV) y de la densidad de células (DC) en ratas viejas y seniles respecto a jóvenes, en ambos sexos. Con referencia al área (A) y al perímetro (P) celulares, se registró un incremento significativo ($p < 0.01$ para A y $p < 0.05$ para P) en animales viejos y seniles respecto a jóvenes, machos y hembras (**tablas 1 y 2**) (Cónsole y col., 1997).

Tabla 1. Morfometría de la población tirotrópica en ratas machos jóvenes, viejos y seniles

Parámetro	Joven (10)	Viejo (8)	Senil (8)
Área celular (A)	33.5 ± 1.8	39.5 ± 1.7 *	38.4 ± 0.5 *
Perímetro celular (P)	31.3 ± 1.6	34.4 ± 1.6 ⁺	33.7 ± 1.7 ⁺
DV (x 10 ⁻³)	4.8 ± 0.9	1.9 ± 0.4*	2.1 ± 0.6*
DC (x 10 ⁻⁵)	13.7 ± 2.3	4.8 ± 1.0*	5.8 ± 1.1*

Tabla 2. Morfometría de la población tirotrópica en ratas hembras jóvenes, viejas y seniles

Parámetro	Joven (10)	Viejo (8)	Senil (8)
Área celular (A)	30.3 ± 1.7	37.2 ± 1.6 *	37.0 ± 1.7 *
Perímetro celular (P)	31.9 ± 1.7	34.4 ± 1.6 ⁺	33.8 ± 1.8 ⁺
DV (x 10 ⁻³)	4.2 ± 1.0	1.7 ± 0.3*	1.0 ± 0.3*
DC (x 10 ⁻⁵)	14.0 ± 2.3	4.7 ± 1.0*	3.3 ± 1.0*

Tablas 1 y 2. Cada valor representa el promedio ± ES. Las diferencias de significancia estadística con respecto al grupo etáreo son indicadas: * $p < 0.01$; + $p < 0.05$, NS = no significativo. El número de animales se muestra entre paréntesis.

En correlación con nuestros datos de área celular (A), Garner y Bernick (1975) detectaron un aumento de las tirotrópicas en ratas machos y hembras de 26 meses que mostraron grandes vacuolas citoplasmáticas.

Con la edad se produjo una acumulación de TSH de alto PM y una alteración entre TSH inmunorreactiva y bioactiva (Klug y col, 1977 y 1979). Nuestros niveles séricos de TSH y hormonas tiroideas registrados en ratas viejas y seniles mostraron descenso de T4 y ascenso de TSH (Cónsole y col.,

Our morphometric analysis found a significant decrease ($p < 0.01$) in volume density (VD) and cell density (CD) in old and senescent rats compared to young animals of both sexes. As regards A and P, a significant increment was reported ($p < 0.01$ for A and $p < 0.05$ for P) in old and senile animals compared to male and female young rats (**tables 1 and 2**) (Cónsole et al., 1997).

Table 1. Morphometry of thyrotrope population in young, old and senescent male rats

Parameter	Young (10)	Old (8)	Senescent (8)
Cellular area (A)	33.5 ± 1.8	39.5 ± 1.7 *	38.4 ± 0.5 *
Cellular perimeter (P)	31.3 ± 1.6	34.4 ± 1.6 ⁺	33.7 ± 1.7 ⁺
VD (x 10 ⁻³)	4.8 ± 0.9	1.9 ± 0.4*	2.1 ± 0.6*
CD (x 10 ⁻⁵)	13.7 ± 2.3	4.8 ± 1.0*	5.8 ± 1.1*

Table 2. Morphometry of thyrotrope population in young, old and senescent female rats

Parameter	Young (10)	Old (8)	Senescent (8)
Cellular area (A)	30.3 ± 1.7	37.2 ± 1.6 *	37.0 ± 1.7 *
Cellular perimeter (P)	31.9 ± 1.7	34.4 ± 1.6 ⁺	33.8 ± 1.8 ⁺
VD (x 10 ⁻³)	4.2 ± 1.0	1.7 ± 0.3*	1.0 ± 0.3*
CD (x 10 ⁻⁵)	14.0 ± 2.3	4.7 ± 1.0*	3.3 ± 1.0*

Tables 1 and 2. Each value represents the average ± ES. Differences statistically significant with respect to the age group are indicated: * $p < 0.01$; + $p < 0.05$, NS = non significant. The number of animals is shown in parenthesis.

In correlation to our cell area (a) data, Garner and Bernick (1975) detected an increase in thyrotropes of 26-month-old male and female rats which evidenced large cytoplasmic vacuoles. Ageing led to accumulation of high MW TSH and alteration between immunoreactive and bioactive TSH (Klug et al., 1977 and 1979).

1995), de acuerdo con estudios previos que registraron también una pérdida del ritmo circadiano de la TSH (Goya y col., 1987 y 1990) (tabla 3).

Tabla 3. Niveles séricos de TSH, T4 y T3 en ratas machos envejecidos

Hormona	Joven	Viejo	Senil
TSH (ng/ml)	4.8 ± 0.5	6.2 ± 1.2	10.1 ± 1.6**
T4 (ug/dl)	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.2**	2.7 ± 0.5**
T3 (ng/dl)	77.4 ± 7.1	74.6 ± 6.7	63.5 ± 6.5

Algunos autores detectaron niveles no alterados de TSH o aumentados (Gregerman y col., 1981). El descenso en los niveles séricos de T4 detectado en nuestras ratas envejecidas concuerda con los hallazgos de numerosos autores (Huang y col., 1976; Valueva y Verzhikovskaya, 1977; Chen y Walfishi, 1979; Gregerman y col., 1981; Pekary y col., 1983; Goya y col., 1990). Estos datos se sustentan en el hecho de que el hipotiroidismo experimental no sólo resulta en un incremento de TSH, sino que anula las variaciones circadianas de la hormona (Fukuda y col., 1975). Cizza y col. (1992) comunicaron en ratas machos Fischer 344/N una pérdida progresiva de los folículos tiroideos durante el envejecimiento, asociada con descenso de T4 y T3 libres, pero no de la TSH que permaneció sin cambios.

Ryan y col. (1979) no hallaron diferencias importantes la granulación de las tiotropas y en la inmunorreactividad relacionadas con la edad y el sexo, por lo que sugirieron que la pituitaria sería capaz de producir TSH hasta edad avanzada. Crosson y col. (1981) hicieron pruebas de TRH y T4 en pacientes ligeramente tiorotóxicos y eutiroides con un índice elevado de tiroxina libre. El índice T3 libre fue normal en un tercio de los pacientes levemente tiorotóxicos y en todos los pacientes eutiroides con T4 falsamente elevada. En el envejecimiento la respuesta reducida a la TRH se debería a una autonomía parcial de la tiroides y no a una menor capacidad de las tiotropas.

Donda y col. (1987 y 1989) hallaron diferencias entre ratas jóvenes y viejas de ambos sexos en los receptores T3 y en la concentración de T3 pituitaria. En las ratas jóvenes observaron una correlación inversa entre densidad

Table 3. Serum levels of TSH, T4 and T3 in aging male rats

Hormone	Young	Old	Senescent
TSH (ng/ml)	4.8 ± 0.5	6.2 ± 1.2	10.1 ± 1.6**
T4 (ug/dl)	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.2**	2.7 ± 0.5**
T3 (ng/dl)	77.4 ± 7.1	74.6 ± 6.7	63.5 ± 6.5

Our serum levels of TSH and thyroid hormones recorded in old and senile rats evidenced a decreased T4 and an increased TSH (Cónsole et al., 1995), in accordance with early studies that also showed a loss of circadian rhythm of TSH (Goya et al., 1987 and 1990) (table 3).

Some authors detected either unaltered or increased levels of TSH (Gregerman et al., 1981). The decreased serum levels of T4 detected in the study of our old rats is in agreement with the findings by other numerous authors (Huang et al., 1976; Valueva and Verzhikovskaya, 1977; Chen and Walfishi, 1979; Gregerman et al., 1981; Pekary et al., 1983; Goya et al., 1990). These data are supported by the fact that experimental hypothyroidism results not only in an increased TSH, but also in the disappearance of the circadian variations of the hormone (Fukuda et al., 1975).

Fischer 344/N male rats were reported by Cizza et al. (1992) as evidencing progressive loss thyroid follicles during aging, associated to decreased free T4 and T3, but not decreased TSH, which remained unchanged. Ryan et al. (1979) found no important differences in thyrotrope age- and sex-related immunoreactivity and granulation, for what they suggested that the pituitary would be capable of producing TSH even up to an advanced age.

Crosson et al. (1981) did TRH and T4 tests in patients who were slightly thyrotoxic and euthyroid with an elevated index of free thyroxine. The free T3 index appeared normal in one third of the patients slightly thyrotoxic and in all the euthyroid patients with falsely elevated T4. During aging, the reduced response to TRH would be due to a partial autonomy of the thyroid gland and not to a reduced capacity of the thyrotropes.

Donda et al. (1987 and 1989) found differences between Young and old rats of both sexes in T3 receptors and pituitary T3 concentration. In

de receptores T3 pituitarios y TSH plasmática, mientras que en ratas viejas la ausencia de esta correlación es sugerente de una alteración en la acción de T3 sobre las tiotropas o de cambios que responden a otros factores moduladores de la secreción de TSH. Szabolcs y col. (1991) sugirieron que el envejecimiento no sólo induce una menor respuesta de la TSH a la TRH, sino que podría estar relacionado con una disminución de la síntesis de TSH y con un deterioro de la acción de T3 sobre las tiotropas. Moreira y col. (2005) demostraron que la capacidad de las tiotropas para incrementar la secreción hormonal, en respuesta a menores niveles de las hormonas tiroideas, se altera en las ratas viejas, aun cuando dichos niveles estuvieran muy reducidos.

La microscopía electrónica de las ratas jóvenes (Jurado, 2003) muestra células poligonales angulares, pequeñas y en número reducido. Los gránulos secretorios son escasos, de densidad variable, membrana visible, se ubican junto a la membrana plasmática y presentan un diámetro promedio de 100 nm. El RER presenta sacos alargados o cisternas con ribosomas y el complejo de Golgi yuxtannuclear se muestra reducido. Se ven mitocondrias esféricas y alargadas, así como numerosos lisosomas (fig. 9.2).

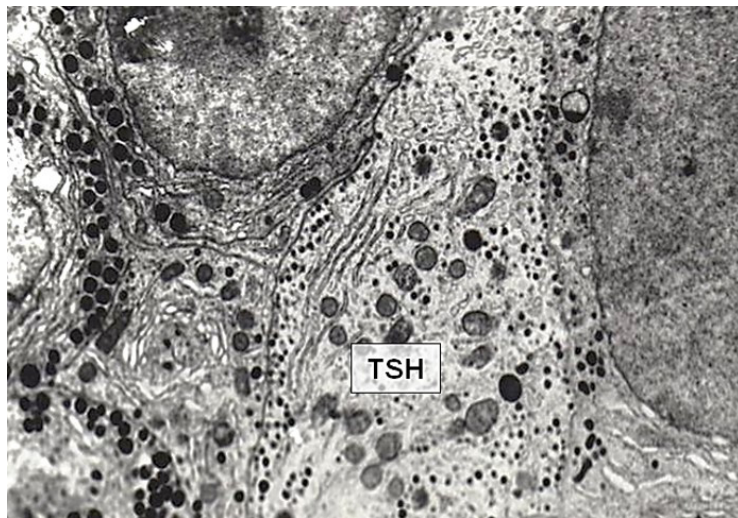


Fig. 9.2. Tirotropa (TSH) de rata macho joven. Gránulos secretorios pequeños y periféricos (x 10.000).

young rats they noticed an inverse correlation between the density of pituitary T3 receptors and plasmatic TSH; whereas in old rats, the absence of this correlation suggests an alteration of T3 action on thyrotropes or of changes that respond to other factors that modulate TSH secretion.

Szabolcs et al. (1991) suggested that not only does aging induce a lower response of TSH to TRH, but it might also be related to a decreased action of T3 on thyrotropes. Moreira et al. (2005) demonstrated that the capacity of thyrotropes to increase hormonal secretion, in response to the declined levels of thyroid hormones, is altered in old rats, even when those levels were dramatically reduced.

Electron microscopy of young rats evidence angular polygonal cells, both small and reduced in number. Secretory granules are scarce, variably dense, with visible membrane and located next to the plasmatic membrane. The secretory granules have an average diameter of 50 to 100 nm.

In the RER flattened sacs or cisternae with ribosomes appeared and the Golgi complex is reduced. Spherical and elongated mitochondria as well as numerous lysosomes are seen (fig. 9.2) (Jurado, 2003).

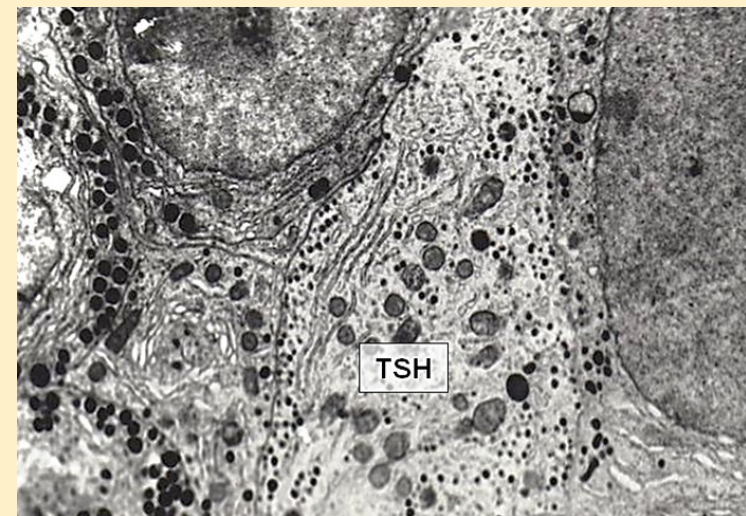


Fig. 9.2. Thyrotrope (TSH) from young male rat. Scarce and peripheral secretory granules (x 10.000).

Los animales envejecidos mostraron un 20% de células hipertróficas con dilatación de las cisternas del RER y del complejo de Golgi. Se detectan células oscuras involutivas, descenso del número de gránulos secretorios e imágenes de crinofagia, con un descenso de las exocitosis. La **fig. 9.3** presenta un complejo de Golgi (G) expandido y mitocondrias (m) con ligera tumefacción (Jurado, 2003).

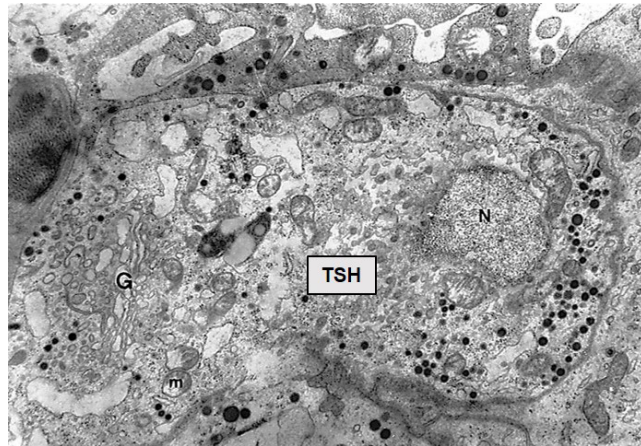


Fig. 9.3. Tirotrópa de rata hembra vieja. Núcleo (N), Golgi (G) dilatado y mitocondrias (m) tumefactas (x 12.000).

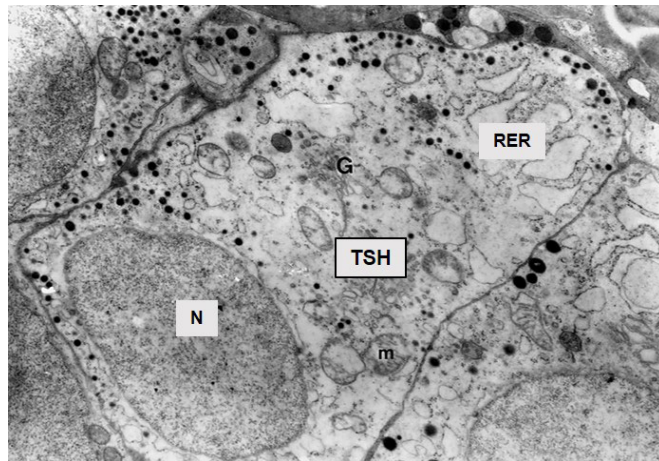


Fig. 9.4. Tirotrópa de rata hembra vieja. Núcleo (N), Golgi (G), RER y mitocondrias (m) (x 11.000).

Ageing animals showed a 20% of hypertrophic cells with dilated RER and Golgi complex. We detected involutive cells, decrease of secretory granules and images of crinophagy.

In **fig. 9.3** an expanded Golgi complex (G) is shown. Slightly swollen mitochondria (m) can also be observed (Jurado, 2003).

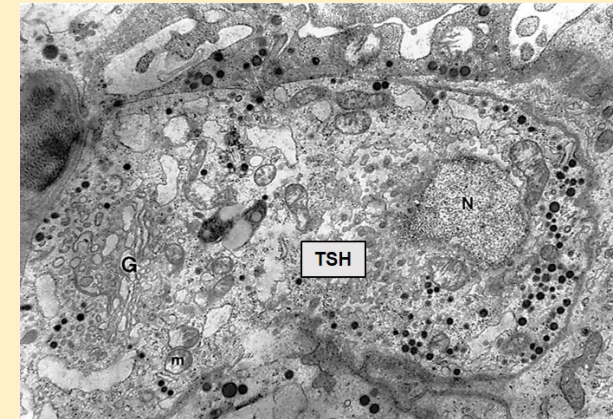


Fig. 9.3. Thyrotrope from young female rat. Nucleus (N) dilated Golgi (G) and swollen mitochondria (m) (x 12.000).

In **fig. 9.4** there is evidence of granules near the plasmatic membrane, as well as of a dilated Golgi complex and RER. Some swollen mitochondria can also be seen.

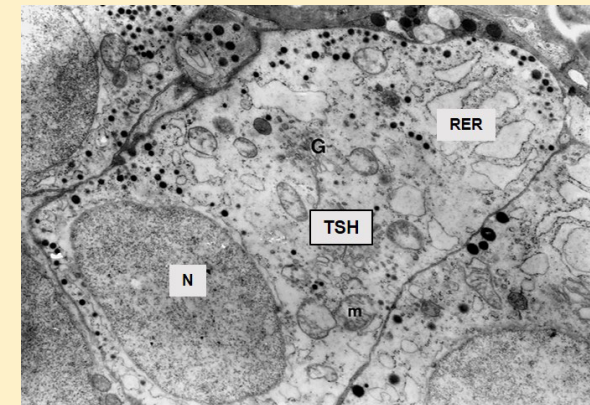


Fig. 9.4. Thyrotrope from old female rat. Nucleus (N), Golgi (G), RER and mitochondria (m) (x 11.000).

En la **fig. 9.4** se observan gránulos cercanos a la membrana plasmática, así como un complejo de Golgi y un RER dilatados. También pueden verse algunas mitocondrias tumefactas.

Nuestros grupos de ratas seniles (**figs. 9.5-9.6**) muestran una dilatación extrema del RER con sacos irregulares de amplia luz, escasísimos gránulos secretorios y algunas mitocondrias tumefactas (Jurado, 2003).

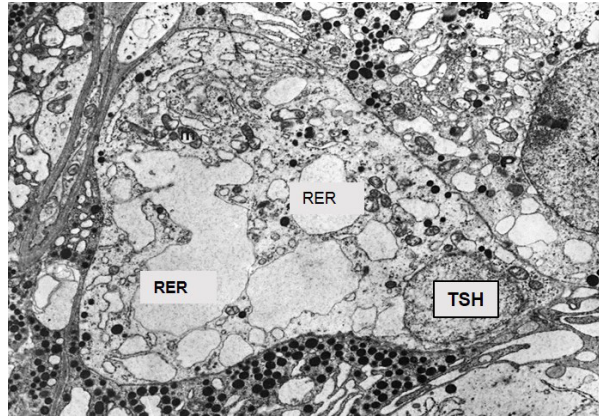


Fig. 9.5. Tirotrópa (TSH) de rata hembra senil. RER dilatado y escasos gránulos secretorios (*x 11.000*).

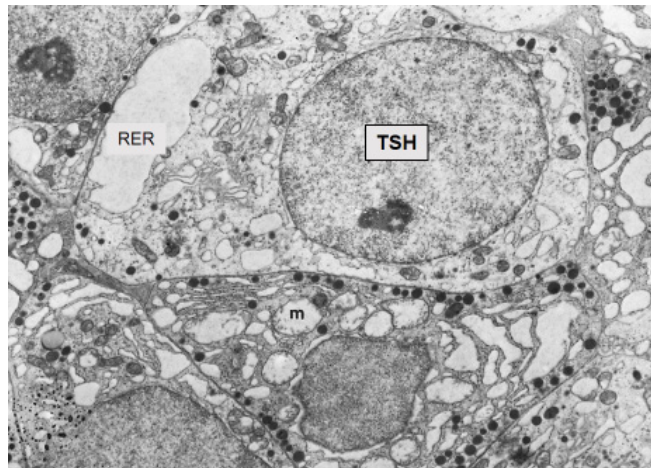


Fig. 9.6. Tirotrópa de rata hembra senil. RER dilatado, mitocondrias tumefactas (*m*) y escasos gránulos secretorios (*x 10.000*).

In our groups of senile rats of both sexes there was an extreme dilatation of RER that evidenced irregular sacs of wide light, very few secretory granules and some swollen mitochondria (**figs. 9.5-9.6**) (Jurado, 2003).

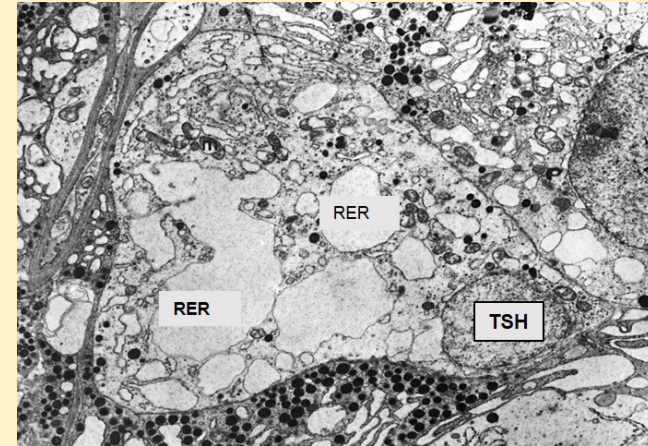


Fig. 9.5. Thyrotrope from senescent female rat. Dilated RER and scarce secretory granules (*x 11.000*).

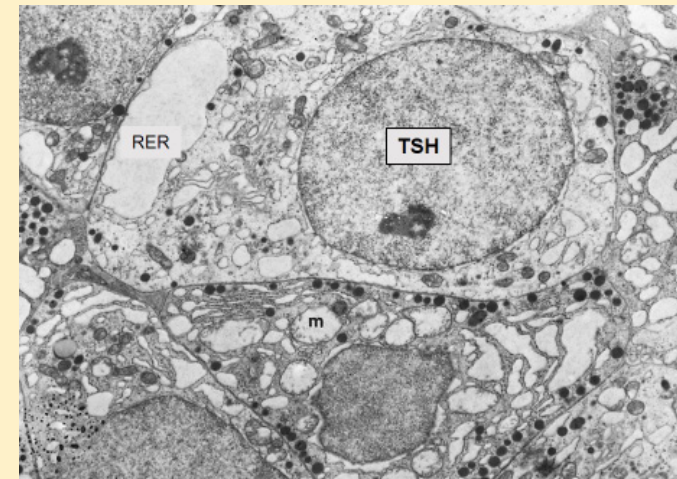


Fig. 9.6. Thyrotrope (TSH) from senescent female rat. Dilated RER, swollen mitochondria (*m*) and scarce secretory granules (*x 10.000*).

Concluimos que las ratas envejecidas de ambos sexos mostraron una población tirotrópica con descenso de la densidad celular y de volumen, aumento del tamaño celular, marcados cambios ultraestructurales a nivel de sus gránulos secretorios, RER y Golgi, así como una disminución de los niveles circulantes de T4 con altos niveles de TSH, sugerentes de una progresiva desensibilización de la glándula tiroidea a la TSH.

Referencias

- Aizawa T, Ishihara M, Hashizume K, Takasu N, Yamada T. Age related changes of thyroid function and immunologic abnormalities in patients with hyperthyroidism due to Graves disease. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37(10):944-948.
- Blumenthal HT, Perlstein IB. The aging thyroid I. A description of lesions and an analysis of their age and sex distribution. *J Am Geriatr Soc* 1987; 35(9):843-854.
- Bonnyns M, Pasteels JL, Herlant M, Vanhaelst L, Bastanie PA. Comparison between thyrotropin concentration and cell morphology of anterior pituitary in asymptomatic atrophic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35(5):722-728.
- Chen HJ, Walfish PG. Effects of age and testicular function on the pituitary-thyroid system in male rats. *J Endocrinol* 1979; 82(1):53-59.
- Cizza T, Brady LS, Calogero AE, Badgy T, Lynn AB, Kling MA, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Central hypothyroidism is associated with advanced age in male Fischer 344/N rat: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 1992; 131(6):2672-80.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat (Basel)* 1995; 152(1):28-32.
- Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Fluctuations of the pituitary thyrotrophs in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997; 3(1):3-8.

We conclude that aged rats of both sexes in the thyrotropic population evidenced a decreased cell and volume density, an increased cell size, marked ultrastructural changes at the level of the secretory granules, RER and Golgi, as well as a diminution in the T4 circulating levels with high levels of TSH, suggestive of progressive desensitizing of TSH thyroid gland.

References

- Aizawa T, Ishihara M, Hashizume K, Takasu N, Yamada T. Age related changes of thyroid function and immunologic abnormalities in patients with hyperthyroidism due to Graves disease. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37(10):944-948.
- Blumenthal HT, Perlstein IB. The aging thyroid I. A description of lesions and an analysis of their age and sex distribution. *J Am Geriatr Soc* 1987; 35(9):843-854.
- Bonnyns M, Pasteels JL, Herlant M, Vanhaelst L, Bastanie PA. Comparison between thyrotropin concentration and cell morphology of anterior pituitary in asymptomatic atrophic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35(5):722-728.
- Chen HJ, Walfish PG. Effects of age and testicular function on the pituitary-thyroid system in male rats. *J Endocrinol* 1979; 82(1):53-59.
- Cizza T, Brady LS, Calogero AE, Badgy T, Lynn AB, Kling MA, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Central hypothyroidism is associated with advanced age in male Fischer 344/N rats: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 1992; 131(6):2672-80.
- Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat (Basel)* 1995; 152(1):28-32.

Croxson MS, Wilson TM, Ballantyne GH. TRH testing, T4-thyrotoxicosis and the aging thyroid gland. *N Z Med J* 1981; 93(686):417-420.

Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of thyrotropin releasing hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimer Dis (Columbia)* 2013; 1(1):7726.

Donda A, Reymond MJ, Lemarchand-Beraud T. Influence of age on the control of thyrotropin secretion by thyrotropin-releasing hormone in the male rat. *Neuroendocrinology* 1989; 49(4):389-394.

Donda A, Reymond MJ, Zurich MG, Lemarchand-Beraud T. Influence of sex and age on T3 receptors and T3 concentration in the pituitary gland of the rat: consequences on TSH secretion. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 54(1):29-34.

Fukuda H, Greer MA, Roberts L, Allen CF, Critchlow V, Wilson M. Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine. *Endocrinology* 1975; 97(6):1424-31.

Garner HS, Bernick S. Effect of age upon the thyroid gland and pituitary thyrotrophs of the rat. *J Gerontol* 1975; 30(2):137-148.

Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Sosa YE, Meites J. Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in aging rats. *Neurobiol Aging* 1990; 11(6):625-630.

Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL, Meites J. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent thyrotropin-inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 1987; 41(3):219-227.

Gregerman RI, Bierman EL. Aging and hormones. *Textbook of Endocrinology*. In: Williams RH (ed.) Philadelphia. Saunders 1981:1192.

Hintze G, Windeler J, Baumert J, Stein H, Kobberling J. Thyroid volume and goitre prevalence in the elderly as determined by ultrasound and their relationship to laboratory indices. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 124(1):12-18.

Huang HH, Marshall S, Meites J. Capacity of old versus young female rats to secrete LH, FSH and prolactin. *Biol Reprod* 1976; 14(5):538-543.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Fluctuations of the pituitary thyrotropes in male and female rats during ageing. *Sci Morph* 1997; 3(1):3-8.

Croxson MS, Wilson TM, Ballantyne GH. TRH testing, T4-thyrotoxicosis and the aging thyroid gland. *N Z Med J* 1981; 93(686):417-420.

Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of thyrotropin releasing hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimer Dis (Columbia)* 2013; 1(1):7726.

Donda A, Reymond MJ, Lemarchand-Beraud T. Influence of age on the control of thyrotropin secretion by thyrotropin-releasing hormone in the male rat. *Neuroendocrinology* 1989; 49(4):389-394.

Donda A, Reymond MJ, Zurich MG, Lemarchand-Beraud T. Influence of sex and age on T3 receptors and T3 concentration in the pituitary gland of the rat: consequences on TSH secretion. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 54(1):29-34.

Fukuda H, Greer MA, Roberts L, Allen CF, Critchlow V, Wilson M. Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine. *Endocrinology* 1975; 97(6):1424-31.

Garner HS, Bernick S. Effect of age upon the thyroid gland and pituitary thyrotrophs of the rat. *J Gerontol* 1975; 30(2):137-148.

Goya RG, Quigley KL, Takahashi S, Sosa YE, Meites J. Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in aging rats. *Neurobiol Aging* 1990; 11(6):625-630.

Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL, Meites J. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent thyrotropin-inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 1987; 41(3):219-227.

Gregerman RI, Bierman EL. Aging and hormones. *Textbook of Endocrinology*. In: Williams RH (ed.) Philadelphia. Saunders 1981:1192.

Hintze G, Windeler J, Baumert J, Stein H, Kobberling J. Thyroid volume and goitre prevalence in the elderly as determined by ultrasound and

Jurado SB. Impacto del envejecimiento sobre las poblaciones adeno-hipofisarias de la rata. Estudio inmunocitoquímico y ultraestructural. Tesis doctoral. Directores: Dres. Gómez Dumm C y Cónsole G, 2003.

Klug TL, Adelman RC. Altered hypothalamic-pituitary regulation of thyrotropin in male rats during aging. *Endocrinology* 1979; 104(4):1136-42.

Klug TL, Adelman RC. Evidence for large thyrotropin and its accumulation during aging in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77(4):1431-1437.

Moreira DG, Marassi MP, Correa da Costa VM, Carvalho DP, Rosenthal D. Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Exp Gerontol* 2005; 40(4):330-334.

Pekary AE, Carlson HE, Yamada T, Sharp PG, Walfish PG, Hershman JM. Thyrotropin-releasing hormone levels decrease in hypothalamus of aging rats. *Neurobiol Aging* 1984; 5(3):221-226.

Pekary AE, Hershman JM, Sugawara M, Gieschen KI, Sogol PB, Reed AW, Pardridge WM, Walfish PG. Preferential release of triiodothyronine: an intrathyroidal adaptation to reduced serum thyroxine in aging rats. *J Gerontol* 1983; 38(6):653-659.

Radian S, Coculescu M, Morris JF. Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism - a light and electron microscopy study. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3):297-306.

Ryan N, Kovacs K, Ezrin C. Thyrotrophs in old age. An immunocytologic study of human pituitary glands. *Endokrinologie* 1979; 73(2):191-198.

Snyder PJ, Utiger RD. Response to thyrotropin releasing hormone (TRH) in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34(2):380-385.

Szabolcs I, Schultheiss H, Astier H, Horster FA. Age-related decreases in the thyrotropin (TSH) responsiveness to thyrotropin-releasing-hormone (TRH) stimulation and the inhibitory effect of triiodothyronine (T3), in vitro study on superfused rat pituitaries. *Exp Gerontol* 1991; 26(4):347-355.

their relationship to laboratory indices. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 124(1):12-18.

Huang HH, Marshall S, Meites J. Capacity of old versus young female rats to secrete LH, FSH and prolactin. *Biol Reprod* 1976; 14(5):538-543.

Jurado SB. Impact of ageing on the adenohipofyseal populations in the rat. An immunocytochemical and ultrastructural study. Doctoral thesis: Directors: PhD Gómez Dumm CLA - Cónsole GM, 2003.

Klug TL, Adelman RC. Altered hypothalamic-pituitary regulation of thyrotropin in male rats during aging. *Endocrinology* 1979; 104(4):1136-42.

Klug TL, Adelman RC. Evidence for large thyrotropin and its accumulation during aging in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77(4):1431-1437.

Moreira DG, Marassi MP, Correa da Costa VM, Carvalho DP, Rosenthal D. Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Exp Gerontol* 2005; 40(4):330-334.

Pekary AE, Carlson HE, Yamada T, Sharp PG, Walfish PG, Hershman JM. Thyrotropin-releasing hormone levels decrease in hypothalamus of aging rats. *Neurobiol Aging* 1984; 5(3):221-226.

Pekary AE, Hershman JM, Sugawara M, Gieschen KI, Sogol PB, Reed AW, Pardridge WM, Walfish PG. Preferential release of triiodothyronine: an intrathyroidal adaptation to reduced serum thyroxine in aging rats. *J Gerontol* 1983; 38(6):653-659.

Radian S, Coculescu M, Morris JF. Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism - a light and electron microscopy study. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3):297-306.

Ryan N, Kovacs K, Ezrin C. Thyrotrophs in old age. An immunocytologic study of human pituitary glands. *Endokrinologie* 1979; 73(2):191-198.

Snyder PJ, Utiger RD. Response to thyrotropin releasing hormone (TRH) in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34(2):380-385.

Valueva GV, Verzhikovskaya NV. Thyrotropic activity of hypophysis during aging. *Exp Gerontol* 1977; 12(3-4):97-105.

Zegarelli-Schmidt E, Yu XR, Fenoglio-Preiser CM, O'Toole K, Pushparaj N, Kledzik G, King DW. Endocrine changes associated with the human ageing process: II. Effect of age on the number and size of thyrotropin immunoreactive cells in the human pituitary. *Hum Pathol* 1985; 16(3):277-286.

Szabolcs I, Schultheiss H, Astier H, Horster FA. Age-related decreases in the thyrotropin (TSH) responsiveness to thyrotropin-releasing-hormone (TRH) stimulation and the inhibitory effect of triiodothyronine (T3), in vitro study on superfused rat pituitaries. *Exp Gerontol* 1991; 26(4):347-355.

Valueva GV, Verzhikovskaya NV. Thyrotropic activity of hypophysis during aging. *Exp Gerontol* 1977; 12(3-4):97-105.

Zegarelli-Schmidt E, Yu XR, Fenoglio-Preiser CM, O'Toole K, Pushparaj N, Kledzik G, King DW. Endocrine changes associated with the human ageing process: II. Effect of age on the number and size of thyrotropin immunoreactive cells in the human pituitary. *Hum Pathol* 1985; 16(3):277-286.

CAPÍTULO 10

Envejecimiento de la población corticotropa

La respuesta neuroendocrina a la adaptación frente al estrés activa el eje hipotálamo (hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y vasopresina: núcleo paraventricular) - pituitario (corticotropas: corticotrofina (ACTH) - suprarrenal (glucocorticoides) que sufre alteraciones a nivel transcripcional durante el envejecimiento (Aguilera, 2011). Se detectó un factor de liberación de ACTH residuo 41 a nivel hipotalámico (Antoni, 1986).

Con la edad, el eje corticotropo presenta una mayor variabilidad de los diferentes parámetros medidos, incluyendo la respuesta al estrés. Los resultados contradictorios podrían deberse a las variaciones con la edad y las diferencias entre especies (roedores y primates) (Goncharova, 2013). Revskoy y Redei (2000) observaron una desregulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (H-H-A) durante el envejecimiento debida a un menor grado de retroalimentación negativa. El hipocampo sería el principal sitio responsable de dicha alteración. Los hallazgos demostrarían una

CHAPTER 10

The ageing of corticotrope population

The neuroendocrine response to adaptation to stress is the activation of the hypothalamus (corticotropin releasing hormone: CRH and vasopressin: paraventricular nucleus) - pituitary (corticotropes: corticotropin (ACTH) - adrenal (glucocorticoids) axis undergoes alterations at transcriptional level during ageing (Aguilera, 2011). A 41-residue ACTH-releasing factor was detected at hypothalamic level (Antoni, 1986).

Ageing was associated with higher variability in the different measured parameters of the corticotrope axis, including the response to stress. The contradictory results might be related to age variations and the differences between species (rodents and primates) (Goncharova, 2013). Revskoy and Redei (2000) observed a dysregulation of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal (H-H-A) axis during ageing due to a lower negative feedback.

disminución de la sensibilidad de las corticotropas a los glucocorticoides con la edad. Hubo descenso de la corticosterona plasmática en respuesta a estímulos potentes de estrés en ratas de edad avanzada (Brett y col., 1983). A nivel del hipocampo, la pérdida de neuronas sería un indicador válido para evaluar los cambios detectados durante el envejecimiento (Landfield y col., 1978). Además, la edad determinó una depleción de los receptores de corticosteroides (De Kloet, 1992). Tres meses de exposición a la corticosterona causaron un patrón de degeneración neuronal similar al observado durante el envejecimiento: **a.** Pérdida del 25 % de las neuronas; **b.** Necrosis neuronal preferencial en sitios de mayor concentración de receptores de corticosteroides y **c.** Degeneración neuronal asociada con una hiperplasia glial compensadora (Salposky y col., 1985).

El eje H-H-A exhibe un ritmo circadiano, es inhibido por los corticoides y se activa con el estrés. La secreción de corticoides inducida por el estrés no inhibe al eje corticotropo que se mantendría sensible para lograr la supervivencia. Hay un costo metabólico global para que el animal mantenga una actividad continua de dicho eje durante el estrés crónico (Dallman, 1993).

Los altos niveles hormonales y el estrés acentuaron la necrosis neuronal, hecho conocido como la hipótesis de la cascada de glucocorticoides que postula la importancia de los mismos y del estrés en el proceso de envejecimiento (Salposky y col., 1986). Quizá un “buen envejecimiento” está directamente relacionado con el buen manejo de un estrés leve a moderado. En contraste, una exposición a un estrés severo y prolongado altera el control homeostático y lleva en forma inexorable al envejecimiento. El estrés en el adulto activa el eje H-H-A y ello implica aumento de la secreción de ACTH y altos niveles séricos de glucocorticoides frente a la emergencia. Si el hipocampo está dañado no puede ejercer el efecto inhibitorio y los glucocorticoides permanecen elevados con un lentísimo retorno a los niveles basales (Timiras y col., 1995).

Nuestro estudio inmunohistoquímico se hizo en ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y seniles (29 meses) de ambos sexos. La **fig. 10.1** muestra el descenso del número de corticotropas en ratas envejecidas respecto a jóvenes.

The hippocampus would be the main site responsible for such alteration. These findings would demonstrate an age-related decrease of the sensitivity of corticotropes to glucocorticoids. The plasmatic corticosterone decreased in response to strong stress stimuli in rats of advanced age (Brett et al., 1983). At hippocampal level, neuronal loss would be a valid sign to evaluate age-related changes (Landfield et al., 1978). Also, corticosteroid receptors were depleted during ageing (De Kloet, 1992). Three-month exposure to corticosterone caused a pattern of neuronal degeneration similar to that observed during ageing: **a.** Loss of 25 % of neurons; **b.** Neuronal necrosis in areas of higher concentration of corticosteroid receptors and **c.** Neuronal degeneration associated with compensatory glial hyperplasia (Salposky et al., 1985).

The H-H-A axis exhibits circadian rhythm; it is corticoid-inhibited and stress-activated. Stress-induced secretion of corticoids does not inhibit the corticotrope axis, which would remain sensitive in order to survive. A global metabolic cost is necessary for the animal to maintain a continuous activity of these axes during chronic stress (Dallman, 1993).

High hormonal levels and stress enhanced neuronal necrosis, what is known as glucocorticoid cascade hypothesis that posit the importance of these levels and of stress in the ageing process (Salposky et al., 1986). Perhaps “good ageing” is directly related to a good management of mild to moderate stress. In contrast, exposition to severe and prolonged stress alters homeostatic control and inexorably leads to ageing. Stress in the adult activates the H-H-A axis that implies increased ACTH secretion and high glucocorticoid serum levels to deal with the emergency. If the hippocampus is damaged, it cannot exert its inhibiting effect and glucocorticoids remain elevated with an extremely slow return to basal levels (Timiras et al., 1994).

Our immunohistochemical study was made in young (3 months), old (20 months) and senescent (29 months) rats of both sexes. In **fig.**

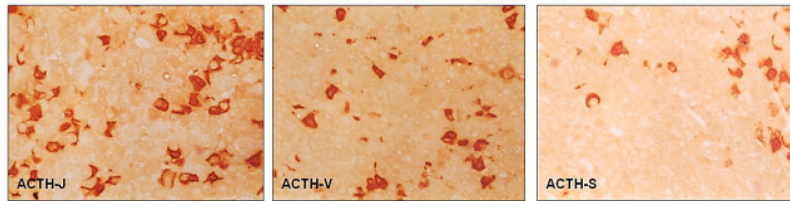


Fig. 10.1. Corticotropas. Ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) machos
(EnVision peroxidasa, anti-ACTH, x 200).

El estudio morfométrico registró un descenso significativo ($p < 0.01$) en la densidad de células (DC) y en la densidad de volumen (DV) en ratas viejas y seniles respecto a jóvenes de ambos sexos. No hubo cambios significativos en el área (A) y perímetro (P) celulares (tablas 1 y 2).

Tabla 1: Población corticotropa de ratas machos jóvenes, viejas y seniles

Parámetro	Joven (10)	Vieja (8)	Senil (8)
Área celular (A)	33.4 ± 2.0	32.5 ± 2.0 (NS)	33.1 ± 2.0 (NS)
Perímetro celular (P)	36.7 ± 2.1	37.4 ± 2.0 (NS)	37.6 ± 2.0 (NS)
DV (x 10 ⁻³)	6.5 ± 1.0	2.5 ± 0.7 *	1.6 ± 0.5 *
DC (x 10 ⁻⁵)	19.4 ± 2.0	7.8 ± 1.5 *	4.9 ± 1.0 *

Cada valor representa el promedio ± ES. Las diferencias de significancia estadística con respecto al grupo etáreo son indicadas: * $p < 0.01$; + $p < 0.05$, NS = no significativo. El número de animales se muestra entre paréntesis.

Tabla 2: Población corticotropa de ratas hembras jóvenes, viejas y seniles

Parámetro	Joven (10)	Vieja (8)	Senil (8)
Área celular (A)	31.5 ± 1.8	31.9 ± 1.9 (NS)	32.8 ± 2.0 (NS)
Perímetro celular (P)	36.9 ± 2.0	37.8 ± 2.2 (NS)	37.9 ± 2.0 (NS)
DV (x 10 ⁻³)	6.6 ± 1.5	2.4 ± 0.8 *	2.0 ± 0.5 *
DC (x 10 ⁻⁵)	20.9 ± 3.0	7.6 ± 1.6 *	6.0 ± 1.3 *

Cada valor representa el promedio ± ES. Las diferencias de significancia estadística con respecto al grupo etáreo son indicadas: * $p < 0.01$; NS = no significativo. El número de animales se muestra entre paréntesis.

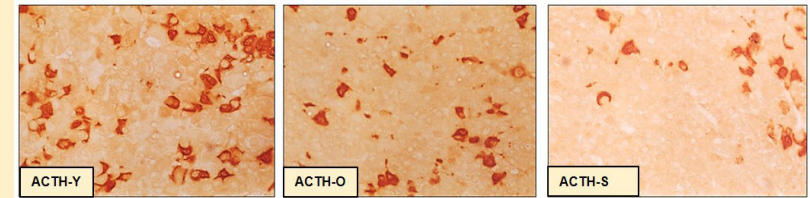


Fig. 10.1. Corticotrope population from young (Y), old (O) and senescent (S) rats (EnVision peroxidase, anti-ACTH, x 200).

10.1 there is evidence of the decreased number of corticotropes in aged rats compared to young animals.

The morphometric study recorded a significant decrease ($p < 0.01$) in cell density (CD) and volume density (VD) in old and senescent rats compared to the young ones. No significant changes in cell area (A) and perimeter (P) were recorded (tables 1 and 2).

Table 1. Morphometry of corticotrope population in young, old and senescent male rats

Parameter	Young (10)	Old (8)	Senescent (8)
Cellular area (A)	33.4 ± 2.0	32.5 ± 2.0 (NS)	33.1 ± 2.0 (NS)
Cellular perimeter (P)	36.7 ± 2.1	37.4 ± 2.0 (NS)	37.6 ± 2.0 (NS)
VD (x 10 ⁻³)	6.5 ± 1.0	2.5 ± 0.7 *	1.6 ± 0.5 *
CD (x 10 ⁻⁵)	19.4 ± 2.0	7.8 ± 1.5 *	4.9 ± 1.0 *

Table 2. Morphometry of corticotrope population in young, old and senescent female rats

Parameter	Young (10)	Old (8)	Senescent (8)
Cellular area (A)	31.5 ± 1.8	31.9 ± 1.9 (NS)	32.8 ± 2.0 (NS)
Cellular perimeter (P)	36.9 ± 2.0	37.8 ± 2.2 (NS)	37.9 ± 2.0 (NS)
VD (x 10 ⁻³)	6.6 ± 1.5	2.4 ± 0.8 *	2.0 ± 0.5 *
CD (x 10 ⁻⁵)	20.9 ± 3.0	7.6 ± 1.6 *	6.0 ± 1.3 *

VD: volume density and CD: cell density. Values are expressed as mean ± SD; number of rats in parenthesis

Gaal y col. (1979) no hallaron cambios sustanciales en las corticotropas de individuos sanos envejecidos. Sano y col. (1993) estudiaron las pituitarias de humanos envejecidos (80-90 años) y observaron aumento de la fibrosis, depósitos amiloides, descenso de la población somatotropa, adenomas pituitarios y presencia de corticotropas en el lóbulo posterior pituitario.

El mantenimiento de las corticotropas por autoduplicación contrasta con la respuesta proliferativa informada en las células indiferenciadas luego de la adrenalectomía. Si la reentrada de las corticotropas en el ciclo celular constituye un mecanismo normal para mantener un nivel basal de células adultas, dicho mecanismo también podría perturbarse en el desarrollo de un corticotropinoma (Langlais y col., 2013).

La concentración plasmática de glucocorticoides aumentó durante la senectud (Tang y Phillips, 1978; Salpolsky y col., 1983; Dekosky y col., 1984). El nivel de ACTH plasmática estuvo elevada en ratas envejecidas al final del ciclo diurno (Issa y col., 1990) y en condiciones de estrés (van Eekelen y col., 1992). Esto coincide con nuestros datos séricos que mostraron un incremento de la corticosterona en ratas machos envejecidas y un descenso en la secreción diurna en ratas viejas (Goya y col., 1989). Los ratones machos viejos mostraron menores niveles de corticosterona sérica, después de 8 hs de la inyección de dexametasona respecto a jóvenes (Harris y Saltzman, 2013). En estudios tempranos realizados en humanos no se hallaron alteraciones en los niveles basales o estimulados de cortisol (Blichert-Toft y col., 1970), aunque la excreción diaria de metabolitos de corticosteroides estuvo disminuida (West y col., 1961). Estudios posteriores han demostrado una alteración en el ritmo circadiano de la ACTH sérica en pacientes de 80 años (Lakatia y col., 1984). En el estrés se detectaron altos niveles de cortisol en pacientes de edad avanzada (Blichert-Toft y col., 1975).

El envejecimiento estaría asociado a una disminución de la sensibilidad del eje corticotropo a los glucocorticoides en su acción in-

Gaal et al. (1979) found no substantial changes in corticotropes of aged healthy individuals. Sano et al. (1993) studied the pituitaries in aged human beings (80-90 years old) and observed increased fibrosis, amyloid deposits, a decreased somatotrope population, pituitary adenomas and corticotropes in the posterior pituitary lobe.

The maintenance of corticotropes by self-duplication contrasts with the reported proliferative response of undifferentiated cells observed after adrenalectomy. If corticotrope re-entry into cell cycle constitutes a normal mechanism to maintain an adult basal level, this same mechanism may also be perturbed during corticotrope adenoma development (Langlais et al., 2013).

The plasmatic concentration of glucocorticoids increased during senescence (Tang and Phillips, 1978; Salpolsky et al., 1983; Dekosky et al., 1984). The level of plasmatic ACTH was increased in aged rats at the end of the diurnal cycle (Issa et al., 1990) and under stress conditions (van Eekelen et al., 1992). This is in agreement with our serum data that evidenced increased corticosterone in aged male rats and decreased diurnal secretion in old rats (Goya et al., 1989). Old male mice showed lower levels of serum corticosterone after 8 h of the injection of dexamethasone compared to young animals (Harris and Saltzman, 2013). Early studies carried out on human beings did not reveal alterations in the basal or cortisol-stimulated levels (Blichert-Toft et al., 1970), although the daily excretion of corticosteroid metabolites was found to be diminished (West et al., 1961). Subsequent studies have shown an alteration in the circadian rhythm of serum ACTH in 80-year-old patients (Lakatia et al., 1984). Stress demonstrated high levels of cortisol in aged patients (Blichert-Toft et al., 1975).

Ageing would be associated to a diminution of the corticotrope axis sensitivity to glucocorticoids in its inhibition feedback (Blackman, 1987). In addition to this, Brudieux et al. (1995) used CRH to stimulate old rats and reported decreased levels of ACTH and corticosterone, suggesting an altered steroidogenic capacity of adrenocortical cells to respond to ACTH and a decreased ability of corticotropes to produce ACTH.

hibidora mediante retroalimentación (Blackman, 1987). En agregado, Brudieux y col. (1995) estimularon con CRH a ratas viejas registrando un descenso en los niveles de ACTH/corticosterona y sugirieron alteraciones en la capacidad esteroideogénica de las células adrenocorticales para responder a la ACTH y una disminución de la habilidad de las corticotropas para producir ACTH.

Cizza y col. (1994) investigaron los efectos del envejecimiento sobre la regulación del eje H-H-A y los receptores esteroides del hipocampo y con la edad hallaron una deficiencia de CRH en receptores hipotalámicos por aumento de ARNm de arginina-vasopresina. Heroux y col. (1991) demostraron en ratas envejecidas un descenso en los receptores de CRH de la hipófisis anterior que podría ser debida a una hipersecreción hipotalámica de CRH y no a una pérdida de corticotropas. El fitoestrógeno de soja o genisteína se consume como una alternativa terapéutica para las enfermedades relacionadas con la edad. La genisteína modularía las características morfo-funcionales de las corticotropas y disminuiría los niveles de ACTH en sangre (Milosevic y col., 2009).

La corteza adrenal en humanos y en algunas especies disminuye de peso durante el envejecimiento y en su histología se observa: **a.** Acúmulos de gránulos de lipofucsina (Sohal, 1981), inclusiones amiloides (Eriksson y Westermarck, 1990) e infiltración linfocítica (Hayashi y col., 1989); **b.** Fibrosis en el conectivo de sostén, en la cápsula adrenal y a nivel perivascular y **c.** Aterosclerosis en los vasos sanguíneos adrenales. A pesar de dichos cambios morfológicos, los niveles basales de glucocorticoides no difirieron mucho entre humanos de edad media y avanzada (Jensen y Blichert-Toft, 1971; Waltman y col., 1991; Barton y col., 1993). La reducida esteroideogénesis en el envejecimiento se asocia a una menor respuesta de las células adrenocorticales a la ACTH y esto se debería a una pérdida de receptores, a alteraciones de membrana y a la menor disponibilidad de precursores.

Cizza et al. (1994) investigated the effects of aging on the H-H-A axis and the hippocampal steroid receptors, finding an age-related CRH deficiency in hypothalamic receptors caused by an increase of arginine-vasopressin mRNA. Heroux et al. (1991) demonstrated in senescent rats a decrease in the CRH receptors of the anterior pituitary that might derive from a pituitary hypersecretion of CRH of the anterior pituitary and not from a loss of corticotropes. Soy phytoestrogens or genistein is consumed as a therapeutic alternative for age-related diseases. Genistein would modulate the morpho-functional characteristics of corticotrophs and would diminish ACTH levels in blood (Milosevic et al., 2009).

Adrenal cortex in human beings and in some species diminishes its weight during ageing and its histology reveals: **a.** Clumps of lipofuscin granules (Sohal, 1981), amyloid inclusions (Eriksson et al., 1990) and lymphocytic infiltration (Hayashi et al., 1989); **b.** Fibrosis in supportive tissue, adrenal capsule and at perivascular level; **c.** Atherosclerosis in adrenal vessels. In spite of those morphological changes, glucocorticoid basal levels did not differ much between middle-aged and old individuals (Jensen et al., 1971; Walkman et al., 1991; Barton et al., 1993). Reduced steroidogenesis during ageing is associated to a minor response of adrenocortical cells to ACTH. This would be due to a loss of receptors, membrane alterations and to the minor availability of precursors.

Barton et al. (1993) showed that the plasmatic levels of cortisol and the tests of adrenocortical function did not change with age. A reduced adrenal sensitivity to ACTH has been suggested (Popplewell et al., 1987). The decline of the adrenal response to ACTH with age would be caused by a minor delivery of cholesterol to mitochondria to reach steroidogenesis (Malamed et al., 1983; Popplewell et al., 1987). If adrenal cortices present a low response to ACTH, larger quantities of ACTH would be required and this would be detected at hypophyseal level by an elevated concentration of the hormone (Tang and Phillips, 1978). Efficient feedback exerted by glucocorticoids decline with age. In aged rats, some axis components lose sensitivity to this regulation since resistance to dexamethasone appears and endogenous corticosterone levels remain

Barton y col. (1993) mostraron que los niveles plasmáticos de cortisol y las pruebas de función adrenocortical no cambiaron con la edad. Se ha sugerido una reducción de la sensibilidad adrenal a la ACTH (Popplewell y col., 1987). La declinación de la respuesta adrenal a la ACTH con la edad se debería a una menor entrega de colesterol a las mitocondrias responsables de la esteroidogénesis (Malamed y Carsia, 1983; Popplewell y col., 1987). Si las cortezas adrenales responden menos a la ACTH, se exigirían mayores cantidades de ACTH y esto se detectaría a nivel hipofisario con una concentración elevada de la hormona (Tang y Phillips, 1978). La eficiencia con que los glucocorticoides ejercen la retroalimentación declina con la edad. En ratas envejecidas, algunos componentes del eje pierden sensibilidad a dicha regulación, debido a que se produce resistencia a la dexametasona y los niveles de corticosterona endógena permanecen altos durante largo tiempo (Oxenkrug y col., 1984; Salpolsky y col., 1986). Por ello, la hipersecreción de glucocorticoides en ratas viejas reflejaría una menor sensibilidad del eje a la regulación mediante la retroalimentación.

La hipófisis envejecida sería menos hábil para responder a la CRH hipotalámica (Hylka y col., 1984). El cerebro es el sitio más sensible del eje corticotropo frente a la inhibición por retroalimentación de los glucocorticoides (Levin y col., 1988). Se realizaron estudios ultraestructurales y funcionales de la corteza-médula suprarrenal en ratas viejas, luego de estimulación eléctrica del núcleo ventromedial del hipotálamo en ratas albinas adultas y viejas, detectándose un descenso en el control hipotalámico de las catecolaminas y en la síntesis de corticosteroides. El hipotálamo influyó más sobre las células adenomédulares que sobre las adrenocorticales (Shaposhnikov y Bezrukov, 1985).

A nivel ultraestructural (Jurado, 2003), en ratas jóvenes de ambos sexos se observan corticotropas con electrotransparencia, buen RER-

high for a long time (Oxenkrug et al., 1984; Salpolsky et al., 1986). Thus, hypersecretion of glucocorticoids in old rats would probably reflect minor axis sensitivity to feedback regulation.

The aged hypophysis would be less capable to respond to the pituitary corticotropin releasing hormone (CRH) (Hylka et al., 1984). The brain is the most sensitive place of the corticotrope axis at the moment of facing glucocorticoid feedback inhibition (Levin et al., 1988). Ultrastructural and functional studies were undertaken on the adrenal cortex and the adrenal medulla of old rats after electric stimulation to the ventromedial nucleus of the hypothalamus in adult and old albino rats, revealing a decrease in the hypothalamic control over catecholamines and over the synthesis of corticosteroids. The hypothalamus exerted more influence on adenomedullar than on adrenocortical cells (Shaposhnikov and Bezrukov, 1985).

At ultrastructural level (Jurado, 2003), young rats are observed to have the typical characteristics of corticotropes with electron transparency, well-developed RER-Golgi and secretory granules localized next to the plasmatic membrane (**fig. 10.2**).

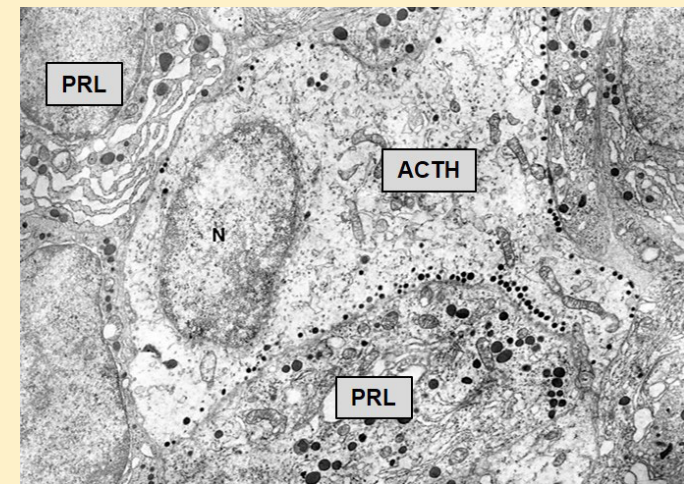


Fig. 10.2. Young male rat corticotrope. Nucleus (N) and aligned secretory granules (*x 10.000*).

Golgi y gránulos secretorios (200 nm) ubicados junto a la membrana plasmática (fig. 10.2).

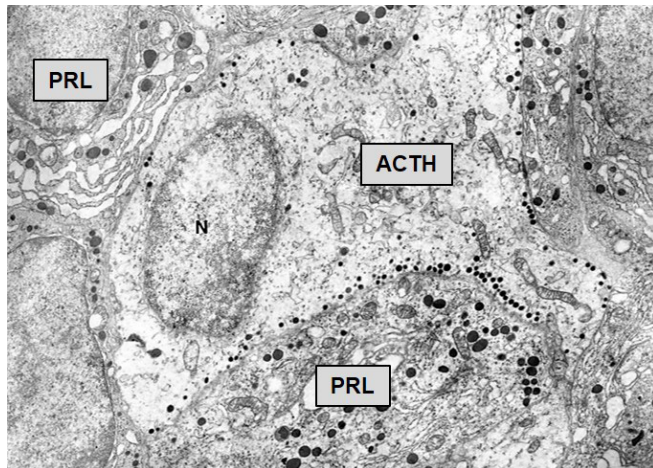


Fig. 10.2. Corticotropa de rata macho joven. N: núcleo y gránulos secretorios alineados (x 10.000).

En las ratas viejas se ven algunas células hipertroóficas con dilatación de las cisternas golgianas y gránulos inmaduros, hipertrofia del RER, incremento de las exocitosis y marcada granulolisis, con

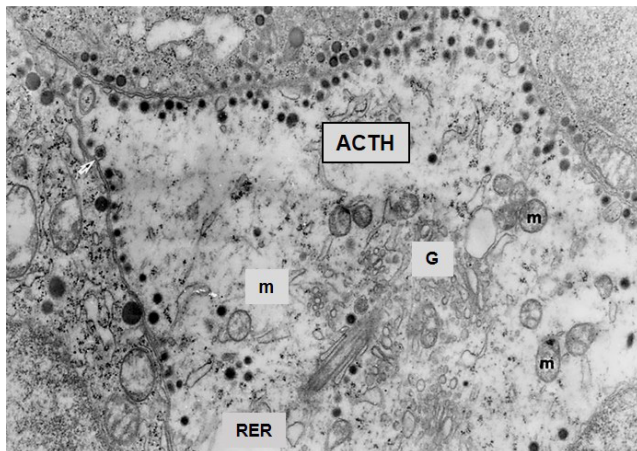


Fig. 10.3. Corticotropa de rata macho joven. RER, mitocondrias (m), Golgi (G) extenso, gránulos alineados paralelos al plasmalema y microtúbulos (Mt) (x 20.000).

Old rats evidence some hypertrophic cells with dilated Golgi cisternae and immature granules, RER hypertrophy, increased exocytosis and marked granulolysis, with increased lysosomal activity. In fig. 10.3 there is evidence of RER, mitochondria, expanded Golgi complex, microtubules and aligned secretory granules parallel to the plasmatic membrane.

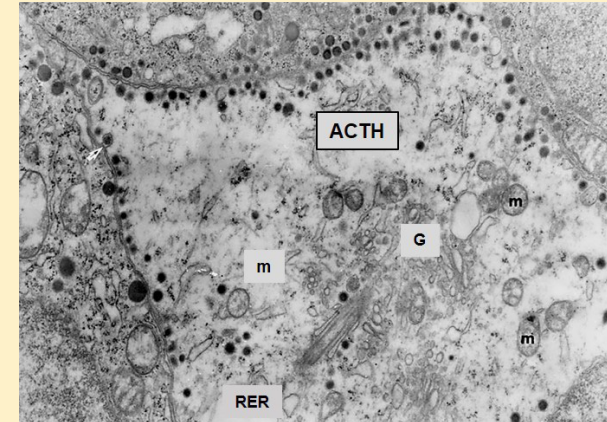


Fig. 10.3. Young male rat corticotrope. RER, mitochondria (m), Golgi (g) secretory granules localized next to the plasmatic membrane and microtubules (Mt) (x 20.000).

In fig. 10.4 a dilated RER, an expanded Golgi and moderate mitochondrial swelling can be observed.

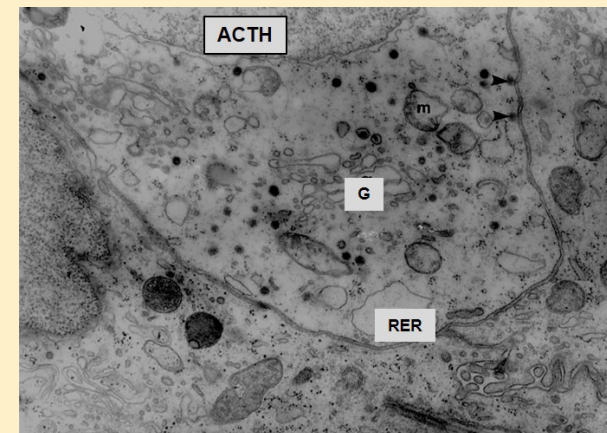


Fig. 10.4. Old male rat corticotrope (ACTH). Mitochondria (m). Dilated RER and Golgi (g) (x 24.000).

aumento de la actividad lisosómica. En la **fig. 10.3** se observa RER, mitocondrias, complejo de Golgi extenso, microtúbulos y gránulos secretorios alineados paralelos a la membrana plasmática.

En la **fig. 10.4** se observa la dilatación del RER y del complejo de Golgi.

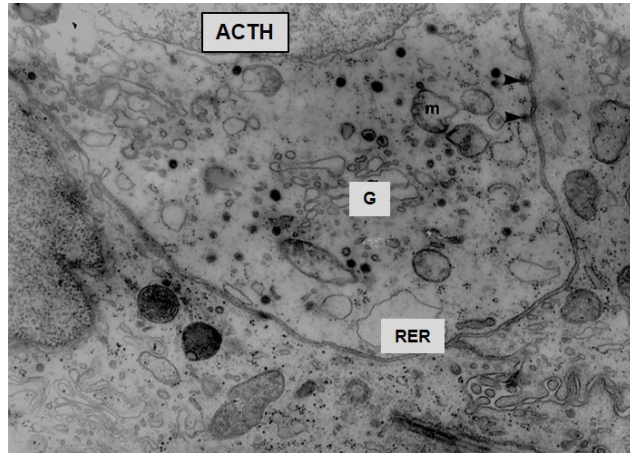


Fig. 10.4. Corticotropa (ACTH) de rata macho vieja. Mitocondrias (m), RER and Golgi (G) dilatados (x 24.000).

En las ratas seniles se observa una mayor dilatación del RER-complejo de Golgi y una moderada tumefacción mitocondrial (**figs. 10.5-10.6**).

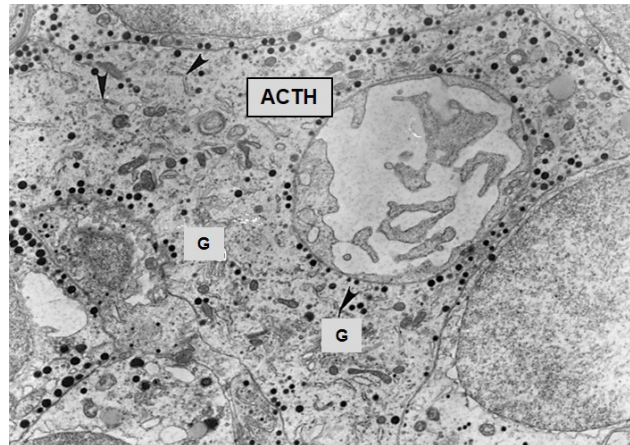


Fig. 10.5. Corticotropa de rata hembra senil. Golgi (G) y RER (flechas) (x 10.000).

In senescent rats a higher RER and Golgi complex as well as mild mitochondrial swelling could be seen (**figs. 10.5-10.6**).

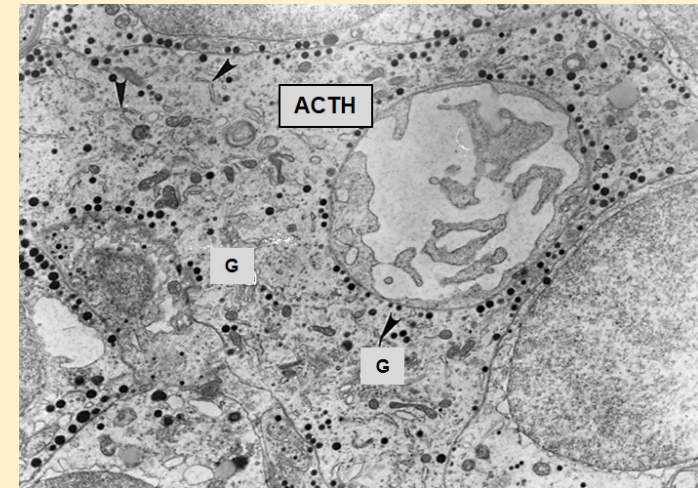


Fig. 10.5. Senescent female rat corticotrope. Golgi (G) and RER (arrows) (x 10.000).

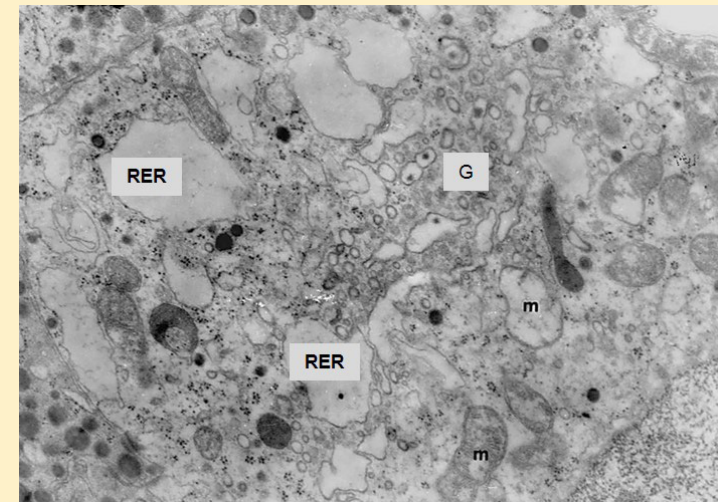


Fig. 10.6. Senescent male rat corticotrope. Golgi (g) with numerous vesicles, scarce secretory granules, dilated RER and mitochondria (m) (x 24.000).

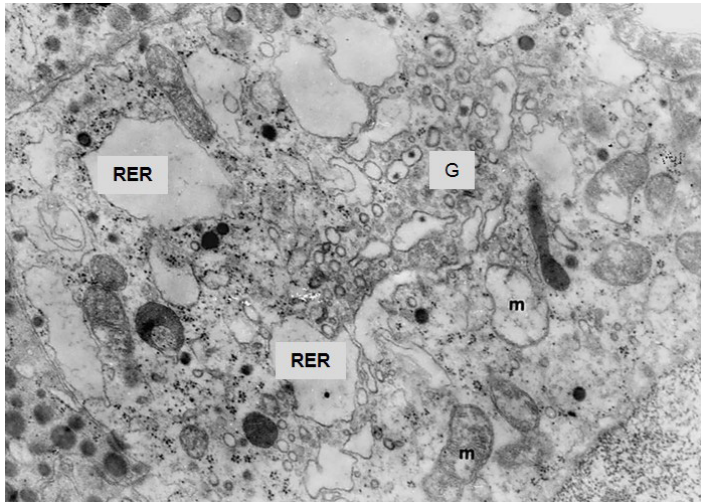


Fig. 10.6. Corticotropa de rata macho senil. Golgi (g) con numerosas vesículas, escasos gránulos secretorios, RER dilatado y mitocondrias (m) (x 24.000).

Concluyendo, el envejecimiento hipofisario presenta un eje H-H-A con: **1.** Disminución de la respuesta hipotalámica a la retroalimentación ejercida por los glucocorticoides y una necrosis neuronal asociada a hiperplasia glial compensadora, con menor liberación de CRH hipotalámica. **2.** Hiposensibilidad hipofisaria a la CRH que determina un descenso de la población corticotropa y alteraciones en su ultraestructura con dilatación del RER, Golgi expandido y tumefacción mitocondrial que provocan una alteración en la síntesis-liberación de la ACTH. **3.** Cambios séricos con variaciones en los ritmos circadianos de ACTH y glucocorticoides. **4.** Hiposensibilidad de los receptores córtico-adrenales a la ACTH y envejecimiento de la glándula adrenal con depósito de lipofuscina e inclusiones amiloides, fibrosis y aterosclerosis de los vasos sanguíneos adrenales.

To conclude, pituitary ageing inserts in an H-H-A axis that presents: **1.** Diminution of the pituitary response to the feedback exerted by glucocorticoids and neuronal necrosis associated with compensatory glial hyperplasia with less pituitary CRH release. **2.** Pituitary hyposensitivity to CRH that determines a decrease in the corticotroph population and ultrastructural alterations with RER dilatation, an expanded Golgi and mitochondrial swelling entails an alteration in the synthesis-release of ACTH. **3.** Serum changes with variations in the circadian rhythm of ACTH and glucocorticoids. **4.** Hyposensitivity of corticoadrenal receptors to ACTH and ageing of the adrenal gland with lipofuscin deposits and amyloid inclusions, fibrosis and atherosclerosis of the adrenal vessels.

References

- Aguilera T. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3):90-95.
- Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986; 7(4):351-378.
- Barton RN, Horan MA, Weijers JW, Sakkee AN, Roberts NA, van Bezooijen CF. Cortisol production rate and the urinary excretion of 17-hydroxy corticosteroids, free cortisol, and beta-hydrocortisol in healthy men and women. *J Gerontol* 1993; 48(5):M213-218.
- Blackman MR. Pituitary hormones and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(4):981-994.
- Blichert-Toft M, Blichert-Toft B, Jensen HK. Pituitary-adrenocortical stimulation in the aged as reflected in levels of plasma cortisol compound S. *Acta Chir Scand* 1970; 136(8): 665-670.

Referencias

- Aguilera T. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3):90-95.
- Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986; 7(4):351-378.
- Barton RN, Horan MA, Weijers JW, Sakkee AN, Roberts NA, van Bezooijen CF. Cortisol production rate and the urinary excretion of 17-hydroxy corticosteroids, free cortisol, and beta-hydrocortisol in healthy men and women. *J Gerontol* 1993; 48(5):M213-218.
- Blackman MR. Pituitary hormones and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(4):981-994.
- Blichert-Toft M, Blichert-Toft B, Jensen HK. Pituitary-adrenocortical stimulation in the aged as reflected in levels of plasma cortisol compound S. *Acta Chir Scand* 1970; 136(8): 665-670.
- Blichert-Toft M. Secretion of corticotrophin and somatotrophin by the senescent adenohipophysis in man. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1975; 78(195): 15-154.
- Brett LP, Chong G, Coyle S, Levine S. The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 1983; 4(2):133-138.
- Brudieux R, Ait Chaoui A, Rakotondrazafy J. Age-related decreases in plasma adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, and aldosterone responses to exogenous corticotropin-releasing hormone in the rat. *Gerontology* 1995; 41(6):308-314.
- Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology* 1994; 134(4):1611-20.
- Dallman MF. Stress update adaptation of the hypothalamic-pituitary axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4(2):62-69.
- Blichert-Toft M. Secretion of corticotrophin and somatotrophin by the senescent adenohipophysis in man. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1975; 78(195): 15-154.
- Brett LP, Chong G, Coyle S, Levine S. The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 1983; 4(2):133-138.
- Brudieux R, Ait Chaoui A, Rakotondrazafy J. Age-related decreases in plasma adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, and aldosterone responses to exogenous corticotropin-releasing hormone in the rat. *Gerontology* 1995; 41(6):308-314.
- Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology* 1994; 134(4):1611-20.
- Dallman MF. Stress update adaptation of the hypothalamic-pituitary axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4(2):62-69.
- Blichert-Toft M. Secretion of corticotrophin and somatotrophin by the senescent adenohipophysis in man. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1975; 78(195): 15-154.
- Brett LP, Chong G, Coyle S, Levine S. The pituitary-adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 1983; 4(2):133-138.
- Brudieux R, Ait Chaoui A, Rakotondrazafy J. Age-related decreases in plasma adrenocorticotrophic hormone, corticosterone, and aldosterone responses to exogenous corticotropin-releasing hormone in the rat. *Gerontology* 1995; 41(6):308-314.
- Cizza G, Calogero AE, Brady LS, Bagdy G, Bergamini E, Blackman MR, Chrousos GP, Gold PW. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology* 1994; 134(4):1611-20.
- Dallman MF. Stress update adaptation of the hypothalamic-pituitary axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4(2):62-69.
- Dekosky S, Scheff S, Cotman C. Elevated corticosterone levels. A possible cause of reduced axon sprouting in aged animals. *Neuroendocrinology* 1984; 38(1):33-38.
- Eriksson L, Westermark P. Age-related accumulation of amyloid inclusions in adrenal cortical cells. *Am J Pathol* 1990; 136(2):461-466.
- Gaal JM, Ryan N, Kovacs K. Corticotroph cells of the human pituitary in old age. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1979; 93(5):992-998.
- Goncharova ND. Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:26.
- Goya RG, Castro MG, Sosa YE. Diminished diurnal secretion of corticosterone in aging female but not male rats. *Gerontology* 1989; 35(4):181-187.

- De Kloet ER. Corticosteroids, stress, and aging. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663:357-371.
- Dekosky S, Scheff S, Cotman C. Elevated corticosterone levels. A possible cause of reduced axon sprouting in aged animals. *Neuroendocrinology* 1984; 38(1):33-38.
- Eriksson L, Westermark P. Age-related accumulation of amyloid inclusions in adrenal cortical cells. *Am J Pathol* 1990; 136(2):461-466.
- Gaal JM, Ryan N, Kovacs K. Corticotroph cells of the human pituitary in old age. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1979; 93(5):992-998.
- Goncharova ND. Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:26.
- Goya RG, Castro MG, Sosa YE. Diminished diurnal secretion of corticosterone in aging female but not male rats. *Gerontology* 1989; 35(4):181-187.
- Harris BN, Saltzman W. Effect of reproductive status on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity and reactivity in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiol Behav* 2013; 112-113:70-76.
- Hayashi Y, Hiyoshi T, Takemura T, Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistological analysis of infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(1):101-105.
- Heroux JA, Grigoriadis DE, De Souza EB. Age-related decreases in corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in rat brain and anterior pituitary gland. *Brain Res* 1991; 542(1):155-158.
- Hylka VW, Sonntag WE, Meites J. Reduced ability of old male rats to release ACTH and corticosterone in response to CRF administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175(1):1-4.
- Issa A, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 1990; 10(10):3247-54.
- Harris BN, Saltzman W. Effect of reproductive status on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity and reactivity in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiol Behav* 2013; 112-113:70-76.
- Hayashi Y, Hiyoshi T, Takemura T, Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistological analysis of infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(1):101-105.
- Heroux JA, Grigoriadis DE, De Souza EB. Age-related decreases in corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in rat brain and anterior pituitary gland. *Brain Res* 1991; 542(1):155-158.
- Hylka VW, Sonntag WE, Meites J. Reduced ability of old male rats to release ACTH and corticosterone in response to CRF administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175(1):1-4.
- Issa A, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 1990; 10(10):3247-54.
- Harris BN, Saltzman W. Effect of reproductive status on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity and reactivity in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiol Behav* 2013; 112-113:70-76.
- Hayashi Y, Hiyoshi T, Takemura T, Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistological analysis of infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(1):101-105.
- Heroux JA, Grigoriadis DE, De Souza EB. Age-related decreases in corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in rat brain and anterior pituitary gland. *Brain Res* 1991; 542(1):155-158.
- Hylka VW, Sonntag WE, Meites J. Reduced ability of old male rats to release ACTH and corticosterone in response to CRF administration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175(1):1-4.
- Issa A, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* 1990; 10(10):3247-54.
- Jensen HK, Blichert-Toft M. Serum corticotrophin, plasma cortisol and urinary excretion of 17-ketogenic steroids in the elderly (age group: 66-94 years). *Acta Endocrinol* 1971; 66(1):25-34.
- Jurado SB. Impact of ageing on the adenohipophyseal populations in the rat. An immunocytochemical and ultrastructural study. Doctoral thesis: Directors: PhD Gómez Dumm CLA - PhD Cónsole GM, 2003.
- Lakatua DJ, Nicolau GY, Bogdan C, Petrescu E, Sackett-Lundeen LL, Irvine PW, Haus E. Circadian endocrine time structure in humans above 80 years of age. *J Gerontol* 1984; 39(6):648-654.
- Landfield PW, Waymire JC, Lynch G. Hippocampal aging and adreno-corticoids: quantitative correlations. *Science* 1978; 202(4372):1098-1102.
- Langlais D, Couture C, Kmita M, Drouin J. Adult pituitary cell maintenance: lineage-specific contribution of self-duplication. *Mol Endocrinol* 2013; 27(7):1103-12.

Sano T, Kovacs KT, Scheithauer BW, Young WF. Aging and human pituitary gland. *Mayo Clinic Proc* 1993; 68(10):971-977.

Sapolsky RM, Krey L, Mc Ewen BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci* 1985; 5(5):1222-27.

Sapolsky RM, Krey L, Mc Ewen BS. The adrenocortical axis in aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging* 1986; 7(5):331-335.

Sapolsky RM, Krey L, Mc Ewen BS. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol* 1983; 18(1):55-64.

Shaposhnikov VM, Bezrukov VV. Age changes in the ultrastructure and function of rat adrenal glands during stimulation of the hypothalamus. *J Submicrosc Cytol* 1985; 17(1):75-81.

Sohal RS. Age pigments. In: Elsevier /North Holland, New York, 1981.

Tang G, Phillips JG. Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *J Gerontol* 1978; 33(3):377-382.

Timiras PS, Quay WD, Vernadakis A. Hormones and aging. In: CRC Press Inc., 1995.

van Eekelen JA, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER. The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the brown Norway rat. *Neurobiol Aging* 1992; 13(1):159-170.

Waltman C, Blackman MR, Chrousos GP, Rieman C, Harman SM. Spontaneous and glucocorticoid-inhibited adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion are similar in healthy young and old men. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(3):495-502.

West CD, Brown H, Simons EL, Carter CD, Kumagai LF, Englert E. Adrenocortical function and cortisol metabolism in old age. *J Clin Endocrinol Metab* 1961, 21:1197-1207.

Sohal RS. Age pigments. In: Elsevier /North Holland, New York, 1981.

Tang G, Phillips JG. Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *J Gerontol* 1978; 33(3):377-382.

Timiras PS, Quay WD, Vernadakis A. Hormones and aging. In: CRC Press Inc., 1995.

van Eekelen JA, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER. The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the brown Norway rat. *Neurobiol Aging* 1992; 13(1):159-170.

Waltman C, Blackman MR, Chrousos GP, Rieman C, Harman SM. Spontaneous and glucocorticoid-inhibited adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion are similar in healthy young and old men. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(3):495-502.

West CD, Brown H, Simons EL, Carter CD, Kumagai LF, Englert E. Adrenocortical function and cortisol metabolism in old age. *J Clin Endocrinol Metab* 1961, 21:1197-1207.

CAPÍTULO 11

Envejecimiento de la población folículo-estelar

Las células folículo-estelares (FE) fueron reconocidas por Rinehart y Farquhar (1955) e inmunomarcadas con proteína S100 (Girod y col, 1985; Watanabe y Hashimoto, 1993). Los estudios morfológicos de la pituitaria anterior permitieron observar sus largas prolongaciones citoplasmáticas intercaladas entre las células endocrinas vecinas y sus conexiones con capilares a modo de “pies chupadores” de tipo glial.

Girod y col. (1986) indicaron la relación entre las células FE y las células secretoras, aplicando marcación inmunoenzimática doble. Horiguchi y col. (2010) observaron mediante fluorescencia células FE vivas con procesos citoplasmáticos entre las células endocrinas y conexiones con las FE vecinas que expresaron receptores de matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágenos). La metaloproteinasa-9 se detectó en las células FE, siendo necesaria en la conexión intercelular y para su proliferación en presencia de laminina (Ilmiawati y col., 2012).

CHAPTER 11

The ageing of folliculo-stellate population

Folliculo-stellate (FS) cells were recognized by Rinehart and Farquhar in 1955 and immunostained with protein S100 (Girod et al., 1985; Watanabe and Hashimoto, 1993). Morphological studies of the anterior pituitary allowed observing their long cytoplasmic prolongations which interdigitated with neighbouring endocrine cells and their capillary connections like glial “sucking feet”.

Girod et al. (1986) showed the relationship between FS cells and secretory cells by means of *double immunoenzymatic staining*. Horiguchi et al. (2010) observed by means of immunofluorescence living FS cells with cytoplasmic processes extending between the endocrine cells and interconnections with neighbouring FS cells that expressed receptors of extracellular matrix (laminin, fibronectin and collagen). Metaloproteinase-9 was detected in FS cells, which is necessary in the intercellular connection and for its proliferation in the presence of laminin (Ilmiawati et al., 2012).

Además, Allaerts y col. (1996 y 1997b) hallaron una población de células estrelladas en hipófisis anterior que expresaron marcadores de CMH-clase II, morfología dendrítica y rasgos ultraestructurales de las células FE. La inmunomarcación de las células FE con una citoqueratina de bajo PM (CK-8) demuestra una diferenciación epitelial (Tsuchida y col., 1993). De acuerdo a Yamashita y col. (2005), en la adenohipófisis humana se inmunomarcaron células tipo citoqueratina (CK) positivas y células estrelladas S100 positivas cercanas a las células endocrinas.

El desarrollo de las células FE en *pars distalis* de hipófisis fetal se investigó mediante inmunocitoquímica con proteína S100 y proteína gliofibrilar ácida (PGFA), apareciendo a las 15 semanas y 18 semanas, respectivamente. Las diferencias temporales podrían indicar la presencia de dos tipos celulares o de uno solo en progresión. Las células FE se originarían cerca de la *pars intermedia* y luego pasarían a la *pars distalis* (Coates y Doniach, 1988). La PGFA puede ser considerada como marcadora de pituicitos y células FE (Redecker y Fechner, 1989).

Las células FE tienen un gran potencial de diferenciación con características similares a los astrocitos (Osuna y col., 2012). Horvath y Kovacs (2002) asignaron naturaleza multifacética a las células FE y sugirieron que representan un tipo pluripotencial de célula madre adulta. En base a este criterio se explicaría el pasaje de células endocrinas a FE mediante una retrodiferenciación de precursores derivados de la bolsa de Rathke. Las funciones de las células FE son probablemente reguladas por interacciones con la matriz extracelular e interactúan con los pericitos vía TGFbeta2 (Tsukada y col., 2016).

Las células FE cumplen funciones de soporte, trofismo, transferencia de iones y metabolitos, secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Allaerts y col., 1990). En agregado, se comunicó que las células FE son fagocitos de los restos celulares (García Navarro y col., 1989) y de los cuerpos apoptóticos (Drewett y col., 1993; Claudius y col., 2006). Allaerts y col. (1997a) hallaron una distribución heterogénea de las células FE mediante estudios inmuno-histoquímicos y ultraestructurales.

Las células FE secretan moléculas diversas: interleuquina 6 (IL-6) (Vankelecom y col., 1993; Allaerts y col., 1997a), fibronectina, factor de

Also, Allaerts et al. (1996 and 1997b) found a population of FS cells in the anterior pituitary that expressed CMH-type II markers, dendritic morphology and ultrastructural features of FS cells. FS cell staining for low MW cytokeratin (CK-8) evidence epithelial differentiation (Tsuchida et al., 1993). According to Yamashita et al. (2005), immunohistochemistry in human pituitaries was positive for cytokeratin-like cells (CK) and for S100 folliculo-stellate cells close to endocrine cells.

The development of FS cells in the *pars distalis* of foetal pituitaries was investigated by means of an immunohistochemical study for S100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP), appearing at weeks 15 and 18, respectively. Temporal differences might indicate the presence of two cell types or of only one in progressive process. FS cells originate near the *pars intermedia* and would then move to the *pars distalis* (Coates and Doniach, 1988). PGFA can be considered as a marker protein of pituicytes and FS cells (Redecker and Fechner, 1989).

FS cells have a great differentiation potential with characteristics similar to those of astrocytes (Osuna et al., 2012). Horvath and Kovacs (2002) attributed a multifaceted nature to FS cells and suggested that they represent a pluripotent type of adult stem cell. This criterion can explain the passage of endocrine cells to FS cells by means of retro differentiation of precursor cells derived from Rathke's pouch. The functions of FS cells are likely regulated by extracellular matrix interactions and interacts with pericyte via TGFbeta2 (Tsukada y col., 2016).

They were attributed the functions of support, trophism, ion and metabolite transference, cytokine secretion and growth factors (Allaerts et al., 1990). In addition, FS cells have been reported to be phagocytes of the cell debris (García Navarro et al., 1989) and of apoptotic bodies (Drewett et al., 1993). Allaerts et al. (1997a) found homogeneous distribution of FE cells by immunohistochemical and ultrastructural studies.

These cells secrete different molecules: interleukin 6 (IL-6) (Vankelecom et al., 1993; Allaerts et al., 1997a), fibronectin, vascular en-

crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor inhibitorio de la leucemia (LIF) (Ferrara y col., 1992). La IL-6, sintetizada y secretada por las células FE (Vankelecom y col., 1989), estimuló la secreción de PRL, GH, FSH y LH *in vivo* (Spangelo y col., 1989). La liberación del polipéptido activador de la adenilato-ciclasa (PACAP) en la pituitaria ha sido detectado en la línea celular TtT/GF. Este factor estimuló la proliferación de las células FE, así como la producción de IL-6 (Arimura, 1992; Matsumoto y col., 1993).

La presencia de uniones intercelulares en las prolongaciones de las células FE permitiría la transferencia de iones y metabolitos. Esto explica el aumento de estas células en la periferia de lesiones adenomatosas y necróticas. Las células FE ejercen funciones paracrinas que serían imprescindibles para el funcionamiento armónico de las células endocrinas (Coates y col., 1988). La red de células FE interconecta los diferentes folículos sugiriendo una estructura sincitial y los mensajes pasarían a través de las uniones hendidas (Soji y Herbert, 1989).

Las lactotropas, somatotropas, luteinizantes y corticotropas en cultivo modificaron su respuesta a los diferentes agentes extracelulares, dependiendo de la proporción de células FE presentes (Allaerts y col., 1994). Harrison y col. (1982) demostraron en adenohipófisis de aves una relación morfológica y funcional entre tirotropas y células FE. Allaerts y col. (1994) trabajaron en cultivos de gonadotropas enriquecidos con células FE y observaron una atenuación en el porcentaje de secreción de LH frente a respuestas tempranas y tardías a la GnRH.

Además, Katayama y col. (1992) sugirieron que las células FE de la pituitaria anterior estarían involucradas en la regulación paracrina y en la morfogénesis de las células folículo-tropas, afectando la acción de la activina A mediada por la follistatina. En un cultivo monocapa de las células de la hipófisis anterior, los glucocorticoides aumentaron la actividad de una enzima que se halla en las células FE y es esencial para el metabolismo del glutamato en el sistema nervioso: la glutamina sintetasa (Shirasawa y Yamanouchi, 1999). La población FE contiene una proteína S100 reactiva (Cocchia y Miani, 1980; Nakajima y col., 1980), capaz de

dothelial growth factor, fibroblastic growth factor and leukaemia inhibitory factor (Ferrara et al., 1992). Molecule IL-6, synthesized and secreted by FS cells (Vankelecom et al., 1989), stimulated PRL, GH, FSH and LH secretion *in vivo* (Spangelo et al., 1989). The release of the *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) has been detected in the TtT/GF cell lineage. This factor stimulated the proliferation of FS cells as well as the production of IL-6 (Arimura, 1992; Matsumoto et al., 1993).

The presence of intercellular junctions in FS cell prolongations would be related to ion and metabolite transference. This would explain the increase of these cells in the periphery of adenomatous and necrotic lesions. Folliculo-stellate cells would have paracrine functions essential for balanced functioning of endocrine cells (Coates et al., 1988). The network of FS cells would interconnect the different follicles thus suggesting a syncytial structure, and messages would pass through the gap junctions (Soji and Herbert, 1989).

Lactotropes, somatotropes, luteinizing and corticotropes in culture modified their response to the different extracellular agents depending on the proportion of FS cells present (Allaerts et al., 1994). Harrison et al. (1982) demonstrated in bird adenohipophysis a morphologic and functional relationship between thyrotropes and FS cells. Allaerts et al. (1994) worked on gonadotrope cultures enriched with FS cells and observed a reduction in the percentage of LH secretion between early and late responses to GnRH.

Also, Katayama et al. (1992) suggested that anterior pituitary FS cells would be involved in the paracrine regulation of the function and morphogenesis of folliculotrope cells thus affecting the action of activin A mediated by follistatin. In a monolayer culture of anterior pituitary cells, glucocorticoids increased the activity of an enzyme that is present in FS cells and is essential for the metabolism of glutamate in the nervous system: glutamine synthetase (Shirasawa and Yamanouchi, 1999). Also, the FS population contains a reactive S100 protein (Cocchia and Miani, 1980; Nakajima et al., 1980) capable of

estimular la secreción de PRL bajo ciertas condiciones como el descenso de la inhibición de la dopamina (Allaerts y col., 1990).

Aunque se han comunicado estudios inmunohistoquímicos cuantitativos de las células secretoras de hormonas de la pituitaria anterior en ratas viejas (Takahashi y Kawashima, 1983; Cónsole y col., 1994; 1995; 1997 y 1998; Jurado y col., 1998), escasos intentos han sido hecho para cuantificar los cambios progresivos en la población FE durante el envejecimiento en general o en un estadio avanzado de senescencia en particular.

Nuestro modelo experimental en *pars distalis* de ratas jóvenes (4 meses), viejas (20 meses) y seniles (29 meses), representa un equivalente a un modelo humano extendido hasta los 80-100 años.

Realizamos un estudio inmunohistoquímico morfométrico marcando la población FE con suero anti-S100 (Cónsole y col., 2000). Las células FE se hallaron dispersas dentro de toda la *pars distalis* y alcanzaron un valor cercano al 2.5 % de la población total del parénquima (**fig. 11.1**).

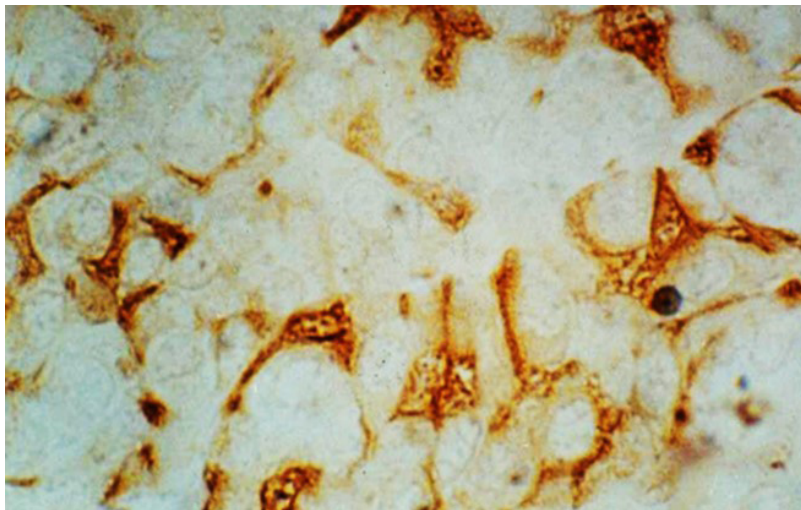


Fig. 11.1. Células FE (*EnVision peroxidase, anti-S100, x 600*).

stimulating PRL secretion under specific conditions such as decreased dopamine inhibition (Allaerts et al., 1990).

Although there have been reports on quantitative immunohistochemical studies of hormone secretory cells of old rat anterior pituitaries (Takahashi and Kawashima, 1983; Cónsole et al., 1993; 1994; 1995; 1997; 1998; Jurado et al., 1998), few attempts have been made to quantify the progressive changes in the FS population during ageing in general or in a specific advanced stage of senescence.

Our experimental model in *pars distalis* of 4-month-old young rats, 20-month-old old rats and 29-month-old senescent rats represents an equivalent of a human model extended up to 80-100 years of age. We performed a morphometric immunohistochemical study by labelling the FS population with anti-S100 serum (Cónsole et al., 2000).

Folliculo-stellate cells were found to be spread inside the whole *pars distalis* and reached a value close to 2.5 % of the total parenchyma population (**fig. 11.1**).

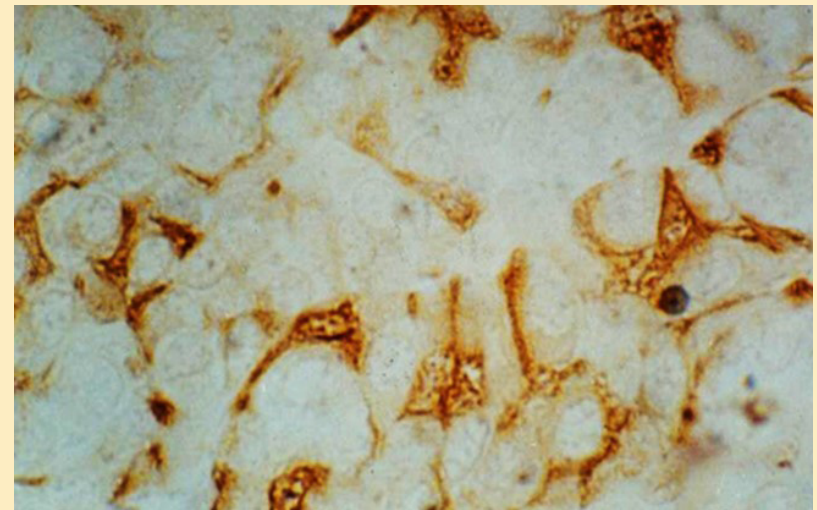


Fig. 11.1. FS cells (*EnVision peroxidase, anti-S100, x 600*).

Estos datos estuvieron en concordancia con los valores de 1 a 6% publicados por otros autores (Girod y col., 1985; Girod y Trouillas, 1993).

Poco se conoce acerca del efecto del envejecimiento sobre las células FE, a pesar de las múltiples funciones que han sido comunicadas para esta población. Hemos hallado una progresiva declinación del número de células FE con la edad en ratas machos y hembras que se evidenció aun antes de la evaluación morfológica (fig. 11.2).

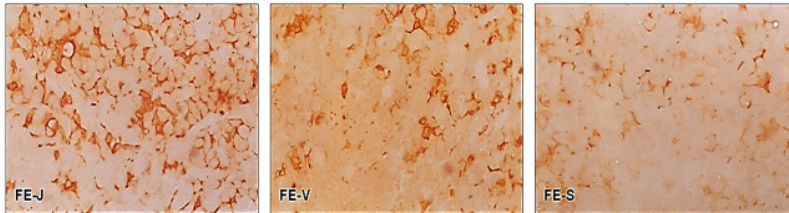


Fig. 11.2. Células FE de ratas jóvenes (J), viejas (V) y seniles (S) machos
(EnVision peroxidasa, anti-S100, x 400).

Hemos detectado una hiperplasia de células FE en la periferia de los microprolactinomas (fig. 11.3).

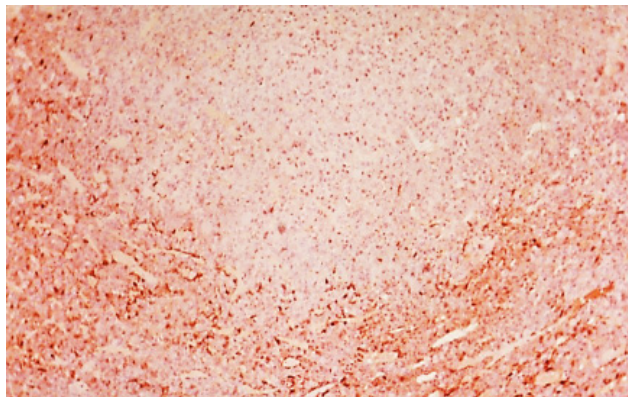


Fig. 11.3. Microprolactinoma. Hiperplasia peritumoral de células FE
(EnVision peroxidasa, anti-S100, x 200).

En concordancia con nuestras observaciones, Farnoud y col. (1994) describieron células FE concentradas a nivel peritumoral. También Nis-

These data agreed with values 1 to 6% published by other authors (Girod et al., 1985; Girod and Trouillas, 1993).

Little has been known about the ageing effect on FS cells, in spite of the multiple functions reported for this population. We have found a progressive decline of the number of FS cells with age in male and female evidenced even before the morphometric evaluation (fig. 11.2).

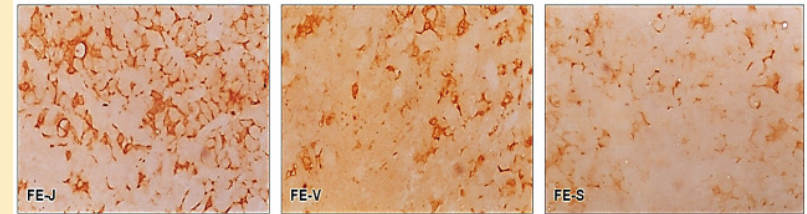


Fig. 11.2. FS population from young (Y), old (O) and senescent (S) rats.
(EnVision peroxidase, anti-S100, x 400).

We detected FS hyperplasia in the periphery of microprolactinoma (fig. 11.3). In agreement with our observations, Farnoud et al. (1994) described that there was concentration of FS cells at peritumoral level. Nishioka et al., (1991) found numerous FS cells bordering the adenoma, thus suggesting an association between FS cells and the glial nervous tissue.

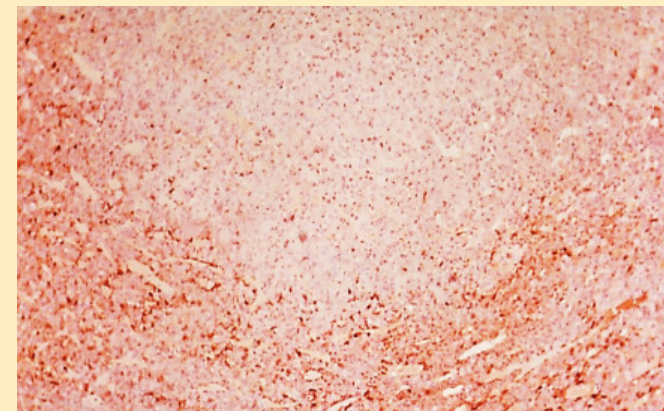


Fig. 11.3. Microprolactinoma. Peritumoral hyperplasia of FS cells
(EnVision peroxidase, anti-S100, x 200).

hioka y col., (1991) hallaron numerosas células FE bordeando el adenoma, sugiriendo una asociación entre las células FE y el tejido nervioso glial. Esta distribución característica de las células FE inmunorreactivas se logró a nivel experimental mediante un tratamiento a largo plazo con estrógenos que fue prevenido con progesterona (Heinzlmann y Koves, 2008).

Las células FE S100 positivas están presentes en pituitarias normales e hiperplásicas y regularían la secreción de PRL mediante mecanismos paracrinos (Lloyd y Mailloux, 1988). Kameda (1991) comunicó la presencia de folículos con inclusiones coloidales, filamentos intermedios y numerosos lisosomas en las células FE de *pars distalis* durante el envejecimiento.

El análisis de los parámetros morfológicos (Cónsole y col., 2000) reveló un descenso significativo ($p < 0.05$) en la densidad de volumen (DV) y en la densidad de células (DC) de ratas viejas y seniles respecto a jóvenes de ambos sexos. No se halló dimorfismo sexual excepto en el grupo de hembras portadoras de prolactinomas (**tabla 1**).

Tabla 1. Morfometría de las células FE de la pituitaria de ratas jóvenes, viejas y seniles

HEMBRAS	DV (x 10 ⁻²)	DV (valor de p)	DC (x 10 ⁻⁴)	DC (valor de p)
Joven (6) (a)	2.14 ± 0.68	a-b: p < (0.05)	4.66 ± 1.48	a-b p < (0.05)
Vieja (6) (b)	0.63 ± 0.12	b-c NS; b-d NS	1.35 ± 0.27	b-c NS; b-d NS
Senil (5) (c)	0.35 ± 0.05	a-c: p < (0.05)	0.76 ± 0.12	a-c p < (0.05)
Senil-PRL (4) (d)	1.55 ± 0.31	a-d NS; c-d p < (0.02)	3.36 ± 0.68	a-d NS; c-d p < (0.02)
MACHOS	DV (x 10 ⁻²)	DV (valor de p)	DC (x 10 ⁻⁴)	DC (valor de p)
Joven (6) (a)	2.21 ± 0.65	a-b: p < (0.05)	4.80 ± 1.41	a-b: p < (0.05)
Vieja (6) (b)	0.80 ± 0.09	b-c = NS	1.47 ± 0.59	b-c = NS
Senil (4) (c)	0.40 ± 0.04	a-c: p < (0.05)	0.89 ± 0.09	a-c: p < (0.05)

DV: densidad de volumen; DC: densidad celular. Los valores son expresados como media ± ES; número de ratas entre paréntesis (Cónsole y col., 2000).

Estos resultados estuvieron en contraposición con los hallazgos de Pavlovic y col. (2013), quienes mediante un estudio inmunohistoquímico comunicaron el aumento de las células FE con la edad.

This distribution, typical of immunoreactive FS cells, was achieved at experimental level by means of a long-term estrogen-treatment previously prevented by progesterone (Heinzlmann and Koves, 2008). S-100 positive FS cells are present in normal and hyperplastic pituitaries and would regulate PRL secretion by means of paracrine mechanisms (Lloyd and Mailloux, 1988). Kameda (1991) reported the presence of follicles with colloid inclusions, intermediate filaments and numerous lysosomes in the FS cells of the *pars distalis* during aging.

Our morphometric results have revealed a clear cut in the decline of the VD and CD of FS cells of old and senescent rats of both sexes when comparing to young animals, with the exception of the prolactinoma-carrying females which evidenced FS cell hyperplasia. The analysis of the morphologic parameters (Cónsole et al., 2000) revealed a significant decrease ($p < 0.05$) in volume density (VD) and in cell density (CD) in old and senescent rats compared to young animals of both sexes. No sexual dimorphism was found with the exception of the prolactinoma-carrying female group (**table 1**).

TABLE 1. Morphometry of FS cells of young, old and senescent rat pituitaries

FEMALES	VD (x 10 ⁻²)	VD (p value)	CD (x 10 ⁻⁴)	CD (p value)
Young (6) (a)	2.14 ± 0.68	a-b: p < 0.05	4.66 ± 1.48	a-b p < 0.05
Old (6) (b)	0.63 ± 0.12	b-c NS; b-d NS	1.35 ± 0.27	b-c NS; b-d NS
Senescent (5) (c)	0.35 ± 0.05	a-c: p < 0.05	0.76 ± 0.12	a-c p < 0.05
Senescent-PRL (4)(d)	1.55 ± 0.31	a-d NS- c-d p < 0.02	3.36 ± 0.68	a-d NS- c-d p < 0.02
MALES	VD (x 10 ⁻²)	VD (p value)	CD (x 10 ⁻⁴)	CD (p value)
Young (6) (a)	2.21 ± 0.65	a-b: p < 0.05	4.80 ± 1.41	a-b: p < 0.05
Old (6) (b)	0.80 ± 0.09	b-c = NS	1.47 ± 0.59	b-c = NS
Senescent (4) (c)	0.40 ± 0.04	a-c: p < 0.05	0.89 ± 0.09	a-c: p < 0.05

VD: volume density; CD: cell density. Values are expressed as mean ± SD; number of rats in parenthesis (Cónsole et al., 2000).

These results contrasted those found by Pavlovic et al. (2013), who reported in their immunohistochemical studies an increase of FS cells

El envejecimiento produjo marcados cambios morfológicos en las células endocrinas según han sido comunicados mediante inmunohistoquímica cuantitativa (Takahashi y Kawashima, 1983; Cónsole y col., 1994; 1995 y 1997), así como mediante observaciones ultraestructurales (Jurado y col., 1998; Cónsole y col., 1998).

En nuestro estudio ultraestructural (Cónsole y col., 2000) las células FE de las ratas jóvenes presentan las características típicas. Se observa un citoplasma electrotransparente desprovisto de gránulos secretorios y largas prolongaciones citoplasmáticas que se entremezclan con las células endocrinas vecinas (figs. 11.4-11.6).

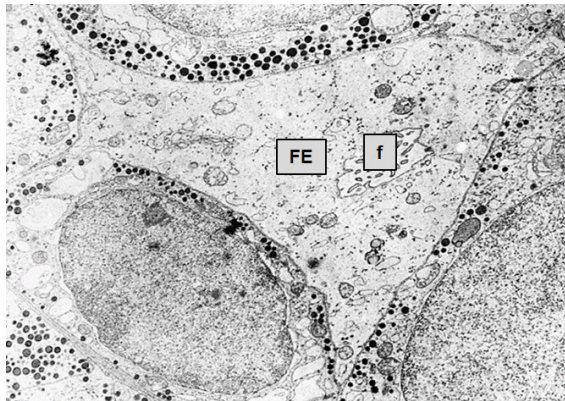


Fig. 11.4. Célula FE de rata macho joven. Folículo (f) (x 24.000).

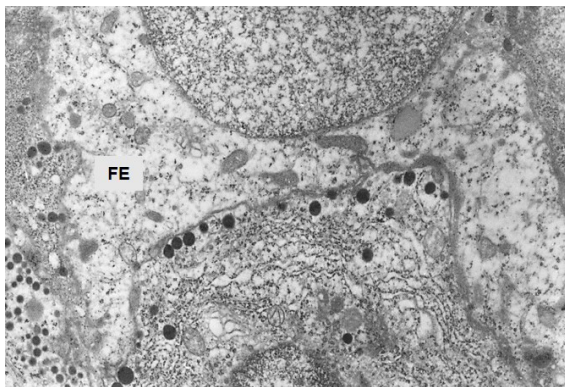


Fig. 11.5. Célula FE de rata macho joven. Prolongación citoplasmática de FE entre células vecinas y polirribosomas en el citoplasma (x 12.000).

with age. Ageing produced marked morphological changes in endocrine cells according to what was reported by means of quantitative immunohistochemistry (Takahashi and Kawashima, 1983; Cónsole et al., 1994 and 1995; Cónsole; 1997), as well as by means of ultrastructural observations (Jurado et al., 1998; Cónsole et al., 1998).

In our ultrastructural study (Cónsole et al., 2000) FS cells of young rats presented typical characteristics: clear cytoplasm lacking granules and long prolongations that intermingle with neighbouring cells (figs. 11.4-11.6).



Fig. 11.4. Young male rat FS cell. Follicle (f) (x 24.000).

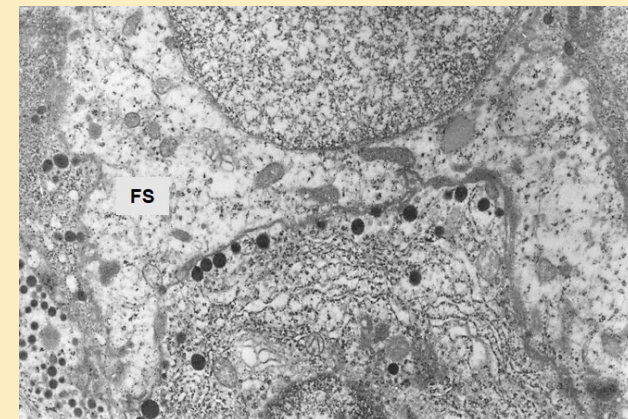


Fig. 11.5. Young male rat FS cell. Cytoplasmic prolongation of FS cells to neighbouring cells and polyribosomes in the cytoplasm (x 12.000).

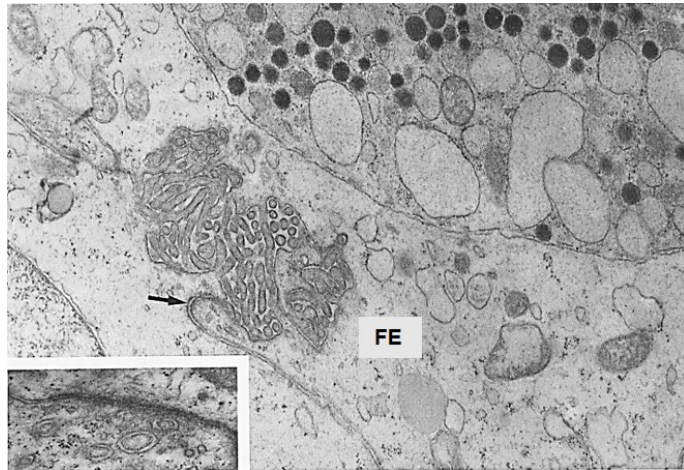


Fig. 11.6. Células FE de rata joven hembra. Limitan un folículo con microvellosidades en sus bordes (x13.000). Recuadro: unión hendidura entre células FE (x 20.000).

Numerosas células FE de ratas viejas muestran un RER dilatado con un contenido electrodenso, revestido por ribosomas (figs. 11.7-11.8).

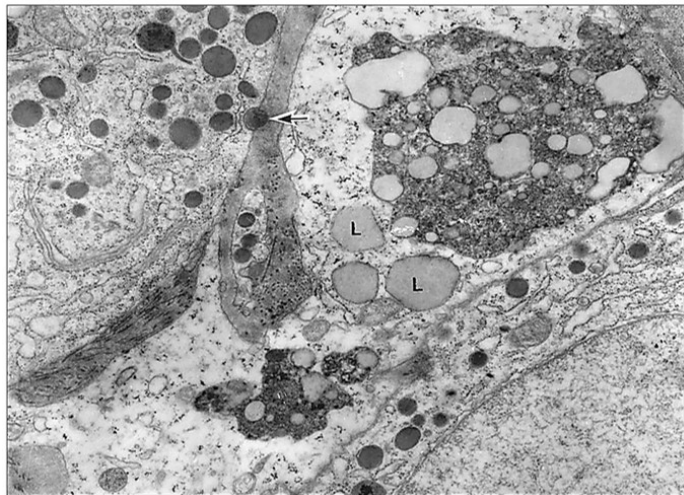


Fig. 11.7. Células FE de rata hembra vieja. Lisosomas, gotas de lípidos (L) y exocitosis (flecha) (x 20.000).

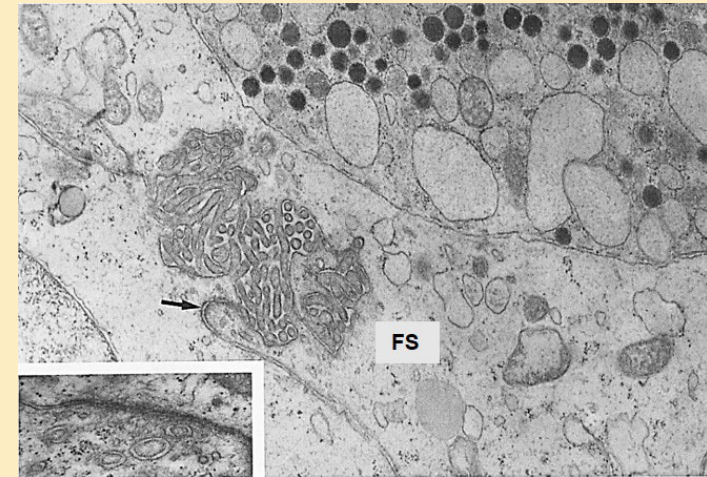


Fig. 11.6. Young male rat FS cell. They limit a follicle with microvilli on the borders (x 13.000). Inset: gap junctions only between adjacent FS cells (x 20.000).

Numerous FS cells of old rats evidenced a dilated RER with a clear to a mildly electron-dense content lined by a smaller number of ribosomes (Fig. 11.7-11.8).

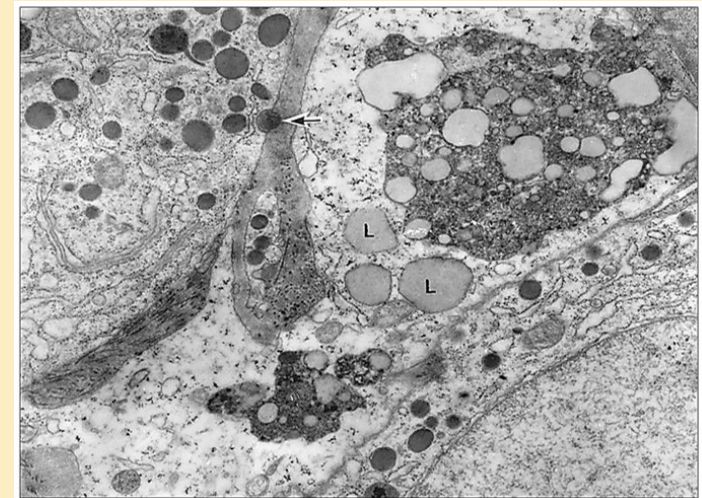


Fig. 11.7. FS cell. Old female rat. Lysosomes, lipid drops (L) and exocytosis (arrow) (x 20.000).

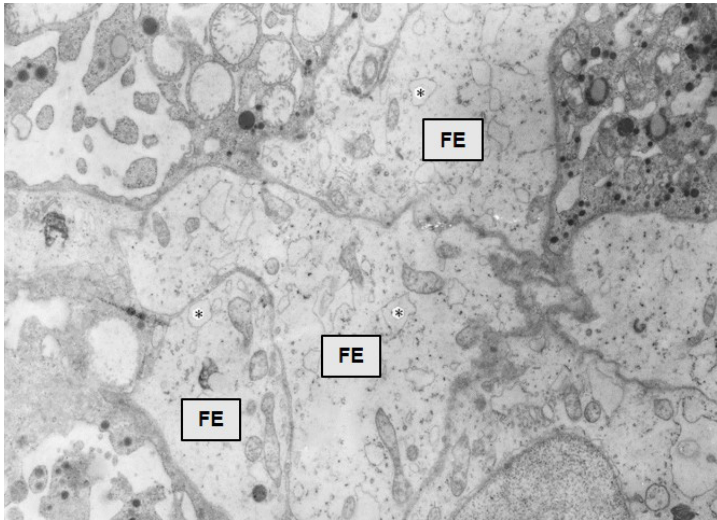


Fig. 11.8. Células FE de rata hembra vieja. Cisternas (*) dilatadas de RER (x 12.000).

En las ratas seniles se observan cisternas dilatadas de RER con material moderadamente denso y procesos de autofagia lisosómica (Figs. 11.9-11.10).

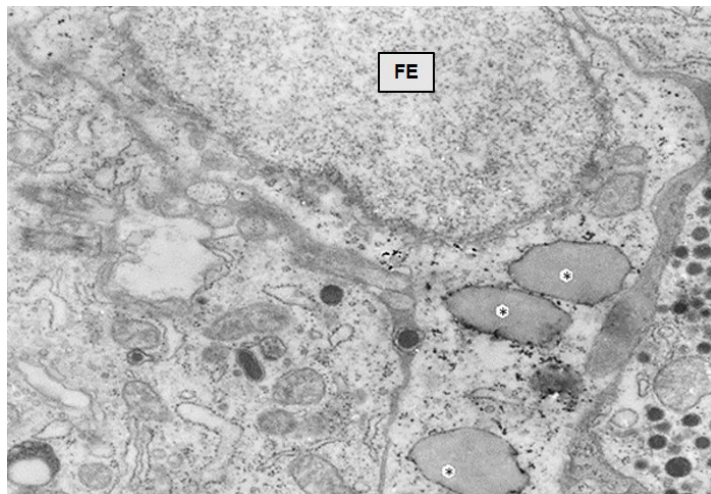


Fig. 11.9. Células FE de rata hembra senil. RER (*) dilatado con material de densidad moderada y ribosomas adheridos (x 24.000).

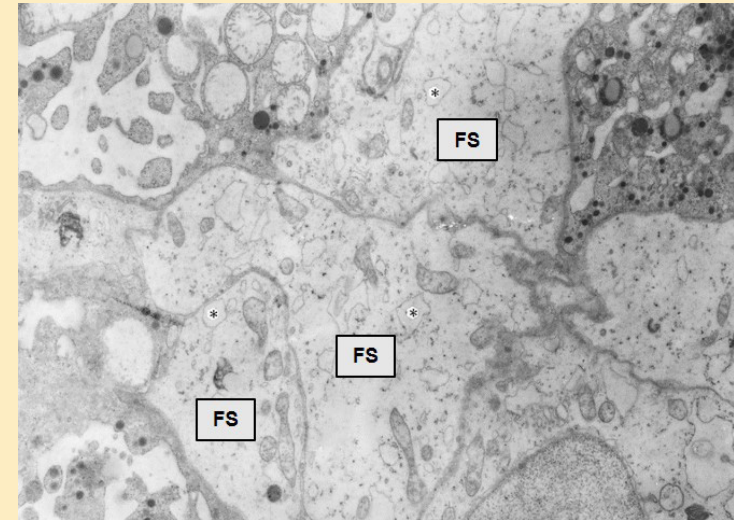


Fig. 11.8. Old female rat FS cell. RER: dilated cisternae (*) (x 12.000).

In figs. 11.9-11.10 FS cells from senescent rats can be observed to show numerous lysosomes and a dilated RER.

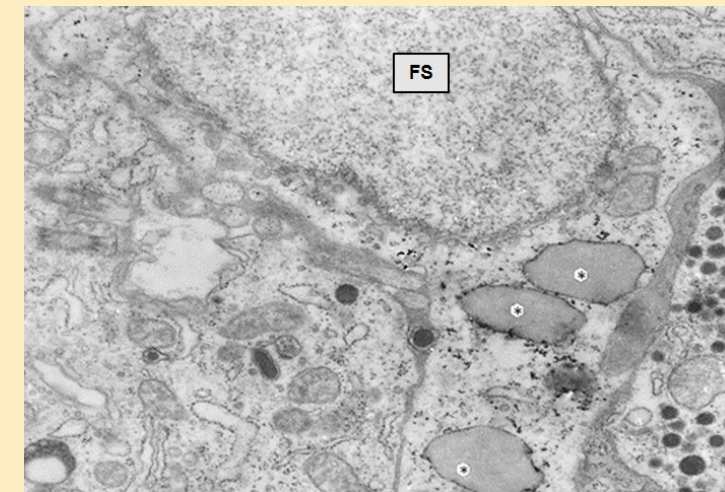


Fig. 11.9. Senescent female rat FS cell. Dilated RER (*) with ribosomes (x 24.000).

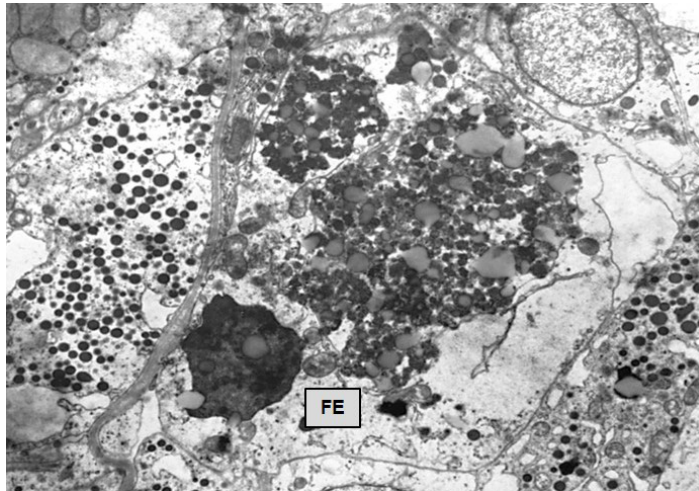


Fig. 11.10. Células FE de rata hembra senil. *Proceso autofágico lisosómico (x 10.000).*

La ultraestructura de las células FE permite detectar una red que envía procesos citoplasmáticos entre las células endocrinas y presenta cavidades foliculares con coloide, cilias y microvellosidades. Harrison y col. (1982) logró una manipulación experimental al administrar TRH y observó cambios ultraestructurales: RER dilatado, Golgi expandido, gránulos secretorios recién sintetizados y dilatación de las cavidades foliculares llenas de coloide. La presencia de un sistema de folículos interrelacionados en la adenohipófisis podría indicar la presencia de un sincitio con señales de transmisión a través de las uniones hendidura. Tales uniones metabólicas aumentan rápidamente con la edad hasta los 40-45 días (Soji y col., 1997) y responderían a señales intracelulares específicas que inducen el cierre del canal en un proceso reversible (Godwin y col., 1993). Morand y col. (1996), usando una prueba fluorescente en cultivo demostraron que los cinco tipos celulares endocrinos de la pituitaria anterior de rata, así como las células FE están funcionalmente acopladas a través de las uniones hendidura. Kurono y col. (1994) detectaron uniones de tipo septal que tendrían una función de sostén de los folículos. Nuestras observaciones permitieron detectar uniones hendidura entre células FE.

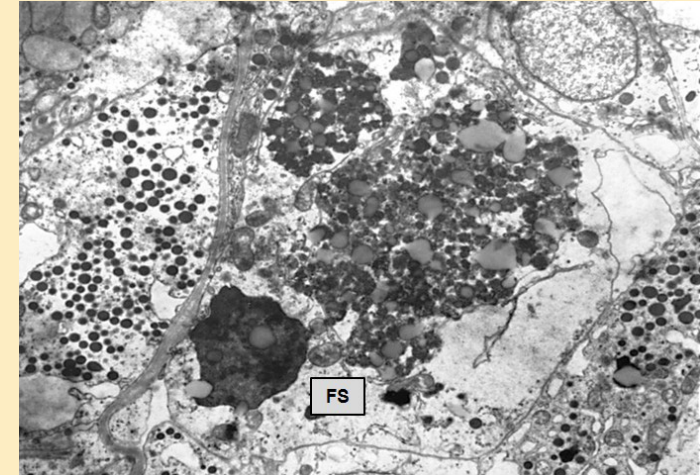


Fig. 11.10. Senescent female rat FS cell. *Lysosomal autophagy process (x 10.000).*

The structure of FS cells allows detecting a network that sends cytoplasmic processes among the endocrine cells and presents follicular cavities with colloids, cilia and microvilli. Harrison et al. (1982) managed to an experimental manipulation when the thyrotropin releasing hormone (TRH) was administered, and observed ultrastructural changes; dilated RER, expanded Golgi, recently synthesized secretory granules and dilation of the follicular cavities filled with colloid. The presence of a system of follicles interrelated in the adenohipophysis might indicate the presence of a syncytium with transmission signals through gap junctions (Soji et al., 1992). Such metabolic junctions rapidly increase with age up to 40-45 days (Soji et al., 1997) and might respond to specific intracellular signals that induce the closing of the canal in reversible process (Godwin et al., 1993). Morand et al. (1996), using a fluorescent test in culture demonstrated that the five endocrine cell types of the anterior pituitary of rat as well as the FS cells are functionally coupled through gap junctions. Kurono et al. (1994) detected septal-like junctions that might have follicle support function. Our observations allowed detecting gap junctions only between FS cells.

Concluyendo, nuestros estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales de la población FE se correlacionaron y mostraron un marcado descenso de las células FE en ratas viejas y seniles.

Referencias

- Allaerts W, Carmeliet P, Deneff C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Jeucken PH, Morreau H, Bosman FT, Drexhage HA. Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol* 1996; 8(1):17-29.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997a; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Tijssen AMI, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Allaerts W., Salomon B, Leenen PJ, van Wijngaardt S, Jeucken PH, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage HA. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* 1997b; 78(1-2):184-197.
- Arimura P. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of search. *Regul Pept* 1992; 37(3):287-303.
- Claudius L, Yoshimi Y, Yoichiro H, Gabriel M, Koichi M. Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary collo-

We thus conclude that the ageing process produces a well-defined impact on the immunohistochemical and ultrastructural studies of FS cell population with a decrease of FS cells in old and senescent rats.

References

- Allaerts W, Carmeliet P, Deneff C. New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 71(2):73-81.
- Allaerts W, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Jeucken PH, Morreau H, Bosman FT, Drexhage HA. Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol* 1996; 8(1):17-29.
- Allaerts W, Jeucken PH, Debets R, Hoefakker S, Claassen E, Drexhage HA. Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* 1997a; 9(1):43-53.
- Allaerts W, Tijssen AMI, Jeucken PH, Drexhage HA, de Koning J. Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 1994; 130(5):530-539.
- Allaerts W., Salomon B, Leenen PJ, van Wijngaardt S, Jeucken PH, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage HA. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* 1997b; 78(1-2):184-197.
- Arimura P. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of search. *Regul Pept* 1992; 37(3):287-303.
- Claudius L, Yoshimi Y, Yoichiro H, Gabriel M, Koichi M. Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clustering accumulation in pituitary co-

ds in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Acta Histochem* 2006; 108(1):69-80.

Coates PJ, Doniach I. Development of folliculo-stellate cells in the human pituitary. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 119(1):16-20.

Cocchia D, Miani N. Immunohistochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 1980; 9(6):771-782.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat* 1995; 152(1):28-32.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.

Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1):25-32.

Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.

Farnoud MR, Kujas M, Derome P, Racadot J, Peillon F, Li JY. Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1994; 424(1):75-82.

lloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Acta Histochem* 2006; 108(1):69-80.

Coates PJ, Doniach I. Development of folliculo-stellate cells in the human pituitary. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 119(1):16-20.

Cocchia D, Miani N. Immunohistochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J Neurocytol* 1980; 9(6):771-782.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological study of pituitary gonadotrophs during aging in male rats. *Mech Ageing Dev* 1994; 73(2):87-95.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats. *Acta Anat* 1995; 152(1):28-32.

Cónsole GM, Gómez Dumm CL, Goya RG. Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev* 1993; 70(1-2):45-51.

Cónsole GM, Jurado SB, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural age-related changes in rat lactotroph cells. *Biocell* 1998; 22(3):197-205.

Cónsole GM, Jurado SB, Riccillo FL, Gómez Dumm CL. Immunohistochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cell Tissues Organs* 2000; 167(1):25-32.

Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.

Farnoud MR, Kujas M, Derome P, Racadot J, Peillon F, Li JY. Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1994; 424(1):75-82.

Ferrara N, Winer J, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(2):698-702.

García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immuno-cytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition* 1993, 10-017-A-10, 1:1-24.

Girod C, Trouillas J, Raccurt M, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of adenohypophysis in the monkeys *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. *Cell Tissue Res* 1986; 246(2):237-242.

Girod C, Trouillas J, Dubois PM. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3):505-511.

Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, Mc Donald JR, Walsh DA, Fletcher WH. In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1993; 127-128:293-307.

Harrison F, Van Hoof J, Vakaet L. The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 226(1):97-111.

Heinzlmann A, Koves K. The characteristic change in the distribution of S-100 immunoreactive folliculostellate cells in rat anterior pituitary upon long-term estrogen treatment is prevented by concomitant progesterone treatment. *Endocrine* 2008; 33(3):342-348.

Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T. Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol* 2010; 204(2):115-123.

Ferrara N, Winer J, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(2):698-702.

García-Navarro F, Porter D, García-Navarro S, Licht P. Immuno-cytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during in vitro superfusion. *Cell Tissue Res* 1989; 256(3):623-630.

Girod C, Trouillas J. Hypophyse: embriologie, anatomie et histologie. *Encycl Med Chir (Paris, France), Endocrinologie-Nutrition* 1993, 10-017-A-10, 1:1-24.

Girod C, Trouillas J, Raccurt M, Dubois MP. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of adenohypophysis in the monkeys *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. *Cell Tissue Res* 1986; 246(2):237-242.

Girod C, Trouillas J, Dubois PM. Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 1985; 241(3):505-511.

Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, Mc Donald JR, Walsh DA, Fletcher WH. In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1993; 127-128:293-307.

Harrison F, Van Hoof J, Vakaet L. The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 1982; 226(1):97-111.

Heinzlmann A, Koves K. The characteristic change in the distribution of S-100 immunoreactive folliculostellate cells in rat anterior pituitary upon long-term estrogen treatment is prevented by concomitant progesterone treatment. *Endocrine* 2008; 33(3):342-348.

Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T. Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells. *J Endocrinol* 2010; 204(2):115-123.

Horvath E, Kovacs K. Folliculo-stellate cells of human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol* 2002; 26(4):219-228.

Ilmiawati C, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T. Matrix metalloproteinase -9 expression in folliculostellate cells of rat anterior pituitary gland. *J Endocrinol* 2012; 212(3):363-370.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci* 1998; 60(6):705-711.

Kameda Y. Occurrence of colloid-containing follicles in the pars distalis of pituitary glands from aging guinea pigs. *Cell Tissue Res* 1991; 263(1):115-124.

Katayama T, Shiota K, Sugino H, Takahashi M. Paracrine effect of folliculo-stellate cells on the growth factor-like action of activin A in anterior pituitary cultures. *Endocrinol Jpn* 1992; 39(3):289-297.

Kurono C, Nozaki M, Ohguchi H, Soji T, Herbert DC. Septate-like junctions in the normal male rat pituitary gland. *Tissue Cell* 1994; 26(6):913-916.

Lloyd RV, Mailloux J. Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues. *Am J Pathol* 1988; 133(2):338-346.

Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K. Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3', 5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 1993; 133(5):2150-55.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 1996; 137(8):3356-67.

Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K. S-100 protein in folliculo-stellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 1980; 191(2):523-531.

Nishioka H, Llana JF, Hirano A. Immunohistochemical study of folliculo-stellate cells in pituitary lesions. *Endocr Pathol* 1991; 2:155-160.

Horvath E, Kovacs K. Folliculo-stellate cells of human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol* 2002; 26(4):219-228.

Ilmiawati C, Horiguchi K, Fujiwara K, Yashiro T. Matrix metalloproteinase -9 expression in folliculostellate cells of rat anterior pituitary gland. *J Endocrinol* 2012; 212(3):363-370.

Jurado SB, Cónsole GM, Gómez Dumm CL. Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotroph cells. An immunohistochemical and ultrastructural study. *J Vet Med Sci* 1998; 60(6):705-711.

Kameda Y. Occurrence of colloid-containing follicles in the pars distalis of pituitary glands from aging guinea pigs. *Cell Tissue Res* 1991; 263(1):115-124.

Katayama T, Shiota K, Sugino H, Takahashi M. Paracrine effect of folliculo-stellate cells on the growth factor-like action of activin A in anterior pituitary cultures. *Endocrinol Jpn* 1992; 39(3):289-297.

Kurono C, Nozaki M, Ohguchi H, Soji T, Herbert DC. Septate-like junctions in the normal male rat pituitary gland. *Tissue Cell* 1994; 26(6):913-916.

Lloyd RV, Mailloux J. Analysis of S-100 protein positive folliculo-stellate cells in rat pituitary tissues. *Am J Pathol* 1988; 133(2):338-346.

Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K. Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3', 5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 1993; 133(5):2150-55.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 1996; 137(8):3356-67.

Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K. S-100 protein in folliculo-stellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 1980; 191(2):523-531.

Nishioka H, Llana JF, Hirano A. Immunohistochemical study of folliculo-stellate cells in pituitary lesions. *Endocr Pathol* 1991; 2:155-160.

Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Kato Y, Inoue K. Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol* 2012; 213(3):231-237.

Pavlovic M, Jovanovic I, Ugrenovic S, Vasovic L, Krstic M, Bakic M, Zivkovic V, Stojanovic V. Morphometric analysis of the human anterior pituitary's folliculosatellite cells during aging process. *Ann Anat* 2013; 195(3):231-237.

Redecker P, Fechner J. Immunohistochemical study of cells positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the human pituitary gland, with special reference to folliculo-stellate cells. *Histochemistry* 1989; 91(3):227-234.

Rinehart JF, Farquhar MG. The fine vascular organization of anterior pituitary gland; an electron microscopic study with histochemical correlations. *Anat Rec* 1955; 121:207.

Shirasawa N, Yamanouchi H. Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro. *J Anat* 1999; 194(Pt4):567-577.

Soji T, Herbert DC. Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 1989; 224(4):523-533.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):138-149.

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125(1):575-577.

Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima University Serie B Div 1*, 1983; 31:185-191.

Tsuchida T, Hruban RH, Carson BS, Phillips PC. Folliculo-stellate cells in the human anterior pituitary express cytokeratin. *Pathol Res Pract* 1993; 189(2):184-188.

Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Fujiwara K, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T. Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGFbeta2 in rat anterior pituitary. *J Endocrinol* 2016. (Epub ahead of print).

Osuna M, Sonobe Y, Itakura E, Devnath S, Kato T, Kato Y, Inoue K. Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *J Endocrinol* 2012; 213(3):231-237.

Pavlovic M, Jovanovic I, Ugrenovic S, Vasovic L, Krstic M, Bakic M, Zivkovic V, Stojanovic V. Morphometric analysis of the human anterior pituitary's folliculostellate cells during aging process. *Ann Anat* 2013; 195(3):231-237.

Redecker P, Fechner J. Immunohistochemical study of cells positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the human pituitary gland, with special reference to folliculo-stellate cells. *Histochemistry* 1989; 91(3):227-234.

Rinehart JF, Farquhar MG. The fine vascular organization of anterior pituitary gland; an electron microscopic study with histochemical correlations. *Anat Rec* 1955; 121:207.

Shirasawa N, Yamanouchi H. Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro. *J Anat* 1999; 194(Pt4):567-577.

Soji T, Herbert DC. Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 1989; 224(4):523-533.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):138-149.

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989; 125(1):575-577.

Takahashi S, Kawashima S. Age-related changes in prolactin cells in male and female rats of the Wistar/Tw strain. *J Sci Hiroshima University Serie B Div 1*, 1983; 31:185-191.

Tsuchida T, Hruban RH, Carson BS, Phillips PC. Folliculo-stellate cells in the human anterior pituitary express cytokeratin. *Pathol Res Pract* 1993; 189(2):184-188.

Tsukada T, Azuma M, Horiguchi K, Fujiwara K, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T. Folliculostellate cell interacts with pericyte via TGFbeta2 in rat anterior pituitary. *J Endocrinol* 2016. (Epub ahead of print).

- Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme JV, Billiau A. Production of Interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland. *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissue*. In: PM Motta ed. Boston: Martinus Nijhoff, 1989:64.
- Vankelecom H, Matthys P, Van Damme JV, Heremans H, Billiau A, Deneef C. Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(2):151-156.
- Watanabe T, Hashimoto H. Immunohistochemical studies on S-100 cells in the anterior pituitary gland of Sprague Dawley rats and spontaneous dwarf rats. *Anat Embryol (Berl.)* 1993; 188(5):493-500.
- Yamashita M, Qian ZR, Sano T, Horvath E, Kovacs K. Immunohistochemical study on so-called follicular cells and folliculostellate cells in the human adenohypophysis. *Pathol Int* 2005; 55(5):244-247.

- Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme JV, Billiau A. Production of Interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland. *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissue*. In: PM Motta ed. Boston: Martinus Nijhoff, 1989:64.
- Vankelecom H, Matthys P, Van Damme JV, Heremans H, Billiau A, Deneef C. Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(2):151-156.
- Watanabe T, Hashimoto H. Immunohistochemical studies on S-100 cells in the anterior pituitary gland of Sprague Dawley rats and spontaneous dwarf rats. *Anat Embryol (Berl.)* 1993; 188(5):493-500.
- Yamashita M, Qian ZR, Sano T, Horvath E, Kovacs K. Immunohistochemical study on so-called follicular cells and folliculostellate cells in the human adenohypophysis. *Pathol Int* 2005; 55(5):244-247.

CAPÍTULO 12

Envejecimiento hipofisario: transferencia del gen portador del factor insulino-símil tipo I

El envejecimiento está asociado a un progresivo aumento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, tanto en los animales de laboratorio como en los seres humanos. Sin embargo, debe destacarse que el cerebro adulto conserva su capacidad neurogénica en bulbo olfatorio, giro dentado del hipocampo, numerosas áreas corticales, regiones ependimarias ventriculares y *sustancia nigra*.

A. Enfermedad de Parkinson (EP): trastorno neurodegenerativo crónico con edad de inicio a los 60 años que conduce a una incapacidad progresiva por la pérdida de neuronas secretoras de **dopamina** (DA) en la *sustancia nigra* y en los **ganglios de la base del encéfalo** (fig. 12.1).

La dopamina es un neurotransmisor responsable de la transmisión sináptica que coordina la actividad de los músculos esqueléticos. La EP desencadena alteraciones en la función cognitiva, en la expresión de

CHAPTER 12

Pituitary ageing: transference of insulin-like I gene

Ageing is associated with increasing incidence of neurodegenerative diseases, such as Parkinson and Alzheimer, in both laboratory animals and humans. However, it should be noted that the adult brain preserves its neurogenic capacity in the olfactory bulb, *dentate gyrus* of the hippocampus, numerous cortical areas, ependymal ventricular regions, and *substantia nigra*.

A therapeutic possibility of growing clinical interest in the treatment of neurodegenerative processes is the use of neurotrophic factors that prevent degeneration and restore the function of the remaining dopaminergic population, with repercussion at pituitary level. A factor of growing interest for neuronal recovery in neurodegenerative processes is the insulin-like I growth factor (IGF-I). It has been reported that in the rat, tissue levels of IGF-I and of its receptor diminished significantly in the hippocampus and in cortical layers II/III and V/VI during aging (Sonntag et al., 1999). When the hippocampus suffered cytotoxic dama-

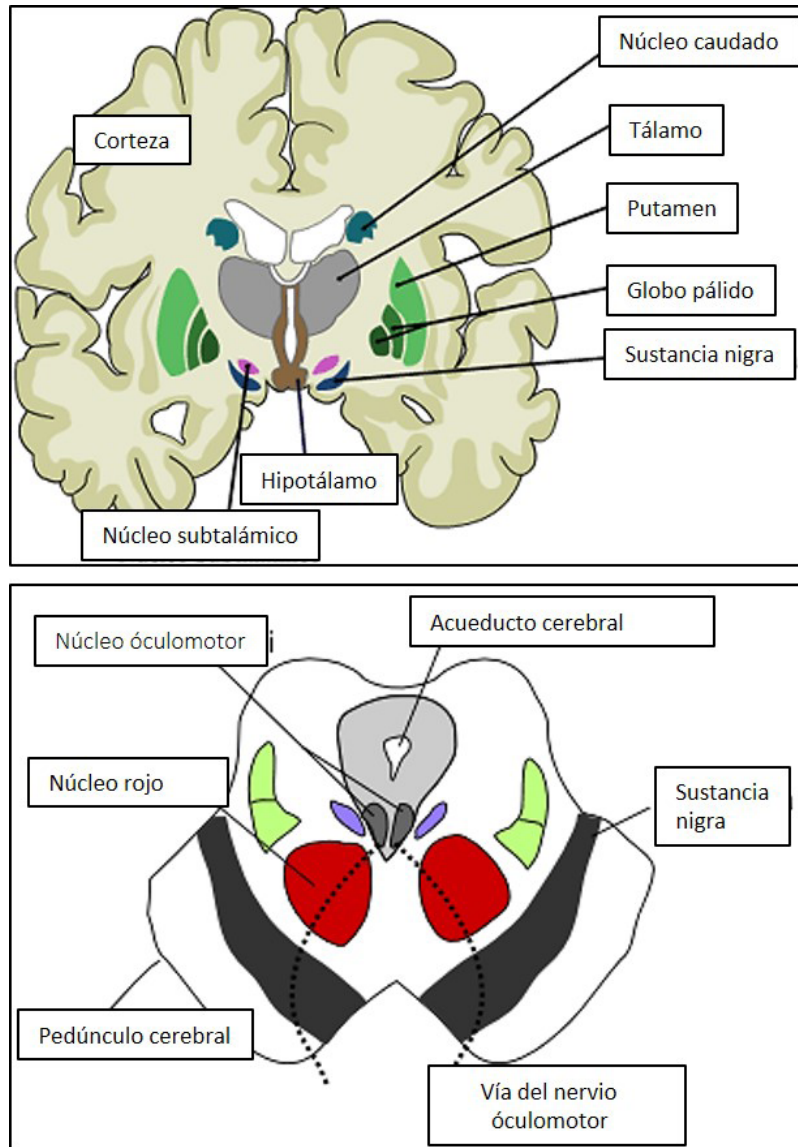


Fig. 12.1. *Sustancia nigra y ganglios de la base* (es.wikipedia.org).

ge, the microglia of this region increased the production of IGF-I and of IGF-binding protein 2 (IGF-IBP2), which suggests a neuroprotective role of these molecules in the central nervous system (CNS) (Breese et al., 1996). Also, IGF-I has been reported to protect hippocampal neurons from the toxic effects of amyloid peptides (Dore et al., 1997) and the IGF-I treatment of rats overexpressing a mutant A β amyloid peptide has been noticed to reduce the brain burden and to improve cognitive efficiency (Carro et al., 2002 and 2006). In *in vitro* studies IGF-I has been demonstrated to increase cell survival of primary hypothalamic neuron cultures (Torres-Aleman et al., 1990) and to stimulate the differentiation of rat mesencephalic dopaminergic neurons (Knusel et al., 1990). Soritino and Canonico (1996) communicated the neuroprotective effect of IGF-I in immortalized hypothalamic cells.

A. Parkinson's disease (PD): chronic neurodegenerative disorder with onset at 60 years of age that leads to progressive incapacity by loss of secretory DA neurons in the *substantia nigra* and in the **basal ganglia of encephalon** (fig. 12.1).

Dopamine is a neurotransmitter responsible for the synaptic transmission that coordinates the activity of skeletal muscles. PD triggers alterations in the cognitive function, in the expression of emotions and in the autonomous function. Patients evidence rigidity, resting tremor, bradykinesia, loss of postural reflexes and speech disorder. There is genetic predisposition for PD and deposits of α synuclein are formed. In men, Parkinson's disease, a degeneration of nigrostriatal DA neurons, is the most conspicuous manifestation of the DA neurons vulnerability facing advancing age. It is worth noticing that patients with Parkinson generally present functional alterations in the hypothalamo-lactotrope axis (Franceschi et al., 1988).

Treatment for PD includes dopamine precursors and anticholinergic medication. Also, gene therapies are being assayed, as well as transplantation of dopaminergic neurons of the *substantia nigra*. A therapeutic possibility of growing clinical interest in the treatment of neurodegenerative processes is the use of neurotrophic factors that

las emociones y en la función autónoma. Los pacientes presentan rigidez, temblor de reposo, bradicinesia, pérdida de los reflejos posturales y trastornos del habla. Hay predisposición hereditaria y se producen depósitos de α sinucleína. La EP muestra una degeneración de las neuronas DA nigroestriales, siendo el reflejo más conspicuo de la vulnerabilidad de las neuronas DA ante el avance de la edad. Es de remarcar que los pacientes parkinsonianos generalmente presentan alteraciones funcionales en el eje hipotálamo-lactotropo (Franceschi y col., 1988). La EP es tratada con precursores de dopamina y medicación anticolinérgica. Además, se están ensayando terapias génicas y trasplantes de neuronas secretoras de dopamina en la *sustancia nigra*. Una posibilidad terapéutica de creciente interés clínico en el tratamiento de procesos neurodegenerativos es el empleo de los factores neurotróficos que prevengan la degeneración y restauren la función de la población

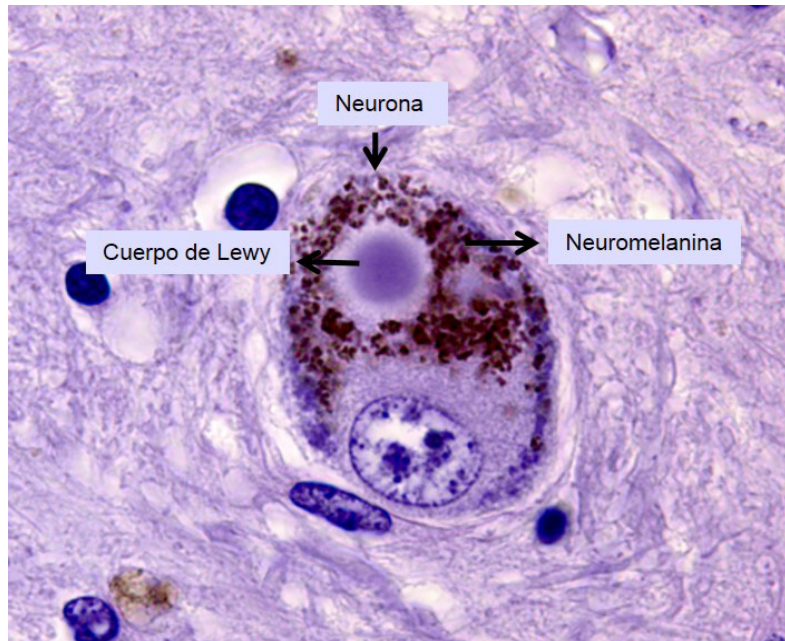


Fig. 12.2. Neurona de la *sustancia nigra*. Neuromelanina y cuerpo de Lewy (*drosophila.es*).

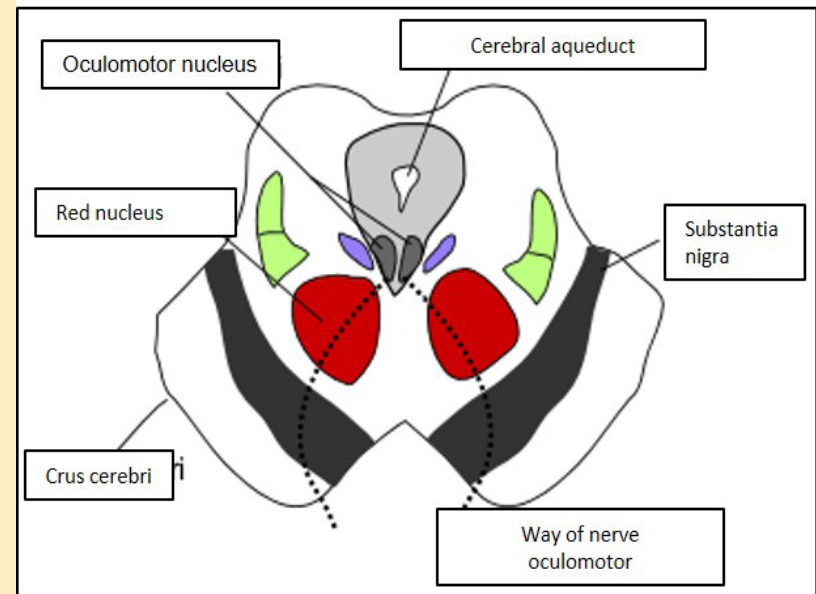
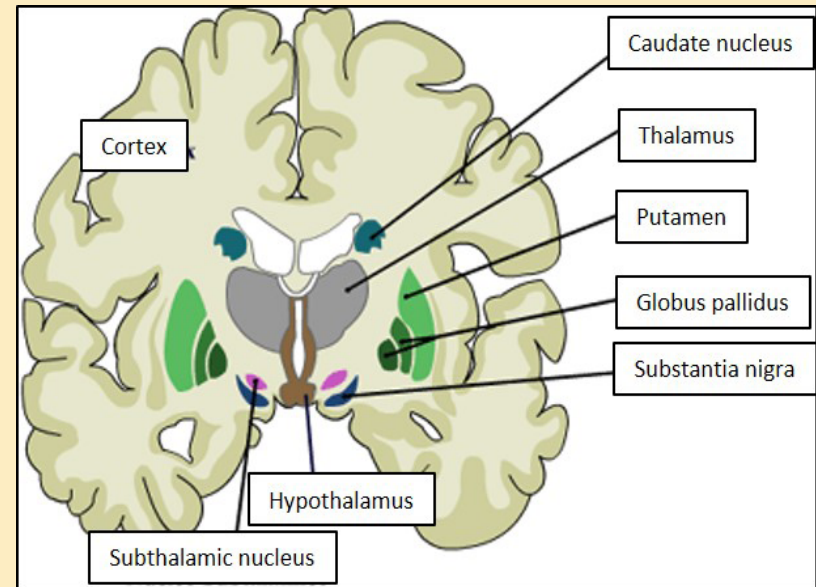


Fig. 12.1. Substantia nigra and basal ganglia of encephalon (*es.wikipedia.org*).

dopaminérgica remanente con repercusión a nivel pituitario. La **fig. 12.2** señala una neurona de la *substancia nigra* con neuromelanina y un cuerpo de Lewy (estructura proteica anormal).

En la **fig. 12.3** se ven los núcleos hipotalámicos y la glándula pituitaria.

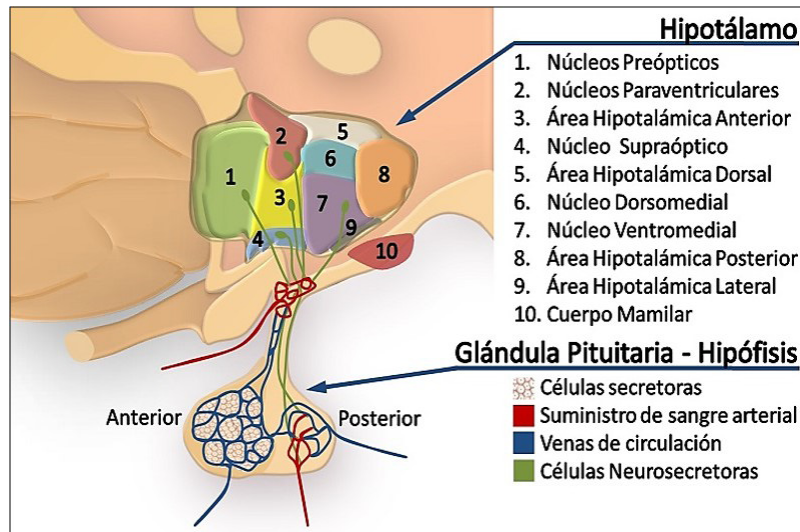


Fig. 12.3. Núcleos hipotalámicos y glándula pituitaria (*asociacioneducar.com*).

B. Enfermedad de Alzheimer: alteración neurodegenerativa de evolución lenta que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, incapacidad para incorporar nuevos datos, alteraciones del lenguaje y falta de orientación con dificultad para encontrar recorridos habituales, a medida que se produce pérdida neuronal. Es la forma más común de demencia. Es incurable, terminal y aparece con mayor frecuencia en personas de más de 65 años de edad. Las investigaciones la asocian con la aparición de **placas seniles** formadas por depósitos de **A β amiloide** entre las neuronas del hipocampo (área CA1) que determinan la pérdida de la memoria episódica y espacial. El tratamiento farmacológico busca aumentar la acetilcolina cerebral

prevent the degeneration and restore the function of the remaining dopaminergic population with repercussion at pituitary level. **Fig. 12.2** indicates a *substancia nigra* neuron with neuromelanin and Lewy body (abnormal protein structure).

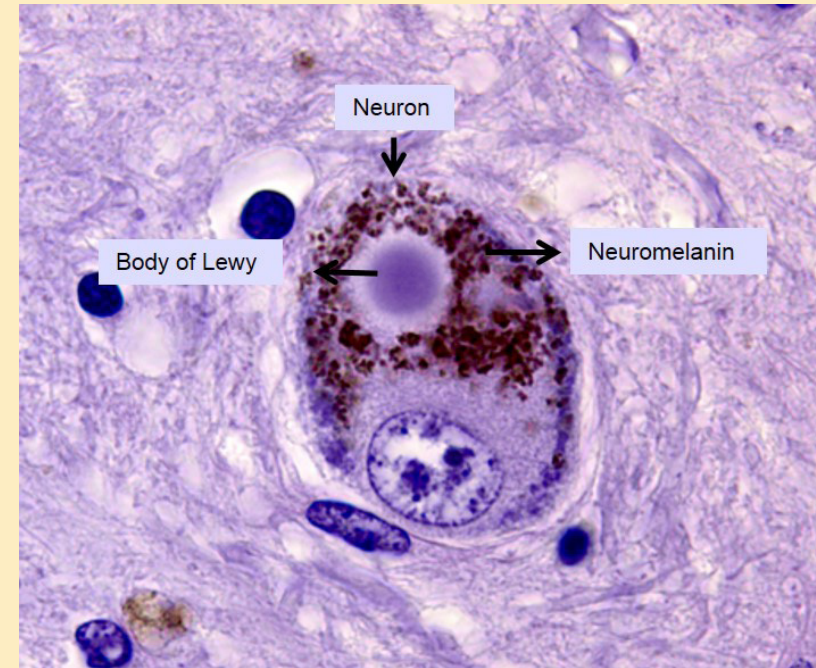


Fig. 12.2. *Substantia nigra* neuron. Neuromelanin and Lewy body (*drosophila.es*).

Fig. 12.3 shows the hypothalamic nuclei and the pituitary gland.

B. Alzheimer's disease (AD): neurodegenerative alteration of slow evolution that manifests as cognitive impairment and behavior disorders. It is characterized by progressive memory loss, inability to incorporate new information, speech disorders and impaired orientation ability and getting lost, as neuronal loss occurs. It is the most common type of dementia. It is incurable, terminal and it most commonly appears in people over 65 years of age. Research associates it with the appearance of

por lo que se suministran anticolinesterásicos para inhibir la colinesterasa que descompone la acetilcolina.

El hipocampo se relaciona con la corteza cerebral ubicada en el interior del lóbulo temporal. Se le considera una invaginación de la arquicorteza, producida por la formación de la fisura del hipocampo que lo empuja haciendo prominencia en el piso del cuerno inferior. Mide aproximadamente 3,5 a 4 cm. de longitud ánteroposterior. Al observar un corte coronal del cuerno inferior, se puede ver que se parece al “caballito de mar”, y de ahí el nombre de “hipocampo”, pero en otro contexto histórico se le comparó con un cuerno de la antigüedad egipcia Amón Ra. Es de color amarillo claro, debido a que está cubierto por una capa de sustancia blanca que se llama **alveo** (del latín *alveus*), que corresponde a fibras mielinizadas o axones de las células piramidales del hipocampo. En un corte transversal se ve cómo el alveo se continúa con la **fimbria**. La fimbria es un paquete de fibras piramidales del hipocampo que se continúa con los pilares del **fórnix** (fig. 12.4).

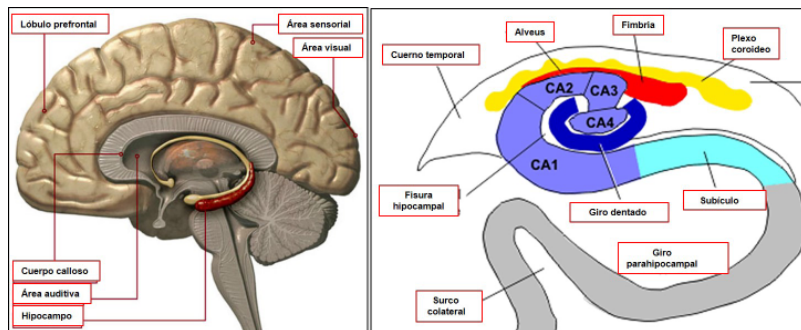


Fig. 12.4. Hipocampo. Áreas CA1-CA2 y CA3. Alveo, giro dentado, fimbria (blogs.spot.com).

En la fig. 12.5 se muestran las neuronas del hipocampo dibujadas por Ramón y Cajal.

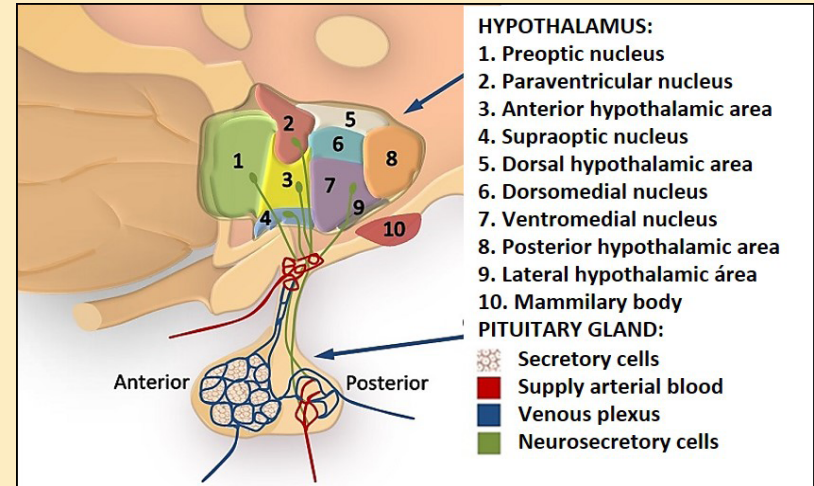


Fig. 12.3. Hypothalamic nuclei and pituitary gland (asociacioneducar.com).

senile plaques formed by **A β amyloid deposits** between hippocampal neurons (CA1 area) that determine loss of episodic and spatial memory. As the pharmacological treatment seeks increasing brain acetylcholine, anticholinesterases are administered to inhibit cholinesterase that break down acetylcholine.

The hippocampus is related to the cerebral cortex located inside the temporal lobe. It is considered to be an invagination of the *archicortex*, produced by the formation of the brain fissure which pushes it protruding from the bottom of the lower horn. The anteroposterior length is approximately 3.5 to 4 cm. When observing a crown section of the lower horn, resemblance to a “seahorse” can be appreciated, hence the term “*hippocampus*”, but in another historical context, was compared to a horn from ancient Egyptian god Amón Ra. Its color is light yellow since it is covered by a layer of a white substance called *alveus*, which belongs to myelinated fibers or axons from hippocampal pyramidal cells. In a cross section the alveus is seen to continue as the *fimbriae*. The *fimbriae* are a bundle of hippocampal pyramidal fibers that continue as the columns of the *fornix* (fig. 12.4).

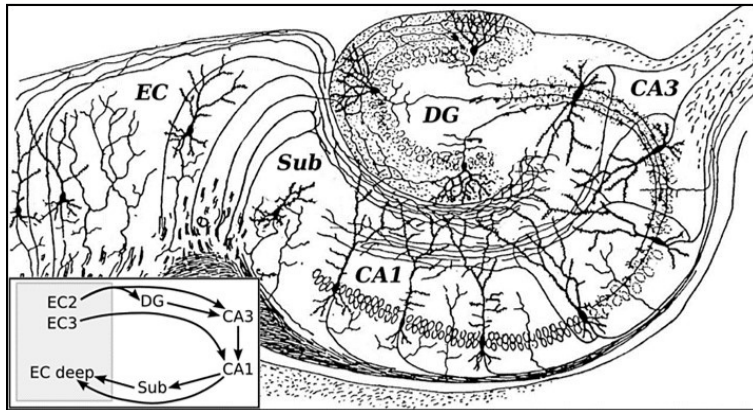
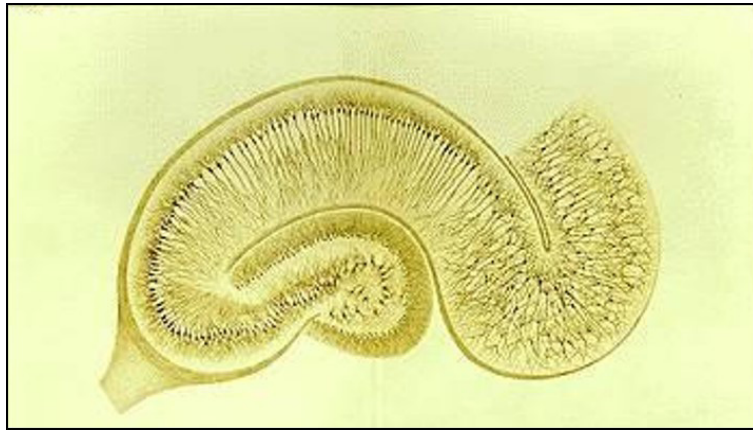


Fig. 12.5. Neuronas del hipocampo. Áreas CA1-CA2 y CA3. Giro dentado (DG). (Dibujo de Santiago Ramón y Cajal).

En la **fig. 12.6** se observa la histología de las neuronas piramidales del hipocampo que tiene 3 estratos: polimorfo, piramidal y molecular. Las neuronas piramidales emiten las arborizaciones dendríticas que van al giro dentado y las colaterales de Schaffer.

Una posibilidad terapéutica de creciente interés clínico es el tratamiento de los procesos neurodegenerativos mediante el empleo de los **factores neurotróficos** para provocar la restauración neuronal. Un factor trófico utiliza-

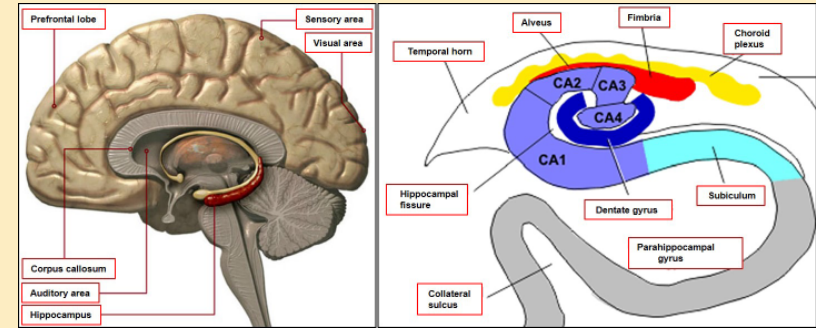


Fig. 12.4. Hipocampo. CA1-CA2 and CA3 areas. Alveus, dentate gyrus, fimbriae (blogs.spot.com).

Figure 12.5 shows hippocampal neurons drawn by Ramón y Cajal.

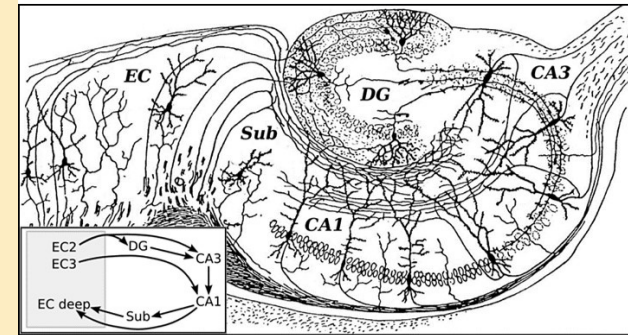


Fig. 12.5. Hippocampal neurons. CA1-CA2 and CA3 areas. Dentate gyrus (DG). (S. Ramón y Cajal).

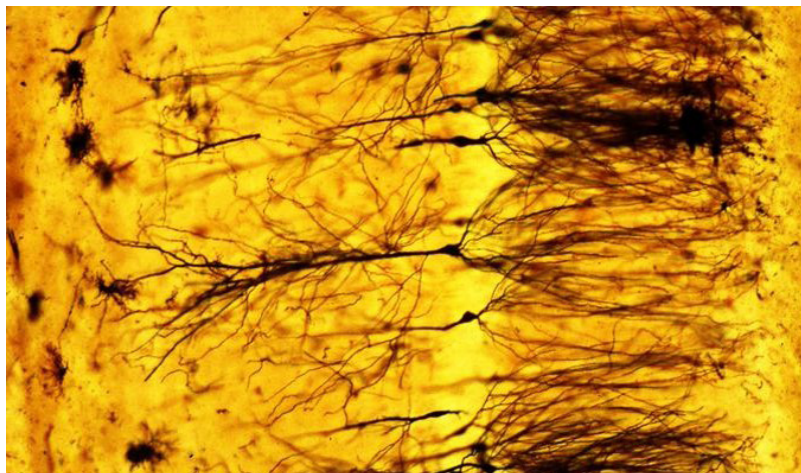


Fig. 12.6. Neuronas piramidales del hipocampo con sus arborizaciones dendríticas y colaterales de Schaffer (*agenciasinc.es*).

do para el rescate neuronal en los procesos neurodegenerativos es el **factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I)**. En la rata, los niveles tisulares del IGF-I y de su receptor disminuyeron significativamente en el hipocampo y en las capas corticales II/III y V/VI durante el envejecimiento (Sonntag y col., 1999). Cuando se produjo un daño citotóxico del hipocampo, la microglía de esta región aumentó la producción de IGF-I y de IGF-I-proteína de unión 2 (IGF-IBP2), respuesta que sugiere un rol neuroprotector de estas moléculas en el sistema nervioso central (SNC) (Breese y col., 1996). Además, se ha observado que el IGF-I protege a las neuronas del hipocampo de los efectos tóxicos de los péptidos amiloides (Doré y col., 1997) y que el tratamiento con IGF-I en ratones que sobreexpresan un mutante del péptido A β amiloide reduce su carga cerebral y mejora la eficiencia cognitiva (Carro y col., 2002 y 2006). En estudios *in vitro* se ha demostrado que el IGF-I incrementó la supervivencia celular de los cultivos primarios de las neuronas hipotalámicas (Torres-Aleman y col., 1990) y estimuló la diferenciación de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas de la rata (Knusel y col., 1990). Además, Sortino y Canónico (1996) comunicaron el efecto neuroprotector del IGF-I en las células hipotalámicas inmortalizadas.

In **fig. 12.6** the histology of hippocampal pyramidal neurons can be observed. There are 3 layers: polymorphous, pyramidal and molecular. Pyramidal neurons emit dendritic trees that terminate in the *dentate gyrus* and the collaterals of Schaffer.

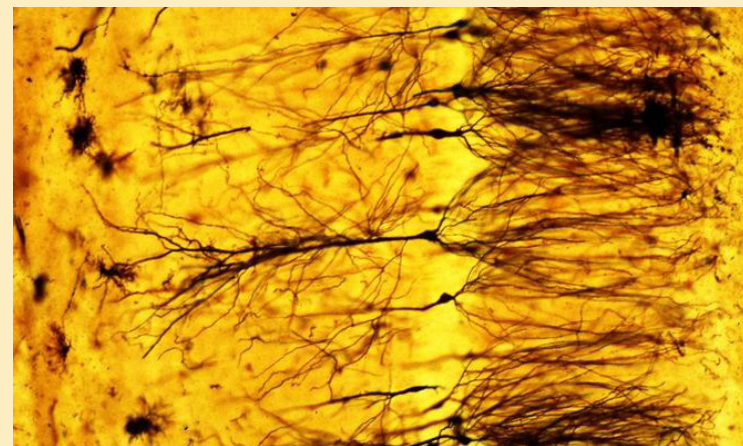


Fig. 12.6. Hippocampal pyramidal neurons of with dendritic trees and collaterals of Schaffer (*agenciasinc.es*).

A therapeutic possibility of growing clinical interest in the treatment of neurodegenerative processes is the use of neurotrophic factors that prevent degeneration and restore the function of the remaining dopaminergic population, with repercussion at pituitary level. A factor of growing interest for neuronal recovery in neurodegenerative processes is the insulin-like I growth factor (IGF-I). It has been reported that in the rat, tissue levels of IGF-I and of its receptor diminished significantly in the hippocampus and in cortical layers II/III and V/VI during aging (Sonntag et al., 1999). When the hippocampus suffered cytotoxic damage, the microglia of this region increased the production of IGF-I and of IGF-binding protein 2 (IGF-IBP2), which suggests a neuroprotective role of these molecules in the central nervous system (CNS) (Breese et al., 1996). Also, IGF-I has been reported to protect hippocampal neurons from the toxic effects of amyloid peptides (Dore et al., 1997) and the IGF-I treatment of rats overexpressing

También en la glándula pituitaria se producen varios factores de crecimiento (Webster y col., 1989; Halper y col., 1992) que pueden afectar la función y proliferación de sus células a través de acciones autocrinas o paracrinias (Houben y Deneff, 1994) y uno de ellos, el IGF-I, se detectó en los lóbulos anterior e intermedio de la pituitaria (D'Ercole y col., 1984). El IGF-I actúa en la embriogénesis del sistema nervioso y en el crecimiento de las neuronas, siendo promisorio su aplicación en el tratamiento de los tumores pituitarios.

En la **fig. 12.7** se muestran las moléculas de los IGF tipos I y II. La molécula de IGF-I abarca 90kb de ADN genómico y consiste en 6 hexones que pueden ser empalmados para crear variantes de transcripción. El péptido maduro de IGF-I contiene 70 aminoácidos y 4 dominios. El dominio B está implicado con el receptor de IGF-I (Daughaday y Rotwein, 1989).

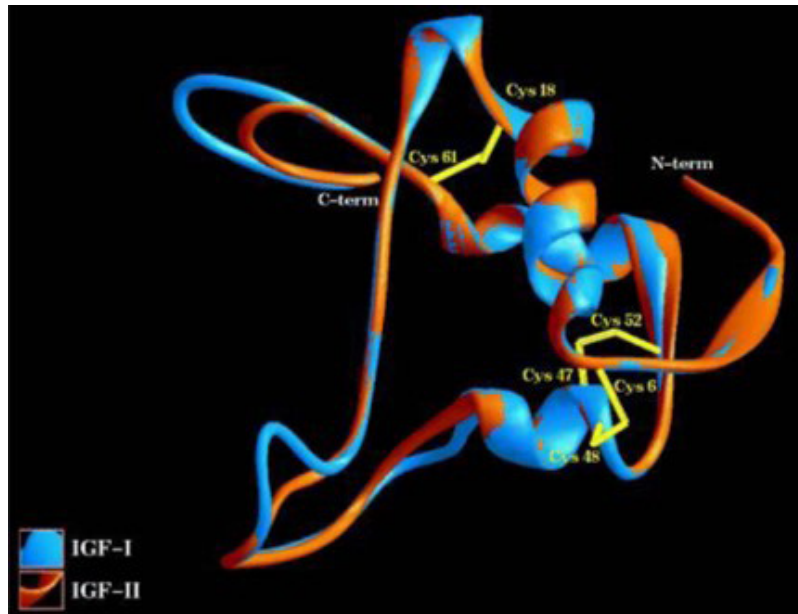


Fig. 12.7. Factores de crecimiento insulino-símiles tipos I y II (IGF-I y -II).

El eje GH-IGF-I se debilita con la edad, dependiendo de la integridad del eje hipotálamo-pituitario-hepático. El uso de GH recombinante hu-

a mutant A β amyloid peptide has been noticed to reduce the brain burden and to improve cognitive efficiency (Carro et al., 2002 and 2006). In *in vitro* studies IGF-I has been demonstrated to increase cell survival of primary hypothalamic neuron cultures (Torres-Aleman et al., 1990) and to stimulate the differentiation of rat mesencephalic dopaminergic neurons (Knusel et al., 1990). Sortino and Canonico (1996) communicated the neuroprotective effect of IGF-I in immortalized hypothalamic cells.

Also, the pituitary gland produces several growth factors (Webster et al., 1989; Harper et al., 1992) that can affect cell function and proliferation through autocrine and paracrine mechanisms (Hoben and Deneff, 1994) and one of them, IGF-I, was detected in the anterior and intermediate pituitary lobes (D'Ercole et al., 1984). Also, IGF-I acts on the nervous system embryogenesis and in neuron growth, and it is a promising tool in the treatment of pituitary tumors.

IGF-I molecule is 90kb genomic DNA and consists of 6 hexon proteins that can be connected to create transition variants. The mature IGF-I peptide contains 70 aminoacids and 4 domains. B domain is implicated

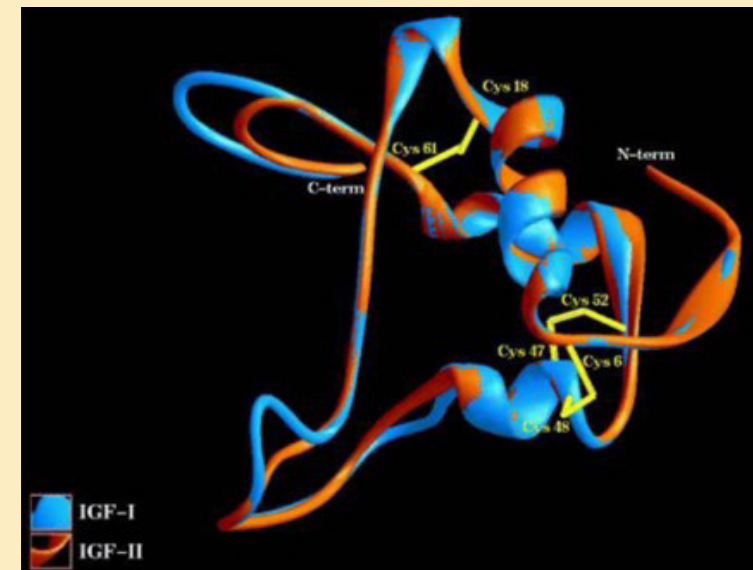


Fig. 12.7. Insulin-like I and II growth factors (IGF-I and -II).

mana en pacientes ancianos no hipopituitarios mostró un incremento en el riesgo de neoplasias, por lo que se requiere un estudio a largo plazo (Sherlock y Toogood, 2007). El tratamiento con IGF-I extendería la longevidad en un modelo de envejecimiento prematuro humano o **progeria**, mediante la restauración del eje somatotropo, pudiendo ser de interés terapéutico en síndromes con alteraciones de la envoltura nuclear (Mariño y col., 2010). Los niveles séricos de GH-IGF-I disminuyeron de modo significativo en la **somatopausia**, llevando al uso de GH humana recombinante. Sin embargo, varias mutaciones que disminuyeron el tono de dicho eje estuvieron asociadas con una mayor longevidad en ratones. Además, los humanos y ratones con menor actividad del eje GH-IGF-I estarían protegidos de cáncer y diabetes mellitus (Junnila y col., 2013). Díaz-Torga y col. (2002) detectaron que la interrupción del receptor D2 de dopamina (DA) alteró la secreción de IGF-I-GH y causó enanismo en los ratones machos.

Existe una expresión diferencial de los transcritos de ARNm de IGF-I en respuesta a los esteroides, a la GH y a las señales del desarrollo. Oberbauer (2013) presentó una minuciosa regulación de la transcripción génica del IGF-I y su empalme durante el desarrollo y el envejecimiento. Los niveles séricos de IGF-I bioactivo disminuyeron con la edad en adultos sanos (Vestergaard y col., 2013). La inactivación del receptor de IGF-I (R-IGF-I) en heterocigotas extendió la vida útil de ratones hembras intactos y mutantes de cepa C57BL/6J, pero hubo menor efecto en la cepa 129/SvPas, lo que se sugiere una penetrancia específica de los fenotipos en la longevidad (Xu y col., 2014). Walter y col. (1997) observaron que el IGF-I actuaría de manera paracrina-autocrina en las heridas cerebrales de la rata regulando las respuestas celulares, con disponibilidad espacial y temporal. En adición, la injuria criogénica en la médula espinal indujo expresión astrocítica del gen de la IGF-I-BP que estaría implicado en la regeneración de la mielina (Yao y col., 1995).

Los vectores derivados de los adenovirus portadores de IGF-I han sido usados con fines de investigación básica y en aplicaciones terapéuticas a nivel del sistema neuroendocrino. Los adenovirus no tienen membrana y presentan un genoma de 36 Kb que posee capacidad para infectar una amplia variedad de células en reposo o en mitosis. Los receptores celulares para ade-

in IGF-I receptor (Daughaday and Rotwein, 1989; Gaugin et al., 2009). In **fig. 12.7** molecules of type I and II IGF are shown.

The GH-IGF-I axis weakens with age and depends on the integrity of the hypothalamo-pituitary-liver axis. Long-term studies have shown that the use of recombinant human GH in elderly non pituitary patients showed an increment in the risk of neoplasias (Sherlock and Toogood, 2007). The treatment with IGF-I would extend longevity in a model of human premature ageing (**progeria**) by restoring the somatotroph axis function, which can be of therapeutic interest for syndromes associated with nuclear envelope abnormalities (Mariño et al., 2010). Serum levels of GH-IGF-I diminished significantly in people over the age of 60 (**somatopause**), which derived in the use recombinant human GH. However, several mutations that decreased the tone of such axis were associated with extended longevity in mice. Moreover, humans and mice with minor activity of the GH-IGF-I axis would be protected from cancer and diabetes mellitus (Junnila et al., 2013). Díaz-Torga et al. (2002) detected that the interruption of dopamine (DA) D2 receptor altered the secretion of IGF-I-GH and caused dwarfism in male mice.

There is a differential expression of IGF-I mRNA transcripts in response to steroids, to GH and to development signals. Oberbauer (2013) presented a detailed regulation of IGF-I gene transcription and its connection during development and ageing processes. Serum levels of bioactive IGF-I decreased with age in healthy adults (Vestergaard et al., 2013). The inactivation of IGF-I receptor (R-IGF-I) in heterozygous extended the lifespan of intact female mice and mice from C57BL/6J strain, but a minor effect was suffered by strain 129/SvPas, thus suggesting specific penetrance of longevity phenotypes (Xu et al., 2014). Walter et al. (1997) observed that IGF-I acts in a paracrine-autocrine manner in wounds of the rat brain regulating cell responses, with spatial and temporal availability. In addition, cryogenic injury of the spinal cord induced astrocyte expression of IGF-I-BP gene that would be implied in myelin regeneration (Yao et al., 1995).

novirus son los denominados receptores de alta afinidad CAR (Coxackie-Receptor de Adenovirus) que se adhieren a la proteína viral (Bergelson y col., 1997) y a las integrinas $\alpha_v\beta_{3/5}$ que interactúan con la base pentamérica viral (Hidaka y col., 1999). La **fig. 12.8** muestra la estructura de un adenovirus.

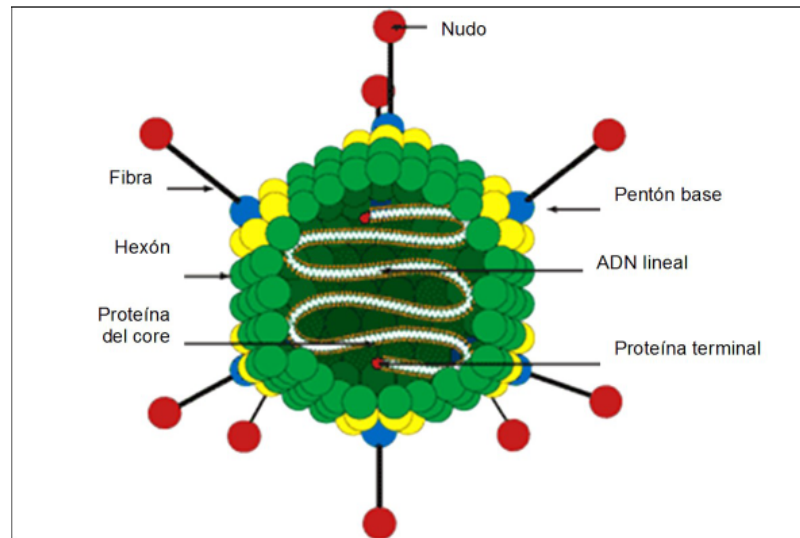


Fig. 12.8. Estructura del adenovirus.

En la **tabla 1** se describen las diferentes características del vector adenoviral considerando supresiones, tamaño máximo del transgén y su expresión a corto- largo plazo.

Tabla 1. Supresiones, tamaño máximo del transgén y expresión a corto y largo plazo.

Vector adenoviral	Supresiones	Tamaño máximo del transgén	Expresión
Primera generación	E1/E3	8,2 Kb	Fuerte a corto plazo
Segunda generación	E1/E2/E3/E4	12 Kb	Fuerte a corto plazo
Tercera generación	Todos los genes excepto ITRs/ Ψ	36 Kb	A largo plazo y en células en reposo

Vectors derived from adenoviruses bearing IGF-I have been used with basic investigation and therapeutic application purposes at the level of the neuroendocrine system. Adenoviruses do not possess a membrane and present a 36 Kb genome that can infect a wide variety of resting or mitotic cells. Cell receptors for adenoviruses are those called high affinity receptors CAR (Coxackie-Receptor de Adenovirus) that adhere to the viral protein (Bergelson et al., 1997) and to integrins $\alpha_v\beta_{3/5}$ that interact with the viral pentameric base (Hidaka et al., 1999). **Fig. 12.8** shows the structure of an adenovirus.

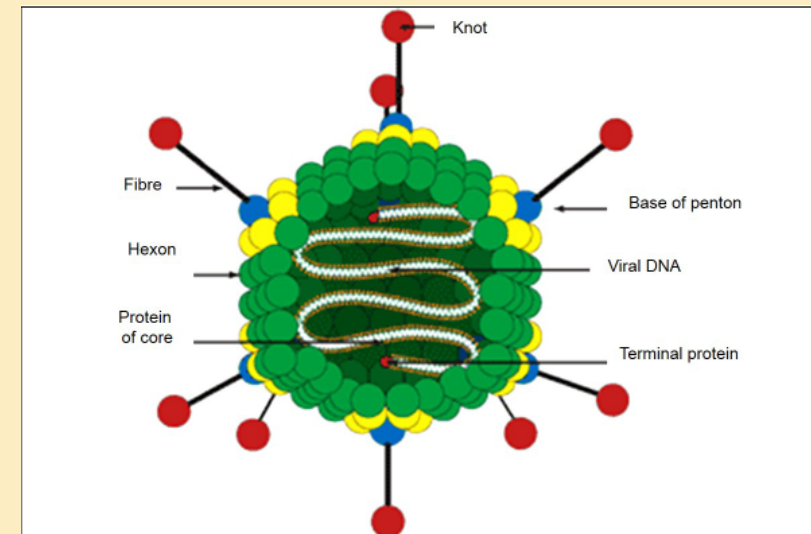


Fig. 12.8. Structure of adenovirus.

Table 1. Suppressions, maximum size of the transgene and short- and long-term expression.

Adenoviral vector	Suppressions	Maximum size of the transgene	Expression
First generation	E1/E3	8,2 Kb	Strong in short term
Second generation	E1/E2/E3/E4	12 Kb	Strong in short term
Third generation	All genes except for ITRs/ Ψ	36 Kb	In short term and in resting cells

Los genes adenovirales han sido clasificados como genes tempranos que codifican proteínas reguladoras expresadas antes de la replicación del ADN y genes tardíos expresados después de la replicación de ADN, codificando proteínas estructurales. La región genómica temprana E1 es delecionada en los vectores adenovirales para tomarlos en replicación-defectivos. Esta región genómica E1 debe ser complementada in trans (en un ADN separado) para replicar el vector que es provisto por medio de una línea celular como la HEK 293, transfectada con los genes virales delecionados (Hitt y col., 1998). La primera generación de vectores adenovirales recombinantes adolece de las regiones genómicas E1 y E3, delecionándose la última para hacer más espacio en las secuencias exógenas. La expresión de la proteína viral estimula una fuerte respuesta inmune, caracterizada por linfocitos T citotóxicos que eliminan las células infectadas (Yang y col., 1994). Para superar esta limitación, otras regiones genómicas son delecionadas en nuevos vectores adenovirales.

Los adenovectores denominados “Helpers-Dependientes” (HDAd) son los más prometedores y en ellos, los genes adenovirales son delecionados y conservan sólo las terminales repetidas invertidas (TRI). Dichas terminales son necesarias para la replicación del ADN viral y para la señal de encapsulación. Como el vector no puede expresar ninguna proteína viral, la generación de los vectores HD requiere que todos los genes adenovirales sean provistos en trans, usualmente mediante coinfección con un adenovirus, denominado “virus colaborador” (Park y col., 1996). Este virus, usado para generar los HDAd, permanece como un contaminante. Varios sistemas han sido diseñados para minimizar los títulos de virus colaboradores en las reservas de virus HDAd (Parks y Gram, 1997). La limitación crítica de los vectores adenovirales proviene de una fuerte respuesta inmune contra las partículas virales y las células infectadas. Esto limita la expresión a largo plazo de los transgenes porque los linfocitos T citotóxicos producen citólisis y previenen la readministración del vector. Las estrategias para vencer las respuestas inmunes no deseadas incluyen el uso de los vec-

In **table 1** the different characteristics of the adenoviral vector are described considering supressions, maximum size of the transgene and its short-term expression.

Adenovirus genes have been classified into early genes that are expressed prior to DNA replication and late genes expressed after the initiation of DNA replication. Early region E1 is selected from adenovirus vectors to render them replication-defective. This region E1 must be trans-complemented (in a separate DNA) to replicate the vector provided by means of a cell line such as HEK 293, transfected with the virus genes selected (Hitt et al., 1998). The first generation of recombining adenovirus vectors lack regions E1 and E3, the latter being selected to provide more space to exogenous sequences. The expression of the virus protein stimulates a strong immune response characterized by cytotoxic T-lymphocytes that eliminated the infected cells (Yang et al., 1994). In order to overcome this limitation, other regions are selected in new adenovirus vectors.

Adenovectors called “Helpers-Dependent” (HDAd) are the most promising ones; adenovirus genes are selected in them and conserve only the inverted terminal repeated (ITR). These terminals are necessary for viral DNA replication and for encapsulation signal. Since the vector cannot express any viral protein, the generation of HD vectors requires all adenovirus genes to be provided in position trans, usually by coinfection with an adenovirus called “helper virus” (Park et al., 1996). This virus, used to generate HDAd, remain to be contaminating. Several systems have been designed in order to minimize titers of helper viruses in HDAd virus reservoirs (Parks and Gram, 1997). Critical limitation of adenoviral vectors come from a strong immune response against the viral particles and infected cells. This limits the long-term expression of transgenes because cytotoxic T lymphocytes may produce cytolysis and prevent vector administration. Strategies to control undesired immune responses include the use of adenoviral vectors bearing immunosuppressive genes (Ideguchi et al., 2000), as well as immunosuppressive drugs (cyclosporine) (Geddes et al., 1996) and oral tolerance resources (Ilan et al., 1997).

tores adenovirales transportando genes inmunosupresores (Ideguchi y col., 2000), así como drogas inmunosupresoras (ciclosporina) (Geddes y col., 1996) y recursos de tolerancia oral (Ilan y col., 1997).

Estudios iniciales con los vectores derivados de los adenovirus y herpes virus demostraron que los dos sistemas pueden ser usados eficientemente para transferir diferentes tipos de genes a las células en cultivos primarios, como las líneas tumorales corticotropa AtT₂₀ y mamosomatotropa GH₃ de la pituitaria anterior normal de rata (Castro y col., 1997; Goya y col., 1998).

Es de remarcar que las células neoplásicas hipofisarias son más susceptibles a la transducción mediada por vectores respecto a las células normales. La inyección estereotáxica de los vectores adenovirales transportando el gen de la *E. coli* β-galactosidasa (β-gal) bajo el control de promotores de la PRL humana (PRLh) o del virus del citomegalovirus humano (CMVh) lleva a altos niveles de la expresión del transgén.

El éxito de la terapia génica requiere, en el caso de los vectores virales, un vector capaz de transducir eficientemente las células blanco *in vivo* y de producir una expresión elevada y prolongada en el tiempo del transgén, con una toxicidad mínima. Los vectores adenovirales de primera generación no cumplen con todas estas expectativas porque la eliminación del gen E1 no es suficiente para evitar la total activación de los demás genes virales. Esto genera *in vivo* una respuesta inmune sobre las células transducidas que reduce la duración de la expresión del transgén. Este problema es resuelto con los adenovectores HD en los que se les ha removido todas las secuencias virales del adenovirus, excepto los elementos en cis esenciales para la replicación y encapsidación del genoma. Estos vectores *in vivo* generan menor toxicidad y mayor duración de expresión del transgén con respecto a los adenovirus de primera generación. Luego ser endocitados, los virus se liberan desde el compartimiento endosomal hasta el citosol y se depositan sobre el complejo del poro nuclear donde el ADN viral con algunas proteínas asociadas son translocados hacia el núcleo. Allí, el genoma viral permanece en un estado no integrado (episomal). En la **fig. 12.9** se presenta el ciclo de infección del adenovirus y del vector adenoviral recombinante.

Initial studies with vectors derived from adenoviruses and herpes viruses demonstrated that both systems may be used efficiently to transfer different types of genes to cells in primary cultures, such as corticotrope tumor AtT₂₀ and mamosomatotrope GH₃ cell lines of the normal anterior pituitary of the rat (Castro et al., 1997; Goya et al., 1998).

It is worth noticing that pituitary neoplastic cells are more susceptible to vector-mediated transduction compared to normal cells. Stereotaxic injection of adenoviral vectors bearing the *E. coli* β-galactosidase (β-gal) gene under the control of human PRL (hPRL) promoters or the virus of the human cytomegalovirus (hCMV) leads to high levels of transgene expression.

The success of gene therapy requires in the case of viral vectors, a vector capable of transducing efficiently *in vivo* target cells and producing high and time prolonged expression of the gene, with minimum toxicity. First generation adenoviral vectors do not meet all these requirements since elimination of gene E1 is not enough to prevent the total activation of the other viral genes. This generates an *in vivo* immune response on the transduced cells that reduce the length of the transgene expression. This problem is solved with HD adenovectors which have been removed of all the viral sequences of the antiviral, except for the elements in position cis that is essential for genome replication and encapsidation. These *in vivo* vectors generate less toxicity and more transgene expression length with respect to first generation adenoviruses. After endocytosis, viruses are released from the endosomal compartment to the cytosol and are deposited on the nuclear pore complex where viral DNA with some associated proteins are translated to the nucleus. There, the viral genome remains in a non integrated (episomal) state. In **fig. 12.9** the cycle of infection of the adenovirus and of the recombinant adenoviral vector is presented.

In our laboratory, first-generation vectors RAd-IGF-I and RAd-βgal were constructed for short-term (17 days) gene therapy and two third-generation adenoviral vector encoding IGF-I and DsRed2 (red fluorescent protein) called HDAd-IGF-I and HDAd-DsRed2, respectively. Unlike first-generation vectors, these allowed a much extended expression

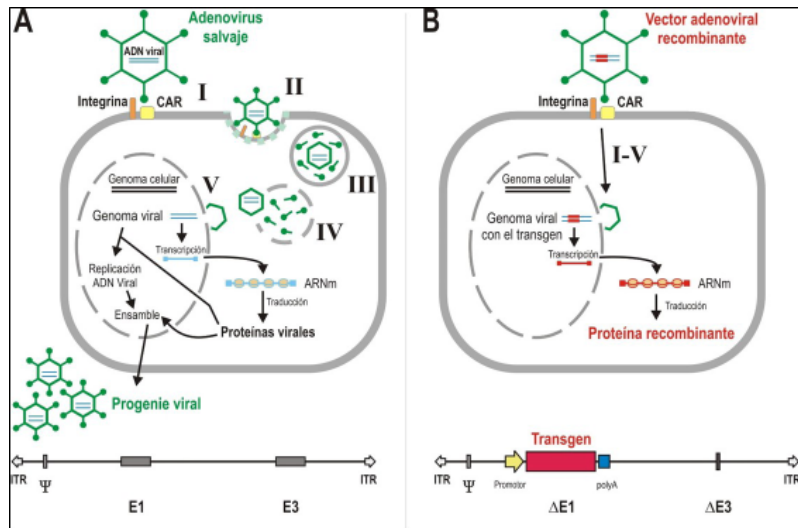


Fig. 12.9. Ciclo de infección del adenovirus (Ad) y del vector adenoviral recombinante (RAD).

A) Adenovirus salvaje: se une a receptores de la membrana celular y es endocitado. El ADN viral es transferido al núcleo donde forma un **episoma**. Luego de la replicación viral del ADN, se expresan genes virales que codifican para proteínas estructurales que van al núcleo donde generan **cápsides** virales. Las partículas maduras se liberan por citólisis.

B) Vector adenoviral recombinante: entra en las células blanco y transfiere su ADN al núcleo. El genoma del vector carece de región genómica E1 y la replicación del ADN viral no sucede. El transgén se expresa produciendo niveles altos de proteína transgénica. No se generan nuevas partículas virales y no hay citólisis (Bolognani y Goya, 2001).

Se construyeron en nuestro laboratorio los vectores de primera generación RAD-IGF-I y RAD-βgal para la terapia génica a corto plazo (17 días) y los vectores adenovirales de tercera generación portadores de los transgenes IGF-I y DsRed2 (proteína fluorescente roja) denominados: HDAd-IGF-I y HDAd-DsRed2, respectivamente. A diferencia de los vectores de primera generación, éstos permitieron una expresión mucho más prolongada de sus transgenes (4 meses). En el **fig. 12.10** se muestra la construcción de un adenovector recombinante para IGF-I.

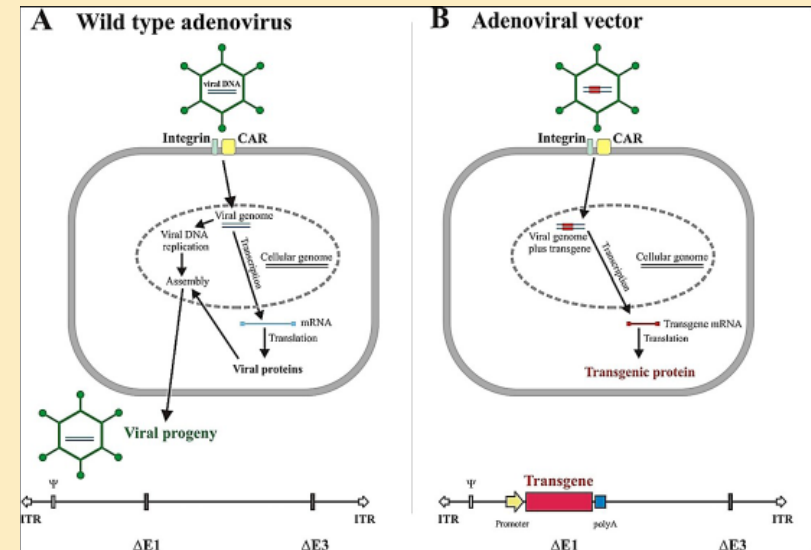


Fig. 12.9. Cycle of adenovirus (Ad) and recombinant adenoviral vector (RAD) infection.

A) Wild adenovirus: it is bound to receptors of the cell membrane and is endocitated. Viral DNA is transferred to the nucleus where an **episome** is formed. After viral replication of DNA, viral genes are expressed encoding for structural proteins that are directed to the nucleus where they generate **capsids**. Mature particles are released by cytolysis.

B) Recombinant adenoviral vector: it enters the target cells and transfers its DNA to the nucleus. The vector genome lacks E1 region and replication of viral DNA does not take place. The expression of the transgene occurs by producing high levels of transgenic protein. There is no generation of new viral particles and no cytolysis (Bolognani and Goya, 2001).

of their transgenes (4 months). In **fig. 12.10** the construction of a recombinant adenovector for IGF-I is shown.

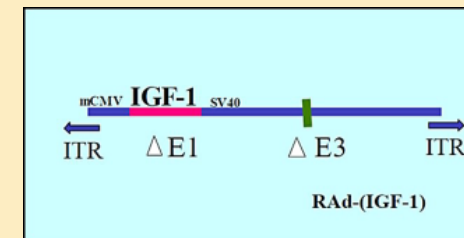


Fig. 12.10. Construction of a recombinant adenovector for IGF-I.

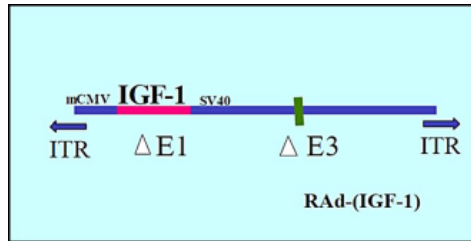


Fig. 12.10. Construcción de un adenovector recombinante para IGF-I (Hereñú y col., 2007).

La fig. 12.11 presenta la construcción de los adenovectores de tercera generación.

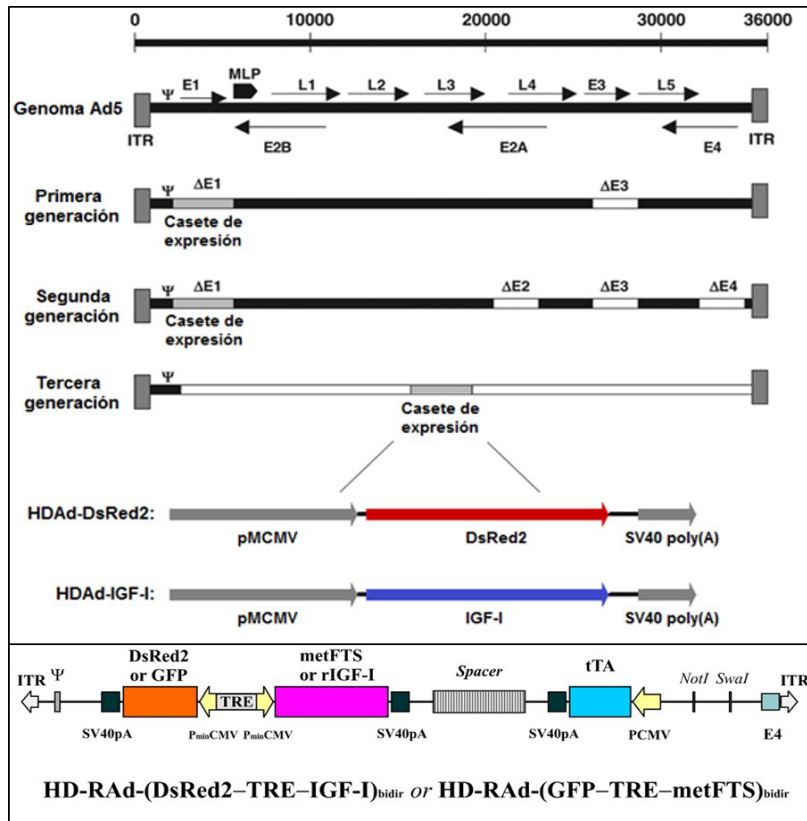


Fig. 12.11. Adenovectores de tercera generación (Schwerdt y col., 2013).

Figure 12.11 presents the construction of adenovectors of third generation.

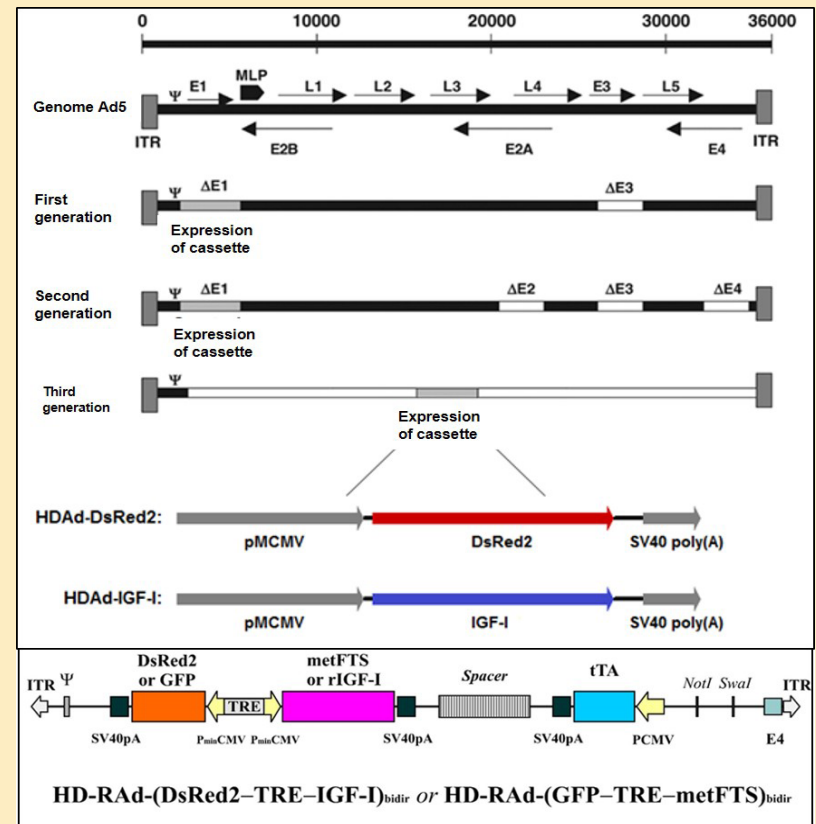


Fig. 12.11. Adenovectors of third generation (Schwerdt et al., 2013).

In fig. 12.12 the plasmid map used to construct HD adenoviruses is shown.

Neuroprotective gene therapy has been implemented with IGF-I in female young and old rats that were injected in the mediobasal hypothalamus (MBH) with 8.45×10^9 WV of HDAd-IGF-I or HDAd-DsRed2 (control vector) and an intact group was added in both ages. These HDAds

En la **fig. 12.12** se muestran los mapas de los plásmidos utilizados para construir los adenovectores.

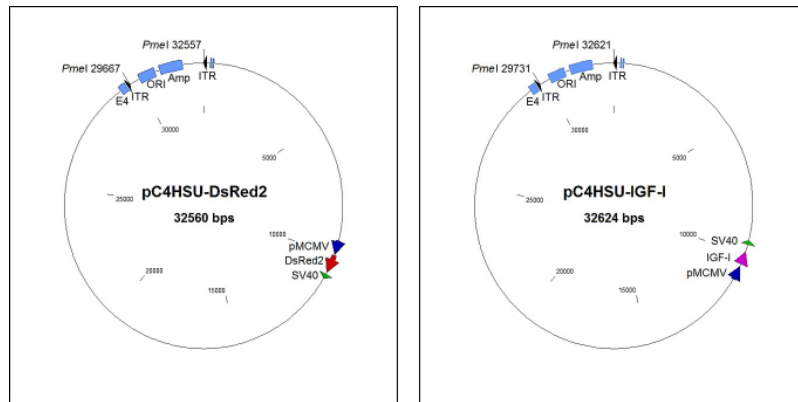


Fig. 12.12. Mapas de los plásmidos pC4HSU-IGF-I y pC4HSU-DsRed2 utilizados para generar el HDAd-IGF-I y el HDAd-DsRed2, respectivamente. PCMV: promotor del citomegalovirus murino; DsRed2: gen de la proteína fluorescente en rojo; IGF-I: factor de crecimiento insulino similar tipo I; SV40: señal de poliadenilación; Amp: gen de resistencia a ampicilina; ORI: origen de replicación; ITR: repetición terminal invertida; Ψ: señal de encapsidación; E4: secuencia no codificante de la región E4 del Ad5 (Schwerdt y col., 2013).

Se implementó terapia génica neuroprotectora con IGF-I en ratas hembras jóvenes y viejas, las cuales fueron inyectadas en el hipotálamo mediobasal con $8,45 \times 10^9$ PV de HDAd-IGF-I o HDAd-DsRed2 (vector control) y se adicionó un grupo intacto para ambas edades. Estos HDAd's fueron estudiados *in vitro* e *in vivo* con el fin de determinar si pueden ser utilizados para terapia génica de largo plazo (4 meses). Dichos adenovectores fueron aplicados por Hitt y col. (1998) en las líneas celulares A549 (adenocarcinoma alveolar humano), B92 (glial de rata) y N2a (neuroblastoma de ratón).

El estudio del envejecimiento hipotalámico a corto plazo (17 días) se hizo con adenovectores RAd-βgal (vector control) y RAd-IGF-I de primera generación. Se asignaron grupos de ratas jóvenes, viejas

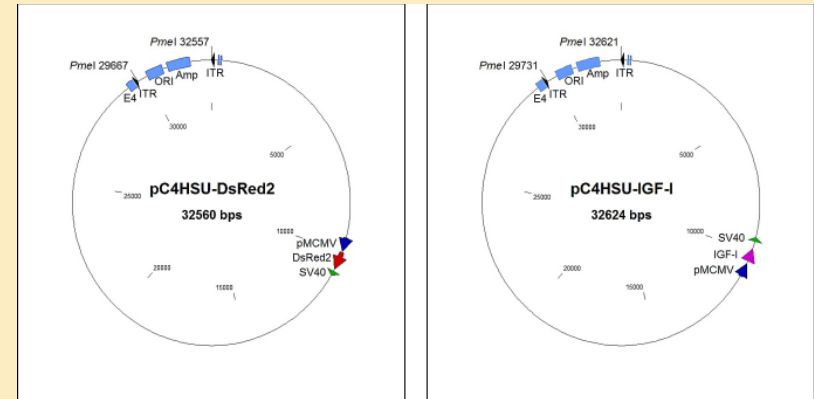


Fig. 12.12. Maps of pC4HSU-IGF-I and pC4HSU-DsRed2 plasmids used to generate HDAd-IGF-I and HDAd-DsRed2, respectively. mCMV: murine cytomegalovirus promoter; DsRed2: red fluorescent protein gene; IGF-I: insulin I growth factor I; SV40: Simian virus 40 late polyadenylation signal; Amp: ampicillin resistant gene; ORI: origin of replication; ITR: inverted terminal repetition; Ψ: encapsidation signal; E4: non-coding sequence of Ad5 E4 region (Schwerdt et al., 2013).

were studied *in vitro* and *in vivo* in order to determine if they can be used for long-term gene therapy (4 months). These adenovectors were applied by Hitt et al. (1998) in the cellular lines A549 (human alveolar adenocarcinoma), B92 (rat glial tumor) and N2a (mice neuroblastoma).

The study of hypothalamic ageing with short-term gene therapy (17 days) was performed with the adenovectors RAd-βgal (control vector) and RAd-IGF-I of first generation. The groups of young, old and senescent rats were injected with both adenovectors. The levels of serum PRL were measured during the experiment in order to monitor the neurons of TIDA system.

Vectors were injected by hypothalamic stereotaxia (**fig. 12.13 A-B**) in the arcuate nucleus (Paxinos and Watson, 1998).

The dopaminergic (DA) neurons of rat hypothalamus are grouped into two main areas, A12 and A14, which include different nuclei (Dahlström and Fuxe, 1964; Tillet and Kitahama, 1998). Kawano and Daikoku (1997) localized the A12 area in the arcuate nucleus (ARC; containing dorsal and ventrolateral cellular groups) and in the periarculate region, with their axons projecting into the external zone

y seniles inyectadas con ambos adenovectores. Los niveles de PRL sérica fueron medidos durante el experimento para monitorear las neuronas del sistema TIDA. Los vectores fueron inyectados mediante estereotaxia hipotalámica en el núcleo arcuato (Paxinos y Watson, 1998) (fig. 12.13 A-B).

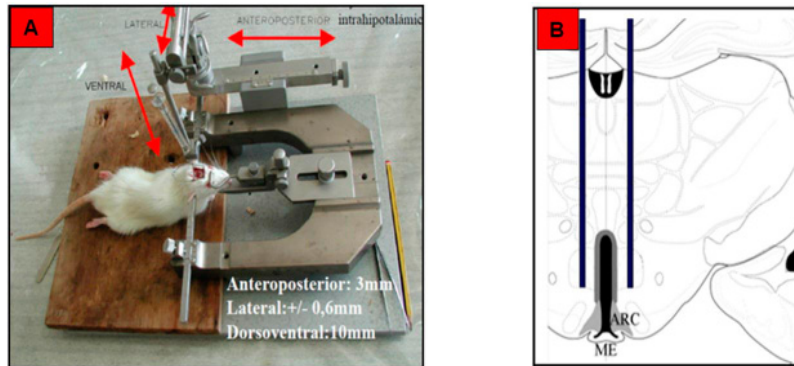


Fig. 12.13 A-B. Estereotaxia hipotalámica. A. Aparato de estereotaxia. B. Representación esquemática de una sección coronal de la región hipotalámica tuberal a nivel de la eminencia media (ME) mostrando el área de distribución de las neuronas dopaminérgicas en el núcleo arcuato (ARC) (gris) y la zona periventricular. Cánula bilateral insertada. En negro: tercer ventrículo (3V).

Las neuronas dopaminérgicas (DA) del hipotálamo de rata están agrupadas en las áreas A12 y A14 (Dahlström y Fuxe, 1964; Tillet y Kitahama, 1998). Kawano y Daikoku (1997) localizaron el área A12 y sus correspondientes axones terminales que constituyen el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA) y el área A14 en el núcleo arcuato (ARC, grupos celulares dorsales y ventrolaterales) y región periarquato que proyecta sus axones a la eminencia media donde la DA es liberada en los vasos porta para actuar sobre la adenohipófisis. En la fig. 12.14 se muestra la expresión de β gal en el hipotálamo de ratas jóvenes y seniles después de 17 días de la inyección de RAD- β gal.

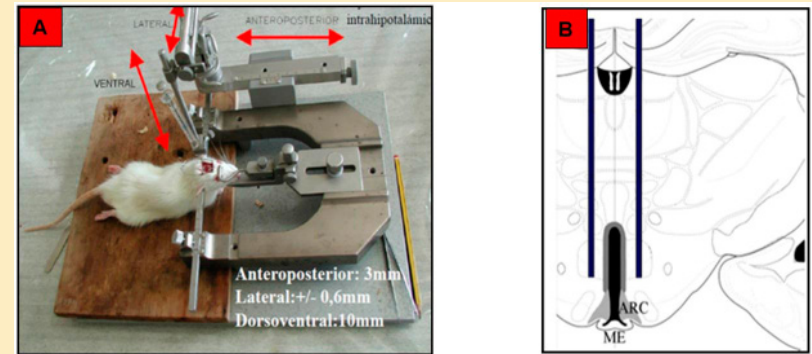


Fig. 12.13 A-B. Hypothalamic stereotaxia. A. Stereotactic apparatus. B. Scheme representation of a coronal plane of the tuberal pituitary region at the level of the median eminence (ME) showing the distribution area of the dopaminergic neurons in the arcuate nucleus (ARC) (grey) and the periventricular zone. Inserted bilateral cannula. In black: third ventricle (3V).

of the median eminence. There, dopamine is released from the axon terminals into the portal vessels of the median eminence, where the neurotransmitters pass on the anterior pituitary lobe. Its correspon-

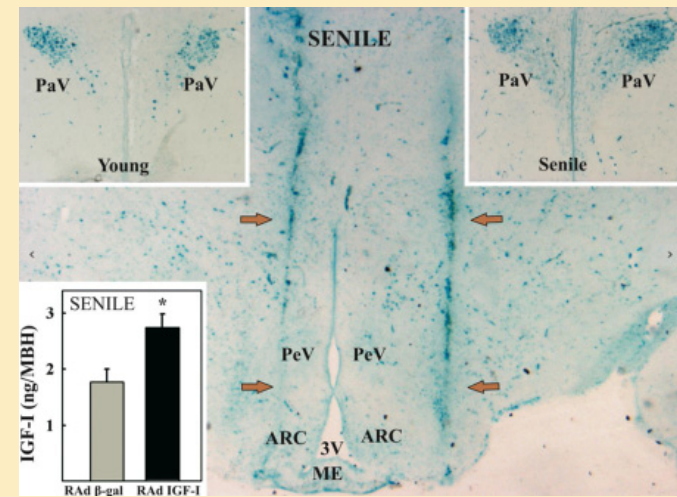


Fig. 12.14. Expression of Rad- β gal. Hypothalamus of young and senescent rats after 17 days of RAD- β gal injection (Hereñú et al., 2007).

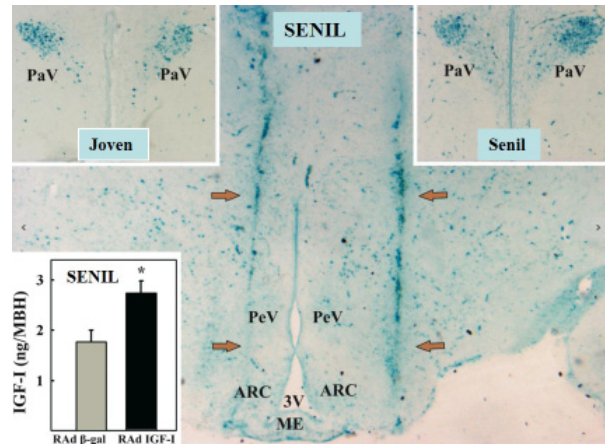


Fig. 12.14. Expresión de RAD-βgal. Hipotálamo de ratas jóvenes y seniles después de 17 días de la inyección de RAD-βgal (Hereñú y col., 2007).

La **fig. 12.15** muestra el aumento del número de las neuronas del hipotálamo periventricular y arcuato en seniles respecto a jóvenes al inyectar el gen portador de IGF-I en una terapia génica de corto plazo.

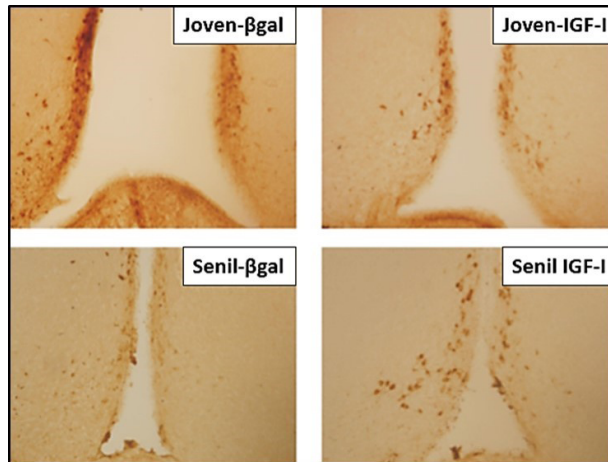


Fig. 12.15. Neuronas hipotalámicas TIDA inmunomarcadas en ratas jóvenes y seniles sometidas a terapia génica de corto plazo con IGF-I. Grupos: joven y senil inyectadas con RAD-β gal /RAD-IGF-I, peroxidasa anti-TH, x 200 (Hereñú y col., 2007).

ding axon terminals constitute the tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) system, whereas the A14 area and its fibers are known as the periventricular dopaminergic (PVDA) system (Kawano and Daikoku; 1997; Goudreau et al., 1992). The A14 DA neurons project their axons passing through the internal portion of the median eminence to terminate in both the neural and intermediate pituitary lobes. Both systems regulate PRL secretion by exerting a tonic inhibitory control on both PRL secretion and lactotrope proliferation (Ben-Jonathan et al., 1989). In **fig. 12.14** the expression of adenovector is seen in the hypothalamus of young and senescent rats after 17 days of RAD-βgal injection.

In **fig. 12.15** the increment of neurons is exhibited in the periventricular and arcuate nucleus of senescent respect to young rats submitted to short-term gene therapy with RAD-βgal.

Our results showed an increment (* $p < 0.05$) of hypothalamic DA neurons of arcuate-periventricular (Arc-Pev) and paraventricular (Pav)

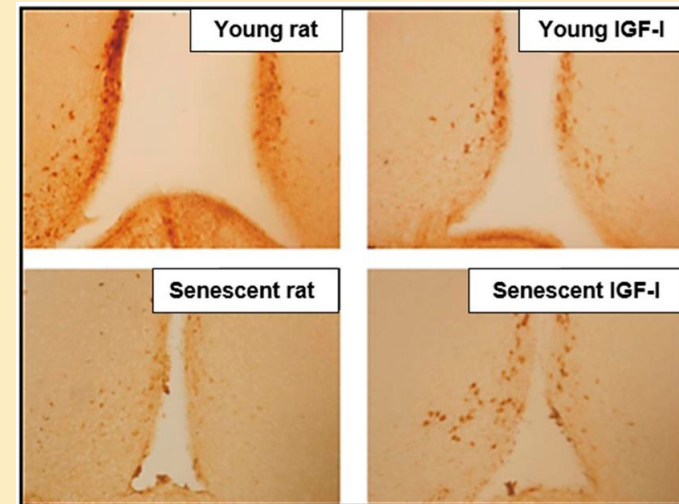


Fig. 12.15. Hypothalamic TIDA neurons immunolabeled in young and senescent rats submitted to short-term gene therapy with RAD-IGF-I. Groups: young and senescent rats injected with RAD-βgal /RAD-IGF-I, peroxidase anti-TH, x 200 (Hereñú et al., 2007).

Nuestros resultados mostraron un incremento (* $p < 0.05$) de las neuronas DA hipotalámicas de arcuato-periventricular (Arc-Pev) y para-ventricular (Pav) en ratas seniles respecto a jóvenes sometidas a terapia génica de corto plazo (17 días), así como un marcado incremento (** $p < 0.01$) de las neuronas DA totales (fig. 12.16).

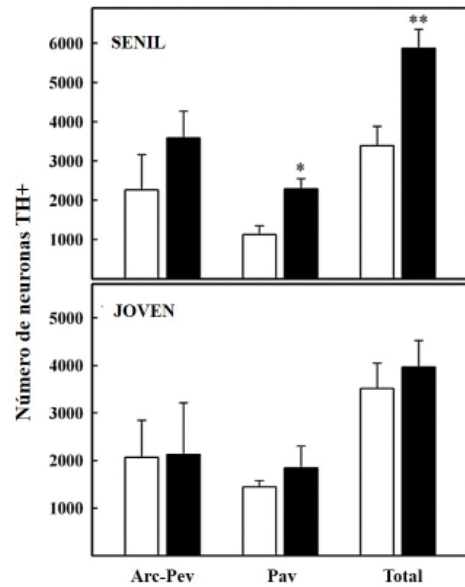


Fig. 12.16. Morfometría de las neuronas TIDA sometidas a la terapia génica a corto plazo con Rad-IGF-I/Rad β gal en ratas jóvenes y seniles (Hereñú y col., 2007).

El estudio del envejecimiento del eje hipotálamo-hipofisario a largo plazo (4 meses) se hizo con los adenovectores HDAd-Red2 (vector control) y HDAd-IGF-I. Se asignaron grupos con ratas jóvenes y viejas divididas en intactas e inyectadas con HDAd-Red2 y HDAd-IGF-I. Los niveles de PRL sérica fueron medidos cada 10 días durante los 4 meses post-inyección, a fin de monitorear la actividad de las neuronas del sistema TIDA hipotalámico. Se detectó un nivel estable de dichas neuronas TIDA en las ratas viejas inyectadas respecto a sus contrapartes jóvenes.

nuclei in senescent rats submitted to short-term gene therapy (17 days) respect to young ones, as well as an increment (** $p < 0.01$) of the totality of DA neurons (fig. 12.16).

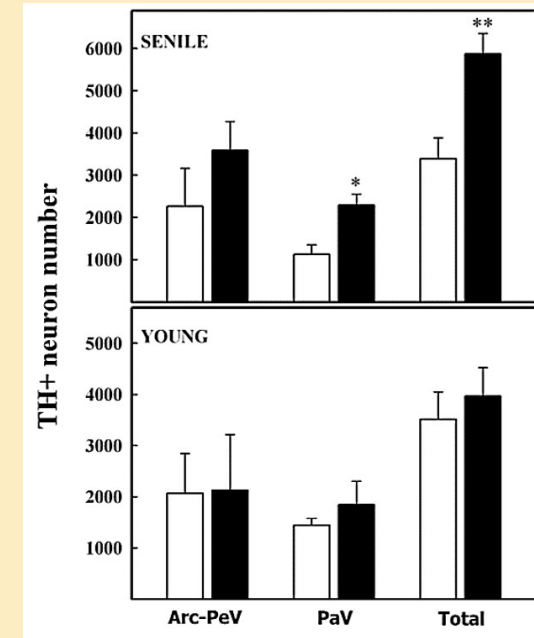


Fig. 12.16. Morphometry of TIDA neurons submitted to short-term gene therapy with RAD-IGF-I/RAD- β gal in young and old rats (Hereñú et al., 2007).

The aging of hypothalamo-pituitary axis to long-term gene therapy (4 months) was made with the adenovectors HDAd-Red2 (control vector) and HDAd-IGF-I. The rats were divided in different groups: young and old, intact and injected with both vectors. The levels of serum PRL were measured each 10 days during 4 post-injection months, so as to monitor the activity of neurons of the hypothalamic TIDA system. We detected a stable level of these TIDA neurons in injected old rats respect to their young counterpart. The intact old rats showed a decrease ($p < 0.05$) of the neurons of this system (fig. 12.17).

En los grupos intactos las ratas viejas mostraron un descenso ($p < 0.05$) de las neuronas del sistema TIDA (fig. 12.17).

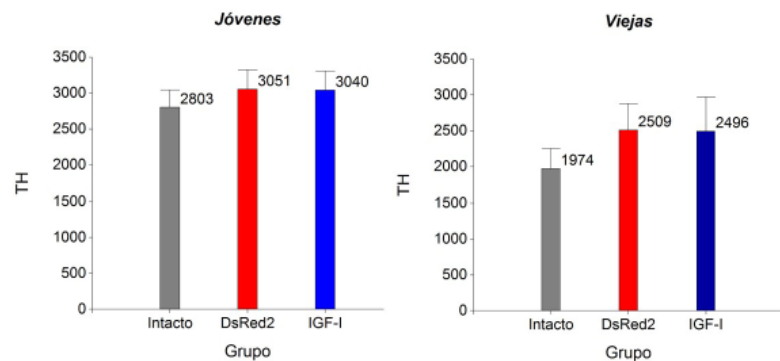


Fig. 12.17. Morfometría de las neuronas TIDA sometidas a la terapia génica a largo plazo con HADd-IGF-I/HADd-DsRed en ratas jóvenes y viejas de los diferentes grupos experimentales (Schwerdt y col., 2013).

La fig. 12.18 muestra gran expresión de DsRed2 (fluorescencia roja) en HMB a los 5 meses post-inyección del vector HDAd-DsRed2. Las células se infectaron con distintas multiplicidades MOI: 10, 100, 1000 y 10000 PV de cada vector, midiendo a las 48 hs post-infección.

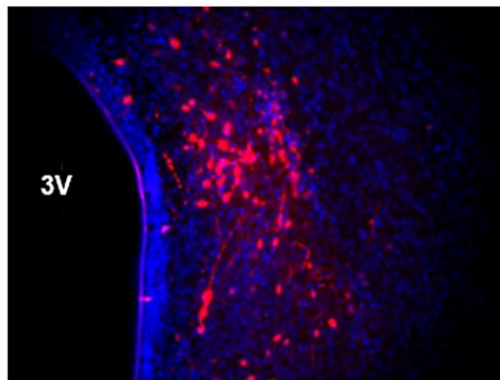


Fig. 12.18. Expresión de DsRed2 (fluorescencia roja) en el HMB del vector HDAd-DsRed2. Azul: núcleos marcados con DAPI; 3V: tercer ventrículo (IF, x 200) (Schwerdt y col., 2013).

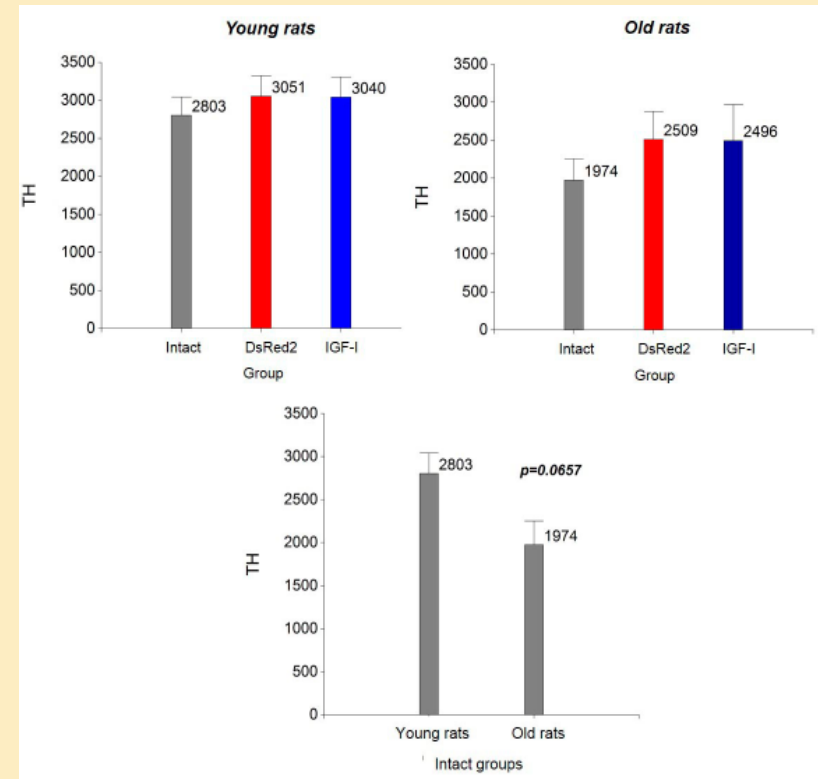


Fig. 12.17. Morphometry of TIDA neurons submitted to long-term gene therapy with HADd-IGF-I/HADd-DsRed in young and old rats of different experimental groups (Schwerdt et al., 2013).

Figure 12.18 shows the expression of DsRed2 (red fluorescence) in mediobasal hypothalamus (MBH) at 5 post-injection months of vector HDAd-DsRed2. Cells were infected with different MOI multiplicities: 10, 100, 1000 and 10000 PV of each vector, measuring at 48 h post-infection the fluorescence intensity of DsRed2 of lysates in HMB.

In **fig. 12.19** intensity of fluorescence is observed in cell lysates A549, B92 and N2a, at 48 h post-infection. High levels of HDAd-IGF-I in B92 and of HDAd-DsRed2 in A549 are seen.

En la **fig. 12.19** se observa la intensidad de fluorescencia específica en los lisados celulares A549, B92 y N2a, a las 48 hs post-infección. Se ven altos niveles de fluorescencia específica de HDAd-IGF-I en B92 y de HDAd-DsRed2 en A549.

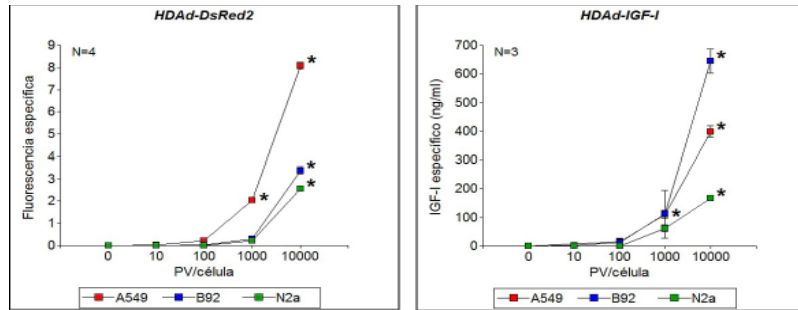


Fig. 12.19. Intensidad de fluorescencia específica en lisados celulares A549, B92 y N2a a las 48 hs post-infección. Distintas MOI (PV/célula) de HDAd-DsRed2 y HDAd-IGF-I (Schwerdt y col., 2013).

Se evaluó la expresión del IGF-I (pg/mg) en los homogenatos del hipotálamo mediobasal (HMB), a las 48 hs post-inyección en los grupos: ratas intactas no inyectadas con el vector y ratas inyectadas con HDAd-DsRed2 (vector control) y con HDAd-IGF-I. Se detectó una sobreexpresión de IGF-I en el HMB ($p < 0.05$).

En la **fig. 12.20** se muestra la sobreexpresión ($p < 0.05$) del IGF-I (pg/mg) en los homogenatos del HMB, a las 48 hs post-inyección al comparar los diferentes grupos experimentales.

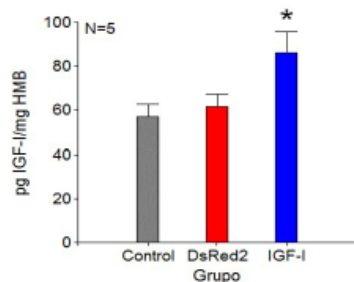


Fig. 12.20. Sobreexpresión de IGF-I en los homogenatos de HMB a los 48 hs post-inyección del HDAd-IGF-I. Grupo control: ratas intactas no inyectadas. Grupo DsRed2: ratas inyectadas con el vector control HDAd-DsRed2 y grupo IGF-I: ratas inyectadas con HDAd-IGF-I ($p < 0.05$) (Schwerdt y col., 2013).

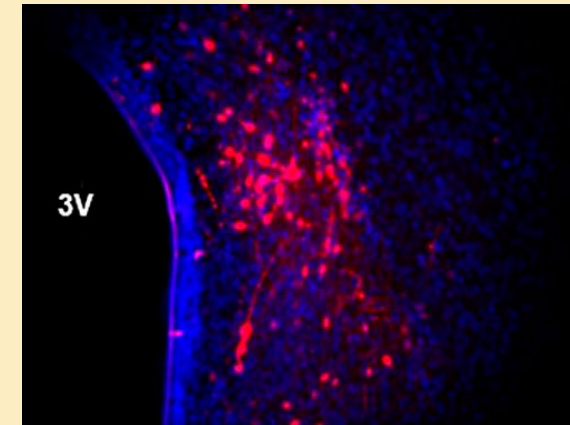


Fig. 12.18. Expression of DsRed2 (red fluorescence) in MBH (5 post-injection months of vector HDAd-DsRed2). Blue: nuclei stained with DAPI. 3V: third ventricle, IF, x 200 (Schwerdt et al., 2013).

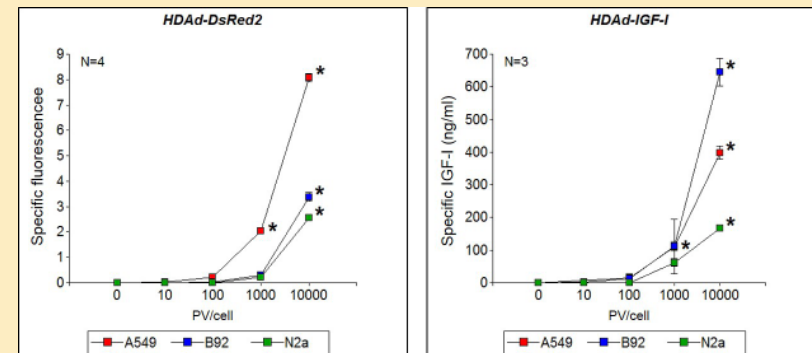


Fig. 12.19. Intensity of fluorescence in cell lysates A549, B92 and N2a at 48 h post-infection. Different MOI (WV/cell) of HDAd-DsRed2 and HDAd-IGF-I (Schwerdt et al., 2013).

The expression of IGF-I (pg/mg) was evaluated in the homogenates of MBH at 48 h post-injection in the groups of intact rats not injected with vector and of rats injected with vectors HDA-DsRed2 and HDA-DsRed2. We detected overexpression of IGF-I in MBH ($p < 0.05$). In **fig. 12.20** overexpression ($p < 0.05$) of IGF-I (pg/mg) is shown in MBH homogenates at 48 h post-injection in the different experimental groups.

La **fig. 12.21 A-F** presenta la morfología de la población lactotropa en ratas jóvenes intactas, inyectadas con vector control HDAd-Red e inyectadas con HDAd-IGF-I y sometidas a terapia génica a largo plazo (4 meses).

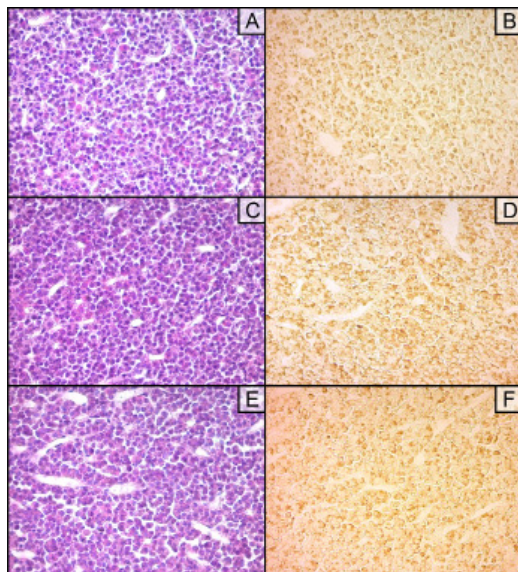


Fig. 12.21 A-F. Población lactotropa en ratas jóvenes. A-B. Jóvenes intactas (H-E/anti-PRL). C-D. Jóvenes HDAd-Red (H-E/anti-PRL). E-F. Jóvenes HDAd-IGF-I. A, C, E: H-E y B, D, F: peroxidasa, anti-PRL (x 400) (Schwerdt y col., 2013).

La **fig. 12.22 A-F** presenta los campos representativos de la H-E e inmunohistoquímica anti-PRL de la población lactotropa en ratas viejas sometidas a terapia génica de largo plazo con el HDAd-IGF-I. En la **fig. 12.22 D** se ve un microprolactinoma cromóforo rodeado por una empalizada de lactotropas bien teñidas. Dichos prolactinomas sintetizarían isoformas de PRL por lo que sus lactotropas no inmunomarcaban con el antisuero anti-PRL utilizado en la inmunohistoquímica. Se observa un descenso de la densidad de lactotropas y una menor incidencia de microprolactinomas, al comparar con los respectivos grupos controles. Las lactotropas de **fig. 12.22 E-F** muestran un evidente aumento del área celular que se confirma en la morfometría.

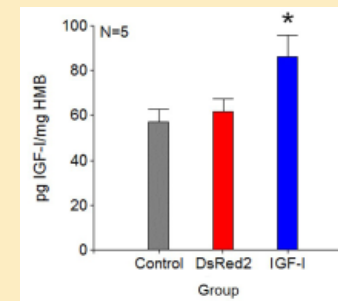


Fig. 12.20. Overexpression of IGF-I in homogenates of MBH at 48 h post-injection of HDAd-IGF-I. Control group: intact rats not injected with vector. Group DsRed2: rats injected with vector HDA-DsRed2 (* $p < 0.05$) (Schwerdt et al., 2013).

Presented in **fig. 12.21 A-F** there appears morphology in intact young rats and injected with HDAd-Red and HDAd-IGF-I, submitted to long-term gene therapy (4 months).

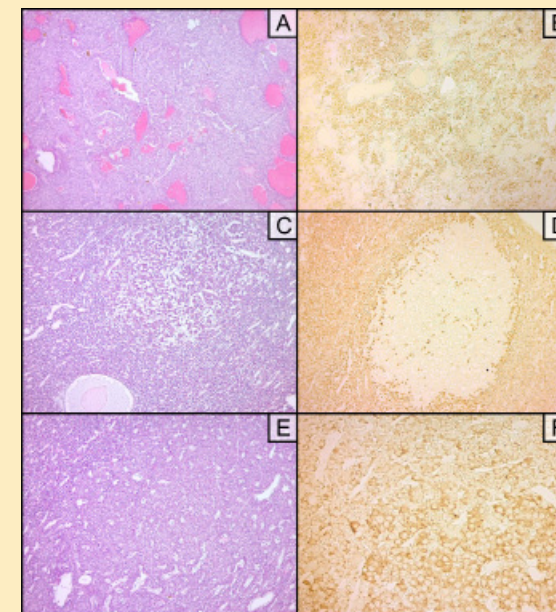


Fig. 12.21 A-F. Lactotrope population in young rats. A-B. Intact young (H-E/anti-PRL). C-D. Young HDAd-Red with microprolactinomas (H-E/anti-PRL). E-F. Young HDAd-IGF-I. A, C, E: H-E and B, D, F: peroxidase, anti-PRL (x 400) (Schwerdt et al., 2013).

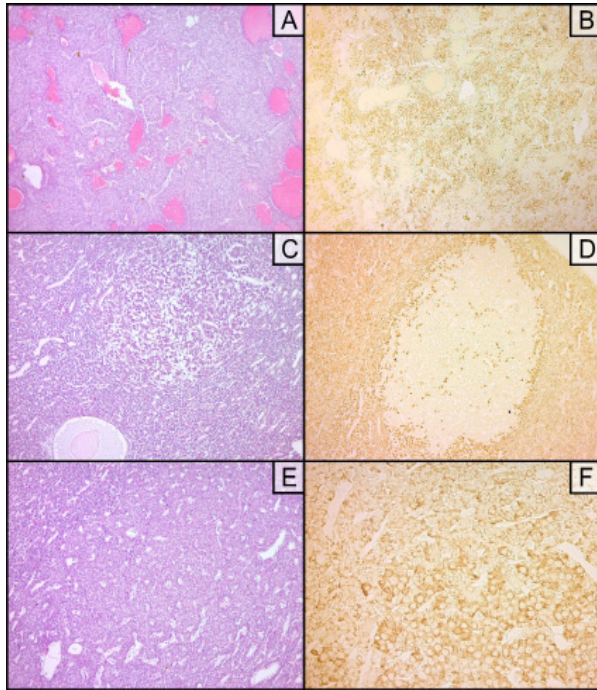


Fig. 12.22 A-F. Población lactotropa en ratas viejas. A-B. *Viejas intactas: H-E/anti-PRL.* C-D. *Viejas: HDAd-Red con microprolactinoma (H-E/anti-PRL).* E-F. *Viejas: HDAd-IGF-I. (ACE: H-E y BDF: peroxidasa, anti-PRL, x 400) (Schwerdt y col., 2013).*

Tabla 2. Morfometría de la población lactotropa en ratas sometidas a terapia génica.

Jóvenes	Intactas	HDAd-Red2	HDAd-IGF-I
DV	92.9 ± 4.0	84.7 ± 5.1	83.5 ± 1.2
DC	292.5 ± 32.1	285.8 ± 20.1	305.2 ± 25.2
TC	35.5 ± 2.1	26.2 ± 0.5*	27.6 ± 2.1*
N° células/1000 μm ²	30.3 ± 2.3	27.2 ± 0.4	31.0 ± 3.1
Viejas			
DV	47.6 ± 3.1	22.3 ± 2.3*	11.3 ± 1.0**
DC	227.0 ± 12.2	101.5 ± 8.2**	98.6 ± 4.2**
TC	21.7 ± 2.1	31.6 ± 4.2*	31.0 ± 4.3*
N° células/1000 μm ²	47.7 ± 2.1	36.7 ± 6.1	26.5 ± 4.1**

Los datos son expresados ± ES. Los asteriscos representan el nivel de significancia respecto a ratas intactas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Grupos: intactas, inyectadas con HDAd-Red2 y HDAd-IGF-I, jóvenes y viejas.

Presented in **fig. 12.22 A-F** there are the representative fields of H-E and anti-PRL immunohistochemistry of the lactotrope population in old rats submitted to long-term gene therapy with HDAd-IGF-I. In **fig. 12.22 D** a chromophobe microprolactinoma is seen surrounded by a palisade of well labeled lactotropes. This prolactinoma synthesizes PRL isoforms that are not labeled with the antiserum anti-PRL used. We observed a decrease of cell density and a smaller incidence of microprolactinomas, especially when comparing the respective control groups. The lactotropes of **fig. 12.22 E-F** show an evident increment of cell area that confirm the morphometry.

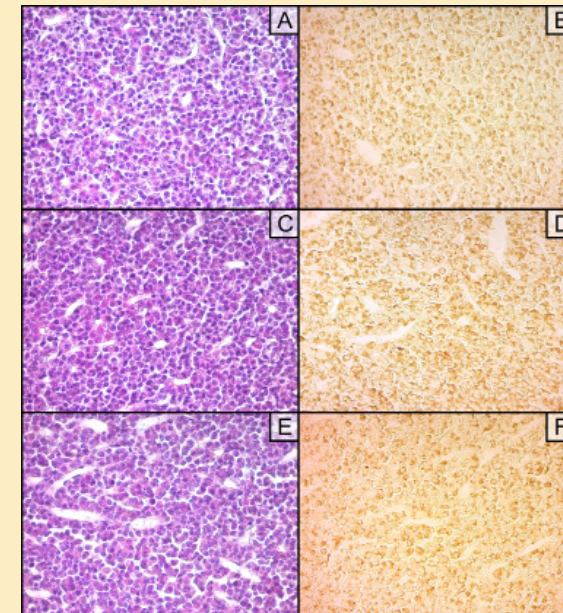


Fig. 12.22 A-F. Lactotrope population in old rats. A-B. *Intact old (H-E/anti-PRL).* C-D. *Old HDAd-Red with microprolactinomas (H-E/anti-PRL).* E-F. *Old HDAd-IGF-I. A, C, E: H-E and B, D, F: peroxidase, anti-PRL, x 400 (Schwerdt et al., 2013).*

In **table 2** morphometry of lactotrope population is shown in young and old rats submitted to long-term gene therapy.

Table 2 shows that in young rats there are no profound changes in volume density (VD), cell density (CD) and N° of cells/1000 mm², but a decrease ($p < 0.05$) of cell size (CS) in injected groups respect to intact one can be observed.

En la **tabla 2** se muestra la morfometría de la población lactotropa en ratas jóvenes y viejas sometidas a terapia génica a largo plazo. En las ratas jóvenes no hay grandes cambios en la densidad de volumen (DV), en la densidad de células (DC), en el N° de células /1000 mm², observándose un descenso ($p < 0.05$) del tamaño celular (TC) en los grupos inyectados respecto al grupo intacto. En las ratas viejas se detecta un descenso significativo ($p < 0.01$) de DV, DC, N° de células /1000 mm² y un incremento del tamaño celular ($p < 0.05$) compensatorio en los grupos inyectados respecto a ratas intactas. Es de remarcar, que hubo áreas cromóforas que tendrían isoformas de PRL que no se pudieron cuantificar.

Además, en la **fig. 12.23** se observa el aumento ($p < 0.01$) del número y tamaño de las lactotropas en ratas sometidas a estrógenos y el descenso ($p < 0.01$) del número y tamaño celular bajo la influencia del adenovector Rad-IGF-I en ratas inyectadas mediante estereotaxia intrapituitaria (Schwerdt y col., 2016).

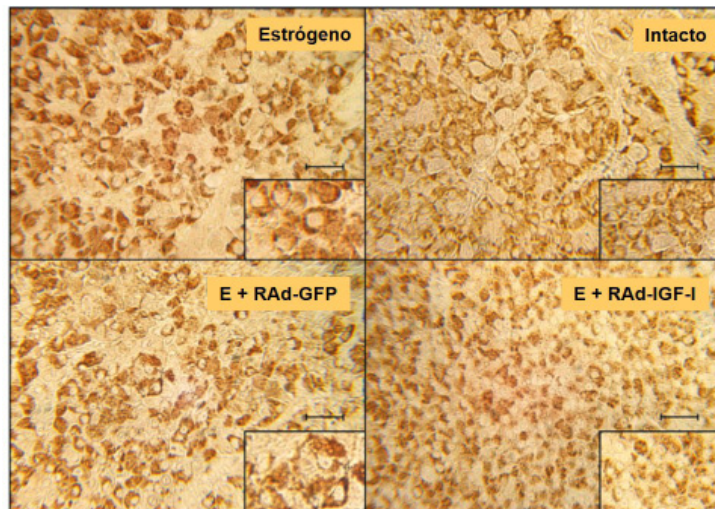


Fig. 12.23. Inmunohistoquímica de la población lactotropa en ratas sometidas a tratamiento con estrógenos y Rad-IGF-I (peroxidasa, anti-PRL, x 200) (Cónsole y col., 2008).

It is important to note that there were chromophobe areas with PRL isoforms that cannot be quantified. In addition, in **fig. 12.23** an increase ($p < 0.01$) of the number and size of lactotropes submitted to estrogens and a decrease ($p < 0.01$) of these parameters can be observed under the influence of RAD-IGF-I in rats injected by intrapituitary stereotaxia (Schwerdt et al., 2016).

Table 2. Morphometry of lactotrope population in rats submitted to long-term gene therapy

Young	Intact	HDAd-Red2	HDAd-IGF-I
VD	92.9 ± 4.0	84.7 ± 5.1	83.5 ± 1.2
CD	292.5 ± 32.1	285.8 ± 20.1	305.2 ± 25.2
CS	35.5 ± 2.1	26.2 ± 0.5*	27.6 ± 2.1*
N° cells/1,000 μm ²	30.3 ± 2.3	27.2 ± 0.4	31.0 ± 3.1
Old			
VD	47.6 ± 3.1	22.3 ± 2.3*	11.3 ± 1.0**
CD	227.0 ± 12.2	101.5 ± 8.2**	98.6 ± 4.2**
CS	21.7 ± 2.1	31.6 ± 4.2*	31.0 ± 4.3*
N° cells/1,000 μm ²	47.7 ± 2.1	36.7 ± 6.1	26.5 ± 4.1**

Dates are expressed ± SEM. Asterisks represent the level of significance respect to intact rats: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Groups: intact, injected with HDAd-Red2 and HDAd-IGF-I, young and old (Schwerdt et al., 2013).

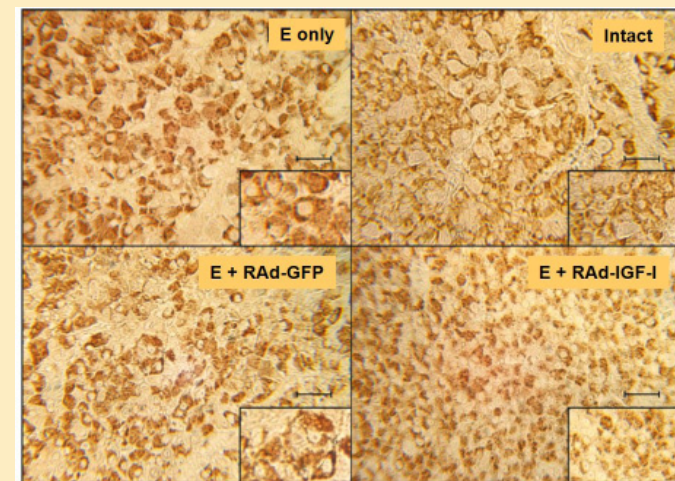


Fig.12.23. Immunohistochemistry of lactotrope population in rats submitted to treatment with estrogens and RAD-IGF-I (peroxidase, anti-PRL, x 200) (Cónsole et al., 2008).

Nuestro grupo de trabajo demostró que la terapia génica de corto plazo (17 días) para RAD-IGF-I en el sistema TIDA hipotalámico de ratas hembras de seniles fue altamente efectiva para corregir la hiperprolactinemia crónica (**p < 0.01) (fig. 12.24).

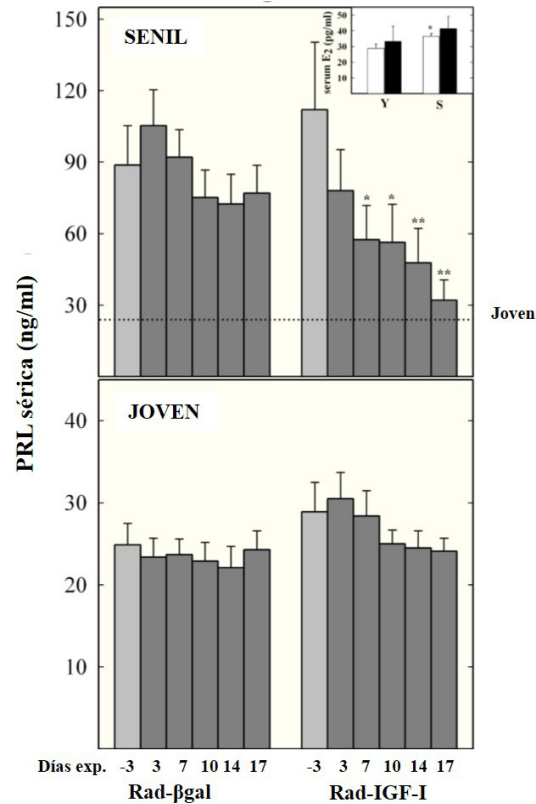


Fig. 12.24. Valores séricos de PRL en ratas jóvenes y seniles sometidas a terapia génica de corto plazo (17 días) (**p < 0.01) (Hereñú y col., 2007).

En la terapia génica a largo plazo (4 meses) con el vector HDAd-IGF-I descendieron (*p < 0.05) los valores séricos de PRL tanto en ratas jóvenes como en viejas inyectadas respecto a las ratas intactas (fig. 12.25).

Our working group demonstrated that the short-term gene therapy (17 days) for RAD-IGF-I in the hypothalamus TIDA system of senescent female rats was highly effective to correct chronic hiperprolactinemia (**p < 0.01) (fig. 12.24).

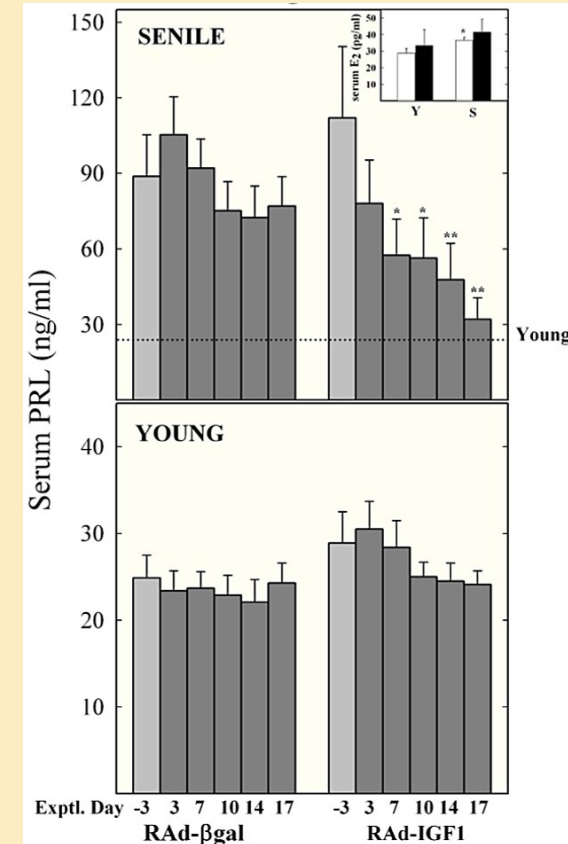


Fig. 12.24. Serum values of PRL in senescent and young rats submitted to short-term gene therapy (17 days) (**p < 0.01) (Hereñú et al., 2007).

The serum values of PRL decreased (*p < 0.05) with HDAd-IGF-I in injected young as well as old rat respect to intact ones (fig. 12.25).

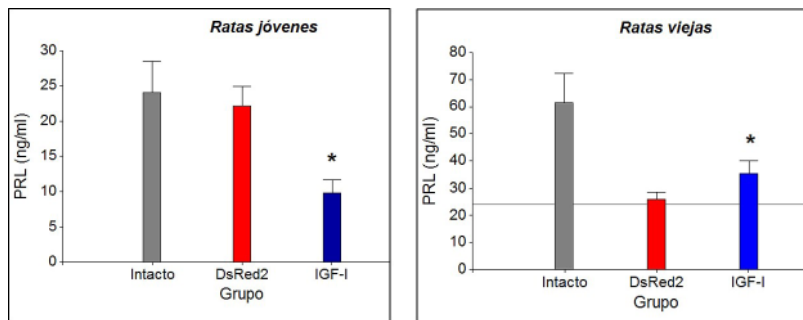


Fig. 12.25. Valores séricos de PRL en ratas jóvenes y viejas sometidas a terapia génica a largo plazo. (* $p < 0.05$). La línea de corte corresponde a los valores normales en ratas jóvenes (Schwerdt y col., 2013).

La **fig. 12.26** muestra la cinética de la PRL (ng/ml) de ratas jóvenes en los días pre/post-inyección de los vectores.

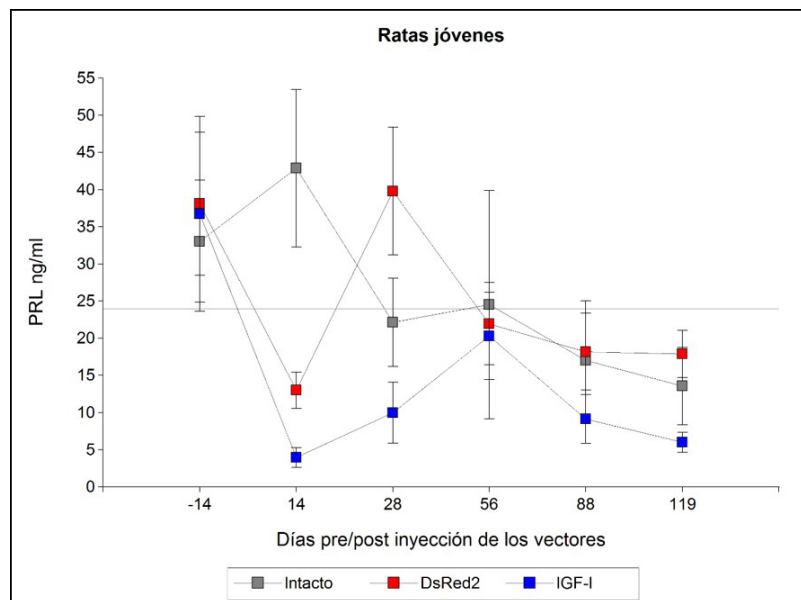


Fig. 12.26. Cinética de la PRL (ng/ml) de ratas jóvenes en los días pre/postinyección de los vectores (Schwerdt y col., 2013).

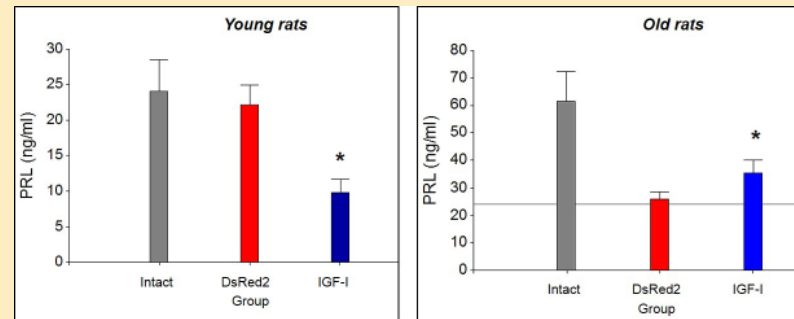


Fig. 12.25. Serum values of PRL in young and old rats submitted to long-term gene therapy. The cut line belongs to the normal values in young rats (* $p < 0.05$) (Schwerdt et al., 2013).

The **fig. 12.26** shows the kinetics of PRL (ng/ml) of young rats in pre/postinjection of vectors.

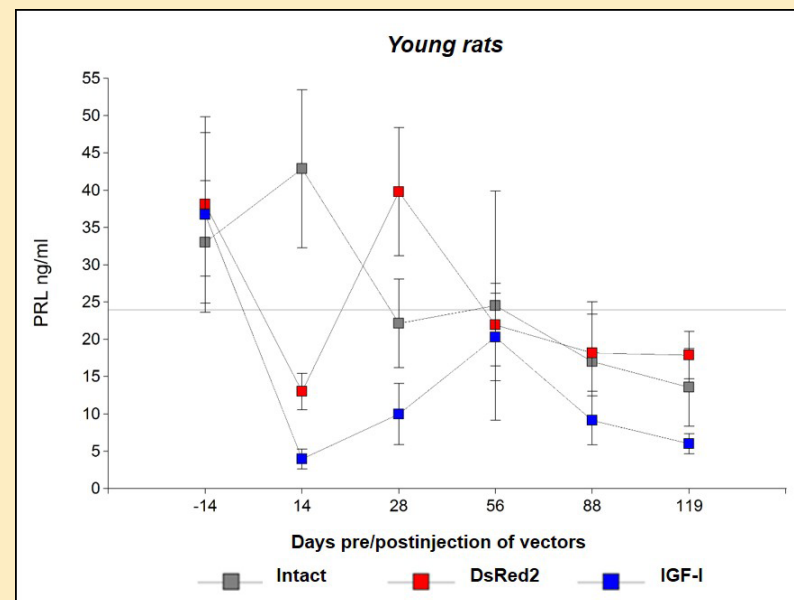


Fig. 12.26. Kinetics of PRL (ng/ml) of young rats in pre/postinjection of vectors (Schwerdt y col., 2013).

El análisis del envejecimiento del hipocampo se hizo con los vectores HDAd-Red2 (vector control) y HDAd-IGF-I. Se asignaron grupos de ratas jóvenes y viejas inyectadas vía icv con estos vectores. Una de las regiones más afectadas por el proceso del envejecimiento es el hipocampo que juega un rol clave en el control de las funciones cognitivas. Estas alteraciones desencadenan enfermedades neurodegenerativas que afectan la salud mental y conducen a la pérdida progresiva de la memoria. Cuando el vector se inyectó en los ventrículos laterales, pudo detectarse expresión transgénica hasta al menos 18 días después de la estereotaxia, observándose fluorescencia roja en las células ependimarias de los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el acueducto de Silvio (fig. 12.27).

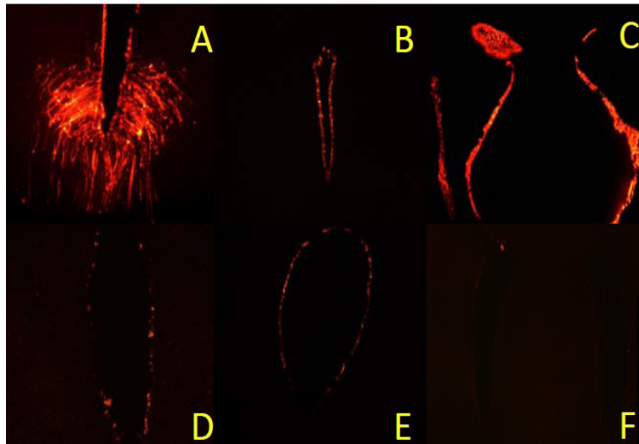


Fig. 12.27. Expresión del RAd-DsRed. Microfotografías de las células ependimarias con emisión de fluorescencia roja. A, B y C: rata sacrificada 2 días después de la inyección icv del adenovector. D, E y F: rata sacrificada 18 días después de la inyección icv del adenovector. A y D: 3er ventrículo, x 100 y x 200, respectivamente. B y C: Acueducto de Silvio, x 100 y x 200, respectivamente. C y F: Ventriculos laterales, x 400 (Pardo y col., 2013).

La **fig. 12.28** muestra la inmunomarcación de los grupos IGF-I y Ds-Red para doblecortina, GFAP y vimentina.

The analysis of hippocampal ageing was made with adenovectors HDAd-Red2 (control vector) and HDAd-IGF-I. The groups assigned were: young and old rats injected (intracerebroventricular way: icv) with these vectors. One of the most affected regions by the aging process is the *hippocampus* that plays a key role in the control of cognitive functions. These alterations trigger neurodegenerative diseases that affect mental health and lead to a progressive loss of memory. When the vector was injected in the lateral ventricles transgenic expression could be detected until 18 days after stereotaxia, noting red fluorescence in the ependymal cells of lateral ventricles, third ventricle and Sylvian aqueduct (fig. 12.27).

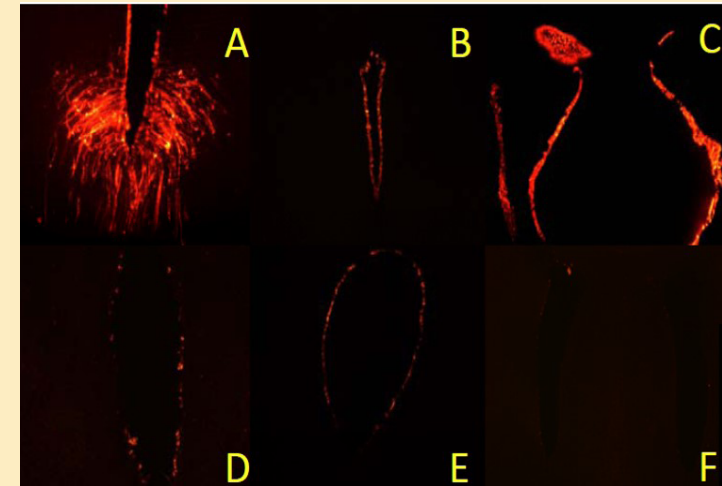


Fig. 12.27. Expression of RAd-DsRed. Microphotographies of endymal cells with red fluorescence. A, B, C: sacrificed rat 2 days after icv injection of RAd-DsRed. D, E, F: sacrificed rat after 18 days of injection of RAd-DsRed. A, D: third ventricle, x 100 y x 200, respectively. B, C: Sylvian aqueduct, x 100 y x 200, respectively. C, F: lateral ventricles, x 400 (Pardo et al., 2013).

In **fig. 12.28** there is evidence of immunolabeling of groups IGF-I and DsRed for doublecortin, GFAP and vimentin.

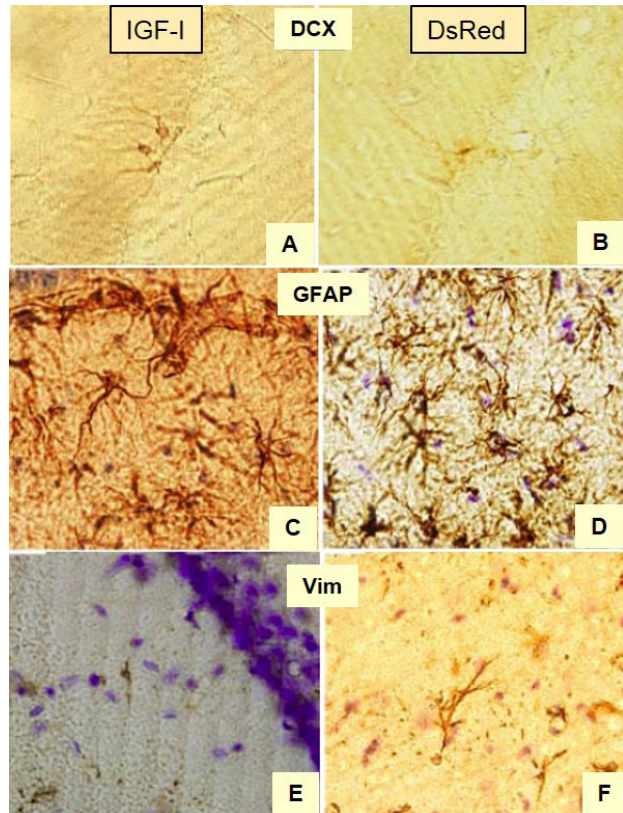


Fig. 12.28. Inmunomarcación de las neuronas del giro dentado (GD) y del *stratum radiatum* (SR). A y B: Doblecortina en GD. C y D: GFAP en SR. E y F: Vimentina en SR. A, C y E: Grupo T. B, D y F: Grupo C. Campos microscópicos x 200 (Pardo y col., 2013).

Los estudios morfométricos realizados en nuestro laboratorio detectaron un aumento ($*p < 0.05$) de las neuronas doblecortina positivas en el giro dentado respecto al grupo control. En el *stratum radiatum* (SR) no se observaron diferencias significativas en el recuento de células vimentina positivas ($p=0.483$). Por el contrario, el recuento de células GFAP positivas fue mayor en el SR del grupo C, respecto al T ($p=0.025$) (fig. 12.29).

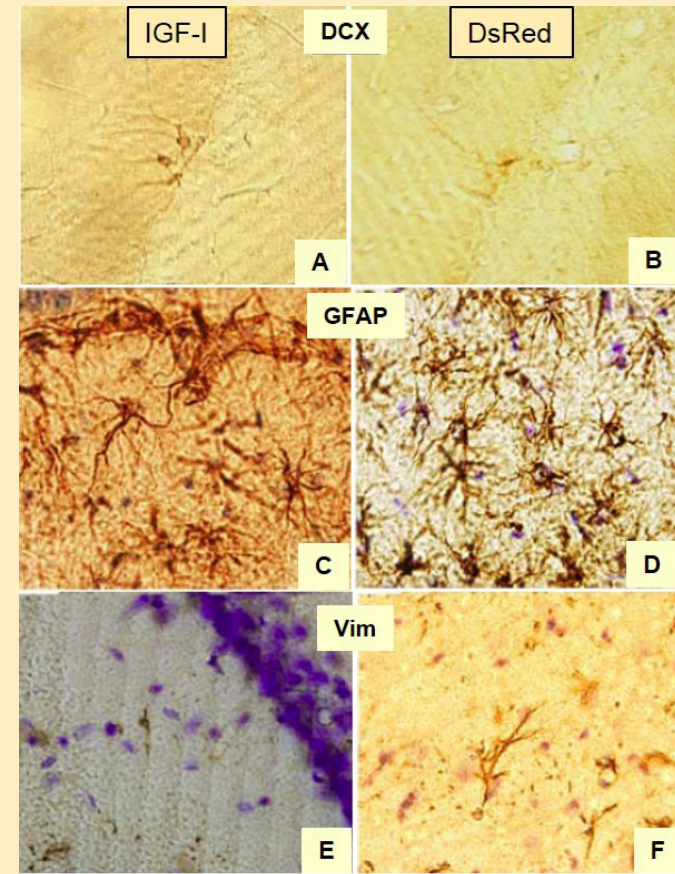


Fig. 12.28. Immunolabeling of neurons of *dentate gyrus* (DG) and *stratum radiatum* (SR). A, B: Doublecortin in DG. C, D: GFAP in SR. E, F: Vimentin in SR. A, C, E: T group. B, D, F: C group, x 200 (Pardo et al., 2013).

The morphometric studies made in our laboratory detected an increase ($*p < 0.05$) of positive doublecortin neurons in *dentate gyrus* respect to control group. In *stratum radiatum* (SR) no significant differences were observed in the recount of positive vimentin cells ($p=0.483$). On the contrary, the recount of positive GFAP cells was bigger in SR of C group respect to T ($p=0.025$) (fig. 12.29).

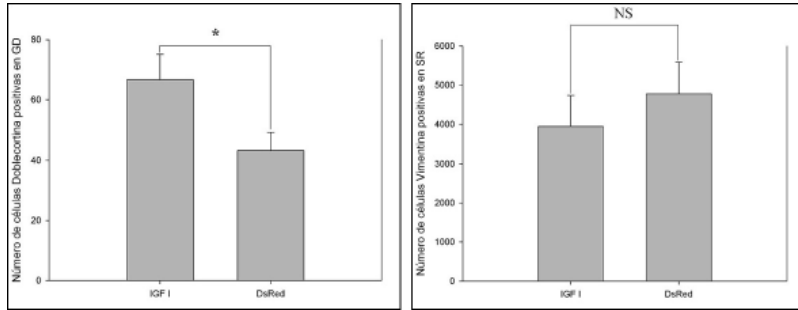


Fig. 12.29. Morfometría de las células doblecortina y vimentina en IGF-I y DsRed (Pardo y col., 2013).

El test cognitivo muestra que ambos grupos T y C reducen su latencia de escape en el desafío 4, después de lo cual se mantienen constantes. En los ensayos sin caja el grupo T cometió en promedio la misma cantidad de errores primarios antes y después del tratamiento. Sin embargo, en el grupo C se observó una tendencia ($p=0.092$) a cometer más errores primarios en el desafío sin caja post-tratamiento. Se observó que el grupo T explora más la región meta en el desafío sin caja después de la cirugía respecto al grupo C. Los valores de los gráficos representan la media +/- ES (figs. 12.30 A-B-C) (Pardo y col., 2016).

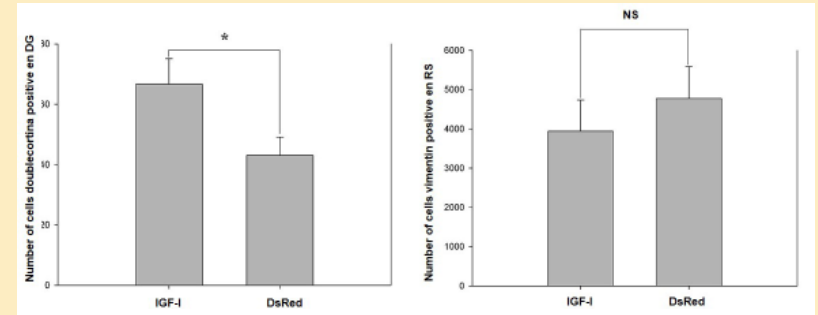


Fig. 12.29. Morphometry of doublecortin and vimentin cells in IGF-I and DsRed (Pardo et al., 2013).

The cognitive test evidences that both groups T and C reduce escape latency in trial 4, after which, they remain constant. In assays with no cage, group T committed on average the same quantity of primary errors before and after treatment. However, in group C a tendency ($p=0.092$) to commit more primary errors in post-treatment trial without cage was observed. Group T was noticed to explore more the target region in the no-cage trial after surgery compared to group C. The values of charts represent the mean +/- SEM (figs. 12.30 A-B-C) (Pardo et al., 2016).

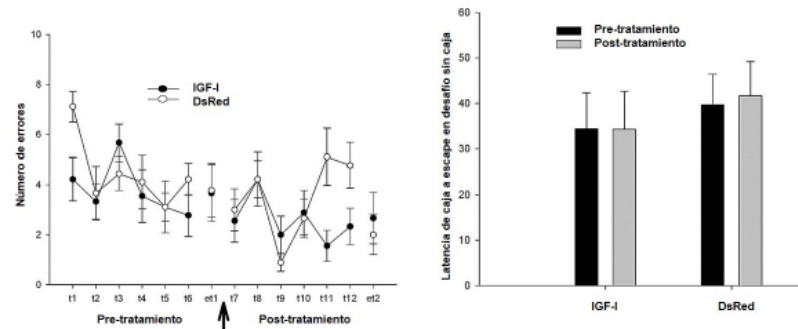


Fig. 12.30 A. Número de errores pre/post-tratamiento y latencia de caja a escape en desafío sin caja (Pardo y col., 2013; 2016).

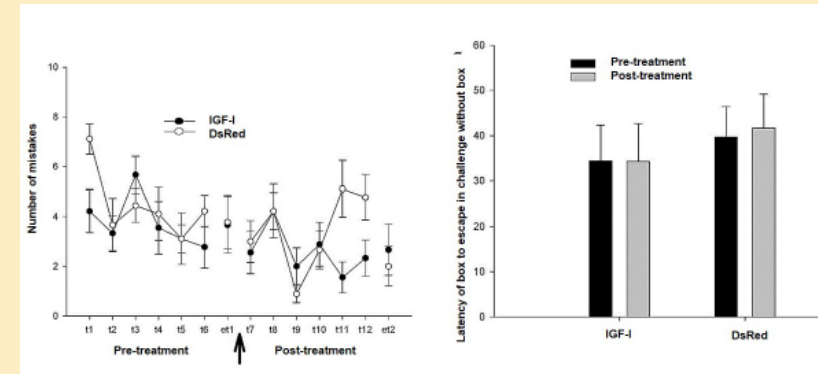


Fig. 12.30 A. Number of pre/post-treatment errors and cage latency to escape in trial with no cage (Pardo et al., 2013; 2016).

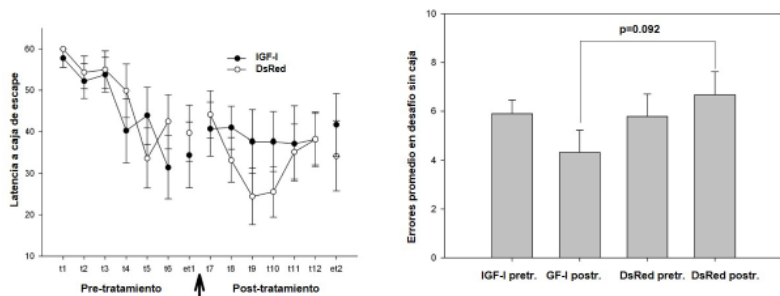


Fig. 12.30 B. Latencia a caja de escape y errores promedio en desafío sin caja (Pardo y col., 2013; 2016).

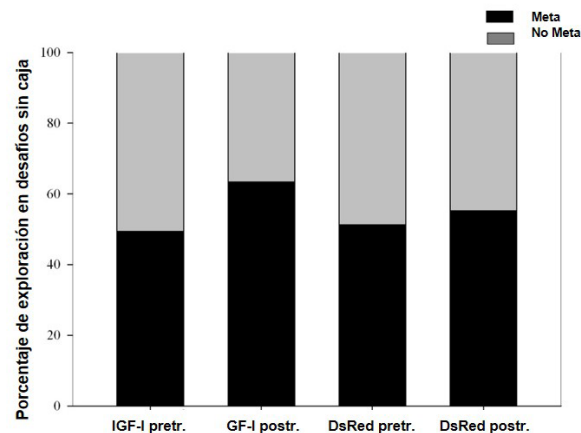


Fig. 12.30 C. Porcentaje de exploración en desafíos sin caja (Pardo y col., 2013; 2016).

El envejecimiento determina en la rata hembra una pérdida de las neuronas hipotalámicas del sistema TIDA que ejercen un control inhibitorio tónico sobre la secreción de PRL y la proliferación de la población lactotropa adenohipofisaria (Sarkar y col., 1982). Dicha pérdida neuronal estuvo asociada a una progresiva hiperprolactinemia (Goya y col., 1990; Hereñú y col., 2007) y al desarrollo de prolactinomas hipofisarios en las ratas hembras (Cónsole y col., 1997).

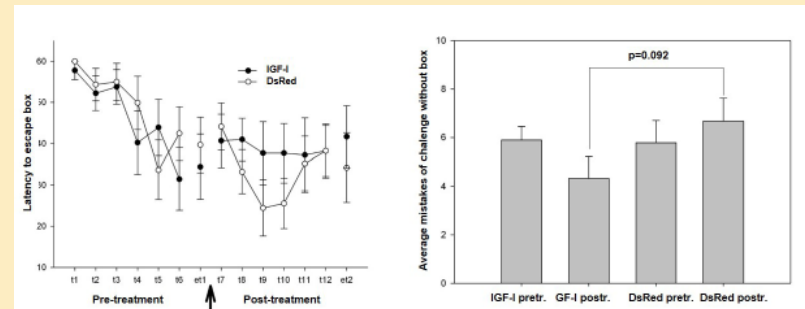


Fig. 12.30 B. Latency to escape cage and average errors in no-cage trial (Pardo et al., 2013; 2016).

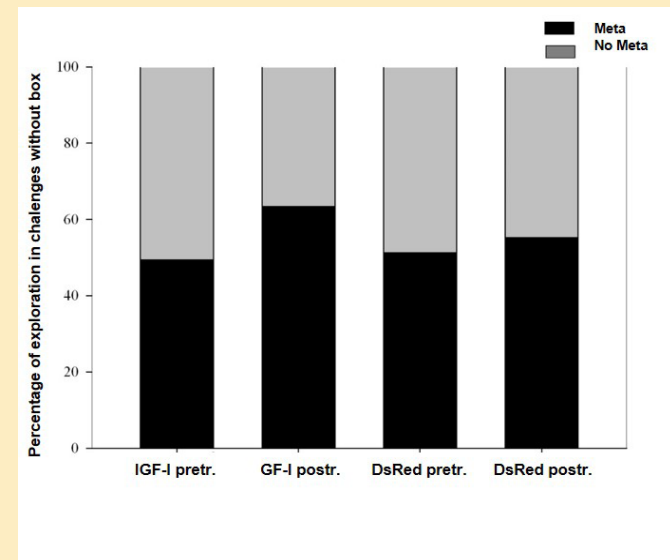


Fig. 12.30 C. Percentage of exploration in no-cage trials (Pardo et al., 2013; 2016).

Aging in the rat determines a progressive loss of TIDA neurons that exert a tonic inhibiting control on PRL secretion and lactotrope proliferation (Sarkar et al., 1982). This loss is associated to a progressive hyperprolactinemia (Goya et al., 1990; Hereñú et al., 2007) and to the development of pituitary prolactinomas in female rats (Cónsole et al., 1997).

En este contexto, la rata hembra envejecida emerge como un modelo único de pérdida y/o disfunción espontánea de neuronas DA centrales, debiendo destacarse que no se trata de un modelo basado en la lesión farmacológica. Se ha detectado en ratas hembras seniles una significativa degeneración de sus neuronas dopaminérgicas (DA) centrales (Porter y col., 1994). La función de las neuronas TIDA declinó durante el envejecimiento, con marcada reducción del contenido de la DA en el hipotálamo, eminencia media y *pars neural* de ratas envejecidas (28 meses) respecto a ratas jóvenes (4 meses) (Porter y col., 1980). El porcentaje de secreción de DA en la sangre del tallo pituitario declinó en ratas machos y hembras envejecidas, comparando con el grupo joven (Reymond y Porter, 1981; Gudelsky y col., 1981).

La transferencia génica constituye una herramienta para tratar enfermedades neurodegenerativas a través del uso de ácidos nucleicos y nuestro modelo aporta la utilización de adenovectores de primera generación en la terapia de corto plazo (17 días) y de tercera generación capaces de actuar a largo plazo (4 meses). Las neuronas A14 están localizadas en los núcleos hipotalámicos para-periventricular (HPV) y periventricular (HPeV) con unas pocas neuronas dispersas en el área hipotalámica ventromedial (AHVM). El 50% de las neuronas DA que terminan en la *pars intermedia* de la pituitaria de la rata se proyectan a través del núcleo periventricular y regulan la secreción de hormona melanoestimulante α (MSH α) (Goudreau y col., 1992; Kawano y Daikoku, 1997). El área A14 y sus fibras son conocidas como el sistema dopaminérgico periventricular. Ambos sistemas regulan la secreción de PRL ejerciendo un control inhibitorio tónico sobre la secreción de PRL y la proliferación lactotropa (Ben-Jonathan y col., 1989).

Sánchez y col. (2003) midieron las áreas A12 y A14 durante la senescencia en A12 hallaron en ratas viejas y seniles un nivel estacionado del número de neuronas DA respecto a jóvenes, con marcado aumento del área neuronal que justifica el aumento de la PRL sérica. Nuestro RAD- β gal mostró una amplia distribución en las células transducidas del HMB que sugiere que el IGF-I transgénico también enriquece las re-

In this context, the aged female rat emerges as a unique model of spontaneous loss and/or dysfunction of central dopaminergic neurons, considering that it is not a model based on the pharmacological lesion. In senescent female rats a significant degeneration of its central dopaminergic neurons (DA) has been detected (Porter et al., 1994). The function of TIDA neurons declined during aging, with marked reduction of DA content in the hypothalamic median eminence and *pars neural* of old rats (28 months) compared to young rats (4 months) (Porter et al., 1980). The percentage of DA secretion into pituitary stalk blood declined in aged male and female rats (24 months), compared to the young group (4 months) (Reymond and Porter, 1981; Gudelsky et al., 1981).

Gene transference constitutes a tool used for treating neurodegenerative diseases by means of the use of nucleic acids, and our model provides the usage of a third-generation adenovector capable of long-term action (4 months). Neurons A14 are localized within the nucleus and at para-periventricular level, with a few scattered neurons in the anterior ventral-medial pituitary. A total of 50% of dopaminergic neurons ending in the *pars intermedia* of the rat pituitary originate or project through the periventricular nucleus and regulate the secretion of the melanocyte-stimulating α (MSH α) hormone (Goudreau et al., 1992; Kawano and Daikoku, 1997). Area A12 and its corresponding terminal axons constitute the TIDA system, whereas area A14 and its fibers are known as the periventricular dopaminergic system (PVDA). Both systems regulate PRL secretion and exert an inhibiting effect on PRL secretion and lactotrope proliferation (Ben-Jonathan et al., 1989).

Sánchez et al. (2003) measured A12 and A14 areas during senescence. In A12 in old and senescent rats a stable number of DA neurons was found compared to those in young ones, with marked increase in the neuronal area justifying the increase in serum PRL. Our RAD- β gal evidenced a wide distribution in the transduced cells of HMB, which suggests that transgenic IGF-I also enriches regions PaV and ARC-

giones PaV y ARC-PeV. La marcada reversión de la hiperprolactinemia crónica lograda con IGF-I en ratas seniles sugiere que su sobreexpresión en el hipotálamo de ratas envejecidas restaura la función y el número de las neuronas DA (Hereñú y col., 2007).

Nuestro modelo experimental con IGF-I en ratas viejas mantuvo el nivel de las neuronas hipotalámicas y mostró en las ratas seniles un aumento ($p < 0.01$) del número de neuronas DA con incremento del área neuronal ($p < 0.05$) respecto a animales jóvenes. Ello determinó un mayor control inhibitorio hipotalámico que resultó en un descenso ($p < 0.01$) del número de lactotropas, menor incidencia de microprolactinomas y control de la hiperprolactinemia ($p < 0.01$). Dichos resultados ratifican la eficacia de nuestra terapia génica con IGF-I para revertir los parámetros propios de la senescencia.

Un buen número de modelos *in vivo* han sido desarrollados para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP), así como para el ensayo de estrategias terapéuticas para esta devastadora enfermedad (Korell y Tanner, 2004). Se han usado neurotoxinas para lesionar las neuronas DA en primates y roedores, y para generar modelos transgénicos que sobreexpresen α -sinucleína (Shimohama y col., 2003). Aunque cada uno de estos paradigmas han provisto información útil en la comprensión de la EP, tienen una limitación común ya que las lesiones neurológicas fueron causadas por una manipulación experimental más que por el envejecimiento fisiológico. Sánchez y col. (2008) detectaron una pérdida del 30-40% de las neuronas DA nigrales, mostrando un severo deterioro de la eficiencia motora y cognitiva. Pérez-Martín y col. (2010) documentaron neurogénesis en el hipotálamo y en las regiones periventriculares de las ratas adultas, después de un tratamiento con IGF-I vía icv. La terapia génica icv de corto plazo con IGF-I en ratas seniles indujo una moderada pero significativa mejora de la eficiencia motora en ratas (Nishida y col., 2011). Aberg y col. (2000) demostraron en el hipocampo de ratas adultas una neurogénesis selectiva con proliferación de las células progenitoras. Trejo y col. (2001) hallaron incremento del IGF-I circulante luego del ejercicio con aumento de nuevas neuronas

PeV. The marked regression of chronic hyperprolactinemia achieved with IGF-I in senescent rats suggests that overexpression in the hypothalamus of aged rats restore the function and number of DA neurons (Hereñú et al., 2007).

Our experimental model with IGF-I in old rats maintained the level of hypothalamic neurons and evidenced in senescent rats an increase ($p < 0.01$) of the number of DA neurons with augmented neuronal area ($p < 0.05$) respect young animals. That determined a higher hypothalamic inhibitory control that led to a decrease ($p < 0.01$) of the number of lactotropes, lower incidence of microprolactinomas and control of hyperprolactinemia ($p < 0.01$). These results ratify how efficiently of our gene therapy with IGF-I reverts the parameters proper of senescence.

A considerable number of *in vivo* models have been developed for the study of the physiopathology of the Parkinson's disease (PD), as well as for the trial of therapeutic strategies for this devastating condition (Korell and Tanner, 2004). The use of neurotoxins has been applied in order to cause lesions to the dopaminergic neurons in primates and rodents, and to generate transgenic models that may overexpress α -synuclein (Shimohama et al., 2003). Although each of these paradigms have provided useful information to understand PD, they have a common limitation since the neurological lesions were caused by experimental manipulation rather than by physiologic aging. Sánchez et al. (2008) detected a loss of 30-40% of nigral DA neurons, evidencing a severe deterioration of motor and cognitive efficiency. Pérez-Martín et al. (2010) reported neurogenesis in the hypothalamus and periventricular regions of adult rats, after icv treatment with IGF-I. Short-term intracerebroventricular IGF-I gene therapy in senescent rats induced a moderate but significant improvement in the motor efficiency of these animals (Nishida et al., 2011). Aberg et al. (2000) demonstrated in *hippocampus* of adult rats a selective neurogenesis with proliferation of stem cells. Trejo et al. (2001) found an increment of circulating IGF-I after exercise with increase of new neurons in the hippocampus. Also, it has been documented that stem neurons are present in the ependymal layer of the third

en el hipocampo. Además, se ha documentado que hay neuronas progenitoras en la capa endimaria del tercer ventrículo de la rata adulta que pueden migrar y diferenciarse como neuronas hipotalámicas (Xu y col., 2005). Liu y col. (2012) detectaron que el β -amiloide indujo la expresión del receptor de IGF-I y sugirieron un mecanismo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Se estudió la prevalencia de la EP en diferentes grupos etáreos, hallando valores que van del 0.2% a 4.8% (85 a 94 años) (de Rijk y col., 1995) y en números absolutos, se comunicó una tasa de prevalencia promedio de 13 por 100.000 personas por año (Mayeux y col., 1995). El IGF-I presentó un efecto neuroprotector contra la neurotoxicidad inducida por DA en cultivos neuronales humanos y de roedores que tendrían implicancias en el tratamiento de la EP (Offen y col., 2001) y protegió a las neuronas DA humanas de la toxicidad inducida por salsolinol, confirmando su aplicación en la EP (Shavali y col., 2003).

La sobreexpresión del IGF-I aumentó la neurogénesis y restauró las neuronas inmaduras en la zona subgranular luego de una lesión cerebral traumática en el hipocampo (Carlson y col., 2014). Kuhn y col. (1996) comunicaron descenso de la neurogénesis en el giro dentado de la rata y la relacionaron con una disminución de la proliferación de las células precursoras de las neuronas granulares. El déficit cognitivo, característico del envejecimiento, se asoció con una disminución de la neurogénesis en el giro dentado (Kuhn y col., 1996), así como con un incremento de la astrogliosis en la zona del stratum radiatum del hipocampo (Nichols y col., 1993). Lee y col. (2014) hallaron descenso del IGF-I y de su receptor en las células piramidales de la corteza somatosensorial y en las neuronas granulares del hipocampo durante el envejecimiento. Además, en un modelo de rata con ataxia cerebelosa, inducido por acetilpiridina, la administración de IGF-I restauró la coordinación motora y rescató parcialmente las neuronas de la oliva inferior (Fernández y col., 1998).

El envejecimiento normal se caracteriza por una declinación en el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo, en acuerdo con los resultados de nuestro laboratorio al aplicar el Test de Barnes (Barnes,

ventricle of the adult rat that may migrate and differentiate as pituitary neurons (Xu et al., 2005). Liu et al. (2012) detected that β -amyloid induced the expression of IGF-I receptor and suggested a mechanism of development of Alzheimer's disease.

Prevalence of PD has been studied in different age groups, thus finding values ranging from 0.2% to 4.8% (85 to 94 years) (de Rijk et al., 1995); and in absolute numbers, an average prevalence rate of 13 every 100.000 people per year has been communicated (Mayeux et al., 1995). IGF-I presented a neuroprotective effect against neurotoxicity induced by DA in human and rodent neuronal cultures that would affect PD treatment (Offen et al., 2001) and protected human dopaminergic neurons from toxicity induced by salsolinol, thus confirming its application on PD (Shavali et al., 2003).

Overexpression of IGF-I increased neurogenesis and restored immature neurons in the subgranular zone after a traumatic cerebral lesion in the hippocampus (Carlson et al., 2014). Kuhn et al. (1996) communicated decrease of neurogenesis in the *dentate gyrus* of the rat and related it with a decrease in the proliferation of precursor cells of granular neurons. The cognitive deficit, typical of aging, was associated with a decrease neurogenesis in the *dentate gyrus* (Kuhn et al., 1996), as well as with an increment of astrogliosis in the *stratum radiatum* zone of the hippocampus (Nichols et al., 1993). Lee et al. (2014) found a decrease of IGF-I and its receptor in the pyramidal cells of the somatosensory cortex and in the granular neurons of the hippocampus during aging. Also, in a rat model with cerebellar ataxia induced by acetylpyridine, administration of IGF-I restored motor coordination and partially rescued inferior olive neurons (Fernández et al., 1998).

Normal ageing is characterized by a decline in learning hippocampus-dependent memory, according to our laboratory results when applying Barnes Test (Barnes, 1979; Pardo et al., 2013). GH and IGF-I modulated the excitatory synaptic transmission and plasticity of the *hippocampus* in old rats, changing the course of cognitive deterioration with stimulation of glutaminergic transmission (Molina et al., 2012 and 2013).

1979; Pardo y col., 2013). La GH y el IGF-I modularon la transmisión sináptica excitatoria y la plasticidad del hipocampo en ratas viejas, cambiando el curso del deterioro cognitivo con estimulación de la transmisión glutamatérgica (Molina y col., 2012 y 2013).

Markowska y col. (1998) documentaron que la administración icv del péptido IGF-I mejora el aprendizaje espacial y el reconocimiento de objetos, incrementando la transmisión sináptica en la región CA1, con inducción de neurogénesis en ratas seniles y también Lichtenwalner y col. (2001) demostraron que la infusión icv de IGF-I mejora la neurogénesis del giro dentado hipocampal en ratas seniles. Liquitaya-Montiel y col. (2012) constataron que el IGF-I promueve la restauración morfológica y la recuperación funcional después de una lesión focal en el giro dentado. Dupraz y col. (2013) comunicaron que el receptor del IGF-I resulta esencial para la regeneración axonal de las neuronas del SNC adulto.

Las ventajas de la evaluación del sistema neuroendocrino ya se demostraron en ratas Brattleboro, al estudiar un mutante con ausencia de arginina-vasopresina (AVP) que ha sido usado como modelo de diabetes insípida (Valtin, 1992). Se detectó expresión de AVP en las células magnocelulares e inmunohistoquímica positiva en los axones que se proyectan a la pituitaria posterior, cuando un vector adenoviral que endocodifica para ADNc AVP fue inyectado por estereotaxia en el núcleo supraóptico de las ratas Brattleboro. La medición de la osmolaridad y de la cantidad de orina mostró síntomas de diabetes insípida que fue reducida significativamente luego de los 4 meses de la inyección del vector viral (Geddes y col., 1996).

La injuria hipóxica por isquemia mostró cambios marcados en el eje IGF-I/IGFBP del cerebro de rata, restringiendo la pérdida neuronal asociada a astrocitos reactivos que expresaron IGFBP-2 (Beilharz y col., 1998) e indujo expresión de ARNm de IGF-I, luego de una noxa traumática en el cerebro postnatal (Li y col., 1998).

El presente estudio describe la implementación de una terapia génica restaurativa a corto y largo plazo con el factor neurotrófico IGF-I en un

Markowska et al. (1998) reported that icv administration of peptide IGF-I improves spatial learning and recognition of objects, increasing the synaptic transmission in CA1 region, with induction of neurogenesis in senescent rats; and also Lichtenwalner et al. (2001) demonstrated that icv infusion of IGF-I ameliorates the neurogenesis of the hippocampal *dentate gyrus* in senile rats. Liquitaya-Montiel et al. (2012) confirmed that IGF-I promotes the morphological restoration and functional recovery in the *dentate gyrus* after a focal lesion. Dupraz et al. (2013) communicated that IGF-I receptor results to be essential for the axon regeneration of neurons of the adult NCS.

The advantages of evaluating the neuroendocrine system has been demonstrated in Brattleboro rats, a mutant lacking arginine-vasopressin (AVP) used as model of insipid diabetes (Valtin, 1992). Expression of AVP was detected in magnocellular cells and positive immunohistochemistry in axons that are projected to the posterior pituitary, when an adenoviral vector codifying for DNAc AVP was injected by stereotaxia in the supraoptic nucleus of Brattleboro rats. Measurement of osmolarity and of the quantity of urine showed symptoms of insipid diabetes that was significantly reduced after 4 months of the injection of the viral vector (Geddes et al., 1997).

The ischemic hypoxic injury evidenced marked changes in the IGF-I/IGFBP axis of the rat brain, restricting the neuronal loss associated with reactive astrocytes expressing IGFBP-2 (Beilharz et al., 1998) and induced expression of ARNmIGF-I after a traumatic noxa in postnatal brain (Li et al., 1998).

The present study describes the implementation of a short- and long-term restorative gene therapy with neurotrophic factor IGF-I in a physiological model of aging and assesses the degree of pituitary and hippocampal neuron degeneration. The increase in the number of positive doublecortin cells in the *dentate gyrus* of old animals submitted to gene therapy with IGF-I suggests that the treatment stimulated neurogenesis in that region and seems to have reverted the increased number of astrocytes in the *stratum radiatum* that normally occur with

modelo fisiológico de envejecimiento y evalúa el grado de degeneración neuronal hipotalámica e hipocampal. El aumento en el número de células doblecortina positivas en el giro dentado de los animales viejos sometidos a terapia génica con IGF-I sugiere que el tratamiento estimuló la neurogénesis en dicha región y parece haber revertido el aumento en el número de astrocitos en el *stratum radiatum* que normalmente ocurre con la edad. Los resultados del test de Barnes mostraron cambios moderadamente favorables en algunos aspectos de la performance cognitiva.

Concluyendo, hemos demostrado que la terapia génica con IGF-I revierte la disfunción del sistema TIDA hipotalámico y provoca un efecto neurogénico sobre el giro dentado en ratas hembras envejecidas.

Referencias

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20:2896-2903.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979; 93(1):74-104.
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, et al. Coordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59:119-134.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 1989; 33:399-477.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275(5304):1320-23.

age. The results of Barnes test evidenced changes moderately favorable in some aspects of the cognitive performance.

To conclude, we have demonstrated that gene therapy with IGF-I reverts the dysfunction of the pituitary TIDA system and causes a neurogenic effect on the *dentate gyrus* in senescent female rats.

References

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20:2896-2903.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979; 93(1):74-104.
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, et al. Coordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59:119-134.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 1989; 33:399-477.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275(5304):1320-23.
- Bolognani F, Goya RG. Gene therapy in the neuroendocrine system: its implementation in experimental models using viral vectors. *Neuroendocrinology* 2001; 73:75-83.
- Breese CR, D'Costa A, Rollins YD, Adams C, Booze RM, Sonntag WE, Leonard S. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus fo-

- Bolognani F, Goya RG: Gene therapy in the neuroendocrine system: its implementation in experimental models using viral vectors. *Neuroendocrinology* 2001; 73:75-83.
- Breese CR, D'Costa A, Rollins YD, Adams C, Booze RM, Sonntag WE, Leonard S. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1996; 369(3):388-404.
- Carlson SW, Madathil SK, Sama DM, Gao X, Chen J, Saatman KE. Conditional overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances hippocampal neurogenesis and restores immature neuron dendritic processes after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73(8):734-746.
- Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 2006; 27(9):1250-57.
- Carro E, Trejo JL, Gómez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002; 8(12):1390-97.
- Castro MG, Goya RG, Sosa YE, Rowe J, Larregina AT, Morelli AE, Lowenstein PR. Expression of transgenes in normal and neoplastic anterior pituitary cells using recombinant adenoviruses: long term expression, cell cycle dependency, and effects on hormone secretion. *Endocrinology* 1997; 138(5):2184-94.
- Cónsole G, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.
- Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Bracamonte MI, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13.
- Following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1996; 369(3):388-404.
- Carlson SW, Madathil SK, Sama DM, Gao X, Chen J, Saatman KE. Conditional overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances hippocampal neurogenesis and restores immature neuron dendritic processes after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73(8):734-746.
- Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 2006; 27(9):1250-57.
- Carro E, Trejo JL, Gómez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002; 8(12):1390-97.
- Castro MG, Goya RG, Sosa YE, Rowe J, Larregina AT, Morelli AE, Lowenstein PR. Expression of transgenes in normal and neoplastic anterior pituitary cells using recombinant adenoviruses: long term expression, cell cycle dependency, and effects on hormone secretion. *Endocrinology* 1997; 138(5):2184-94.
- Cónsole G, Gómez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(3):157-166.
- Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Bracamonte MI, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13.
- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.
- Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of

- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.
- Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Experientia* 1964; 20(7):398-9.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II: peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10:68-91.
- de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study. *Neurology* 1995; 45:2143-2146.
- Díaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 2002; 43:1270-1279.
- Doré S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 protects and rescues hippocampal neurons against amyloid- and amylin-induced toxicity. *PNAS* 1997; 94(9):4772-77.
- Dupraz S, Grassi D, Karnas D, Nieto Guil AF, Hicks D, Quiroga S. The insulin-like growth factor 1 receptor is essential for axonal regeneration in adult central nervous system neurons. *PLoS* 2013; 8(1): 354462.
- Fernández AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *PNAS* 1998; 95:1253-1258.
- Franceschi M, Camerlingo M, Perego L, Bottacchi E, Truci G, Mamoli A. Tubero-infundibular dopaminergic function in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1988; 28(3):117-119.
- Geddes BJ, Harding TC, Hughes DS, Byrnes AP, Lightman SL, Conde G, Uney JB. Persistent transgene expression in the hypothalamus of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Experientia* 1964; 20(7):398-9.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II: peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10:68-91.
- de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: The Rotterdam study. *Neurology* 1995; 45:2143-2146.
- Díaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 2002; 43:1270-1279.
- Doré S, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 protects and rescues hippocampal neurons against amyloid- and amylin-induced toxicity. *PNAS* 1997; 94(9):4772-77.
- Dupraz S, Grassi D, Karnas D, Nieto Guil AF, Hicks D, Quiroga S. The insulin-like growth factor 1 receptor is essential for axonal regeneration in adult central nervous system neurons. *PLoS* 2013; 8(1): 354462.
- Fernández AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *PNAS* 1998; 95:1253-1258.
- Franceschi M, Camerlingo M, Perego L, Bottacchi E, Truci G, Mamoli A. Tubero-infundibular dopaminergic function in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1988; 28(3):117-119.
- Geddes BJ, Harding TC, Hughes DS, Byrnes AP, Lightman SL, Conde G, Uney JB. Persistent transgene expression in the hypothalamus following stereotaxic delivery of a recombinant adenovirus: suppression of the immune response with cyclosporine. *Endocrinology* 1996; 137(11):5166-69.
- Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ, Moore KE. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 1992; 56(1):100-105.

- llowing stereotaxic delivery of a recombinant adenovirus: suppression of the immune response with cyclosporin. *Endocrinology* 1996; 137(11):5166-69.
- Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ, Moore KE. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 1992; 56(1):100-105.
- Goya RG, Lu JKH, Meites J. Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mech Ageing Dev* 1990; 56(1):77-88.
- Goya RG, Rowe J, Sosa YE, Tomasec P, Lowenstein PR, Castro MG. Use of recombinant herpes simplex virus type I vectors for gene transfer into tumour and normal anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 139(1-2):199-207.
- Gudelsky GA, Nansel DD, Porter JC. Dopaminergic control of prolactin secretion in the aging male rat. *Brain Res* 1981; 204:446-450.
- Halper J, Parnell P, Carter B, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.
- Hereñú C, Cristina C, Rimoldi O, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky E, Goya R. Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy* 2007; 14(3):237-245.
- Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P, Crystal RG. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblast. *J Clin Invest* 1999; 103(4):579-587.
- Hitt M, Bett A, Prevec L, Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, 1998: 1500-1512.
- Houben H, Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.
- Goya RG, Lu JKH, Meites J. Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mech Ageing Dev* 1990; 56(1):77-88.
- Goya RG, Rowe J, Sosa YE, Tomasec P, Lowenstein PR, Castro MG. Use of recombinant herpes simplex virus type I vectors for gene transfer into tumour and normal anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 139(1-2):199-207.
- Gudelsky GA, Nansel DD, Porter JC. Dopaminergic control of prolactin secretion in the aging male rat. *Brain Res* 1981; 204:446-450.
- Halper J, Parnell P, Carter B, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.
- Hereñú C, Cristina C, Rimoldi O, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky E, Goya R. Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy* 2007; 14(3):237-245.
- Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P, Crystal RG. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblast. *J Clin Invest* 1999; 103(4):579-587.
- Hitt M, Bett A, Prevec L, Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, 1998: 1500-1512.
- Houben H, Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.
- Ideguchi M, Kajiwara K, Yoshikawa K, Uchida T, Ito H. Local adenovirus-mediated CTLA4-immunoglobulin expression suppresses the immune responses to adenovirus vectors in the brain. *Neuroscience* 2000; 95(1):217-226.
- Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona V, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury JR. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term

- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 2001; 107(4):603-613.
- Liquitaya-Montiel A, Aguilar-Arredondo A, Arias C, Zepeda A. Insulin growth factor-I promotes functional recovery after a focal lesion in the dentate gyrus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11(7):818-828.
- Liu X, Zhang YN, Jiang LH, Teng ZY. Study of the correlation about IGF-I receptor and β -amyloid in Alzheimer's disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2012; 92(15): 1062-1065.
- Mariño G, Ugalde AP, Fernández AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JM, López-Otín C. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad USA* 2010; 107(37):16268-73.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ameliorates age related behavioral deficits. *Neuroscience* 1998; 87:559-569.
- Mayeux R, Marder K, Cote LJ, Denaro J, Hemenegildo N, Mejia H et al. The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol* 1995; 142:820-827.
- Molina DP, Ariwodola DO, Linville C, Sonntag WE, Weiner JL, Brunso-Bechtold JK, Adams MM. Growth hormone modulates hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in old rats. *Neurobiol Aging* 2012; 33(9):1938-1949.
- Molina DP, Ariwodola DO, Weiner JL, Brunso-Bechtold JK, Adams MM. Growth hormone and insulin-like growth factor-I alter hippocampal excitatory synaptic transmission in young and old rats. *Age (Dordr)* 2013; 35(5):1575-1587.
- lesion in the dentate gyrus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11(7):818-828.
- Liu X, Zhang YN, Jiang LH, Teng ZY. Study of the correlation about IGF-I receptor and β -amyloid in Alzheimer's disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2012; 92(15): 1062-1065.
- Mariño G, Ugalde AP, Fernández AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JM, López-Otín C. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad USA* 2010; 107(37):16268-73.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ameliorates age related behavioral deficits. *Neuroscience* 1998; 87:559-569.
- Mayeux R, Marder K, Cote LJ, Denaro J, Hemenegildo N, Mejia H et al. The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol* 1995; 142:820-827.
- Molina DP, Ariwodola DO, Linville C, Sonntag WE, Weiner JL, Brunso-Bechtold JK, Adams MM. Growth hormone modulates hippocampal excitatory synaptic transmission and plasticity in old rats. *Neurobiol Aging* 2012; 33(9):1938-1949.
- Molina DP, Ariwodola DO, Weiner JL, Brunso-Bechtold JK, Adams MM. Growth hormone and insulin-like growth factor-I alter hippocampal excitatory synaptic transmission in young and old rats. *Age (Dordr)* 2013; 35(5):1575-1587.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain with age. *Neurobiol Aging* 1993; 14(5):421-429.
- Nishida F, Morel GR, Hereñú CB, Schwerdt JI, Goya RG, Portiansky E. Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience* 2011; 177:195-206.

Pérez-Martín M, Cifuentes M, Grondona JM, López-Avalos MD, Gómez-Pinedo U, García-Verdugo JM, Fernández-Llebrez P. IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci* 2010; 31(9):1533-1548.

Porter JC, Aguila-Mansilla N, Ramin SM, Kedzierski W. Secretion by hypothalamic dopaminergic neurons of the aged brain. *Neurobiol Aging* 1994; 15:535-539.

Porter JC, Nansel DD, Guselsky, GA, Reymond MJ, Pilotte NS, Foreman MM et al. Some aspects of hypothalamic and hypophysial secretion in aging rats. *Peptides* 1980; 1:135-139.

Reymond MJ, Porter JC. Secretion of hypothalamic dopamine into pituitary stalk blood of aged female rats. *Brain Res Bull* 1981; 7:69-73.

Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol* 2003; 458(4):319-325.

Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Hereñú CB, Goya RG, Zuccolilli GO. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience* 2008; 154(4):1598-1606.

Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982; 218(4573):684-686.

Schwerdt JI, Cónsole GM, Spinedi EJ, Camihort G, Luna G, Brown OA, Goya RG. Morphological changes induced by long-term insulin-like growth factor-I gene therapy in spontaneous prolactinomas of senile female rats. *Neuroendocrinology*, enviado 2016.

Schwerdt JI, Hereñú CB, Rimoldi OJ, Luna G, Camihort G, Goya RG, Cónsole GM. Terapia génica hipotalámica con IGF-I en ratas hembras viejas. *Medicina* 2013; 73(Supl. III): 284.

Shavali S, Ren J, Ebadi M. Insulin-like growth factor-1 protects human dopaminergic SH-SY5Y cells from Salsolinol-induced toxicity. *Neurosci Lett* 2003; 340:79-82.

Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insuline like growth factor-I axis. *Pituitary* 2007; 10(2):189-204.

Porter JC, Nansel DD, Guselsky, GA, Reymond MJ, Pilotte NS, Foreman MM et al. Some aspects of hypothalamic and hypophysial secretion in aging rats. *Peptides* 1980; 1:135-139.

Reymond MJ, Porter JC. Secretion of hypothalamic dopamine into pituitary stalk blood of aged female rats. *Brain Res Bull* 1981; 7:69-73.

Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO. Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol* 2003; 458(4):319-325.

Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Hereñú CB, Goya RG, Zuccolilli GO. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience* 2008; 154(4):1598-1606.

Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982; 218(4573):684-686.

Schwerdt JI, Cónsole GM, Spinedi EJ, Camihort G, Luna G, Brown OA, Goya RG. Morphological changes induced by long-term insulin-like growth factor-i gene therapy in spontaneous prolactinomas of senile female rats. *Neuroendocrinology*, sent 2016.

Schwerdt JI, Hereñú CB, Rimoldi OJ, Luna G, Camihort G, Goya RG, Cónsole GM. Terapia génica hipotalámica con IGF-I en ratas hembras viejas. *Medicina* 2013; 73(Supl. III): 284.

Shavali S, Ren J, Ebadi M. Insulin-like growth factor-1 protects human dopaminergic SH-SY5Y cells from Salsolinol-induced toxicity. *Neurosci Lett* 2003; 340:79-82.

Sherlock M, Toogood AA. Aging and the growth hormone/insuline like growth factor-I axis. *Pituitary* 2007; 10(2):189-204.

Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 2003; 9:360-365.

Sonntag WE, Lynch CD, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso-Bechtold JK. Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience* 1999; 88(1):269-279.

Xu J, Gontier G, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R (+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell* 2014; 13(1):19-28.

Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Ide C. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 2005; 192:251-264.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10):4407-4411.

Yao DL, West NR, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J and al. Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res* 1995; 40:647-659.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10):4407-4411.

Yao DL, West NR, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J and al. Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res* 1995; 40:647-659.

CAPÍTULO 13

Antiandrógenos no esteroides: efectos sobre la población gonadotropa de ratas machos prepuberales

El eje gonadotropo de ratas machos está regulado por factores hipotalámicos, pituitarios y gonadales. Los andrógenos actúan mediante el mecanismo de retroalimentación o por acción directa a nivel hipotalámico, pituitario o en forma combinada (ver Cap. 5: Fisiología del eje gonadotropo).

La respuesta hipofisaria a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es máxima entre los 25-35 días para la hormona folículo-estimulante (FSH) y entre 35-45 días para la hormona luteinizante (LH) (Debeljuk y col., 1972; Dullaart, 1977). La LH es inhibida por los andrógenos y la FSH es regulada por la inhibición hipotalámica y la estimulación pituitaria. Esto indicaría una independencia en el control de la secreción de dichas gonadotrofinas, por acción directa de los andrógenos a nivel pituitario (Drouin y Labrie, 1976; Wierman y Wang, 1990). La estimulación de la testosterona sobre la síntesis de FSH no sería debida a un aumento en el número de folículotropas, sino a un incremento en la secreción a nivel celular (Noguchi y col., 1996).

CHAPTER 13

Non-steroid antiandrogens: effects on the gonadotrope population of prepuberal male rats

The gonadotrope axis in male rats is regulated by hypothalamic, pituitary and gonadal factors. Androgens act via feedback or directly at the hypothalamic or pituitary level, or else in a combined manner (see Chapter 5: Physiology of the gonadotrope axis).

The hypophyseal response to the gonadotropin releasing hormone (GnRH) is the highest between days 25-35 for FSH and between days 35-45 for LH (Debeljuk et al., 1972; Dullaart, 1977). The luteinizing hormone (LH) is inhibited by androgens and the folliculo-stimulating hormone (FSH) is regulated by hypothalamic inhibition and pituitary stimulation. This would imply an independent control of LH and FSH secretion by means of a straightforward action of androgens at the pituitary level (Drouin and Labrie, 1976; Wierman and Wang, 1990). Stimulation of testosterone on FSH synthesis would not be caused by an increased number of folliculotropes, but by an increased secretion at cellular level (Noguchi et al., 1996).

La población gonadotropa en ratas adultas machos es heterogénea desde el punto de vista estructural y funcional. El aumento en el depósito hormonal se debe al incremento de tres parámetros: densidad de células, densidad de volumen y mayor número de gránulos secretorios por célula (Childs y col., 1981). Las gonadotropas serían capaces de reciclarse a sí mismas (Childs, 1995) y el 70% de la población es portadora de ambos antígenos: LH y FSH (Kurosumi, 1974; Childs y col., 1987).

Existen tres posibilidades para incrementar el número de gonadotropas: **a.** Mitosis de las células maduras; **b.** Diferenciación de las células inmaduras y **c.** Conversión de algunos tipos celulares en gonadotropas (Inou y Kurosumi, 1981).

Las gonadotropas pueden ser separadas en tres subpoblaciones mediante gradiente continuo de Percoll. La subpoblación de baja densidad predomina en ratas prepuberales y está constituida principalmente por células monohormonales que muestran pocos gránulos secretorios y Golgi-retículo endoplásmico rugoso (RER) expandidos. Las subpoblaciones de densidad media y elevada están formadas por células bihormonales LH-FSH que presentan citoplasma muy granulado, con Golgi-RER poco desarrollados (Torronteras y col., 1993).

Se sugirió que los dos tipos de células gonadotropas (luteinizantes y folículotropas) representarían diferentes estados funcionales de un mismo tipo celular, concepto que ha sido confirmado mediante inmunocitoquímica (Childs y col., 1987; Tougard y Tixier-Vidal, 1988). La población gonadotropa monohormonal varía dependiendo de las especies, la edad, el sexo y el estado fisiológico (Childs y col., 1986). Las pequeñas gonadotropas monohormonales en las ratas hembras ciclantes podrían ser las precursoras de sus contrapartes bihormonales activas.

Se ha propuesto una secuencia hipotética de maduración para las gonadotropas en ratas hembras y el tipo monohormonal podría jugar roles paracrinos y endocrinos dentro de la pituitaria, considerando el hecho de que pueden producir péptidos regulatorios como angiotensina II, activina, inhibina y follistatina (Deschepper y col., 1985; Roberts y col., 1992; Steele y col., 1992; Childs, 1995 y 1997).

The gonadotrope population in male adult rats is heterogeneous from the structural and functional point of view. The increase in the hormone deposit is due to the increase of three parameters: cell density, volume density and higher number of secretory granules per cell (Childs et al., 1981). Gonadotropes would be able to recycle themselves (Childs, 1995) and 70% of the population is a carrier of both antigens: LH and FSH (Kurosumi, 1974; Childs et al., 1987). There are three possible ways to increase the number of gonadotropes: a. Mitosis of mature cells, b. Differentiation of immature cells and c. Conversion of some cell types into gonadotropes (Inou and Kurosumi, 1981).

Gonadotropes can be grouped in three different subpopulations by means of a continuous Percoll gradient. Low density subpopulation is predominant in prepubertal rats and is mainly constituted by monohormonal cells showing few secretory granules and expanded Golgi-RER. Medium and high density subpopulations are formed by LH-FSH bihormonal cells presenting highly granulated cytoplasm, with slightly developed Golgi-RER (Torronteras et al., 1993).

It was suggested that both types of gonadotropes (luteinizing and folliculotropes) would represent different functional stages of a same cell type, concept that has been confirmed by means of immunocytochemistry (Childs et al., 1987; Tougard and Tixier-Vidal, 1988). The monohormonal gonadotrope population varies depending on species, age, sex and physiological state of animals (Childs et al., 1986). Small monohormonal gonadotropes in cycling female rats might be the precursors of their active bihormonal counterparts. A hypothetical sequence of maturation has been suggested for gonadotropes in female rats. Monohormonal gonadotropes might play paracrine and endocrine roles within the pituitary, considering the fact that they can produce regulatory peptides such as angiotensin II, activin, inhibin and follistatin (Deschepper et al., 1985; Roberts et al., 1992; Steele et al., 1992; Childs, 1995 and 1997).

At ultrastructural level, gonadotropes are divided into folliculotropes (**Type I**) and luteinizing cells (**Type II**) (Farquhar and Rinehart, 1955).

A nivel ultraestructural, las gonadotropas se dividen en folículo-tropas (**Tipo I**) y células luteinizantes (**Tipo II**) (Farquhar y Rinehart, 1955). En nuestros estudios ultraestructurales en ratas jóvenes machos y hembras identificamos los dos tipos de gonadotropas.

Las células **Tipo I** (FSH) muestran mayor tamaño, formas redondeadas y núcleos esféricos con borde dentado. Presentan gránulos secretorios de diferente tamaño: grandes (200-300 nm) y pequeños (150-200 nm) que se caracterizan por su electrodensidad variable. El complejo de Golgi se ve hipertrófico con sacos dilatados y el RER muestra cisternas redondeadas.

Las células **Tipo II** (LH) son más pequeñas y presentan sólo gránulos secretorios pequeños (100-200 nm) esparcidos por todo el citoplasma. El RER está bien desarrollado y muestra cisternas dilatadas. Ambos tipos de células gonadotropas se hallan en contacto con los capilares sanguíneos (ver Cap. 4).

Farquhar y Rinehart (1954) identificaron por primera vez las células de la gonadectomía mediante observaciones ultraestructurales y Tixier-Vidal y col. (1975) lograron su inmunomarcación. Desde entonces, un gran número de estudios morfológicos se realizaron para estudiar el efecto de la castración sobre la población gonadotropa.

A las 12 hs post-gonadectomía se detectó aumento de la densidad de volumen, del área celular promedio y de los porcentajes de folículo-tropas y células luteinizantes (Childs y col., 1982). Además, Garner y Blake (1981) comunicaron que 24 hs post-ovariectomía hubo un incremento del porcentaje de las gonadotropas debido a mitosis o diferenciación de las células monohormonales. A los 6 meses de la gonadectomía, Yoshimura y Harumiya (1965) detectaron las típicas células en anillo de sello e Ibrahim y col. (1986) registraron en machos y hembras un descenso del 20% de la población gonadotropa. La menor inmunorreactividad detectada podría deberse a la rápida liberación de gonadotropinas, asociada a una escasa síntesis. También podría existir un estado transicional con gran número de pequeñas células inmaduras descritas por Kihara (1984).

Nuestras inmunomarcaciones mostraron un patrón homogéneo de distribución en toda la *pars distalis*.

In our ultrastructural studies in male and female young rats we identified two types of gonadotropes.

Type I cells (FSH) evidence larger size, round shape and spherical nuclei with dentate edge. They present secretory granules of different sizes: large (200-300 nm) and small (150-200 nm) that characterize their variable electron density. The Golgi complex appears hypertrophic with dilated sacks and the RER shows rounded cisternae.

Type II cells (LH) are smaller and present only small secretory granules (100-200 nm) spread throughout the cytoplasm. The RER is well developed and show dilated cisternae. Both types of gonadotropes are found to be contacting blood capillaries (see Chap. 4). Farquhar and Rinehart (1954) first identified gonadectomy cells via ultrastructural studies and Tixier-Vidal et al. (1975) performed the immunocytochemistry. Since then many morphological studies have been done to study the effect of castration on the gonadotrope population.

Twelve hours after gonadectomy an increase was detected in volume density, mean cell area as well as in folliculotrope and luteinizing cells (Childs et al., 1982). Garner and Blake (1981) reported that 24 h after ovariectomy there was a percentage increment in gonadotropes due to mitosis or differentiation of monohormonal cells. After 6 months of gonadectomy, Yoshimura and Harumiya (1965) detected the typical signet ring cells and Ibrahim et al. (1986) recorded in males and females a 20% decline of the gonadotrope population. After 6 months of gonadectomy, Yoshimura and Harumiya (1965) detected the typical signet ring cells and Ibrahim et al. (1986) recorded in males and females a 20% decline of the gonadotrope population. The lowest immunoreactivity detected might be caused by the fast release of gonadotropins associated to poor synthesis. There might also be a transitional state with a large number of small immature cells described by Kihara (1984).

Our immunocytochemical findings evidenced a homogeneous pattern of distribution throughout the whole *pars distalis*. In **fig. 13.1 A-E** there appears the immunostained folliculotrope population of

En la **fig. 13.1 A-E** se presenta la población folículo­tropa inmunomarcada en los diferentes grupos experimentales. Se observa un número similar de folículo­tropas en los grupos controles (A) y castrados con reemplazo androgénico (DHTP) (E). Hay un mayor número de folículo­tropas en los grupos flutamida (B), Casodex (C) y castrado (D) comparados con A y E. El mayor tamaño celular es evidente en los grupos B, C y D. Similares resultados se obtuvieron en la población luteinizante (Cónsole y col., 1999 y 2001).

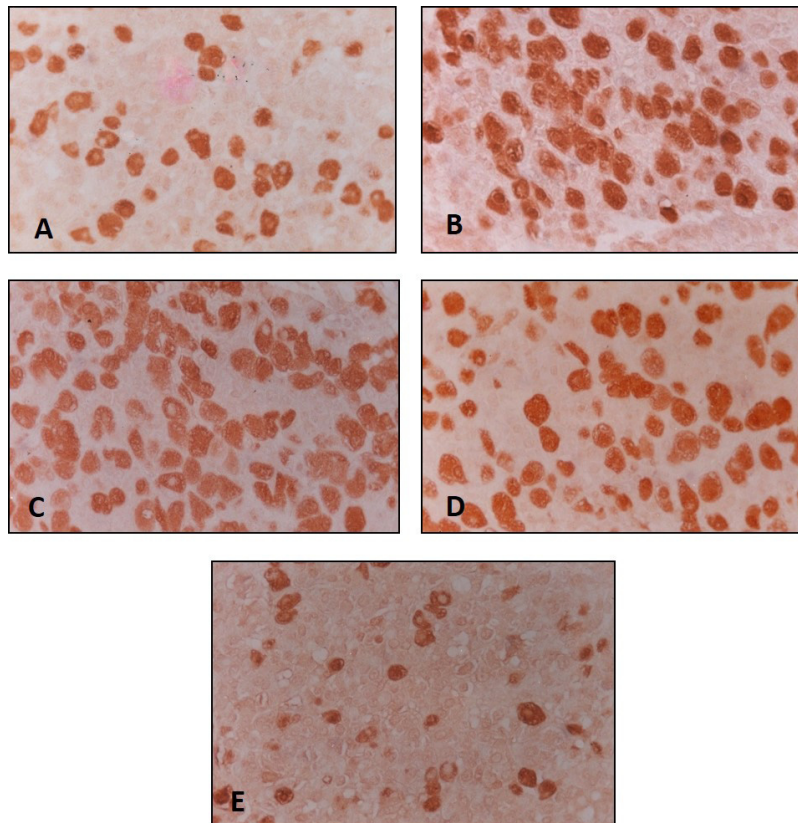


Fig. 13.1 A-E. Campos representativos de las folículo­tropas. A. Control. B. Flutamida. C. Casodex. D. Castrado. E. Castrado + DHTP (EnVision peroxidasa, anti-FSH, x 400).

the different experimental groups. A similar number of folliculotropes can be observed in the control groups (A) and castrated animals with androgen replacement (DHTP) (E). There is a larger number of folliculotropes in flutamide (B), Casodex (C) and castrated (D) groups compared with A and E. The largest cell size is evident in groups B, C and D. Similar observations were detected in the luteinizing population (Cónsole et al., 1999 and 2001).

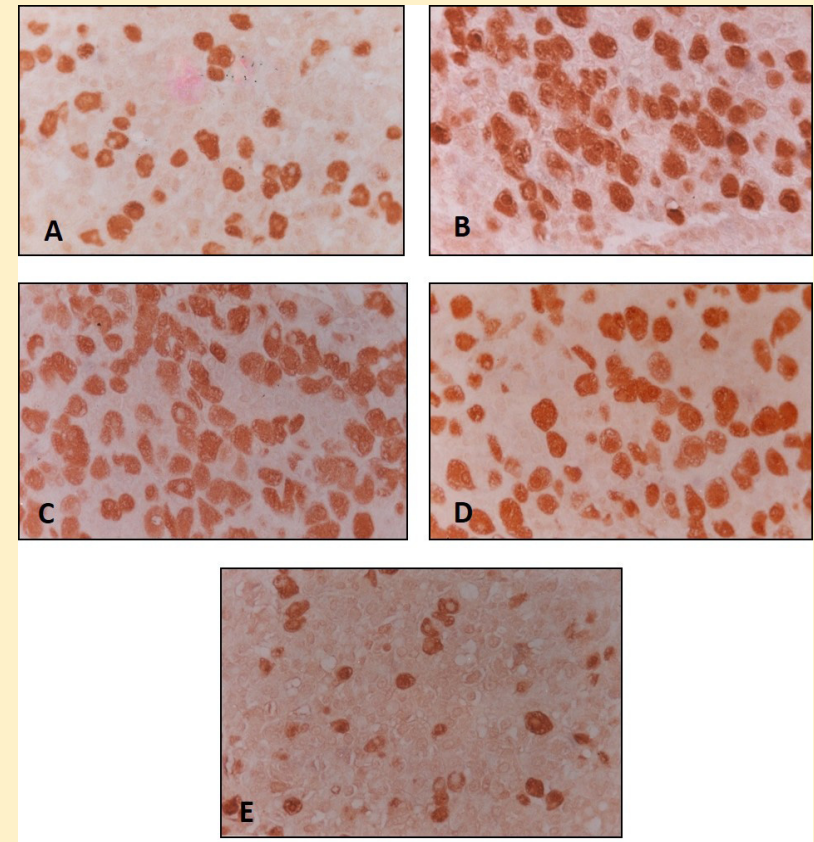


Fig. 13.1 A-E. Representative fields of folliculotropes. A. Control. B. Flutamide. C. Casodex. D. Castrated. E. Castrated with DHTP (EnVision peroxidase, anti-FSH, x 400).

La morfometría (tabla 1) registró un aumento significativo ($p < 0.001$) del área celular promedio (μm^2) en un 50% de las folículotropas y en un 80% de las células luteinizantes de los grupos castrados e inyectados con flutamida y Casodex comparados con los controles, indicando hipertrofia celular. La densidad de volumen (DV) estuvo incrementada ($p < 0.05$) en ambos tipos de gonadotropas en ratas castradas y tratadas con Casodex y flutamida, respecto a controles. La DV estuvo aumentada 2.5 veces en las folículotropas y 1.5 veces en las células luteinizantes. Además, se detectaron dos poblaciones de diferente tamaño celular en el grupo castrado sustituido con andrógeno. El reemplazo androgénico en ratas castradas redujo el área celular promedio y la DV en relación a los controles. La densidad de células (DC) de las células FSH se incrementó ($p < 0.05$) en los grupos Casodex, flutamida y castrados. La DC de las células LH aumentó ($p < 0.05$) en el grupo tratado con Casodex, mientras no hubo incremento de tales parámetros con flutamida y castración.

Tabla 1. Área celular promedio (A), densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) de las gonadotropas, (n=6), 10 días después de tratamiento con flutamida o Casodex, de castración o de castración más reemplazo androgénico

Tratamiento	FSH			LH		
	Área celular promedio (A)	DV ($\times 10^{-2}$)	DC ($\times 10^{-4}$)	Área celular promedio (A)	DV ($\times 10^{-2}$)	DC ($\times 10^{-4}$)
Control	118.3 \pm 8.3 a	6.0 \pm 0.6 a	5.1 \pm 0.7abd	104.4 \pm 8.1 a	9.1 \pm 0.7 a	8.7 \pm 0.8 ab
Flutamida (10 mg/day)	195.9 \pm 9.2 c	13.7 \pm 1.7 b	7.0 \pm 0.8 bc	176.2 \pm 8.0 b	14.9 \pm 1.7 bc	8.5 \pm 0.9 ab
Casodex (10 mg/día)	198.3 \pm 9.5 c	15.1 \pm 0.9 b	7.6 \pm 0.4 c	172.6 \pm 7.4 b	19.6 \pm 2.3 c	11.4 \pm 0.8 b
Castrado	179.6 \pm 8.4 c	12.5 \pm 0.9 b	7.0 \pm 0.7 abc	163.4 \pm 6.9 b	13.8 \pm 1.2 b	8.4 \pm 1.2 ab
Castrado + Andrógenos (40 μg /día)	89.3 \pm 10.1 b	4.0 \pm 1.4 a	4.5 \pm 0.3 d	94.9 \pm 10.6 a	7.2 \pm 1.1 a	7.6 \pm 0.7 ac

Letras diferentes indican diferencias significativas (área celular promedio: $p < 0.001$, DV y DC: $p < 0.05$).

Morphometry (table 1) recorded a significant increase ($p < 0.001$) of the mean cell area (μm^2) in 50% of folliculotropes and 80% of luteinizing cells in those groups that were castrated and injected with flutamide and Casodex compared with controls, indicating cellular hypertrophy. Volume density (VD) was increased ($p < 0.05$) in both types of gonadotropes in castrated rats and rats treated with Casodex and flutamide with respect to controls. VD was increased 2.5 times in folliculotropes and 1.5 times in luteinizing cells. Also, two populations with different cell sizes were detected in the castrated group that received androgen substitution. Androgen replacement in castrated rats reduced the mean cell area and the VD in relation to controls. The cell density (CD) of FSH cells was increased ($p < 0.05$) in Casodex, flutamide and castrated groups. The CD of LH cells was increased ($p < 0.05$) in the Casodex-treated group, whereas there was no increment in those parameters with flutamide and castration.

Table 1. Mean cell area (A), volume density (VD) and cell density (CD) of gonadotropes in prepubertal male rats (n=6): treated with flutamide and Casodex, castrated and castrated + androgen.

Treatment	FSH			LH		
	Mean cell area	VD ($\times 10^{-2}$)	CD ($\times 10^{-4}$)	Mean cell area	VD ($\times 10^{-2}$)	CD ($\times 10^{-4}$)
Control	118.3 \pm 8.3 a	6.0 \pm 0.6 a	5.1 \pm 0.7abd	104.4 \pm 8.1 a	9.1 \pm 0.7 a	8.7 \pm 0.8 ab
Flutamide (10 mg/day)	195.9 \pm 9.2 c	13.7 \pm 1.7 b	7.0 \pm 0.8 bc	176.2 \pm 8.0 b	14.9 \pm 1.7 bc	8.5 \pm 0.9 ab
Casodex (10 mg/day)	198.3 \pm 9.5 c	15.1 \pm 0.9 b	7.6 \pm 0.4 c	172.6 \pm 7.4 b	19.6 \pm 2.3 c	11.4 \pm 0.8 b
Castrated	179.6 \pm 8.4 c	12.5 \pm 0.9 b	7.0 \pm 0.7 abc	163.4 \pm 6.9 b	13.8 \pm 1.2 b	8.4 \pm 1.2 ab
Castrated + Androgen (40 μg /day)	89.3 \pm 10.1 b	4.0 \pm 1.4 a	4.5 \pm 0.3 d	94.9 \pm 10.6 a	7.2 \pm 1.1 a	7.6 \pm 0.7 ac

Different letters indicate significant differences (mean cell area: $p < 0.001$, VD and CD: $p < 0.05$).

Nuestros datos morfométricos estuvieron en concordancia con Inoue y Kurosumi (1981), quienes comunicaron que las gonadotropas inmunomarcadas con antisuero anti-LH aumentaron 1.4 veces 2 semanas después de la castración y 2 veces a los tres meses después de la gonadectomía. Tan pronto como 12 hs después de la orquidectomía la densidad de volumen (DV), los porcentajes de gonadotropas y el promedio del área celular estuvieron aumentados (Childs y col., 1982). Dos semanas después de la castración, el porcentaje de gonadotropas mitóticas aumentó 5 a 6 veces en ratas castradas comparadas con controles intactos (Sakuma y col., 1984). En ratas machos, después de 1 mes de castración se hallaron incrementos de 2 a 3 veces en los porcentajes de luteinizantes y foliculotropas, respectivamente. Estos animales también evidenciaron un aumento del área promedio de las gonadotropas, llegando al máximo a los 3 meses posteriores a la gonadectomía (Ibrahim y col., 1986). De acuerdo con Childs y col. (1982), es verosímil que los mayores valores de DV inducidos por castración en la población gonadotropa podrían proveer de una superficie necesaria para sustentar el incremento del número de receptores de GnRH que fueron detectados bajo tal condición (Clayton y Catt, 1981).

Para sintetizar, las células luteinizantes y foliculotropas mostraron un aumento en la DV 24 hs después de la castración, sugiriendo hipertrofia, hiperplasia y/o diferenciación al estado de la producción hormonal dual (Childs y col., 1982). Además, los valores incrementados revirtieron a niveles normales en las ratas tratadas con andrógenos. Hemos detectado un descenso en la DV y en el área (A) de ambas gonadotropas en ratas castradas con sustitución androgénica, identificando dos subpoblaciones de diferente tamaño celular. El número de las pequeñas gonadotropas que hemos observado podría estar relacionado con la presencia de células monohormonales, teniendo en cuenta la secuencia de maduración propuesta por Childs (1995). El mayor porcentaje de gonadotropas monohormonales fue detectado en ratas expuestas a estrés quirúrgico y el menor porcentaje fue hallado en ratas castradas (menos del 10%). Este dato sugirió que las gonadotropas fueron potencialmente bihormonales y que una apropiada estimulación podría determinar la expresión de ambas hormonas (Childs, 1995).

Our morphometric data were in accordance with Inoue and Kurosumi (1981), who reported that gonadotropes immunostained with anti-LH sera increased 1.4 times 2 weeks after castration and 2 times three months after gonadectomy. Soon after 12 h following orchietomy volume density (VD), gonadotrope percentages and the mean cell area were increased (Childs et al., 1982). Two weeks after castration, the percentage of mitotic gonadotropes increased 5 to 6 times in castrated rats compared to intact controls (Sakuma et al., 1984). In male rats, after month one posterior to castration, two fold or three fold increased percentages were found in luteinizing cells and folliculotropes, respectively. These animals also evidenced an increase of the mean cell area in gonadotropes, reaching the highest 3 months after gonadectomy (Ibrahim et al., 1986). According to Childs et al. (1982), it is plausible that the highest VD values induced by castration in the gonadotrope population might provide a surface necessary to support the increment in the number of GnRH receptors detected under such conditions (Clayton and Catt, 1981).

In summary, folliculotropes and luteinizing cells evidenced an increase in VD 24 h after castration, suggestive of hypertrophy, hyperplasia and/or differentiation from the dual hormone-producing state (Childs et al., 1982). Also, the increased values reverted to normal levels in androgen-treated rats. We have detected a decrease in VD and area (A) of both gonadotropes in castrated rats with androgen substitution, identifying two subpopulations of different cell size. There might be a relationship between the number of small gonadotropes observed and the presence of monohormonal cells, considering the maturation sequence proposed by Childs (1995). The highest percentage of monohormonal gonadotropes was detected in rats exposed to surgical stress and the lowest percentage was found in castrated rats (less than 10%). This suggested that gonadotropes were potentially bihormonal and that adequate stimulation might determine the expression of both hormones (Childs, 1995). Large bihormonal gonadotropes might become small monohormonal gonadotropes after they increased their

Las grandes gonadotropas bihormonales podrían convertirse en pequeñas gonadotropas monohormonales después de aumentar su actividad secretoria y el pool de reserva podría activarse en el ciclo siguiente. Algunas gonadotropas monohormonales podrían ser inmaduras o reguladoras y jugarían roles paracrinos y autocrinos en la población pituitaria (Childs, 1997).

La **tabla 2** muestra los niveles séricos de FSH y LH aumentados ($p < 0.01$) en los grupos flutamida, Casodex y castrado comparados con los controles. La castración indujo altos niveles séricos. El grupo castrado con sustitución androgénica redujo los niveles de gonadotropinas respecto a los controles. Esto confirmó resultados previos de Rulli y col. (1995) y de otros autores (Viguiet-Martinez y col., 1983a; Chandolia y col., 1991a-b; Gromoll y col., 1993). La flutamida ejercería un efecto central mediante inhibición de la retroalimentación negativa a nivel del eje hipotálamo-hipofisario y aumentaría el contenido hipotalámico de GnRH (Sodersten y col., 1975; Neumann y Töpert, 1986). La absorción de testosterona estuvo bloqueada en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata al usar concentraciones crecientes del metabolito activo de la flutamida. Su actividad podría explicarse por la capacidad del antiandrógeno puro para desplazar al andrógeno de su receptor específico. Esta acción sería similar en los tejidos blanco hormono-dependientes (próstata, útero, mama) (Simard y col., 1986). No se hallaron alteraciones en los perfiles séricos cuando se administró antiandrógenos a ratas adultas (Chandolia y col., 1991b).

Tabla 2. Niveles séricos de FSH y LH de ratas tratadas con flutamida, Casodex, castradas y castradas sustituidas con propionato de dihidrotestosterona (DHTP) por 10 días

Tratamiento	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
Control	13.7 ± 1.2 ^a	0.4 ± 0.1 ^a
Flutamida (10 mg/día)	29.5 ± 1.4 ^{b,c}	5.4 ± 0.8 ^b
Casodex (10 mg/día)	26.9 ± 1.5 ^b	4.7 ± 0.9 ^b
Castrado	35.0 ± 1.6 ^c	9.4 ± 0.9 ^c
Castrado + DHTP (40 µg/día)	8.7 ± 1.0 ^a	0.2 ± 0.03 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$, $n = 6$).

secretory activity and the reserve pool might be activated in the following cycle. Some monohormonal gonadotropes might be immature or regulatory and would play paracrine-autocrine roles in the pituitary population (Childs, 1997).

Table 2 shows increased FSH and LH serum levels ($p < 0.01$) in flutamide, Casodex and castrated groups compared to controls. Castration induced high serum levels. The castrated group with DHTP reduced gonadotropin levels with respect to controls. This confirmed previous results by Rulli et al. (1995) and by other authors (Viguiet-Martinez et al., 1983a; Chandolia et al., 1991a-b; Gromoll et al., 1993). Flutamide would have a central effect inhibiting negative feedback at the level of the hypothalamo-hypophyseal axis and would increase the hypothalamic content of GnRH (Sodersten et al., 1975; Neumann and Töpert, 1986).

Table 2. Serum levels of FSH and LH of prepubertal male rats treated with flutamide, Casodex or castrated plus dihydrotestosterone propionate (DHTP) for 10 days

Treatment	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)
Control	13.7 ± 1.2 ^a	0.4 ± 0.1 ^a
Flutamide (10 mg/day)	29.5 ± 1.4 ^{b,c}	5.4 ± 0.8 ^b
Casodex (10 mg/day)	26.9 ± 1.5 ^b	4.7 ± 0.9 ^b
Castrated	35.0 ± 1.6 ^c	9.4 ± 0.9 ^c
Castrated + DHTP (40 µg/day)	8.7 ± 1.0 ^a	0.2 ± 0.03 ^a

Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$, $n = 6$).

The absorption of testosterone was blocked in primary cultures of pituitary cells in rats when increasing concentrations of flutamide active metabolite was used. This activity might be explained by the capacity of the pure antiandrogen to displace the androgen from its specific receptor. This action would be similar in hormone-dependent target tissues (prostate, uterus, mammary gland) (Simard et al., 1986). No alterations were found in the serum profiles when antiandrogens were administered to adult rats (Chandolia et al., 1991b).

A nivel ultraestructural, (Cónsole y col., 1999 y 2001) las gonadotropas del grupo control presentan características normales.

En la **fig. 13.2** se observan gránulos secretorios grandes y pequeños con diferente densidad electrónica, Golgi evidente y RER vesiculoso.

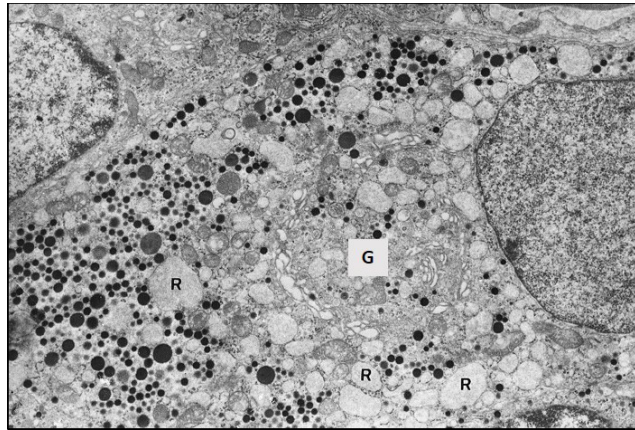


Fig. 13.2. Folliculotropa de grupo control. Grandes y pequeños gránulos de diferente densidad, RER (R) vesiculoso y Golgi (G) evidente (x 10.000).

En la **fig. 13.3** del grupo castrado se observa RER desarrollado, complejo de Golgi expandido y mitocondrias con imágenes laminares electrodensas.

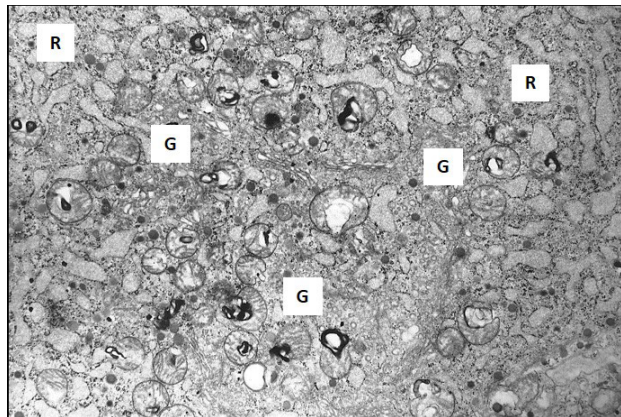


Fig. 13.3. Gonadotropa de grupo castrado. RER (R) bien desarrollado, Golgi (G) expandido y mitocondrias con figuras laminares electrodensas. (x 12.500).

At ultrastructural level, (Cónsole et al., 1999 and 2001) gonadotropes from the control group present normal characteristics. Large and small secretory granules with different electron density, an evident Golgi and vesicular RER are observed (**fig. 13.2**).

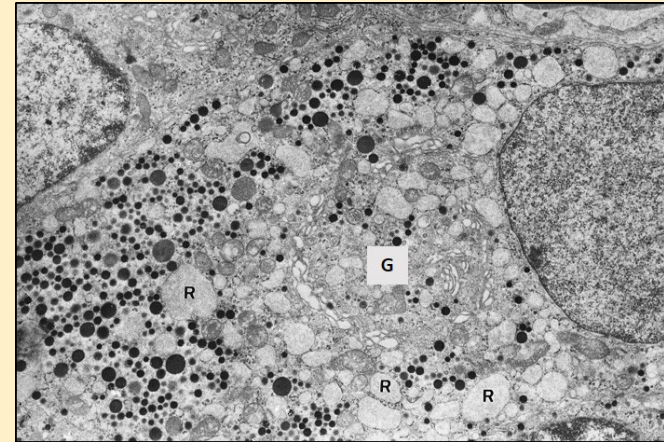


Fig. 13.2. Folliculotrope from control group. Large and small secretory granules of different density, vesicular RER (R) and evident Golgi (G) (x 10.000).

In **fig. 13.3** from the castrated group a developed RER, an expanded Golgi complex and mitochondria with electron-dense lamellar images are observed.

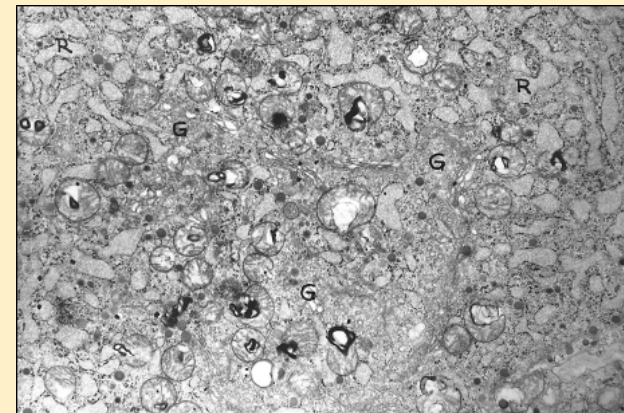


Fig. 13.3. Gonadotrope from castrated group. Well developed RER (R), expanded Golgi (G) and mitochondria with electron-dense lamellar figures. (x 12.500).

La **fig. 13.4** muestra un animal castrado con sustitución androgénica que presenta RER con cisternas irregulares y aisladas mitocondrias.

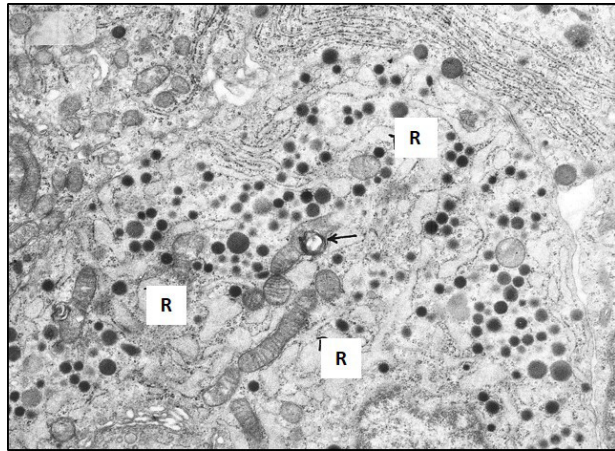


Fig. 13.4. Gonadotropa de grupo castrado con reemplazo androgénico. Se ve RER (R) con cisternas irregulares y una imagen mitocondrial residual (flecha) (x 16.500).

La **fig. 13.5** corresponde al grupo tratado Casodex en el que se ve un RER dilatado con cisternas vesiculosas y pequeños gránulos secretorios.

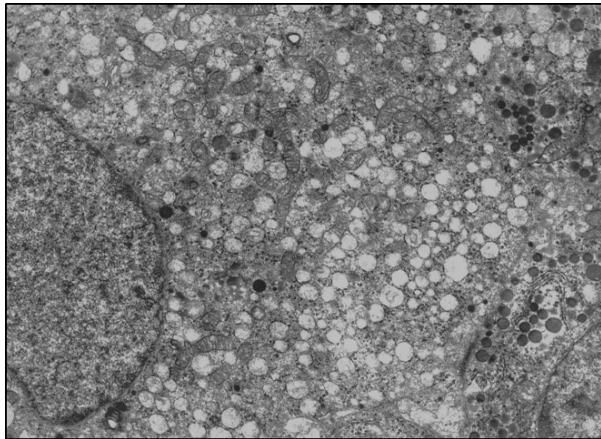


Fig. 13.5. Gonadotropa de grupo tratado con Casodex. RER dilatado con vesículas en todo el citoplasma y pequeños gránulos secretorios (x 16.000).

In **fig. 13.4** from the castrated group with androgen substitution a RER with irregular cisternae and isolated mitochondria are present.

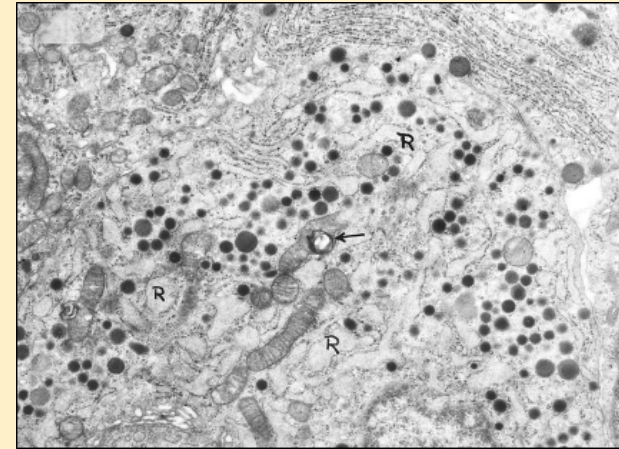


Fig. 13.4. Gonadotrope from castrated group with androgen replacement. RER (R) with irregular cisternae and residual mitochondria image (arrow) are seen (x 16.500).

In **fig. 13.5** (Casodex-treated group) a dilated RER with vesicular cisternae and small secretory granules are seen.

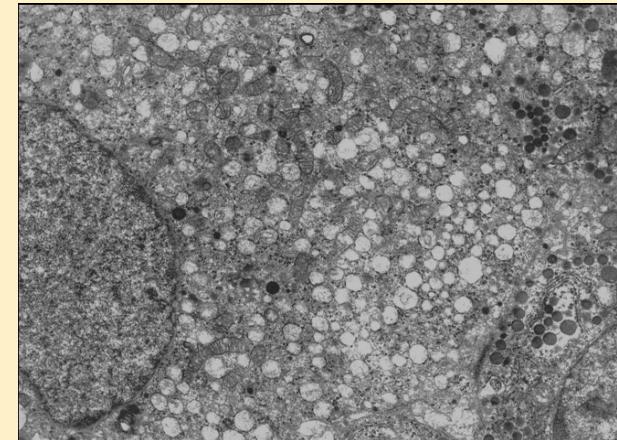


Fig. 13.5. Gonadotrope from Casodex-treated group. Dilated RER with vesicles throughout the whole cytoplasm and small secretory granules (x 16.000).

En la **fig. 13.6** se puede observar una gonadotropa de un grupo flutamida con RER formado por vesículas dilatadas en todo el citoplasma, Golgi expandido y alguna mitocondria clara con figura laminar electrodensa.

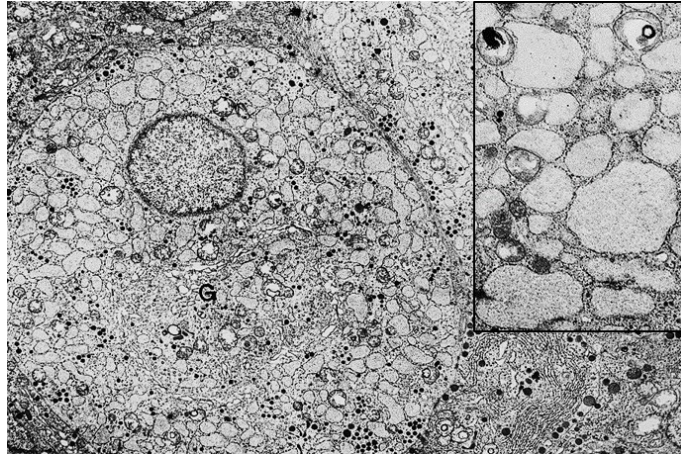


Fig. 13.6. Gonadotropa de grupo tratado con flutamida. RER: cisternas dilatadas en todo el citoplasma y Golgi (G) expandido (x 5.000). Recuadro: RER: cisternas dilatadas y mitocondrias con figuras laminares electrodensas (x 10.500).

Se sabe que la privación de andrógenos por castración induce un rápido aumento de los niveles de gonadotropinas circulantes. El bloqueo de los receptores androgénicos a nivel periférico o en el eje hipotálamo-pituitario, previenen la regulación de los andrógenos sobre la síntesis y secreción de las gonadotropinas mediante retroalimentación (Sodersten y col., 1975; Neumann y Töpert, 1986). El bloqueo específico del receptor de andrógeno mediante los antiandrogénos no esteroideos Casodex y flutamida han provisto una herramienta útil para el estudio del efecto androgénico *in vivo* sobre la función testicular. Los andrógenos actuarían directa o indirectamente sobre la pituitaria, regulando la incorporación de residuos de carbohidratos en la molécula de FSH y modulando su actividad biológica (Rulli y col., 1995 y 1996). Se demostró un aumento significativo de los niveles de gonadotropinas y andrógenos séricos con la administra-

In **fig. 13.6** a gonadotrope from a flutamide group with RER formed by dilated vesicles throughout the whole cytoplasm, expanded Golgi and some clear mitochondria with electrodense laminar figure can be observed.

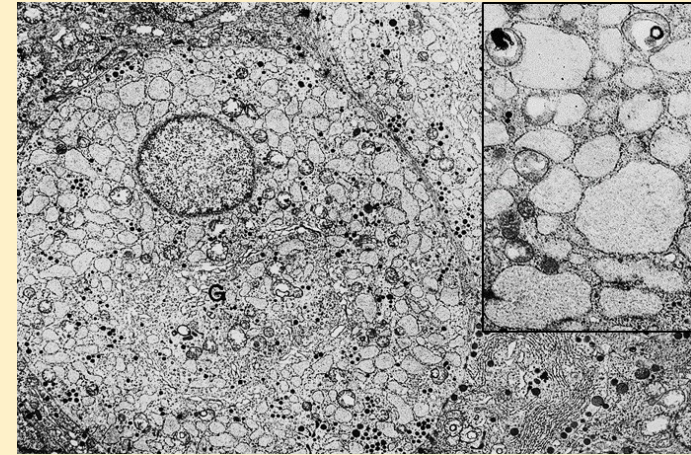


Fig. 13.6. Gonadotrope from the flutamide-treated group. RER: dilated cisternae throughout the whole cytoplasm and expanded Golgi (G) (x 5.000). Inset: RER: dilated cisternae and mitochondria with electrodense laminar figures (x 10.500).

It is known that androgen-deprivation by castration induces a fast increase of the circulating gonadotropin levels. The blocking of androgen receptors at peripheral level or in the pituitary-hypothalamo level, prevent the feedback regulation of androgens on gonadotropin synthesis and secretion (Sodersten et al., 1975; Neumann and Töpert, 1986). Specific androgen-receptor blockade by the non-steroidal antiandrogens, flutamide and Casodex, has proven to be a valid tool for studying androgen effects *in vivo* on the testicular function. Androgens could be acting directly or indirectly on the pituitary gland, regulating the incorporation of carbohydrate residues in the FSH molecules and modulating its biological activity (Rulli et al., 1995 and 1996). A significant increase in serum gonadotropins and androgens was shown when adult rats (Viguiet-Martinez et al., 1983a-b; Chandolia et al., 1991a-b) and prepubertal rats (Rulli et al., 1995) were ad-

ción de flutamida a ratas adultas (Viguiet-Martinez y col., 1983 a-b; Chandolia y col., 1991a-b) y a ratas prepuberales (Rulli y col., 1995). Además, se propuso que el Casodex actuaría como un antiandrógeno selectivo, con un limitado acceso al sistema nervioso central, pero con una efectiva unión a los receptores androgénicos pituitarios (Freeman y col., 1989).

Entre otras acciones complementarias, se señala que el tratamiento neonatal con flutamida disminuyó el número de las neuronas en el giro dentado del hipocampo y la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la región CA1 (Zhang y col., 2010) y que la terapia perinatal con flutamida determinó reducción del peso testicular y prostático, descenso del número de espermatozoides y del nivel de testosterona que llevaron a una menor fertilidad (Leonelli y col., 2011). Además, la flutamida alteró la función reproductiva mediante la unión a los receptores androgénicos y la expresión génica testicular en ratas machos (Vo y col., 2009a-b). La administración de flutamida provocó alteraciones en la expresión génica en el eje hipotálamo-pituitario-testicular, con alteraciones en la secreción de las gonadotropinas y sobreexpresión de los genes de las enzimas esteroideogénicas testiculares (Ohsako y col., 2003).

La toxicidad testicular inducida por flutamida (dosis de 0.04 a 150 mg/Kg/día durante 28 días) determinó la hiperplasia de las células de Leydig, con alteración de los genes asociados a la lesión testicular (Rouquié y col., 2009). Las ratas hembras gestantes (día embrionario: E8-E14) expuestas a flutamida (5 mg-20 mg/día) mostraron en la siguiente generación un fenotipo testicular con aumento de las apoptosis en las células espermatogénicas y descenso del número de espermatozoides epididimarios (Anway y col., 2008). Además, la flutamida afectó la esteroideogénesis testicular en fetos de ratas (Adamsson y col., 2008). La modulación de la oxidasa del L-aminoácido (LAO) por los antiandrógenos (ej: flutamida) indica que esta proteína podría ser un biomarcador de la alteración endócrina en roedores machos (Tinwell y col., 2007). La flutamida puede causar

ministrado flutamida. También, se sugirió que Casodex podría estar actuando como un antiandrógeno selectivo, con un limitado acceso al sistema nervioso central, pero con una efectiva unión a los receptores androgénicos pituitarios (Freeman et al., 1989).

Otras actividades complementarias evidenciaron que el tratamiento neonatal con flutamida disminuyó el número de neuronas en el giro dentado del hipocampo y la densidad de espinas dendríticas en la zona CA1 de las neuronas piramidales (Zhang et al., 2010) y que el tratamiento perinatal con flutamida determinó la reducción del peso testicular y prostático, el descenso del número de espermatozoides y el nivel de testosterona que llevaron a una menor fertilidad (Leonelli et al., 2011). Además, la flutamida alteró la función reproductiva mediante la unión a los receptores androgénicos y la expresión génica testicular en ratas machos (Vo et al., 2009a-b). La administración de flutamida alteró la expresión génica en el eje hipotálamo-pituitario-testicular, con alteraciones en la secreción de las gonadotropinas y sobreexpresión de los genes de las enzimas esteroideogénicas testiculares (Ohsako et al., 2003).

La toxicidad testicular inducida por flutamida (dosis de 0.04 a 150 mg/Kg/día durante 28 días) determinó la hiperplasia de las células de Leydig, con alteración de los genes asociados a la lesión testicular (Rouquié et al., 2009). Las ratas hembras gestantes (día embrionario: E8-E14) expuestas a flutamida (5 mg-20 mg/día) mostraron en la siguiente generación un fenotipo testicular con aumento de las apoptosis en las células espermatogénicas y descenso del número de espermatozoides epididimarios (Anway et al., 2008). Además, la flutamida afectó la esteroideogénesis testicular en fetos de ratas (Adamsson et al., 2008). La modulación de la oxidasa del L-aminoácido (LAO) por los antiandrógenos (ej: flutamida) indica que esta proteína podría ser un biomarcador de la alteración endócrina en roedores machos (Tinwell et al., 2007). La flutamida puede causar

abnormal sex differentiation and development and induce an experimental model of hypospadias (Li et al., 2006). Casodex has been considered a selective substance of peripheral action (Furr et al., 1987). However, Lawson et al. (2001) while work-

diferenciación y desarrollo sexual anormales e inducir un modelo experimental de hipospadias (Li y col., 2006).

El Casodex ha sido considerado una sustancia selectiva de acción periférica (Furr y col., 1987). Sin embargo, Lawson y colab. (2001) trabajando con la línea celular L β T2, hallaron que el Casodex disminuyó el receptor de andrógeno, indicando una acción central a nivel de las gonadotropas. La bicalutamida (Casodex), antiandrógeno no esteroide suministrado en monoterapia (150 mg/día) para el cáncer de próstata no metastásico temprano, provoca un descenso del antígeno prostático específico (Cockshott, 2004). La exposición prolongada al Casodex o bicalutamida induce una alteración del genoma mitocondrial que se manifiesta en el descenso del ADN mitocondrial y en la menor expresión de los genes de la cadena respiratoria (Pignatta y col., 2014). El receptor de andrógenos (RA) juega un rol clave en la regulación de la expresión génica de varios tejidos, incluyendo la próstata. El Casodex es el más usado en el tratamiento del cáncer de próstata, ya que antagoniza el RA al acceder al bolsillo de unión adicional adyacente al sitio de unión de la hormona (Osguthorpe y Hagler, 2011). La monoterapia con Casodex oral resultó efectiva en pacientes con cáncer prostático localizado (Iversen y col., 2010; 2016). La bicalutamida (Casodex) puede ser sintetizada a partir de halohidrina o de epóxido apropiado y se puede obtener un análogo de O-metil clorohidrina que no reacciona con el tiolato (Asaad y Fillery, 2009). A pesar de que con Casodex se puede reducir el tamaño del cáncer de próstata, su efecto sobre las metástasis es poco claro por lo que se sugiere el agregado de ASC-J9 en la fase resistente a la castración (Lin y col., 2013). Nakai y col. (2015) presentaron un estudio comparativo de la eficacia de la flutamida versus la bicalutamida con marcadas diferencias significativas en los niveles de antígeno prostático específico, testosterona y dihidroepiandrosterona.

ing with cell line L β T2 found that Casodex diminished the androgen receptor, indicating a central action at the gonadotrope level. Bicalutamide (Casodex), non steroid antiandrogen administered in monotherapy (150 mg/day) for early non-metastatic prostate cancer, caused a decrease of the specific prostate antigen (Cockshott, 2004). Prolonged exposition to Casodex or bicalutamide causes an alteration of the mitochondrial genome manifested in the decrease of the mitochondrial DNA and the lower expression of the respiratory chain genes (Pignatta et al., 2014). The androgen receptor (AR) plays a key role in the regulation of the gene expression of several tissues, including the prostate. Casodex is the most used in prostate cancer treatment since it antagonizes AR by accessing an additional binding pocket adjacent to the hormone binding site (Osguthorpe and Hagler, 2011). Monotherapy with oral Casodex resulted effective in patients with localized prostate cancer (Iversen et al., 2010; 2016). Bicalutamide (Casodex) could be synthesized from halohydrins or appropriate epoxide and an O-methyl chlorohydrins analogue can be obtained that does not react to thiolate (Asaad and Fillery, 2009). Even though with the use of Casodex the size of the prostate cancer can be reduced, its effect on metastasis is not quite clear, thus suggesting the addition of ASC-J9 in the resistant phase of castration (Lin et al., 2013). Nakai et al. (2015) showed a randomized control trial comparing the efficacy of flutamide vs. bicalutamide with statistical significance in levels of prostate-specific antigen, testosterone and dehydroepiandrosterone.

To conclude, our studies show that castration and antiandrogens have a great impact on the morphology of the gonadotrope population and on gonadotropin serum levels. Such results would allow clarifying cellular and molecular aspects applicable to prostate cancer therapies.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la castración y los antiandrógenos causan gran impacto sobre la morfología de la población gonadotropa y sobre los niveles séricos de las gonadotropinas. Dichos resultados permitirían clarificar aspectos celulares y moleculares aplicables a las terapias del cáncer de próstata.

Referencias

- Adamsson NA, Brokken LJ, Paranko J, Toppari J. In vivo and in vitro effects of flutamide and diethylstilbestrol on fetal testicular steroidogenesis in the rat. *Reprod Toxicol* 2008; 25(1):76-83.
- Anway MD, Rekow SS, Skinner MK. Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2008; 26(2):100-106.
- Arimura A, Shino M, de la Cruz KG, Rennels EG, Schally AV. Effect of active and passive immunization with luteinizing hormone-releasing hormone on serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels and the ultrastructure of the pituitary gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1976; 99(1):291-303.
- Asaad N, Fillery S. Mechanistic studies on the synthesis of bicalutamide. *Org Biomol Chem* 2009; 7(4):678-686.
- Chandolia RK, Weinbauer GF, Behre HM, Nieschlag E. Evaluation of a peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991a; 38(3):367-375.
- Chandolia RK, Weinbauer GF, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal anti-androgens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991b; 125(5):547-555.

References

- Adamsson NA, Brokken LJ, Paranko J, Toppari J. In vivo and in vitro effects of flutamide and diethylstilbestrol on fetal testicular steroidogenesis in the rat. *Reprod Toxicol* 2008; 25(1):76-83.
- Anway MD, Rekow SS, Skinner MK. Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2008; 26(2):100-106.
- Arimura A, Shino M, de la Cruz KG, Rennels EG, Schally AV. Effect of active and passive immunization with luteinizing hormone-releasing hormone on serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels and the ultrastructure of the pituitary gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1976; 99(1):291-303.
- Asaad N, Fillery S. Mechanistic studies on the synthesis of bicalutamide. *Org Biomol Chem* 2009; 7(4):678-686.
- Chandolia RK, Weinbauer GF, Behre HM, Nieschlag E. Evaluation of a peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991a; 38(3):367-375.
- Chandolia RK, Weinbauer GF, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal anti-androgens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991b; 125(5):547-555.
- Childs GV, Ellison DG, Foster LP, Ramaley JA. Postnatal maturation of gonadotropes in the male rat pituitary. *Endocrinology* 1981; 109(5):1683-92.
- Childs GV, Ellison DG, Lorenzen JR, Collins TJ, Schwartz NB. Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology* 1982; 111(4): 1318-28.

Childs GV, Ellison DG, Foster LP, Ramaley JA. Postnatal maturation of gonadotropes in the male rat pituitary. *Endocrinology* 1981; 109(5):1683-92.

Childs GV, Ellison DG, Lorenzen JR, Collins TJ, Schwartz NB. Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology* 1982; 111(4): 1318-28.

Childs GV, Unabia, G, Tibolt R, Lloyd JM. Cytological factors that support nonparallel secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the estrous cycle. *Endocrinology* 1987; 121(5):1801-13.

Childs GV. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):114-130.

Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50: 215-286.

Clayton RN, Catt KH. Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology* 1981; 108(3):887-895.

Cockshott ID. Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(13):855-878.

Cónsole GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by nonsteroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepubertal rats. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(1):64-72.

Cónsole GM, Rulli SB, Riccillo FL, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Effects of androgens and antiandrogens on quantitative immunohistochemistry of gonadotrope cells in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):261-267.

Debeljuk L, Arimura A, Schally AV. Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in intact male rats of different ages. *Endocrinology* 1972; 90(2):585-588.

Childs GV, Unabia, G, Tibolt R, Lloyd JM. Cytological factors that support nonparallel secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the estrous cycle. *Endocrinology* 1987; 121(5):1801-13.

Childs GV. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc Res Tech* 1997; 39(2):114-130.

Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitam Horm* 1995; 50: 215-286.

Clayton RN, Catt KH. Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology* 1981; 108(3):887-895.

Cockshott ID. Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(13):855-878.

Cónsole GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by nonsteroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepubertal rats. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(1):64-72.

Cónsole GM, Rulli SB, Riccillo FL, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Effects of androgens and antiandrogens on quantitative immunohistochemistry of gonadotrope cells in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):261-267.

Debeljuk L, Arimura A, Schally AV. Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in intact male rats of different ages. *Endocrinology* 1972; 90(2):585-588.

Deschepper CF, Seidler CD, Steel MK, Ganong WF. Further studies on the localization of angiotensin-II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology* 1985; 40(6):471- 475.

Deschepper CF, Seidler CD, Steel MK, Ganong WF. Further studies on the localization of angiotensin-II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology* 1985; 40(6):471- 475.

Drouin J, Labrie F. Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 1976; 98(6):1528-34.

Dullaart J. Immature rat pituitary gland in vitro: age-and sex-related changes in luteinizing hormone releasing hormone-stimulated gonadotrophin release. *J Endocrinol* 1977; 73(2):309-319.

Farquhar MG, Rinehart JF. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology* 1954; 54(5):516-541.

Farquhar MG, Rinehart JF. Further evidence for the existence of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary of the rat. *Anat Res* 1955; 121: 394.

Freeman SN, Mainwaring WI, Furr BJ. A possible explanation for the peripheral selectivity of a novel, non-steroidal antiandrogen Casodex (ICI 176,334). *Br J Cancer* 1989; 60(5):664-668.

Furr BJ, Valcaccia B, Curry B, Woodburn JR, Chesterson C, Tucker H. ICI 176.334: a novel non-steroidal, peripherally selective antiandrogen. *J Endocrinol* 1987; 113(3): R7-R9.

Furr BJ. The development of Casodex (bicalutamide): preclinical studies. *Eur Urol* 1996; 29(Suppl 2):83-95.

Garner LL, Balke CA. Ultrastructural immunocytochemical study of the LH secreting cell of the rat anterior pituitary gland: changes occurring after ovariectomy. *Biol Reprod* 1981; 24(2):461-474.

Gromoll J, Weinbauer GF, Simoni M, Nieschlag E. Effects of antiandrogens and ethane dimethane sulphonate (EDS) on gene expression,

Drouin J, Labrie F. Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 1976; 98(6):1528-34.

Dullaart J. Immature rat pituitary gland in vitro: age-and sex-related changes in luteinizing hormone releasing hormone-stimulated gonadotrophin release. *J Endocrinol* 1977; 73(2):309-319.

Farquhar MG, Rinehart JF. Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology* 1954; 54(5):516-541.

Farquhar MG, Rinehart JF. Further evidence for the existence of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary of the rat. *Anat Res* 1955; 121: 394.

Freeman SN, Mainwaring WI, Furr BJ. A possible explanation for the peripheral selectivity of a novel, non-steroidal antiandrogen Casodex (ICI 176,334). *Br J Cancer* 1989; 60(5):664-668.

Furr BJ, Valcaccia B, Curry B, Woodburn JR, Chesterson C, Tucker H. ICI 176.334: a novel non-steroidal, peripherally selective antiandrogen. *J Endocrinol* 1987; 113(3): R7-R9.

Furr BJ. The development of Casodex (bicalutamide): preclinical studies. *Eur Urol* 1996; 29(Suppl 2):83-95.

Garner LL, Balke CA. Ultrastructural immunocytochemical study of the LH secreting cell of the rat anterior pituitary gland: changes occurring after ovariectomy. *Biol Reprod* 1981; 24(2):461-474.

Gromoll J, Weinbauer GF, Simoni M, Nieschlag E. Effects of antiandrogens and ethane dimethane sulphonate (EDS) on gene expression, free subunits, bioactivity and secretion of pituitary gonadotrophins in male rats. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 91(1-2):119-125.

Ibrahim SN, Moussa SM, Childs GV. Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with serum levels of gonadotropins. *Endocrinology* 1986; 119(2):629-637.

- free subunits, bioactivity and secretion of pituitary gonadotrophins in male rats. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 91(1-2):119-125.
- Ibrahim SN, Moussa SM, Childs GV. Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with serum levels of gonadotropins. *Endocrinology* 1986; 119(2):629-637.
- Inoue K, Kurosumi K. Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration-immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch Histol Jpn* 1981; 44(1):71-85.
- Iversen P, Damber JE, Malmberg A, Persson BE, Klotz L. Degarelix monotherapy compared with luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists plus anti-androgen flare protection in advanced prostate cancer: an analysis of two randomized controlled trials. *The Adv Urol* 2016; 8(2):75-82.
- Iversen P, McLeod DG, See WA, Morris T, Armstrong J, Wirth MP. Antiandrogen monotherapy in patients with localized or locally advanced prostate cancer: final results from the bicalutamide. Early Prostate Cancer programme at a median follow-up of 9.7 years. *BJU Int* 2010; 105(8):1074-81.
- Kihara H. Compensatory development of immature LH cells after long-term gonadectomy: an immunocytochemical, electron microscopic and cell count study. *Endocrinol Jpn* 1984; 31(4):395-406.
- Kurosumi K, Kawarai Y, Yukitake Y, Inoue K. Electron microscopic morphometric of the rat castration cells. *Gunna Symp Endocrinol* 1976; 13:221-225.
- Kurosumi K. Adenohypophysis. An Atlas of Electron Micrographs: Functional Morphology of Endocrine Glands. In: K. Kurosumi and H. Fujita, eds. Igaku-Shoin, Tokyo, 1974:1-100.
- Kurosumi K, Oota Y: Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent estrous and diestrous rats. *Z Zellforsch* 1968; 85(1):34-46.
- Inoue K, Kurosumi K. Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration-immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch Histol Jpn* 1981; 44(1):71-85.
- Iversen P, Damber JE, Malmberg A, Persson BE, Klotz L. Degarelix monotherapy compared with luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists plus anti-androgen flare protection in advanced prostate cancer: an analysis of two randomized controlled trials. *The Adv Urol* 2016; 8(2):75-82.
- Iversen P, McLeod DG, See WA, Morris T, Armstrong J, Wirth MP. Antiandrogen monotherapy in patients with localized or locally advanced prostate cancer: final results from the bicalutamide. Early Prostate Cancer programme at a median follow-up of 9.7 years. *BJU Int* 2010; 105(8):1074-81.
- Kihara H. Compensatory development of immature LH cells after long-term gonadectomy: an immunocytochemical, electron microscopic and cell count study. *Endocrinol Jpn* 1984; 31(4):395-406.
- Kurosumi K, Kawarai Y, Yukitake Y, Inoue K. Electron microscopic morphometric of the rat castration cells. *Gunna Symp Endocrinol* 1976; 13:221-225.
- Kurosumi K. Adenohypophysis. An Atlas of Electron Micrographs: Functional Morphology of Endocrine Glands. In: K. Kurosumi and H. Fujita, eds. Igaku-Shoin, Tokyo, 1974:1-100.
- Kurosumi K, Oota Y: Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent estrous and diestrous rats. *Z Zellforsch* 1968; 85(1):34-46.
- Lawson MA, Li D, Glidewell-Kenney CA, López FJ. Androgen responsiveness of the pituitary gonadotrope cell line L β T2. *J Endocrinol* 2001; 170(3): 601-607.
- Leonelli C, García, PC, Pereira OC. Copulatory efficiency and fertility in male rats exposed perinatally to flutamide. *Reprod Toxicol* 2011; 31(1):10-16.

- Lawson MA, Li D, Glidewell-Kenney CA, López FJ. Androgen responsiveness of the pituitary gonadotrope cell line L β T2. *J Endocrinol* 2001; 170(3): 601-607.
- Leonelli C, García, PC, Pereira OC. Copulatory efficiency and fertility in male rats exposed perinatally to flutamide. *Reprod Toxicol* 2011; 31(1):10-16.
- Li Y, Zhang H, Wang WD, Liang Y, Wu DS. Impact of flutamide on sex differentiation in rats. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Xue Ban* 2006; 37(2):258-261.
- Lin TH, Lee SO, Niu Y, Xu, D, Liang L, Li L, Yeh SD, Fujimoto N, Yeh S, Chang C. Differential androgen deprivation therapies with anti-androgens casodex/bicalutamide or MDV3100/Enzalutamide versus anti-androgen receptor ASC-J9(R) lead to promotion versus suppression of prostate cancer metastasis. *J Biol Chem* 2013; 288(27):19359-69.
- Lou S, Martel C, Chen C, Labrie C, Candas B, Singh SM, Labrie F. Daily dosing with flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. *Urology* 1997; 50(6):913-919.
- Moriarty GC, Garner LL. Immunocytochemical studies of cells in the rat adenohypophysis containing both ACTH and FSH. *Nature* 1977; 265(5592): 365-368.
- Nakai Y, Tanka N, Anai S, Miyake M, Tatsumi Y, Fujimoto K. A randomized control trial comparing the efficacy of antiandrogen monotherapy: flutamide vs. bicalutamide. *Horm Cancer* 2015; 6(4):161-167.
- Neumann F, Töpert M. Pharmacology of antiandrogens. *J Steroid Biochem* 1986; 25(5B):885-895.
- Noguchi K, Arita J, Nagamoto A, Hosaka M, Kimura F. A quantitative analysis of testosterone action on FSH secretion from individual pituitary cells using the cell immunoblot assay. *J Endocrinol* 1996; 148(3):427- 433.
- Ohsako S, Kubota K, Kurosawa S, Takeda K, Qing W, Ishimura R, Tohyama C. Alterations of gene expression in adult male rat testis and
- Li Y, Zhang H, Wang WD, Liang Y, Wu DS. Impact of flutamide on sex differentiation in rats. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Xue Ban* 2006; 37(2):258-261.
- Lin TH, Lee SO, Niu Y, Xu, D, Liang L, Li L, Yeh SD, Fujimoto N, Yeh S, Chang C. Differential androgen deprivation therapies with anti-androgens casodex/bicalutamide or MDV3100/Enzalutamide versus anti-androgen receptor ASC-J9(R) lead to promotion versus suppression of prostate cancer metastasis. *J Biol Chem* 2013; 288(27):19359-69.
- Lou S, Martel C, Chen C, Labrie C, Candas B, Singh SM, Labrie F. Daily dosing with flutamide or Casodex exerts maximal antiandrogenic activity. *Urology* 1997; 50(6):913-919.
- Moriarty GC, Garner LL. Immunocytochemical studies of cells in the rat adenohypophysis containing both ACTH and FSH. *Nature* 1977; 265(5592): 365-368.
- Nakai Y, Tanka N, Anai S, Miyake M, Tatsumi Y, Fujimoto K. A randomized control trial comparing the efficacy of antiandrogen monotherapy: flutamide vs. bicalutamide. *Horm Cancer* 2015; 6(4):161-167.
- Neumann F, Töpert M. Pharmacology of antiandrogens. *J Steroid Biochem* 1986; 25(5B):885-895.
- Noguchi K, Arita J, Nagamoto A, Hosaka M, Kimura F. A quantitative analysis of testosterone action on FSH secretion from individual pituitary cells using the cell immunoblot assay. *J Endocrinol* 1996; 148(3):427- 433.
- Ohsako S, Kubota K, Kurosawa S, Takeda K, Qing W, Ishimura R, Tohyama C. Alterations of gene expression in adult male rat testis and pituitary shortly subacute administration of antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev* 2003; 49(4):275-290.
- Osguthorpe DJ, Hagler AT. Mechanism of androgen receptor antagonism by bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Biochemistry* 2011; 50(19):4105-13.

- pituitary shortly subacute administration of antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev* 2003; 49(4):275-290.
- Osguthorpe DJ, Hagler AT. Mechanism of androgen receptor antagonism by bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Biochemistry* 2011; 50(19):4105-13.
- Pignatta S, Arienti C, Zoli W, Di Donato M, Castoria G, Gabucci E, Casadio V, Falconi M, De Giorgi U, Silvestrini R, Tesei A. Prolonged exposure to (R)-bicalutamide generates a LNCaP subclone with alteration of mitochondrial genome. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1):314-324.
- Roberts VJ, Peto CA, Vale W, Sawchenko PE. Inhibin/activin subunits are costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1992; 56(2):214-224.
- Rouquié D, Friry-Santini C, Schorsch F, Tinwell H, Bars R. Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide. *Toxicol Sci* 2009; 109(1):59-65.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 1996; 63(6):514-521.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.
- Rulli SB, González-Calvar SI, Campo S, Calandra RS. Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. *J Androl* 1995; 16(3):225-232.
- Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophyseal pituitary shortly subacute administration of antiandrogen flutamide. *J Reprod Dev* 2003; 49(4):275-290.
- Pignatta S, Arienti C, Zoli W, Di Donato M, Castoria G, Gabucci E, Casadio V, Falconi M, De Giorgi U, Silvestrini R, Tesei A. Prolonged exposure to (R)-bicalutamide generates a LNCaP subclone with alteration of mitochondrial genome. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1):314-324.
- Roberts VJ, Peto CA, Vale W, Sawchenko PE. Inhibin/activin subunits are costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1992; 56(2):214-224.
- Rouquié D, Friry-Santini C, Schorsch F, Tinwell H, Bars R. Standard and molecular NOAELs for rat testicular toxicity induced by flutamide. *Toxicol Sci* 2009; 109(1):59-65.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 1996; 63(6):514-521.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.
- Rulli SB, González-Calvar SI, Campo S, Calandra RS. Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. *J Androl* 1995; 16(3):225-232.
- Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophyseal cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol* 1984; 100(3):323-328.
- Simard J, Luthy I, Guay J, Belanger A, Labrie F. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 44(3):261-270.

- cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol* 1984; 100(3):323-328.
- Simard J, Luthy I, Guay J, Belanger A, Labrie F. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 44(3):261-270.
- Smith PF, Keefer DA. Immunocytochemical and ultrastructural identification of mitotic cells in the pituitary gland of ovariectomized rats. *J Reprod Fertil* 1982; 66(1):383-388.
- Sodersten P, Gray G, Damassa DA, Smith ER, Davidson JM. Effects of a non-steroidal antiandrogen on sexual behaviour and pituitary-gonadal function in the male rat. *Endocrinology* 1975; 97(6):1468-75.
- Steele MK, Brownfield MS, Ganong WF. Immunocytochemical localization of angiotensin immunoreactivity in gonadotropes and lactotropes of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1982; 35(3):155-158.
- Tinwell H, Friry-Santini C, Rouquié D, Belluco S, Elies L, Pallen C, Bars R. Evaluation of the antiandrogenic effects of flutamide, DDE, and linuron in the weanling rat assay using organ weight, histopathological, and proteomic approaches. *Toxicol Sci* 2007; 100(1):54-65.
- Tixier-Vidal A, Tougard C, Kerdelhué B, Justisz M. Light and electron microscopic studies on immunocytochemical localization of gonadotropic hormones in the rat pituitary gland with antisera against ovine FSH, LH, LH α , and LH β . *Ann NY Acad Sci* 1975; 254:433-461.
- Torrónteras R, Castaño JP, Almadén Y, Ruiz Navarro A, García Navarro F. Hormonal storage patterns and morphological heterogeneity of porcine gonadotrope cells during postnatal development. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 97(1-2):51-59.
- Tougaard C, Tixier-Vidal A. Lactotropes and gonadotropes. *The Physiology of Reproduction*. In: E. Knobil and J. Neil, eds. Raven Press, Ltd, New York, 1988: 1305-33.
- Smith PF, Keefer DA. Immunocytochemical and ultrastructural identification of mitotic cells in the pituitary gland of ovariectomized rats. *J Reprod Fertil* 1982; 66(1):383-388.
- Sodersten P, Gray G, Damassa DA, Smith ER, Davidson JM. Effects of a non-steroidal antiandrogen on sexual behaviour and pituitary-gonadal function in the male rat. *Endocrinology* 1975; 97(6):1468-75.
- Steele MK, Brownfield MS, Ganong WF. Immunocytochemical localization of angiotensin immunoreactivity in gonadotropes and lactotropes of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1982; 35(3):155-158.
- Tinwell H, Friry-Santini C, Rouquié D, Belluco S, Elies L, Pallen C, Bars R. Evaluation of the antiandrogenic effects of flutamide, DDE, and linuron in the weanling rat assay using organ weight, histopathological, and proteomic approaches. *Toxicol Sci* 2007; 100(1):54-65.
- Tixier-Vidal A, Tougard C, Kerdelhué B, Justisz M. Light and electron microscopic studies on immunocytochemical localization of gonadotropic hormones in the rat pituitary gland with antisera against ovine FSH, LH, LH α , and LH β . *Ann NY Acad Sci* 1975; 254:433-461.
- Torrónteras R, Castaño JP, Almadén Y, Ruiz Navarro A, García Navarro F. Hormonal storage patterns and morphological heterogeneity of porcine gonadotrope cells during postnatal development. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 97(1-2):51-59.
- Tougaard C, Tixier-Vidal A. Lactotropes and gonadotropes. *The Physiology of Reproduction*. In: E. Knobil and J. Neil, eds. Raven Press, Ltd, New York, 1988: 1305-33.
- Viguié-Martinez MC, Hochereau de Reviers MT, Barenton B, Perreau C. Effect of a non-steroidal antiandrogen, flutamide, on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testis in growing male rats: endocrinological and histological data. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983a; 102(2):299-306.

Viguiet-Martinez MC, Hochereau de Reviers MT, Barenton B, Perreau C. Effect of a non-steroidal antiandrogen, flutamide, on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testis in growing male rats: endocrinological and histological data. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983a; 102(2):299-306.

Viguiet-Martinez MC, Hochereau de Reviers MT, Barenton B, Perreau C. Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidence on fertility. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983b; 104(2):246-252.

Vo TT, Jung EM, Dang VH, Jung K, Baek J, Choi KC, Jeung EB. Differential effects of flutamide and di-(2-ethylhexyl) phthalate on male reproductive organs in a rat model. *J Reprod Dev* 2009a; 55(4):400-411.

Vo TT, Jung EM, Dang VH, Yoo YM, Choi KC, Yu FH, Jeung EB. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2009b; 7:104.

Wierman ME, Wang C. Androgen selectively stimulates follicle-stimulating hormone β -mRNA levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Biol Reprod* 1990; 42(3):563-571.

Yoshimura F, Harumiya K. Electron microscopy of the anterior lobe of pituitary in normal and castrated rats. *Endocrinol Jpn* 1965; 12(2):119-152.

Zhang JM, Tonelli L, Regenold WT, McCarthy MM. Effects of neonatal flutamide treatment on hippocampal neurogenesis and synaptogenesis correlate with depression-like behaviors in preadolescent male rats. *Neuroscience* 2010; 169(1):544-554.

Viguiet-Martinez MC, Hochereau de Reviers MT, Barenton B, Perreau C. Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidence on fertility. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983b; 104(2):246-252.

Vo TT, Jung EM, Dang VH, Jung K, Baek J, Choi KC, Jeung EB. Differential effects of flutamide and di-(2-ethylhexyl) phthalate on male reproductive organs in a rat model. *J Reprod Dev* 2009a; 55(4):400-411.

Vo TT, Jung EM, Dang VH, Yoo YM, Choi KC, Yu FH, Jeung EB. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and flutamide alter gene expression in the testis of immature male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2009b; 7:104.

Wierman ME, Wang C. Androgen selectively stimulates follicle-stimulating hormone β -mRNA levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Biol Reprod* 1990; 42(3):563-571.

Yoshimura F, Harumiya K. Electron microscopy of the anterior lobe of pituitary in normal and castrated rats. *Endocrinol Jpn* 1965; 12(2):119-152.

Zhang JM, Tonelli L, Regenold WT, McCarthy MM. Effects of neonatal flutamide treatment on hippocampal neurogenesis and synaptogenesis correlate with depression-like behaviors in preadolescent male rats. *Neuroscience* 2010; 169(1):544-554.

CAPÍTULO 14

Sialilación de la hormona folículo-estimulante: cambios en la población gonadotropa de ratas machos castrados

El entorno hormonal regula el contenido de ácido siálico y el grado de procesamiento de los oligosacáridos de la hormona folículo-estimulante (FSH). Los estudios en animales y humanos han demostrado que la maduración sexual promueve los cambios en los carbohidratos y en la biopotencialidad de la FSH secretada.

El contenido de ácido siálico aumenta con la edad y esto se debería a un incremento en la expresión de las sialiltransferasas (Ambao y col., 2005; 2007 y 2009). La glicosilación de FSH está controlada por la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y por los esteroides sexuales (Kennedy y Chappel, 1985). Varias enzimas están involucradas en la glicosilación de la FSH. Las sialiltransferasas ST3Gal III y la ST6Gal I son responsables de la incorporación de los residuos de ácido siálico en la cadena carbohidratada de la molécula de FSH. La regulación transcripcional de las glicosiltransferasas fue descrita por Helton y Magner (1994a-b) en las tirotropas de ratones. Además, el estradiol modula la

CHAPTER 14

Sialylation of the folliculo-stimulating hormone: changes in the gonadotrope population of castrated male rats

The hormonal environment regulates the sialic acid content and the processing degree of oligosaccharides of the folliculo-stimulating hormone (FSH). Studies in animals and humans have shown that sexual maturation promotes changes in carbohydrates and in the biopotentiality of secreted FSH.

The content of sialic acid increases with age, which would be due to an increment in the expression of the sialyltransferases (Ambao et al., 2005; 2007 and 2009). Glycosylation of FSH is controlled by the gonadotropin releasing hormone (GnRH) and by the sexual steroids (Kennedy and Chappel, 1985). Several enzymes are involved in FSH glycosylation. Sialyltransferases ST3Gal III and ST6Gal I are responsible for the incorporation of sialic acid residues in the carbohydrate chain of the FSH molecule. The transcriptional regulation of the glycosyltransferases was described by Helton and Magner (1994a-b) in mouse thyrotropes. Also, estradiol modulates the mRNA expression of

expresión del ARNm de la sialiltransferasa, según lo documentado por Damián-Matsumura y col. (1999) en la pituitaria de ratas hembras.

La FSH es sintetizada en múltiples isoformas moleculares que difieren en la estructura de los oligosacáridos necesarios para la expresión de la actividad biológica de la hormona (Chappel y col., 1983; Dahl y Stone, 1992; Ulloa-Aguirre y col., 1999 y 2001). El predominio de isoformas de FSH que presentan oligosacáridos totalmente procesados puede contribuir al desarrollo y mantenimiento de la función del epitelio seminífero (Campo y col., 2007).

El ácido siálico terminal determina el porcentaje de depuración metabólica de la molécula de FSH y su unión al receptor (Wide, 1986; Cerpa-Poljak y col., 1993). Se sabe que las variantes de glicosilación ácida-siálica exhiben una vida media mayor en el plasma, pero una menor biopotencialidad que sus contrapartes ácidas (Ulloa-Aguirre y col., 1992; Cerpa-Poljak y col., 1993; Zambrano y col., 1996). La distribución y el contenido del ácido siálico negativamente cargado distingue a las isoformas de FSH sobre la base de su punto isoeléctrico (Wide 1989; Ulloa-Aguirre y col., 1984).

Se ha comunicado en ratas machos un movimiento hacia las isoformas más ácidas, en paralelo con un gradual aumento de los niveles de andrógenos circulantes (Ulloa-Aguirre y col., 1986). La ausencia de testículo o la administración de antiandrógenos incrementaron la proporción de algunas de las isoformas menos ácidas (Ulloa-Aguirre y col., 1986; Simoni y col., 1992; Campo y col., 2007). Se han documentado cambios en la bioactividad de la FSH y en el contenido de ácido siálico en la pubertad masculina (Phillips y col., 1997; Olivares y col., 2004; Campo y col., 2007), aunque algunas diferencias en los resultados podrían ser debidas a las diversas metodologías utilizadas en la separación de las isoformas de FSH. Wide (1989) documentó que las isoformas pituitarias de hombres adultos fueron más ácidas que las observadas en jóvenes en etapa puberal.

El diseño experimental (Ambao y col., 2009) se preparó para investigar la heterogeneidad molecular de la FSH, la expresión de las sialiltransferasas (ST6Gal I - ST3Gal III) y analizar los cambios morfológicos en la población

the sialyltransferase according to reports by Damián-Matsumura et al. (1999) in female rat pituitaries.

FSH is synthesized in multiple molecular isoforms that differ in the oligosaccharides that are necessary for the expression of the biologic activity of the hormone (Chappel et al., 1983; Dahl and Stone, 1992; Ulloa-Aguirre et al., 1999 and 2001). The predominance of FSH isoforms that present completely processed oligosaccharides may contribute to the development and maintenance of the function of the seminiferous epithelium (Campo et al., 2007).

The terminal sialic acid determines the percentage of metabolic depuration of the FSH molecule and its bond to the receptor (Wide, 1986; Cerpa-Poljak et al., 1993). It is known that the variations of *glycosylation of sialic acid* exhibit a higher half-life in plasma, but lower biopotentiality than acidic-sialic counterparts (Ulloa-Aguirre et al., 1992; Cerpa-Poljak et al., 1993; Zambrano et al., 1996). The distribution and content of negatively charged sialic acid distinguishes FSH isoforms on the basis of their isoelectric point (Wide 1989; Ulloa-Aguirre et al., 1984).

A movement towards the most acidic isoforms has been reported in male rats, with a parallel gradual increase of circulating androgen levels (Ulloa-Aguirre et al., 1986). The absence of testicles or the administration of antiandrogens incremented the proportion of some of the less acidic isoforms (Ulloa-Aguirre et al., 1986; Simoni et al., 1992; Campo et al., 2007). Changes have been reported in the bioactivity of FSH and in the sialic acid content in male puberty (Phillips et al., 1997; Olivares et al., 2004; Campo et al., 2007), although some differences in results might be caused by the different methodologies to separate FSH isoforms. Wide (1989) reported that pituitary isoforms from adult males were less acidic than those observed in youngsters in pubertal stage.

The experimental design (Ambao et al., 2009) was conceived to investigate the molecular heterogeneity of FSH, the expression of the sialyltransferases, (ST6Gal I - ST3Gal III) and to analyze the morpho-

gonadotropina durante el desarrollo sexual y la castración (Cx) en ratas machos. Se pretendió determinar si la ausencia de testículo afecta el grado de sialilación y el procesamiento de los oligosacáridos presentes en la FSH hipofisaria, así como la actividad y la expresión génica de las sialiltransferasas.

La **tabla 1** muestra el contenido pituitario y los niveles séricos de FSH en animales machos controles y castrados. Se ven diferencias significativas ($p < 0.01$) en los grupos Cx₅, Cx₁₀ y Cx₂₀ días respecto a los controles. Se registró un incremento significativo ($p < 0.01$) en el contenido pituitario y en los niveles séricos de FSH en ratas de 23 días, comparadas con ratas de 15 y 60 días. Un descenso transitorio del contenido de FSH pituitaria fue detectado después de 2 y 5 días de la castración, con un aumento más marcado en los animales adultos intactos después de más largos períodos de castración (Ambao y col., 2007 y 2009).

Tabla 1. Contenido pituitario y niveles séricos de FSH durante el desarrollo sexual y luego de diferentes períodos de castración (Cx) en animales adultos

Grupos	FSH pituitaria (ng/mg glándula)	FSH sérica (ng/ml)
Control 15 días	75.1 ± 2.0	4.0 ± 0.4
Control 23 días	296.0 ± 32.4	9.2 ± 1.0
Control 60 días	244.3 ± 16.8 ^a	6.6 ± 1.2 ^a
Cx ₂	131.2 ± 9.6 ^b	15.9 ± 0.7 ^b
Cx ₅	120.5 ± 8.7 ^b	16.4 ± 1.0 ^{b,c}
Cx ₁₀	212.3 ± 31.1 ^a	19.6 ± 0.8 ^{c,d}
Cx ₂₀	244.7 ± 32.8 ^a	21.5 ± 1.3 ^d

Los datos son expresados como promedio ± ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

Se halló una relativa abundancia de isoformas de carga de la FSH en los diferentes estadios del desarrollo sexual. La FSH inmunorreactiva fue detectada en 11 fracciones del gradiente de pH. La carga de isoformas de FSH fue aislada dentro del rango de pH 2.17-6.39 en todas las condiciones

logical changes in the gonadotrope population during sexual development and male rat castration (Cx). It was expected to determine if the absence of testicles affects the degree of sialylation and the processing of the oligosaccharides present in the pituitary FSH, as well as the activity and gene expression of the sialyltransferases.

Table 1 shows the pituitary content and the serum levels of FSH in castrated and control male animals. Significant differences ($p < 0.01$) can be seen in groups Cx₅, Cx₁₀ and Cx₂₀ days compared to controls. A significant increment in ($p < 0.01$) was reported in the pituitary content and in the FSH serum levels in 23-day-old rats, compared to 15- and 60-day-old animals. A temporary decrease of pituitary FSH content was detected after 2 and 5 days of castration, with a more marked increase in intact adult males after longer periods of castration (Ambao et al., 2007 and 2009).

Table 1. Pituitary content and FSH serum levels in control and castrated (Cx) animals during sexual development

Groups	Pituitary FSH (ng/mg gland)	Serum FSH (ng/ml)
Control 15 days	75.1 ± 2.0	4.0 ± 0.4
Control 23 days	296.0 ± 32.4	9.2 ± 1.0
Control 60 days	244.3 ± 16.8 ^a	6.6 ± 1.2 ^a
Cx ₂	131.2 ± 9.6 ^b	15.9 ± 0.7 ^b
Cx ₅	120.5 ± 8.7 ^b	16.4 ± 1.0 ^{b,c}
Cx ₁₀	212.3 ± 31.1 ^a	19.6 ± 0.8 ^{c,d}
Cx ₂₀	244.7 ± 32.8 ^a	21.5 ± 1.3 ^d

These data are expressed as mean ± S.E.M. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).

A relative abundance of load isoforms of FSH was found in the different stages of sexual development. Immunoreactive FSH was detected in 11 fractions of pH gradient. The charge of isoforms was isolated within the 2.17-6.39 pH range in all the experimental condi-

experimentales estudiadas. Las variaciones fueron halladas con la edad: en ratas de 15 días, 40 % ± 3 del total recuperado fue aislado dentro de un rango de pH 4.10-4.69 ($p < 0.05$) y en ratas de 23 días, se detectaron similares proporciones dentro de un rango de pH de 3.80-4.69.

En la **tabla 2** y la **fig. 14.1** se presentan los datos correspondientes a los diferentes tiempos de castración sobre el perfil de distribución de análogos de carga de la FSH.

Tabla 2. Efectos de los diferentes períodos de castración sobre el perfil de distribución de las cargas de las isoformas de FSH

Grupos	Proporción predominante de FSH	% FSH a pH < 3.2	% FSH a pH > 5.0
Intacto	24.8 ± 1.8 % (pH= 3.80-4.09)	14.8 ± 0.6 % ^a	7.9 ± 0.8 % ^a
Cx ₂	55.8 ± 0.4 % (pH= 4.10-4.69)	3.6 ± 2.2 % ^b	9.2 ± 2.6 % ^a
Cx ₅	35.9 ± 1.7 % (pH= 4.40-4.69)	5.8 ± 1.5 % ^b	8.8 ± 2.1 % ^a
Cx ₁₀	38.9 ± 2.5 % (pH= 4.40-4.69)	1.5 ± 0.3 % ^b	16.8 ± 0.5 % ^b
Cx ₂₀	31.1 ± 0.6 % (pH= 4.40-4.69)	3.9 ± 0.3 % ^b	14.8 ± 1.0 % ^b

Los datos son expresados como promedio ± ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

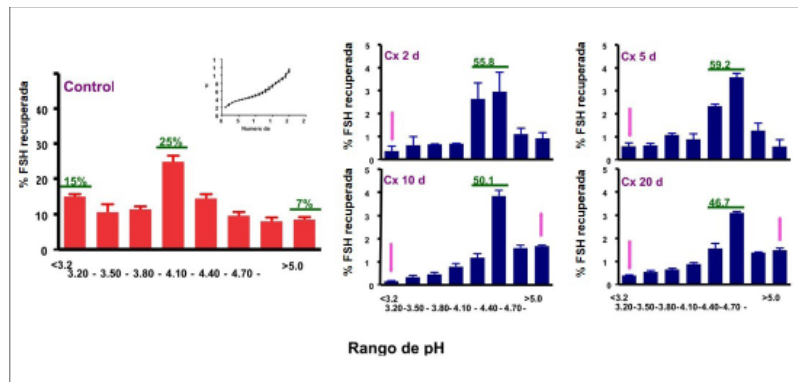


Fig. 14.1. Efecto del tiempo de castración sobre la distribución de las cargas de isoformas de FSH dentro de intervalos de pH (unidades de 0.29) (Ambao y col., 2007).

tions studied. The variations were found to be age-related. In 15-day-old rats, 40± 3% from the total recovered was isolated within a range of 4.10-4.69 pH ($p < 0.05$). In 23-day-old rats, similar proportions were detected within a range of 3.80-4.69 pH.

In **table 2** and **fig. 14.1** the data belonging to the different castration times of the distribution profile of FSH charge analogues were presented.

Table 2. Effects of the different periods of castration on the distribution profile of FSH charge analogues

Groups	Proportion of predominant FSH	% FSH to pH < 3.2	% FSH to pH > 5.0
Intact	24.8 ± 1.8 % (pH= 3.80-4.09)	14.8 ± 0.6 % ^a	7.9 ± 0.8 % ^a
Cx ₂	55.8 ± 0.4 % (pH= 4.10-4.69)	3.6 ± 2.2 % ^b	9.2 ± 2.6 % ^a
Cx ₅	35.9 ± 1.7 % (pH= 4.40-4.69)	5.8 ± 1.5 % ^b	8.8 ± 2.1 % ^a
Cx ₁₀	38.9 ± 2.5 % (pH= 4.40-4.69)	1.5 ± 0.3 % ^b	16.8 ± 0.5 % ^b
Cx ₂₀	31.1 ± 0.6 % (pH= 4.40-4.69)	3.9 ± 0.3 % ^b	14.8 ± 1.0 % ^b

Data: mean ± SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).

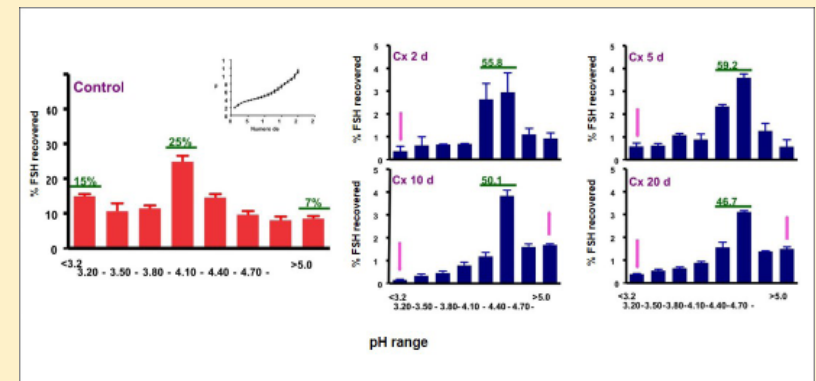


Fig. 14.1. Effect of the time of castration on the distribution profile of pituitary FSH charge within pH ranges (units of 0.29) (Ambao et al., 2007).

La hormona se aisló en una proporción predominante en el intervalo de pH 3.80-4.09 y se observó una buena proporción de FSH en el extremo final de gradiente de pH. Luego de la castración se ve un corrimiento de la proporción predominante de la FSH a valores más altos de pH y una disminución significativa ($p < 0.05$) de la FSH aislada a pH < 3.20 . A los 10 días de Cx se registró un aumento significativo ($p < 0.01$) de la proporción de análogos de carga aislados a pH 4.40-4.69 (fig. 14.1).

En la fig. 14.2 se muestra el efecto del tiempo de castración sobre la expresión génica de ST3Gal III y ST6Gal I en hipófisis de ratas machos adultas. En la castración, la proporción predominante de cargas de isoformas de FSH se movió hacia el pH menos ácido después de 5 días C_x. No hubo mayores cambios en este parámetro después de largos períodos de castración. En C_{x2}, hubo descenso significativo de la proporción de hormona altamente dializada y un descenso significativo en la expresión de ARNm de la ST6Gal I. En C_{x5}, C_{x10} y C_{x20} hubo un progresivo descenso en el contenido de ácido siálico de la hormona, asociado con un incremento en la expresión de ARNm de la ST6Gal I, mientras el ARNm de la ST3Gal III permaneció inalterable.

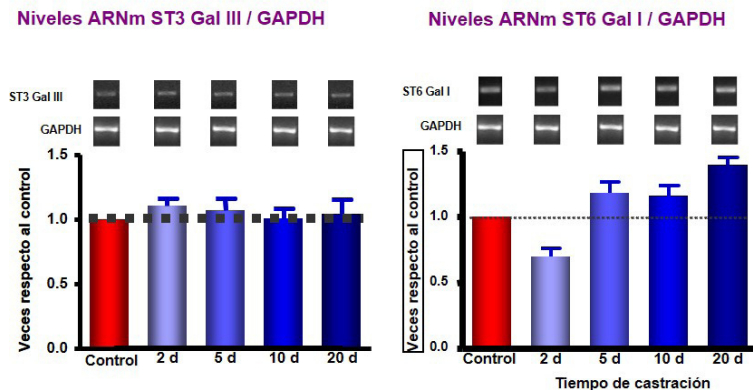


Fig. 14.2. Efecto de la castración sobre la expresión génica de ARNm ST3Gal III y ST6Gal I después de 2, 5, 10 o 20 días de la cirugía. Los datos son expresados \pm ES, $p < 0.05$ (Ambao y col., 2007).

The hormone was isolated in predominant proportion in the 3.80-4.09 pH interval and considerable proportion of FSH was observed at the lower end of the pH gradient. After castration there is a shift of the predominant proportion of FSH to higher values of pH and to a significant decrease ($p < 0.05$) of isolated FSH to pH < 3.20 . At day 10 of Cx a significant increase ($p < 0.01$) of the proportion of isolated charge analogues to pH 4.40-4.69 was recorded (fig. 14.1).

In fig. 14.2 the effect of the time of castration on the gene expression of ST3Gal III and ST6Gal I can be seen in pituitaries of adult male rats. In castration, the predominant proportion of FSH charge isoforms shifted to the less acidic pH after 5 days of C_x. No substantial changes were found in this parameter after long periods of castration. In C_{x2}, there was a significant decrease of the proportion of highly dialyzed hormone and a significant decrease in the expression of mRNA of ST6Gal. In C_{x5}, C_{x10} and C_{x20} the hormone content of sialic acid decreased progressively, which was associated to an increased mRNA expression of ST6Gal I, whereas mRNA of ST3Gal III remained unalterable.

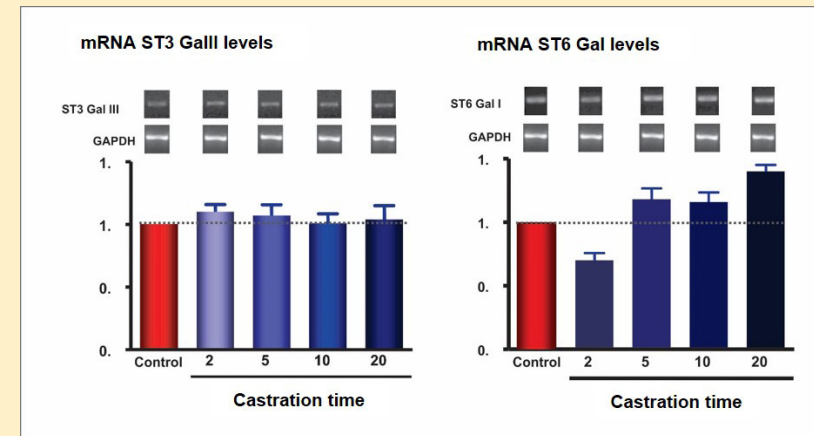


Fig. 14.2. Effect of the time of castration on mRNA levels of ST3Gal III and ST6Gal I gene expression in pituitaries of intact adult males (Ambao et al., 2007).

Se hallaron glicofomas de FSH: **a.** No unidas; **b.** Firmemente unidas (FU), portando cadenas de carbohidratos truncados; **c.** Sólidamente unidas (SU) portando cadenas de carbohidratos truncados; **d.** Firmemente unidas portando oligosacáridos de tipo híbrido y manosa.

Se observó un predominio de las glicofomas de FSH portando oligosacáridos de tipo complejo (FU: $44\% \pm 6.2$ y SU: $30.5\% \pm 5.8$) en las ratas adultas intactas. Después de 2, 5, 10 y 20 días de Cx hubo un significativo descenso en la proporción de glicofomas de FSH portando oligosacáridos triantennarios y bisecados, con un incremento en la proporción de glicofomas de FSH portando oligosacáridos incompletos de tipo híbrido. La castración no modificó la abundancia de glicofomas de FSH con carbohidratos truncados (Ambao y col., 2009).

A fin de clarificar los resultados discordantes hallados entre el grado de sialilación de la FSH y la expresión de ARNm de la ST6Gal I, se usaron anticuerpos específicos para analizar la expresión de ambas sialiltransferasas a nivel pituitario. La inmunomarcación permitió distinguir células folículo tropas vacuoladas con un patrón citoplasmático granular difuso ocre (cromógeno DAB). En la **fig. 14.3** se observan las inmunomarcaciones anti-FSH en ratas macho castradas a los 2, 5, 10 y 20 días.

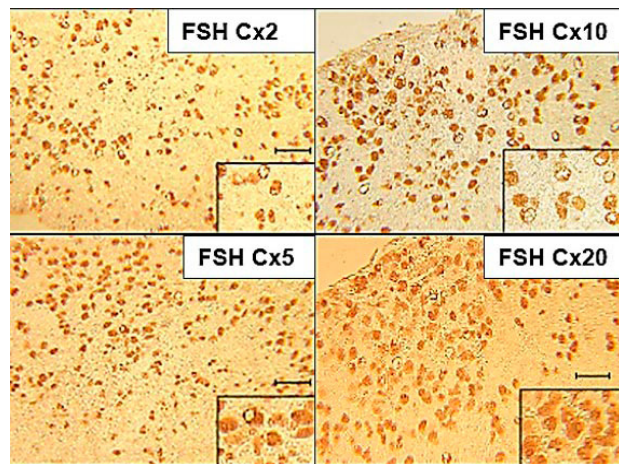


Fig. 14.3. Inmunohistoquímica (IHQ) de ratas machos castrados (Cx2, Cx5, Cx10 y Cx20) (EnVision peroxidasa, anti-FSH, x 300) (Ambao y col., 2007).

Glycoforms of FSH were found: **a.** Unbound; **b.** Firmly bound (FB) bearing truncated carbohydrate chains; **c.** Solidly bound (SB) bearing truncated carbohydrate chains; **d.** Firmly bound bearing hybrid-type oligosaccharides and mannose.

In intact adult rats a clear predominance of FSH glycoforms bearing complex-type oligosaccharides (FB: $44\% \pm 6.2$ and SB: $30.5\% \pm 5.8$) was observed. After 2, 5, 10 and 20 days of Cx a significant decrease in the proportion of FSH glycoforms bearing triantennary and bisecting oligosaccharides with a concomitant increase in the proportion of FSH glycoforms bearing incomplete, hybrid-type oligosaccharides was observed. Castration did not modify the abundance of FSH glycoforms with truncated carbohydrates (Ambao et al., 2009).

In order to clarify the contrasting results found between the sialylation degree of FSH and the expression of ST6Gal I mRNA, specific antibodies were used to analyze the expression of both sialyltransferases at pituitary level. Immunohistochemistry allowed distinguishing vacuolated folliculotropes with an ochre diffuse granular cytoplasmic pattern (DAB chromogen).

In **Fig. 14.3** immunostained anti-FSH are seen in male rats castrated at 2, 5, 10 and 20 days.

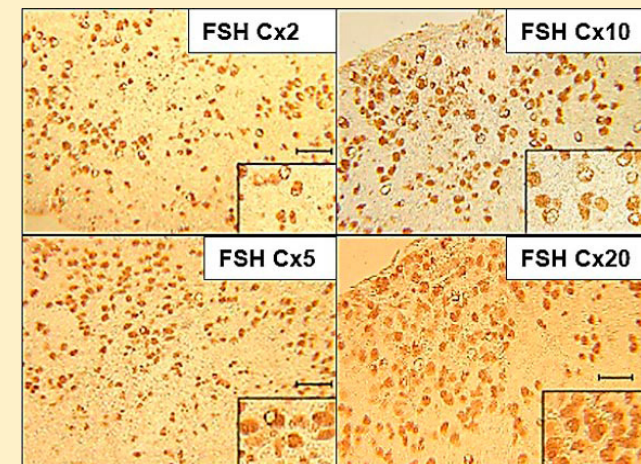


Fig. 14.3. Immunohistochemistry of castrated male rats (Cx2, Cx5, Cx10 and Cx20) (EnVision peroxidase, anti-FSH, x 300) (Ambao et al., 2007).

Los estudios inmunohistoquímicos morfométricos registraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la densidad de células (DC) y en la densidad de volumen (DV), luego de los 5 días de castración (Cx_5) respecto a animales intactos.

La morfometría de las sialiltransferasas ST3Gal III y ST6Gal I mostró un significativo ($p < 0.05$) incremento en la DV y DC después Cx_5 respecto al grupo adulto intacto (tabla 3).

Tabla 3. Morfometría de la población foliculotropa en ratas machos adultas intactas y castradas (Cx)

Grupo experimental	FSH DV ($\times 10^{-2}$)	FSH DC ($\times 10^{-4}$)	ST3Gal III DV ($\times 10^{-3}$)	ST6Gal I DV ($\times 10^{-3}$)
Intacto	7.2 \pm 0.2 ^a	5.7 \pm 0.1 ^a	5.2 \pm 0.4 ^a	7.1 \pm 0.1 ^a
Cx_2	8.0 \pm 0.1 ^a	6.5 \pm 0.1 ^b	5.5 \pm 0.4 ^a	4.6 \pm 0.1 ^b
Cx_5	11.2 \pm 0.6 ^b	7.3 \pm 0.1 ^b	5.6 \pm 0.2 ^a	9.3 \pm 0.3 ^c
Cx_{10}	11.8 \pm 1.1 ^b	7.0 \pm 0.3 ^b	6.2 \pm 1.2 ^a	10.9 \pm 1.2 ^c
Cx_{20}	17.1 \pm 0.6 ^c	9.3 \pm 0.3 ^c	6.8 \pm 0.6 ^a	14.2 \pm 0.8 ^c

Los datos son expresados como promedio \pm ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$). DV = Σ de áreas celulares/área de referencia; DC = número de células /área de referencia; área de referencia: total del área de medición (Ambao y col., 2009).

El patrón de inmunomarcación de cada enzima fue diferente. La ST3Gal III no reveló diferencias marcadas entre los grupos estudiados, mientras la ST6Gal I mostró un descenso luego de Cx_2 al comparar con los controles, seguido de un incremento en la intensidad de tinción a lo largo del período de castración ($p < 0.05$). La cantidad de gránulos citoplasmáticos positivos fue mayor en ST6Gal I respecto a ST3Gal III (fig. 14.4).

Nuestros resultados (Ambao y col., 2007 y 2009) confirmaron estudios previos (Foulds y Robertson, 1983; Glum et al., 1985; Ulloa-Aguirre y col., 1986; Yarema y Bertozzi, 2001) que demostraron un movimiento de la glicosilación de la FSH hacia isoformas más ácidas o dializadas, con un significativo incremento en los niveles circulantes de

The immunohistochemical morphometric studies revealed a significant increase ($p < 0.05$) was reported in the cell density (CD) and volume density (VD), after 5 days of castration with respect to intact animals.

The morphometry of the sialyltransferases ST3Gal III and ST6Gal I showed a significant increase ($p < 0.05$) in VD and CD after Cx_5 with respect to the intact adult group (table 3).

Table 3. Morphometry of folliculotropes in adult male intact and castrated rats

Group	FSH VD ($\times 10^{-2}$)	FSH CD ($\times 10^{-4}$)	ST3Gal III VD ($\times 10^{-3}$)	ST6Gal I VD ($\times 10^{-3}$)
Intact	7.2 \pm 0.2 ^a	5.7 \pm 0.1 ^a	5.2 \pm 0.4 ^a	7.1 \pm 0.1 ^a
Cx_2	8.0 \pm 0.1 ^a	6.5 \pm 0.1 ^b	5.5 \pm 0.4 ^a	4.6 \pm 0.1 ^b
Cx_5	11.2 \pm 0.6 ^b	7.3 \pm 0.1 ^b	5.6 \pm 0.2 ^a	9.3 \pm 0.3 ^c
Cx_{10}	11.8 \pm 1.1 ^b	7.0 \pm 0.3 ^b	6.2 \pm 1.2 ^a	10.9 \pm 1.2 ^c
Cx_{20}	17.1 \pm 0.6 ^c	9.3 \pm 0.3 ^c	6.8 \pm 0.6 ^a	14.2 \pm 0.8 ^c

Results are shown as mean \pm SEM. VD: volume density: Σ cell area/reference area; CD: cell density = number of cells/reference area; reference area: total area throughout which the cells were scored. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$) (Ambao et al., 2009).

The immunostaining pattern for each enzyme was different. No marked differences were evidenced by ST3Gal III between both groups studied, whereas ST6Gal I evidenced a decrease after Cx_2 when comparing controls, followed by an increased staining intensity throughout the castration period ($p < 0.05$). The amount of positive cytoplasmic granules for ST6Gal I was higher than the one observed in ST3Gal III (fig. 14.4).

Our results (Ambao et al., 2007 and 2009) confirmed previous studies (Foulds and Robertson, 1983; Glum et al., 1985; Ulloa-Aguirre et al., 1986; Yarema and Bertozzi, 2001) that demonstrated that a shift of FSH glycosylation to more acidic or dialyzed isoforms, with significantly increased in the circulating levels of androgens in intact adult animals. The charge distribution profile of FSH isoforms

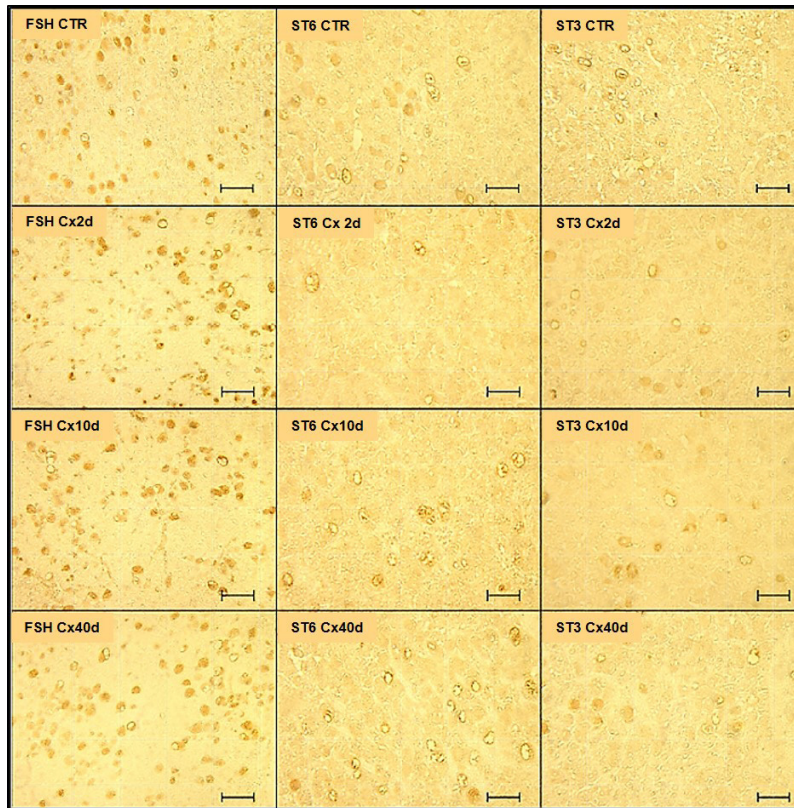


Fig. 14.4. Campos representativos de IHQ con FSH, ST5Gal I y ST3 Gal III en pituitaria de ratas machos adultos intactas y castradas (Cx₂, Cx₁₀ y Cx₄₀ días). (EnVision peroxidasa: anti-FSH, anti-ST5Gal I, anti-ST3Gal III, x 400). Barras: FSH: 60 μ m, ST: 35 μ m (Ambao y col., 2009).

los andrógenos en animales adultos intactos. La distribución del perfil de las isoformas de carga de la FSH se reflejó en dos aspectos: en primer término, el intervalo de pH conteniendo la proporción predominante de FSH devino estrecho y más ácido, y en segundo lugar, hubo un significativo aumento en la abundancia de la FSH recuperada en el extremo de menor gradiente de pH (pH < 3.20) en animales adultos. Dichos datos sugieren que las isoformas menos ácidas (alta biopotencialidad y vida

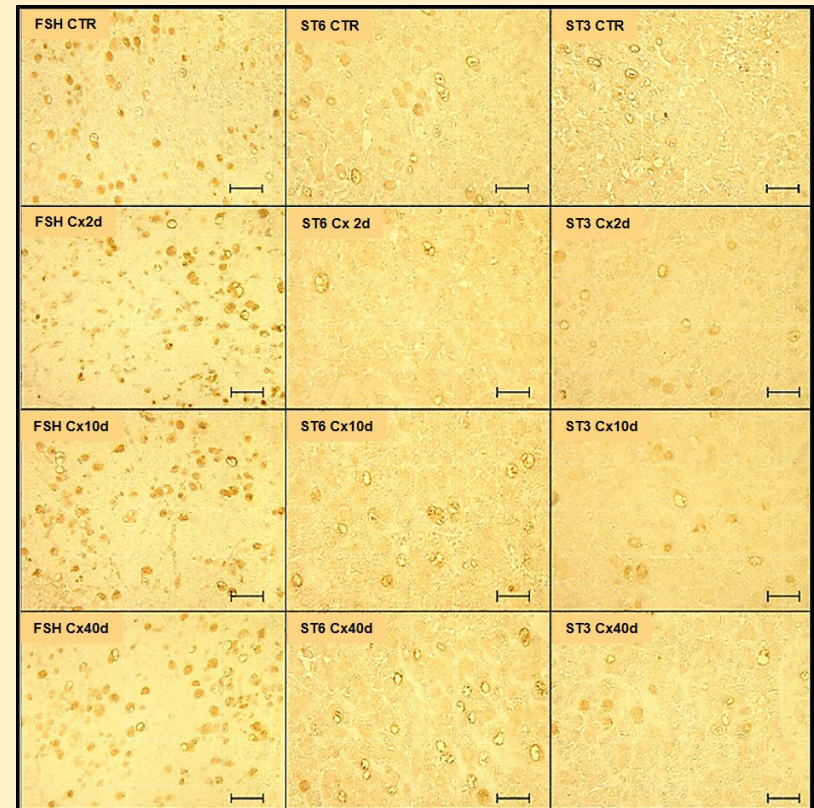


Fig. 14.4. Representatives fields of IHQ with FSH, ST6Gal I and ST3 Gal III in rat pituitaries of adult male intact and castrated (Cx₂, Cx₁₀ y Cx₄₀ days) (EnVision peroxidase, anti-FSH, anti-ST5Gal I, anti-ST3Gal III, Bars: FSH: 60 μ m, ST: 35 μ m x 400) (Ambao et al., 2009).

was reflected in two aspects: firstly, the pH interval containing the predominant proportion of FSH became limited and more acidic, and secondly, there was a significant increase in the abundance of FSH recovered in the lower gradient end of pH (pH < 3.20) in adult animals. These data suggest that the less acidic isoforms (high biopotentiality and short half-life) may send a more intense gonadotropic signal in the testicles, necessary for the proliferation of Sertoli cells.

media corta) pueden proveer una señal gonadotrófica más intensa en los testículos, necesaria para la proliferación de las células de Sertoli. La espermatogénesis necesitaría una mayor sialización cuando se completa el desarrollo sexual.

Además, los niveles séricos de testosterona declinaron luego del nacimiento, con valores mínimos a los 20-21 días y comenzaron a aumentar después de los 35 días, disminuyendo después de la castración y llegando a valores máximos después de los 20 días ($p < 0.01$). Dichos datos en el contenido pituitario de FSH y en los niveles séricos estuvieron en concordancia con los valores registrados por Winters y Moore (2004). La posibilidad de que los andrógenos influyan la glicosilación de la FSH a nivel pituitario deviene de la actividad de la ST6Gal I directamente a nivel de las gonadotropas o indirectamente a través de cambios en la secreción de GnRH hipotalámica. Los andrógenos influenciarían la glicosilación y el tratamiento con testosterona llevaría a cambios en el perfil de distribución de las cargas de FSH intrapituitaria (Sharma y col., 1990). Además, la exposición a este esteroide en las células pituitarias en cultivo aumenta la proporción relativa de las formas dializadas de la FSH secretada (Kennedy y Chappel, 1985).

Es difícil de explicar por qué la expresión de ARNm de la ST3Gal III no cambia durante la maduración sexual y después de la orquidectomía, considerando que en las ratas hembras la expresión del ARNm está regulada mediante hormonas (Damian-Matsumura y col., 1999). Una posibilidad es la existencia de múltiples promotores para la ST6Gal I, pero no para la ST3Gal III (Taniguchi y col., 2003 y 2008).

El progresivo aumento de sialilación de la FSH observado durante el desarrollo sexual estuvo asociado con un incremento en la expresión de ARNm de la ST6Gal I en la glándula pituitaria, alcanzando niveles máximos en animales adultos. Contrariamente, la expresión de ARNm de la ST3Gal III se mantuvo sin cambios. Las variaciones en el patrón secretorio de la GnRH y en el número de sus receptores en la glándula pituitaria (Chan et al., 1981; Zapatero-Caballero et al., 2003) y/o el incremento en la producción de testosterona, inducido por la activación

Spermatogénesis would need a higher sialylation when sexual development is completed.

Also, testosterone serum levels declined after birth, with minimum values at days 20-21 and started to increase after day 35, decreasing after castration and reaching maximum levels after day 20 ($p < 0.01$). These data in FSH pituitary content and in serum levels were in agreement with the values reported by Winters and Moore (2004). The possibility that androgens affect FSH glycosylation at pituitary level derives from ST6Gal I activity directly at the level of the gonadotropesor indirectly mediated by the changes in the secretion of hypothalamic GnRH. Androgens would influence glycosylation and the treatment with testosterone would lead to changes in the charge distribution profile of intrapituitary FSH (Sharma et al., 1990). Also, exposition to this steroid in the pituitary cells in culture increases the relative proportion of dialyzed forms of secreted FSH (Kennedy and Chappel, 1985).

It is difficult to express why the expression ST3Gal III mRNA does not change with sexual maturation and after orchietomy, considering that in female rats the expression of mRNA is regulated by hormones (Damian-Matsumura et al., 1999). Possibly, the existence of promoters for ST6Gal I is multiple, but it is not so for ST3Gal III (Taniguchi et al., 2003 and 2008).

The progressive increase of sialylation of FSH observed during sexual development was associated to an increase in the expression of ST6Gal I mRNA in the pituitary gland, reaching maximum levels in adult animals. On the contrary, the expression of ST3Gal III mRNA remained unchanged. The variations in the GnRH secretory pattern and in the number of receptors in the pituitary gland (Chan et al., 1981; Zapatero-Caballero et al., 2003) and/or the increase in testosterone production induced by the activation of the hypothalamo-pituitary-testicular axis, might be responsible for the increase observed in the structural variants of FSH, as well as the expression of ST6Gal I mRNA during the sexual development.

del eje hipotálamo-pituitario-testicular, podrían ser responsables del aumento observado en las variantes estructurales de la FSH, así como en la expresión de ARNm de la ST6Gal I durante el desarrollo sexual.

La ausencia de sustancias apropiadas en cantidades suficientes y la sialilación de los sustratos híbridos podría ser la razón por la que la acción de la ST6Gal I no estuvo reflejada en la producción de glicofomas fuertemente sializadas (Dalpathado y col, 2006). La ausencia de gónadas indujo un rápido descenso de la proporción de glicofomas portadoras de oligosacáridos triantennarios, con un aumento concomitante de la proporción de las glicofomas incompletas con oligosacáridos híbridos. Esto se debería a que este tipo de carbohidrato no puede ser totalmente procesado por las cisternas del Golgi, debido a la ausencia de un apropiado grado de ramificación de los residuos de ácido siálico (Roth y col., 1985). El efecto de la castración en la complejidad de los oligosacáridos de la FSH ha sido previamente comunicado por Rully y col. (2003). Además, los andrógenos y antiandrógenos actuarían provocando cambios en la actividad inmunológica y biológica de las isoformas de FSH y en la población gonadotropa de ratas machos prepuberales (Rully y col., 1995; 1996 y 1999; Cónsole y col, 1999 y 2001).

Concluyendo, la castración afecta el grado de complejidad de las cadenas carbohidratadas de la FSH y condiciona el posterior agregado de ácido siálico, no permitiendo que una sialittransferasa específica controle el grado de sialilación. Debido a que la expresión de ST6 Gal I fue mayor que la ST3 Gal III en todas las condiciones experimentales, se sugiere que en las ratas machos la abundancia de isoformas de FSH con ácido siálico unido estaría regulada por factores hormonales que determinarían un posible dimorfismo sexual en el proceso de glicosilación.

Referencias

Ambao V, Carino M, Cónsole GM, Rulli S, Calandra RS, Campo S. Efecto del tiempo de castración sobre el grado de sialilación y complejidad

The absence of the proper substances in enough amounts and the sialylation of the hybrid substrates might be the reason why the action of ST6Gal I was not reflected in the production of glycoforms firmly sialylated (Dalpathado et al, 2006). The absence of gonads induced a rapid decrease of the proportion of glycoforms bearing triantennary oligosaccharides, with a concomitant increase of the proportion of the incomplete glycoforms with hybrid oligosaccharides. This would result from the impossibility of this type of carbohydrate to be totally processed by the Golgi cisternae, due to the absence of an appropriate degree of ramification of residues of sialic acid (Roth et al., 1985). The effect of castration on the complexity of FSH oligosaccharides has been previously reported by Rully et al. (2003). Also, androgens and antiandrogens would cause changes in the immunologic and biologic activity of FSH isoforms and in the gonadotrope population of prepubertal male rats (Rully et al., 1995; 1996 and 1999; Cónsole et al, 1999 and 2001).

To conclude, castration affects the degree of the complexity of FSH carbohydrate chains and conditions the subsequent addition of sialic acid preventing specific sialyltransferase from control the degree of sialylation. Since the expression of ST6Gal I was higher than that of ST-3Gal III under all the experimental conditions, it is suggested that in male rats, the abundance of FSH isoforms with bound sialic acid would be regulated by hormonal factors that would determine a possible sexual dimorphism in the glycosylation process.

References

Ambao V, Carino M, Cónsole GM, Rulli S, Calandra RS, Campo S. Efecto del tiempo de castración sobre el grado de sialilación y complejidad del carbohidrato de FSH hipofisaria en rata macho. *Medicina* 2007; 67 (supl III):74.

- del carbohidrato de FSH hipofisaria en rata macho. *Medicina* 2007; 67 (supl III):74.
- Ambao V, Rulli SB, Carino MH, Cónsole GM, Ulloa-Aguirre A, Calandra RS, Campo S. Hormonal regulation of pituitary FSH sialylation in male rats. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 309(1-2):39-47.
- Ambao V, Ulloa-Aguirre A, Rulli S, Calandra RS, Campo S. Regulación hormonal del poliformismo de FSH: actividad y expresión génica de sialiltransferasas. *Medicina* 2005; 65, II R20.
- Blum WF, Riegelbauer G, Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on in-vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J Endocrinol* 1985; 105(1):17-27.
- Campo S, Ambao V, Creus S, Gottlieb S, Fernandez Vera G, Benencia H, Bergadá C. Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260:197-204.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology* 1993; 132(1):351-356.
- Chan V, Clayton RN, Knox G, Catt KJ. Ontogeny of pituitary GnRH receptors in the rat. *Endocrinology* 1981; 108(6):2086-92.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1983; 28(1):196-205.
- Dahl KD, Stone MP. FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl* 1992; 13(1):11-22.
- Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR, Desaire H. Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry* 2006; 45(28):8665-73.
- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. Oestrogens regulate pituitary α 2-3-
- Ambao V, Rulli SB, Carino MH, Cónsole GM, Ulloa-Aguirre A, Calandra RS, Campo S. Hormonal regulation of pituitary FSH sialylation in male rats. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 309(1-2):39-47.
- Ambao V, Ulloa-Aguirre A, Rulli S, Calandra RS, Campo S. Regulación hormonal del poliformismo de FSH: actividad y expresión génica de sialiltransferasas. *Medicina* 2005; 65, II R20.
- Blum WF, Riegelbauer G, Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on in-vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J Endocrinol* 1985; 105(1):17-27.
- Campo S, Ambao V, Creus S, Gottlieb S, Fernandez Vera G, Benencia H, Bergadá C. Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260:197-204.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology* 1993; 132(1):351-356.
- Chan V, Clayton RN, Knox G, Catt KJ. Ontogeny of pituitary GnRH receptors in the rat. *Endocrinology* 1981; 108(6):2086-92.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1983; 28(1):196-205.
- Dahl KD, Stone MP. FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl* 1992; 13(1):11-22.
- Dalpathado DS, Irungu J, Go EP, Butnev VY, Norton K, Bousfield GR, Desaire H. Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry* 2006; 45(28):8665-73.
- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. Oestrogens regulate pituitary α 2-3-

sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 1999; 23(2):153-165.

Foulds LM, Robertson DM. Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone for male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 31(1):117-130.

Helton TE, Magner JA. Beta-1-4-galactosyltransferase and alpha-mannosidase-II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Endocrinology* 1994a; 135(5):1980-85.

Helton TE, Magner JA. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 1994b; 134(6):2347-53.

Kennedy J, Chappel S. Direct pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno- and radioreceptor assay. *Endocrinology* 1985; 116(2):741-748.

Olivares A, Soderlund D, Castro-Fernández C, Zariñán T, Zambrano E, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Basal and gonadotropin releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution and in vitro biological-to-immunological ratio in male puberty. *Endocrine* 2004; 23(2-3):189-198.

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9):3103-06.

Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC. Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* 1985; 43(1):287-295.

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 1996; 63(6):514-521.

sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 1999; 23(2):153-165.

Foulds LM, Robertson DM. Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone for male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 31(1):117-130.

Helton TE, Magner JA. Beta-1-4-galactosyltransferase and alpha-mannosidase-II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Endocrinology* 1994a; 135(5):1980-85.

Helton TE, Magner JA. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 1994b; 134(6):2347-53.

Kennedy J, Chappel S. Direct pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno- and radioreceptor assay. *Endocrinology* 1985; 116(2):741-748.

Olivares A, Soderlund D, Castro-Fernández C, Zariñán T, Zambrano E, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Basal and gonadotropin releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution and in vitro biological-to-immunological ratio in male puberty. *Endocrine* 2004; 23(2-3):189-198.

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9):3103-06.

Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC. Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* 1985; 43(1):287-295.

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. Immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.

Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS. Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular functions in prepubertal rats. *J Androl* 1995; 16(3):225-232.

Rulli SB, Zitta K, Calandra RS, Campo S. Effect of dihydrotestosterone on pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in adult male rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Neuroendocrinology* 2003; 78(5):280-286.

Sharma OP, Khan SA, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E. Effects of androgens on bioactivity and immunoreactivity of pituitary FSH in GnRH antagonist-treated male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122(2):168-174.

Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK, Nieschlag E. Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic androgen deprivation induced by castration or androgen blockade. *J Mol Endocrinol* 1992; 9(2):175-182.

Taniguchi A, Saito K, Kubota T, Matsumoto K. Characterization of the promoter region of the human Galbeta1,3(4) GlcNAc alpha2,3-sialyltransferase III (hST3Gal III) gene. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1626(1-3):92-96.

Taniguchi A. Promoter structure and transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 3-sialyltransferase genes. *Curr Drug Targets* 2008; 9(4):310-316.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A. Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 2000; 165(2):193-205.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 1992; 7(1):23-30.

hormone isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 1996; 63(6):514-521.

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.

Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS. Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular functions in prepubertal rats. *J Androl* 1995; 16(3):225-232.

Rulli SB, Zitta K, Calandra RS, Campo S. Effect of dihydrotestosterone on pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in adult male rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Neuroendocrinology* 2003; 78(5):280-286.

Sharma OP, Khan SA, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E. Effects of androgens on bioactivity and immunoreactivity of pituitary FSH in GnRH antagonist-treated male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122(2):168-174.

Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK, Nieschlag E. Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic androgen deprivation induced by castration or androgen blockade. *J Mol Endocrinol* 1992; 9(2):175-182.

Taniguchi A, Saito K, Kubota T, Matsumoto K. Characterization of the promoter region of the human Galbeta1,3(4) GlcNAc alpha2,3-sialyltransferase III (hST3Gal III) gene. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1626(1-3):92-96.

Taniguchi A. Promoter structure and transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 3-sialyltransferase genes. *Curr Drug Targets* 2008; 9(4):310-316.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A. Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 2000; 165(2):193-205.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. Biological characterization of the naturally

Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res* 2001; 32(6):520-532.

Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz-Sánchez V, Larrea F. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol* 1986; 110(3):539-549.

Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod* 1984; 30(2):382-387.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11(3):205-215.

Wide L. Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol (Copenh)* 1989; 123(3):519-529.

Wide L. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol* 1986; 112(3):336-344.

Winters SJ, Moore JP. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction* 2004; 128(1):13-23.

Yarema KJ, Bertozzi CR. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol* 2001; 2(5): reviews S0004.

Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(8):563-571.

Zapatero-Caballero H, Sánchez-Franco F, Guerra-Pérez N, Fernández-Méndez C, Fernández-Vázquez G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod* 2003; 68(5):1764-70.

occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 1992; 7(1):23-30.

Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res* 2001; 32(6):520-532.

Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz-Sánchez V, Larrea F. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol* 1986; 110(3):539-549.

Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod* 1984; 30(2):382-387.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11(3):205-215.

Wide L. Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol (Copenh)* 1989; 123(3):519-529.

Wide L. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol* 1986; 112(3):336-344.

Winters SJ, Moore JP. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction* 2004; 128(1):13-23.

Yarema KJ, Bertozzi CR. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol* 2001; 2(5): reviews S0004.

Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(8):563-571.

Zapatero-Caballero H, Sánchez-Franco F, Guerra-Pérez N, Fernández-Méndez C, Fernández-Vázquez G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod* 2003; 68(5):1764-70.

CAPÍTULO 15

Malnutrición: efectos sobre las poblaciones adenohipofisarias de monos (*saimiri sciureus boliviensis*)

El modelo experimental de malnutrición en monos (*Saimiri sciureus boliviensis*) permitió hacer una correlación entre la morfología de la pituitaria y el estudio longitudinal del crecimiento-desarrollo de los componentes neurocraneano-faciales, así como la longitud de los huesos largos, considerando la incidencia de los **factores intrínsecos** (edad, sexo, estructura corporal) y **extrínsecos** (nutrición, condiciones sociales, medio ambiente) (Pucciarelli y col., 1990; Oyhenart y Pucciarelli, 1992; Corner y Richtsmeier, 1992; Pucciarelli y Dressino, 1996; Dressino y Pucciarelli, 1997 y 1999; Pucciarelli y col., 2000).

La malnutrición afecta el crecimiento de: **A.** El complejo creaneofacial. **B.** El esplanocráneo. **C.** Los componentes medioneurales y respiratorios. La malnutrición influye en la forma del cráneo a través de la relación entre el componente ántero-neural y el neurocráneo (Pucciarelli y col., 1990) y afecta el crecimiento postdestete en tamaño, pero no cambia la forma en relación a la ortocefalización (Pucciarelli y Dressino, 1996).

CHAPTER 15

Undernourishment: effects on the adenohipophyseal populations of monkeys (*saimiri sciureus boliviensis*)

The experimental model of undernourishment in monkeys (*Saimiri sciureus boliviensis*) allowed to correlate the morphology of the pituitary gland and the longitudinal study of the growth and development of the neurocranial and facial components, as well as the long bone length, considering the incidence of **intrinsic** (age, sex, body structure) and **extrinsic** (nutrition, social conditions, environment) **factors** (Pucciarelli et al., 1990; Oyhenart and Pucciarelli, 1992; Corner and Richtsmeier, 1992; Pucciarelli and Dressino, 1996; Dressino and Pucciarelli, 1997; 1999; Pucciarelli and Dressino, 2000).

Undernourishment affects the growth of the following: **A.** The craniofacial complex. **B.** The *splanchnocranium*. **C.** Midneural and respiratory components. Undernourishment influences the shape of the cranium via the relationship between the anteroneural and neurocranial components (Pucciarelli et al., 1990) and affects post-weaning growth size but not the shape in relation to *orthocephalization* (Pucciarelli and Dressino, 1996).

El crecimiento longitudinal del mono ardilla joven (*Saimiri sciureus boliviensis*) sigue tres patrones: **1. Lineal simple:** longitud femoral de todos los grupos e índice pélvico de hembras malnutridas (la ecuación de regresión explica 95% de la variación). **2. Complejo lineal:** índice pélvico de controles y machos malnutridos e índices neurocraneal y faciales de todos los grupos. **3. Sin correlación con la edad:** índice neurofacial de hombres malnutridos e índice pélvico-femoral de hembras-machos malnutridos y mujeres (Pucciarelli y col., 2000).

La **heterocronía** es el estudio de los cambios evolutivos en las tasas relativas y marca el crecimiento-desarrollo. Ramírez Rozzi y col. (2005) sugieren que la heterocronía puede provenir del medio ambiente y no ser exclusivamente genética.

La secreción de hormonas hipofisarias se hace mediante mecanismos estimulatorios e inhibitorios, así como por la acción de agentes paracrinos intraglandulares. La privación de alimento disminuyó la somatostatina y la hormona liberadora de GH (GHRH) en las neuronas de la eminencia media hipotalámica y también redujo los niveles de ARNm para somatostatina, GHRH y GH (Brogan y col., 1997). Polkowska y col. (1996) detectaron que la restricción dietaria proteica crónica (8% en 20 semanas) en corderos hembras disminuyó el contenido hipotalámico de somatostatina y Hara y col. (1998), mostraron un descenso en el número de células lactotropas y somatotropas, en ratas alimentadas con una dieta hipoproteica (8% en 30 días).

La GH es descripta como anabólica, lipolítica y antagonista de la insulina y facilitaría un mejor uso de los nutrientes durante los períodos de privación (Snyder y col., 1988). La edad y el estado nutricional determinaron variaciones en los patrones de secreción hormonal (Snyder y col., 1988; Vance y col., 1992).

La administración pulsátil de GH a adultos deficientes causó alteraciones significativas en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, sustentando la hipótesis de que la GH juega un rol importante en el uso de los nutrientes (Vance y col., 1992). Además, los datos bioquímicos han permitido la detección de reducidos niveles

Three length growth patterns of the young squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*) were observed: **1. Simple linear:** femur length of all groups and pelvic index of undernourished females (95% of the variation is explained by the regression equation). **2. Complex linear:** pelvic index of control and undernourished males, and neurocranial and facial indices of all the groups. **3. Non-correlated with age:** neurofacial index of undernourished males, and pelvio-femoral index of females and undernourished females and males (Pucciarelli et al., 2000).

Heterochrony is the study of the evolutionary changes in the relative rates and timing of growth and development. Ramírez Rozzi et al. (2005) suggest that heterochrony depends on the effects of environmental and not exclusively genetic factors.

The secretion of pituitary hormones is mediated by stimulating and inhibitory mechanisms, as well as by the action of intraglandular paracrine agents. Food deprivation diminished somatostatin and the GH releasing hormone (GHRH) in the neurons of the hypothalamic median eminence and also reduced the mRNA levels for somatostatin, GHRH and GH (Brogan et al., 1997). Polkowska et al. (1996) detected that *chronic restriction of dietary proteins* in female lambs reduced (8% in 20 weeks) the somatostatin content in the hypothalamus, and Hara et al. (1998) reported a decreased number of lactotropes and somatotropes in rats fed on low protein diet (8% in 30 days). GH is described as an anabolic, lipolytic and insulin antagonist that facilitates the best use of nutrients during deprivation periods (Snyder et al., 1988). Age and nutritional status have been found to determine variations in the secreting patterns of this hormone (Snyder et al., 1988; Lee Vance et al., 1992). The pulsatile administration of GH to GH-deficient adults causes significant alterations in protein, carbohydrate and lipid metabolism, supporting the hypothesis that GH plays an important role in the utilization of nutrients (Vance et al., 1992). On the other hand, biochemical data have shown reduced GH levels (Nitzan and Wilber, 1974) together with a lesser serum activity of somatomedins, in undernourished rats (Price et al., 1979). GH-deficient children have been treated with recombinant

de GH (Nitzan y Wilber, 1974), junto con una menor actividad sérica de las somatomedinas en ratas malnutridas (Price y col., 1979). Los niños con deficiencia de GH han sido tratados con GH recombinante humana (GHh) mostrando un aumento en la velocidad de crecimiento y en la densidad mineral ósea, en especial en los primeros 5 años de tratamiento. La terapia con GHh aumentó la velocidad de crecimiento y la altura final alcanzada en los niños con insuficiencia renal crónica (Lanes, 2000).

Además, la restricción calórica redujo el estrés oxidativo, mejoró la sensibilidad a la insulina y alteró la respuesta neuroendocrina en el eje gonadal, proporcionando nuevas estrategias para el manejo de la disfunción reproductiva (Martin y col., 2008). La calidad y la cantidad de la dieta alimentaria tienen marcadas influencias sobre la síntesis de las hormonas (Cheek y Hill, 1974; Pimstone, 1976; Phillips, 1986; Brogan y col., 1997). En nuestro diseño experimental, la dieta hipocalórica e hipoproteica (**tabla 1**) produjo severo retardo del crecimiento en humanos y en animales de laboratorio.

Tabla 1. Composición de las dietas control (20%) e hipoproteica (10%)

Componente	Dieta control (g)	Dieta hipoproteica (g)
Harina de soja	28.0	9.9
Harina de trigo	14.7	8.0
Glucosa	0.0	6.7
Leche en polvo	10.6	4.9
Salvado de trigo	5.6	5.6
Sacarosa	3.5	3.5
Arroz	3.3	6.6
Maicena	3.0	21.4
Margarina	4.2	6.7
Huevo	7.0	3.2
Mezcla de vitaminas	1.5	1.5

La malnutrición retarda el peso corporal, pero no el peso cerebral de los animales malnutridos, respecto a los controles. Los valores volumétricos registrados fueron siempre mayores en machos respecto a hem-

human GH (hGH) evidencing an acceleration of growth velocity and bone mineral density, especially during the first five years of treatment. In children with chronic kidney deficiency hGH therapy accelerated the growth velocity and increased their final height (Lanes, 2000).

Additionally, caloric restriction reduced oxidative stress, improved insulin sensitivity and altered the neuroendocrine responses in the gonadal axis that provided new strategies for the management of the reproductive dysfunction (Martin et al., 2008). Quality and quantity of food intake have a marked influence on hormone synthesis (Cheek and Hill, 1974; Pimstone, 1976; Phillips, 1986; Brogan et al., 1997). In our experimental design low-calorie and low-protein diets (**table 1**) produced slower growth in humans and laboratory animals.

Table 1. Composition of control (20%) and low protein diets (10%)

Component	Control diet	High -protein diet (g)
Soybean meal	28.0	9.9
Wheat meal	14.7	8.0
Glucose	0.0	6.7
Skimmed milk	10.6	4.9
Wheat bran	5.6	5.6
Sucrose	3.5	3.5
Rice meal	3.3	6.6
Corn starch	3.0	21.4
Margarine	4.2	6.7
Egg	7.0	3.2
Vitamin mixture	1.5	1.5

Values are expressed in grams.

Undernourishment retards body weight, but not the brain weight of undernourished animals compared to controls. The volumetric values recorded were always higher in males than in females (**table 2**).

bras (tabla 2). Resultados similares fueron hallados en ratas (Pucciarelli, 1981) y en humanos (Pucciarelli y col, 1993).

Tabla 2. Pesos corporal y cerebral de monos controles y malnutridos

Grupos	Peso corporal	Peso cerebral
Hembras controles	438.00 ± 26.10	26.43 ± 3.29
Machos controles	527.67 ± 17.47	26.85 ± 1.48
Hembras malnutridas	357.75 ± 56.62	26.37 ± 1.81
Machos malnutridos	428.00 ± 31.18	26.30 ± 1.00

Los valores son expresados en gramos como promedio ± ES.

En la tabla 3 se muestra la distribución porcentual de la densidad de volumen (DV) en las diferentes poblaciones adenohipofisarias de monos malnutridos y controles.

Tabla 3. Distribución porcentual de la densidad de volumen en las poblaciones adenohipofisarias de monos controles y malnutridos

Poblaciones (%)	Machos Controles	Machos Malnutridos	Hembras controles	Hembras Malnutridas
Somatotropa	26.7	9.7 *	16.4	6.7 *
Lactotropa	12.3	4.0 *	23.0	7.9 *
Luteinizante	7.7	2.4 *	7.3	1.9 *
Folículo­tropa	3.3	1.1 *	3.2	0.8 *
Tirotropa	0.4	0.2 *	0.6	0.2 *
Corticotropa	3.1	3.1 NS	2.8	2.5 NS
Cromó­foba	46.4	79.5 *	46.9	79.9 *

NS no significativo, * $p < 0.05$.

El incremento porcentual de las poblaciones somatotropa, lactotropa, gonadotropa y tirotropa, sin cambios significativos en las corticotropas, podría estar asociado a un aumento de la población cromó­foba (células inmaduras y células involutivas). En nuestro estudio morfológico se observa un patrón granular citoplasmático con descenso en el número de somatotropas, lactotropas, gonadotropas y tiotropas de monos malnutridos de ambos sexos. No se hallaron cambios morfológicos en la población corticotropa (fig. 15.1). La ACTH, hormona de la vida, estaría mantenida en sus niveles plasmáticos basales (Cónsole, 2001a-b).

Table 2. Body and brain weights of undernourished and control monkeys

Groups	Body weight	Brain weight
Female control	438.00 ± 26.10	26.43 ± 3.29
Male control	527.67 ± 17.47	26.85 ± 1.48
Undernourished female	357.75 ± 56.62	26.37 ± 1.81
Undernourished male	428.00 ± 31.18	26.30 ± 1.00

Values are expressed in grams as mean ± S.E.M.

Similar results were recorded in rats (Pucciarelli, 1981) and humans (Pucciarelli et al, 1993).

Table 3 shows the percentage distribution of volume density in the different adenohipophyseal populations in undernourished and control monkeys.

Table 3. Percentage distribution of volume density of the different pituitary cell populations in undernourished and control monkeys

Populations %	Control male	Undernourished male	Control female	Undernourished Female
Somatotrope	26.7	9.7 *	16.4	6.7 *
Lactotrope	12.3	4.0 *	23.0	7.9 *
Luteinizing	7.7	2.4 *	7.3	1.9 *
Folliculotrope	3.3	1.1 *	3.2	0.8 *
Thyrotrope	0.4	0.2 *	0.6	0.2 *
Corticotrope	3.1	3.1 NS	2.8	2.5 NS
Chromophobe	46.4	79.5 *	46.9	79.9 *

NS nonsignificant, * $p < 0.05$.

The percentage increment in somatotropes, lactotropes, gonadotropes and thyrotropes, with no significant changes in corticotropes, might be associated to an increase in the chromophobe population comprising the immature cells with scarce granules and degranulated regressive cells. In our morphological study, immunostained pituitary cells exhibited a cytoplasmic granular pattern. It was seen (fig. 15.1) that the

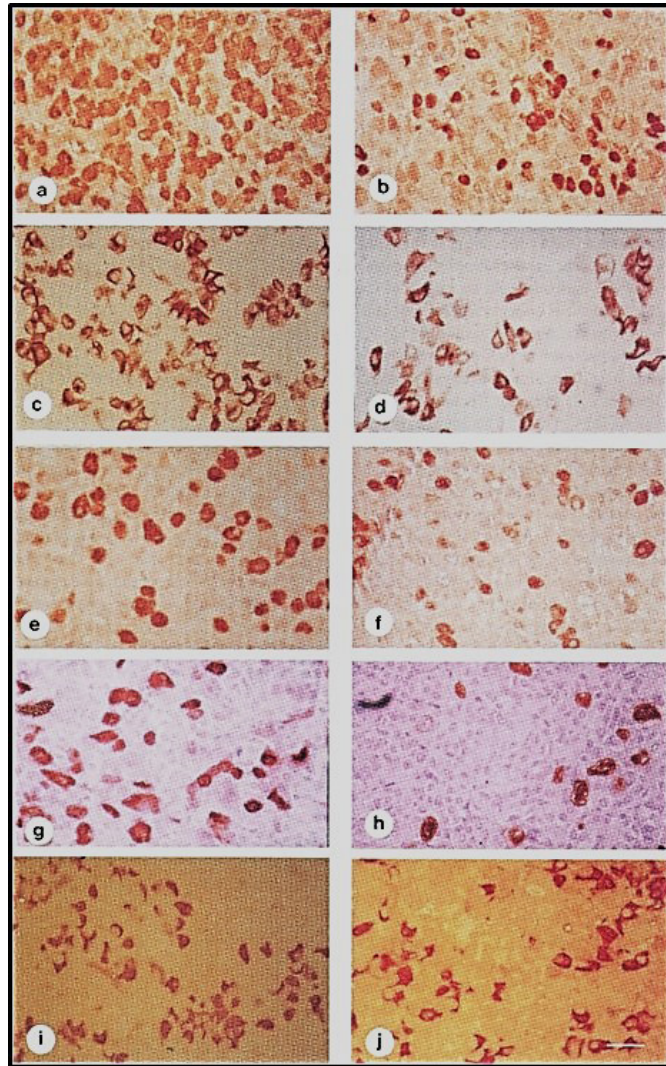


Fig. 15.1 (a-j). Campos representativos de las células adenohipofisarias inmunomarcadas. **Somatotropas:** machos: a. controles, b. malnutridos. **Lactotropas:** hembras: c. controles, d. malnutridas. **Gonadotropas:** machos: e. controles, f. malnutridos. **Tirotropas:** machos: g. controles, h. malnutridos. **Corticotropas:** machos: i. controles, j. malnutridos (EnVision peroxidasa: anti-GH, -PRL, -LH/FSH, -TSH, -ACTH, x 200) (Cónsole y col., 2001).

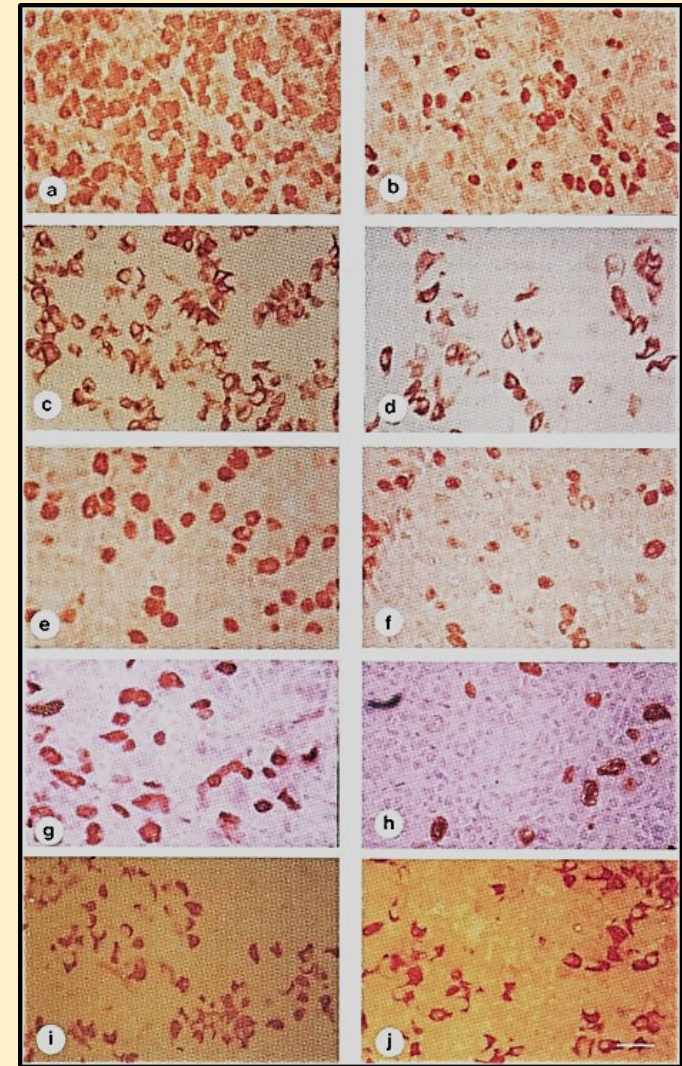


Fig. 15.1 (a-j): Representative fields of immunostained pituitary cells. **Somatotropes:** males: a. control, b. undernourished. **Lactotropes:** females: c. control, d. undernourished. **Gonadotropes:** males: e. control, f. undernourished. **Thyrotropes:** males: g. control, h. undernourished. **Corticotropes:** males: i. control, j. undernourished (EnVision peroxidase: anti-GH, -PRL, -LH/FSH, -TSH, -ACTH, x 200) (Cónsole et al., 2001).

El análisis morfométrico registró un descenso significativo ($p < 0.05$) de la densidad de volumen (DV) y de la densidad de células (DC) en las poblaciones somatotropa, lactotropa, gonadotropa y tirotropa de monos malnutridos comparados con sus contrapartes controles. No se detectaron diferencias significativas en la DC y en la DV de la población corticotropa (fig. 15.2).

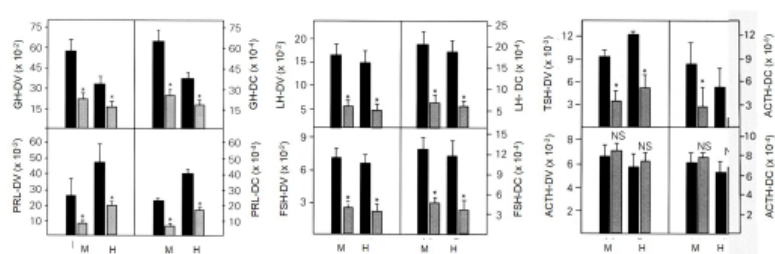


Fig. 15.2. Densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) en las poblaciones adenohipofisarias. Somatotropas y lactotropas. Folliculotropas y luteinizantes. Tirotropas y corticotropas. Machos (M), hembras (H), controles (barras negras) y malnutridos (barras grises), * $p < 0.05$, NS: no significativo (Cónsole y col., 2001).

En concordancia con nuestras observaciones, se comunicó descenso del tamaño de las somatotropas y lactotropas en ratas malnutridas (Medvedev y col., 1995; Hara y col., 1998; Molon-Noblot y col., 2003), mientras Shimokawa y col. (1996) no hallaron cambios en las somatotropas sometidas a restricción dietética. Herbert y col. (1993) mostraron descenso de algunos parámetros adenohipofisarios en ratas malnutridas.

Nuestros datos mostraron descenso de la población gonadotropa en monos malnutridos, de acuerdo con las alteraciones morfológicas descritas en ratas malnutridas por Herbert (1980) y Heindel y col. (1988). Además, hubo descenso de la función ovárica y testicular en ratas restringidas (Hre) (Heindel y col., 1988).

Respecto a la población corticotropa no pudimos detectar cambios significativos, mientras Herbert y Carrillo (1982) hallaron un incremento de la población corticotropa en la malnutrición, sugerente de una estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

number of somatotropes, lactotropes, gonadotropes and thyrotropes in undernourished monkeys from both sexes decreased. No morphologic changes were found in corticotropes. The ACTH hormone, hormone of life, would remain on their basal plasmatic levels (Cónsole, 2001 a-b).

The morphometric analysis recorded a significant decrease ($p < 0.05$)

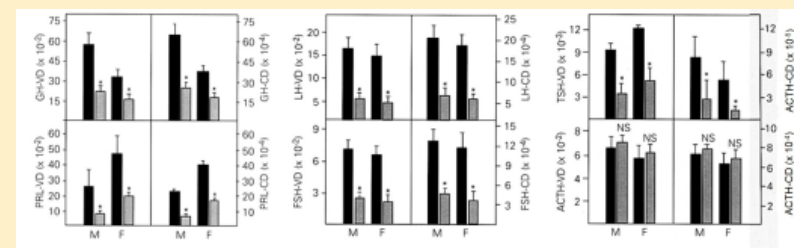


Fig. 15.2. Volume density (VD) and cell density (CD). Somatotropes and lactotropes. Folliculotropes and luteinizing cells. Thyrotropes and corticotropes. Males (M), females (F), controls (black bars) and undernourished (gray bars), * $p < 0.05$, NS: nonsignificant (Cónsole et al., 2001).

in the volume density (VD) and cell density (CD) in the somatotropes, lactotropes, gonadotropes and thyrotropes of undernourished monkeys compared to their control counterparts. No significant differences were found in the CD and VD of the corticotrope population (fig. 15.2).

According to our observations, decreased somatotrope and lactotrope size was reported in undernourished rats (Medvedev et al., 1995; Hara et al., 1998; Molon-Noblot et al., 2003), whereas Shimokawa et al. (1996) found no changes in those somatotropes subjected to dietary restriction. Herbert et al., 1993 reported some decreased pituitary parameters in undernourished rats. Our data evidenced a decreased gonadotrope population in undernourished monkeys, according to the morphologic alterations described in undernourished rats by Herbert (1980) and Heindel et al. (1988). Additionally, the gonadotrope and testicular functions appeared decreased in restricted rats (Hre) (Heindel et al., 1988). As regards the corticotrope population, no significant changes were detected. In contrast, Herbert and Carrillo (1982) found an increase of the corticotrope population

El dimorfismo sexual registrado en las poblaciones somatotropa y lactotropa se correlacionó con los patrones morfométricos craneofaciales en monos malnutridos cuando se compararon con los controles. Resultados similares fueron hallados en ratas (Herbert, 1980; Pucciarelli 1981; Oyhenart y Pucciarelli, 1992) y en humanos (Pucciarelli y col., 1993).

En nuestro estudio ultraestructural se observó en todas las células adenohipofisarias (excepto las corticotropas) una disminución en el número de gránulos secretorios, alta actividad exocítica, dilatación del RER y expansión del Golgi (**fig. 15.3**). Esto implicaría una mayor liberación compensatoria del material secretorio, sugerente de un patrón de hiperestimulación.

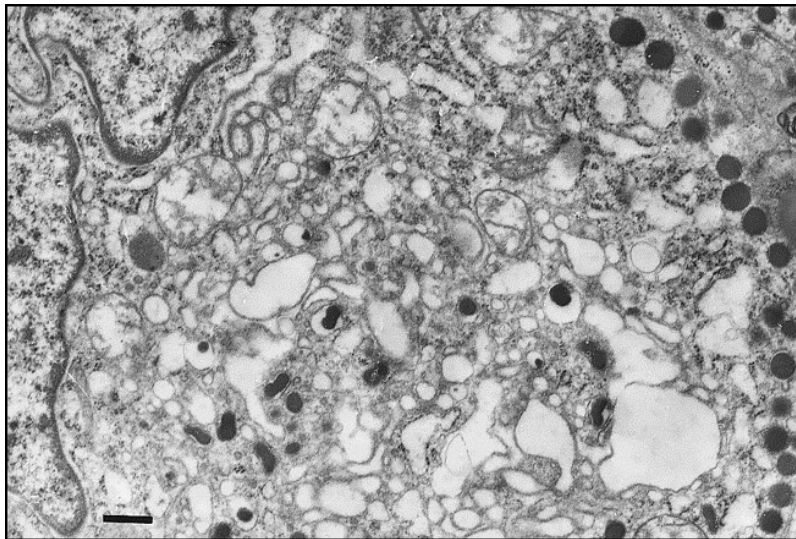


Fig. 15.3. Somatotrope de mono malnutrido. Gránulos secretorios en contacto con la membrana plasmática y complejo de Golgi expandido y dilatado (x 18.000).

Las lactotropas de monos malnutridos exhiben un complejo de Golgi hipertrófico con vesículas inmaduras, gránulos secretorios pleomórficos (rango de 100 a 600 nm) y un RER irregular (**fig. 15.4 A**).

in undernourishment, suggestive of stimulation of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis. The sexual dimorphism detected in the somatotrope and lactotrope populations correlated with the craniofacial morphometric patterns in undernourished monkeys when compared to controls. Similar results were reported in rats (Herbert, 1980; Pucciarelli 1981; Oyhenart and Pucciarelli, 1992) and humans (Pucciarelli et al., 1993). In our ultrastructural study all the adeno-pituitary cells (with the exception of corticotropes) were observed to have decreased the number of secretory granules, high exocytic activity, a dilated RER and an expanded Golgi (**fig. 15.3**).

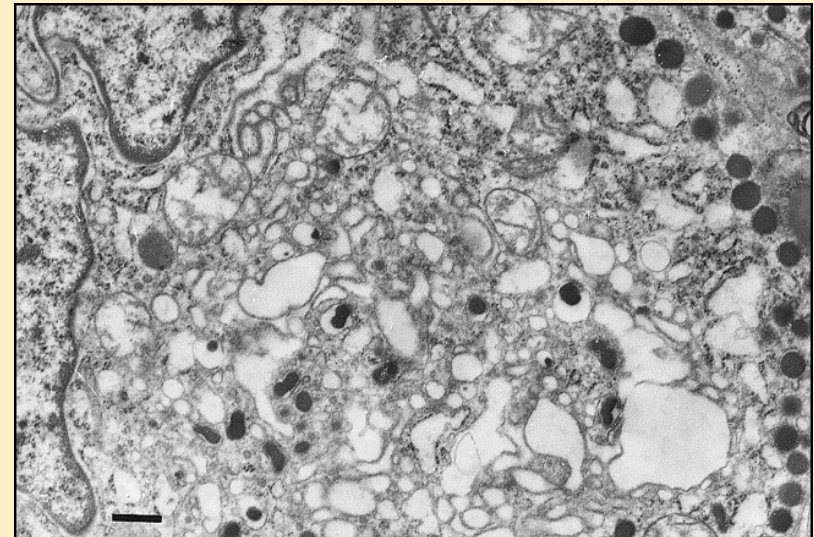


Fig. 15.3. Somatotrope from undernourished monkey. Secretory granules contacting the plasmatic membrane and an expanded and dilated Golgi complex (x 18.000).

This would imply a higher compensatory release of the secretory material suggestive of a pattern of hyperstimulation.

Lactotropes from undernourished monkey exhibit hypertrophic Golgi and pleomorphic secretory granules (**fig. 15.4 A**).

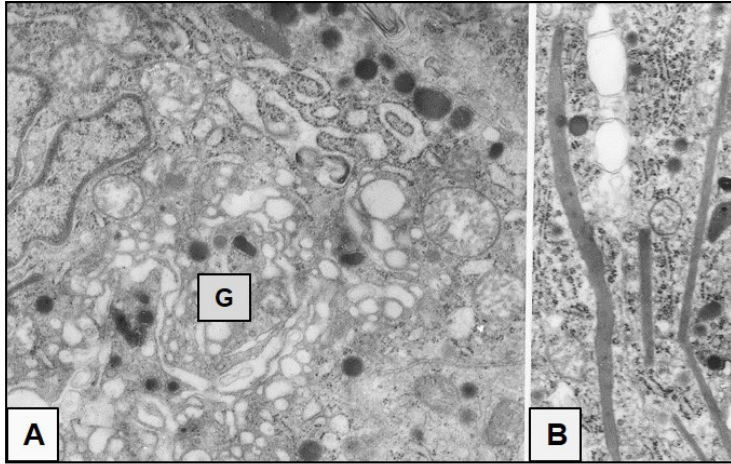


Fig. 15.4 A-B. Lactotropa de mono malnutrido. A. Golgi (G) hipertrófico con gránulos inmaduros, gránulos secretorios periféricos y RER irregular (18000x). B. Largos cristaloides citoplasmáticos (x 18.000).

En algunas lactotropas se observan largos cristaloides citoplasmáticos relacionados con inclusiones lipídicas **figs. 15.4B y 15.5**. En **15.6** se ven exocitosis y RER desarrollado.

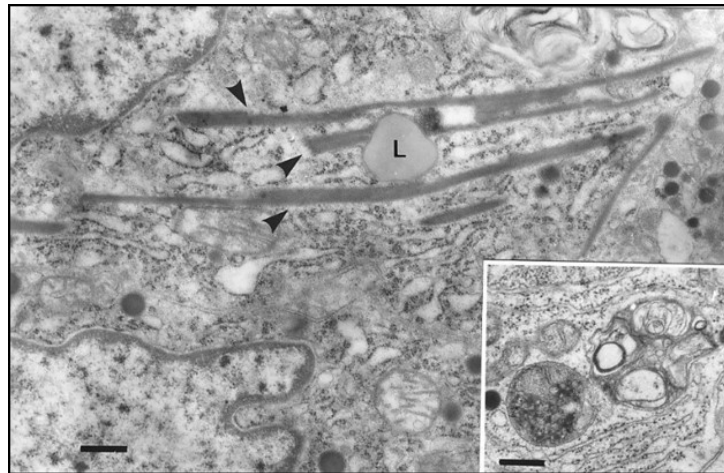


Fig. 15.5. Lactotropa de mono malnutrido. Largos cristaloides (cabezas de flechas) relacionados con gotas de lípidos (L). Recuadro: lisosomas heterogéneos con perfiles multilaminados. Barras: 500 nm.

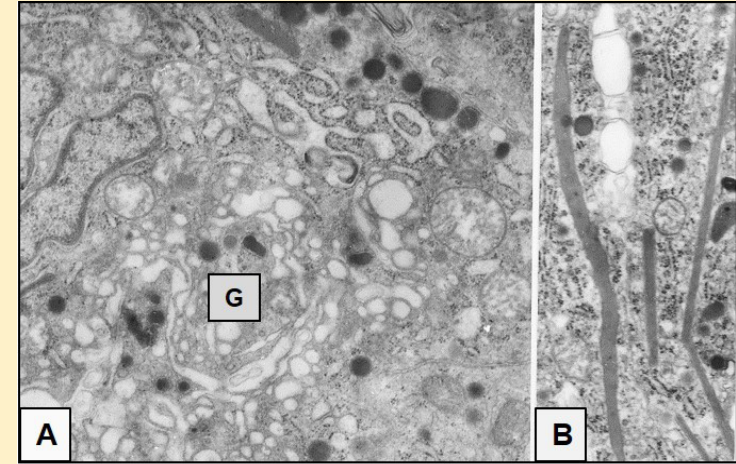


Fig. 15.4 A-B. Lactotrope from undernourished monkey. A. Hypertrophic Golgi (G) with immature granules, peripheral secretory granules and irregular RER (18000x). B. Long cytoplasmic crystalloids (x 18.000).

Long cytoplasmic crystalloids related to lipid inclusions in **figs. 15.4 B-15.5**.

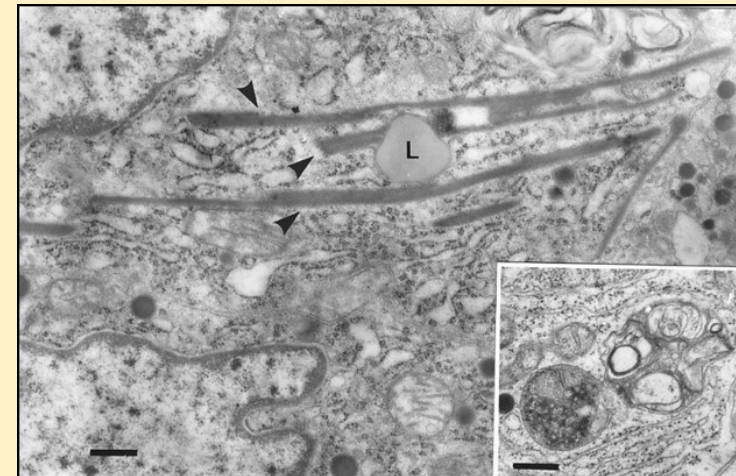


Fig. 15.5. Lactotrope from undernourished monkey. Long crystalloids (arrowheads) related to a lipid droplet (L). Inset: heterogeneous lysosomes with multilaminated profiles. Bar scale: 500 nm.

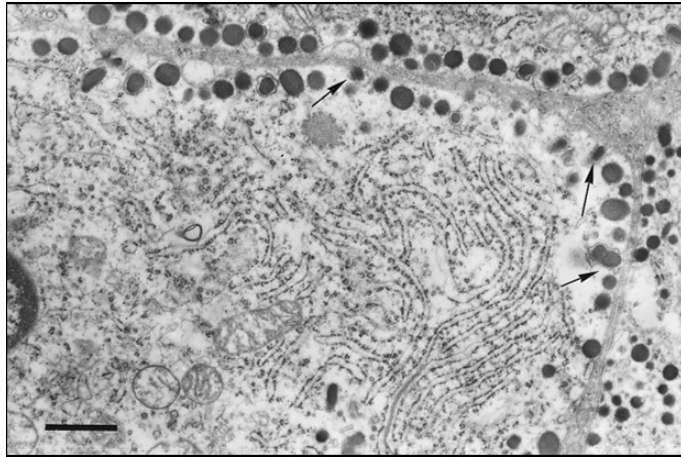


Fig. 15.6. Lactotropa de mono malnutrido. RER muy desarrollado con ribosomas adheridos, ribosomas libres y exocitosis en los gránulos secretorios marginales (flechas). Barra: 1 μ m.

En la **fig. 15.7** se observa una folículotropa de mono malnutrido con RER dilatado, Golgi expandido y escasos gránulos secretorios periféricos.



Fig. 15.7. Folliculotropa de mono malnutrido. RER dilatado, gránulos secretorios periféricos en contacto con la membrana plasmática (flechas) y Golgi (G) expandido (x 13.000).

In **fig. 15.6** exocytosis and well-developed RER were seen.

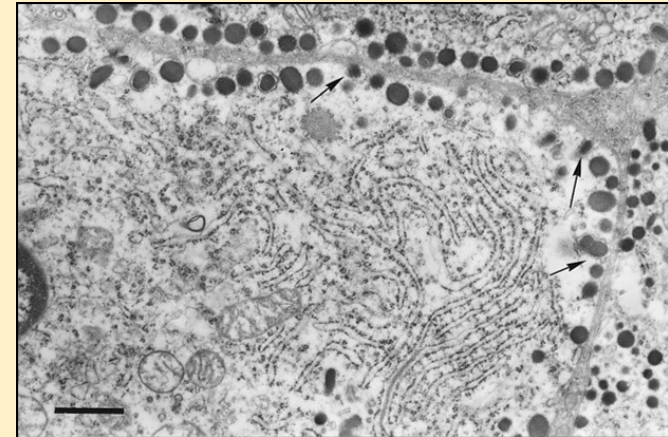


Fig. 15.6. Lactotrope from undernourished monkey. Well-developed RER with attached and free ribosomes and exocytosis (arrows) in margined secretory granules. Bar scale: 1 μ m.

In **fig. 15.7** there is evidence of a folliculotrope from undernourished monkey with dilated RER, expanded Golgi and scarce peripheral secretory granules.



Fig. 15.7. Folliculotrope from undernourished monkey. Dilated RER, peripheral secretory granules contacting the plasmatic membrane (arrows) and expanded Golgi (G) (x 13.000).

Las tirotropas del mismo grupo muestran un RER irregular con abundantes polirribosomas y pequeños gránulos secretorios periféricos (fig. 15.8).

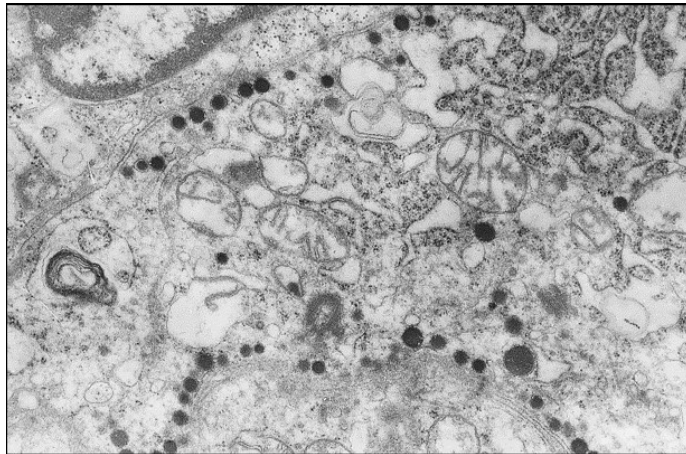


Fig. 15.8. Tirotropa de mono malnutrido. RER dilatado con abundantes polirribosomas y pequeños gránulos secretorios periféricos (x 24.000).

Las corticotropas en un diseño de malnutrición presentan características normales cuando se comparan con el grupo control (fig. 15.9).

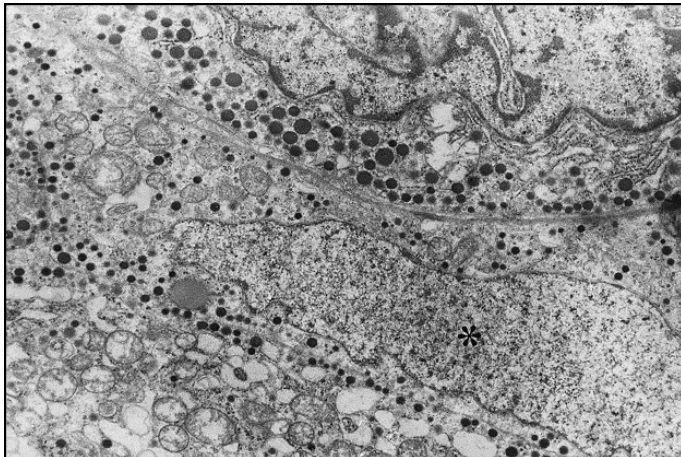


Fig. 15.9. Corticotropa de mono malnutrido. Se observan las características normales: electrotransparencia y gránulos periféricos (x 10.000).

Thyrotropes from the same group evidenced an irregular RER with abundant polyribosomes and small peripheral secretory granules (fig. 15.8).

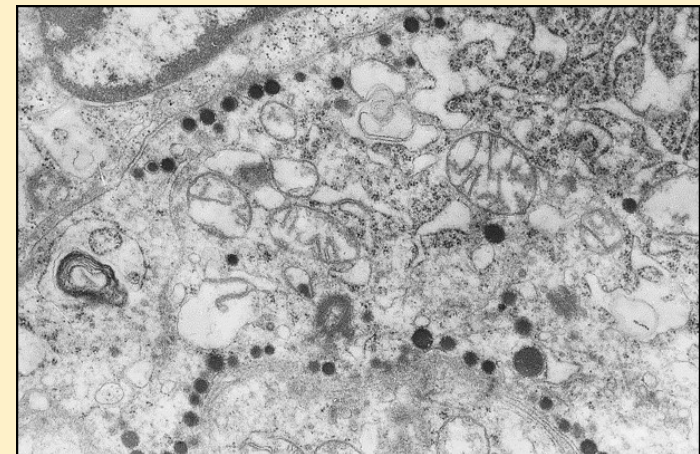


Fig. 15.8. Thyrotrope from undernourished monkey. Dilated RER with abundant polyribosomes and small peripheral secretory granules (x 24.000).

Corticotropes presented normal characteristics in an undernourishment design when compared to the control group (fig. 15.9).

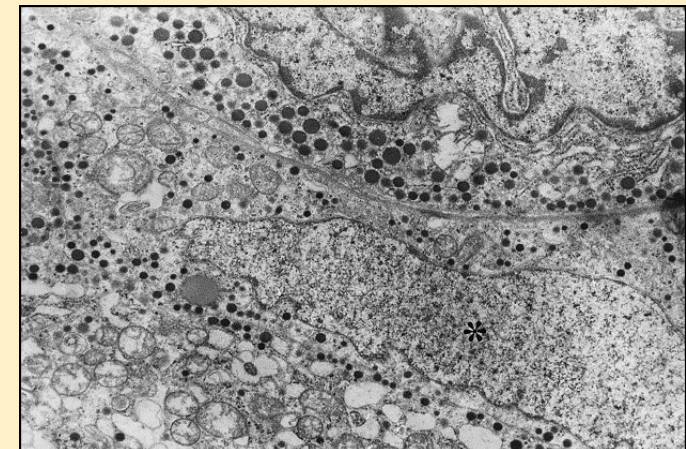


Fig. 15.9. Corticotrope from undernourished monkey. Normal characteristics are observed: electron transparency and peripheral granules (x 10.000).

Gómez Dumm y col. (1982 y 1987) comunicaron interesantes cambios ultraestructurales en la población somatotropa de ratas con dieta postdestete y Medvedev y col. (1995) detectaron un descenso en el diámetro medio de los gránulos secretorios de las somatotropas en ratones con baja dieta proteica. Además, Herbert (1980) describió en las lactotropas y gonadotropas de ratas machos malnutridas, menor extensión del RER-Golgi y un menor tamaño de los gránulos secretorios.

La nutrición es un factor importante en el desarrollo mental y, como consecuencia, en el rendimiento cognitivo. La malnutrición se refleja en el peso corporal, la altura de los niños y las curvas del IMC. Sandjaja y col. (2013) comunicaron relación entre los indicadores antropométricos y el rendimiento cognitivo en niños en edad escolar del sudeste asiático y observaron una marcada asociación entre malnutrición y coeficiente intelectual (CI) no verbal en niños de 6-12 años.

Alvarez y col. (2014) investigaron los efectos morfológicos de la malnutrición con privación nutricional en los días 2-15 postnatales en ratas, mostrando descenso en el volumen del hipocampo y en la densidad neuronal en el estrato piramidal de los subcampos CA1 y CA3, asociados a convulsiones recurrentes.

Concluyendo, la malnutrición determinó un descenso en el número de células adenohipofisarias (excepto las corticotropas) que es compatible con los cambios ultraestructurales indicadores de un posible patrón secretorio de hiperestimulación con RER dilatado, complejo de Golgi expandido, descenso del número de gránulos secretorios y alta actividad exocítica.

Referencias

Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Mol Med Rep* 2014; 10(2):579-584.

Gómez Dumm et al. (1982 and 1987) reported ultrastructural changes in the somatotrope population from rats on post-weaning diet and Medvedev et al. (1995) detected a decrease in the mean diameter of the secretory granules of somatotropes in mice on low-protein diet. Also, in lactotropes and gonadotropes from undernourished male rats, Herbert (1980) described a less expanded RER-Golgi and smaller secretory granules.

Nutrition is an important factor in mental development and, as a consequence, in cognitive performance. Malnutrition is reflected in children's weight and BMI curves. Sandjaja et al. (2013) reported relationship between anthropometric indicators and cognitive performance in school-aged children of southeast of Asia and observed a pronounced association between undernourishment and non-verbal intelligence quotient (IQ) in 6-12-year-old children.

Alvarez et al. (2014) investigated the morphological effects of the undernourishment with nutritional deprivation from postnatal day 2 to 15 in rats, showing a decrease in the hippocampal volume and neuronal density in CA1 and CA3 subfields, associated to recurrent seizures.

To conclude, undernourishment determined a decrease of the number of adenopituitary cells (with the exception of corticotropes) that is compatible with the ultrastructural changes showing a possible secretory pattern of hyperstimulation with dilated RER, an expanded Golgi complex, decrease of the number of secretory granules and high exocytic activity.

References

Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Mol Med Rep* 2014; 10(2):579-584.

Brogan RS, Fife SK, Conley LK, Giustina A, Wehrenberg WB. Effects of food deprivation on the GH axis: immunocytochemical and molecular analysis. *Neuroendocrinology* 1997; 65(2):129-135.

Brogan RS, Fife SK, Conley LK, Giustina A, Wehrenberg WB. Effects of food deprivation on the GH axis: immunocytochemical and molecular analysis. *Neuroendocrinology* 1997; 65(2):129-135.

Bussey ME, Finley S, La Barbera A, Ogata ES. Hypoglycemia in the newborn growth-retarded rat: delayed phosphoenolpyruvate carboxykinase induction despite increased glucagon availability. *Pediatr Res* 1985; 19(4):363-367.

Cheek DB, Hill DE. Effect of growth hormone on cell and somatic growth. In Greep, Astwood, *Handbook of Physiology Endocrinology* 4, Waverley, Baltimore, 1974:159-183.

Chermausek SD. Update: consequences of abnormal fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(3):689-695.

Cónsole GM, Jurado SB, Oyhenart E, Ferese C, Pucciarelli H, Gomez Dumm CL. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz J Med Biol Res* 2001a; 34(1):65-74.

Cónsole GM, Oyhenart E, Jurado SB, Riccillo FL, Pucciarelli H, Gomez Dumm CL. Effect of undernutrition on cranial components and somatotroph-lactotroph pituitary populations in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*). *Cells Tissues Organs* 2001b; 168(4):272-284.

Corner BD, Richstmeier JT. Cranial growth in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a quantitative analysis using three dimensional coordinate data. *Am J Phys Anthropol* 1992; 87(1):67-81.

Dessi A, Ottonello T, Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(Suppl 5):13-18.

Dressino V, Orden B, Oyhenart EE. Sexual responses to intrauterine stress: body and brain growth. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):100-102.

Bussey ME, Finley S, La Barbera A, Ogata ES. Hypoglycemia in the newborn growth-retarded rat: delayed phosphoenolpyruvate carboxykinase induction despite increased glucagon availability. *Pediatr Res* 1985; 19(4):363-367.

Cheek DB, Hill DE. Effect of growth hormone on cell and somatic growth. In Greep, Astwood, *Handbook of Physiology Endocrinology* 4, Waverley, Baltimore, 1974:159-183.

Chermausek SD. Update: consequences of abnormal fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(3):689-695.

Cónsole GM, Jurado SB, Oyhenart E, Ferese C, Pucciarelli H, Gomez Dumm CL. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz J Med Biol Res* 2001a; 34(1):65-74.

Cónsole GM, Oyhenart E, Jurado SB, Riccillo FL, Pucciarelli H, Gomez Dumm CL. Effect of undernutrition on cranial components and somatotroph-lactotroph pituitary populations in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*). *Cells Tissues Organs* 2001b; 168(4):272-284.

Corner BD, Richstmeier JT. Cranial growth in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a quantitative analysis using three dimensional coordinate data. *Am J Phys Anthropol* 1992; 87(1):67-81.

Dessi A, Ottonello T, Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(Suppl 5):13-18.

Dressino V, Orden B, Oyhenart EE. Sexual responses to intrauterine stress: body and brain growth. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):100-102.

Dressino V, Pucciarelli HM. Cranial growth in *Saimiri sciureus* (Cebidae) and its alteration by nutritional factors: a longitudinal study. *Am J Phys Anthropol* 1997; 102(4):545-554.

Dressino V, Pucciarelli HM. Cranial growth in *Saimiri sciureus* (Cebidae) and its alteration by nutritional factors: a longitudinal study. *Am J Phys Anthropol* 1997; 102(4):545-554.

Dressino V, Pucciarelli HM. Growth of the functional cranial components in *Saimiri sciureus boliviensis* (Cebidae): a longitudinal study. *Growth Dev Aging* 1999; 63(3):111-127.

Falkner F, Holzgreve W, Schloo RH. Prenatal influences on postnatal growth: overview and pointers for needed research. *Eur J Clin Nutr* 1994; (Suppl 1): S15-22.

Fields HW. Craniofacial growth from infancy through adulthood. Background and clinical implications. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38(5):1053-88.

Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 2004; 127(5):515-526.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005; 81(9):723-734.

Frisk V, Amsel R, Whyte HE. The importance of head growth patterns in predicting the cognitive abilities and literacy skills of small-for-gestational-age children. *Dev Neuropsychol* 2002; 22(3):565-593.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998; 19(6):717-797.

Gómez Dumm CL, Pucciarelli HM, Dressino V. Quantitative ultrastructural study of somatotrophic cells in malnourished weanling rats. *Acta Anat (Basel)* 1987; 129(3):200-202.

Gómez Dumm CLA, Pucciarelli HM, Terreros MC. Effects of a low-protein diet on the ultrastructure of somatotroph cells in the rat. *Com Biol* 1982; 1(2):165-170.

Dressino V, Pucciarelli HM. Growth of the functional cranial components in *Saimiri sciureus boliviensis* (Cebidae): a longitudinal study. *Growth Dev Aging* 1999; 63(3):111-127.

Falkner F, Holzgreve W, Schloo RH. Prenatal influences on postnatal growth: overview and pointers for needed research. *Eur J Clin Nutr* 1994; (Suppl 1): S15-22.

Fields HW. Craniofacial growth from infancy through adulthood. Background and clinical implications. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38(5):1053-88.

Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 2004; 127(5):515-526.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005; 81(9):723-734.

Frisk V, Amsel R, Whyte HE. The importance of head growth patterns in predicting the cognitive abilities and literacy skills of small-for-gestational-age children. *Dev Neuropsychol* 2002; 22(3):565-593.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998; 19(6):717-797.

Gómez Dumm CL, Pucciarelli HM, Dressino V. Quantitative ultrastructural study of somatotrophic cells in malnourished weanling rats. *Acta Anat (Basel)* 1987; 129(3):200-202.

Gómez Dumm CLA, Pucciarelli HM, Terreros MC. Effects of a low-protein diet on the ultrastructure of somatotroph cells in the rat. *Com Biol* 1982; 1(2):165-170.

Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawskii E. Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *N Engl J Med* 1991; 325(4):231-237.

Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawskii E. Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *N Engl J Med* 1991; 325(4):231-237.

Hara M, Herbert DC, Taniguchi T, Hattori A, Ohtani-Kaneko R, Ligo M, Kato Y, Hirata K. Effects of a low-protein diet on prolactin- and growth hormone-producing cells in the rat pituitary gland. *Anat Rec* 1998; 251(1):37-43.

Heindel JJ, Berkowitz AS, Grotjan HE, Herbert DC, Klemckes HG, Bartke A. Pituitary and testicular function in the restricted (Hre) rat. *Int J Androl* 1988; 11(4):313-326.

Herbert D.C. Morphology of the mammothrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. *Am J Anat* 1980; 158 (4):521-531.

Herbert DC, Carrillo AJ. The hypophyseal-adrenal axis in the protein-calorie malnourished rat. *Horm Metab Res* 1982; 14(4):205-207.

Herbert DC, Yashiro T, Muraki T, Okano T, Hattori A, Suzuki T. Quantitative morphological analysis of the pituitary gland in protein-calorie malnourished rats. *Anat Rec* 1993; 235(1):121-125.

Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delemarre van de Waal HA. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 2000; 166(3):599-608.

Huizinga CT, Engelbregt MJ, Rekers-Mombarg LT, Vaessen SF, Delemarre van de Wall HA, Fodor M. Ligation of uterine artery and early postnatal food restriction - animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004; 62(5):233-240.

Huizinga CT, Oudejans CB, Delemarre van de Wall HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol* 2001; 168(2):273-281.

Hara M, Herbert DC, Taniguchi T, Hattori A, Ohtani-Kaneko R, Ligo M, Kato Y, Hirata K. Effects of a low-protein diet on prolactin- and growth hormone-producing cells in the rat pituitary gland. *Anat Rec* 1998; 251(1):37-43.

Heindel JJ, Berkowitz AS, Grotjan HE, Herbert DC, Klemckes HG, Bartke A. Pituitary and testicular function in the restricted (Hre) rat. *Int J Androl* 1988; 11(4):313-326.

Herbert D.C. Morphology of the mammothrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. *Am J Anat* 1980; 158 (4):521-531.

Herbert DC, Carrillo AJ. The hypophyseal-adrenal axis in the protein-calorie malnourished rat. *Horm Metab Res* 1982; 14(4):205-207.

Herbert DC, Yashiro T, Muraki T, Okano T, Hattori A, Suzuki T. Quantitative morphological analysis of the pituitary gland in protein-calorie malnourished rats. *Anat Rec* 1993; 235(1):121-125.

Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delemarre van de Waal HA. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 2000; 166(3):599-608.

Huizinga CT, Engelbregt MJ, Rekers-Mombarg LT, Vaessen SF, Delemarre van de Wall HA, Fodor M. Ligation of uterine artery and early postnatal food restriction - animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004; 62(5):233-240.

Huizinga CT, Oudejans CB, Delemarre van de Wall HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol* 2001; 168(2):273-281.

Huizinga CT, Oudejans CB, Steiner RA, Clifton DK, Delemarre van de Wall HA. Effects of intrauterine and early postnatal growth restric-

- Huizinga CT, Oudejans CB, Steiner RA, Clifton DK, Delemarre van de Wall HA. Effects of intrauterine and early postnatal growth restriction on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat. *Pediatr Res* 2000; 48(6):815-820.
- Imdad A, Yakoob MY, Siddiqui S, Bhutta ZA. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 11(Suppl 3):S1.
- Karlberg JP, Albertsson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1997; 48(Suppl 1):17-24.
- Klammt J, Pfaffle R, Werner H, Kiess W. IGF signalling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(6):197-205.
- Lanes R. Growth velocity, final height and bone mineral metabolism of short children treated long term with growth hormone. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1(1):33-46.
- Lesage J, Sebaai N, Leonhart M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006; 9(4):183-198.
- Mallard C, Loeliger M, Copolov D, Rees S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 2000; 100(2):327-333.
- Mallard C, Rees S, Stringer M, Cock ML, Harding R. Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. *Pediatr Res* 1998; 43(2):262-270.
- Medvedev DI, Babichenko II, Savrova OB, Eremia IZ, Kravtsova AI. The morphological state of the adenohipophyseal somatotrophs during body development under conditions of protein-energy insufficiency. *Aviakosm Ekolog Med* 1995; 29(3):28-31.
- tion on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat. *Pediatr Res* 2000; 48(6):815-820.
- Imdad A, Yakoob MY, Siddiqui S, Bhutta ZA. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 11(Suppl 3): S1.
- Karlberg JP, Albertsson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1997; 48(Suppl 1):17-24.
- Klammt J, Pfaffle R, Werner H, Kiess W. IGF signalling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(6):197-205.
- Lanes R. Growth velocity, final height and bone mineral metabolism of short children treated long term with growth hormone. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1(1):33-46.
- Lesage J, Sebaai N, Leonhart M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006; 9(4):183-198.
- Luna ME, Quintero FA, Cesani MF, Fucini MC, Prio V, Guimarey LM, Oyhenart EE. Craniofacial catch-up growth in intrauterine growth retarded rats following postnatal nutritional rehabilitation. *Clin Exp Obst Gynecol* 2014; 41(5):530-533.
- Mallard C, Loeliger M, Copolov D, Rees S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 2000; 100(2):327-333.
- Mallard C, Rees S, Stringer M, Cock ML, Harding R. Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. *Pediatr Res* 1998; 43(2):262-270.

Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J Nutr* 1999; 129(11):2061-69.

Molon-Noblot S, Laroque P, Coleman JB, Hoe CM, Keenan KP. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pituitary gland pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003; 31(3):310-320.

Ogata ES, Swanson SL, Collins JW, Finley SL. Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. *Pediatr Res* 1990; 27(1):56-63.

Oyhenart EE, Cesani MF, Castro LE, Quintero FA, Fucini MC, Luna ME, Guimarey LM. Bone growth and sexual dimorphism at birth in intrauterine-growth-retarded rats. *Anat Sci Int* 2011; 86(3):119-127.

Oyhenart EE, Guimarey LM, Fucini MC, Quintero FA, Orden B. Effects of bilateral uterine vessel ligation on skeletal growth in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):121-125.

Oyhenart EE, Muñe MC, Pucciarelli HM. Influence of intrauterine blood supply on cranial growth and sexual dimorphism at birth. *Growth Dev Aging* 1998; 62(4):187-198.

Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Dev Aging* 2003; 67(2):73-83.

Phillips LS. Nutrition, somatomedins, and the brain. *Metabolism* 1986; 35(1):78-87.

Pimstone BL. Endocrine function in protein calorie malnutrition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976; 5(1):79-95.

Polkowska J, Krejci P, Snochowski M. The long-term effect of low protein diet on the somatostatin hypothalamic neuronal system and the pituitary growth hormone cells in growing ewe. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104(1):59-66.

Price DA, Wit JM, van Buul-Offers S, Korteland-van Male AM, van Rooyen-Wehrmeijer AK, Hoogerbrugge C, Van den Brande JL. Se-

Medvedev DI, Babichenko II, Savrova OB, Eremia IZ, Kravtsova AI. The morphological state of the adenohipophyseal somatotrophs during body development under conditions of protein-energy insufficiency. *Aviakosm Ekolog Med* 1995; 29(3):28-31.

Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J Nutr* 1999; 129(11):2061-69.

Molon-Noblot S, Laroque P, Coleman JB, Hoe CM, Keenan KP. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pituitary gland pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003; 31(3):310-320.

Ogata ES, Swanson SL, Collins JW, Finley SL. Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. *Pediatr Res* 1990; 27(1):56-63.

Oyhenart EE, Cesani MF, Castro LE, Quintero FA, Fucini MC, Luna ME, Guimarey LM. Bone growth and sexual dimorphism at birth in intrauterine-growth-retarded rats. *Anat Sci Int* 2011; 86(3):119-127.

Oyhenart EE, Guimarey LM, Fucini MC, Quintero FA, Orden B. Effects of bilateral uterine vessel ligation on skeletal growth in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):121-125.

Oyhenart EE, Muñe MC, Pucciarelli HM. Influence of intrauterine blood supply on cranial growth and sexual dimorphism at birth. *Growth Dev Aging* 1998; 62(4):187-198.

Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Dev Aging* 2003; 67(2):73-83.

Phillips LS. Nutrition, somatomedins, and the brain. *Metabolism* 1986; 35(1):78-87.

Pimstone BL. Endocrine function in protein calorie malnutrition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976; 5(1):79-95.

Polkowska J, Krejci P, Snochowski M. The long-term effect of low protein diet on the somatostatin hypothalamic neuronal system and the

- rum somatomedin activity and cartilage metabolism in acutely fasted, chronically malnourished, and re-fed rats. *Endocrinology* 1979; 105(3):851-861.
- Pucciarelli HM, Carnese FR, Pinotti LV, Guimarey LM, Goicoechea AS. Sexual dimorphism in schoolchildren of the Villa IAPI neighborhood (Quilmes, Buenos Aires, Argentina). *Am J Phys Anthropol* 1993; 92(2):165-172.
- Pucciarelli HM, Dressino V, Niveiro MH. Changes in skull components of the squirrel monkey evoked by growth and nutrition: an experimental study. *Am J Phys Anthropol* 1990; 81(4):535-543.
- Pucciarelli HM, Dressino V. Ortocephalization on the postweaning squirrel monkey. *Am J Phys Anthropol* 1996; 101(2):173-181.
- Pucciarelli HM, Muñe MC, Oyhenart EE, Orden AB, Villanueva ME, Rodríguez RR, Pons ER. Growth of skeletal components in the young squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*): a longitudinal experiment. *Am J Phys Anthropol* 2000; 112(1):57-68.
- Pucciarelli HM. Growth of the functional components of the rat skull and its alteration by nutritional effects. A multivariate analysis. *Am J Phys Anthropol* 1981; 56(1):33-41.
- Quintero FA, Castro LE, Luna ME, Guimarey LM, Cesani MF, Fucini MC, Villanueva M, Prio V, Oyhenart EE. Growth of functional cranial components in rats with intrauterine growth retardation after treatment with growth hormone. *Eur J Orthod* 2012; 34(6):710-718.
- Ramírez Rozzi FV, González-José R, Pucciarelli HM. Cranial growth in normal and low-protein-fed *Saimiri*. An environmental heterochrony. *J Hum Evol* 2005; 49(4):515-535.
- Sandjaja, Poh BK, Rojroonwasinkul N, Le Nyugen BK, Budiman B, NG LO, Soothorndhaha K, Xuyen HT, Deurenberg P, Parikh P. SEA-NUTS Study Group. Relationship between anthropometric indicators and pituitary growth hormone cells in growing ewe. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104(1):59-66.
- Price DA, Wit JM, van Buul-Offers S, Korteland-van Male AM, van Rooyen-Wehrmeijer AK, Hoogerbrugge C, Van den Brande JL. Serum somatomedin activity and cartilage metabolism in acutely fasted, chronically malnourished, and re-fed rats. *Endocrinology* 1979; 105(3):851-861.
- Pucciarelli HM, Carnese FR, Pinotti LV, Guimarey LM, Goicoechea AS. Sexual dimorphism in schoolchildren of the Villa IAPI neighborhood (Quilmes, Buenos Aires, Argentina). *Am J Phys Anthropol* 1993; 92(2):165-172.
- Pucciarelli HM, Dressino V, Niveiro MH. Changes in skull components of the squirrel monkey evoked by growth and nutrition: an experimental study. *Am J Phys Anthropol* 1990; 81(4):535-543.
- Pucciarelli HM, Dressino V. Ortocephalization on the postweaning squirrel monkey. *Am J Phys Anthropol* 1996; 101(2):173-181.
- Pucciarelli HM, Muñe MC, Oyhenart EE, Orden AB, Villanueva ME, Rodríguez RR, Pons ER. Growth of skeletal components in the young squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*): a longitudinal experiment. *Am J Phys Anthropol* 2000; 112(1):57-68.
- Pucciarelli HM. Growth of the functional components of the rat skull and its alteration by nutritional effects. A multivariate analysis. *Am J Phys Anthropol* 1981; 56(1):33-41.
- Quintero FA, Castro LE, Luna ME, Guimarey LM, Cesani MF, Fucini MC, Villanueva M, Prio V, Oyhenart EE. Growth of functional cranial components in rats with intrauterine growth retardation after treatment with growth hormone. *Eur J Orthod* 2012; 34(6):710-718.
- Ramírez Rozzi FV, González-José R, Pucciarelli HM. Cranial growth in normal and low-protein-fed *Saimiri*. An environmental heterochrony. *J Hum Evol* 2005; 49(4):515-535.

tors and cognitive performance in Southeast Asian school-age children. *Br J Nutr* 2013; 110 Suppl3:S57-64.

Shimokawa I, Yu BP, Higami Y, Ikeda T. Morphometric analysis of somatotrophs: effects of age and dietary restriction. *Neurobiol Aging* 1996; 17(1):79-86.

Tannenbaum GS. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991; 372:5-16.

Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Sancho Rossignol A, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Huppi PS. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56(1):132-138.

Vance ML, Hartman ML, Thorner MO. Growth hormone and nutrition. *Horm Res* 1992; 38 (Suppl1):85-88.

Sandjaja, Poh BK, Rojroonwasinkul N, Le Nyugen BK, Budiman B, NGL O, Soothorndhaha K, Xuyen HT, Deurenberg P, Parikh P. SEA-NUTS Study Group. Relationship between anthropometric indicators and cognitive performance in Southeast Asian school-age children. *Br J Nutr* 2013; 110 Suppl3:S57-64.

Shimokawa I, Yu BP, Higami Y, Ikeda T. Morphometric analysis of somatotrophs: effects of age and dietary restriction. *Neurobiol Aging* 1996; 17(1):79-86.

Tannenbaum GS. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991; 372:5-16.

Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Sancho Rossignol A, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Huppi PS. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56(1):132-138.

Vance ML, Hartman ML, Thorner MO. Growth hormone and nutrition. *Horm Res* 1992; 38 (Suppl1):85-88.

CAPÍTULO 16

Retardo del crecimiento intrauterino: alteraciones en la población somatotropa de ratas

La ligadura unilateral y bilateral de la arteria uterina en la rata gestante es un modelo animal que parece mimetizar el tercer trimestre del retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) en el humano, con incompleta recuperación del peso y de la estatura corporales (Bussey y col., 1985; Ogata y col., 1990; Huizinga y col., 2004). El RCIU, causado por malnutrición o insuficiencia placentaria, estuvo asociado a la reducción del crecimiento de algunos órganos y tejidos fetales (Greenwood y Bell, 2003). El crecimiento de la cabeza parece estar alterado cuando hay RCIU asociado a una disfunción placentaria (Falkner y col., 1994). Sin embargo, el cráneo no es una unidad de desarrollo individual ya que se distinguen 2 regiones diferentes: la cara o víscerocráneo y el neurocráneo (Cheverud, 1982). La cara parece más susceptible a los factores epigénéticos respecto al neurocráneo (Pucciarelli, 1981; Fields, 1991), debido a los diferentes requerimientos funcionales y a los diversos patrones de crecimiento (Miller y German, 1999).

CHAPTER 16

Intrauterine growth retardation (iugr): alterations of the somatotrope population in rats

Unilateral and bilateral ligation of the uterine artery in pregnant rats is a model that apparently imitates the third trimester of intrauterine growth retardation (IUGR) in humans, with incomplete recovery of body weight and height (Bussey et al., 1985; Ogata et al., 1990; Huizinga et al., 2004). The IUGR caused by undernourishment or placental insufficiency, was associated to growth reduction of some fetal organs and tissues (Greenwood and Bell, 2003). The growth of the head seems to be altered when IUGR is associated with placental dysfunction (Falkner et al., 1994). However, the cranium is not a unit of individual development since two different regions can be distinguished: the face or viscerocranium and the neurocranium (Cheverud, 1982). The face, compared to the neurocranium, appears to be more susceptible to epigenetic factors (Pucciarelli, 1981; Fields, 1991) due to the different functional requirements and diverse growth patterns (Miller and German, 1999).

En los seres humanos, el bajo peso al nacer se asocia con un mayor riesgo de disfunción metabólica en la vida adulta. La programación endocrina prenatal, con especial énfasis en los ejes somatotropo y corticotropo, contribuye a la programación metabólica en la vida posterior (Fowden y col., 2005). La ausencia de recuperación del crecimiento en el modelo experimental RCIU permitió estudiar los mecanismos responsables en humanos con bajo peso, quienes nunca alcanzaron la estatura normal del adulto. La calidad y cantidad de la dieta alimentaria tiene marcadas influencias sobre la síntesis hormonal (Cheek y Hill, 1974; Pimstone, 1976; Phillips, 1986; Brogan y col., 1997). La falla en el crecimiento postnatal persistente podría ser atribuida en parte a la secreción anormal de GH. No está claro si las alteraciones en la secreción de GH son el resultado de anomalías intrínsecas de la pituitaria o reflejan cambios en la producción de la hormona liberadora de GH (GHRH) o de la somatostatina (Huizinga y col., 2000). Klammt y col. (2008) demostraron que los niños con bajo peso por retardo del crecimiento intrauterino podrían deberse a mutaciones en el receptor del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (R-IGF-I). Además, la desnutrición temprana con bajo peso al nacer alteró el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Lesage y col., 2006).

Guimarey y col. (2005) evaluaron la recuperación del peso corporal en ratas con RCIU tratadas con GH y hallaron que la testosterona inhibió el aumento del peso corporal y la ausencia de estrógenos promovió la recuperación del crecimiento. Oyhenart y col. (2011) analizaron el crecimiento óseo y el dimorfismo sexual en ratas con RCIU, comunicando que el descenso del flujo sanguíneo redujo el crecimiento del hueso apendicular y la longitud pélvica. Los anchos de los huesos pélvicos y extremidades estuvieron más afectados en los machos respecto a las hembras. Quintero y col. (2012) analizaron el efecto del tratamiento con GH en la recuperación del crecimiento de los componentes facial y neurocraneano en ratas con RCIU. El grupo control y el RCIU + GH tuvieron valores neurocraneanos similares, mientras el grupo RCIU mostró los valores más bajos y el volumen facial fue similar en los grupos estudia-

In human beings, low weight at birth is associated with higher risk of metabolic dysfunction in adult life. Prenatal endocrine programming, with special emphasis on the somatotrope and corticotrope axes, contribute to the metabolic programming in later life (Fowden et al., 2005). The absence of growth recovery in the experimental model IUGR allowed studying those mechanisms that are responsible for low weight in human beings, who never reached the normal height of the adult. The quantity and quality of the food diet strongly influences hormone synthesis (Cheek and Hill, 1974; Pimstone, 1976; Phillips, 1986; Brogan et al., 1997). The persistent failure in postnatal growth might be partly attributed to the abnormal secretion of GH. It remains unclear if the alterations in GH secretion are the result of intrinsic abnormalities of the pituitary or if they reflect changes in the production of the GH releasing hormone (GHRH) or in the production of somatostatin (Huizinga et al., 2000). Klammt et al. (2008) demonstrated that low weight in children due to retarded intrauterine growth might be caused by mutations in the insulin-like growth factor (RIGF-I). Also, early undernourishment with low weight at birth altered the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis (Lesage et al., 2006)

Guimarey et al. (2005) evaluated the body weight recovery in IUGR-rats treated with GH and found that testosterone inhibited the increase of body weight, and the absence of estrogens promoted growth recovery. Oyhenart et al. (2011) analyzed bone growth and sexual dimorphism in rats with IUGR, and reported that the decrease of blood flow reduced the growth of the appendicular bone and pelvic length. Pelvic bone and limb width was more affected in males compared to females. Quintero et al. (2012) analyzed the effect of the treatment with GH in the growth recovery of the facial and neurocranial components in rats with IUGR. Control and IUGR + GH groups presented similar neurocranial values, whereas group IUGR presented the lowest values and the facial value was similar in the groups studied. In previous studies, Oyhenart et al. (1998; 2002 and 2003) suggested that the reduction of the uterus-placental blood flow in rats interfere in full expression of sexual dimorphism

dos. En estudios previos, Oyhenart y col. (1998; 2002 y 2003) sugirieron que la disminución del flujo sanguíneo útero-placentario en ratas interfiere en la plena expresión del dimorfismo sexual y confirma el impacto de la restricción del RCIU en el crecimiento postnatal. Dressino y col. (2002) analizaron el crecimiento corporal y cerebral en ratas con RCIU sometidas a estrés intrauterino, demostrando que el estrés prenatal puede modificar el crecimiento y el dimorfismo sexual.

Hemb y col. (2010) evaluaron los efectos de la malnutrición en crías de ratas y hallaron descenso del peso corporal y de los cerebros, así como alteraciones en la memoria espacial. Kohmura y col. (2013) comunicaron una asociación entre el peso corporal al destete y la remodelación del tejido adiposo subcutáneo en ratones adultos obesos con malnutrición en el útero. Morris y col. (2009) establecieron un vínculo entre desnutrición gestacional y desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta. Las alteraciones en el estado nutricional de la madre conducen a cambios en la plasticidad del desarrollo, en parte apoyada por los cambios epigenéticos en la regulación de los genes. La programación intrauterina de los animales favorece la disfunción mitocondrial que afecta la función hepática postnatal y conduce al síndrome metabólico. En agregado, Ramírez-Oseguera y col. (2013) comunicaron que la malnutrición gestacional modifica la composición de las membranas tubulares transversales musculares esqueléticas y las propiedades mecánicas de los músculos de ratas recién nacidas.

El modelo experimental de malnutrición en monos (*Saimiri sciureus boliviensis*) permitió hacer una correlación entre la morfología de la pituitaria y el estudio longitudinal del crecimiento-desarrollo de los componentes neurocraneano-faciales y de la longitud de los huesos largos, considerando la incidencia de los **factores intrínsecos** (edad, sexo, estructura corporal) y **extrínsecos** (nutrición, condiciones sociales, medio ambiente) (Corner and Richtsmeier, 1992; Dressino y Pucciarelli, 1997 y 1999; Pucciarelli y col., 2000). Nuestros estudios en monos malnutridos (Cónsole y col., 2001a-b) comunicaron un descenso en el número de somatotropas, así como marcados cambios ultraestructurales. En con-

and confirms the impact of IUGR restriction in postnatal growth. Dressino et al. (2002) analyzed body and brain growth in rats with IUGR subjected to intrauterine stress, showing that prenatal stress may modify growth and sexual dimorphism.

Hemb et al. (2010) evaluated the effects of undernourishment in rat pups and founded a decrease of body and brain weight as well as of spatial memory. Kohmura et al. (2013) reported association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment in the utero. Morris et al. (2009) established a link between gestational undernourishment and the development of metabolic and cardiovascular diseases in the adult life. The alterations in the maternal nutritional state led to changes in the development plasticity, in part underpinned by epigenetic changes in gene expression. The intrauterine programming of animals favors the mitochondrial dysfunction which affects the postnatal hepatic function and leads to the metabolic syndrome. In addition, Ramírez-Oseguera et al. (2013) reported that the gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats.

The experimental model of undernourishment in monkeys (*Saimiri sciureus boliviensis*) allowed correlating the morphology of the pituitary and the longitudinal study of the growth and development of the neurocranial and facial components, as well as the length of long bones, taking into account the incidence of **intrinsic** (age, sex, body structure) and **extrinsic** (nutrition, social conditions, environment) **factors** (Corner and Richtsmeier, 1992; Dressino and Pucciarelli, 1997 and 1999; Pucciarelli et al., 2000).

Our studies in malnourished monkeys (Cónsole et al., 2001a-b) reported a decrease in the number of the somatotropes as well as marked ultrastructural changes. In accord with our observations, were reported a decrease in the size of somatotropes and lactotropes in malnourished rats (Medvedev et al., 1995; Hara et al., 1998; Molon-Noblot et al., 2003).

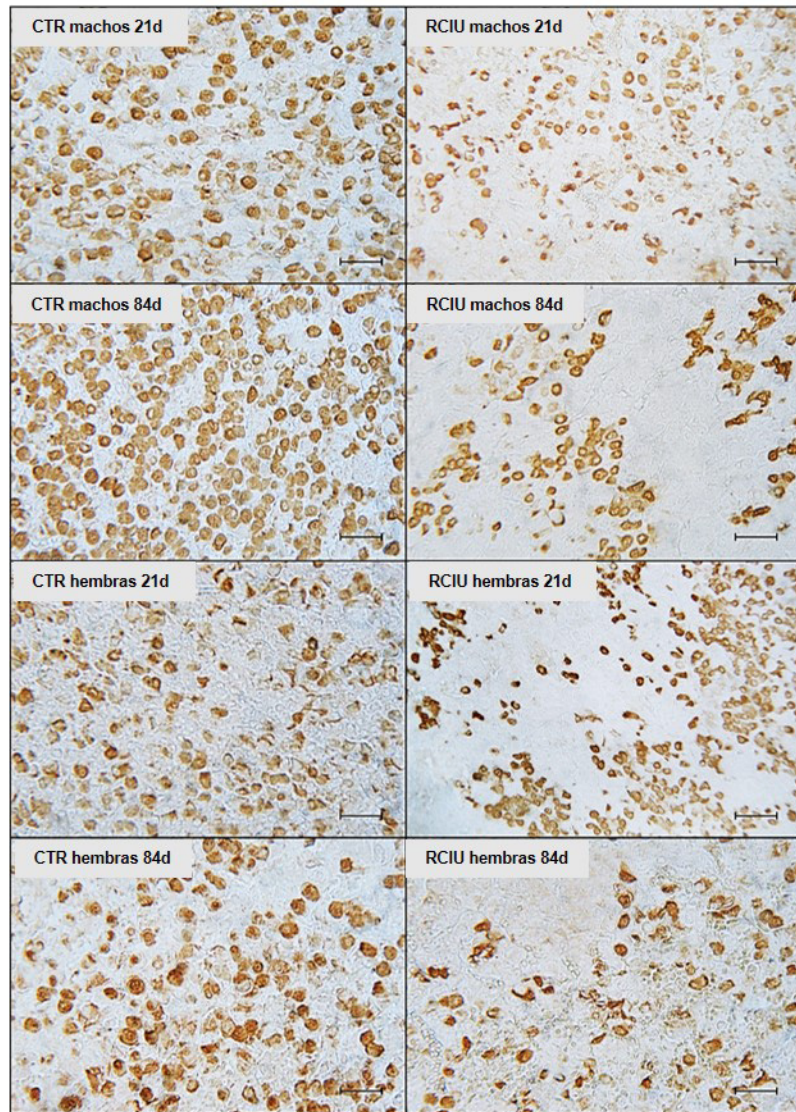


Fig. 16.1. Campos representativos de la población somatotropa. Grupos RCIU y CTR de 21 y 84 días en ambos sexos (EnVision peroxidasa, anti-GH, barra: 30 μ m).

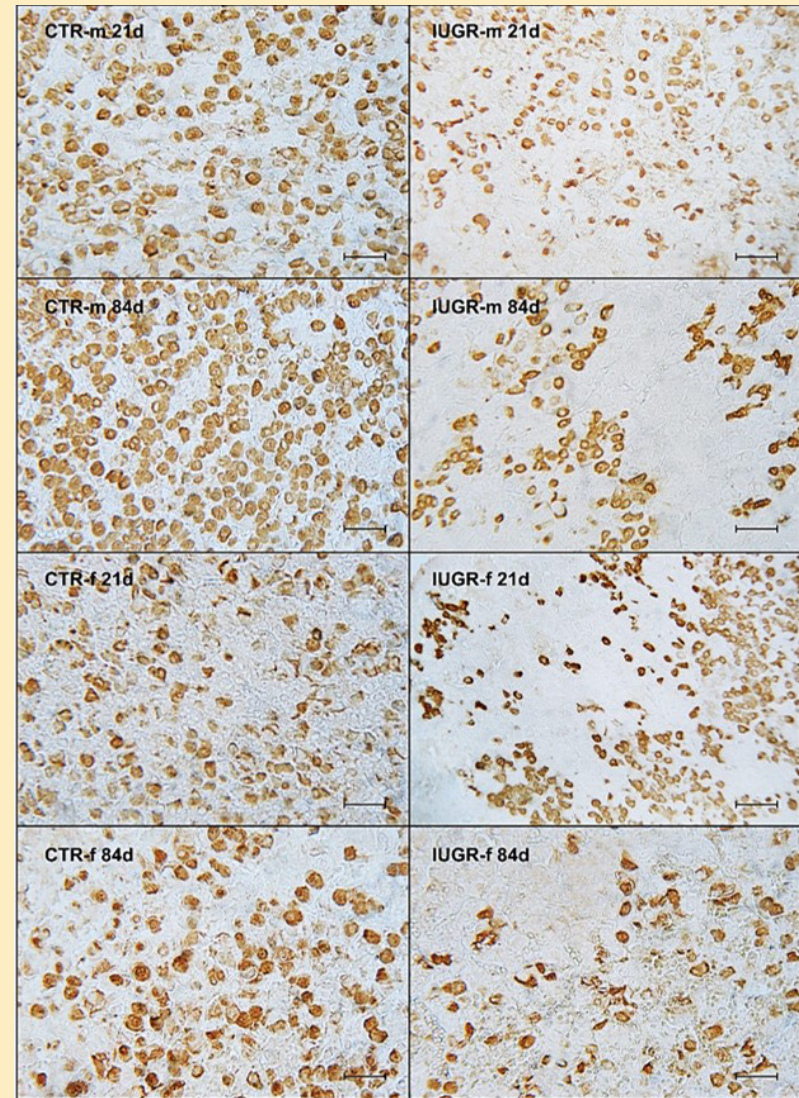


Fig. 16.1. Representative fields of somatotrope population. IUGR and CTR groups of males (m) and females (f) of 21 and 84 days (EnVision peroxidase, anti-GH, scale bar: 30 μ m).

cordancia con nuestras observaciones, se documentó un descenso del tamaño de las somatotropas y lactotropas en ratas malnutridas (Medvedev y col., 1995; Hara y col., 1998; Molon-Noblot y col., 2003). En nuestro modelo se estudiaron los efectos de la injuria prenatal sobre el crecimiento corporal y craneofacial en animales con RCIU y su correlación con los cambios histomorfométricos detectados en la población somatotropa. Nuestro análisis inmunohistoquímico muestra un descenso de la población somatotropa en los grupos RCIU de 21 y 84 días, comparados con los controles (**fig. 16.1**).

El crecimiento retardado a los 84 días de edad disminuyó 13.5% en machos y 9.6% en hembras, respecto a los controles (Oyhenart y col., 2008).

Se han detectado cambios en el análisis histométrico de la población somatotropa de la *pars distalis*. Los RCIU machos y hembras, de 21 y 84 días de edad muestran un descenso significativo ($p < 0.01$) en la densidad de células (DC) y en la densidad de volumen (DV), comparados con los controles (CTR). Los machos tienen valores menores que las hembras (**fig. 16.2 A-B**).

Dicho estudio morfométrico indica un claro descenso de la DC y la DV en la población somatotropa de los grupos RCIU en el destete y ratas adultas jóvenes. Aunque los mecanismos subyacentes no están claros, estaría involucrada la regulación de la GH que es estimulada por la GHRH e inhibida por la somatostatina. Estas observaciones están de acuerdo con la hipótesis que postula: a más severo grado del retardo del crecimiento, mayor tiempo tomará su recuperación (Houdijk y col., 2000).

Los cambios en la programación metabólica de los niños con RCIU comenzaron a explorarse y parece que habría alteraciones en la metilación del ADN y que las “firmas epigenéticas” podrían hallarse en los tejidos fetales. El RCIU predispone a diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular, reducción persistente de la estatura y cambios en el patrón de la pubertad (Chernausek, 2012). Imdad y col. (2011) detectaron y clasificaron el RCIU en la población general y en los embarazos de alto riesgo, estudiando: Doppler en las arterias umbilicales y fetales, masa corporal materna, altura sínfisis-fondo uterino y con-

Our model studied the effects of prenatal injury on body and craniofacial growth in IUGR animals and the correlation with histomorphometric changes detected in the somatotrope population. Our immunohistochemical analysis evidences a decreased somatotrope population in groups IUGR of 21 and 84 days compared to controls (**fig. 16.1**).

Retarded growth at 84 days of age diminishes 13.5% in males and increased 9.6% in females (Oyhenart et al., 2008).

We have detected changes in the histometric analysis of the somatotrope population of the *pars distalis*. Male and female IUGR, of 21 and 84 days of age evidence a significant ($p < 0.01$) decrease in cell density (CD) and volume density (VD), compared to controls (CTR). Males present lower values than females (**fig. 16.2 A-B**).

Such morphometric study indicates a clear decrease of CD and VD in the somatotrope population of IUGR groups at weaning and in young adult rats. Although the underlying mechanisms are not clear, GH regulation would be involved, which is stimulated by GHRH and inhibited by somatostatin. These observations are in agreement with the hypothesis that the more serious the degree of retarded growth is, the longer growth recovery will take (Houdijk et al., 2000).

Changes in the metabolic programming in children with IUGR started to be investigated and apparently there would be alterations in DNA methylation and the ‘epigenetic signatures’ might be found in fetal tissues. Among the multiple affections caused by IUGR we can include predisposition to type 2 diabetes, the metabolic syndrome, cardiovascular disease, persistent reduction in stature, and possibly changes in the pattern of puberty (Chernausek, 2012). Imdad et al. (2011) detected and classified IUGR in general population and in high risk pregnancies applying Doppler velocimetry of umbilical and fetal arteries, detection of maternal BMI, symphysial-fundal height measurement and routine ultrasound monitoring. Adverse conditions in intrauterine life such as IUGR may determine permanent changes in the physiology and metabolism of the newborn that would lead to higher risks of diseases in the

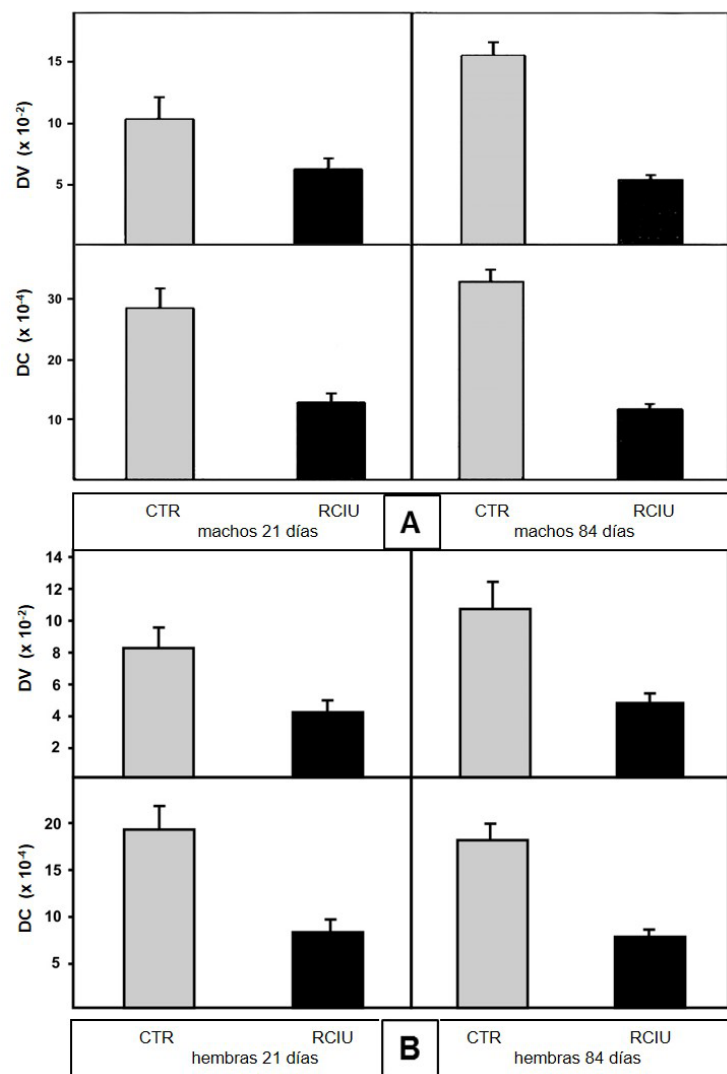


Fig. 16.2 A-B. Morfometría de la población somatotropa. A. Densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) en RCIU machos 21 y 84 días respecto a CTR. **B.** Densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) en RCIU hembras 21 y 84 días respecto a CTR (* $p < 0.01$).

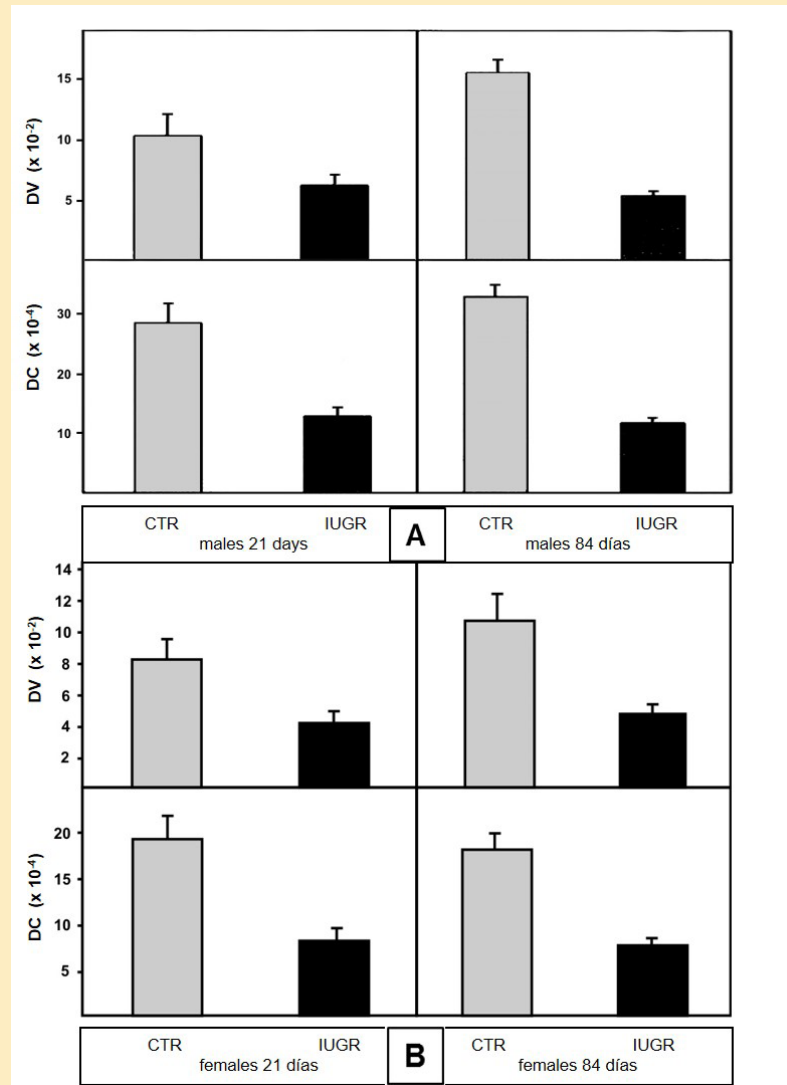


Fig. 16.2 A-B. Morphometry of somatotrope population. A. Volume density (VD) and cell density (CD) in IUGR males (white bar) of 21 and 84 days compared to CTR (grey bar). **B.** Volume density (VD) and cell density (CD) in IUGR females (white bar) of 21 and 84 days compared to CTR (grey bar), * $p < 0.01$.

trol periódico con ultrasonido. Las condiciones adversas durante la vida intrauterina como es el RCIU, pueden determinar cambios permanentes en la fisiología y en el metabolismo del recién nacido que conducirían a un mayor riesgo de enfermedades en la vida adulta. Se están utilizando nuevos biomarcadores como endotelina-1, leptina, proteína S100B y visfatina para su evaluación (Dessi y col., 2012).

Hack y col. (1991) comunicaron el efecto del muy bajo peso al nacer sobre las habilidades cognitivas y mostraron un descenso en la circunferencia cefálica debajo de lo normal, a los 8 meses de vida. Karlberg y col. (1997) señalaron que muchos niños con RCIU se recuperaron dentro de los primeros 2 años de vida, pero una significativa fracción (15 a 40%) no lo hizo. Frisk y col. (2002) estudiaron los patrones de crecimiento de la cabeza para predecir las capacidades cognitivas de los niños en edad escolar. El RCIU enlenteció el crecimiento cerebral y afectó las habilidades cognitivas, incluso cuando se recuperaron en el período postnatal. El RCIU por insuficiencia placentaria es causa importante de mortalidad y morbilidad perinatal y se asocia con trastornos en el neurodesarrollo que implican alteración de la función cognitiva y de la atención. Tolsa y col. (2004) estudiaron niños prematuros con RCIU, midieron los volúmenes de tejido cerebral mediante resonancia magnética y hallaron correlación entre volumen de sustancia gris cortical cerebral y las habilidades cognitivas y de atención. Hay evidencia clínica de que la hipoxemia fetal determina una mala evolución neurológica del recién nacido. Mallard y col. (1998) analizaron los efectos de la hipoxia fetal por alteración de la función placentaria sobre el desarrollo cerebral en fetos de ovejas y hallaron alteraciones en la mielinización y en el desarrollo cerebeloso. En conejillos de Indias, la restricción del crecimiento intrauterino, por disminución del flujo placentario en la segunda mitad de la preñez, determinó una reducción del número de neuronas en el hipocampo y en el cerebelo, con deficiencias neurológicas que afectaron las conductas postnatales (Mallard y col., 2000).

El neuropeptido Y (NPY) estimuló la secreción de la somatostatina e inhibió indirectamente la secreción de GH (Tannenbaum, 1991; Gius-

adult life. New biomarkers such as endothelin-1, leptin, protein S100B and visfatin are being used (Dessi et al., 2012).

Hack et al. (1991) reported that very low birth weight affects cognitive abilities and subnormal head size at eight months of age. Karlberg et al. (1997) indicated that many infants with IUGR recovered during the first two years of age, but a significant fraction (15 to 40%) did not. Frisk et al. (2002) studied the head growth patterns to predict the cognitive abilities of school-age children and found that brain growth was slower and affected cognitive skills, even when they recovered during the postnatal period. Placental insufficiency leading to IUGR is an important cause of perinatal mortality and morbidity and is associated with neurodevelopmental disorders that imply the alteration of the cognitive function and deficits in attention. Tolsa et al. (2004) studied premature infants with IUGR, their *brain tissue volume measurement* from magnetic resonance imaging and found correlation between the volume of cerebral cortical grey matter and cognitive abilities and attention. Clinical evidence shows that fetal hypoxemia has bad implications for the neurodevelopment of the newborn. Mallard et al. (1998) analyzed the effects of fetal hypoxia due to alterations of the placental function on the brain development of sheep fetuses and found alterations in myelination and cerebellar development. In Guinea pigs, intrauterine growth restriction due to diminished placental flow in the second half of pregnancy determined a reduced number of neurons in the hippocampus and in the cerebellum with neurologic deficiencies that affect post-natal behavior (Mallard et al., 2000).

Neuropeptide Y (NPY) stimulated somatostatin secretion and directly inhibited GH secretion (Tannenbaum, 1991; Giustina and Veldhuis, 1998). It has been speculated that during the postnatal phase, when growth is controlled by the somatotrope axis, retarded growth in IUGR rats would be caused by a pituitary activity of somatostatin neurons inhibiting GH secretion (Huizinga et al., 2000). Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y were determined by IUGR, with an increase in the expression of mRNA in the para-

tina y Veldhuis, 1998). Durante la fase postnatal, cuando el crecimiento está bajo el control del eje somatotropo, el retardo de crecimiento en ratas RCIU sería causado por una actividad hipotalámica de las neuronas de somatostatina que actúan como inhibidoras de la secreción de GH (Huizinga y col., 2000). El RCIU determinó cambios persistentes en la somatostatina y en el neuropéptido Y, con aumento de la expresión del ARNm en el núcleo paraventricular, pero sin alteración del ARNm de la GHRH en el núcleo arcuato (Huizinga y col., 2001). Los factores de crecimiento insulino-símiles (IGFs) tienen un papel predominante en el crecimiento y desarrollo fetal, estando implicados en la proliferación, diferenciación, y apoptosis de las células fetales. Además, en seres humanos se han detectado varios defectos moleculares en los genes del IGF-I y su receptor que se han asociado con un grave retraso del crecimiento intrauterino y con un deterioro en la maduración del esqueleto. Los datos contradictorios de las observaciones de la morfogénesis ósea *in vitro* e *in vivo* sugieren que los IGFs no serían los únicos factores tróficos implicados (Agrogiannis y col., 2014)

Concluyendo, el momento y la duración de la injuria parecen ser cruciales para la recuperación del peso corporal y del crecimiento craneano en la rata. A pesar de la tendencia a un descenso de las diferencias en animales adultos, el neurocráneo permaneció más reducido y la cara exhibió una recuperación parcial. Las diferencias cuantitativas detectadas entre controles y RCIU en la población somatotropa serían responsables de una ausencia de recuperación del crecimiento, sugiriendo que el RCIU tiene un efecto a largo plazo sobre el eje somatotropo.

Referencias

Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Mol Med Rep* 2014; 10(2):579-584.

ventricular nucleus, but with no alterations of the GHRH mRNA in the arcuate nucleus (Huizinga et al., 2001). Insulin-like growth factors (IGFs) play a predominant role in fetal growth and development, and are involved in the proliferation, differentiation and apoptosis of fetal cells. Also, human beings have evidenced several molecular defects in IGF-I genes and its receptor associate with a severe retarded intrauterine growth and with deterioration of skeletal maturation. Contradictory data of the observations of bone morphogenesis *in vitro* and *in vivo* suggest that IGFs would not be the only trophic factors involved (Agrogiannis et al., 2014).

To conclude, the injury time and maturation period seem to be essential for the recovery of body weight and cranial growth in the rat. Despite the tendency to decreased differences in adult animals, the neurocranium remained more reduced and the face exhibited a partial recovery. The quantitative differences detected between controls and IUGR in the somatotrope population would be responsible for the lack of growth recovery, thus suggesting that IUGR has a long term effect on the somatotrope axis.

References

- Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Mol Med Rep* 2014; 10(2):579-584.
- Alvarez PS, Simao F, Hemb M, Xavier LL, Nunez ML. Effects of undernourishment, recurrent seizures and enriched environment during early life in hippocampal morphology. *Int J Dev Neurosci* 2014; 33:81-87.
- Brogan RS, Fife SK, Conley LK, Giustina A, Wehrenberg WB. Effects of food deprivation on the GH axis: immunocytochemical and molecular analysis. *Neuroendocrinology* 1997; 65(2):129-135.

- Alvarez PS, Simao F, Hemb M, Xavier LL, Nunez ML. Effects of undernourishment, recurrent seizures and enriched environment during early life in hippocampal morphology. *Int J Dev Neurosci* 2014; 33:81-87.
- Brogan RS, Fife SK, Conley LK, Giustina A, Wehrenberg WB. Effects of food deprivation on the GH axis: immunocytochemical and molecular analysis. *Neuroendocrinology* 1997; 65(2):129-135.
- Bussey ME, Finley S, Labarbera A, Ogata ES. Hypoglycemia in the newborn growth-retarded rat: delayed phosphoenolpyruvate carboxykinase induction despite increased glucagon availability. *Pediatr Res* 1985; 19(4):363-367.
- Cheek DB, Hull DE. Effect of growth hormone on cell and somatic growth. In *Handbook of Physiology Endocrinology*. In: Greep, Astwood, Waverley, Baltimore 1974:159-183.
- Chernauek SD. Update: consequences of abnormal fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(3):689-695.
- Chevered JM. Relationships among ontogenetic, static, and evolutionary allometry. *Am J Phys Anthropol* 1982; 59(2):139-149.
- Cónsole GM, Jurado SB, Oyhenart E, Ferese C, Pucciarelli HN, Gómez Dumm CL. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz J Med Biol Res* 2001a; 34(1):65-74.
- Cónsole GM, Oyhenart EE, Jurado SB, Riccillo FL, Pucciarelli HM, Gómez Dumm CL. Effect of undernutrition on cranial components and somatotroph-lactotroph pituitary populations in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*). *Cells Tissues Organs* 2001b; 168(4):272-284.
- Corner BD, Richtsmeier JT. Cranial growth in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a quantitative analysis using three dimensional coordinate data. *Am J Physiol Anthropol* 1992; 87(1):67-81.
- Dessi A, Ottonello T, Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(Suppl 5):13-18.
- Bussey ME, Finley S, Labarbera A, Ogata ES. Hypoglycemia in the newborn growth-retarded rat: delayed phosphoenolpyruvate carboxykinase induction despite increased glucagon availability. *Pediatr Res* 1985; 19(4):363-367.
- Cheek DB, Hull DE. Effect of growth hormone on cell and somatic growth. In *Handbook of Physiology Endocrinology*. In: Greep, Astwood, Waverley, Baltimore 1974:159-183.
- Chernauek SD. Update: consequences of abnormal fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(3):689-695.
- Chevered JM. Relationships among ontogenetic, static, and evolutionary allometry. *Am J Phys Anthropol* 1982; 59(2):139-149.
- Cónsole GM, Jurado SB, Oyhenart E, Ferese C, Pucciarelli HN, Gómez Dumm CL. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz J Med Biol Res* 2001a; 34(1):65-74.
- Cónsole GM, Oyhenart EE, Jurado SB, Riccillo FL, Pucciarelli HM, Gómez Dumm CL. Effect of undernutrition on cranial components and somatotroph-lactotroph pituitary populations in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*). *Cells Tissues Organs* 2001b; 168(4):272-284.
- Corner BD, Richtsmeier JT. Cranial growth in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a quantitative analysis using three dimensional coordinate data. *Am J Physiol Anthropol* 1992; 87(1):67-81.
- Dessi A, Ottonello T, Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(Suppl 5):13-18.
- Dressino V, Orden B, Oyhenart EE. Sexual responses to intrauterine stress: body and brain growth. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):100-102.
- Dressino V, Pucciarelli HM. Cranial growth in *Saimiri sciureus* (Cebidae) and its alteration by nutritional factors: a longitudinal study. *Am J Phys Anthropol* 1997; 102(4):545-554.

Dressino V, Orden B, Oyhenart EE. Sexual responses to intrauterine stress: body and brain growth. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):100-102.

Dressino V, Pucciarelli HM. Cranial growth in *Saimiri sciureus* (Cebidae) and its alteration by nutritional factors: a longitudinal study. *Am J Phys Anthropol* 1997; 102(4):545-554.

Dressino V, Pucciarelli HM. Growth of the functional cranial components in *Saimiri sciureus boliviensis* (Cebidae): a longitudinal study. *Growth Dev Aging* 1999; 63(3):111-127.

Falkner F, Holzgreve W, Schloo RH. Prenatal influences on postnatal growth: overview and pointers for needed research. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(Suppl 1):15-22.

Fields HW. Craniofacial growth from infancy through adulthood. Background and clinical implications. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38(5):1053-88.

Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 2004; 127(5):515-526.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005; 81(9):723-734.

Frisk V, Amsel R, Whyte HE. The importance of head growth patterns in predicting the cognitive abilities and literacy skills of small-for-gestational-age children. *Dev Neuropsychol* 2002; 22(3):565-593.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998; 19(6):717-797.

Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod* 2003; 61:195-206.

Guimarey LM, Quintero FA, Orden AB, Fucini MC, Oyhenart EE. Catch-up in body weight of intrauterine growth retarded (IUGR) rats castrated and treated with growth hormone. *Growth Dev Aging* 2005; 69(2):89-99.

Dressino V, Pucciarelli HM. Growth of the functional cranial components in *Saimiri sciureus boliviensis* (Cebidae): a longitudinal study. *Growth Dev Aging* 1999; 63(3):111-127.

Falkner F, Holzgreve W, Schloo RH. Prenatal influences on postnatal growth: overview and pointers for needed research. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48(Suppl 1):15-22.

Fields HW. Craniofacial growth from infancy through adulthood. Background and clinical implications. *Pediatr Clin North Am* 1991; 38(5):1053-88.

Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 2004; 127(5):515-526.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005; 81(9):723-734.

Frisk V, Amsel R, Whyte HE. The importance of head growth patterns in predicting the cognitive abilities and literacy skills of small-for-gestational-age children. *Dev Neuropsychol* 2002; 22(3):565-593.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 1998; 19(6):717-797.

Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod* 2003; 61:195-206.

Guimarey LM, Quintero FA, Orden AB, Fucini MC, Oyhenart EE. Catch-up in body weight of intrauterine growth retarded (IUGR) rats castrated and treated with growth hormone. *Growth Dev Aging* 2005; 69(2):89-99.

Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawski E. Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *N Engl Med* 1991; 325(4):231-237.

Hara M, Herbert DC, Taniguchi T, Hattori A, Ohtani-Kaneko R, Ligo M, Kato Y, Hirata K. Effects of a low-protein diet on prolactin- and

- Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawski E. Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *N Engl Med* 1991; 325(4):231-237.
- Hara M, Herbert DC, Taniguchi T, Hattori A, Ohtani-Kaneko R, Ligo M, Kato Y, Hirata K. Effects of a low-protein diet on prolactin- and growth hormone-producing cells in the rat pituitary gland. *Anat Rec* 1998; 251(1):37-43.
- Hemb M, Cammarota M, Nunez ML. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28(4):303-307.
- Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 2000; 166(3):599-608.
- Huizinga CT, Engelbregt MJ, Rekers-Mombarg LT, Vaessen SF, Delemarre-van de Waal HA, Fodor M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction-animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004; 62(5):33-40.
- Huizinga CT, Oudejans CB, Delemarre-van de Waal HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol* 2001; 168(2):273-281.
- Huizinga CT, Oudejans CB, Steiner RA, Clifton DK, Delemarre-van de Waal HA. Effects of intrauterine and early postnatal growth restriction on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat. *Pediatr Res* 2000; 48(6):815-820.
- Imdad A, Yakoo MY, Siddiqui S, Bhutta ZA. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 11(Suppl 3):S1.
- growth hormone-producing cells in the rat pituitary gland. *Anat Rec* 1998; 251(1):37-43.
- Hemb M, Cammarota M, Nunez ML. Effects of early malnutrition, isolation and seizures on memory and spatial learning in the developing rat. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28(4):303-307.
- Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 2000; 166(3):599-608.
- Huizinga CT, Engelbregt MJ, Rekers-Mombarg LT, Vaessen SF, Delemarre-van de Waal HA, Fodor M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction-animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004; 62(5):33-40.
- Huizinga CT, Oudejans CB, Delemarre-van de Waal HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol* 2001; 168(2):273-281.
- Huizinga CT, Oudejans CB, Steiner RA, Clifton DK, Delemarre-van de Waal HA. Effects of intrauterine and early postnatal growth restriction on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat. *Pediatr Res* 2000; 48(6):815-820.
- Imdad A, Yakoo MY, Siddiqui S, Bhutta ZA. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 11(Suppl 3): S1.
- Karlberg JP, Altbjersson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC. The timing of early postnatal catch up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1997; 48(Suppl 1):17-24.
- Klammt J, Pfaffle R, Werner H, Kiess W. IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(6):197-205.

- Karlberg JP, Altbjörnsdóttir K, Kwan EY, Lam BC, Low LC. The timing of early postnatal catch up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1997; 48(Suppl 1):17-24.
- Klammt J, Pfaffle R, Werner H, Kiess W. IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(6):197-205.
- Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Sussuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H. Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment. *Reprod Sci* 2013; 20(7):813-827.
- Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, De-loof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006; 9(4):183-198.
- Mallard C, Loeliger M, Copolo D, Rees S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 2000; 100(2):327-333.
- Mallard EC, Rees S, Stringer M, Cock ML, Harding R. Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. *Pediatr Res* 1998; 43(2):262-270.
- Medvedev DI, Babichenko II, Savrova OB, Eremia IZ, Kravtsova AI. The morphological state of the adenohipophyseal somatotrophs during body development under conditions of protein-energy insufficiency. *Aviakosm Ekolog Med* 1995; 29(3):28-31.
- Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J Nutr* 1999; 129(11):2061-69.
- Molon-Noblot S, Laroque P, Coleman JB, Hoe CM, Keenan KP. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pituitary gland pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003; 31(3):310-320.
- Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Sussuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H. Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment. *Reprod Sci* 2013; 20(7):813-827.
- Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, De-loof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006; 9(4):183-198.
- Mallard C, Loeliger M, Copolo D, Rees S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* 2000; 100(2):327-333.
- Mallard EC, Rees S, Stringer M, Cock ML, Harding R. Effects of chronic placental insufficiency on brain development in fetal sheep. *Pediatr Res* 1998; 43(2):262-270.
- Medvedev DI, Babichenko II, Savrova OB, Eremia IZ, Kravtsova AI. The morphological state of the adenohipophyseal somatotrophs during body development under conditions of protein-energy insufficiency. *Aviakosm Ekolog Med* 1995; 29(3):28-31.
- Miller JP, German RZ. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J Nutr* 1999; 129(11):2061-69.
- Molon-Noblot S, Laroque P, Coleman JB, Hoe CM, Keenan KP. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pituitary gland pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2003; 31(3):310-320.
- Morris TJ, Vickers M, Gluckman P, Gilmour S, Affara N. Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the development variations in metabolic traits. *PLoS One* 2009; 4(9):e7271.
- Ogata ES, Swanson SL, Collins JW, Finley S. Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. *Pediatr Res* 1990; 27(1):56-63.

Morris TJ, Vickers M, Gluckman P, Gilmour S, Affara N. Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the development variations in metabolic traits. *PLoS One* 2009; 4(9):e7271.

Ogata ES, Swanson SL, Collins JW, Finley S. Intrauterine growth retardation: altered hepatic energy and redox states in the fetal rat. *Pediatr Res* 1990; 27(1):56-63.

Oyhenart EE, Cesani MF, Castro LE, Quintero FA, Fucini MC, Luna ME, Guimarey LM. Bone growth and sexual dimorphism at birth in intrauterine-growth-retarded rats. *Anat Sci Int* 2011; 86(3):119-127.

Oyhenart EE, Guimarey LM, Fucini MC, Quintero FA, Orden B. Effects of bilateral uterine vessel ligation on skeletal growth in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):121-125.

Oyhenart EE, Muñe C, Pucciarelli HM. Influence of intrauterine blood supply on cranial growth and sexual dimorphism at birth. *Growth Dev Aging* 1998; 62(4):187-198.

Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Dev Aging* 2003; 67(2):73-83.

Oyhenart EE, Quintero FA, Orden AB, Fucini MC, Guimarey LM, Carino M, Ferese C, Cónsole GM. Catch-up growth in intrauterine growth retarded rats: its correlation with histomorphometric changes of the pituitary somatotrope cells. *Eur J Anat* 2008; 12(1):115-122.

Phillips LS. Nutrition, somatomedins, and the brain. *Metabolism* 1986; 35(1):78-87.

Pimstone BL. Endocrine function in protein calorie malnutrition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976; 5(1):79-95.

Pucciarelli HM, Muñe MC, Oyhenart EE, Orden AB, Villanueva ME, Rodríguez RR, Pons ER. Growth of skeletal components in the young squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*): a longitudinal experiment. *Am J Phys Anthropol* 2000; 112(1):57-68.

Pucciarelli HM. Growth of the functional components of the rat skull and its alterations by nutritional effects. *Am J Phys Anthropol* 1981; 56:33-41.

Oyhenart EE, Cesani MF, Castro LE, Quintero FA, Fucini MC, Luna ME, Guimarey LM. Bone growth and sexual dimorphism at birth in intrauterine-growth-retarded rats. *Anat Sci Int* 2011; 86(3):119-127.

Oyhenart EE, Guimarey LM, Fucini MC, Quintero FA, Orden B. Effects of bilateral uterine vessel ligation on skeletal growth in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2002; 29(2):121-125.

Oyhenart EE, Muñe C, Pucciarelli HM. Influence of intrauterine blood supply on cranial growth and sexual dimorphism at birth. *Growth Dev Aging* 1998; 62(4):187-198.

Oyhenart EE, Orden B, Fucini MC, Muñe MC, Pucciarelli HM. Sexual dimorphism and postnatal growth of intrauterine growth retarded rats. *Growth Dev Aging* 2003; 67(2):73-83.

Oyhenart EE, Quintero FA, Orden AB, Fucini MC, Guimarey LM, Carino M, Ferese C, Cónsole GM. Catch-up growth in intrauterine growth retarded rats: its correlation with histomorphometric changes of the pituitary somatotrope cells. *Eur J Anat* 2008; 12(1):115-122.

Phillips LS. Nutrition, somatomedins, and the brain. *Metabolism* 1986; 35(1):78-87.

Pimstone BL. Endocrine function in protein calorie malnutrition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976; 5(1):79-95.

Pucciarelli HM, Muñe MC, Oyhenart EE, Orden AB, Villanueva ME, Rodríguez RR, Pons ER. Growth of skeletal components in the young squirrel monkey (*Saimiri sciureus boliviensis*): a longitudinal experiment. *Am J Phys Anthropol* 2000; 112(1):57-68.

Pucciarelli HM. Growth of the functional components of the rat skull and its alterations by nutritional effects. *Am J Phys Anthropol* 1981; 56:33-41.

Quintero FA, Castro LE, Luna ME, Guimarey LM, Cesani MF, Fucini MC, Villanueva M, Prio V, Oyhenart EE. Growth of functional cranial components in rats with intrauterine growth retardation after treatment with growth hormone. *Eur J Orthod* 2012; 34(6):710-718.

Ramírez Oseguera RT, Jiménez-Garduño AM, Alvarez R, Heine K, Pinzón-Estrada E, Torres-Saldaña I, Ortega A. Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse

Quintero FA, Castro LE, Luna ME, Guimarey LM, Cesani MF, Fucini MC, Villanueva M, Prio V, Oyhenart EE. Growth of functional cranial components in rats with intrauterine growth retardation after treatment with growth hormone. *Eur J Orthod* 2012; 34(6):710-718.

Ramírez_oseguera RT, Jiménez-Garduño AM, Alvarez R, Heine K, Pinzón-Estrada E, Torres-Saldaña I, Ortega A. Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(4):1024-1039.

Tannenbaum GS. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Acta Paediatr Scand* 1991; Suppl 372:5-16.

Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Sancho Rossignol A, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Huppi PS. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56(1):132-138.

tubule membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(4):1024-1039.

Tannenbaum GS. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Acta Paediatr Scand* 1991; Suppl 372:5-16.

Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Sancho Rossignol A, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Huppi PS. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56(1):132-138.

CAPÍTULO 17

Fotoperíodos: cambios morfológicos en las poblaciones lactotropa y gonadotropa

Se postulan dos principales mecanismos biológicos temporales que han evolucionado para la adaptación al medio: **A. Reloj circanual** (1 año). **B. Reloj circadiano** (24 hs) que controla el fotoperíodo. Sáenz de Miera y col. (2014) estudiaron los genes centrales de la reproducción en hámsteres machos europeos y detectaron un reloj circanual.

Hazlerigg y Lincoln (2011) ofrecen 4 argumentos que apoyan la hipótesis de la histogénesis cíclica en el ritmo circanual: **A.** Es un proceso frecuente en la remodelación estacional fisiológica y opera en tiempos largos autónomos. **B.** Los experimentos en los que se seleccionan señales endocrinas periféricas constantes, el ritmo circanual no es el producto de los mecanismos de retroalimentación hormonal. **C.** Las hormonas que controlan la proliferación, diferenciación y organogénesis afectan profundamente el ritmo circanual. **D.** El punto de convergencia entre las vías de entrada fotoperiódicas y la expresión del ritmo circanual se produce a nivel hipotálamo-hipofisario.

CHAPTER 17

Photoperiods: morphological changes in the lactotrope and gonadotrope populations

Two main physiological mechanisms have evolved for the adaptation to environment: **A. Circannual clock** (1 year). **B. Circadian clock** (24 h) that controls the photoperiod. Sáenz de Miera et al. (2014) studied the genes central for seasonal reproduction in male European hamsters and detected a circannual clock.

Hazlerigg and Lincoln (2011) offer 4 arguments in support of the hypothesis of the cyclical histogenesis in the circannual rhythm: **A.** It is a prevalent process in seasonal remodeling of physiology and it operates over long time. **B.** Experiments in which selected peripheral endocrine signals are held constant indicate that circannual rhythms are not primarily the product of interacting hormonal feedback. **C.** Hormones known to control proliferation, differentiation, and organogenesis profoundly affect circannual rhythm. **D.** The convergence

La respuesta fisiológica adecuada para cambiar el fotoperíodo en mamíferos requiere la detección de la luz en la retina y de la secreción de melatonina en la glándula pineal. Además, estos sistemas alteran la conversión hipotalámica de la hormona tiroidea (HT) y el reloj circadiano de la *pars tuberalis* se vincula con la decodificación del fotoperíodo, induciendo cambios de la HT en el hipotálamo mediobasal (Dardente y col., 2014).

La capacidad de medir la duración del día (fotoperíodo) es un rasgo sujeto a una intensa presión evolutiva. Estudios recientes documentaron la expresión de la HT en una población especializada de células fotoperiódicas sensibles en el tallo pituitario que a su vez regulan su metabolismo en el hipotálamo basal. Sería una vía de control ancestral que parece originarse antes de la divergencia de los linajes de vertebrados mamíferos y aves (Hazlerigg, 2012).

El cambio estacional en la HT es crucial y está mediado por enzimas de las células endocrinas especializadas que tapizan el tercer ventrículo. La desiodinasa de tipo 2 se activa con la longitud del día de verano y convierte la tiroxina (T4) inactiva en triiodotironina (T3) activa. Además, la *pars tuberalis* tiene células especializadas tirotrópicas que expresan TSH y son reguladas por la señal de la duración del día que lleva a la activación de TSH para los días largos. Dichas células actúan sobre los receptores de TSH expresados en las células endocrinas, causando la regulación local de las desiodinasas y la conversión de TH a la T3 metabólicamente activa.

En los mamíferos, la *pars tuberalis* está regulada por la melatonina nocturna. El temporizador local pituitario impulsado por la melatonina inicia una cascada de eventos moleculares dirigido por el regulador de transcripción que se traduce en cambios estacionales de la actividad neuroendocrina (Wood y Loudon, 2014).

La señal fotoperiódica en mamíferos es mediada por cambios en la melatonina que conduce a alteración en la expresión de los genes, de los circuitos neuronales y de la secreción hormonal. El hipocampo es una de las estructuras más plásticas del cerebro adulto y la morfo-

point between photoperiodic input pathways occurs in histogenic regions of hypothalamus and pituitary.

The appropriate physiological response to changing photoperiod in mammals requires retinal detection of light and pineal secretion of melatonin. Also, these systems alter the thyroid hormone (TH) conversion and the circadian clock within the *pars tuberalis* links photoperiod decoding to local changes of TH in the mediobasal hypothalamus (Dardente et al., 2014).

The capacity to measure day length (photoperiod) is a trait subject to intense evolutionary pressure. Recent studies documented the expression of thyroid hormone (TH) by a specialized population of photoperiodically sensitive cells in the pituitary stalk which in turn govern their metabolism in the basal hypothalamus. This ancestral control pathway appears to have originated prior to the divergence of mammalian and avian vertebrate (Hazlerigg, 2012).

Seasonal change in thyroid hormone (TH) is a crucial element and it is mediated by enzymes within specialized ependymal cells lining the third ventricle. Deiodinase type 2 is activated in response to summer day length, converting metabolically inactive thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3). In addition, the *pars tuberalis* has specialized thyrotrope cells (TSH-expressing) and are regulated by the changing day-length signal, leading to activation of TSH by long days. These act on the TSH-receptors expressed in the ependymal cells, causing local regulation of deiodinase enzymes and the conversion of TH to the metabolically active T3.

In mammals, the *pars tuberalis* is regulated by the nocturnal melatonin signal. The pituitary local timer, driven by melatonin, initiates a cascade of molecular events, led by a transcription regulator, which translates to seasonal changes of neuroendocrine activity (Wood and Loudon, 2014). The photoperiodic signal is mediated by changes in the melatonin, leading to alterations in gene expression, neuronal circuits, and hormonal secretion. The hippocampus is one of the most plastic

logía neuronal de dicha región muestra diferencias inducidas por el fotoperíodo en los hámsteres siberianos, según lo documentado por Ikeno y col. (2013).

Existe universalidad y diversidad en la traducción de la señal que regula la temporada de reproducción en los vertebrados (Nakane y Yoshimura, 2014). Los cambios estacionales en el ciclo reproductivo de numerosas especies de mamíferos dependen de la longitud del fotoperíodo (Piezzi y col., 1984; Steger y col., 1985 a; van Tienhoven, 1986).

La luz es el estímulo más importante para la sincronización de los ritmos circadianos y estacionales. La duración del fotoperíodo es clave para que los animales con memoria fotoperiódica puedan sobrevivir. El sistema visual circadiano responde con sólo 3 flashes de 2 milisegundos entregados a los hámsteres durante 5 a 60 minutos y se requieren 10 parpadeos para la inducción de proteínas específicas en el núcleo supraquiasmático (Vidal y Morin, 2007).

El reloj circadiano de los mamíferos organiza los procesos rítmicos metabólicos, fisiológicos y conductuales, teniendo su expresión anatómica a nivel del hipotálamo. La adaptación al medio ambiente requiere de un ajuste preciso del reloj circadiano en ciclos de luz-oscuridad.

Las fuentes eferentes del sistema nervioso serían el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la arginina-vasopresina (AVP). Parecen existir mecanismos de gran plasticidad a nivel de los circuitos astrocítico y neuronales que relacionarían la sincronización luz/oscuridad en el núcleo supraquiasmático (Bosler y col., 2009). Dicha plasticidad del sistema circadiano se observa en todos los niveles: expresión génica, estabilidad de las proteínas y localización subcelular de proteínas clave, logrando un ajuste fino de la red y de la modulación de las señales para sincronizar la biología interna en un entorno cambiante (Muraro y col., 2013).

El factor de transcripción génico de la glándula pineal y del hígado en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) se adapta a las condiciones de iluminación ambiental: **fotoperíodos largos (FL)** y **fotoperíodos cortos (FC)**, adecuándose a los parámetros endocrinos y metabó-

structures in the adult brain and hippocampal neuronal morphology displays photoperiod-induced differences in Siberian hamsters, in agreement with Ikeno et al. (2013).

Birds and mammals integrate environmental cues with their internal clocks and prepare the seasonal physiological changes. Melatonin is used as an endocrine index of day/night length and TSH as a seasonal regulator. Both of these hormones are shown to act via photoperiodic axis constituted by photoreceptors, hypothalamus and pituitary. Recent studies have revealed that the *pars tuberalis* that connects hypothalamus-pituitary and locally synthesizes TSH in response to light (birds) or melatonin (mammals) (Rani and Kumar, 2014).

There is universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. (Nakane and Yoshimura, 2014). Seasonal changes in the reproductive cycle of numerous mammal species depend on the length of the photoperiod (Piezzi et al., 1984; Steger et al., 1985 a; van Tienhoven, 1986). Light is the most important stimulus for synchronizing circadian and seasonal rhythms. Photoperiod length is the key to the survival for animals with photoperiod memory. The circadian visual system responds with only 3 flashes of 2 milliseconds each delivered to hamsters from 5 to 60 minutes and 10 flashes are required for the induction of specific proteins in the suprachiasmatic nucleus (Vidal and Morin, 2007). The circadian clock of mammals organizes the metabolic, physiological and behavioral rhythm processes, with anatomic expression at hypothalamic level. Adaptation to the environment requires an accurate adjustment of the circadian clock in light-darkness cycles. The efferent projections of the nervous system would be the vasoactive intestinal peptide (VIP) and the arginine-vasopressin (AVP). Apparently, high plasticity mechanisms exist at the level of the neuronal-astrocytic circuits that would relate light-darkness synchronization in the suprachiasmatic nucleus (Bosler et

licos (Maronde y col., 2007). Los hámsteres muestran grandes cambios de fase inducidos por una luz máxima en los FC, al comparar con los FL. Sin embargo, los efectos de la longitud del fotoperíodo siguen siendo desconocidos.

Los hámsteres sirios, sometidos a FL o FC y expuestos a un pulso de luz de 15 minutos (gama de 0-68.03 mW/cm), con aumento de irradiancias, mostraron un mayor reajuste de fases y un incremento de 40 veces de la sensibilidad fótica en el FC. La modulación de la sensibilidad a la luz por el fotoperíodo significa que menos luz es necesaria para provocar una respuesta circadiana (en 24 hs) bajo los días más cortos del invierno y caracteriza los mecanismos que alteran la respuesta fotónica en el fotoperíodo. Estos resultados podrían aplicarse al tratamiento de los ritmos circadianos y a los trastornos afectivos en seres humanos (Reiter, 1991 y Glickman y col., 2012).

La grelina y la serotonina son sensibles a los aumentos y disminuciones de la duración del día y están relacionadas con el núcleo supraquiasmático que es un marcapasos circadiano y la melatonina que es un transductor interno de los cambios ambientales fóticos (Kirsch y Zieba, 2012).

La adaptación del hámster sirio se refleja en los cambios estacionales del ciclo reproductivo. En su medio ambiente natural, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) presenta un incremento en la capacidad reproductiva en primavera-verano, con una severa involución gonadal en otoño-invierno al pasar a FC que cursa con reducción de los niveles séricos de PRL y testosterona (Bartke y col., 1975; 1980 y 1985; Steger y col., 1983).

Los hámsteres del desierto (*Phodopus roborovskii*) bajo FC disminuyeron la masa corporal, elevaron la termogénesis adaptativa, desacoplaron la proteína UCP1 en el tejido adiposo pardo y suprimieron la reproducción al comparar con los animales en FL. No mostraron diferencias en el consumo de energía o en la concentración de leptina. Esta especie del desierto no sería sensible a los cambios en el fotoperíodo (Zhang y col., 2014).

al., 2009). This plasticity of the circadian rhythm is observed at all levels: gene expression, protein stability and subcellular localization of key proteins, and ensures a fine tuning of network properties and modulation of signals to synchronize the internal biology to a changing environment (Muraro et al., 2013).

The gene transcription factor of the pineal gland and the liver of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) adapt themselves to the environmental lighting conditions: **long photoperiods (LP)** and **short photoperiods (SP)**, adjusting to endocrine and metabolic parameters (Maronde et al., 2007). Hamsters evidence important phase changes induced by the highest light in the SP, when compared to the SP. However, the effects of the photoperiod length remained to be unknown.

Syrian hamsters submitted to LP or SP and exposed to 15-minute-pulse light (range of irradiances 0-68.03 mW/cm), with increased irradiances, evidenced a greater phase readjustment and a 40-fold increase of photic sensitivity in the SP. Modulation of light sensitivity due to the photoperiod means that less light is needed to provoke a circadian response (in 24 h) on the shortest winter days and characterizes the mechanisms that alter the photic response in the photoperiod. These results might be applied to the treatment of the circadian rhythms and to the affective disorders in human beings (Reiter, 1991 and Glickman et al., 2012). Ghrelin and serotonin are sensitive to increases and decreases in the day length and are linked to the supra-chiasmatic nucleus, which is a circadian pacemaker, and melatonin, which is an internal transducer of photic environment changes (Kirsch and Zieba, 2012). The adaptation of the Syrian hamster is reflected in the seasonal changes of the reproductive cycle. In its natural environment, the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) presents an increased reproductive capacity in spring and summer, with severe gonadal regression in fall and winter when passing to SP including decreased PRL and testosterone serum levels (Bartke et al., 1975;

Bajo condiciones de luz artificial en el laboratorio, los hámsteres adultos machos sometidos a FL mantienen el tamaño y la función testicular. Al contrario, aquéllos sometidos a FC (menos de 12.5 hs luz/día) sufren severa regresión testicular, inhibición de la espermatogénesis y declinación de los niveles séricos de LH, FSH, PRL (Berndtson y Desjardins, 1974; Bex y Bartke, 1977; Bex y col., 1978; Bartke, 1980 y 1985; Bernard y col., 2000) y descenso en las concentraciones gonadales de testosterona y sus precursores (Desjardins y col., 1971; Chandrashekar y Bartke, 1989; Frungieri y col., 1996a).

El retorno a más de 12.5 horas luz/día reestablece la función gonadal y es denominada “**recrudescencia inducida**” por Berndtson y Desjardins (1974). Cuando los hámsteres machos son sometidos a FC por un período extendido de tiempo, tiene lugar la recuperación gonadal o “**recrudescencia espontánea**” (Turek y col., 1975).

La *pars tuberalis* es un centro importante para la transmisión de información a los circuitos neuroendocrinos fotoperiódicos implicados en la reproducción, metabolismo y comportamiento, enviando señales por vía retrógrada al hipotálamo y por vía anterógrada a la *pars distalis* (Yasou y Kort, 2011). Recientemente se ha detectado un marcapasos circanual en mamíferos (ovejas) responsable de regular el patrón estacional de la PRL que reside en la *pars tuberalis* y expresa receptores de melatonina. Las gonadotropas estarían controladas indirectamente por las células vecinas sensibles a la melatonina, lo que les permite actuar como marcapasos (Hodson y col., 2013).

Los FL estimulan y los FC inhiben la reproducción en los roedores fotoperiódicos, modificando la secreción de la melatonina pineal nocturna. En hámsteres turcos, los FL, a diferencia de otros roedores, la pinealectomía (Px) induce quiescencia reproductiva comparable a los FC, con secreción de GnIH (Piekarski y col., 2014).

Población lactotropa:

Nuestra inmunomarcación en hámsteres sometidos a FC muestra un descenso significativo de la densidad de células (DC) en las semanas 8, 16 y 22 que se recupera a las 28 semanas respecto a los animales sometidos a FL (**fig. 17.1 a-h**) (Cónsole y col., 2002a).

1980 and 1985; Steger et al., 1983). Desert hamsters (*Phodopus roborovskii*) under SP decreased body mass, increased adaptative thermogenesis and uncoupling protein UCP1 in brown adipose tissue, and suppressed reproduction compared to those under LP. But did not show differences in energy intake or serum leptin concentration. This dessert specie is not sensible to change in photoperiod (Zhang et al., 2014). Under artificial laboratory light conditions, male adult hamsters submitted to long photoperiods (LP) maintain the size and testicular function. However, those submitted to short photoperiods (SP: less than 12.5 h light/day) suffer severe testicular regression, inhibition of spermatogenesis and decreased LH, FSH, PRL serum levels (Berndtson and Desjardins, 1974; Bex and Bartke, 1977; Bex et al., 1978; Bartke, 1980 and 1985; Bernard et al., 2000) and diminished gonadal concentrations of testosterone and its precursors (Desjardins et al., 1971; Chandrashekar and Bartke, 1989; Frungieri et al., 1996a). The return to more than 12.5 h light/day reestablishes the gonadal function and was called “**induced recrudescence**” by Berndtson and Desjardins (1974). When male hamsters are submitted to SP for a long period of time, gonadal recovery or “**spontaneous recrudescence**” takes place (Turek et al., 1975). LP stimulates and SP inhibits reproduction in photoperiodic rodents by modifying nocturnal pineal melatonin secretion. In Turkish hamsters, LP, unlike other rodents, pinealectomy (Px) induces reproductive quiescence comparable to that produced by SP, with secretion of GnIH (Piekarski et al., 2014).

Lactotrope population:

Our immunohistochemistry in hamsters submitted to SP evidence a significant decrease of cell density (CD) in weeks 8, 16 and 22 that is later recovered at week 28 compared to animals submitted to LP (**fig. 17.1 a-h**) (Cónsole et al., 2002a).

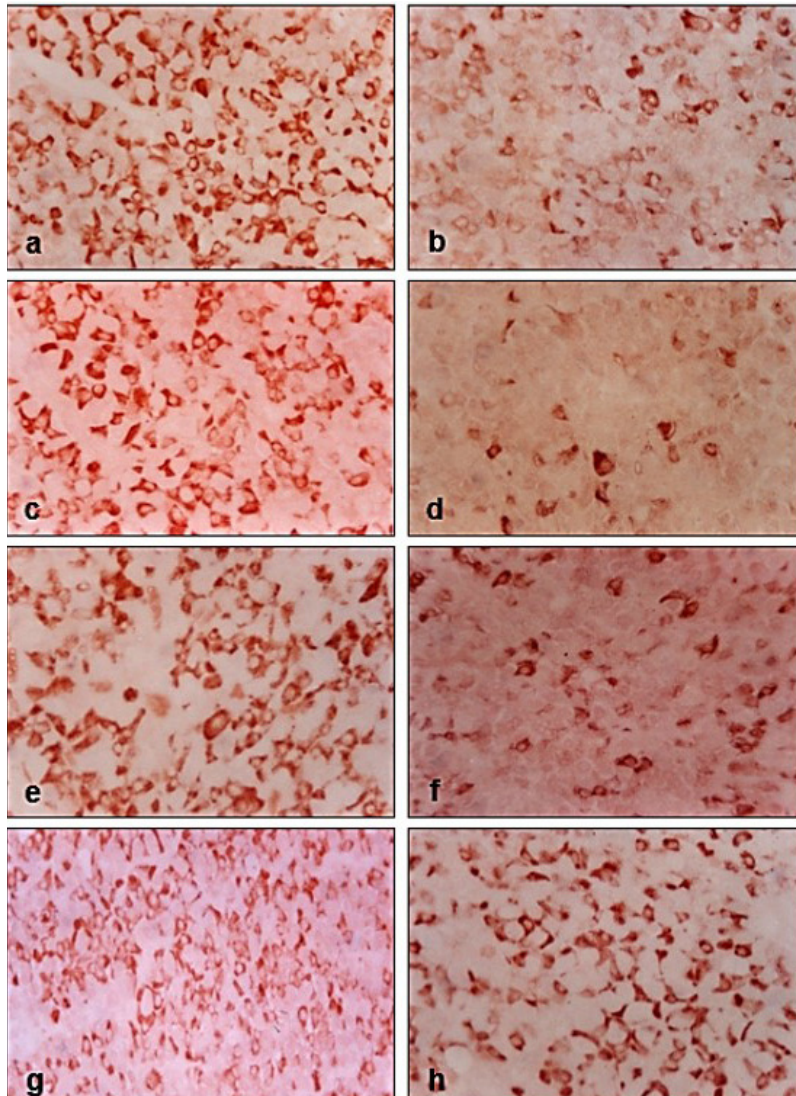


Fig. 17.1 a-h. Campos representativos de las lactotropas inmunomarcadas: a. FL 8s, b. FC 8s, c. FL 16s, d. FC 16s, e. FL 22s, f. FC 22s, g. FL 28s, h. FC 28s (EnVision peroxidasa, anti-PRL, x 200).

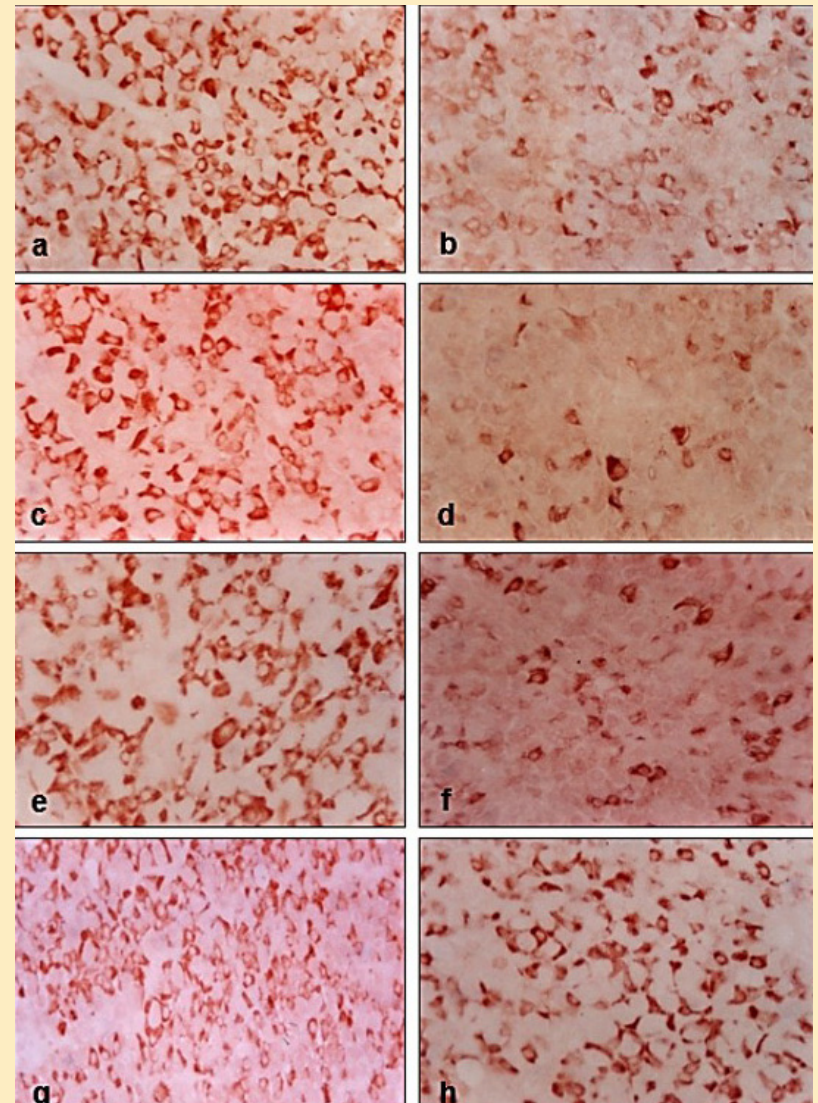


Fig. 17.1 a-h. Representative fields of immunostained lactotropes: a. LP 8w, b. SP 8w, c. LP 16w, d. SP 16w, e. LP 22w, f. SP 22w, g. LP 28w, h. SP 28w (EnVision peroxidase, anti-PRL, x 200).

El análisis histomorfométrico (**fig. 17.2**) revela que la densidad de volumen ($DV \times 10^{-2}$) y la densidad de células ($DC \times 10^{-4}$) están disminuidas de modo significativo ($p < 0.05$) en los hámsteres sometidos a FC, comparados con los animales en FL (8, 16 y 22 semanas). En la

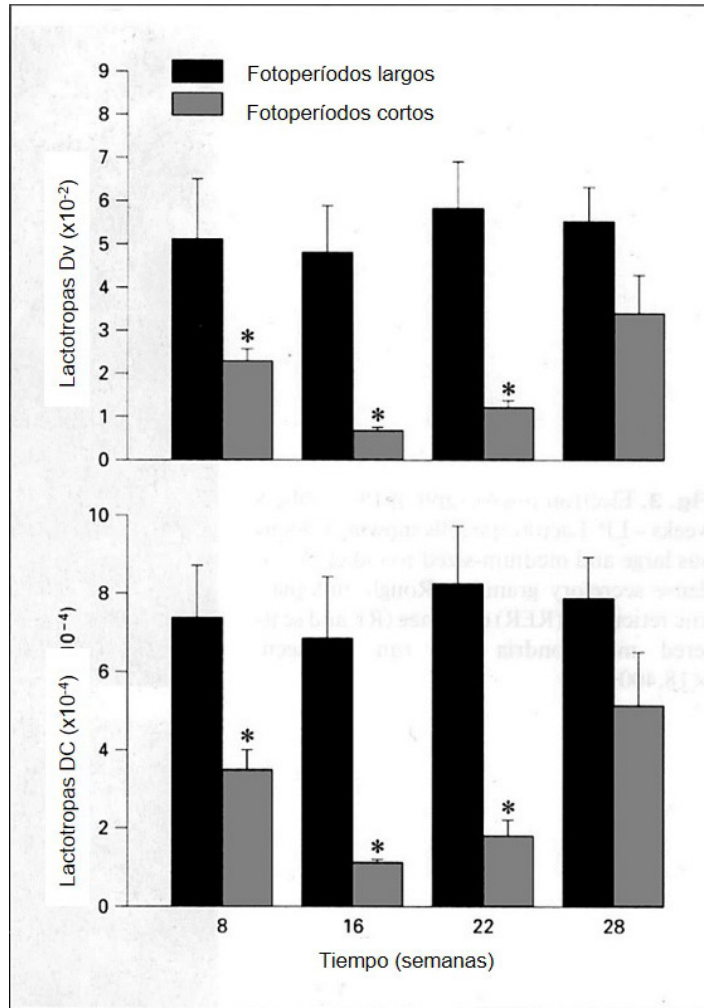


Fig. 17.2. Densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) en la población lactotropa de hámsteres sometidos a FL y FC (* $p < 0.05$).

The histomorphometric analysis (**fig. 17.2**) reveals that volume density ($VD \times 10^{-2}$) and cell density ($CD \times 10^{-4}$) are significantly diminished ($p < 0.05$) in hamsters submitted to SP respect to those animals submitted to LP, at weeks 8, 16 and 22.

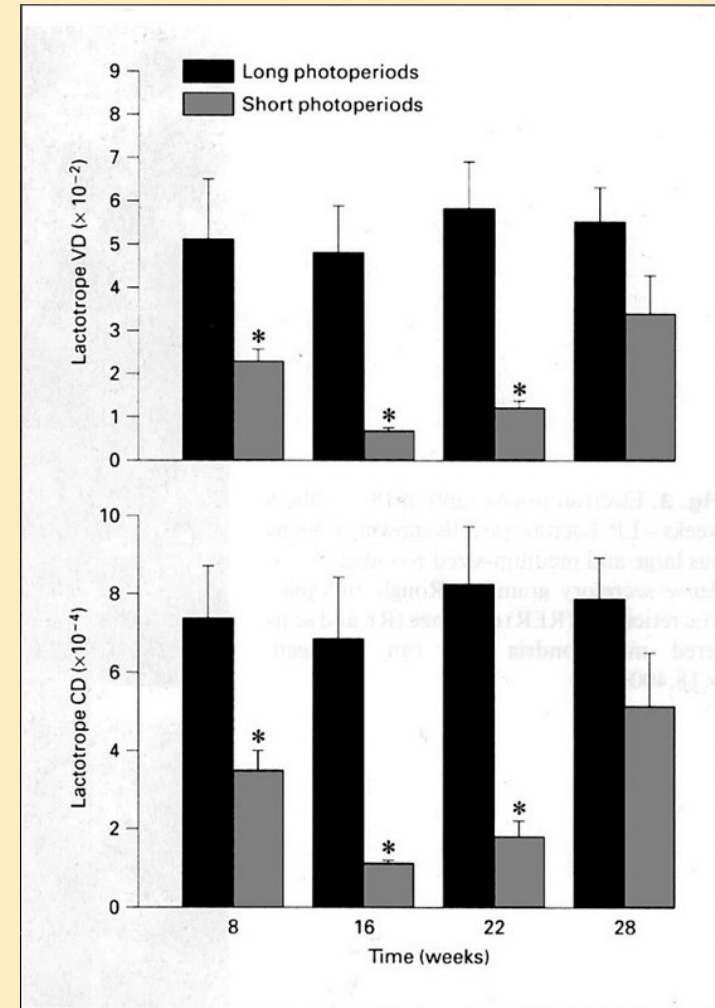


Fig. 17.2. Volume density (VD) and cell density (CD) in the lactotrope population of hamsters submitted to LP and SP (* $p < 0.05$).

semana 28 aparece una recrudescencia espontánea en los animales en FC (Cónsole y col., 2002a).

Wang y col. (1991 y 1992), en concordancia con nuestro estudio inmunohistoquímico, observaron en los hámsteres dorados una privación continua desde las 8 semanas y un efecto inhibitorio sobre la actividad secretoria de las lactotropas, con una marcada hipoplasia/atrofia celular.

Otros estudios han demostrado que la síntesis y liberación de PRL estuvieron inhibidas en hámsteres expuestos a FC (Borer y col., 1982; Badura y Goldman, 1997). Massa y Blask (1989) hallaron que la privación por ceguera o privación de luz por 42 a 56 días deprimió la actividad de las lactotropas en hámsteres sirios, con significativa disminución de los niveles pituitarios de ARNm de la PRL. Stirland y col. (2001) vieron en hámsteres dorados machos que la expresión génica de PRL estuvo descendida en FC de 8-12 semanas. Además, estos autores proveyeron la primera evidencia de que la síntesis de PRL está bajo la modulación fotoperiódica de un factor derivado de la *pars tuberalis*.

Reiter y Johnson (1974) comunicaron la acción depresiva de la glándula pineal sobre la PRL y la LH. Orstead y Blask (1987) intentaron dilucidar la naturaleza de los cambios en la actividad de las lactotropas estudiando hámsteres hembras ciegas o (Px) por 12 semanas. La liberación y depósito de PRL estuvo significativamente disminuido, como consecuencia de los mecanismos pineal-dependientes, ya que este proceso puede ser revertido con Px. En agregado, es posible que la inmunoreactividad de las isoformas glicosiladas de PRL sea menor después de la ceguera. Esto debería ser tenido en cuenta frente a la conocida heterogeneidad de las PRL en los roedores (Lewis y col., 1985) (ver Cap. 21, isoformas de PRL).

A nivel ultraestructural, los hámsteres expuestos a FL a las 8 semanas exhiben lactotropas con numerosos gránulos secretorios redondeados grandes y medianos (**fig. 17.3**) (Cónsole y col., 2002a).

At weak 28 a spontaneous recrudescence appears in SP animals (Cónsole et al., 2002a). Wang et al. (1991 and 1992), in agreement with our immunohistochemical study, observed in golden hamsters a continuous deprivation starting at week 8 and an inhibitory effect on the secretory activity of lactotropes, with a marked hypoplasia/cellular atrophy.

Other studies have demonstrated that PRL synthesis and release were inhibited in hamsters exposed to SP (Borer et al., 1982; Badura and Goldman, 1997). Massa and Blask (1989) found that blindness or light-deprivation for 42 to 56 days depressed the lactotroph activity in Syrian hamsters, with significant decrease of pituitary levels of PRL mRNA. Stirland et al. (2001) saw in male golden hamsters that the gene expression of PRL was decreased in 8-12 weeks SP. Also, these authors provided the first evidence that PRL synthesis depends on the photoperiod modulation of a factor derived from the *pars tuberalis*.

Reiter and Johnson (1974) reported the depressing action of the pineal gland on PRL and LH. Orstead and Blask (1987) attempted to elucidate the nature of the changes in the lactotrope activity by studying female hamsters that were blind or Px for 12 weeks. The release and deposit of PRL was significantly diminished as a consequence of the pineal-dependent mechanisms, since this process can be reverted with Px. In addition, the immunoreactivity of the glycosylated isoforms of PRL is likely to be diminished after blindness. This should be taken into account considering the well-known PRL heterogeneity in rodents (Lewis et al., 1985) (see Chap. 22, PRL isoforms).

At ultrastructural level, those hamsters exposed to LP at week 8 evidence lactotropes with numerous rounded secretory granules, both large and medium-sized (**fig. 17.3**) (Cónsole et al., 2002a).

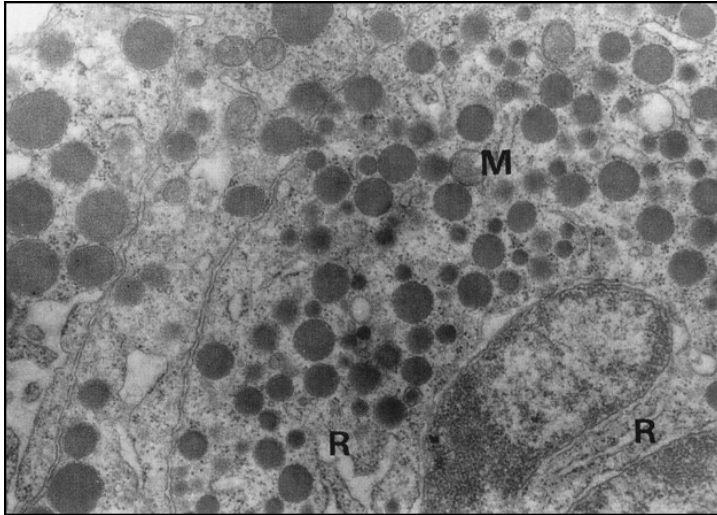


Fig. 17.3. Lactotropa FL 8 semanas. Gránulos secretorios grandes y medianos, cisternas del RER (R), mitocondria (M) (x 18.400).

En la **fig. 17.4** se observan numerosos gránulos secretorios de tamaño mediano y grande de densidad variable y numerosos ribosomas libres.

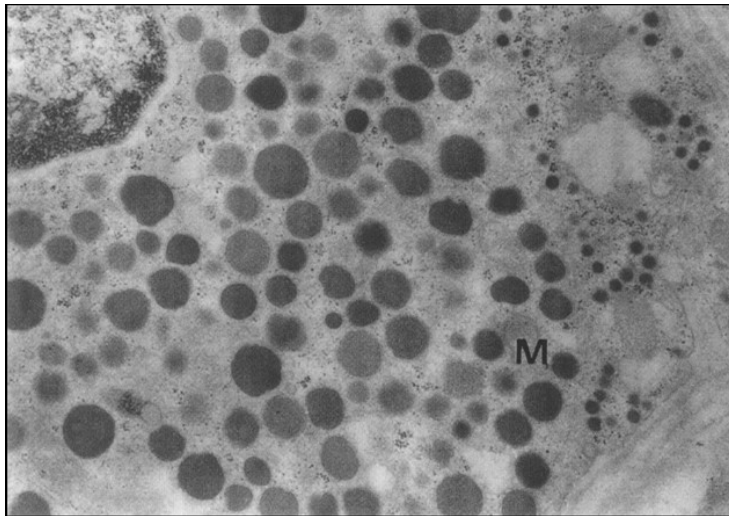


Fig. 17.4. Lactotropa FC 8 semanas. Mitocondria (M) (x 15.200).

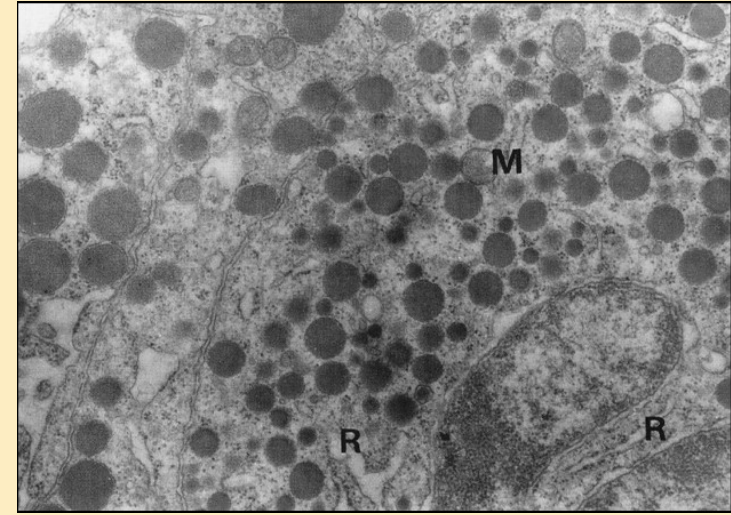


Fig. 17.3. Lactotrope of 8-week LP. Large and medium-sized secretory granules, RER cisternae (R), mitochondria (M) (x 18.400).

In **fig. 17.4** numerous medium-sized and large secretory granules of variable density and numerous free ribosomes can be observed.

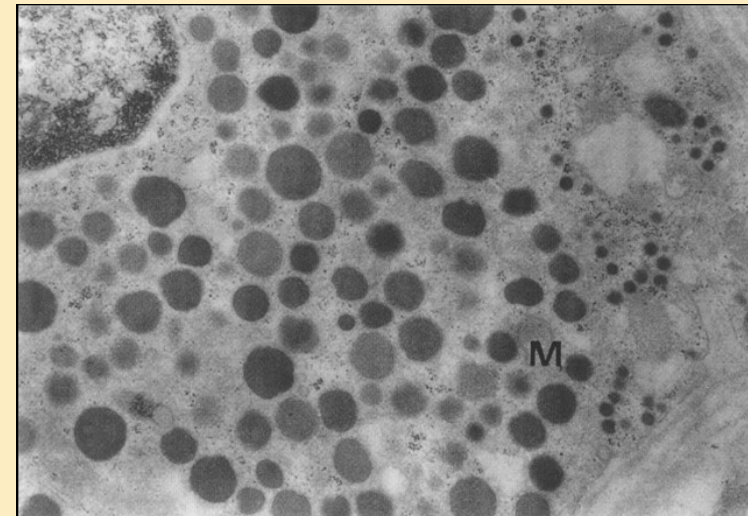


Fig. 17.4. Lactotrope of 8-week SP. Mitocondria (M) (x 15.200).

En la **fig. 17.5** se observa lactotropa de FL a las 22 semanas con gránulos secretorios redondeados pequeños y medios. El RER muestra cisternas aplanadas y ribosomas libres. También se ve gran número de mitocondrias normales y algunas alteradas.

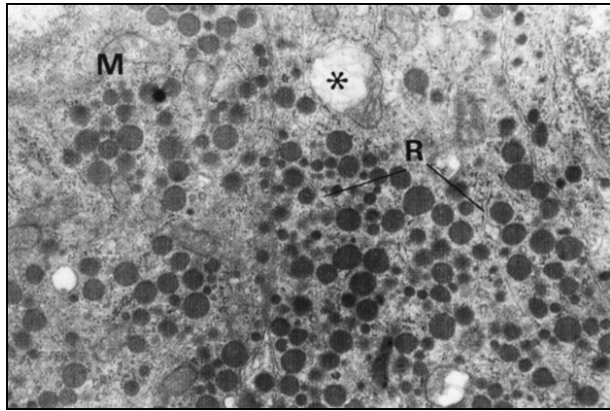


Fig. 17.5. Lactotropa FL 22 semanas. Cisternas de RER (R), mitocondria normal (M) y * distorsionada (x 16.000).

En la **fig. 17.6** se ve una lactotropa FC de 22 semanas con gránulos secretorios pleomórficos, cisternas del RER, mitocondrias y Golgi con cisternas dilatadas, microvesículas y algunos gránulos inmaduros.

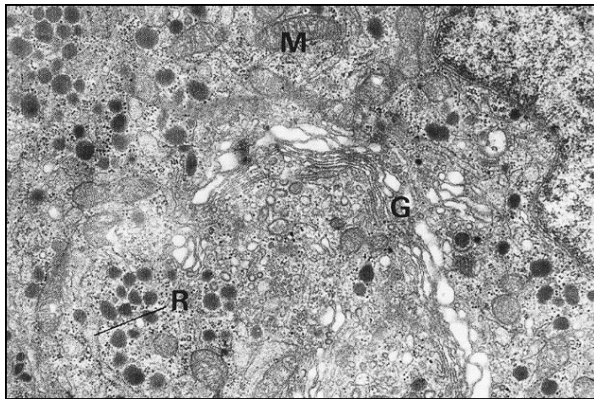


Fig. 17.6. Lactotropa FC 22 semanas. Gránulos secretorios pleomórficos, cisternas de RER (R), mitocondrias (M) y Golgi (G) dilatado (x 15.200).

In **fig. 17.5** a 22-week LP lactotrope with secretory rounded granules, both small and medium-sized can be observed. The RER evidences flattened cisternae and free ribosomes. Some altered mitochondria can be seen.

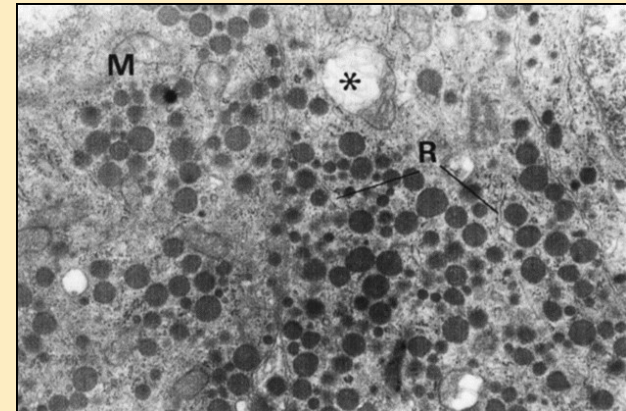


Fig. 17.5. Lactotrope of 22-week LP. RER cisternae (R), normal and * distorted mitochondria (M) (x 16.000).

Figure 17.6 shows a lactotrope submitted to a SP at week 22 with pleomorphic secretory granules and RER cisternae, scattered mitochondria and a Golgi with dilated cisternae and some immature granules can be observed.

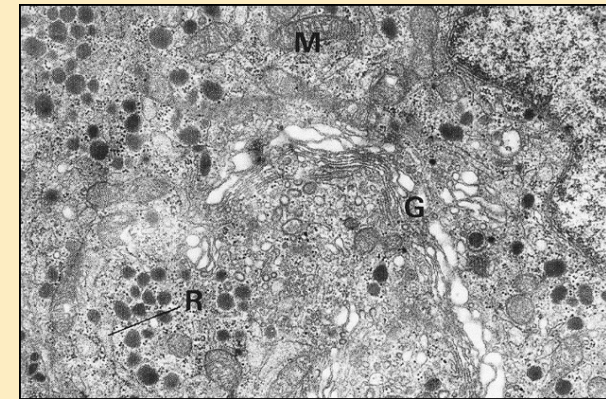


Fig. 17.6. Lactotrope of 22-week SP. Pleomorphic secretory granules, RER cisternae (R), mitochondria (M) and dilated Golgi (G) (x 15.200).

La **fig. 17.7** muestra una lactotropa de hámster sometido a FL de 28 semanas con gránulos secretorios grandes y RER con moderada dilatación.

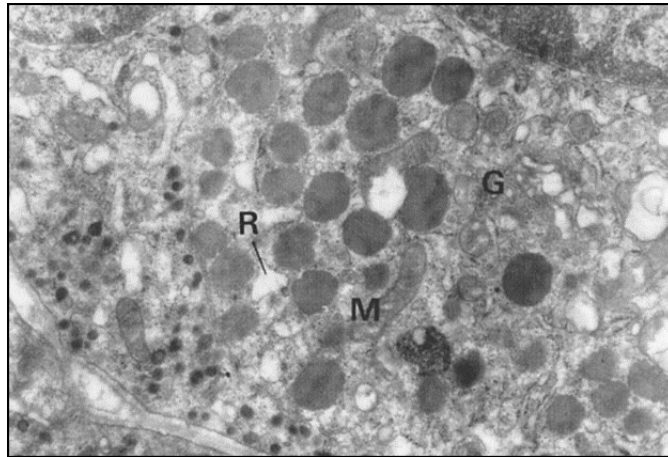


Fig. 17.7. Lactotropa FL 28 semanas. *Grandes gránulos secretorios de borde irregular, RER algo dilatado, mitocondria (M) y Golgi (G) (x 16.000).*

La **fig. 17.8** muestra gránulos secretorios medianos y grandes, así como numerosas cisternas del RER dilatadas e irregulares.

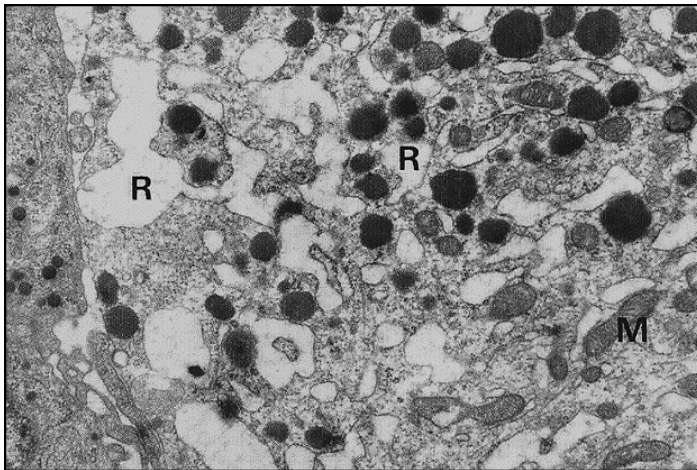


Fig. 17.8. Lactotropa FC 28 semanas. *Gránulos secretorios medianos y grandes, RER dilatado con cisternas irregulares y mitocondria (M) (x 16.000).*

Figure 17.7 evidences a lactotrope from a hamster submitted to 28-week LP with large secretory granules and dilated RER.

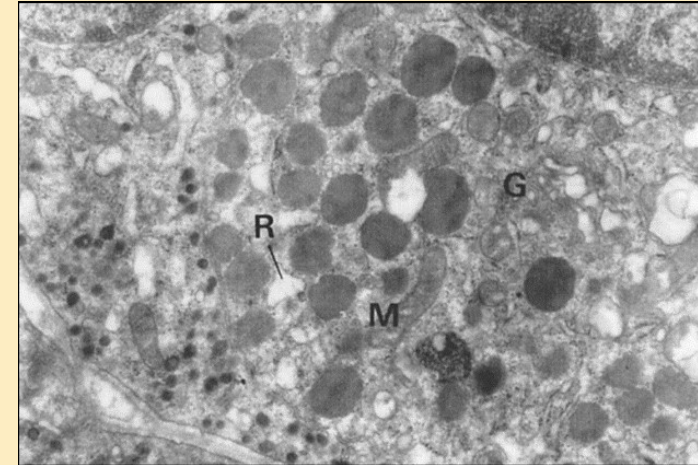


Fig. 17.7. Lactotrope of 28-week LP. *Large secretory granules, dilated RER, mitochondria (M) and Golgi (G) (x 16.000).*

Our ultrastructural findings in the lactotrope population evidence a significant decrease in the number and size of secretory granules

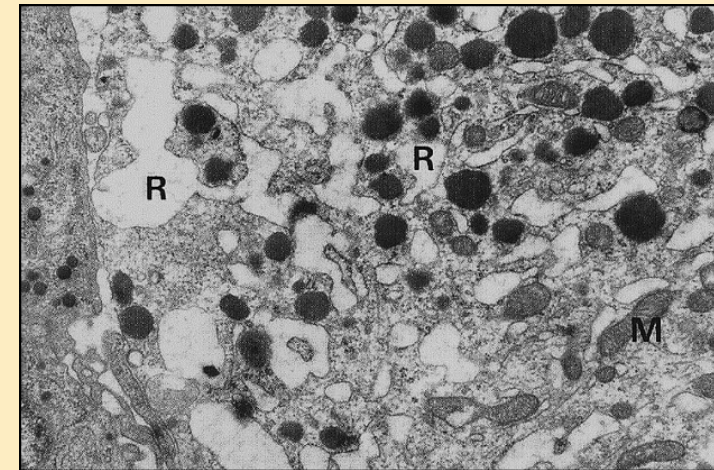


Fig. 17.8. Lactotrope of 28-week SP. *Medium-sized and large secretory granules, dilated RER with irregular cisternae and mitochondria (M) (x 16.000).*

Nuestros hallazgos ultraestructurales en la población lactotropa presentan una significativa disminución en el número y tamaño de los gránulos secretorios en los hámsteres bajo FC a las semanas 16 y 22, indicando descenso en la síntesis y depósito de PRL. Los animales expuestos a FL mostraron similitudes con las observaciones comunicadas en las pituitarias de hámsteres chinos (Deslex y col., 1976). El estudio inmunoelectrónico en hámsteres dorados deprivados de luz y expuestos a la oscuridad permanente durante 8 semanas (Wang y col., 1992) presentó lactotropas atróficas con pequeños gránulos (células tipo A), mientras los Px resultaron con un incremento de lactotropas con gránulos de tamaño medio (tipo B) y grandes (tipo C), similares a los de los animales intactos.

La morfometría ultraestructural (**tabla 1**) registra descenso significativo ($p < 0.05$) en el número de los gránulos secretorios y en los perfiles exocíticos en las semanas 16 y 22, respecto a los animales en FL. No se detectaron cambios en las semanas 8 y 28 de los FC.

Tabla 1. Número de los componentes ultraestructurales de las lactotropas por 50 μm^2

Número	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
Gránulos secretorios	124±8	114±6	117±5	128±8	129±9	73±5*	72±7*	124±9
Mitocondrias	16±2	15±2	13±1.8	16±1.6	14±1.4	15±1.5	16±2	17±2
Perfiles exocíticos	2 ±0.2	2±0.3	3±0.4	3±0.3	3±0.7	4±0.1*	1.2±0.1*	3±0.8

Cada grupo es el promedio \pm ES de 4 animales/grupo sometidos a FL y FC (* $p < 0.05$).

Nuestro análisis morfométrico ultraestructural (Cónsole y col., 2002a) refleja alteraciones en la síntesis y liberación de la PRL en animales mantenidos bajo FC en las semanas 16 y 22. En concordancia, Merks y col. (1993) hallaron en la *pars tuberalis* de hámsteres machos Djungarian una menor actividad exocítica en el FC.

in hamsters under SP at weeks 16 and 22, indicating a decrease in the synthesis and deposit of PRL. Those animals exposed to LP evidenced similarities with the observations reported in chinese hamster pituitaries (Deslex et al., 1976). An immunoelectron study on golden hamsters which were light-deprived by exposition to permanent darkness for 8 weeks (Wang et al., 1992) presented atrophic lactotropes with small granules (type A cells), while the Px group evidenced an increase of lactotropes with medium-sized granules (type B) and large granules (type C), similar to those belonging to intact animals.

In **fig. 17.8** medium-sized and large secretory granules and dilated RER with irregular cisternae can be seen.

Ultrastructural morphometry (**table 1**) reports a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of secretory granules and of the exocytic profiles at weeks 16 and 22, when compared to LP animals. No changes were detected in weeks 8 and 28 of SP.

Table 1. Number of ultrastructural components of lactotropes by 50 μm^2

Number	LP				SP			
	8w	16w	22w	28w	8w	16w	22w	28w
Secretory granules	124±8	114±6	117±5	128±8	129±9	73±5*	72±7*	124±9
Mitochondria	16±2	15±2	13±1.8	16±1.6	14±1.4	15±1.5	16±2	17±2
Exocytic profiles	2 ±0.2	2±0.3	3±0.4	3±0.3	3±0.7	1.4±0.1*	.2±0.1*	3±0.8

Each group is the mean \pm S.E.M. of 4 animals/group submitted to LP and SP (* $p < 0.05$).

Our ultrastructural morphometric analysis (Cónsole et al., 2002a) reflects alterations in the synthesis and release of PRL in animals submitted to SP at weeks 16 and 22. Accordingly, Merks et al. (1993) found in the *pars tuberalis* of Djungarian male hamsters a lower exocytic activity during the SP.

Tabla 2. Área de los componentes ultraestructurales de las lactotropas por 50 μm^2

Área	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
Complejo de Golgi	2±0.4	3±0.6	3±0.4	2±0.2	2±0.3	1.2±0.1*	1.4±0.1*	3±0.5
RER	5±1	4±1.7	4±1.4	5±1.5	4±1.3	2.7±0.7 *	3±0.5 *	8±0.9
Mitocondrias	2±0.3	2±0.4	2±0.3	3±0.3	2±0.4	3.0±0.5	3±0.3	3±0.2
Gránulos secretorios	12±2	11±2	11±1.4	11±1.6	11±1.7	5±0.5 *	5±0.8 *	10±2.0
Gránulo individual	0.1±0.01	0.1±0.02	0.08±0.01	0.13±0.02	0.1±0.01	0.04±0.01*	0.05±0.01*	0.09±0.03

Cada grupo representa el promedio \pm ES, $n=4$, FL y FC, * $p < 0.05$.

El estudio del área (unidad de área: 50 μm^2) registra un descenso significativo ($p < 0.05$) en el complejo de Golgi, el RER y los gránulos secretorios (**tabla 2**) durante las semanas 16 y 22 de los FC, respecto a animales en FL, permitiendo inferir un descenso en la síntesis y depósito de PRL. No hay cambios durante las semanas 8 y 28 en los hámsteres sometidos a FC y en los diferentes tiempos de los FL.

Los niveles séricos de PRL (**fig. 17.9**) estuvieron severamente reducidos bajo el FC ($p < 0.05$) en las semanas 8, 16 y 22. Este descenso fue más marcado en la semana 16 y cuando los hámsteres fueron mantenidos por 22 semanas bajo FC, los niveles comenzaron a recuperarse. Luego, en la semana 28, los valores de PRL retornaron a niveles cercanos a los detectados en los animales de FL (Cónsole y col., 2002a). Este mecanismo de recrudescencia espontánea aun no estaría bien dilucidado. Nuestros resultados estuvieron en concordancia con los de Steger y Bartke (1991), quienes observaron un descenso significativo en la PRL sérica desde las 8 semanas del FC.

Junto con la involución reproductiva, se ha demostrado una inhibición en la síntesis, depósito y liberación de la PRL en pituitarias de hámsteres dorados machos y hembras expuestos a FC (Malpaux y col., 1999; Bernard y col., 2000). Los cambios fotoperiódicos fueron debidos en parte

Table 2. Area of the ultrastructural components of lactotropes by 50 μm^2

Area	LP				SP			
	8w	16w	22w	28w	8w	16w	22w	28w
Golgi complex	2±0.4	3±0.6	3±0.4	2±0.2	2±0.3	1.2±0.1*	1.4±0.1*	3±0.5
RER	5±1	4±1.7	4±1.4	5±1.5	4±1.3	2.7±0.7*	3±0.5*	8±0.9
Mitochondria	2±0.3	2±0.4	2±0.3	3±0.3	2±0.4	3.0±0.5	3±0.3	3±0.2
Secretory granules	12±2	11±2	11±1.4	11±1.6	11±1.7	5±0.5*	5±0.8*	10±2.0
Individual granule	0.1±0.01	0.1±0.02	0.08±0.01	0.13±0.02	0.1±0.01	0.04±0.01*	0.05±0.01*	0.09±0.03

Each group presents the mean \pm ES, $n=4$, LP and SP, * $p < 0.05$.

The study of the area (area unit: 50 μm^2) reports a significant decrease ($p < 0.05$) in the Golgi complex, the RER and secretory granules (**table 2**) at weeks 16 and 22 of the SP, compared to LP animals, what allows us to infer a decrease in the synthesis and deposit of PRL. No changes were seen at weeks 8 and 28 in SP hamsters and at the different times of LP.

Serum levels of PRL (**fig. 17.9**) were severely reduced under SP ($p < 0.05$) at weeks 8, 16 and 22. This decrease was more marked at week 16. When hamsters were maintained under SP for 22 weeks, levels started to recover.

Later, at week 28, PRL values returned to levels similar to those of LP animals (Cónsole et al., 2002a). This mechanism of spontaneous recrudescence has not been made clear yet. Our results were in agreement with those of Steger and Bartke (1991), who observed a significant decrease in serum PRL starting at week 8 of the SP.

Together with the reproductive regression, there has been evidence of inhibition in synthesis, deposit and release of PRL in golden hamster pituitaries, both male and female, exposed to SP (Malpaux et al., 1999; Bernard et al., 2000). The photoperiodic changes were partly consequence of the decrease in PRL secretion, since the pituitary homografts

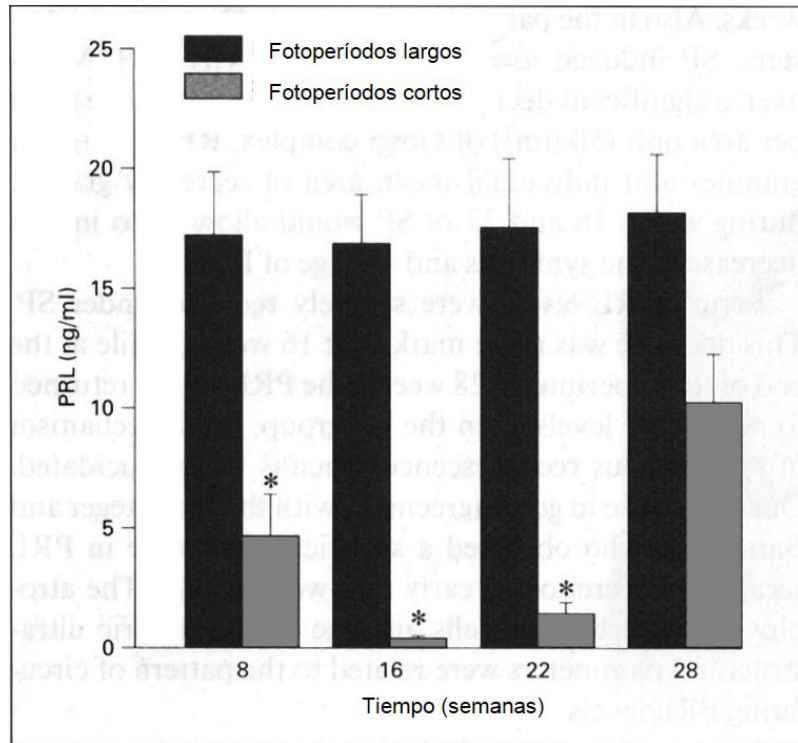


Fig. 17.9. Efecto de los FL y FC sobre los niveles séricos de PRL (* $p < 0.05$).

al descenso en la secreción de PRL, ya que los homoinjertos pituitarios restauraron la función testicular en hámsteres regresionados (Kriegsfeld y Nelson, 1998). Los homoinjertos pituitarios secretores de PRL debajo de la cápsula renal retrasaron la regresión reproductiva en hámsteres machos en FC (Reiter y Ferguson, 1979). Los FC aumentaron la capacidad de la dopamina para suprimir la secreción de PRL y este efecto podría ser revertido por un injerto ectópico de hipófisis (Steger y col., 1985b).

El efecto supresivo del FC sobre la liberación de PRL sería mediado por el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (TIDA). La dopamina falló para inhibir la síntesis de PRL *in vitro*, pero no su liberación en los hámsteres machos sometidos a FL (Meites y Sonntag, 1981). Además, la respuesta

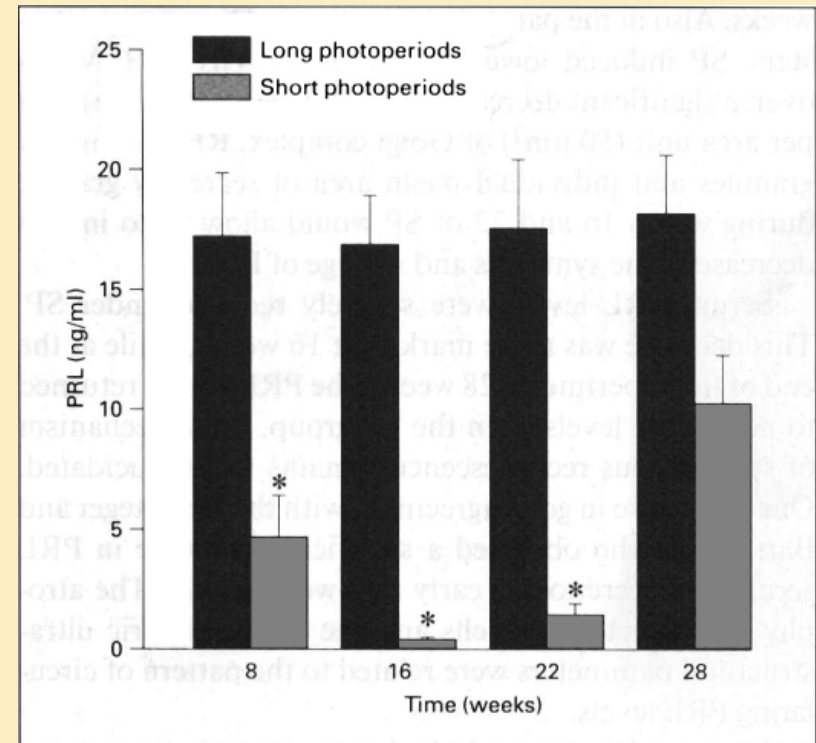


Fig. 17.9. Effect of LP and SP on PRL serum levels (* $p < 0.05$).

restored the testicular function in regressed hamsters (Kriegsfeld and Nelson, 1998). The pituitary homografts secreting PRL under the renal capsule delayed the reproductive regression in male hamsters under SP (Reiter and Ferguson, 1979). Short photoperiods increase the capacity of dopamine to suppress PRL secretion and this effect might be reverted with a pituitary ectopic graft (Steger et al., 1985b).

The suppressing effect of the SP on PRL release would be mediated by the tuberoinfundibular dopaminergic system (TIDA). Dopamine failed to inhibit the PRL synthesis *in vitro*, but not its release in male hamsters submitted to LP (Meites and Sonntag, 1981). Also, the pituitary response to dopamine on PRL secretion increased in SP, but not as much as to explain the

pituitaria a la dopamina sobre la secreción de PRL aumentó en los FC, pero no al grado de poder explicar la marcada reducción en la liberación de PRL (Pickard y Silverman, 1979). Blask y Orstead (1986b) detectaron que la dopamina regularía la liberación de PRL a corto plazo, mientras Steger y col. (1995) sugirieron que el descenso en la secreción de PRL asociado a la transferencia de los hámsteres machos de FL a FC, sería causado en parte por un aumento en el reemplazo de las neuronas dopaminérgicas.

Se han propuesto cambios en la sensibilidad de las lactotropas. No se descarta la influencia de otros factores moduladores del fotoperíodo, al inhibir la liberación de la dopamina que regula la secreción de la PRL. Steger y Bartke (1991) hallaron alteraciones en el recambio de la melatonina, noradrenalina y dopamina en los FC. También describieron la habilidad del FC para causar un recambio de la dopamina y sugirieron que el efecto supresor sobre la liberación de PRL, podría ser mediado por la activación del sistema TIDA y la influencia inhibitoria de la *pars neural*. Estos grupos neuronales podrían estar directa o indirectamente estimulados por una señal pineal-dependiente de la melatonina. Leadem y col. (1988) propusieron mayor actividad en las neuronas dopaminérgicas. La dopamina, el factor inhibitorio fisiológico de la PRL, inhibiría la actividad de las lactotropas. Otros factores inhibitorios y estimulatorios de la PRL podrían modular los efectos del fotoperíodo sobre la secreción de la hormona y esto estaría relacionado con una vía pineal-independiente.

La pineal influye sobre la *pars intermedia* pituitaria para responder al mecanismo natural del fotoperíodo (Piezzi y col., 1984). La privación de la luz, inducida ya sea por exposición a FC o enucleación óptica bilateral, causó una significativa reducción en la PRL pituitaria o circulante. Esto llevaría a una atrofia de los órganos reproductivos por medio de una inducción de la actividad, mientras que la Px previno los efectos supresores sobre las lactotropas (Reiter, 1980; Benson y Matthews, 1980; Blask y col., 1986a). Dicho efecto fue especialmente efectivo en hembras, mostrando un dimorfismo según sexo (Wang y col., 1991).

Lincoln (1999) propuso que la modulación de la secreción de PRL debería ser alcanzada por medio de los mecanismos filogenéticos más

marked decrease in PRL release (Pickard and Silverman, 1979). Blask and Orstead (1986b) detected that dopamine would regulate PRL in the short term, whereas Steger et al. (1995) suggest that the decrease of PRL secretion associated with the transference of male hamsters from LP to SP would be partly caused by an increase in the replacement of dopaminergic neurons.

Changes in the lactotrope sensitivity have been suggested. The influence of other modulating factors of the photoperiod as the cause of the inhibition of dopamine release that regulates PRL secretion has not been discarded. Steger and Bartke (1991) found alterations in the turnover of melatonin, noradrenalin and dopamine in SP. They also described the ability of the SP to produce turnover of dopamine and suggested that the suppressing effect on PRL release might be mediated by the activation of the TIDA system and the inhibitory influence of the *pars neural*. These neuronal groups might be directly or indirectly stimulated by a melatonin pineal-dependent signal. Leadem et al. (1988) proposed higher activity in the dopaminergic neurons. Dopamine, PRL physiologic inhibitory factor, would inhibit the activity of the lactotropes. Other PRL inhibitory and stimulating factors might modulate the effects of the photoperiod on the hormone secretion and this would be related with a pineal-dependent pathway.

The pineal gland affects the pituitary *pars intermedia* in order to answer to the natural mechanism of the photoperiod (Piezzi et al., 1984). Light deprivation, induced either by submission to SP or by bilateral optical enucleation, caused a significant reduction of the pituitary or circulating PRL. This would lead to an atrophy of the reproductive organs by means of an induction of the activity, whereas Px prevented the suppressing effects on lactotropes (Reiter, 1980; Benson and Matthews, 1980; Blask et al., 1986a). Such effect was especially effective in females, evidencing dimorphism according to sex (Wang et al., 1991).

Lincoln (1999) suggested that the modulation of PRL secretion should be reached by means of the oldest phylogenetic mechanisms. In photoperiodic mammals PRL hypersecretion on long days is due to a pineal-dependent mechanism that would stimulate the *pars tuberalis* possessing

antiguos. Los mamíferos fotoperiódicos hipersecretan PRL los días largos mediante un mecanismo pineal-dependiente que estimularía la *pars tuberalis* poseedora de receptores de melatonina y regularía a las lactotropas de la *pars distalis*. La secreción de PRL es regulada a través de cambios fotoperiódicos en el perfil de 24 hs de melatonina y despliega ritmicidad circanual bajo un fotoperíodo constante. Estos dos procesos parecen ocurrir dentro de la pituitaria, controlada por la *pars tuberalis*. Una dotación completa de genes se expresa en la *pars tuberalis* de la especie ovina y se someten a la expresión cíclica (24 hs) como se observa en las células autónomas del reloj circadiano (Lincoln y col., 2003).

Concluyendo, nuestros cambios inmunohistoquímicos cuantitativos, ultraestructurales y bioquímicos sugieren una inhibición de la síntesis, depósito y liberación de la PRL en hámsteres dorados machos sometidos a FC, con una recrudescencia espontánea al final del estudio.

Población gonadotropa

Bernard y col. (1999) no hallaron diferencias significativas en los niveles circulantes de gonadotrofinas en hámsteres sometidos de modo crónico a días cortos y largos, a pesar de las diferencias en el fotoperíodo. Sin embargo, a través de la transición de FC a FL los hámsteres machos exhibieron un aumento en el número de células expresando ARNm pre-hormona liberadora de gonadotrofinas (pre-GnRH) en la mañana del segundo día largo. Los niveles de FSH comenzaron a aumentar a los 3-5 días después de que los hámsteres machos fueron transferidos de FC a FL.

Nuestro diseño experimental analizó los cambios inmunohistoquímicos y ultraestructurales de la población gonadotropa (folículo­tropa y luteinizante), así como las fluctuaciones de FSH y LH en hámsteres dorados machos que van primero a la regresión y luego a la recrudescencia espontánea. La inmunohistoquímica mostró gonadotropas con una distribución homogénea en las semanas 8, 16, 22 y 28 en hámsteres sometidos a FL y FC (**fig. 17.10 a-h**) (Cónsole y col., 2002b).

melatonin receptors and would regulate the lactotropes of the *pars distalis*. The *pars tuberalis* would be an important center for the transmission of information to the photoperiodic neuroendocrine circuits involved in the reproduction, metabolism and behavior, sending signals via a retrograde pathway to the hypothalamus and via an anterograde pathway to the *pars distalis* (Yasou and Kort, 2011). Prolactin secretion is regulated by photoperiod through changes in the 24-h melatonin profile and displays circannual rhythmicity under constant photoperiod. These two processes appear to occur within the pituitary, controlled by the *pars tuberalis*. A full complement of clock genes is expressed in the ovine *pars tuberalis*, and undergo 24-h cyclical expression as observed in a cell autonomous of the circadian clock (Lincoln et al., 2003).

To conclude, our biochemical, ultrastructural, quantitative and immunohistochemical changes suggest inhibition of PRL synthesis, deposit and release in male golden hamsters submitted to SP, with spontaneous recrudescence at the end of the study.

Gonadotrope population

Bernard et al. (1999) did not find any significant differences in gonadotropin circulating levels in hamsters submitted chronically to short and long days, in spite of photoperiodic differences. However, during the transition from SP to long LP, male hamsters exhibited an increase in the number of cells expressing pre-gonadotropin releasing hormone (pre-GnRH) mRNA in the morning of the long day second. Levels of FSH started to increase 3-5 days after male hamsters were transferred from SP to LP.

Our experimental design analyzed the immunohistochemical and ultrastructural changes of the gonadotrope population (folliculotrope and luteinizing), as well as FSH and LH fluctuations in male golden hamsters which first suffered regression and then spontaneous recrudescence.

Immunohistochemistry shows gonadotrope cells with homogeneous distribution at weeks 8, 16, 22 and 28 in hamsters submitted to LP and SP (**fig. 17.10 a-h**) (Cónsole et al., 2002b).

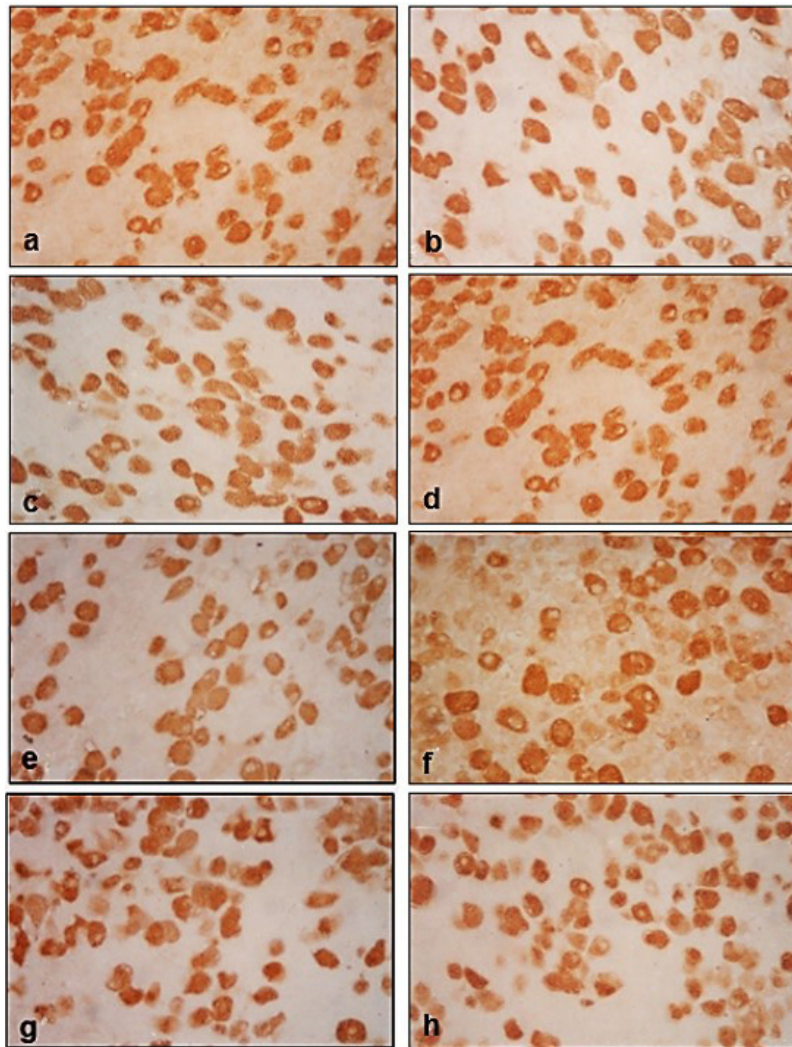


Fig. 17.10 a-h. Campos representativos de las gonadotropas inmunomarcadas: a. FL 8s, b. FC 8s (a-b células LH), c. FL 16s, d. FC 16s (c-d células FSH), e. FL 22s, f. FC 22s (células FSH), g. FL 28s, h. FC 28s (g-h: células LH) (EnVision peroxidasa, anti-LH -FSH, x 200).

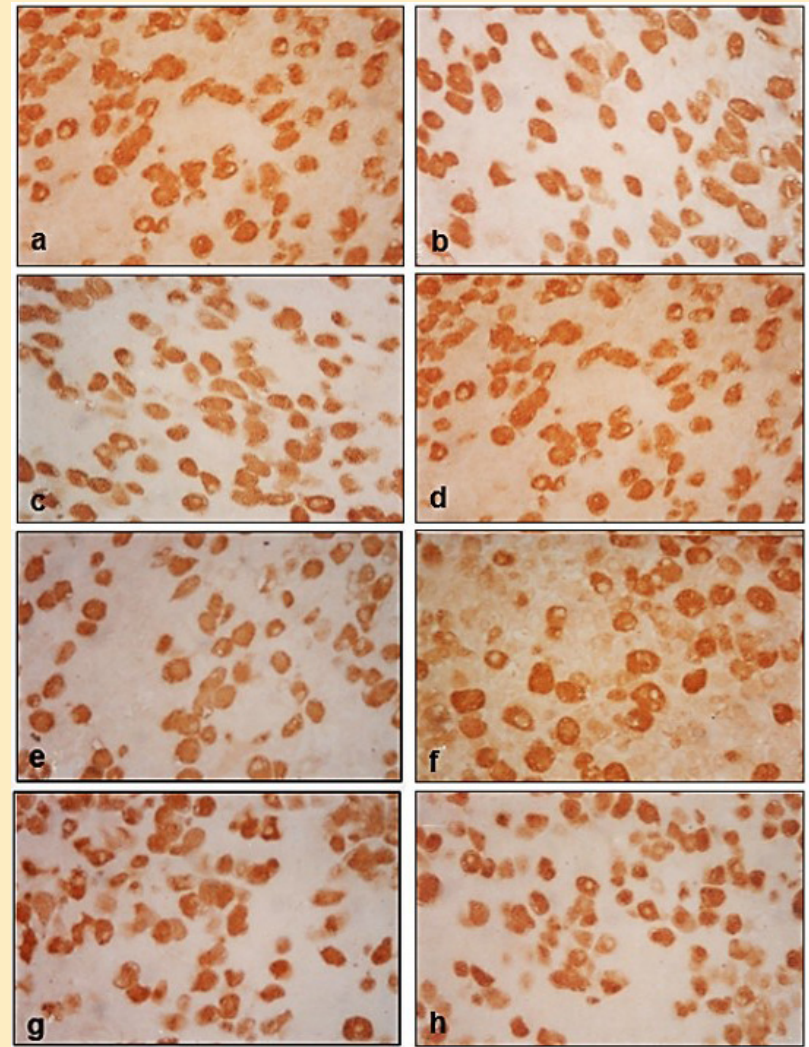


Fig. 17.10 a-h. Representative fields of immunostained gonadotropes: a. FL 8s, b. FC 8s (a-b LH cells), c. FL 16s, d. FC 16s (c-d FSH cells), e. FL 22s, f. FC 22s (FSH cells), g. FL 28s, h. FC 28s (g-h: LH cells) (EnVision peroxidase, anti-LH -FSH, x 200).

El análisis histométrico de la población gonadotropa en hámsteres machos sometidos a FC no muestra diferencias significativas en la densidad de volumen (DV $\times 10^{-2}$) y en la densidad de células (DC $\times 10^{-4}$) durante las semanas 8, 16, 22 y 28, cuando se comparan con el grupo sometido a FL (fig. 17.11) (Cónsole y col., 2002b).

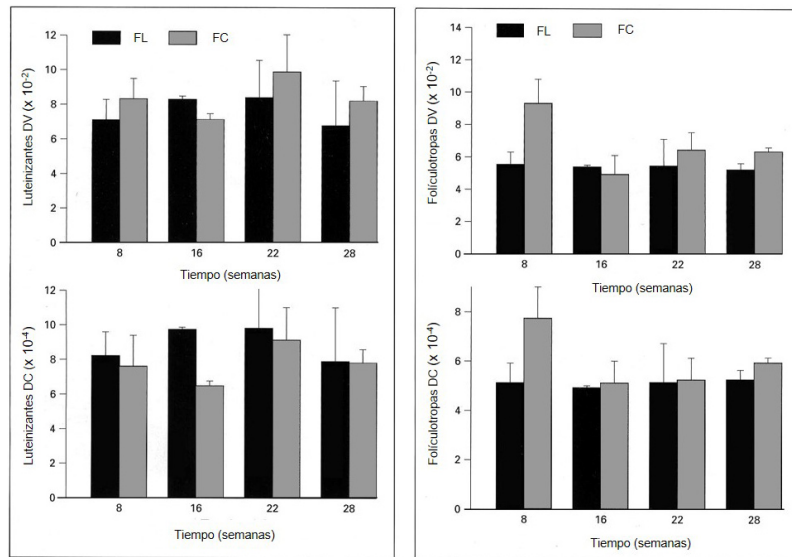


Fig. 17.11. Densidad de volumen (DV) y densidad de células (DC) en la población luteinizante y folículo­tropa de hámsteres sometidos a FL y FC (* $p < 0.05$).

Nuestros estudios a nivel pituitario revelaron la presencia de gonadotropas activas con marcada síntesis de LH y FSH. Estos resultados se correlacionaron con los hallazgos inmunohistoquímicos pituitarios que demostraron alteraciones en la liberación, pero sin cambios en la síntesis. La respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en hámsteres dorados sometidos a FL determinó una estrecha ventana temporal en la que los mecanismos moleculares, celulares y funcionales mediaron para regular el fotoperíodo. El retorno a más de 12 hs luz/día capacitó para la recuperación de la actividad gonadal natural descrita por Berndtson y Desjardins (1974) como “recrudescencia inducida”.

The histometric analysis of the gonadotrope population in male hamsters submitted to SP does not evidence significant differences in volume density (VD $\times 10^{-2}$) and cell density (CD $\times 10^{-4}$) at weeks 8, 16, 22 and 28, when compared with the LP group (fig. 17.11) (Cónsole et al., 2002b).

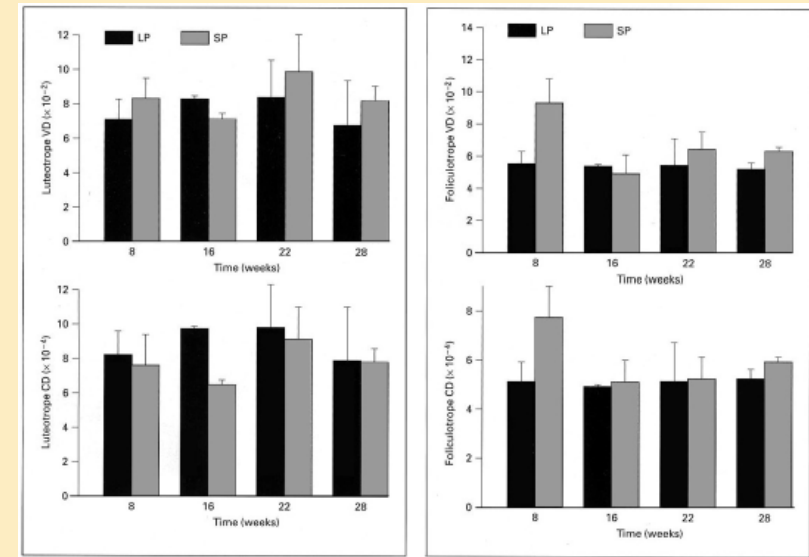


Fig. 17.11. Volume density (VD) and cell density (CD) in the luteinizing and folliculotrope population of hamsters submitted to LP and SP (* $p < 0.05$).

Our studies at pituitary levels revealed the presence of active gonadotropes with marked synthesis of LH and FSH. These results were correlated with pituitary immunohistochemical findings that demonstrated alterations in the release but no in the synthesis. The response of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in golden hamsters submitted to LP determined a narrow temporal window where the molecular, cellular and functional mechanisms mediated to regulate the photoperiod.

At ultrastructural levels, LP gonadotropes presented a well-developed juxtannuclear Golgi complex, RER with laminar cisternae and numerous secretory granules of variable electron density (diameter: 150-250 nm) (figs. 17.12-17.17) (Cónsole et al., 2002b).

La señal de la luz pasa a través de numerosas sinapsis, desde la retina hasta la glándula pineal, donde se refleja como un ciclo diario de secreción de melatonina que aumenta durante la noche y decrece durante el día. La longitud del período de secreción nocturna de melatonina regula la secreción pulsátil de la GnRH hipotalámica y los cambios en su liberación indujeron alteraciones en la secreción de LH y FSH que fueron responsables de la ovulación y de las variaciones en la espermatogénesis (Malpau y col., 1999). Los detectores de los fotoperíodos son críticos en los vertebrados, en particular para medir el tiempo del inicio de la reproducción de cada año. En las aves, los ojos no parecen controlar la información fotoperiódica y se han propuesto neuronas especializadas, llamadas fotorreceptores profundos del cerebro (en tabique y tres áreas hipotalámicas), para regular el fotoperíodo y activar la regulación neuroendocrina del desarrollo gonadal (Kuenzel y col., 2015).

A nivel ultraestructural, las gonadotropas de FL presentan un Golgi yuxtannuclear bien desarrollado, RER con cisternas laminares y numerosos gránulos secretorios de densidad electrónica variable (diámetro: 150-250 nm) (figs. 17.12-17.17) (Cónsole y col., 2002b).

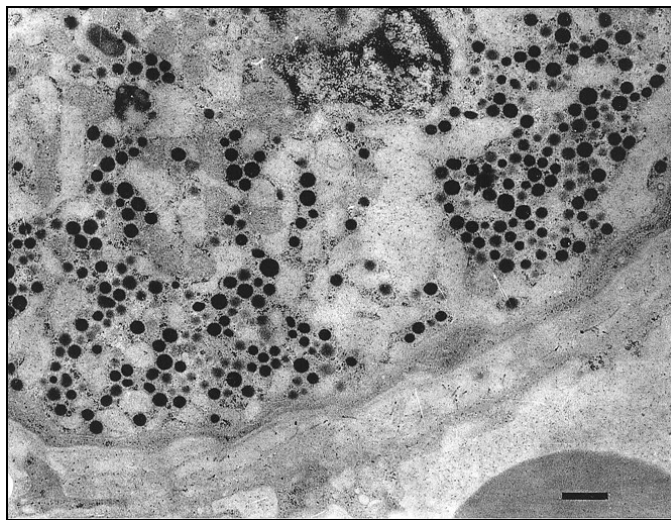


Fig. 17.12. Folliculotropa FL 8s. RER irregular y gránulos secretorios de densidad variable ($\times 9.000$, barra 1 μm).

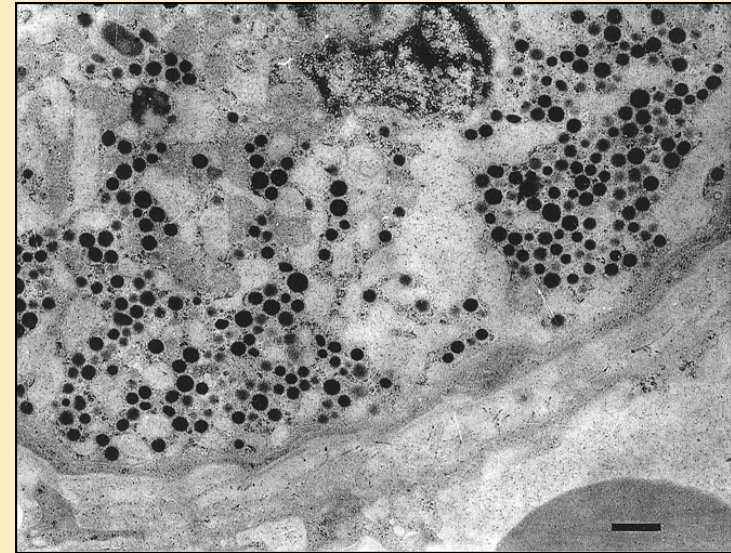


Fig. 17.12. Folliculotrope of 8w-LP. Irregular RER with secretory granules of variable density ($\times 9.000$, bar 1 μm).

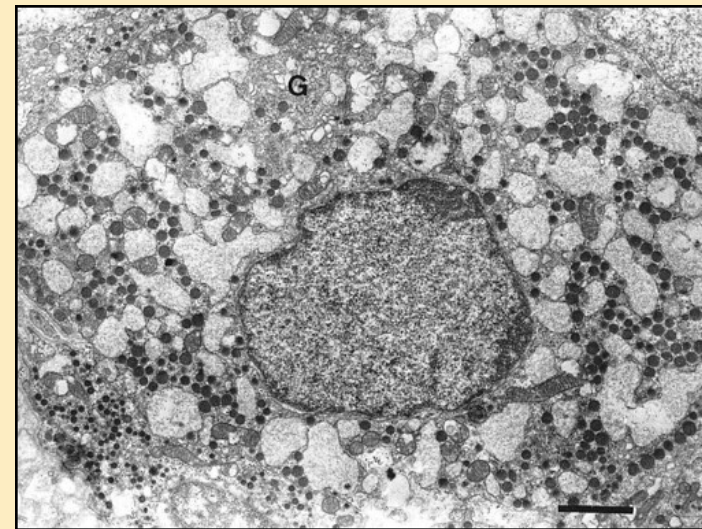


Fig. 17.13. Folliculotrope of 16w-LP. Dilated RER with intraluminal material of moderate density, juxtannuclear Golgi (G) and granules of variable density ($\times 15.000$, bar 1 μm).

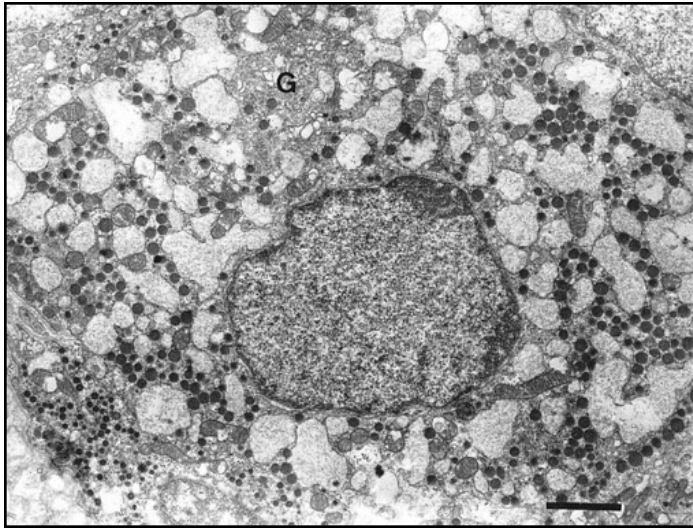


Fig. 17.13. Folliculotropa FL 16s. RER dilatado con material intraluminal de densidad moderada, Golgi (G) yuxtannuclear y gránulos de densidad variable (x 15.000, barra 1µm).

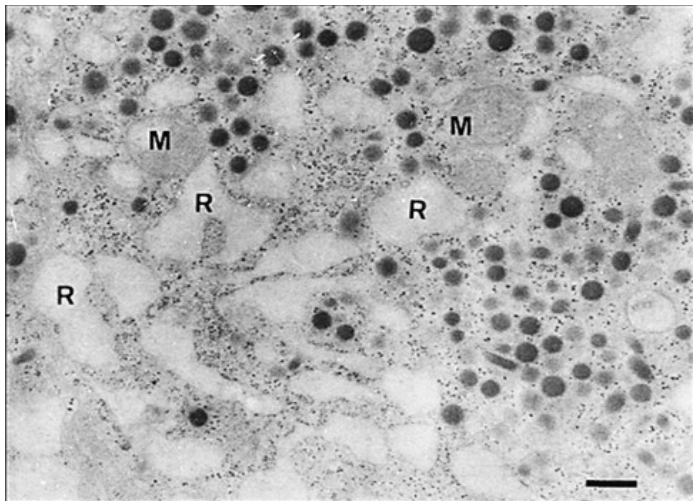


Fig. 17.14. Folliculotropa FL 28s. RER (R) dilatado con perfiles irregulares con material intraluminal de moderada densidad y numerosos ribosomas libres; gránulos secretorios de densidad variable y mitocondria (M) (x 15.000, barra 1µm).

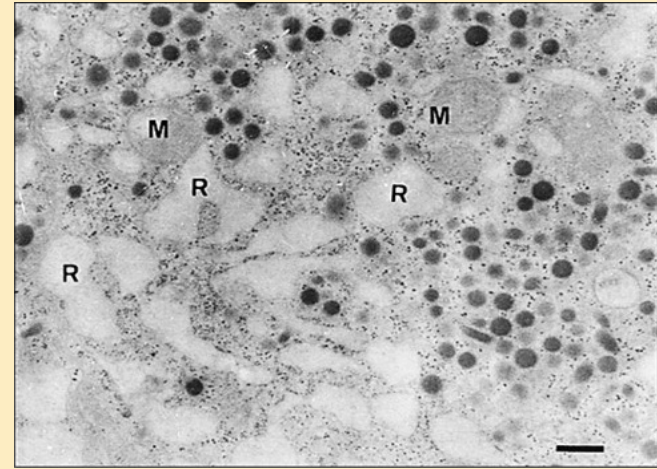


Fig. 17.14 Folliculotrope of 8w-LP. Dilated RER (R) with irregular profiles with intraluminal material of moderate density and numerous free ribosomes; secretory granules of variable density and mitochondria (M) (x 15.000, bar 1 µm).

Gonadotropes of SP evidence regular number of secretory granules and dilated RER with intraluminal colloid material. There appear mitochondria, free ribosomes and scattered lysosomes (Figs. 17.15-17.17).

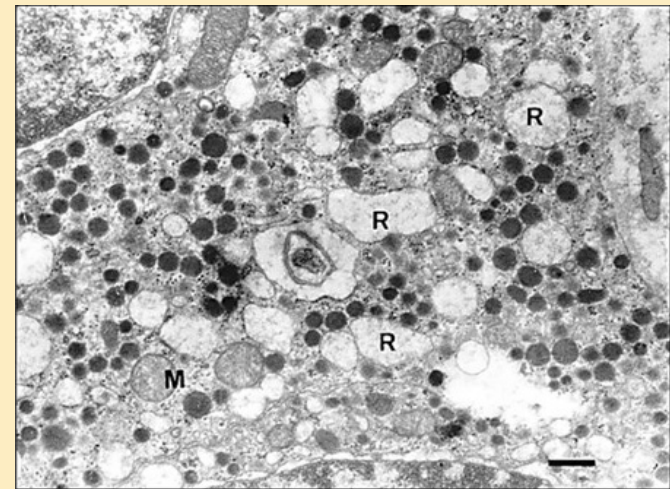


Fig. 17.15. Folliculotrope of 8w-SP. Dilated RER (R), mitochondria (M) and secretory granules (x 20.000, bar 500nm).

Las gonadotropas de FC muestran un regular número de gránulos secretorios y RER dilatado con material coloide intraluminal. Hay mitocondrias, ribosomas libres y lisosomas dispersos (Figs. 17.15-17.17).

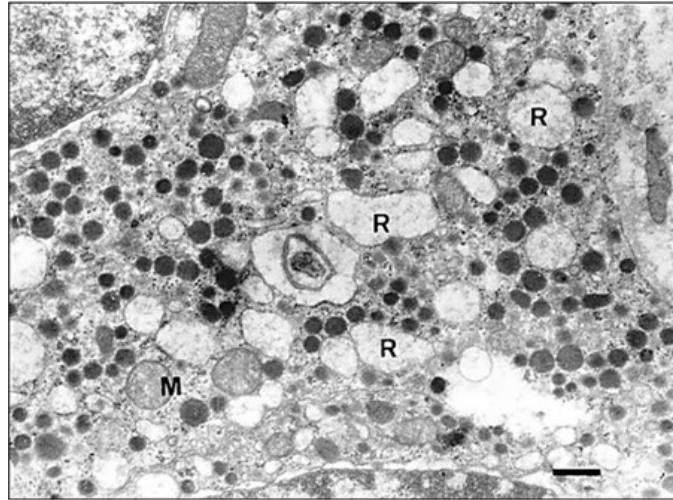


Fig. 17.15. Folliculotropa FC 8s. RER (R) dilatado, mitocondria (M) y gránulos secretorios (x 20.000, barra 500nm).

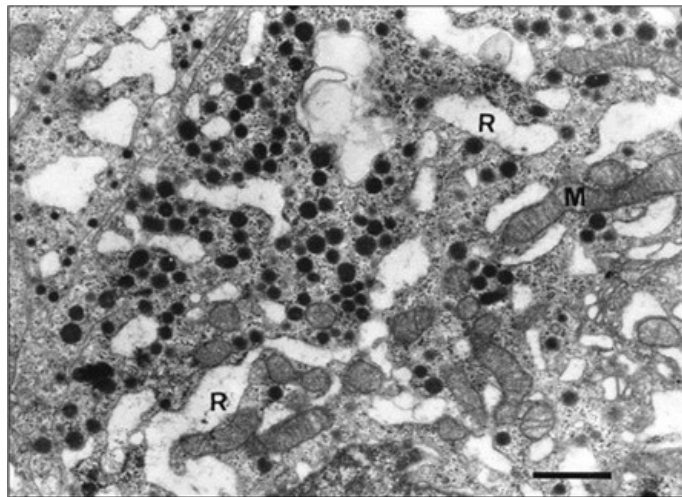


Fig. 17.16. Folliculotropa FC 16s. RER (R) dilatado, mitocondria (M) aislada y regular número de gránulos secretorios (x 19.000, barra 500 nm)

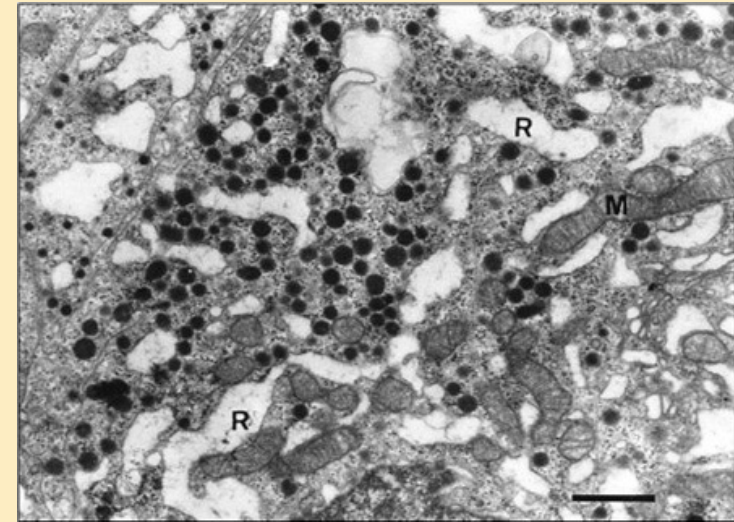


Fig. 17.16. Folliculotrope of 16w-SP. Dilated RER (R), isolated mitochondria (M) and regular number of secretory granules (x 19.000, bar 500 nm)

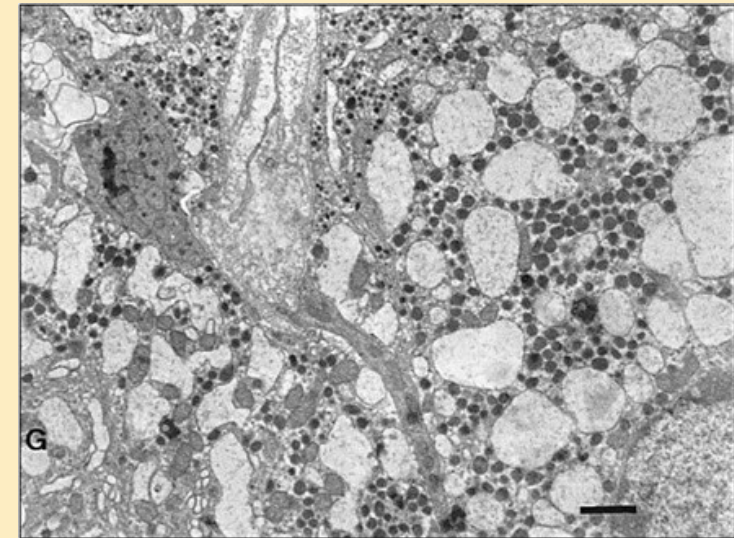


Fig. 17.17. Folliculotrope of 28w-SP. Two gonadotropes with dilated RER, an expanded Golgi (G) and some lysosomes (x 10.000, bar 1µm).

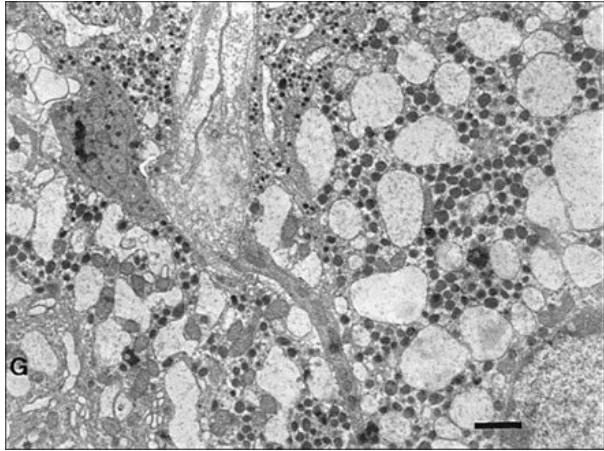


Fig. 17.17. Folículotropa FC 28s. Se ven dos gonadotropas con RER dilatado, Golgi (G) expandido y algunos lisosomas (x 10.000, barra 1µm).

En relación al estudio ultraestructural de la población gonadotropa, las microfotografías de FL muestran similitudes con las características en los gránulos secretorios que se han comunicado en pituitarias de hámsteres chinos (Deslex y col., 1976) y hámsteres dorados (Girod y Dubois, 1965; Dubois y Girod, 1967). Los parámetros ultraestructurales no presentan cambios en los gránulos secretorios y mitocondrias, pero hay descenso ($p < 0.05$) en el número de los perfiles exocíticos (**tabla 3**) (Cónsole y col., 2002b).

Tabla 3. Número de los componentes ultraestructurales por 50 (µm²) de las gonadotropas

Número	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
Gránulos secretorios	106±5	111±5	111±6	154±7	123±6	155±7	154±7	134±5
Mitocondrias	20±2	18±2	15±1.6	16±2	19±1	18±2	15±1	18±2
Perfiles exocíticos	5±0.3	6±0.4	5±0.6	6±0.4	5±0.2	1.1±0.1*	2±0.1*	7±0.6

Cada grupo representa el promedio ± ES, n=4, FL y FC, * $p < 0.05$.

En las semanas 16 y 22 de los animales de FC se registra un descenso del área promedio individual de los gránulos secretorios, al comparar con hámsteres sometidos a FL (**tabla 4**) (Cónsole y col., 2002b).

Detectors of photoperiods are critical in vertebrates, particularly for timing the onset of reproduction each year. In birds, the eyes do not appear to monitor photoperiodic information and specialized neurons, called deep brain photoreceptors (in septum and three hypothalamic areas), have been proposed to regulate the photoperiod, activating the neuroendocrine regulation of gonadal development (Kuenzel et al., 2015).

The return to more than 12 h light/day enables the recovery of the natural gonadal activity described by Berndtson and Desjardins (1974) as “induced recrudescence”. Light signaling goes through numerous synapses, from the retina to the pineal gland, where it is reflected as a daily cycle of melatonin secretion that increases at night and decreases in the day. The length of the night secretion period of melatonin regulates the pulsatile secretion of hypothalamic GnRH and the changes in its release led to alterations in LH and FSH secretion that were responsible of ovulation and variations in spermatogenesis (Malpaux et al., 1999).

Considering the ultrastructural study of the gonadotrope population, LP microphotographs evidence similar characteristics to those in the secretory granules reported in pituitaries of Chinese hamsters (Deslex et al., 1976) and in golden hamsters (Girod and Dubois, 1965; Dubois and Girod, 1967).

The ultrastructural parameters do not show any changes in the secretory granules and mitochondria, but the number of exocytic profiles is decreased ($p < 0.05$) (**table 3**) (Cónsole et al., 2002b).

Table 3. Number of gonadotrope ultrastructural components per 50 (µm²)

Number	LP				SP			
	8w	16w	22w	28w	8w	16w	22w	28w
Secretory granules	106±5	111±5	111±6	154±7	123±6	155±7	154±7	134±5
Mitochondria	20±2	18±2	15±1.6	16±2	19±1	18±2	15±1	18±2
Exocytic profiles	5±0.3	6±0.4	5±0.6	6±0.4	5±0.2	1.1±0.1*	2±0.1*	7±0.6

Each group represents the mean ± S.E.M., n=4, LP y SP, * $p < 0.05$.

At weeks 16 and 22 of SP animals there is a decrease of the individual mean area of the secretory granules when compared with hamsters submitted to LP (**table 4**) (Cónsole et al., 2002b).

Tabla 4. Área de los componentes ultraestructurales de las gonadotropas (unidad: 50 μm^2)

Área	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
Complejo de Golgi	2±0.3	2±0.4	2±0.3	2±0.4	2±0.1	2±0.3	2.6±0.4	3±0.5
RER	8±2.3	8±2.1	9±2.6	10±2.8	9±2.3	10±2.4	10±2	9±2
Mitocondrias	3±0.2	3±0.3	3±0.4	4±0.7	3±0.2	4±0.4	3.4±0.3	4±0.4
Gránulos secretorios	5±1.2	5±1.3	4±1.5	5±1.2	4±1.1	5.5±1	6±1.5	5.3±1
Gránulo Individual	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01*	0.03±0.01*	0.04±0.01

Cada grupo representa el promedio \pm ES, $n=4$, FL y FC, * $p < 0.05$.

Los niveles séricos de LH y FSH de los grupos FC están reducidos ($p < 0.05$) en la semana 16 en los diferentes estadios de los fotoperíodo-

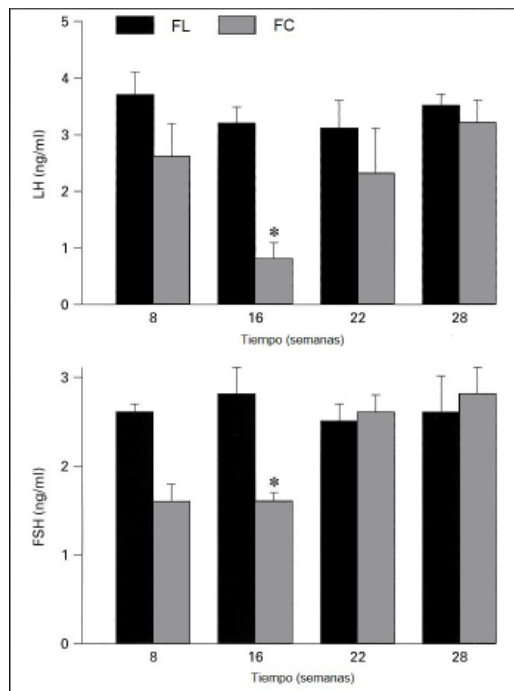


Fig. 17.18. Efecto de los FL y FC sobre los niveles séricos de LH y FSH en hámsteres sometidos a FL Y FC (* $p < 0.05$).

Table 4. Area of gonadotrope ultrastructural components (unit: 50 μm^2)

Area	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
Golgi complex	2±0.3	2±0.4	2±0.3	2±0.4	2±0.1	2±0.3	2.6±0.4	3±0.5
RER	8±2.3	8±2.1	9±2.6	10±2.8	9±2.3	10±2.4	10±2	9±2
Mitochondria	3±0.2	3±0.3	3±0.4	4±0.7	3±0.2	4±0.4	3.4±0.3	4±0.4
Secretory granules	5±1.2	5±1.3	4±1.5	5±1.2	4±1.1	5.5±1	6±1.5	5.3±1
Individual granule	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01*	0.03±0.01*	0.04±0.01

Each group represents the mean \pm S.E.M., $n=4$, LP and SP, * $p < 0.05$.

The LH and FSH serum levels of the SP groups appear reduced ($p < 0.05$) at week 16 in the different stages of the photoperiod and start to

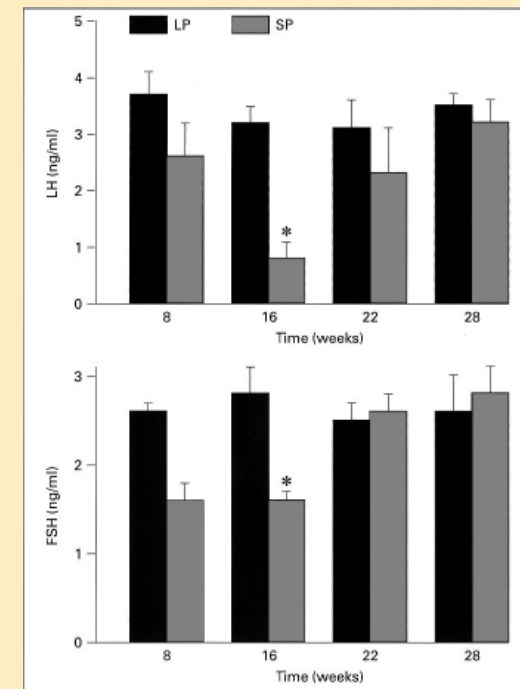


Fig. 17.18. Effect of LP and SP on LH and FSH serum levels of hamsters submitted to LP and SP (* $p < 0.05$).

dos y comienzan a recuperarse a las 22 semanas de los FC. A las 28 semanas los valores se acercan a los niveles de los hámsteres controles (**fig. 17.18**) (Cónsole y col., 2002b).

Los niveles circulantes de FSH comienzan a aumentar a los 3-5 días después de la transferencia de FC a FL. Los niveles de LH no muestran incrementos hasta varias semanas después. Estos patrones diferenciales de FSH y LH podrían representar ejemplos de una regulación diferencial de las gonadotropinas *in vivo* (Bernard y col., 2000). La leptina inhibió el eje reproductivo de hámsteres sirios machos expuestos a FL y FC (Boggio y col., 2013).

La recuperación de la actividad gonadal es precedida por cambios que ocurren en el eje hipotálamo-hipofisario (Bartke, 1985) aunque los mecanismos regulatorios deberían clarificarse más. El contenido de la GnRH hipotalámica estuvo ligeramente aumentado o no cambió a través del período de regresión testicular (Pickard y Silverman, 1979; Steger y col., 1982). La liberación de GnRH debería estar inhibida en los FC, mostrando cambios en la síntesis, como se muestra en los estudios inmunohistoquímicos presentados por Urbanski y col. (1991 y 1992). Los neurotransmisores controlan la síntesis hormonal hipofisaria, mientras que la liberación hormonal es regulada por las hormonas hipotalámicas hipofisotróficas. La noradrenalina (NA) es el principal estímulo inductor en la liberación de LH y FSH (Meites y Sonntag., 1981; Kalra y Kalra, 1983). Los valores de NA hipotalámica retornaron a los niveles de FL varias semanas previas a la aparición de la recrudescencia. La exposición a FC llevó a la supresión de la liberación de LH y FSH con una reducción en los pulsos (Reiter, 1980; Bartke, 1985; Steger y col., 1985a; Krey y col., 1989). En hámsteres dorados, el fotoperíodo no afectó el número de neuronas GnRH inmunorreactivas (Shionati, 1985; Ronchi, 1992), pero los animales sometidos a FC presentaron cuerpos neuronales de mayor tamaño (Urbanski, 1991; Korytko y col., 1997; Kriegsfeld y Nelson, 1998).

recover at week 22 of the SP. At week 28 values approach the levels of control hamsters (**fig. 17.18**) (Cónsole et al., 2002b).

The circulating levels of FSH start to increase after 3-5 days of the SP transference to LP. No increase of LH levels is shown until several weeks later. These differential patterns of FSH and LH might represent examples of a differential regulation of gonadotropins *in vivo* (Bernard et al., 2000). Leptin inhibited the reproductive axis of Syrian male hamsters exposed to LP and SP (Boggio et al., 2013).

The recovery of the gonadal activity is preceded by changes that take place in the hypothalamo-pituitary axis (Bartke, 1985) although the regulatory mechanisms should be further clarified. The contents of hypothalamic GnRH were slightly increased or unchanged throughout the period of testicular regression (Pickard and Silverman, 1979; Steger et al., 1982). The release of GnRH should be inhibited in SP, evidencing changes in the synthesis, as shown in the immunohistochemical studies presented by Urbanski et al. (1991 and 1992). Neurotransmitters control the pituitary hormone synthesis, whereas the hormone release is regulated by the hypothalamic hypothysiotropic hormones. Noradrenaline (NA) is the main stimulus for inducing LH and FSH release (Meites and Sonntag., 1981; Kalra and Kalra, 1983). Values of hypothalamic NA returned to FL levels several weeks previous to the appearance of recrudescence. Exposition to SP led to the suppression of LH and FSH release with reduced pulses (Reiter, 1980; Bartke, 1985; Steger et al., 1985a; Krey et al., 1989). In golden hamsters, the photoperiod did not affect the number of immunoreactive GnRH neurons (Shionati, 1985; Ronchi, 1992), but those animals submitted to SP showed the neuronal bodies of larger size (Urbanski, 1991; Korytko et al., 1997; Kriegsfeld and Nelson, 1998). Specific groups of neurons GnRH in the preoptic area are topographically organized to regulate the neuroendocrine reproductive system (Stevenson et al., 2012).

Se han detectado grupos específicos de neuronas GnRH en el área preóptica topográficamente organizada para regular el sistema neuroendocrino reproductivo (Stevenson y col., 2012).

La hormona gonadotrofina inhibitoria (GnIH) es un neuropéptido hipotalámico descubierto en la codorniz (pájaro fotoperiódico) como factor inhibidor de las gonadotrofinas que actúa directamente sobre la pituitaria (Tsutsui y col., 2010a-b y 2013). También ha sido identificada en mamíferos fotoperiódicos y en humanos (Fukusumi y col., 2001). La melatonina actuaría sobre las neuronas GnIH. La integración neuroendocrina de las señales internas y ambientales controla el proceso de la reproducción. El descubrimiento de la GnIH ha cambiado la comprensión del control hipotalámico de la reproducción y parece que la actividad de las neuronas GnIH disminuiría en los FC por acción inhibitoria de la melatonina nocturna en la pineal (Revel y col., 2008; Mason y col., 2010). Hattori y col. (1995) comunicaron que la melatonina inhibe de modo directo la liberación de LHRH. Los mamíferos y las aves, se enfrentan al reto de maximizar el éxito reproductivo ante la menor disponibilidad de los alimentos y las inclemencias climáticas (Bronson, 1989) y el sistema GnIH actuaría como intermediario entre el medio ambiente y el eje reproductivo. En hámsteres sirios las células del neuropéptido Y se proyectan a las células GnIH del hipotálamo dorsomedial, proporcionando una vía neural que se activa cuando hay reducción de los recursos alimentarios (Klingerman y col., 2011).

El pasaje de los hámsteres dorados machos de FL a FC causó atrofia testicular junto con un descenso significativo en la secreción de LH-FSH y la reducción del metabolismo de la NA a nivel de la eminencia media (Steger y Bartke, 1991). La longitud del período de luz modula los efectos de los andrógenos sobre la secreción de gonadotrofinas. La capacidad de biosíntesis de los andrógenos testiculares estuvo reducida en hámsteres adultos sometidos a FC y los testículos involucionados representaron un estadio fisiológico entre animales

The gonadotropin inhibiting hormone (GnIH) is a hypothalamic neuropeptide discovered in the quail (photoperiodic animal) as inhibiting factor of gonadotropins acting directly on the pituitary (Tsutsui et al., 2010a-b and 2013). It has also been identified in photoperiodic mammals and in human beings (Fukusumi et al., 2001). Melatonin would act on GnIH neurons. The neuroendocrine integration of internal and environmental signaling controls the reproduction process. The discovery of GnIH has changed the way to understand the hypothalamic control of reproduction and apparently the activity of GnIH neurons would diminish in SP by the inhibiting action of night melatonin in the pineal gland (Revel et al., 2008; Mason et al., 2010). Hattori et al. (1995) reported that melatonin directly inhibits LHRH release. Mammals and birds meet the challenge of maximizing the reproductive success in spite of the lower availability of food and climate inclemency (Bronson, 1989), and the GnIH system would act as intermediary between the environment and the reproductive axis. In syrian hamster Y neuropeptide cells are projected to GnIH cells of the dorsal-medial hypothalamus, providing a neural pathway that is activated when there is reduction of alimentary resources (Klingerman et al., 2011).

The transition of golden hamsters from LP to SP caused testicular atrophy together with a significant decrease LH-FSH secretion and diminished noradrenalin metabolism at the level of the media eminence (Steger and Bartke, 1991). The length of the period of light modulates the effect of androgens on gonadotropin secretion. The biosynthesis capacity of testicular androgens was reduced in adult hamsters submitted to SP and regressed testicles represented a physiological stage between prepubertal and adult active animals. Testicular receptors of LH in hamsters submitted to LP and SP were decreased by Px, but testicular receptors of PRL were not affected. In SP Px prevented testicular regression and the total content of LH and PRL decreased. Melatonin diminished the levels of PRL recep-

prepuberales y adultos activos. La Px disminuyó los receptores LH testiculares en hámsteres expuestos a FL y FC, pero no tuvo efecto sobre los receptores testiculares de PRL. En FC la Px impidió la regresión testicular y descendió el contenido total de receptores LH y PRL. La melatonina disminuyó los niveles de los receptores de PRL a nivel testicular (Amador y col., 1988). La exposición de los hámsteres dorados a FC resulta en una regresión temprana de los órganos reproductivos con posterior recrudescencia espontánea. Hubo aumento de los niveles de poliaminas testiculares en los FC, con retorno a los niveles normales en la recrudescencia (Frungeri y col., 1996a). Entre 12 y 18 semanas de FC, el contenido del ácido γ -aminobutírico (GABA) y ácido glutámico en las células testiculares se redujo de modo significativo, mientras el GABA aumentó y el ácido glutámico disminuyó durante la involución máxima ($p < 0.05$) (Frungeri y col., 1996b). Las concentraciones muy disminuidas de andrógenos durante la fase involutiva podrían ser el resultado de la ausencia de factores estimuladores pituitarios, asociadas a una regulación negativa de la esteroidogénesis, en respuesta a diferentes señales no-esteroides intra o extratesticulares (Frungeri y col., 1999).

Además, las vizcachas machos (*Lagostomus maximus*) produjeron menos espermatozoides durante la primavera respecto al verano, sugiriendo un efecto estacional sobre la espermatogénesis inducida por el fotoperíodo que promueve cambios significativos en los túbulos seminíferos y en el rendimiento de las células germinales (Godoy Pieri y col., 2014). La expresión testicular de la modulación fotoperiódica en los receptores de membrana de la melatonina (RMT1) nunca ha sido comunicada en el hámster dorado. Mukherjee y Haldar (2014) han sugerido que el fotoperíodo es regulado a través de los niveles circulatorios y locales de la melatonina, así como la expresión de RMT1 en testículos afina la esteroidogénesis y el estado reproductivo del hámster dorado. Un marcapaso circanual mamario sería responsable de la regulación del patrón estacional de PRL en la

tors at testicular level (Amador et al., 1988). The submission of golden hamsters to SP results in early regression of reproductive organs with subsequent spontaneous recrudescence. Testicular polyamine levels increased in SP and returned to normal levels at recrudescence (Frungeri et al., 1996a). Between weeks 12 and 18 of SP, the content of γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid in testicular cells was significantly reduced, whereas GABA increased and glutamic acid decreased during maximum regression ($p < 0.05$) (Frungeri et al., 1996b). Highly diminished concentrations of androgens during the regression phase might be the result of absent pituitary stimulating factors, associated with a negative regulation of steroidogenesis as a response of different non-steroid signaling inside or outside of the testicle (Frungeri et al., 1999).

In addition, male vizcachas (*Lagostomus maximus*) produced less sperm during the spring than the summer, suggesting a seasonal impact on spermatogenesis induced by photoperiod that promote significant changes in the seminiferous tubules and in the germ cell yield (Godoy Pieri et al., 2014). Photoperiodic modulation of melatonin membrane receptor (MT1R) expression in testis has never been reported in adult golden hamster. Mukherjee and Haldar (2014) have suggested that photoperiod via regulating circulatory and local melatonin level as well as MT1R expression in testes fine tunes the steroidogenesis and reproductive status of golden hamster.

A mammalian circannual pacemaker responsible for regulating the seasonal pattern of PRL has been recently described in sheep. This pacemaker resides within the *pars tuberalis* and expresses melatonin receptors. The gonadotropes are controlled indirectly by neighboring melatonin responsive cells, allowing acting as a pacemaker (Hodson et al., 2013).

Our results showed alterations in the release but not in the synthesis, in correlation with the hypothalamic immunohistochemical findings. Changes in the secretion of pituitary hormones were preceded

oveja. Este marcapaso reside en la *pars tuberalis* y expresa receptores de melatonina. Las gonadotropas son controladas indirectamente por las células vecinas, permitiendo actuar como un marcapasos (Hodson et al., 2013).

Nuestros resultados mostraron alteraciones en la liberación, pero no en la síntesis, en correlación con los hallazgos inmunohistoquímicos hipotalámicos. Los cambios en la secreción de hormonas pituitarias fueron precedidos por distorsiones en el metabolismo de los neurotransmisores hipotalámicos en animales sometidos a FC. Estos fotoperíodos regulan la síntesis y liberación de GnRH, endorfina, vasopresina y arginina, las que estimulan la liberación de gonadotropinas pituitarias y el desarrollo sexual, que a su vez controlan las hormonas esteroides gonadales (Bittman y col., 1996). Al pasar de FC a FL, los hámsteres machos estuvieron afectados por un incremento transitorio en la producción de GnRH, con una población estable de neuronas. Cuando aumentó la secreción de GnRH durante los días largos, se halló que el contenido peptídico dentro de los cuerpos neuronales declinó y llevó a un descenso en el número de neuronas inmunorreactivas detectadas (Bernard y col., 1999). Además, los hámsteres Siberianos mostraron que la menor frecuencia de los pulsos de GnRH facilitó la liberación de la FSH, mientras que la mayor frecuencia de pulsos liberó a favor de la LH (Meredith y col., 1998).

En síntesis, los estudios inmunohistoquímicos, ultraestructurales y séricos en el eje gonadotropo se correlacionaron, mostrando ajustes en la transferencia de FL a FC y en la posterior recrudescencia espontánea.

Referencias

Amador AG, Klemcke HG, Vaughn MK, Bartke A, Steger RW, Reiter RJ. Effects of pinealectomy and melatonin or 5-methoxytryptamine on

by distortions in the metabolism of hypothalamic neurotransmitters in animals subjected to SP. These photoperiods regulate the synthesis and release of GnRH, endorphin, vasopressin and arginine, which stimulate pituitary gonadotropin release and sexual development, which in turn control gonadal steroid hormones (Bittman et al., 1996). The shift from SP to LP affected the male hamsters with a transitory increase in GnRH production, and a stable neuron population. When GnRH secretion increased during long days, the peptide content within the neuronal bodies was found to be diminished and led to a decrease in the number of immunoreactive neurons detected (Bernard et al., 1999). Also, Siberian hamsters evidenced that lower frequency of GnRH pulses facilitate FSH release, whereas higher frequency of pulses favors LH (Meredith et al., 1998).

To summarize, the ultrastructural, immunohistochemical and serum studies in the gonadotrope axis were correlated, showing adjustments in the transference from LP to SP and in the subsequent spontaneous recrudescence.

References

- Amador AG, Klemcke HG, Vaughn MK, Bartke A, Steger RW, Reiter RJ. Effects of pinealectomy and melatonin or 5-methoxytryptamine on testicular LH and PRL receptors in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Rev Esp Fisiol* 1988; 44(1):81-86.
- Badura LL, Goldman BD. Anterior pituitary release of prolactin is inhibited by exposure to short photoperiod. *J Neuroendocrinol* 1997; 9(5):341-345.
- Bartke A, Croft BT, Dalterio S. Prolactin restores plasma testosterone levels and stimulates testicular growth in hamsters exposed to short day-length. *Endocrinology* 1975; 97(6):1601-04.

testicular LH and PRL receptors in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Rev Esp Fisiol* 1988; 44(1):81-86.

Badura LL, Goldman BD. Anterior pituitary release of prolactin is inhibited by exposure to short photoperiod. *J Neuroendocrinol* 1997; 9(5):341-345.

Bartke A, Croft BT, Dalterio S. Prolactin restores plasma testosterone levels and stimulates testicular growth in hamsters exposed to short day-length. *Endocrinology* 1975; 97(6):1601-04.

Bartke A, Goldman BD, Bex FJ, Kelch RJ, Smith MJ, Dalterio S, Doherty PC. Effects of prolactin on testicular regression and recrudescence in the golden hamster. *Endocrinology* 1980; 106(1):167-172.

Bartke A. Male hamster reproductive endocrinology. The hamster. In: H.I. Siegel, ed. Plenum, New York, 1985:73-98.

Benson B, Matthews MJ. Possible role of prolactin and pineal prolactin-regulating substances in pineal-mediated gonadal atrophy in hamster. *Horm Res* 1980; 12(3):137-148.

Bernard DJ, Abuav-Nussbaum R, Horton TH, Turek FW. Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1999; 60(2):272-276.

Bernard DJ, Merzlyak IY, Horton TH, Turek FW. Differential regulation of pituitary gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in photo-stimulated Siberian hamsters. *Biol Reprod* 2000; 62(1):155-161.

Berndtson WE, Desjardins C. Circulating LH and FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiod stimulation. *Endocrinology* 1974; 95(1):195-205.

Bex FJ, Bartke A, Goldman BD, Dalterio S. Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology* 1978; 103(6):2069-80.

Bex FJ, Bartke A. Testicular LH binding in the hamster: modification by photoperiod and prolactin. *Endocrinology* 1977; 100(4):1223-26.

Bartke A, Goldman BD, Bex FJ, Kelch RJ, Smith MJ, Dalterio S, Doherty PC. Effects of prolactin on testicular regression and recrudescence in the golden hamster. *Endocrinology* 1980; 106(1):167-172.

Bartke A. Male hamster reproductive endocrinology. The hamster. In: H.I. Siegel, ed. Plenum, New York, 1985:73-98.

Benson B, Matthews MJ. Possible role of prolactin and pineal prolactin-regulating substances in pineal-mediated gonadal atrophy in hamster. *Horm Res* 1980; 12(3):137-148.

Bernard DJ, Abuav-Nussbaum R, Horton TH, Turek FW. Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1999; 60(2):272-276.

Bernard DJ, Merzlyak IY, Horton TH, Turek FW. Differential regulation of pituitary gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in photo-stimulated Siberian hamsters. *Biol Reprod* 2000; 62(1):155-161.

Berndtson WE, Desjardins C. Circulating LH and FSH levels and testicular function in hamsters during light deprivation and subsequent photoperiod stimulation. *Endocrinology* 1974; 95(1):195-205.

Bex FJ, Bartke A, Goldman BD, Dalterio S. Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology* 1978; 103(6):2069-80.

Bex FJ, Bartke A. Testicular LH binding in the hamster: modification by photoperiod and prolactin. *Endocrinology* 1977; 100(4):1223-26.

Bittman EL, Jetton AE, Villalba C, Devries GJ. Effects of photoperiod and androgen on pituitary function and neuropeptide staining in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 1996; 271(1Pt2): R64-72.

Blask DE, Leadem CA, Orstead KM, Larsen BR. Prolactin cell activity in female and male Syrian hamsters: an apparent sexually dimorphic response to light deprivation and pinealectomy. *Neuroendocrinology* 1986a; 42(1):15-20.

Bittman EL, Jetton AE, Villalba C, Devries GJ. Effects of photoperiod and androgen on pituitary function and neuropeptide staining in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 1996; 271(1Pt2): R64-72.

Blask DE, Leadem CA, Orstead KM, Larsen BR. Prolactin cell activity in female and male Syrian hamsters: an apparent sexually dimorphic response to light deprivation and pinealectomy. *Neuroendocrinology* 1986a; 42(1):15-20.

Blask FJ, Orstead KM. Dopamine inhibition of prolactin release but not synthesis in the male Syrian hamster: in vitro studies. *Life Sci* 1986b; 38(21):1915-21.

Boggio V, Cutrera R, Carbone S, Scacchi P, Ponzo DO. Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod. *Reprod Biol* 2013; 13(3):203-208.

Borer KT, Kelch RP, Corley K. Hamster prolactin: physiological changes in blood and pituitary concentrations as measured by a homologous radioimmunoassay. *Neuroendocrinology* 1982; 35(1):13-21.

Bosler O, Girardet C, Sage-Ciocca D, Jacomy H, Francois-Bellan AM, Becquet D. Mechanisms of structural plasticity associated with photic synchronization of the circadian clock within the suprachiasmatic nucleus. *J Soc Biol* 2009; 203(1):49-63.

Bronson FH. *Mammalian Reproductive Biology*. In: Chicago: University of Chicago Press, 1989.

Chandrashekar V, Bartke A. The influence of short photoperiod on testicular and circulating levels of testosterone precursors in the adult golden hamster. *Biol Reprod* 1989; 40(2):300-306.

Cónsole GM, Jurado SB, Camihort G, Calandra RS, Zitta K, Gómez Dumm CL. Morphological and biochemical changes of pituitary gonadotropes in male golden hamsters submitted to short and long photoperiods. *Cell Tissues Organs* 2002a; 171(2-3):177-187.

Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology and

Blask FJ, Orstead KM. Dopamine inhibition of prolactin release but not synthesis in the male Syrian hamster: in vitro studies. *Life Sci* 1986b; 38(21):1915-21.

Boggio V, Cutrera R, Carbone S, Scacchi P, Ponzo DO. Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod. *Reprod Biol* 2013; 13(3):203-208.

Borer KT, Kelch RP, Corley K. Hamster prolactin: physiological changes in blood and pituitary concentrations as measured by a homologous radioimmunoassay. *Neuroendocrinology* 1982; 35(1):13-21.

Bosler O, Girardet C, Sage-Ciocca D, Jacomy H, Francois-Bellan AM, Becquet D. Mechanisms of structural plasticity associated with photic synchronization of the circadian clock within the suprachiasmatic nucleus. *J Soc Biol* 2009; 203(1):49-63.

Bronson FH. *Mammalian Reproductive Biology*. In: Chicago: University of Chicago Press, 1989.

Chandrashekar V, Bartke A. The influence of short photoperiod on testicular and circulating levels of testosterone precursors in the adult golden hamster. *Biol Reprod* 1989; 40(2):300-306.

Cónsole GM, Jurado SB, Camihort G, Calandra RS, Zitta K, Gómez Dumm CL. Morphological and biochemical changes of pituitary gonadotropes in male golden hamsters submitted to short and long photoperiods. *Cell Tissues Organs* 2002a; 171(2-3):177-187.

Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra RS, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology and function of pituitary lactotropes in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 2002b; 75(5):316-325.

Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJ. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5:19.

Desjardins C, Ewing LG, Johnson BH. Effects of light deprivation upon the spermatogenic and steroidogenic elements of hamster testes. *Endocrinology* 1971; 89(3):791-800.

- function of pituitary lactotropes in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 2002b; 75(5):316-325.
- Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJ. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5:19.
- Desjardins C, Ewing LG, Johnson BH. Effects of light deprivation upon the spermatogenic and steroidogenic elements of hamster testes. *Endocrinology* 1971; 89(3):791-800.
- Deslex P, Rossi GL, Probst D. Ultrastructural study of the adeno-hypophysis of the Chinese hamster. *Acta Anat (Basel)* 1976; 96(1):35-54.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Bartke A, Calandra RS. Influence of age and photoperiod on steroidogenic function of the testis in the golden hamster. *Int J Androl* 1999; 22(4):243-252.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int J Androl* 1996a; 19(3):171-178.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. Polyamine levels in testes and seminal vesicles from adult golden hamsters during gonadal regression-recrudescence. *J Androl* 1996b; 17(6):683-691.
- Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, Iijima N, Kawamata Y, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Kitada C, Shintani Y, Suenaga M, Onda H, Nishimura O, Takana M, Ibata Y, Fujino M. Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540(3):221-232.
- Girod C, Dubois P. Ultrastructural study of the gonadotropic cells of anterior pituitary the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterh.). *J Ultrastruct Res* 1965; 13(1):212-232.
- Glickman T, Webb IC, Elliot JA, Baltazar RM, Reale ME, Lehman MN, Gorman MR. Photic sensitivity for circadian response to light varies with photoperiod. *J Biol Rhythms* 2012; 27(4):308-318.
- Deslex P, Rossi GL, Probst D. Ultrastructural study of the adeno-hypophysis of the Chinese hamster. *Acta Anat (Basel)* 1976; 96(1):35-54.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Bartke A, Calandra RS. Influence of age and photoperiod on steroidogenic function of the testis in the golden hamster. *Int J Androl* 1999; 22(4):243-252.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int J Androl* 1996a; 19(3):171-178.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. Polyamine levels in testes and seminal vesicles from adult golden hamsters during gonadal regression-recrudescence. *J Androl* 1996b; 17(6):683-691.
- Fukusumi S, Habata Y, Yoshida H, Iijima N, Kawamata Y, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Kitada C, Shintani Y, Suenaga M, Onda H, Nishimura O, Takana M, Ibata Y, Fujino M. Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540(3):221-232.
- Girod C, Dubois P. Ultrastructural study of the gonadotropic cells of anterior pituitary the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterh.). *J Ultrastruct Res* 1965; 13(1):212-232.
- Glickman T, Webb IC, Elliot JA, Baltazar RM, Reale ME, Lehman MN, Gorman MR. Photic sensitivity for circadian response to light varies with photoperiod. *J Biol Rhythms* 2012; 27(4):308-318.
- Gogoy Pieri NC, da Silva Santos PR, Santos Roballo KC, Flamini MA, Barbeito CG, Ambrosio CE, Miglino MA, Dos Santos Martins D. Seasonal variations cause morphological changes and altered spermatogenesis in the testes of vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Anim Reprod* 2014; 149(3-4):316-324.
- Hattori A, Herbert DC, Vaughan MK, Yaga K, Reiter RJ. Melatonin inhibits luteinizing hormone releasing (LHRH) induction of LH release from fetal rat pituitary cells. *Neurosci Lett* 1995; 184(2):109-112.

Gogoy Pieri NC, da Silva Santos PR, Santos Roballo KC, Flamini MA, Barbeito CG, Ambrosio CE, Miglino MA, Dos Santos Martins D. Seasonal variations cause morphological changes and altered spermatogenesis in the testes of vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Anim Reprod* 2014; 149(3-4):316-324.

Hattori A, Herbert DC, Vaughan MK, Yaga K, Reiter RJ. Melatonin inhibits luteinizing hormone releasing (LHRH) induction of LH release from fetal rat pituitary cells. *Neurosci Lett* 1995; 184(2):109-112.

Hazlerigg DG, Lincoln GA. Hypothesis: cyclical histogenesis is the basis of circannual timing. *J Biol Rhythms* 2011; 26(6):471-485.

Hazlerigg DG. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates. *Prog Brain Res* 2012; 199:413-422.

Hodson DJ, Townsend J, Tortonesi DJ. Cells co-expressing luteinizing hormone and thyroid-stimulating hormone are present in the ovine pituitary pars distalis but not the pars tuberalis: implications for the control of endogenous circannual rhythms of prolactin. *Neuroendocrinology* 2013; 97(4):355-362.

Ikeno T, Weil ZM, Nelson RJ. Photoperiod affects the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of Siberian hamsters. *Chronobiol Int* 2013; 30(9):1089-1100.

Kalra SP, Kalra PS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 1983; 4(4):311-351.

Kirsch K, Zieba DA. A review on effect of the photoperiod and melatonin on interactions between ghrelin and serotonin. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 179(2):248-253.

Klingerman CM, Williams WP, Simberlund J, Brahme N, Prasad A, Schneider JE, Kriegsfeld LJ. Food restriction-induced changes in gonadotropin-inhibiting hormone cells are associated with changes in sexual motivation and food hoarding, but not sexual performance and food-intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:101.

Korytko AI, Dluzen DE, Blank JL. Photoperiod and steroid-dependent adjustments in hypothalamic gonadotropic hormone-releasing hor-

Hazlerigg DG, Lincoln GA. Hypothesis: cyclical histogenesis is the basis of circannual timing. *J Biol Rhythms* 2011; 26(6):471-485.

Hazlerigg DG. The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates. *Prog Brain Res* 2012; 199:413-422.

Hodson DJ, Townsend J, Tortonesi DJ. Cells co-expressing luteinizing hormone and thyroid-stimulating hormone are present in the ovine pituitary pars distalis but not the pars tuberalis: implications for the control of endogenous circannual rhythms of prolactin. *Neuroendocrinology* 2013; 97(4):355-362.

Ikeno T, Weil ZM, Nelson RJ. Photoperiod affects the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of Siberian hamsters. *Chronobiol Int* 2013; 30(9):1089-1100.

Kalra SP, Kalra PS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 1983; 4(4):311-351.

Kirsch K, Zieba DA. A review on effect of the photoperiod and melatonin on interactions between ghrelin and serotonin. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 179(2):248-253.

Klingerman CM, Williams WP, Simberlund J, Brahme N, Prasad A, Schneider JE, Kriegsfeld LJ. Food restriction-induced changes in gonadotropin-inhibiting hormone cells are associated with changes in sexual motivation and food hoarding, but not sexual performance and food-intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:101.

Korytko AI, Dluzen DE, Blank JL. Photoperiod and steroid-dependent adjustments in hypothalamic gonadotropic hormone-releasing hormone, dopamine, and norepinephrine content in male deer mice. *Biol Reprod* 1997; 56(3):617-624.

Krey LC, Ronchi E, Bittman EL. Effects of daylength on androgen metabolism and pulsatile luteinizing hormone secretion in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 1989; 50(5):533-542.

Kriegsfeld LJ, Nelson RJ. The GnRH neuronal system of male prairie voles (*Microtus ochrogaster*) that vary in reproductive response to photoperiod. *Soc Res Biol Rhythms Abstr* 1998; 6: 58.

mone, dopamine, and norepinephrine content in male deer mice. *Biol Reprod* 1997; 56(3):617-624.

Krey LC, Ronchi E, Bittman EL. Effects of daylength on androgen metabolism and pulsatile luteinizing hormone secretion in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 1989; 50(5):533-542.

Kriegsfeld LJ, Nelson RJ. The GnRH neuronal system of male prairie voles (*Microtus ochrogaster*) that vary in reproductive response to photoperiod. *Soc Res Biol Rhythms Abstr* 1998; 6: 58.

Kuenzel WJ, Kang SW, Zhou ZJ. Exploring avian deep-brain photoreceptors and their role in activating the neuroendocrine regulation of gonadal development. *Poult Sci* 2015, 94(4):786-798.

Leadem CA, Burns DM, Benson B. Possible involvement of the hypothalamic dopaminergic system in the prolactin-inhibitory effects of the pineal gland in blind-anosmic male rats. *Neuroendocrinology* 1988; 48(1):1-7.

Lewis UJ, Sinha YN, Mrkoff E, VanderLann WP. Multiple forms of prolactin: properties and measurement. In: Muller EE (ed.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985; 4:43-57.

Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D. Clock genes and long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(4):390-397.

Lincoln GA. Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. *Systems ancient and modern. Adv Exp Med Biol* 1999; 460:137-153.

Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P. Melatonin and seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 1999; 39(3):355-366.

Maronde E, Pfeffer M, Glass Y, Stehle JH. Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res* 2007; 43(1):16-24.

Mason AO, Duffy S, Zhao S, Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K, Silver R, Kriegsfeld LJ. Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression

Kuenzel WJ, Kang SW, Zhou ZJ. Exploring avian deep-brain photoreceptors and their role in activating the neuroendocrine regulation of gonadal development. *Poult Sci* 2015, 94(4):786-798.

Leadem CA, Burns DM, Benson B. Possible involvement of the hypothalamic dopaminergic system in the prolactin-inhibitory effects of the pineal gland in blind-anosmic male rats. *Neuroendocrinology* 1988; 48(1):1-7.

Lewis UJ, Sinha YN, Mrkoff E, VanderLann WP. Multiple forms of prolactin: properties and measurement. In: Muller EE (ed.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985; 4:43-57.

Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D. Clock genes and long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(4):390-397.

Lincoln GA. Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. *Systems ancient and modern. Adv Exp Med Biol* 1999; 460:137-153.

Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P. Melatonin and seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 1999; 39(3):355-366.

Maronde E, Pfeffer M, Glass Y, Stehle JH. Transcription factor dynamics in pineal gland and liver of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) adapts to prevailing photoperiod. *J Pineal Res* 2007; 43(1):16-24.

Mason AO, Duffy S, Zhao S, Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K, Silver R, Kriegsfeld LJ. Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* 2010; 25(3):176-185.

Massa JS, Blask DE. An early pineal-induced suppression of pituitary prolactin mRNA levels in light-deprived male hamsters. *Neuroendocrinology* 1989; 50(5):506-512.

in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* 2010; 25(3):176-185.

Massa JS, Blask DE. An early pineal-induced suppression of pituitary prolactin mRNA levels in light-deprived male hamsters. *Neuroendocrinology* 1989; 50(5):506-512.

Meites J, Sonntag WE. Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation: current views. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21:295-322.

Meredith JM, Turek FW, Levine JE. Effects of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency modulation on the reproductive axis of photoinhibited male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1998; 59(4):813-819.

Merks T, Schulze-Bonhage A, Wittkowski, W. Photoperiod-dependent changes in exocytotic activity in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 1993; 273(2):287-291.

Mukherjee A, Haldar C. Photoperiodic regulation of melatonin membrane receptor (MT1R) expression and steroidogenesis in testis of adult golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J Photochem Photobiol B*. 2014; 140C:374-380.

Muraro NI, Pirez N, Ceriani MF. The circadian system: plasticity at many levels. *Neuroscience* 2013; 247:280-293.

Nakane Y, Yoshimura T. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Front Neurosci* 2014; 8:115.

Orstead KM, Blask DE. Neuroendocrine effects of light deprivation and pinealectomy in vivo on the time course of changes in prolactin cell activity in vitro. *Neuroendocrinology* 1987; 45(3):182-190.

Pickard GE, Silverman AJ. Effects of photoperiod on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in the male hamster. *J Endocrinol* 1979; 83(3):421-428.

Meites J, Sonntag WE. Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation: current views. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21:295-322.

Meredith JM, Turek FW, Levine JE. Effects of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency modulation on the reproductive axis of photoinhibited male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1998; 59(4):813-819.

Merks T, Schulze-Bonhage A, Wittkowski, W. Photoperiod-dependent changes in exocytotic activity in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 1993; 273(2):287-291.

Mukherjee A, Haldar C. Photoperiodic regulation of melatonin membrane receptor (MT1R) expression and steroidogenesis in testis of adult golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J Photochem Photobiol B*. 2014; 140C:374-380.

Muraro NI, Pirez N, Ceriani MF. The circadian system: plasticity at many levels. *Neuroscience* 2013; 247:280-293.

Nakane Y, Yoshimura T. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Front Neurosci* 2014; 8:115.

Orstead KM, Blask DE. Neuroendocrine effects of light deprivation and pinealectomy in vivo on the time course of changes in prolactin cell activity in vitro. *Neuroendocrinology* 1987; 45(3):182-190.

Pickard GE, Silverman AJ. Effects of photoperiod on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in the male hamster. *J Endocrinol* 1979; 83(3):421-428.

Piekarski DJ, Jarjisian SG, Pérez L, Ahmad H, Dhawan N, Zucker I, Kriegsfeld LJ. Effects of pinealectomy and short day lengths on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptin and GnRH in female Turkish hamsters. *J Biol Rhythms* 2014; 29(3):181-191.

- Piekarski DJ, Jarjisian SG, Pérez L, Ahmad H, Dhawan N, Zucker I, Kriegsfeld LJ. Effects of pinealectomy and short day lengths on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptin and GnRH in female Turkish hamsters. *J Biol Rhythms* 2014; 29(3):181-191.
- Piezzi RS, Guzmán JA, Pelzer LE, Scardapane L, Domínguez S. Biological role of the pineal. Response to the environmental photoperiod. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1984; 17(3-4):273-282.
- Rani S, Kumar V. Photoperiodic regulation of seasonal reproduction in higher vertebrates. *Indian J Exp Biol* 2014; 52(5):413-419.
- Reiter RJ, Ferguson BN. Delayed reproductive regression in male hamsters bearing intrarenal pituitary homografts and kept under natural winter photoperiods. *J Exp Zool* 1979; 209(1):175-180.
- Reiter RJ, Johnson LY. Depressant action of the pineal gland on pituitary luteinizing hormone and prolactin in male hamsters. *Horm Res* 1974; 5(5):311-320.
- Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol* 1991; 35(3):169-175.
- Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1(2):109-131.
- Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 2008; 149(3):902-912.
- Ronchi E, Krey L, Pfaff DW. Steady state analysis of hypothalamic GnRH mRNA levels in male Syrian hamsters: influences of photoperiod and androgen. *Neuroendocrinology* 1992; 55(2):146-155.
- Sáenz de Miera C, Monecke S, Bartzen-Sprauer J, Larách-Chich MP, Pévet-Chich MP, Pévet P, Hazlerigg DG, Simonneaux V. A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol* 2014; 24(13):1500-1506.
- Shiotani Y, Cho HJ, Shiosaka S, Tasaka K, Miyake A, Aono T. Changes in the pineal gland, LH-RH neuron system and pituitary gonadal axis
- Piezzi RS, Guzmán JA, Pelzer LE, Scardapane L, Domínguez S. Biological role of the pineal. Response to the environmental photoperiod. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1984; 17(3-4):273-282.
- Rani S, Kumar V. Photoperiodic regulation of seasonal reproduction in higher vertebrates. *Indian J Exp Biol* 2014; 52(5):413-419.
- Reiter RJ, Ferguson BN. Delayed reproductive regression in male hamsters bearing intrarenal pituitary homografts and kept under natural winter photoperiods. *J Exp Zool* 1979; 209(1):175-180.
- Reiter RJ, Johnson LY. Depressant action of the pineal gland on pituitary luteinizing hormone and prolactin in male hamsters. *Horm Res* 1974; 5(5):311-320.
- Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol* 1991; 35(3):169-175.
- Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1(2):109-131.
- Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 2008; 149(3):902-912.
- Ronchi E, Krey L, Pfaff DW. Steady state analysis of hypothalamic GnRH mRNA levels in male Syrian hamsters: influences of photoperiod and androgen. *Neuroendocrinology* 1992; 55(2):146-155.
- Sáenz de Miera C, Monecke S, Bartzen-Sprauer J, Larách-Chich MP, Pévet-Chich MP, Pévet P, Hazlerigg DG, Simonneaux V. A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol* 2014; 24(13):1500-1506.
- Shiotani Y, Cho HJ, Shiosaka S, Tasaka K, Miyake A, Aono T. Changes in the pineal gland, LH-RH neuron system and pituitary gonadal axis in golden hamsters under artificial winter conditions. *Biomed Res* 1985; 6:297-305.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD, Soares MJ, Talamantes F. Effects of short photoperiod on the ability of golden hamster pituitaries

- in golden hamsters under artificial winter conditions. *Biomed Res* 1985; 6:297-305.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD, Soares MJ, Talamantes F. Effects of short photoperiod on the ability of golden hamster pituitaries to secrete prolactin and gonadotropins in vitro. *Biol Reprod* 1983; 29(4):872-878.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD. Alterations in neuroendocrine function during photoperiod induced testicular atrophy and recrudescence in the golden hamster. *Biol Reprod* 1982; 26(3):437-444.
- Steger RW, Bartke A. Temporal sequence of neuroendocrine events associated with the transfer of male golden hamsters from stimulatory to a nonstimulatory photoperiod. *Biol Reprod* 1991; 44(1):76-82.
- Steger RW, Juszczak M, Fadden C, Bartke A. Photoperiod effects on neurohypophyseal and tuberoinfundibular dopamine metabolism in male hamster. *Endocrinology* 1995; 136(7):3000-06.
- Steger RW, Matt KS, Bartke A. Neuroendocrine regulation of seasonal reproductive activity in the male golden hamster. *Neurosci Biobehav Rev* 1985a; 9(2):191-201.
- Steger RW, Matt KS, Klemcke HG, Bartke A. Interactions of photoperiod and ectopic pituitary grafts on hypothalamic and pituitary function in male hamsters. *Neuroendocrinology* 1985b; 41(2):89-96.
- Stevenson TJ, Hahn TP, MacDougall-Shackleton SA, Ball GF. Gonadotropin-releasing hormone plasticity: a comparative perspective. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):287-300.
- Stirland JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS. Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 2001; 13(2):147-157.
- Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2010a; 31(3):284-295.
- to secrete prolactin and gonadotropins in vitro. *Biol Reprod* 1983; 29(4):872-878.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD. Alterations in neuroendocrine function during photoperiod induced testicular atrophy and recrudescence in the golden hamster. *Biol Reprod* 1982; 26(3):437-444.
- Steger RW, Bartke A. Temporal sequence of neuroendocrine events associated with the transfer of male golden hamsters from stimulatory to a nonstimulatory photoperiod. *Biol Reprod* 1991; 44(1):76-82.
- Steger RW, Juszczak M, Fadden C, Bartke A. Photoperiod effects on neurohypophyseal and tuberoinfundibular dopamine metabolism in male hamster. *Endocrinology* 1995; 136(7):3000-06.
- Steger RW, Matt KS, Bartke A. Neuroendocrine regulation of seasonal reproductive activity in the male golden hamster. *Neurosci Biobehav Rev* 1985a; 9(2):191-201.
- Steger RW, Matt KS, Klemcke HG, Bartke A. Interactions of photoperiod and ectopic pituitary grafts on hypothalamic and pituitary function in male hamsters. *Neuroendocrinology* 1985b; 41(2):89-96.
- Stevenson TJ, Hahn TP, MacDougall-Shackleton SA, Ball GF. Gonadotropin-releasing hormone plasticity: a comparative perspective. *Front Neuroendocrinol* 2012; 33(3):287-300.
- Stirland JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS. Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 2001; 13(2):147-157.
- Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2010a; 31(3):284-295.
- Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H. Discovery and evolutionary history of gonadotropin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 2010b; 22(7):716-727.

Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Seong JY, Vaudry H. Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol* 2010b; 22(7):716-727.

Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Front Neurosci* 2013; 7:60.

Turek FW, Elliott JA, Alvis JD, Menaker M. Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol Reprod* 1975; 13(4):475-481.

Urbanski HF, Doan A, Pierce M. Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod* 1991; 44(4):687-692.

Urbanski HF. Photoperiod modulation of luteinizing hormone secretion in orchidectomized Syrian hamsters and the influence of excitatory amino acids. *Endocrinology* 1992; 131(4):1665-69.

van Tienhover, A. In *Reproductive Physiology of Vertebrates*. In: WB Saunders Co., Philadelphia, 1986.

Vidal L, Morin LP. Absence of normal photic integration in the circadian visual system: response to millisecond light flashes. *J Neurosci* 2007; 27(13):3375-82.

Wang SM, Liu CH, Lin HS. An immunocytochemical study of effects of light deprivation on prolactin cells in the adenohypophysis of the golden hamster. *Histol Histopathol* 1991; 6(3):287-293.

Wang SM, Wu JC, Lue CM, Tsai AI, Chen WP, Lin HS. Effects of light deprivation on prolactin cells in the adenohypophysis of golden hamsters: an immunoelectron microscopic study. *Histol Histopathol* 1992; 7(2):307-313.

Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Front Neurosci* 2013; 7:60.

Turek FW, Elliott JA, Alvis JD, Menaker M. Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol Reprod* 1975; 13(4):475-481.

Urbanski HF, Doan A, Pierce M. Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod* 1991; 44(4):687-692.

Urbanski HF. Photoperiod modulation of luteinizing hormone secretion in orchidectomized Syrian hamsters and the influence of excitatory amino acids. *Endocrinology* 1992; 131(4):1665-69.

van Tienhover, A. In *Reproductive Physiology of Vertebrates*. In: WB Saunders Co., Philadelphia, 1986.

Vidal L, Morin LP. Absence of normal photic integration in the circadian visual system: response to millisecond light flashes. *J Neurosci* 2007; 27(13):3375-82.

Wang SM, Liu CH, Lin HS. An immunocytochemical study of effects of light deprivation on prolactin cells in the adenohypophysis of the golden hamster. *Histol Histopathol* 1991; 6(3):287-293.

Wang SM, Wu JC, Lue CM, Tsai AI, Chen WP, Lin HS. Effects of light deprivation on prolactin cells in the adenohypophysis of golden hamsters: an immunoelectron microscopic study. *Histol Histopathol* 1992; 7(2):307-313.

Yasuo S, Korf HW. The hypophysial pars tuberalis transduces photoperiodic signals via multiple pathways and messenger molecules. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172(1):15-22.

Yasuo S, Korf HW. The hypophysial pars tuberalis transduces photoperiodic signals via multiple pathways and messenger molecules. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172(1):15-22.

Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian timers in hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol* 2014; 222(2): R39-59.

Zhang XY, Zhao ZJ, Vasilieva N, Khrushchova A, Wang DH. Effects of short photoperiod on energy intake, thermogenesis, and reproduction in desert hamsters (*Phodopus roborovskii*). *Integr Zool* 2015; 10(2):207-215.

Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian timers in hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol* 2014; 222(2): R39-59.

Zhang XY, Zhao ZJ, Vasilieva N, Khrushchova A, Wang DH. Effects of short photoperiod on energy intake, thermogenesis, and reproduction in desert hamsters (*Phodopus roborovskii*). *Integr Zool* 2015; 10(2):207-215.

CAPÍTULO 18

Denervación hipotalámica: alteraciones en las poblaciones adenohipofisarias y en el tejido adiposo de ratas hembras

La administración de glutamato monosódico (GMS) provee un modelo animal exitoso para el estudio del eje hipotálamo-hipofisario. El tratamiento neonatal con GMS en ratas indujo un severo daño neuronal a nivel del núcleo arcuato hipotalámico (Olney, 1969 y 1979; Burde y col., 1971; Holzwarth-McBride y col., 1976; Nemeroff y col., 1977; Krieger y col., 1979). Se han documentado anormalidades inmunes, neuroendocrinas (Castrogiovanni y col., 2008) y metabólicas (obesidad hipotalámica) (Iwase y col., 1998). Esta neurotoxina produce una denervación parcial que provoca lesiones morfológicas y funcionales (Redding y col., 1971; Lamperti y Blaha, 1976; Nemeroff y col., 1977).

Legradi y col. (1998) demostraron que la ablación del núcleo arcuato mediante GMS abolió la respuesta homeostática del eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo durante el ayuno. Este tratamiento con GMS también afectó a los ejes: adrenal (Olney, 1979; Miyabo y col., 1982; Spinedi y col., 1984; Magariños y col., 1988; Huang y col., 1998), gonadal (Dada y col., 1985; Sasaki y col., 1994), somatotropo (Dada y col., 1984; Sasaki y col., 1994) y lactotropo (Zelena y col., 1998).

CHAPTER 18

Hypothalamic denervation: alterations in the adenohipophyseal populations and in the adipose tissue in female rats

Administration of monosodium glutamate (MSG) provides a successful animal model for studying the hypothalamo-hypophyseal axis. The neonatal treatment with MSG in rats led to a severe neuron damage at the level of the hypothalamic arcuate nucleus (Olney, 1969 and 1979; Burde et al., 1971; Holzwarth-McBride et al., 1976; Nemeroff et al., 1977; Krieger et al., 1979). Immune and neuroendocrine abnormalities have been reported (Castrogiovanni et al., 2008), as well as metabolic ones (hypothalamic obesity) (Iwase et al., 1998). This neurotoxin produces a partial denervation that causes morphologic and functional lesions (Redding et al., 1971; Lamperti and Blaha, 1976; Nemeroff et al., 1977).

Legradi et al. (1998) demonstrated that the arcuate nucleus ablation induced by MSG abolished the homeostatic response of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. This treatment with MSG also affected the adrenal (Olney, 1979; Miyabo et al., 1982; Spinedi et al., 1984; Magariños et al., 1988; Huang et al., 1998), gonadal (Dada et al., 1985; Sasaki et al., 1994), somatotrope (Dada et al., 1984; Sasaki et al., 1994) and lactotrope axes (Zelena et al., 1998).

El tejido adiposo no es sólo un depósito de energía, con lípidos movi-
lizados bajo la influencia hormonal, sino que resulta un verdadero órgano
endocrino capaz de regular el metabolismo y conectarse con el sistema
nervioso (Rosen y Spiegelman, 2000; Fajas, 2003). Piermaría y col. (2003)
han estudiado el efecto del estradiol sobre el tejido adiposo parametrial.

El tejido adiposo puede secretar factores paracrinos y endocrinos, tales
como la leptina que actúa a nivel del hipotálamo y de los tejidos perifé-
ricos (MacDougald y Mandrup, 2002). Varios ejes neuroendocrinos han
sido relacionados con la actividad del tejido adiposo (Huang y col., 1998;
Cai y Hyde, 1999; Giovambattista y col., 2000; Seoane y col., 2000; Me-
néndez y col., 2003). La acumulación de grasa resulta del equilibrio entre
la **lipogénesis** y la **lipólisis/oxidación de los ácidos grasos**. La lipogéne-
sis se estimula mediante una dieta rica en carbohidratos y se inhibe me-
diante los ácidos grasos poliinsaturados y el ayuno. Dicha lipogénesis es
inhibida por la leptina y estimulada por la insulina. La leptina limitaría el
almacenamiento de grasa, no sólo inhibiendo la ingesta de alimento, sino
también afectando las vías metabólicas específicas en el tejido adiposo y
en otros tejidos. La leptina regula la liberación del glicerol de los adipo-
citos (Siegrist-Kaiser y col., 1997), estimulando la oxidación de los ácidos
grasos e inhibiendo la lipogénesis (Wang y col., 1999). El último efecto se
logra controlando la expresión de los genes involucrados en la síntesis de
ácidos grasos y triglicéridos, como fue demostrado mediante los análisis
de microdistribución de los oligonucleótidos (Soukas y col., 2000).

La **lipogénesis** comprende el proceso de síntesis de los ácidos grasos/
triglicéridos que tiene lugar en el hígado y en el tejido adiposo y no de-
bería confundirse con la **adipogénesis** que se refiere a la diferenciación
de los preadipocitos en adipocitos maduros (Rosen y Spiegelman, 2000).
Los últimos años aportaron abundante información sobre el mecanismo
de regulación de la lipogénesis mediante nutrientes y hormonas. Queda
claro ahora que el factor de transcripción de la proteína-1 ligadora del ele-
mento regulatorio del esteroide (SREBP-1) y, en menor medida los factores
de transcripción zipper bHLH-leucina (USF1 y USF2), tienen un rol clave
en la mediación de los efectos de nutrientes y hormonas sobre la expresión
de los genes lipogénicos en el hígado. En el tejido adiposo, los factores de
transcripción: el receptor hormonal nuclear (PPAR γ) y el SREBP-1 son

Adipose tissue is not only a storage of energy with lipid mobilization
under hormonal influence, but it turns out to be a real endocrine organ
capable of regulating metabolism and connecting with the nervous system
(Rosen and Spiegelman, 2000; Fajas, 2003). Piermaría et al. (2003) stu-
died the effect of estradiol on parametrial adipose tissue. Adipose tissue
can secrete paracrine and endocrine factors such as leptin, which acts at
hypothalamic and peripheral tissue levels (MacDougald and Mandrup,
2002). Several neuroendocrine axes have been related with the activity of
the adipose tissue (Huang et al., 1998; Cai and Hyde, 1999; Giovambat-
tista et al., 2000; Seoane et al., 2000; Menéndez et al., 2003). The increase
of adipose tissue is determined by the balance between lipogenesis and
lipolysis/fatty acid oxidation. Lipogenesis is stimulated by a high carbo-
hydrate diet and is inhibited by polyunsaturated fatty acids and fasting.
Lipogenesis is inhibited by leptin and stimulated by insulin. Leptin is in-
volved in lipogenesis and would limit fat storage, not only by inhibiting
food intake but also affecting specific metabolic pathways in the adipose
tissue and in other tissues. Leptin regulates glycerol release of adipocytes
(Siegrist-Kaiser et al., 1997), stimulating the oxidation of fatty acids and
inhibiting lipogenesis (Wang et al., 1999). The latter effect is achieved by
down-regulating the expression of genes involved in the synthesis of fatty
acids and triglycerides, as demonstrated by oligonucleotide micro-array
analysis (Soukas et al., 2000).

The accumulation of fat results from the balance between synthesis
(lipogenesis) and destruction (lipolysis/oxidation) of fatty acids. Lipoge-
nesis comprises the process of fatty acid/triglyceride synthesis that occurs
in the liver and in the adipose tissue. **Lipogenesis** should not be confused
with **adipogenesis**, which refers to the differentiation of pre-adipocytes
into mature adipocytes (Rosen and Spiegelman, 2000). These last years
have provided abundant information about the mechanism of lipogenesis
regulation by means of nutrients and hormones. It is now clear that sterol
regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) transcription factor and,
to a lesser extent, bHLH-leucine zipper (USF1 and USF2) transcription
factors play a key role in mediating the effects of nutrients and hormones
on lipogenic gene expression in the liver. In adipose tissue, peroxisome
proliferator-activated receptor PPAR γ and SREBP-1 transcription factors

críticos para la regulación tanto de la adipogénesis como de la lipogénesis, siendo blancos atractivos para las intervenciones con fármacos en desórdenes como la hipertrigliceridemia y la obesidad (Kersten y col., 1999).

En nuestro diseño experimental, se analizaron los pesos corporales, hallándose un descenso significativo ($p < 0.05$) entre ratas tratadas con GMS (181 ± 7 g) respecto a controles (218 ± 6 g). El análisis de los pesos de la grasa corporal indicó que la grasa visceral y parietal en animales GMS (7.14 ± 0.5 y 2.81 ± 0.2 g, respectivamente) fue significativamente ($p < 0.05$) mayor respecto a controles (3.82 ± 0.2 y 1.04 ± 0.5 g, respectivamente).

La morfología de las diferentes poblaciones adenohipofisarias y de la grasa parietal y visceral en nuestro diseño experimental se muestra en la **fig. 18.1 A-J** (Camihort y col., 2005).

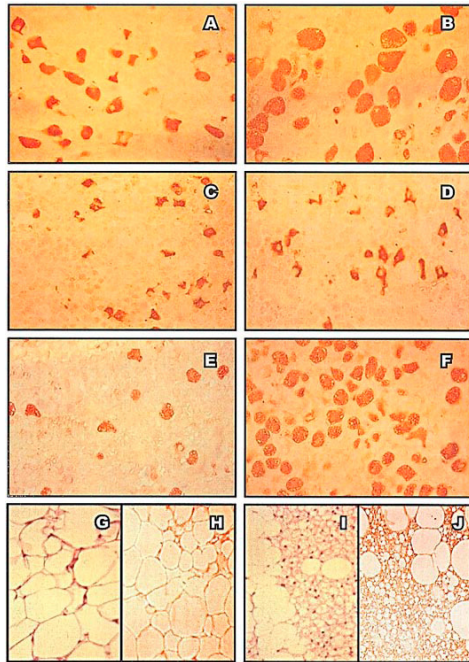


Fig 18.1 A-J. Campos representativos de las células inmunomarcadas. TSH: A CTR y B MSG; ACTH: C CTR y D MSG; LH: E CTR y F MSG; Grasa parietal: G CTR y H MSG; Grasa visceral: I CTR y J MSG (IHQ: anti-TSH, -ACTH y -LH. EnVision peroxidasa. Grasa: H-E. Barras: A-F 25 μ m y G-J 100 μ m (Camihort y col., 2005).

are critical for the regulation of both adipogenesis and lipogenesis and have become attractive targets for pharmaceutical interventions of disorders such as hypertriglyceridemia and obesity (Kersten et al., 1999).

In our experimental design, after body weights were analyzed, we found a significant decrease ($p < 0.05$) in MSG-treated rats (181 ± 7 g) compared to controls (218 ± 6 g). The analyses of body fat weights showed that visceral and parietal fat in MSG animals (7.14 ± 0.48 and 2.81 ± 0.22 g, respectively) was significantly higher ($p < 0.05$) when compared to controls (3.82 ± 0.23 and 1.04 ± 0.51 g, respectively).

The morphology of the different pituitary populations and of the parietal and visceral fat is shown in our experimental design in **fig. 18.1 A-J** (Camihort et al., 2005).

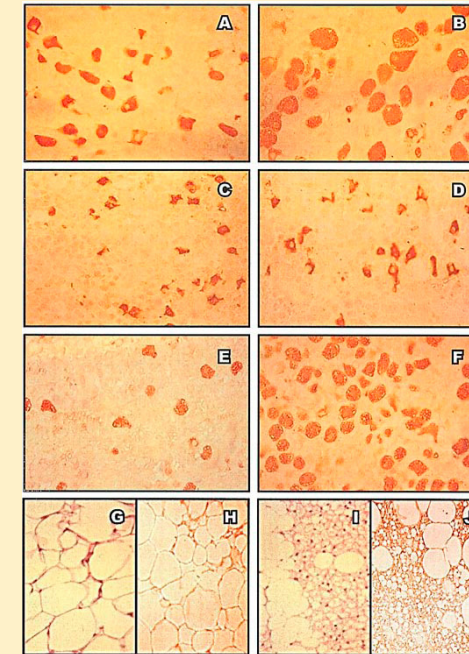


Fig 18.1 A-J. Representative fields of immunolabelled cells. TSH: A CTR and B MSG; ACTH: C CTR and D MSG; LH: E CTR and F MSG; Parietal fat: G CTR and H MSG; Visceral fat: I CTR and J MSG (IHQ: anti-TSH, -ACTH and -LH. Peroxidase EnVision. Fat: H-E. Bars: A-F 25 μ m and G-J 100 μ m (Camihort et al., 2005).

La morfometría de las poblaciones somatotropa, lactotropa y foliculotropa no indica diferencias significativas entre ambos grupos. En la población tirotropa, los valores de tamaño celular (TC), densidad de células (DC) y densidad de volumen (DV) son mayores ($p < 0.05$) en ratas GMS, respecto a controles (CTR). En la población corticotropa, aunque los valores de DV no son significativos, los datos de TC son menores y los de DC mayores ($p < 0.05$) en el grupo GMS, al comparar con el grupo control. En la población luteinizante, los valores muestran un descenso ($p < 0.05$) en el TC con un incremento ($p < 0.05$) en DC y DV en las ratas tratadas con GMS, comparadas con animales controles (CRT) (fig. 18.2) (Camihort y col., 2005).

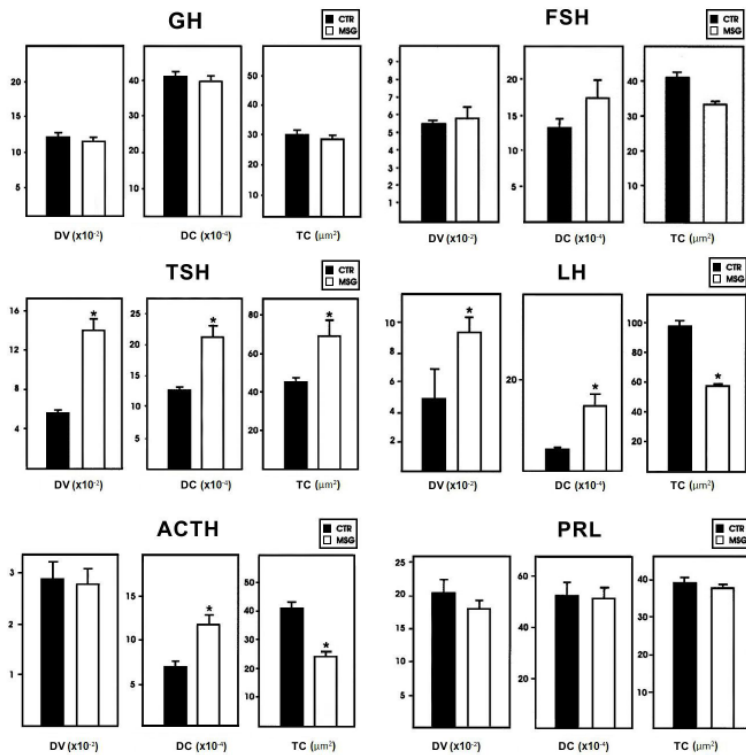


Fig 18.2. Morfometría (DV, DC y TC) de las poblaciones adenohipofisarias en ratas sometidas a tratamiento con glutamato monosódico ($*p < 0.05$).

The morphometry of somatotrope, lactotrope and folliculotrope populations do not show significant differences between both groups. In the thyrotrope population, values of cell size (CS), cell density (CD) and volume density (VD) are higher ($p < 0.05$) in MSG rats compared to controls (CTR). In the corticotrope population, although VD values are not significant, data of CS are lower and those of CD are higher ($p < 0.05$) in the MSG group compared to controls. In the luteinizing population values show a decrease ($p < 0.05$) in CS and an increase ($p < 0.05$) in CD and VD in MSG-treated rats compared to control animals (CRT) (fig. 18.2) (Camihort et al., 2005).

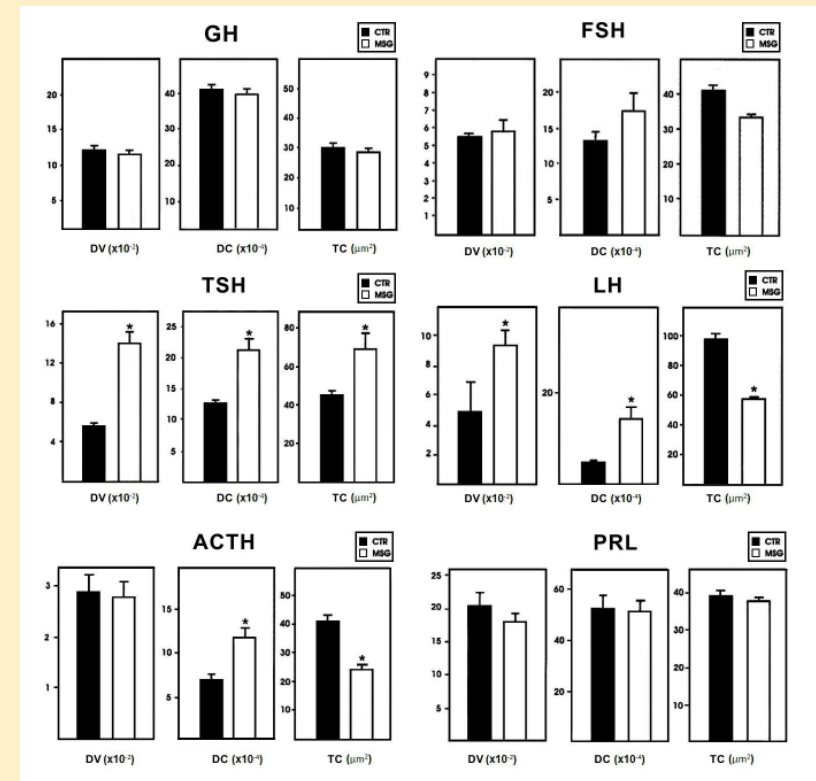


Fig 18.2. Morphometry (VD, CD and CS) of pituitary populations in rats submitted to monosodium glutamate treatment ($*p < 0.05$).

Nuestros resultados morfométricos muestran que el tratamiento neonatal con GMS induce cambios en las diferentes poblaciones adenohipofisarias en las ratas hembras tratadas. Las células corticotropas y luteinizantes aparecen disminuidas de tamaño, mientras las tirotropas muestran hipertrofia. Además, se detecta una clara hiperplasia de estos tres tipos celulares en las ratas tratadas con GMS.

La grasa parietal muestra sólo adipocitos uniloculares, mientras la grasa visceral deposita lípidos en adipocitos uniloculares y multiloculares con múltiples pequeñas gotas, en lugar de una gran gota lipídica. Los adipocitos de la grasa visceral unilocular (62.5%) no muestran diferencias significativas en TC, DC y VC entre ambos grupos experi-

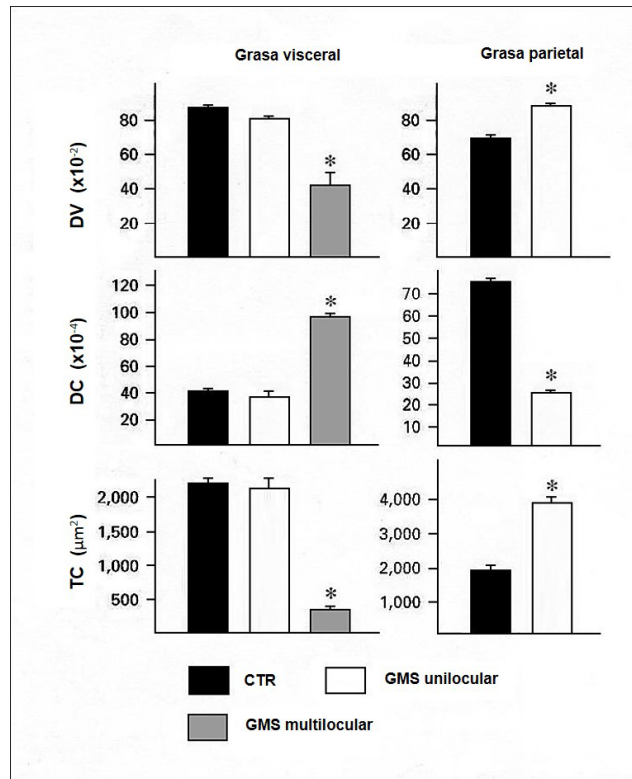


Fig 18.3. Morfometría (DV, DC y TC) de la grasa visceral y parietal en ratas sometidas a tratamiento con glutamato monosódico (* $p < 0.01-0.001$).

Our morphometry results show that neonatal treatment with SMG induces changes in the different pituitary populations in the treated female rats. Corticotrope and luteinizing cells appear with decreased size, whereas thyrotropes evidence hypertrophy. Also, a clear hyperplasia of these three cell types is detected in SMG-treated rats.

Parietal fat evidences only unilocular adipocytes, whereas visceral fat stores lipids in unilocular and multilocular adipocytes with multiple small droplets instead of large lipid ones. Adipocytes from unilocular visceral fat (62.5%) do not show significant differences in CS, CD and CV between both experimental groups. Cells from the multilocular visceral fat (37.5%) in rats treated with SMG evidence a decrease

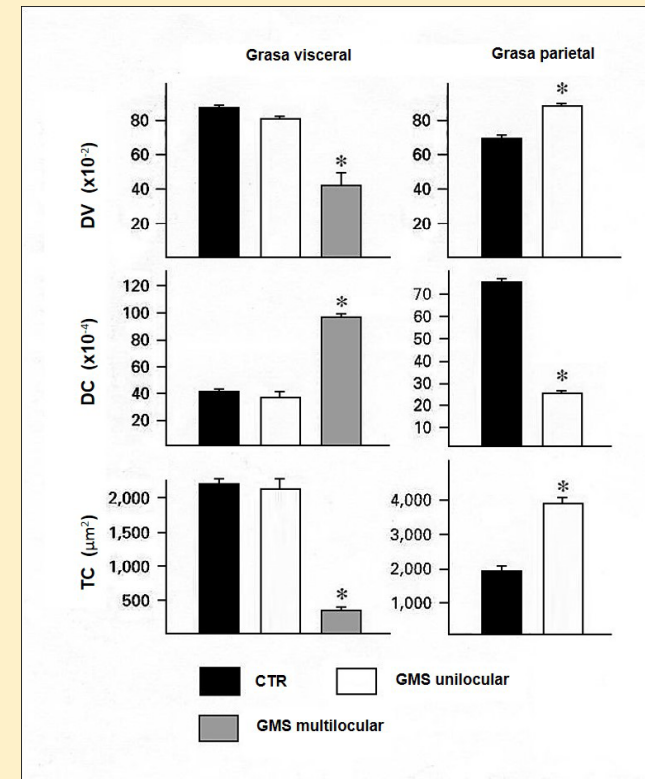


Fig 18.3. Morphometry (VD, CD and CS) of visceral and parietal fat in rats submitted to monosodium glutamate treatment (* $p < 0.01-0.001$).

mentales. Las células de la grasa visceral multilocular (37.5%) en ratas tratadas con GMS, exhiben un descenso en la DV y TC ($p < 0.01$) con un incremento en la DC ($p < 0.01$) comparado con los animales controles. Los adipocitos de la grasa parietal con una gran gota se hallan en los dos grupos experimentales y evidencian incrementos en TC y DV ($p < 0.001$ y < 0.01 , respectivamente), junto con un descenso en la DC ($p < 0.001$) en las ratas tratadas con GMS, en relación al grupo control. En la **fig. 18.3** se observa el análisis morfométrico de la grasa parietal y visceral en las ratas sometidas a denervación, respecto a sus controles (Camihort y col., 2005).

Los niveles circulantes de triglicéridos y leptina son mayores ($p < 0.05$ y < 0.0001 , respectivamente) en las ratas tratadas con GMS, respecto a los controles (**fig. 18.4**).

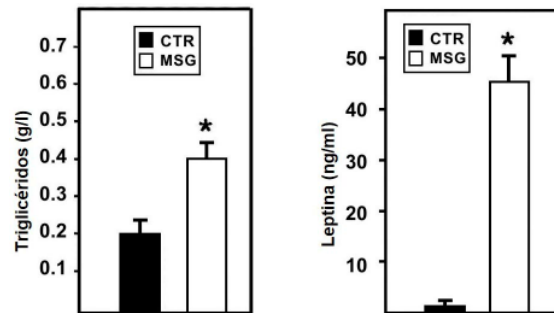


Fig 18.4. Niveles de triglicéridos y leptina en la denervación hipotalámica. Grupos MSG y CTR. (* $p < 0.05$ y 0.0001 respectivamente (Camihort y col., 2005).

Legradi y col., (1998) sugirió en estudios con ayuno, que el núcleo arcuato con gran concentración de receptores de leptina, es esencial para una respuesta homeostática normal del eje tiroideo y constituye un sitio crítico para mediar la acción de la leptina sobre la expresión génica prohormona liberadora de TSH (proTRH) a nivel del núcleo paraventricular. Además, las concentraciones descendidas de la leptina constituirían el evento primario responsable de la supresión de

of VD and CS ($p < 0.01$) and an increase in CD ($p < 0.01$) compared to control animals. Adipocytes from parietal fat with a large droplet are found in both experimental groups and evidence increased CS and VD ($p < 0.001$ and < 0.01 , respectively, together with a decreased CD ($p < 0.001$) in rats treated with SMG compared to the control group. In **fig. 18.3** the morphometric analysis of parietal and visceral fat can be observed in the rats submitted to denervation with respect to their controls (Camihort et al., 2005).

Circulating levels of triglycerides and leptin are higher ($p < 0.05$ and < 0.0001 , respectively) in SMG-treated rats compared to controls (**fig. 18.4**).

Legradi et al., (1998) suggested that during fasting, the arcuate nucleus with high concentration of leptin receptors is essential for

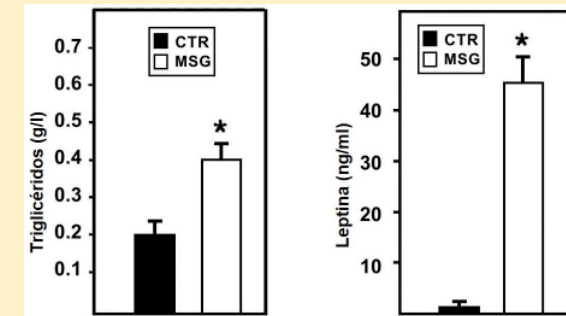


Fig 18.4. Triglyceride and leptin levels in hypothalamic denervation. MSG and CTR groups. (* $p < 0.05$ and 0.0001 respectively) (Camihort et al., 2005).

a normal homeostatic response of the thyroid axis and constitutes a critical site to mediate the effect of leptin on TSH releasing prohormone (pro-TRH) gene expression at the level of the paraventricular nucleus. Also, the decreased leptin concentrations would constitute the primary event responsible for the suppression of such axis in food-deprived animals (Seoane et al., 2000). In addition, studies on human adipose tissue cultures might indicate that leptin and the

dicho eje en animales privados de alimento (Seoane y col., 2000). En agregado, estudios en cultivos de tejido adiposo humano podrían indicar que la leptina y el eje tiroideo mantienen una relación dual, donde la TSH podría contribuir a la regulación de los pulsos de la leptina (Menéndez y col., 2003).

Nuestros resultados revelaron que el daño al núcleo arcuato en el tratamiento con GMS interrumpió el control ejercido sobre el eje tiroideo, causando hipertrofia e hiperplasia de las células tiroideas. Estas observaciones estuvieron de acuerdo con Ribeiro y col. (1997), quienes describieron un incremento plasmático de las hormonas tiroideas en ratas GMS obesas en ayuno. En contraposición, Legradi y col. (1998) mostraron que un tratamiento similar no produjo efectos significativos sobre las hormonas tiroideas plasmáticas y la TSH en ratas con ayuno.

La denervación inducida por la neurotoxina en estos experimentos estimuló la hiperplasia de las corticotropas que aparecieron reducidas en tamaño. Esta alteración concuerda con otras observaciones en ratas lesionadas con GMS, en las que hubo una gran respuesta a los secretagogos *in vitro*, con una estimulación en la liberación de ACTH (Spinedi y col., 1984). Nuestros resultados morfológicos estuvieron de acuerdo con el incremento comunicado en la secreción de corticosterona en las ratas tratadas con GMS (Magariños y col., 1988; Macho y col., 1999).

La población luteinizante evidenció una hiperplasia, pero no mostró ningún cambio significativo respecto a sus controles. Los experimentos *in vitro* en ratas machos con tratamiento neonatal con GMS demostraron una gran liberación de LHRH en la eminencia media después de la estimulación mediante un medio con altas dosis de K⁺ (Spinedi y col., 1984). Este hallazgo es consistente con la hiperplasia y el incremento de la DV en las células luteinizantes que hemos detectado en los animales inyectados con GMS. En contraposición, Dada y Bake (1985) comunicaron un mantenimiento del número de gonadotropas con menor tamaño celular, al administrar GMS.

thyroid axis maintain a dual relation, where TSH might contribute to the regulation of leptin pulses (Menéndez et al., 2003).

Our results revealed that the damage to the arcuate nucleus in SMG treatment interrupted the control exerted on the thyroid axis, causing hypertrophy and hyperplasia of thyrotrope cells. These observations were in agreement with Ribeiro et al. (1997), who discovered a plasmatic increase of thyroid hormones in MSG obese fasting rats. On the contrary, Legradi et al. (1998) reported that a similar treatment did not produce significant effects on plasmatic thyroid hormones and on TSH of fasting rats.

Neurotoxin induced denervation in these experiments stimulated hyperplasia of corticotropes that appeared diminished in size. This alteration is in agreement with other observations in SMG lesioned rats, which showed high responsiveness to *in vitro* secretagogues and stimulation in ACTH release (Spinedi et al., 1984). Our morphological results were in agreement with the increase reported in the secretion of corticosterone in SMG treated rats (Magariños et al., 1988; Macho et al., 1999).

The luteinizing population evidenced hyperplasia but did not show any significant change with respect to their controls. Those *in vitro* experiments in male rats with SMG neonatal treatment demonstrated high LHRH release in the median eminence after stimulation with high K⁺ medium (28 mM) (Spinedi et al., 1984). This finding is consistent with the hyperplasia and the increase of VD in the luteinizing cells we have detected in animals injected with SMG. On the other hand, Dada and Bake (1985) reported that the number of gonadotropes with smaller cell size remained the same when SMG was administered.

Millard et al. (1982) did not see significant changes in the plasmatic levels of GH or in the concentration of the hormone in the anterior pituitary of male rats treated with SMG compared to controls, in agreement with our results at the level of somatotrope axis.

Millard y col. (1982) no vieron cambios significativos en los niveles plasmáticos de GH o en la concentración de la hormona en la pituitaria anterior de ratas machos tratadas con GMS en relación a los controles, en concordancia con nuestros resultados a nivel del eje somatotropo.

La neurotoxina administrada en ratas recién nacidas de ambos sexos no indujo respuestas anormales en los niveles plasmáticos de PRL después de la inyección de un agonista excitatorio del receptor, sugiriendo que la vía TIDA no sería esencial (Zelena y col., 1998). Dichos hallazgos estuvieron de acuerdo con nuestras observaciones morfológicas en la población lactotropa, ya que no detectamos cambios en las ratas tratadas con GMS.

Sasaki y col. (1994) hallaron un descenso en el número y tamaño de las somatotropas y lactotropas luego de la administración de GMS en ratones machos. Estos hallazgos podrían ser variables en las diferentes especies y sexos. En acuerdo con nuestros datos, Dada y col. (1984) comunicaron que el GMS disminuyó los niveles de GH en ambos sexos, con descenso de la densidad de volumen (DV) y el tamaño celular (TC) de las somatotropas en hembras.

Sin embargo, el cuerpo de evidencia surgió en las severas lesiones que causa el GMS en las neuronas GHRH del núcleo arcuato (Kovacs y col., 2000; Millard y col., 1982; Zelena y col., 1998). A pesar de las diferencias de sexo halladas en ratas con respecto a las somatotropas y a la secreción de GH (Dada y col., 1984), está claro que el tratamiento con GMS disminuye los niveles de GH y retarda el crecimiento (Dada y col., 1984; Remke y col., 1988; Kovacs y col., 2000). Estos hallazgos funcionales no parecen tener una contraparte morfológica con nuestros parámetros pituitarios.

Los estudios morfométricos del tejido adiposo indicaron que el GMS en ratas hembras produjo un incremento de la DV en la grasa parietal, por aumento de los adipocitos individuales. En contraste, en la grasa visceral la neurotoxina indujo un mayor número de adipocitos multiloculares de tamaño reducido. El tejido adiposo está compuesto principalmente por adipocitos uniloculares y durante la

The neurotoxin administered in new born rats of both sexes did not induce abnormal responses in PRL plasmatic levels after the injection of an excitatory agonist of the receptor, suggesting that TIDA pathway would not be essential (Zelena et al., 1998). Those findings were in agreement with our morphological observations in the lactotrope population, since we did not detect any changes in SMG treated rats.

Sasaki et al. (1994) founded a decrease in the number and size of somatotropes and lactotropes after administration of SGM in male mice. These findings might be variable in the different species and sex. According to our data, Dada et al. (1984) reported that SGM diminished GH levels in both sexes, with decreased volume density (VD) and cell size (CS) of somatotropes in females.

However, the evidence appeared in the severe lesions caused by SGM in the GHRH neurons of the arcuate nucleus (Kovacs et al., 2000; Millard et al., 1982; Zelena et al., 1998). Despite the sex differences found in rats when compared to somatotropes and GH secretion, it is clear that SGM treatment decreases GH levels and retards growth (Dada et al., 1984; Remke et al., 1988; Kovacs et al., 2000). These functional findings do not apparently have a morphological counterpart with our pituitary parameters.

Adipose tissue morphometric studies indicated that SGM in female rats increased parietal fat VD due to a higher number of individual adipocytes. On the contrary, in visceral fat neurotoxin induced a higher number of multilocular adipocytes of reduced size. Adipose tissue is mainly composed of unilocular adipocytes and during adipogenesis they develop small cells with multiple lipid inclusions. Adipogenesis presents an initial proliferation of preadipocytes and a subsequent differentiation in mature adipose cells (Rosen and Spiegelman, 2000; Fajas, 2003). However, hypertrophy would be the first event that occurred during obesity. Adipogenesis is a complex process that is linked to hyperplasia as an additional response, generating new adipocytes from precursor cells (Fajas, 2003). The hypotha-

adipogénesis desarrollan pequeñas células con múltiples inclusiones lipídicas. La adipogénesis presenta una proliferación inicial de preadipocitos y una subsecuente diferenciación en células adiposas maduras (Rosen y Spiegelman, 2000; Fajas, 2003). Sin embargo, la hipertrofia sería el primer evento ocurrido durante la obesidad. La adipogénesis es un proceso complejo que está unido a la hiperplasia como respuesta adicional, generando nuevos adipocitos a partir de las células precursoras (Fajas, 2003).

La obesidad hipotalámica que se asocia a una marcada hiperinsulinemia/ hiperleptinemia, es un problema importante en los pacientes con lesiones hipotalámicas mediales. Las ratas lesionadas con GMS en período neonatal mostraron disminución en la ingesta de alimentos y retraso en el crecimiento, dando un fenotipo de obesidad similar al de los pacientes que sufren obesidad hipotalámica (Elfers y col., 2011).

El daño hipotalámico por GMS indujo alteraciones metabólicas en la rata hembra adulta determinando un fenotipo de pseudoobesidad hiperleptinéxico-hiperadiposo, con cambios en la función adrenocortical caracterizada por aumento de los mineralocorticoides impulsado por la ACTH (Perelló y col., 2004). Moreno y col. (2006) comunicaron que las ratas GMS desarrollaron un aumento de la función adrenocortical, hiperadiposidad, hiperleptinemia, hiperinsulinemia y un descenso en la sensibilidad periférica a la insulina. La enucleación adrenal revirtió dichas anomalías metabólicas. Los resultados sugieren cambios en las características de los adipocitos y en la resistencia periférica a la insulina debidos a un aumento en la producción de glucocorticoides. El almacenamiento de la grasa fue parcialmente dependiente de la actividad vagal y de la secreción de insulina en las ratas GMS con obesidad hipotalámica (Balbo y col., 2007).

En agregado, la rata hembra hiperadiposa GMS está caracterizada por una sensibilidad alterada de la leptina adrenal y de la adiposidad omental. Por lo tanto, la hiperleptinemia crónica podría desempeñar

lamic lesion in the rat determined a hyperlipidemic-hyperadipose phenotype. Non-genetic hyperadipose female rats evidenced a lower response of mineralocorticoids to ACTH, an adrenal that is refractory to exogenous leptin and an altered visceral adiposity (Perelló et al., 2004 y 2010).

Hypothalamic obesity is a major unsolved problem in patients with medial hypothalamic lesions and is associated with hyperinsulinemia and hyperleptinemia. Rats injured with MSG in neonatal period showed a decreased food intake and stunted growth, and provided an obesity phenotype similar to that in patients who suffer from hypothalamic obesity (Elfers et al., 2011).

The hypothalamic damage by MSG induced metabolic alterations that determined a phenotype of pseudo obesity hyperleptinemic-hyperadipose adult female rats, with changes in adrenocortical function characterized by enhanced ACTH-driven mineralocorticoid function (Perelló et al., 2004). Moreno et al. (2006) reported that MSG rats developed increased adrenocortical function, hyperadiposity, hyperleptinemia, hyperinsulinemia and decreased peripheral insulin sensibility. The adrenal enucleation abrogated these metabolic alterations. The results support changes in adipocyte characteristics and peripheral insulin resistance due to increased glucocorticoid production. Fat storage was partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic MSG rats with hypothalamic obesity (Balbo et al., 2007). In addition, the hyperadipose female rat MSG was characterized by an impaired sensitivity of adrenal leptin and abdominal adiposity. Thus, chronic hyperleptinemia could play a protective role against ACTH-mediated allostatic loads in the adrenal leptin resistant (Perelló et al., 2010).

Obesity is not a homogeneous condition. Regional body fat distribution is a key to establish the relationship between obesity and metabolic disorders (Wajchenberg, 2000). In obese SGM rats, differences were found between the roles played by visceral and subcutaneous adipose tissues (Kim et al., 1999). Also, isolated preadipocytes

un papel protector contra las cargas alostáticas de la ACTH mediada por una leptina adrenal resistente (Perelló y col., 2010).

La obesidad no es una condición homogénea. La distribución regional del tejido adiposo es una llave importante para establecer la relación entre obesidad y disturbios metabólicos (Wajchenberg, 2000). En ratas GMS obesas, se hallaron diferencias entre el rol de los tejidos adiposos visceral y subcutáneo (Kim y col., 1999). Además, los preadipocitos aislados de diferentes áreas del cuerpo han mostrado diferentes potenciales adipogénicos (Rosen y Spiegelman, 2000).

Tsuneyama y col. (2014) comunicaron que el tratamiento con GMS causó una esteatohepatitis macrovesicular con nódulos hepáticos en ratones DIAR. El consumo periódico de multiprobióticos desde la infancia mejoró a corto plazo la sensibilidad a la insulina e impidió el desarrollo de hígado graso no alcohólico y la adiposidad en ratas adultas con obesidad inducida con GMS (Savcheniuk y col., 2014).

En nuestro estudio, las ratas inyectadas con GMS mostraron un tejido adiposo que varió dependiendo del área observada. La grasa visceral mostró claros signos de adipogénesis, mientras la grasa parietal (subcutánea) evidenció incremento de la masa adiposa mediante hipertrofia de los adipocitos. Un mayor porcentaje de lipogénesis es consistente con una función adipocítica aumentada. Estas observaciones están de acuerdo con los altos niveles circulantes de triglicéridos y leptina que caracterizan a los animales tratados con GMS. Hemos confirmado el incremento de los niveles plasmáticos de leptina que se habían comunicado previamente (Perelló y col., 2004). Los niveles de leptina se correlacionaron de modo positivo con la cantidad de tejido adiposo corporal y con el tamaño de los adipocitos (Hynes y col., 2003). Mientras el hipotálamo es considerado el sitio principal de acción de la leptina, la hipófisis anterior sería el blanco adicional de la hormona (Cai y Hyde, 1999). Sin embargo, aunque es bien conocido que la leptina modula la secreción de varias hormonas pituitarias, es escasa la información sobre un efecto recíproco de esta glándula sobre la producción de leptina (Menén-

from different areas of the body have shown different potentials for adipogenesis (Rosen and Spiegelman, 2000).

Tsuneyama et al. (2014) documented that the treatment with MSG caused a macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. Periodic consumption of multiprobiotic from childhood improved insulin sensitivity and prevented development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity (Savcheniuk et al., 2014).

In our study, rats injected with SMG showed an adipose tissue that varied according to the studied area. Visceral fat clearly evidenced adipogenesis, whereas parietal fat (subcutaneous) evidenced an increment of the adipose tissue via hypertrophy of adipocytes. A higher percentage of lipogenesis is consistent with an increased adipocyte function. These observations are in agreement with high circulating levels of triglycerides and leptin that characterize SMG treated animals. We have confirmed the increase of the plasmatic levels of leptin previously reported (Perelló et al., 2004). Leptin levels correlated positively with the amount of body adipose tissue and with the size of adipocytes (Hynes et al., 2003). Whereas the hypothalamus is considered the main site of action of leptin, the anterior hypophysis would be the additional target of the hormone (Cai and Hyde, 1999). However, although it is well known that leptin modulates the secretion of several pituitary hormones, there is scarce information about a reciprocal effect of this gland on the production of leptin (Menéndez et al., 2003). Our results might suggest that the high secretion of leptin in SGM treated rats is consistent with the observations of the increased adipogenesis in visceral fat and higher lipogenesis in parietal fat. Considering the high circulating levels of lipids in lesioned rats treated with SGM, it has been suggested that this animal model develops, in a dose-dependent way, a metabolic pathway of carbohydrates to lipogenesis and to hyperlipidemia (Malik and Ahluwalia, 1994). This fact has been partially attributed to the characteristic hype-

dez y col., 2003). Nuestros resultados podrían sugerir que la alta secreción de leptina en ratas tratadas con GMS es consistente con las observaciones de una adipogénesis aumentada en la grasa visceral y una mayor lipogénesis en la grasa parietal. En vista de los elevados niveles circulantes de lípidos en las ratas lesionadas con GMS, se ha sugerido que este modelo animal desarrolló, de una manera dosis-dependiente, un camino metabólico de los carbohidratos hacia la lipogénesis y hacia la hiperlipidemia (Malik y Ahluwalia, 1994). Este hecho ha sido parcialmente atribuido a la característica hiperinsulinemia de los animales tratados con GMS (Oida y col., 1984). Perelló y col. (2004) comunicaron que el daño hipotalámico producido por el neurotóxico indujo una estimulación en la función a nivel hipotálamo-pituitario-adrenal. En este sentido, los elevados niveles circulantes de glucocorticoides podrían ser responsables, al menos en parte, de una hiperleptinemia relacionada con el desarrollo de una hiperadiposidad. Abu-Taweel y col. (2014) detectaron efectos cognitivos y bioquímicos del GMS y del aspartame, administrados individualmente y en combinación en ratones albinos machos.

Concluyendo, la denervación hipotalámica inducida por GMS resultó en hiperplasia e hipertrofia de las células tirotropas, corticotropas y luteinizantes con modificaciones en el tejido adiposo visceral y parietal, sugerentes de adipogénesis y lipogénesis. Hubo actividad aumentada en los adipocitos, con mayor secreción de triglicéridos y leptina. Nuestro modelo experimental ha provisto evidencia de que existe una correlación entre daño hipotalámico y alteraciones morfológicas en las poblaciones adenohipofisarias y en el tejido adiposo.

Referencias

Abu-Taweel GM, ZM A, Ajarem JS, Ahmad M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered

rinsulinemia of SGM treated animals (Oida et al., 1984). Perelló et al. (2004) reported that the hypothalamic lesion produced by the neurotoxin induced stimulation in the function at the level of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. In this way, the high circulating levels of glucocorticoids might be responsible, at least partly, of a hyperleptinemia related to the development of hyperadiposity. Abu-Taweel et al. (2014) detected cognitive and biochemical effects of GMS and aspartame, administered individually and combination in male albino mice.

To conclude, the hypothalamic denervation induced with SGM resulted in hyperplasia and hypertrophy of thyrotropes, corticotropes and luteinizing cells with modifications in the visceral and parietal adipose tissue, suggestive of adipogenesis and lipogenesis. There was increased activity in adipocytes with higher secretion of triglycerides and leptin. Our experimental model has provided evidence that there is a correlation between hypothalamic lesion and morphological alterations in the adenohipofyseal populations and the adipose tissue.

References

- Abu-Taweel GM, ZM A, Ajarem JS, Ahmad M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. *Neurotoxicol Teratol* 2014; 42:60-67.
- Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito N, Andreazzi AE, Mathias PC, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 2007; 31(2):142-148.
- Burde RM, Schainker B, Kayes J. Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcua-

- individually and in combination in male albino mice. *Neurotoxicol Teratol* 2014; 42:60-67.
- Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito N, Andreazzi AE, Mathias PC, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 2007; 31(2):142-148.
- Burde RM, Schainker B, Kayes J. Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice and rats. *Nature* 1971; 233(5314):58-60.
- Cai A, Hyde JF. The human growth hormone releasing hormone transgenic mouse as a model of modest obesity: differential changes in leptin receptor (OBR) gene expression in the anterior pituitary and hypothalamus after fasting and OBR localization in somatotrophs. *Endocrinology* 1999; 140(8):3609-3614.
- Camihort G, Gómez Dumm CL, Luna G, Ferese C, Jurado S, Moreno G, Spinedi E, Cónsole G. Relationship between pituitary and adipose tissue after hypothalamic denervation in the female rat. A morphometric immuno-histochemical study. *Cells Tissues Organs* 2005; 179(4):192-201.
- Castrogiovanni D, Gaillard RC, Giobambattista A, Spinedi E. Neuroendocrine, metabolic, and immune functions during the acute phase response of inflammatory stress in monosodium L-glutamate-damaged, hyperadipose male rat. *Neuroendocrinology* 2008; 88(3):227-234.
- Dada M., Campbell GT, Blake C. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on somatotrophs and growth hormone secretion in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 1984; 115(3):996-1003.
- Dada MO, Blake CA. Monosodium L-glutamate administration: effects on gonadotrophin secretion, gonadotrophs and mammatrophs in prepubertal female rats. *J Endocrinol* 1985; 104(2):185-192.
- Elfers C, Ralston M, Roth CL. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011; 24(3-4):131-137.
- te nucleus of the hypothalamus in mice and rats. *Nature* 1971; 233(5314):58-60.
- Cai A, Hyde JF. The human growth hormone releasing hormone transgenic mouse as a model of modest obesity: differential changes in leptin receptor (OBR) gene expression in the anterior pituitary and hypothalamus after fasting and OBR localization in somatotrophs. *Endocrinology* 1999; 140(8):3609-3614.
- Camihort G, Gómez Dumm CL, Luna G, Ferese C, Jurado S, Moreno G, Spinedi E, Cónsole G. Relationship between pituitary and adipose tissue after hypothalamic denervation in the female rat. A morphometric immuno-histochemical study. *Cells Tissues Organs* 2005; 179(4):192-201.
- Castrogiovanni D, Gaillard RC, Giobambattista A, Spinedi E. Neuroendocrine, metabolic, and immune functions during the acute phase response of inflammatory stress in monosodium L-glutamate-damaged, hyperadipose male rat. *Neuroendocrinology* 2008; 88(3):227-234.
- Dada M., Campbell GT, Blake C. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on somatotrophs and growth hormone secretion in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 1984; 115(3):996-1003.
- Dada MO, Blake CA. Monosodium L-glutamate administration: effects on gonadotrophin secretion, gonadotrophs and mammatrophs in prepubertal female rats. *J Endocrinol* 1985; 104(2):185-192.
- Elfers C, Ralston M, Roth CL. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011; 24(3-4):131-137.
- Fajás L. Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 2003; 35(2):19-85.
- Giovambattista A, Chisari AN, Corro L, Gaillard RC, E. Spinedi E. Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions

Fajas L. Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 2003; 35(2):19-85.

Giovambattista A, Chisari AN, Corro L, Gaillard RC, E. Spinedi E. Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions and during the acute-phase response to endotoxic shock in undernourished rats. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7(2):92-98.

Holzwarth-McBride MA, Sladek JR, Knigge KM. Monosodium glutamate induced lesions of arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. *Anat Rec* 1976; 186(2):197-205.

Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* 1998; 139(4):1524-1532.

Hynes GR, Heshka J, Chadee K, Jones PJ. Effects of dietary fat type and energy restriction on adipose tissue fatty acid composition and leptin production in rats. *J Lipid Res* 2003; 44(5):893-901.

Iwase M, Yamamoto M, Iino K, Ichikawa N, Shinohara N, Yoshinari M, Fujishima M. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. *Hypertens Res* 1998; 21(1):1-6.

Kersten S, Seydoux J, Petrs JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103(11):1489-98.

Kim YW, Kim JY, Lee SK. Surgical removal of visceral fat decreases plasma free fatty acid and increases insulin sensitivity on liver and peripheral tissue in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *J Korean Med Sci* 1999; 14(5):539-545.

Kovacs M, Kineman RD, Schally AV, Flerko B, Frohman LA. Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate treatment. *J Neuroendocrinol* 2000; 12(4):335-341.

and during the acute-phase response to endotoxic shock in undernourished rats. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7(2):92-98.

Holzwarth-McBride MA, Sladek JR, Knigge KM. Monosodium glutamate induced lesions of arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. *Anat Rec* 1976; 186(2):197-205.

Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* 1998; 139(4):1524-1532.

Hynes GR, Heshka J, Chadee K, Jones PJ. Effects of dietary fat type and energy restriction on adipose tissue fatty acid composition and leptin production in rats. *J Lipid Res* 2003; 44(5):893-901.

Iwase M, Yamamoto M, Iino K, Ichikawa N, Shinohara N, Yoshinari M, Fujishima M. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. *Hypertens Res* 1998; 21(1):1-6.

Kersten S, Seydoux J, Petrs JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103(11):1489-98.

Kim YW, Kim JY, Lee SK. Surgical removal of visceral fat decreases plasma free fatty acid and increases insulin sensitivity on liver and peripheral tissue in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *J Korean Med Sci* 1999; 14(5):539-545.

Kovacs M, Kineman RD, Schally AV, Flerko B, Frohman LA. Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate treatment. *J Neuroendocrinol* 2000; 12(4):335-341.

Krieger DT, Liotta AS, Nichol森 G, Kizer JS. Brain ACTH and endorphin reduced in rats with monosodium glutamate-induced arcuate nuclear lesions. *Nature* 1979; 278(5704):562-563.

- Krieger DT, Liotta AS, Nichol森 G, Kizer JS. Brain ACTH and endorphin reduced in rats with monosodium glutamate-induced arcuate nuclear lesions. *Nature* 1979; 278(5704):562-563.
- Lamperti A, Blaha G. The effects of neonatally-administered monosodium glutamate on the reproductive neuroendocrine axis of adult hamsters. *Biol Reprod* 1976; 14(3):362-369.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1998; 68(2):89-97.
- MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(1):5-11.
- Macho L, Jezova D, Zorad S, Fickova M. Postnatal monosodium glutamate treatment results in attenuation of corticosterone metabolic rate in adult rats. *Endocr Regul* 1999; 33(2):61-67.
- Magariños AM, Estivariz F, Morado MI, De Nicola AF. Regulation of the central nervous system-pituitary-adrenal axis in rats after neonatal treatment with monosodium glutamate. *Neuroendocrinology* 1988; 48(2):105-111.
- Malik VB and Ahluwalia P. Studies on effect of monosodium glutamate (MSG) on various fractions of lipids and certain carbohydrate metabolic enzymes in liver and blood of adult male mice. *Toxicol Lett* 1994; 74(1):69-77.
- Menéndez C, Baldelli R, Camiña JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol* 2003; 176(1):7-12.
- Millard WJ, Martin JB Jr, Audet J, Sagar SM, Martin JB. Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-treated rats is the result of a deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1982; 110(2):540-550.
- Lamperti A, Blaha G. The effects of neonatally-administered monosodium glutamate on the reproductive neuroendocrine axis of adult hamsters. *Biol Reprod* 1976; 14(3):362-369.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1998; 68(2):89-97.
- MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(1):5-11.
- Macho L, Jezova D, Zorad S, Fickova M. Postnatal monosodium glutamate treatment results in attenuation of corticosterone metabolic rate in adult rats. *Endocr Regul* 1999; 33(2):61-67.
- Magariños AM, Estivariz F, Morado MI, De Nicola AF. Regulation of the central nervous system-pituitary-adrenal axis in rats after neonatal treatment with monosodium glutamate. *Neuroendocrinology* 1988; 48(2):105-111.
- Malik VB and Ahluwalia P. Studies on effect of monosodium glutamate (MSG) on various fractions of lipids and certain carbohydrate metabolic enzymes in liver and blood of adult male mice. *Toxicol Lett* 1994; 74(1):69-77.
- Menéndez C, Baldelli R, Camiña JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol* 2003; 176(1):7-12.
- Millard WJ, Martin JB Jr, Audet J, Sagar SM, Martin JB. Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-treated rats is the result of a deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1982; 110(2):540-550.
- Miyabo S, Ooya E, Yamamura I, Hayashi S. Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in rats treated with monosodium glutamate neonatally. *Brain Res* 1982, 248(2):341-345.

- Miyabo S, Ooya E, Yamamura I, Hayashi S. Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in rats treated with monosodium glutamate neonatally. *Brain Res* 1982; 248(2):341-345.
- Moreno G, Perelló M, Camihort G, Luna G, Cónsole G, Gaillard RC, Spinedi E. Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged, hyperadipos female rats. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(1):73-82.
- Nemeroff CB, Grant LD, Bisette G, Ervin GN, Harrell LE, Prange AJ. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology* 1977; 2(2):179-196.
- Oida K, Nakai T, Hayashi T, Miyabo S, Takeda R. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. *Int J Obes* 1984; 8(5):385-391.
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164(3880):719-721.
- Olney JW. Exocytotoxic amino acids: Research applications and safety implications. *Glutamic acids: Advances in Biochemistry and Physiology*. In: Filer ed., Raven Press, New York, 1979:287.
- Perelló M, Cónsole GM, Gaillard RC, Spinedi E. Analysis of angiotensin II- and ACTH-driven mineralocorticoid functions and omental adiposity in a non-genetic, hyperadipose female rat phenotype. *Endocrine* 2010; 37(3):497-506.
- Perelló M, Moreno G, Camihort G, Luna G, Cónsole G, Gaillard RC, Spinedi E. Nature of changes in adrenocortical function in chronic hyperleptinemic female rats. *Endocrine* 2004; 24(2):167-175.
- Piermaría J, Cónsole G, Perelló M, Moreno G, Gaillard RC, Spinedi E. Impact of estradiol on parametrial adipose tissue function: evidence for establishment of a new set point of leptin sensitivity
- Moreno G, Perelló M, Camihort G, Luna G, Cónsole G, Gaillard RC, Spinedi E. Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged, hyperadipose female rats. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(1):73-82.
- Nemeroff CB, Grant LD, Bisette G, Ervin GN, Harrell LE, Prange AJ. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology* 1977; 2(2):179-196.
- Oida K, Nakai T, Hayashi T, Miyabo S, Takeda R. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. *Int J Obes* 1984; 8(5):385-391.
- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164(3880):719-721.
- Olney JW. Exocytotoxic amino acids: Research applications and safety implications. *Glutamic acids: Advances in Biochemistry and Physiology*. In: Filer ed., Raven Press, New York, 1979:287.
- Perelló M, Cónsole GM, Gaillard RC, Spinedi E. Analysis of angiotensin II- and ACTH-driven mineralocorticoid functions and omental adiposity in a non-genetic, hyperadipose female rat phenotype. *Endocrine* 2010; 37(3):497-506.
- Perelló M, Moreno G, Camihort G, Luna G, Cónsole G, Gaillard RC, Spinedi E. Nature of changes in adrenocortical function in chronic hyperleptinemic female rats. *Endocrine* 2004; 24(2):167-175.
- Piermaría J, Cónsole G, Perelló M, Moreno G, Gaillard RC, Spinedi E. Impact of estradiol on parametrial adipose tissue function: evidence for establishment of a new set point of leptin sensitivity
- Redding TW, Schally AV, Arimura A, Wakabayashi I. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology* 1971; 8(3):245-255.

in control of energy metabolism in female rat. *Endocrine* 2003; 20(3):239-245.

Redding TW, Schally AV, Arimura A, Wakabayashi I. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology* 1971; 8(3):245-255.

Remke H, Wilsdorf A, Muller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol* 1988; 33(4):223-232.

Ribeiro EB, do Nascimento CM, Andrade IS, Hirata AE, Dolnikoff MS. Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. *J Comp Physiol B* 1997; 167(6):430-437.

Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:145-171.

Sasaki F, Kawai T, Ohta M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohypophysial cells. *Anat Rec* 1994; 240(2):255-260.

Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept* 2000; 92(1-3):25-29.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2858-64.

Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 2000; 14(8):963-980.

Spinedi E, Johnston C, Negro-Vilar A. Increased responsiveness of hypothalamic-pituitary axis after neurotoxin-induced hypothalamic denervation. *Endocrinology* 1984; 115(1):267-272.

Tsuneyama K, Nishida T, Baba H, Taira S, Fujimoto M, Nomoto K, Hayashi T, Miwa S, Nakajima T, Sutoh M, Oda E, Hokao R, Imura J. Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes,

Remke H, Wilsdorf A, Muller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol* 1988; 33(4):223-232.

Ribeiro EB, do Nascimento CM, Andrade IS, Hirata AE, Dolnikoff MS. Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. *J Comp Physiol B* 1997; 167(6):430-437.

Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:145-171.

Sasaki F, Kawai T, Ohta M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohypophysial cells. *Anat Rec* 1994; 240(2):255-260.

Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept* 2000; 92(1-3):25-29.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2858-64.

Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 2000; 14(8):963-980.

Spinedi E, Johnston C, Negro-Vilar A. Increased responsiveness of hypothalamic-pituitary axis after neurotoxin-induced hypothalamic denervation. *Endocrinology* 1984; 115(1):267-272.

Tsuneyama K, Nishida T, Baba H, Taira S, Fujimoto M, Nomoto K, Hayashi T, Miwa S, Nakajima T, Sutoh M, Oda E, Hokao R, Imura J. Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29(9):1736-1743.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21(6):697-738.

Wang X, Ye G, Sun J. Leptin and feedback regulation of body weight. Review. *Wei Sheng Yan Jiu* 1999; 28(5):318-320.

tes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29(9):1736-1743.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21(6):697-738.

Wang X, Ye G, Sun J. Leptin and feedback regulation of body weight. Review. *Wei Sheng Yan Jiu* 1999; 28(5):318-320.

Zelena D, Jezova D, Acs Z, Makara GB. Monosodium glutamate lesions inhibit the N-methyl-D-aspartate-induced growth hormone but not prolactin release in rats. *Life Sci* 1998; 62(22):2065-72.

Zelena D, Jezova D, Acs Z, Makara GB. Monosodium glutamate lesions inhibit the N-methyl-D-aspartate-induced growth hormone but not prolactin release in rats. *Life Sci* 1998; 62(22):2065-72.

CAPÍTULO 19

Thymectomy, immunoneutralization and gene transfer of thymulin: effects on adenohipofisarias de ratones

Los sistemas inmune, nervioso y endocrino se integran en los mamíferos para constituir una red homeostática. Se documentaron asociaciones entre hipófisis, tiroides, adrenales, gónadas y timo (Fabris y col., 1989). La mayor influencia madurativa entre timo y sistema neuroendocrino se hace en el período perinatal de la vida. El sistema inmune reconoce moléculas extrañas a través de las células presentadoras de antígenos, activa las subpoblaciones de linfocitos y muestra respuesta humoral y celular para mantener la homeostasis del organismo. En estudios tempranos se demostró que en las especies con timectomía (Tx) neonatal no se alteró la capacidad inmune (Solomon, 1971).

El eje neuroendocrino ejerce influencia sobre la fisiología del timo en la vida adulta por acción directa de las hormonas adenohipofisarias o periféricas, actuando sobre las células epiteliales tímicas (CET) y/o sobre las células intratímicas inmaduras (Savino y Dardenne, 2000; Reggiani y col., 2009a). No hay evidencia directa de la existencia de

CHAPTER 19

Thymectomy, immunoneutralization and gene transference of thymulin: effects on adenohipophyseal populations in mice

The immune, nervous and endocrine systems are integrated in mammals so that they constitute a homeostatic network. Associations between hypophysis, thyroid, adrenal glands, gonads and thymus have been reported (Fabris et al., 1989). The main maturative influence between thymus and the neuroendocrine system appears in the perinatal period of life. The immune system recognizes strange molecules by means of the antigen presenting cells, activates lymphocyte populations and shows humoral and cellular responses in order to maintain the organism homeostasis. In previous studies it was demonstrated that in species with neonatal thymectomy (Tx) there was no alteration of the immune capacity (Solomon, 1971).

The neuroendocrine axis influences the thymus physiology in adult life through the direct action of adenohipophyseal or peripheral hormones, acting on the thymic epithelial cells (TEC) and/or immature intrathymic cells (Savino and Dardenne, 2000; Reggiani et al., 2009a).

factores hipotalámicos capaces de afectar la síntesis de timulina por acción sobre las CET. Sin embargo, se ha documentado que el tratamiento con extractos hipotalámicos de ratones jóvenes a ratones viejos determinó la reaparición de niveles detectables de timulina sérica (Folch y col., 1986). Los extractos pituitarios o hipotalámicos de ratones jóvenes indujeron secreción de timulina en las líneas de CET y este efecto declinó cuando dichos extractos provinieron de ratones envejecidos (Goya y col., 1995).

En contrapartida, la glándula tímica es clave para una adecuada maduración del eje neuroendocrino y son conocidas las alteraciones endocrinas inducidas por la ausencia congénita del timo o la Tx neonatal. Se ha comunicado que los ratones congénitamente atímicos (*nude*) hembras redujeron los niveles de gonadotrofinas circulantes y pituitarios, deficiencia que se ha relacionado con los desarreglos reproductivos descritos en estos mutantes (Rebar y col., 1981a-b). Las hormonas tímicas afectan a la hipófisis (Pierpaoli y col., 1976) y la hipótesis de que el timo ejerce un efecto hipofisotrófico se sustenta en una cantidad significativa de resultados. La timulina estimuló la secreción de LH en pituitarias perfundidas (Brown y col., 2000) y de ACTH mediante adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPC) en fragmentos pituitarios incubados (Hadley y col., 1997). Se conoce que la hormona tímica moduló la actividad estimuladora de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), con secreción de LH y FSH, a partir de las células pituitarias de ratas hembras en diferentes días del ciclo estral (Hinojosa y col., 2004). La timulina también estimuló la secreción de TSH, PRL, GH, FSH y LH en las células pituitarias dispersas en dosis de 10^{-8} a 10^{-3} M (Brown y col., 1998; 1999 y 2000).

Las hormonas hipofisarias modulan la actividad funcional de las células linfoides (Fabris y col., 1971) y la **timulina** produce: **a.** Activación de LT citotóxicos, colaboradores y supresores; **b.** Proliferación de LT y **c.** Síntesis de IgG-anti-ADN, IgA, IgG e interleuquina 2 (IL-2) (Charreire y Bach, 1975; Bach, 1983). Además, la timulina tiene un

There is no direct evidence of hypothalamic factors capable of affecting the synthesis of thymulin mediated by the action on TEC. However, it has been reported that the treatment of old mice with hypothalamic extracts from young mice resulted in the reappearance of detectable levels of serum thymulin (Folch et al., 1986). Pituitary or hypothalamic extracts from young mice induced thymulin release from TEC, effect that declined when these extracts were obtained from senile mice (Goya et al., 1995).

On the contrary, the thymic gland is a key element for proper maturation of the neuroendocrine axis and the endocrine alterations induced by the congenital absence of the thymus or neonatal Tx are well known. It has been communicated that congenitally athymic (*nude*) females reduced their circulating gonadotropins and pituitaries, this being a deficiency that has been associated with reproductive disorders described in these mutants (Rebar et al., 1981a-b). Thymic hormones affect the hypophysis (Pierpaoli et al., 1976) and the hypothesis that the thymus exerts a hypophysiotropic effect is based on a significant amount of results. **Thymulin** stimulated LH release in perfused (Brown et al., 2000) and ACTH release by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in incubated pituitary fragments (Hadley et al., 1997). It is known that the thymic hormone modulated the stimulating activity of the gonadotropin releasing hormone (GnRH), with LH and FSH secretion from female rat pituitary cells in different days of the estrual cycle (Hinojosa et al., 2004). Thymulin also stimulated TSH, PRL, GH, FSH and LH release in scattered pituitary cells with 10^{-8} to 10^{-3} M doses (Brown et al., 1998; 1999 and 2000).

Hypophyseal hormones modulate the function of lymphoid cells (Fabris et al., 1971) and **thymulin** produces: **a.** Activation of cytotoxic LT, collaborators and suppressors; **b.** Proliferation of LT and **c.** Synthesis of IgG-anti-DNA, IgA, IgG e IL-2 (Charreire and Bach, 1975; Bach, 1983). Also, thymulin possesses analgesic and anti-inflammatory effect (Safieh-Garabedian et al., 1997; 2000; 2003 and

efecto analgésico y antiinflamatorio (Safieh-Garabedian y col., 1997; 2000; 2003 y 2011; Reggiani y col., 2009a; 2014), actuando a través de las interleuquinas y las prostaglandinas.

El timo presenta su máximo desarrollo después del nacimiento hasta la pubertad y luego involuciona con una progresiva disminución del parénquima tímico, descenso de los linfocitos corticales e infiltración adiposa. Ello determina la declinación de la inmunidad mediada por células y la menor actividad tímica en los adultos está asociada con una inmunodeficiencia selectiva que se manifiesta en neoplasias, enfermedades infecciosas y autoinmunes, con un deterioro de uno o más subtipos de linfocitos T (Oates y col., 1989).

Un caso severo de deficiencia tímica es el síndrome DiGeorge causado por una malformación congénita con hipoplasia o ausencia de timo y paratiroides en los neonatos. La malformación es debida a fallas en las bolsas faríngeas (tercera y cuarta) y en el primer arco branquial. Los pacientes con síndrome DiGeorge presentan susceptibilidad aumentada a las infecciones, hipoparatiroidismo congénito, malformación bucal, oídos de implantación baja, hipoplasia tiroidea y anomalías cardíacas.

Las **células endocrinas tímicas (CET)** representan el componente endocrino del timo ya que sintetizan y liberan interleuquinas y péptidos bioactivos denominados **hormonas tímicas**: timosina ($\alpha 1$), factor tímico humoral $\gamma 2$ (FTH $\gamma 2$), timopoyetina, hormona tímica homeostática y timulina. Se sintetizó un péptido que mostró una actividad biológica idéntica al factor tímico sérico (FTS) natural (Bach y col., 1977) y, sin embargo, en preparaciones fortuitas de FTS sintéticos inactivos se sugirió la existencia de dos formas del péptido, una bioactiva y otra inactiva. De hecho, la incubación del péptido con agentes quelantes resultó en la pérdida de su actividad. Además, mediante estudios de microanálisis se identificaron gránulos densos de Zn^{+2} dentro de las vacuolas citoplasmáticas en los cultivos de CET, sugiriendo la interacción con el FTS (Dardenne y col., 1982). El complejo activo formado por FTS-Zn fue denominado **timulina (tabla 1)**.

2011; Reggiani et al., 2009a; 2014) acting through interleukins and prostaglandins.

The thymus presents its highest development after birth up to puberty and then regresses with a progressive diminution of the thymic parenchyma, decrease of cortical lymphocytes and adipose infiltration. This determines the decline of the cell-mediated immunity. Less thymic activity in adults is associated with selective immunodeficiency that is manifested in neoplasias, infectious and autoimmune diseases, with deterioration of one or more subtypes of T lymphocytes (Oates et al., 1989).

A severe case of thymic deficiency is the DiGeorge syndrome, caused by a congenital malformation with hypoplasia or absence of thymus and parathyroid glands in neonates. Malformation is caused by defects in the pharyngeal pouches (third and fourth) and in the first brachial arch. Patients with DiGeorge syndrome present increased susceptibility to infections, congenital hypoparathyroidism, mouth malformation, low set ears, thyroid hypoplasia and heart abnormalities.

Thymic epithelial cells (TEC) represent the endocrine component of thymus since they synthesize and release bioactive interleukins and peptides called thymic hormones: thymosin ($\alpha 1$), serum thymic factor $\gamma 2$ (STF $\gamma 2$), thymopoietin, homeostatic thymus hormone and thymulin. A peptide was synthesized, which showed a biologic activity identical to the natural serum thymic factor (STF) (Bach et al., 1977) and, however, fortuitous preparations of inactive synthetic STF, have suggested the existence of two forms of peptides, a bioactive and an inactive one. In fact, peptide incubation with chelating agents resulted in activity loss. Also, by means of microanalysis studies, Zn^{+2} dense granules were identified within the cytoplasmic vacuoles in TEC cultures, suggesting interaction with STF (Dardenne et al., 1982). The active complex formed by STF-Zn has been called **thymulin (table 1)**.

Tabla 1. Péptidos tímicos

PÉPTIDO TÍMICOS	ACCIONES PRINCIPALES
TIMOSINA- α 1	Induce la expresión de antígenos Thy 1-2. Incrementa la respuesta mitogénica de los linfocitos. Estimula la producción de anticuerpos y linfoquinas. Modula la expresión de la deoxinucleotidiltransferasa.
FACTOR TÍMICO HUMORAL γ 2 (TFH- γ 2)	Otorga reactividad a poblaciones de L no competentes. Aumenta la proliferación de LT y la IL-2 esplénica.
TIMPOYETINA	Promueve varias de las funciones de los LT.
TIMULINA (FTS-Zn)	Inmunoestimuladora. Prolifera LT y diferencia a LT colaboradores y citotóxicos.

La timulina es producida por las CET (Dardenne y col., 1974) y consiste en un nonapéptido inactivo denominado factor tímico sérico (FTS) acoplado en una relación equimolecular con el ion zinc (Gastinel y col., 1984) que da actividad biológica a la molécula (Dardenne y col., 1982). La forma activa tiene una conformación molecular específica que ha sido registrada mediante resonancia nuclear magnética (Cung y col., 1988) (fig. 19.1).

- Factor tímico sérico.
- Nonapéptido.
- Producido por CET.
- Acoplado al ion Zn^{+2} adquiere actividad biológica y se llama **timulina**.

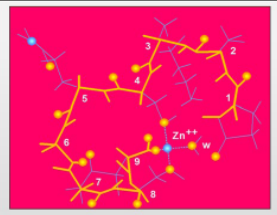


Fig. 19.1. Molécula de timulina.

La actividad biológica de la timulina puede ser evaluada mediante un bioensayo formador de rosetas a partir de glóbulos rojos de oveja y que fuera desarrollado por Bach y col. (1975). En la fig. 19.2 se muestra la regulación de su secreción.

El eje pituitario-tímico se halla afectado por la **timectomía (Tx) neonatal** (Michael y col., 1980), la **inmunoneutralización** (Camihort y col., 2006) o la **ausencia congénita de timo** (Rebar y col., 1981a y 1982):

Table 1. Thymic peptides

Thymic peptides	Main actions
Thymosin- α 1	It induces expression of antigens Thy 1-2
Serum thymic factor γ 2 (THF γ 2)	It increases the mitogenic response of lymphocytes
Thymopoietin	It stimulates the production of antibodies and lymphokines
Thymulin	It modulates the expression of deoxinucleotidiltransferase

Thymulin is produced by TEC (Dardenne et al., 1974) and consists of an inactive nonapeptide called STF (serum thymic factor) coupled in an equimolecular ratio to the ion zinc (Gastinel et al., 1984) which confers biological activity to the molecule (Dardenne et al., 1982). The active form has a specific molecular conformation that has been recorded by nuclear magnetic resonance (Cung et al., 1988) (fig. 19.1).

- Serum thymic factor.
- Nonapeptide.
- Produced by thymic epithelial cells.
- Coupled to Zn^{+2} ion it acquires biologic activity and is called **thymulin**.

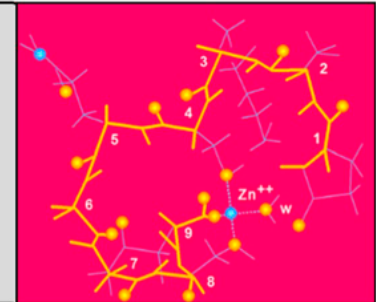


Fig. 19.1. Thymulin molecule.

The biologic activity of thymulin may be assessed by rosette-forming cell bioassay from sheep red blood cells developed by Bach et al. (1975). In fig. 19.2 secretion regulation is shown.

The pituitary thymic axis is affected by **neonatal thymectomy (Tx)** (Michael et al., 1980), **immunoneutralization** (Camihort et al., 2006) or **congenital absence of the thymus** (Rebar et al., 1981a and 1982):

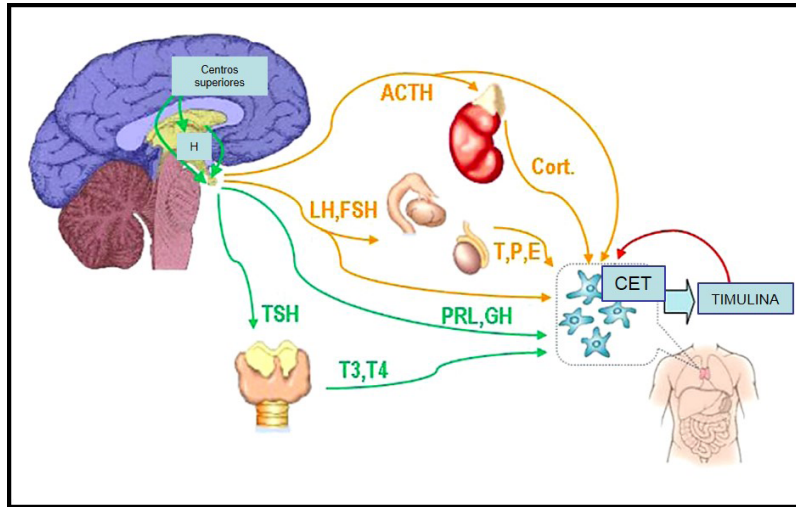


Fig. 19.2. Control de la secreción de timulina. La timulina posee actividad hipofisotrófica y ejerce una retroalimentación negativa. Las hormonas: dexametasona (Cort.), progesterona (P), testosterona (T), estradiol (E), PRL, GH y T3-T4 regulan su secreción. CET: células epiteliales tímicas (Reggiani, 2009c).

1. Timectomía neonatal

El timo interviene en la maduración sexual durante el período perinatal. Es de remarcar que durante este período transcurren pasos decisivos del desarrollo y de la programación de ciertas funciones neuroendocrinas en el cerebro (Harris y Levine, 1965; Pierpaoli y Besedovsky, 1975). La Tx en ratones recién nacidos y hasta los 35 días de edad interfirió con el desarrollo de la capacidad inmunológica de las células provenientes de los nódulos linfáticos ganglionares y esplénicos (Dalmaso y col., 1964). La Tx desarrolló alteraciones degenerativas en las glándulas tiroideas y adrenales, con modificaciones en la población somatotropa pituitaria (Pierpaoli y col., 1971; Pierpaoli y Sorkin, 1972) y en los niveles séricos de GH, LH y FSH, sin alterar los niveles de PRL (Michael y col., 1980). En la Tx neonatal de ratones hembras normales (Nishizuka y Sakakura, 1971; Michael y col., 1980) se observan efectos similares a los descritos en las hembras *nude* homocigotas: retardo

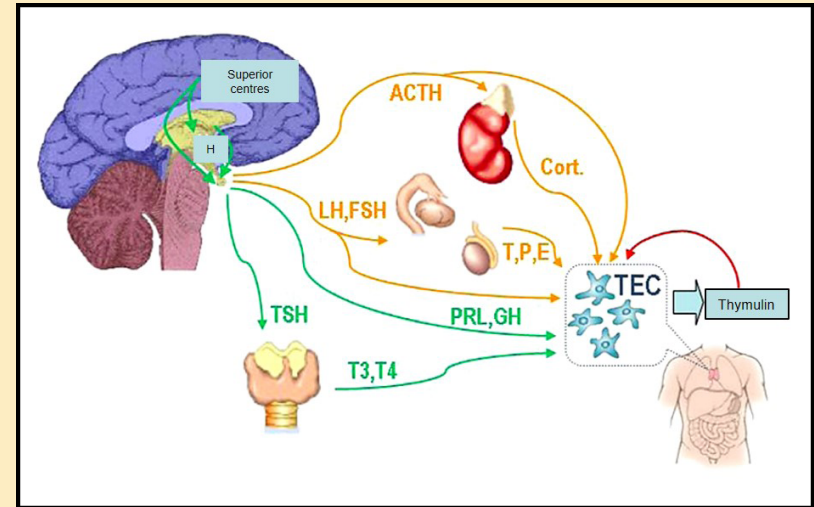


Fig. 19.2. Control of thymulin secretion. Thymulin exerts negative feedback and possesses a hypophysiotropic activity. Dexamethasone (Cort.), progesterone (P), testosterone (T), estradiol (E), PRL, GH and T3-T4 regulate its secretion. TEC: thymic epithelial cells (Reggiani, 2009c).

1. Neonatal thymectomy (Tx)

Thymus is involved in sexual maturation during perinatal period. It is worth noting that in this period decisive stages occur in the development and programming of some neuroendocrine functions in the brain (Harris and Levine, 1965; Pierpaoli and Besedovsky, 1975). Tx in new born mice and up to 35 days of age interferes with the development of the immunologic capacity of the cells from splenic and ganglion lymph nodes (Dalmaso et al., 1964). Tx develops degenerative alterations in the thyroid and adrenal glands, with modifications in the pituitary somatotrope population (Pierpaoli et al., 1971; Pierpaoli and Sorkin, 1972) and in GH, LH and FSH serum levels, with no alteration of PRL levels (Michael et al., 1980). In neonatal Tx of normal female mice (Nishizuka and Sakakura, 1971; Michael et al., 1980) similar effects to those described in homozygous *nude* females can be observed: delayed vaginal opening and first ovulation

en la apertura vaginal y en la primera ovulación (Besedovsky y Sorkin, 1974), fertilidad reducida con bajos niveles de gonadotrofinas circulantes (Rebar et al., 1981a) y aumento de la atresia folicular con una insuficiencia ovárica prematura (Lintern-Moore y Pantelouris, 1975). Se realizaron estudios en ratones Tx a los días 2-4 de vida y se halló una ventana temporal madurativa en la cual interviene el timo. La disfunción ovárica determinó una pérdida de ovocitos, un aumento de la infiltración linfocitaria y una hipertrofia-hiperplasia de las células intersticiales, con descenso del número de folículos y cuerpos lúteos. Estas alteraciones fueron evidenciadas a los 25 días de edad, haciéndose marcadas a los 2-3 meses de vida. Sin embargo, cuando la Tx se realizó después de los 7 días de vida no se observaron cambios en el desarrollo ovárico, mientras que la Tx antes de los 2 días edad provocaba la muerte de los animales (Nishizuka y Sakakura, 1969 y 1971; Michael et col., 1980). Además, se ha observado que la Tx fetal en primates indujo una anormal diferenciación ovárica y una disminución en el tamaño de los ovarios con inhibición de la ovogénesis (Healy y col., 1985) y la

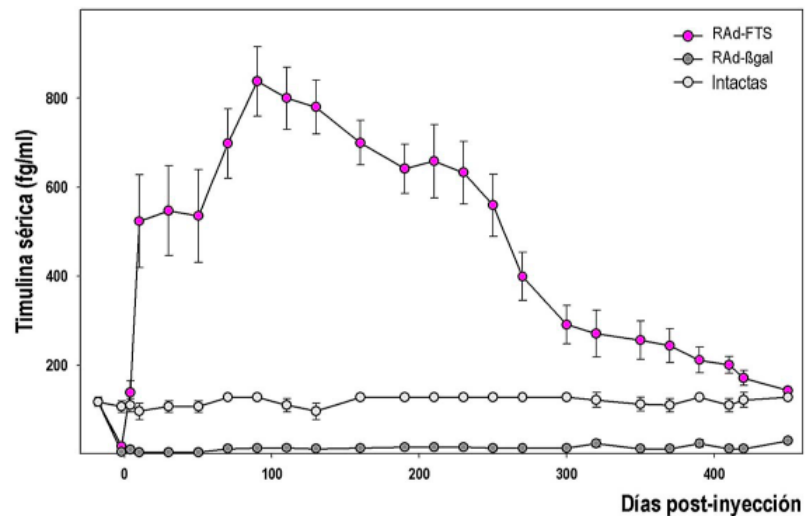


Fig. 19.3. Expresión de timulina sérica en ratas Tx. Intactas (círculos claros), RAd-βgal (círculos grises) y RAd-FTS (círculos rosas) (Reggiani y col., 2006).

(Besedovsky and Sorkin, 1974), reduced fertility with low levels of circulating gonadotropins (Rebar et al., 1981a) and an increase in follicular atresia with premature ovarian failure (Lintern-Moore and Pantelouris, 1975). Studies on Tx mice at 2-4 days of age revealed a maturative time window in which the thymus takes part. Ovarian dysfunction determined a loss of oocytes, an increase of lymphocytic infiltration and a hypertrophy-hyperplasia of interstitial cells with a decreased number of follicles and corpus luteum. These alterations were evidenced at 25 days of age, being more marked at 2-3 months of age. However, when Tx was performed after the age of 7 days, no changes were observed in ovarian development, whereas Tx before 2 days of age caused the animals' death (Nishizuka and Sakakura, 1969; 1971; Michael et al., 1980). Also, fetal Tx in primates has been reported to induce abnormal ovarian differentiation and decrease ovarian size with inhibition of oogenesis (Healy et al., 1985) and Tx in 10-day-old mice induced delayed puberty, decreased number of total follicles and of serum levels of 17β estradiol (Hinojosa et al.,

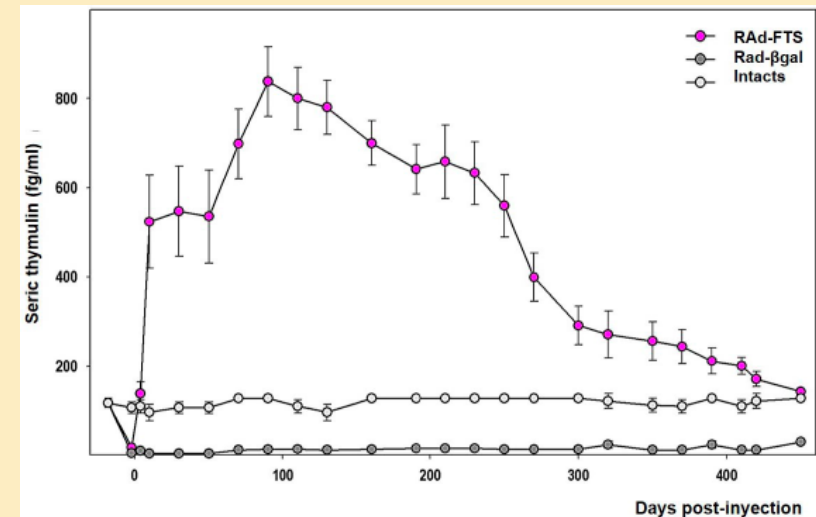


Fig. 19.3. Expression of serum thymulin in Tx rats. Intact (light circles), RAd-βgal (gray circles) and RAd-FTS (pink circles) (Reggiani et al., 2006).

Tx en ratones de 10 días de vida indujo un retraso en la pubertad, una disminución del número de folículos totales y de los niveles séricos de 17β estradiol (Hinojosa y col., 1999). La administración de timulina a ratones Tx adelantó el día de apertura vaginal y produjo un incremento de los niveles séricos de 17β estradiol. Cuando los animales fueron tratados previamente con gonadotrofinas se observó un incremento en el número de ovocitos, en el 17β estradiol sérico y en el peso del útero (García y col., 2000). La Tx promovió mayor tumorigénesis ovárica durante el envejecimiento (Michael y col., 1981).

La **terapia génica neonatal (TGN)** con adenovirus recombinante portador del factor tímico sérico (RAd-FTS) en ratas adultas (9 meses) Tx registró niveles suprafsiológicos de timulina durante 400 días y en las ratas Tx inyectadas con el RAd- β gal (vector control) no se vieron niveles de timulina sérica detectables (Reggiani y col., 2006) (**fig 19.3**).

2. Inmunoneutralización de la timulina

La inmunoneutralización de la hormona se hizo en ratones mediante un anticuerpo anti-timulina (α FTS), desde el nacimiento hasta la pubertad. La **fig. 19.4** permite observar los campos representativos de la histometría realizada en los dos grupos experimentales (FTS y suero normal de conejo: anticuerpo control (NRS) (Camihort y col., 2006).

En la **fig. 19.5** se muestra la morfometría adenohipofisaria de los animales machos y hembras sometidos a inmunoneutralización de la timulina sérica (FTS), respecto a controles (NRS). La población lactotropa mostró un descenso significativo ($p < 0.01$) en la densidad de células (DC) y en la densidad de volumen (DV), sin cambios en el tamaño celular (TC) en hembras y machos del grupo inmunizado con anti- α -FTS, comparados con los controles (NRS).

La población somatotropa presentó un descenso significativo ($p < 0.01$) en la DC y un incremento ($p < 0.01$) en el TC en ambos sexos del grupo α -FTS respecto a controles (NRS).

1999). Administration of thymulin to Tx mice led to earlier vaginal opening time and produced an increment of serum levels of 17β estradiol. When animals were previously treated with gonadotropins, an increase in the number of oocytes, in 17β serum estradiol and in uterus weight was noticed (García et al., 2000). Tx fostered higher ovarian tumorigenesis during aging (Michael et al., 1981).

In neonatal gene therapy (NGT) with RAd-FTS in adult rats (9 months) Tx recorded supraphysiologic levels of thymulin for 400 days and in Tx rats injected with RAd- β gal (control vector) no detectable serum thymulin levels were evident (Reggiani et al., 2006) (**fig. 19.3**).

2. Thymulin immunoneutralization

The hormone immunoneutralization in mice was performed an anti-thymulin antibody from birth to puberty. In **fig. 19.4** we can see the representative fields of the morphometry done on both experimental groups (FTS and NRS: control) (Camihort et al., 2006).

In **fig. 19.5** the adenohipophyseal morphometry is shown for male and female animals submitted to serum thymic (FTS) immunoneutralization compared to controls (NRS). The lactotrope population evidenced a significant decrease ($p < 0.01$) in cell density (CD) and in volume density (VD), with no changes in cell size (CS) in females and males from α -FTS group compared to controls (NRS).

The somatotrope population presented a significant decrease ($p < 0.01$) in CD and an increment in ($p < 0.01$) in CS in both sexes of the α -FTS group compared to controls (NRS).

Gonadotropes (LH-FSH cells) evidenced an increase ($p < 0.01$) in VD and in CS when α -FTS males and females were compared with their NRS counterparts.

In the thyrotrope population CD and CS values were higher ($p < 0.01$) in α -FTS males compared to male controls (NRS).

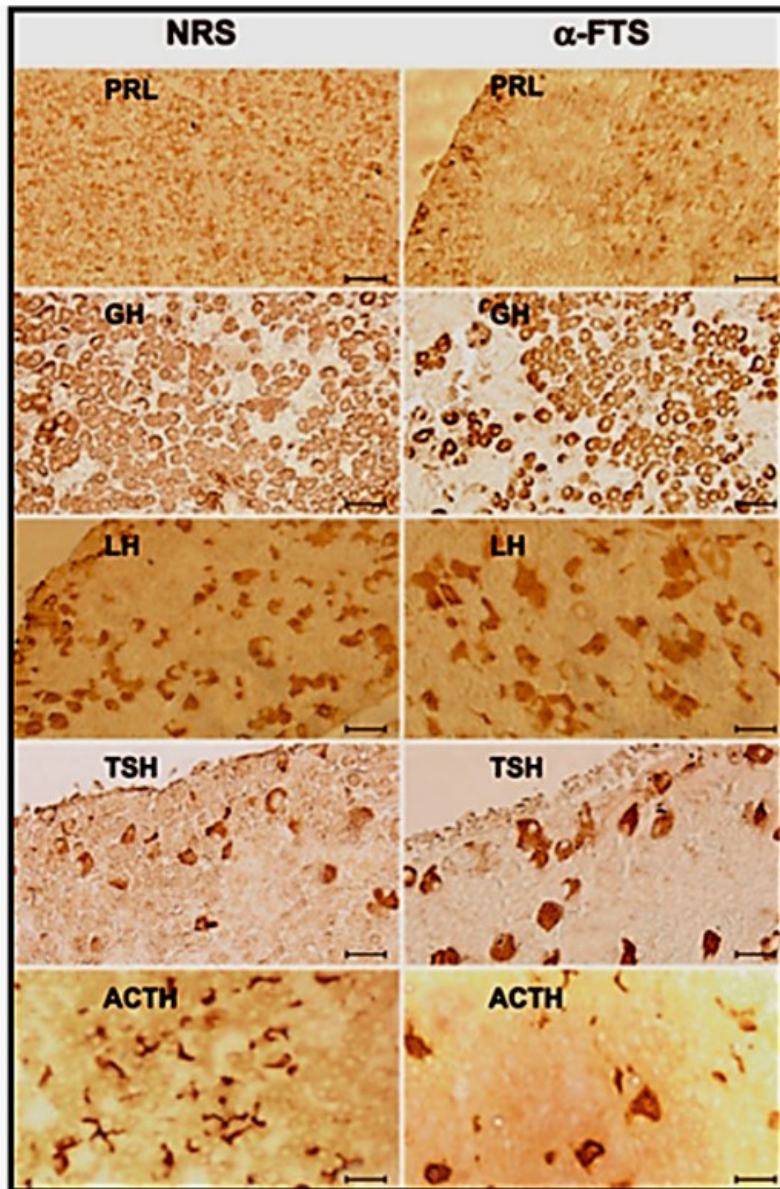


Fig. 19.4. Campos representativos de las poblaciones adenohipofisarias
(*EnVision peroxidasa, barra 25 um*) (Camihort y col., 2006).

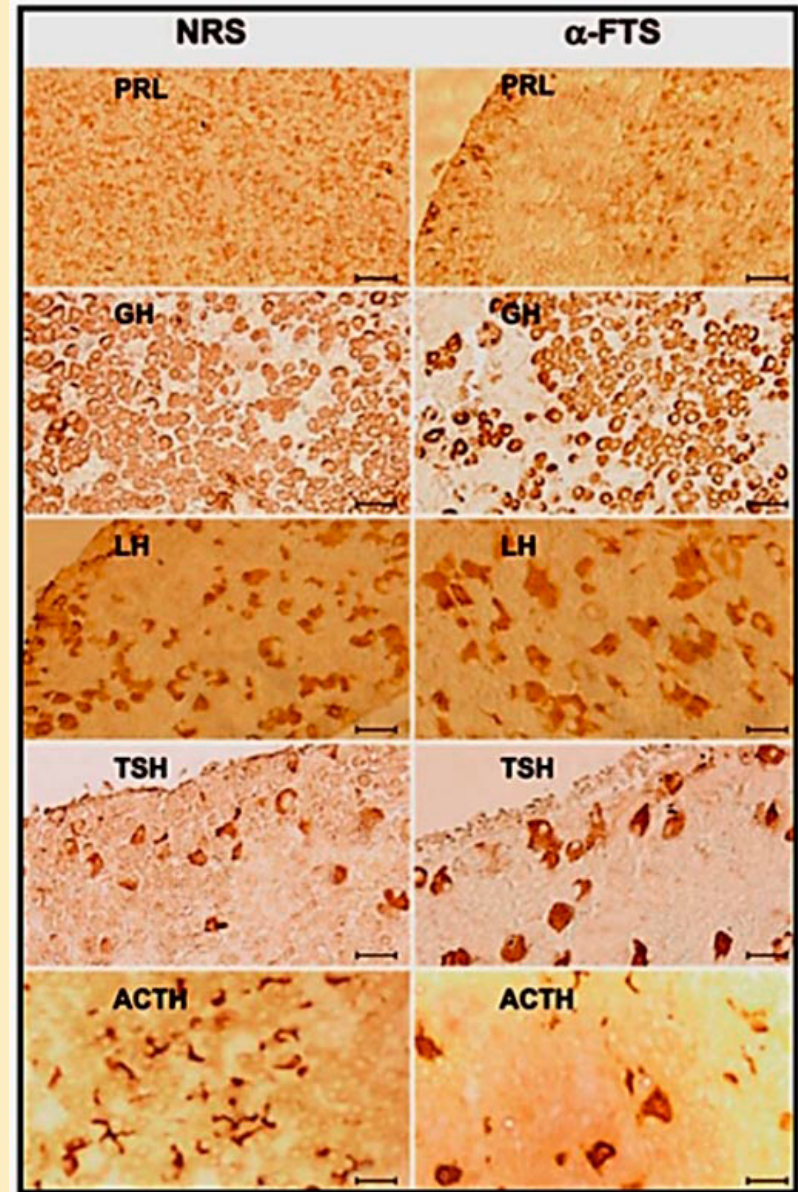


Fig. 19.4. Representative fields of adenohypophyseal populations
(*Peroxidase EnVision, bar 25 um*) (Camihort et al., 2006).

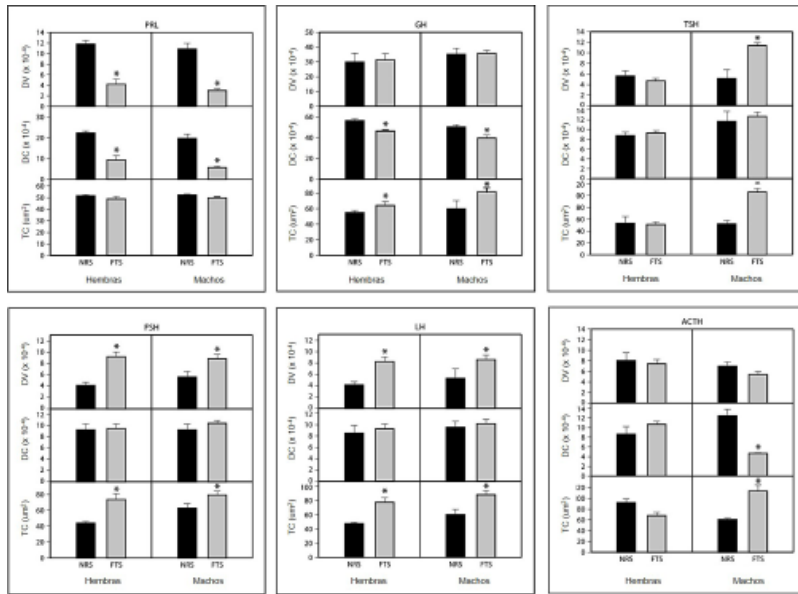


Fig. 19.5. Inmunoneutralización de la timulina. Morfometría (DV, DC y TC) de las poblaciones adenohipofisarias (*p < 0.01) (Camihort y col., 2006).

Las gonadotropas (células LH-FSH) mostraron un aumento (p < 0.01) en la DV y en el TC cuando los machos y hembras α-FTS se compararon con sus contrapartes NRS.

En la población tirotrópica los valores de DC y TC fueron mayores (p < 0.01) en los machos α-FTS, respecto a los controles (NRS) machos.

La población corticotropa exhibió un significativo (p < 0.01) descenso en la DC y un incremento (p < 0.01) en el TC en machos α-FTS, en comparación con machos NRS.

El descenso del número de células adenohipofisarias con aumento del tamaño celular representaría una respuesta compensatoria que no alcanza a prevenir el descenso de los niveles séricos de las respectivas hormonas.

Las **figs. 19.6-19.7** presentan el impacto de la inmunoneutralización de la timulina a corto y largo plazo sobre los niveles séricos de LH, FSH, PRL, GH y TSH en la peripubertad de ratones, de acuerdo al sexo.

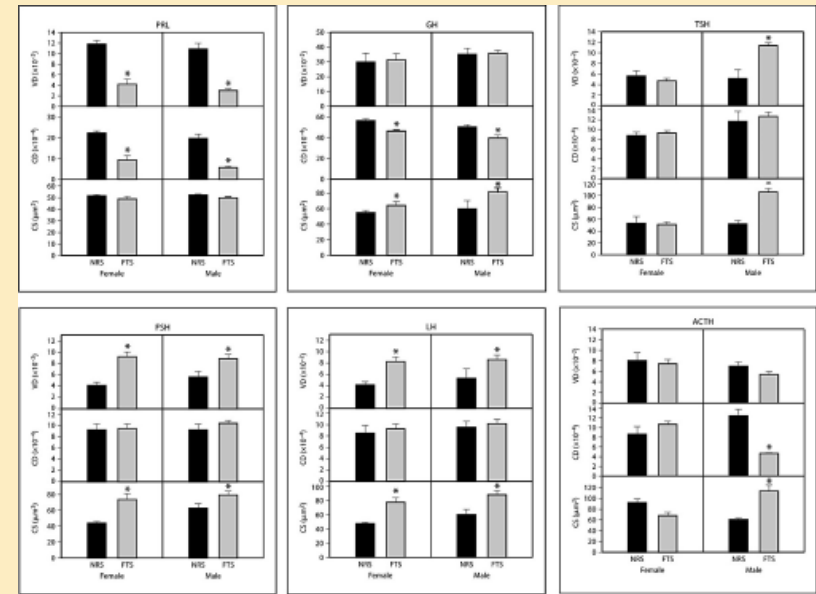


Fig. 19.5. Thymulin immunoneutralization. Morphometry (VD, CD and CS) of adenohypophysial populations (*p < 0.01) (Camihort et al., 2006).

The corticotrope population exhibited a significant decrease (p < 0.01) in CD and an increase (p < 0.01) in CS in α-FTS males when compared to NRS males.

The decrease of the number of pituitary cells with an increase in cell size would represent a compensatory response that is not enough to prevent the decrease of the serum levels of the respective hormones.

The **figs. 19.6 - 19.7** present the impact of long- and short-term serum-thymulin quenching on serum-LH, -FSH, -PRL, -GH and -TSH levels at peripuberty in mice, according to sex. The animals received weekly i.p. injections of rabbit α-anti-FTS serum beginning at birth and control ones received normal rabbit serum (NRS). All mice were sacrificed at 32 days of age. The experimental animals showed a significant (*p < 0.05, **p < 0.01) decrease in levels of adenohypophysial hormones with respect to controls (Vesenbeckh, 2006).

Los animales recibieron inyecciones i.p. semanales de suero de conejo α -anti-factor tímico sérico (anti- α -FTS) al nacimiento y a los controles se les inyectó suero normal de conejo (NRS). Los ratones fueron sacrificados a los 32 días de edad. Los animales experimentales mostraron un descenso significativo ($p < 0.05$, $p < 0.01$) en los niveles de las hormonas adenohipofisarias con respecto a los controles (Vesenbeckh, 2006).

La inyección de nuestro suero de conejo anti-timulina no eliminó completamente la timulina de la circulación, pero causó un drástico y sostenido

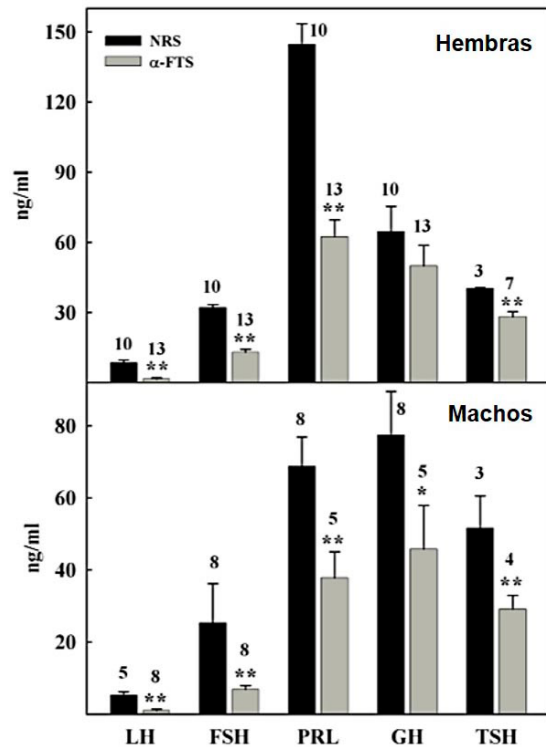


Fig. 19.6. Impacto de la inmunoneutralización de la timulina a largo plazo sobre los niveles séricos de LH, FSH, PRL, GH y TSH en la peripubertad y en ambos sexos. Los animales experimentales (columnas grises) recibieron suero de conejo anti- α -FTS y los controles (columnas negras) fueron inyectados con suero normal de conejo (NRS). Datos \pm ES. Diferencias significativas en entre grupos controles y experimentales: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Injection of our rabbit anti-thymulin serum did not completely eliminate thymulin from circulation but caused a drastic and long-lasting fall in serum thymulin levels in mice. Still, this immunoneutralization of serum thymulin from birth to near-puberty in mice seems to have a slightly negative impact on growth rate which is consistent with what has been reported for *nude* and neonatally thymectomized mice. The influence of thymulin on body growth might be effected through the neuroendocrine system. The depressing effect that thymulin quenching

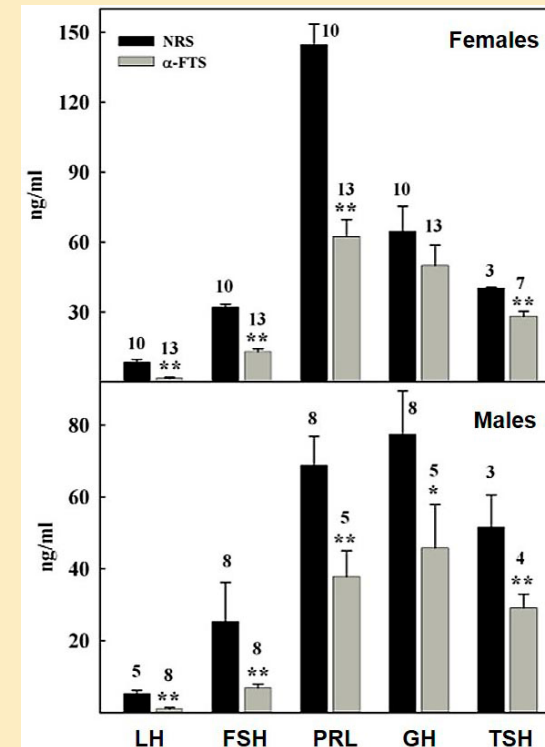


Fig. 19.6. Impact of long-term serum-thymulin quenching on serum-LH, -FSH, -PRL, -GH and -TSH levels at peripuberty in mice, according to sex. Experimental animals (gray columns) received rabbit anti- α -FTS serum (α -FTS) and control mice (black columns) received normal rabbit serum (NRS). Error bars represent SEM. Significance of differences between control- and experimental- groups are indicated by * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

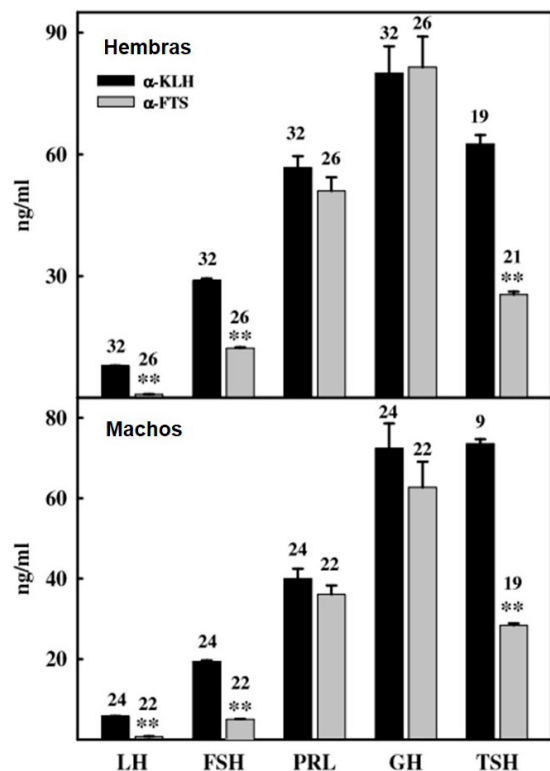


Fig. 19.7. Impacto de la inmunoneutralización de la timulina a corto plazo sobre los niveles séricos de LH, FSH, PRL, GH y TSH en la peripubertad y en ambos sexos. Los animales experimentales (columnas grises) recibieron suero de conejo anti-KLH y los controles (columnas negras) fueron inyectados con suero normal de conejo (NRS). Datos \pm ES. Diferencias significativas en entre grupos controles y experimentales: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

descenso en los niveles de timulina sérica en los ratones. Aun más, esta inmunoneutralización de la timulina sérica desde el nacimiento hasta cerca de la pubertad en ratones parece tener un ligero impacto negativo sobre el grado de crecimiento que sería concordante con lo comunicado en ratones *nude* y Tx en período neonatal. La influencia de la timulina sobre el crecimiento corporal podría ser efectivizada a través del sistema neuroendocri-

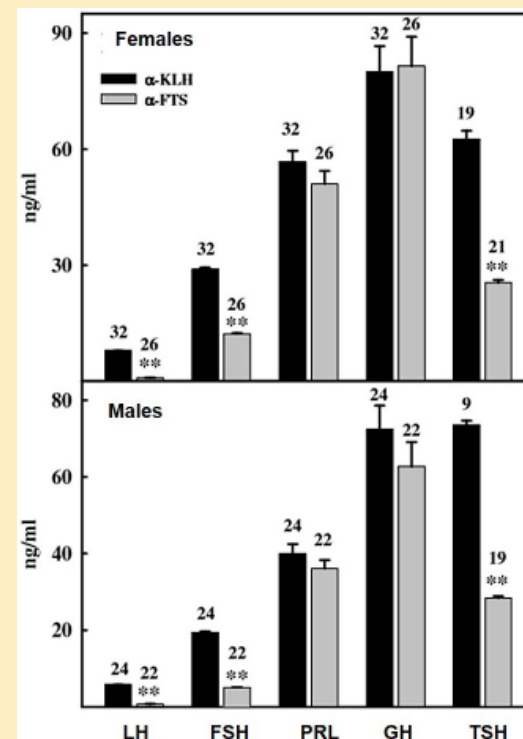


Fig. 19.7. Impact of short-term serum-thymulin quenching on serum-LH, -FSH, -PRL, -GH and -TSH levels at peripuberty in mice, according to sex. Control mice (black columns) received anti-KLH rabbit serum (α -KLH) while experimental mice received rabbit anti- α -FTS serum (α -FTS). Error bars represent SEM. Significance of differences between control- and experimental-groups are indicated by * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

has on serum PRL and gonadotropins is in line with observations in *nude* and neonatally thymectomized mice (Goya et al., 1996). In addition, Vesenbeckh (2006) confirmed this decrease in the levels of adeno-hypophyseal hormones respect to controls.

Taken together, data focus on the facilitating activity of thymulin on the pituitary secretion of hormones. Other factor associated with athymia (e.g.: cachexia-like aspect of the animal) remain unaffected by

no. El efecto depresivo que la inmunoneutralización tiene sobre la PRL y las gonadotropinas séricas está en línea con las observaciones en ratones *nude* y con la Tx en etapa neonatal (Goya y col., 1996). Además, Vesenbeckh (2006) ratificó dicho descenso significativo en los niveles de las hormonas adenohipofisarias respecto a los controles en un diseño experimental similar.

Tomados en conjunto, los datos puntualizan la actividad facilitadora de la timulina sobre la secreción hormonal pituitaria. Otros factores asociados con la atimia (ej: el aspecto del animal caquéctico) permanecen no afectados por la inmunoneutralización de la timulina. Esto podría deberse a que las otras hormonas tímicas y los componentes celulares fueron capaces de mantener parte de las funciones inmunes glandulares.

Concluyendo, nuestros resultados morfológicos y séricos permiten presentar a la timulina como un importante mediador del eje pituitario-tímico durante la vida temprana.

3. Terapia génica neonatal (TGN) en el ratón *nude* (congénitamente atímico)

El ratón *nude* exhibe deficiencias vinculadas a su carencia de hormonas tímicas circulantes. Después del nacimiento desarrollan inmunodeficiencia, alteraciones degenerativas en las glándulas tiroideas/adrenales y severas deficiencias reproductivas. La mutación *nude* fue descubierta en 1962, determinándose que era autosómica recesiva y que causaba disgenesia tímica. Los mutantes *nude* carecen de un timo funcional, permaneciendo como rudimentario (o ausente) y producen un número muy reducido de células T maduras (Rygaard, 1973). Además de fallar en la formación del timo, el ratón *nude* (homocigota) presenta un fenotipo desnudo o sin pelo. El alelo mutado *nude* está localizado en el cromosoma 11 y se ha determinado que el gen *whn* representa el gen *nude*. El **clonado del gen *whn*** permitió establecer que: **a.** Los dos clones generados con la mutación *whn* (homocigotas) exhiben las mismas características macroscópicas del ratón *nude* (atimia y la carencia de pelo); **b.** El gen *whn* codifica para una proteína nuclear: el factor de transcripción *whn*; **c.** Las CET expresan el

thymulin inmunoneutralization. This might be caused by the fact that other thymic hormones and cell components were capable of maintaining part of the gland immune functions.

To conclude, our morphological and serum results allow us to present thymulin as an important mediator of the pituitary-thymic axis in early life.

3. Neonatal gene therapy (NGT) in *nude* mice (congenitally athymic).

The *nude* mice exhibit deficiencies bound to their scarcity of circulating thymic hormones. After birth they develop immunodeficiency, degenerative alterations in the thyroid-adrenal gland and severe reproductive deficiencies. *Nude* mutation was discovered in 1962, defining it as being autosomal recessive and causing thymus dysgenesis. *Nude* mutants are lacking in functional thymus, they remain in a rudimentary form (or absent) and produce a largely reduced number of mature T cells (Rygaard, 1973). Apart from failing in the formation of the thymus, the *nude* mouse (homozygous) presents a naked or hairless body phenotype. The mutant allele of the *nude* is localized in chromosome 11 and it has been determined that *whn* gene represents the *nude* gene. *Whn* gene cloning allowed establishing the following: **a.** Both clones generated with *whn* mutation (homozygous) exhibited the same macroscopic characteristics of the *nude* mouse (athymia and absence of body hair); **b.** *Whn* gene codifies for a nuclear protein: transcription factor *whn*; **c.** The thymic epithelial cells (TEC) express the *whn* gene; **d.** The thymic primordium formation does not require the expression of the *whn* gene; **e.** A successful colonization of LT precursors in the thymic rudiment requires the expression of *whn* gene, and **f.** The activity of the *whn* gene is also necessary to maintain the differentiation of the primitive precursor cells in TEC phenotypes (Nehls et al., 1996; Schlake et al., 1997). Thymic dysgenesis appears to be caused by an ectodermal-mesodermal metabolic error and inadequate mesenchymal mass in the mediastinal area. This abnormality results in a failure in the

gen *whn*; **d.** Para la formación el primordio tímico no es requerida la expresión del gen *whn*; **e.** Para una exitosa colonización de los precursores de los LT en el rudimento tímico es necesaria la expresión de gen *whn* y **f.** La actividad del gen *whn* también es necesaria para el mantenimiento de la diferenciación de las células precursoras primitivas en los fenotipos de CET (Nehls y col., 1996; Schlake y col., 1997). La disgenesia tímica parece ser causada por un error metabólico en el ectodermo-mesodermo y por una inadecuada masa mesenquimática en el área mediastínica, produciéndose una falla durante la colonización del rudimento tímico por los protimocitos migrantes, con alteraciones en las células estromales y epiteliales. Estos animales presentaron deficiencias en los LT competentes, aunque mantuvieron un complemento normal de LB y niveles elevados de las células asesinas naturales (NK) y de los macrófagos (Holub y col., 1989). La formación de anticuerpos en estos mutantes estuvo limitada a las IgM y a una respuesta primaria. Los niveles de IgG fluctuaron entre individuos de la misma colonia. Sin embargo, se observó un déficit general en las IgA y una heterogeneidad disminuida de las inmunoglobulinas (Mink y col., 1980).

Los ratones *nude* homocigotas (*nu/nu*) (desnudos) (**Fig. 19.8 A**) están inmunocomprometidos y los ratones de fenotipo normal (con pelo) son inmunocompetentes (**Fig. 19.8 B**).

Los *nude* presentan una degeneración de los folículos pilosos que resultan en calvicie, a pesar de que incrementaron la frecuencia de los

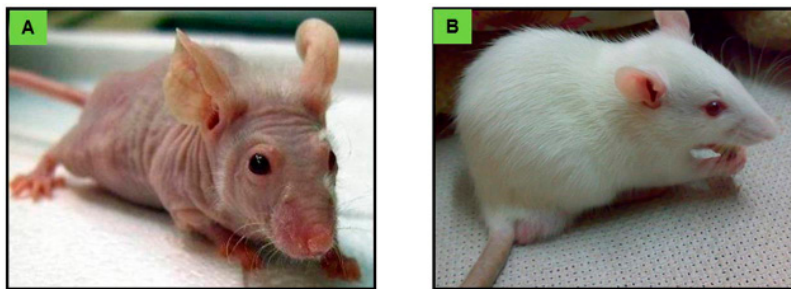
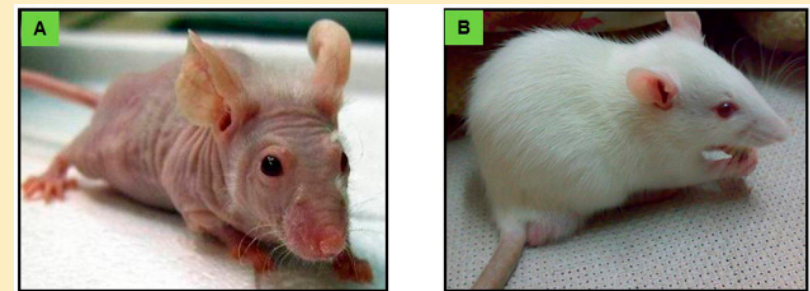


Figura 19.8 A-B. Ratones homocigotas *nude* (A) y heterocigotas (B). Se observan las diferencias fenotípicas ocasionadas por la mutación.

homing of prothymocytes to the developing thymic rudiment, with alterations in the stromal and epithelial cells. These animals present deficiencies of competent LT, although they maintain a normal complement of LB and elevated levels of natural killer cells (NK) and of macrophages (Holub et al., 1989). The formation of antibodies in these mutants was limited to IgM and to a primary response. IgG levels fluctuated among individuals of the same colony. However, a general deficit in IgA and a diminished heterogeneity of immunoglobulin was observed (Mink et al., 1980).

Nude homozygous mice (*nu/nu*) (naked) (**Fig. 19.8 A**) are immunoinvolved and mice with normal phenotype (with hair) are immunocompetent (**Fig. 19.8 B**).



Figures 19.8 A-B. *Nude* homozygous (A) and heterozygous (B) mice. Phenotypical differences caused by mutation can be observed.

Nude mice present a degeneration of the hair follicles that result in hair loss, even though they increase the frequency of hair growth cycles (Eaton, 1976). At histological level, they show scarce normal hair follicles and as a consequence of hair loss they evidence thermoregulation problems (Holub, 1989). Also, they show a lower body weight with respect to heterozygotes. These abnormalities in weight may be genetically determined by a prenatal action of the thymus (Rebar et al., 1982). Under conventional breeding conditions, athymic mice have been reported to have a short life (2-4 months) (Pier-

ciclos de crecimiento piloso (Eaton, 1976). A nivel histológico, mostraron escasos folículos pilosos normales y como consecuencia de la calvicie, tuvieron problemas de termorregulación (Holub, 1989). Además, presentaron un menor peso corporal respecto a los heterocigotas. Las anomalías en el peso podrían estar determinadas genéticamente y/o por una acción prenatal del timo (Rebar y col., 1982). En condiciones convencionales de crianza, los ratones atímicos mostraron una vida corta (2-4 meses) (Pierpaoli y Sorkin, 1972). No obstante, bajo condiciones libres de gérmenes, se ha observado que la supervivencia máxima del ratón *nude* es la misma que la del ratón salvaje (Holland y col., 1978), pero el promedio de supervivencia de los *nude* fue menor que el de su contraparte heterocigota porque desarrollaron linfomas y fueron más susceptibles a ciertos patógenos naturales (Holub, 1989). Estos mutantes presentaron pérdida de la grasa subcutánea, disminución de los linfocitos periféricos, una rápida deshidratación con hipotermia e hipotonía muscular, diarrea, cataratas y caquexia (fig. 19.9).



Figura 19.9. Ratón *nude* de 3 meses de edad que desarrolló caquexia (“wasting”) (Pierpaoli y Sorkin, 1972).

paoli and Sorkin, 1972). However, under germ-free conditions, the maximal survival of *nude* mice is the same as that of wild type mice (Holland et al., 1978). Yet, the median survival time for *nude* mice is lower than that for their heterozygous counterparts since they develop lymphomas, and the *nude* mutant is more susceptible to certain natural pathogens (Holub, 1989). These mutants present reduction of body weight, loss of subcutaneous fat, decrease of the peripheral lymphocytes, a rapid dehydration with hypothermia and muscular hypotonia, diarrhea, cataract and cachexia (fig. 19.9).



Figure 19.9. Three-month-old *nude* mouse that developed cachexia (“wasting”) (Pierpaoli and Sorkin, 1972).

Having accepted the transplantation of human tumors has allowed the development of cancer research, this becoming the first immunodeficient experimental model.

Figure 19.10 present the construction of vector RAd-thymulin.

La aceptación del trasplante de tumores humanos en *nude* ha permitido el desarrollo de investigaciones en cáncer, convirtiéndolos en el primer modelo experimental inmunodeficiente. En la **fig. 19.10** se presenta la construcción del vector RAD-timulina.

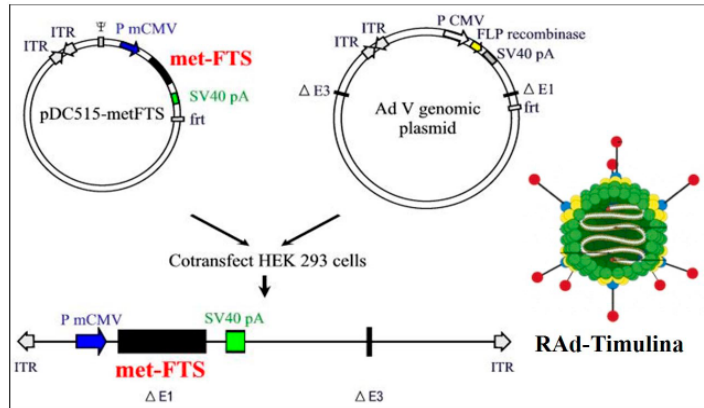


Fig. 19.10. Construcción del vector RAD-timulina (Reggiani y col., 2006).

En la **fig. 19.11** se muestra el diseño experimental que hemos aplicado en ratones *nude* inyectando los vectores adenovirales recombinantes portadores de factor tímico sérico: RAD-FTS o RAD-GFP, portador de proteína fluorescente verde (vector control).

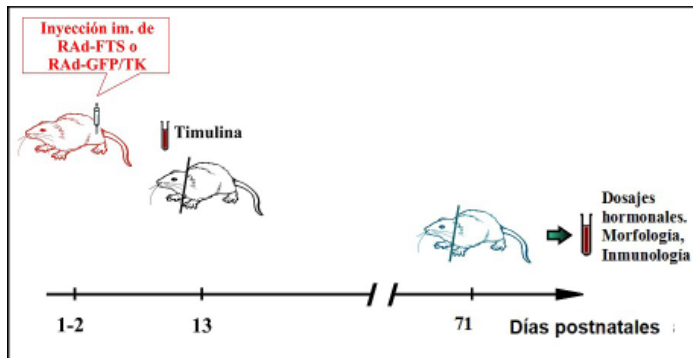


Fig. 19.11. Diseño experimental de TGN con timulina en ratones *nude*. 1-2 días de vida: se inyectó RAD-FTS o RAD-GFP (vector control) y se dosó timulina; 71 días post-natales: dosajes de timulina, estrógeno, progesterona y otros estudios (Reggiani, 2009c).

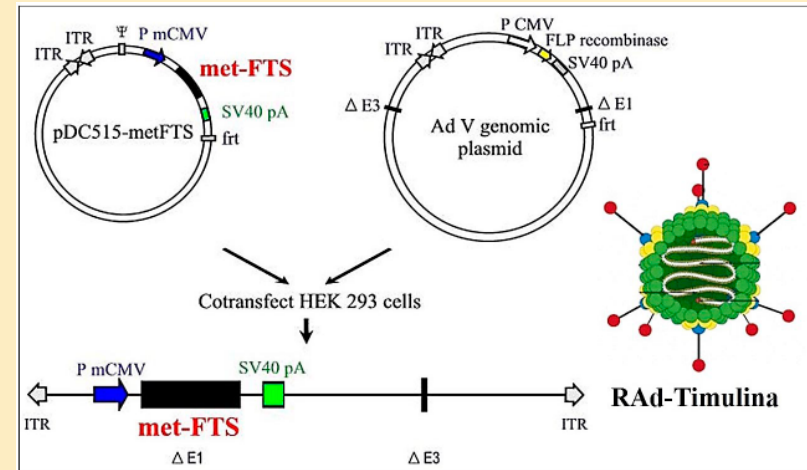


Fig. 19.10. Construction of vector RAD-thymulin (Reggiani y col., 2006).

Figure 19.11 shows our experimental model applied to nude mice which were injected RAD-FTS or RAD-GFP vectors.

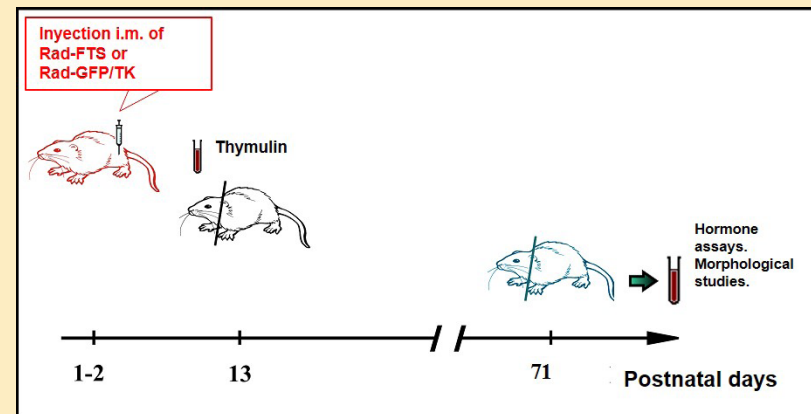


Fig. 19.11. Experimental design of NGT with thymulin in nude mice. 1-2 days old: RAD-FTS or RAD-GFP (control vector) was injected and thymulin was dosed; 71 post-natal days: thymulin, estrogen, progesterone dosages and other studies (Reggiani, 2009c).

A. Eje tímico-gonadotropo: el timo participa en la organización de los centros nerviosos que intervienen en la maduración sexual y la ciclicidad en las hembras (Pierpaoli y col., 1976). En experimentos *in vivo* en ratones heterocigotas y *nude*, se ha observado que la administración de extractos tímicos y de FTS pudo inducir una disminución en la concentración de la hormona liberadora de LH (LHRH) y un aumento variable en los niveles de gonadotrofinas hipofisarias (Strich y col., 1985).

En nuestro estudio la atimia congénita indujo una significativa ($p < 0.05$) reducción en el número de neuronas hipotalámicas productoras de GnRH que ha sido restaurada mediante terapia génica neonatal con timulina. La densidad de axones de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) producidos por las neuronas en la eminencia media y su vecindad fue similar en animales atímicos tratados mediante terapia con timulina, respecto a los controles heterocigotas (Reggiani y col., 2009b).

En estudios *in vitro*, la adición de timulina a fragmentos hipofisarios obtenidos de ratas machos adultas indujo una estimulación en las gonadotrofinas de manera dosis y edad dependiente (Zaidi y col., 1988; Mendoza y Romano, 1989; Hinojosa y col., 1999; Brown y col., 2000). Se ha establecido que la timulina regularía la liberación de gonadotrofinas durante el ciclo estral de la rata, ya que tendría un efecto estimulador sobre la liberación de LH durante todo el ciclo y de FSH durante el diestro 1, pero sería inhibitorio durante el estro. Además, se observó una relación directamente proporcional entre los niveles de progesterona y el efecto de la timulina sobre la liberación de FSH, siendo factible que la progesterona actúe regulando la reactividad de las células hipofisarias a la timulina. Estos resultados sugirieron que la influencia de dicho péptido tímico depende del estado hormonal de los donantes de las pituitarias (Hinojosa y col., 2004).

A nivel ovárico, los ratones *nude* mostraron al nacer un número normal de ovocitos, pero a los 2 meses de vida hubo un marcado descenso del número de folículos y se incrementó la atresia folicular. Además, se ha observado en estos animales una fertilidad reducida y una falla prematura de la función ovárica (Besedovsky y Sorkin, 1974; Rebar y col., 1981a-b). Los ovarios de los ratones *nude* fueron aptos para responder normalmente a la administración

A. Thymus-gonadotrope axis: the thymus participates in organizing the nervous centers for sexual maturity and cyclicity in females (Pierpaoli et al., 1976). In *in vivo* experiments in heterozygous and *nude* mice, it has been observed that the administration of thymic extracts and FTS might induce a decrease in the concentration of the LH releasing hormone (LHRH) and a variable increase in the levels of pituitary gonadotropins (Strich et al., 1985).

In our study, congenital athymia induced a significant ($p < 0.05$) reduction in the number of GnRH-producing pituitary hormones restored with neonatal thymulin gene therapy. The density of the neuronal axons of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) produced by the median eminence and their closeness was similar in athymic animals treated with thymulin therapy compared to heterozygous controls (Reggiani et al., 2009b).

In *in vitro* studies, the addition of thymulin to pituitary fragments obtained from adult male rats induced dose- and age-dependant gonadotropin stimulation (Zaidi et al., 1988; Mendoza and Romano, 1989; Hinojosa et al., 1999; Brown et al., 2000). It has been determined that thymulin would regulate gonadotropin release during the rat estrous cycle, since it would have a stimulatory effect on LH release during the whole cycle and on FSH during diestrous 1, but the effect would be inhibitory during oestrous. Moreover, a directly proportional ratio/relationship has been observed between progesterone levels and the effect of thymulin on FSH release, what makes it possible for progesterone to regulate the reactivity of the thymulin pituitary cells. These results suggested that the influence of this thymic peptide depends on the hormonal state of the pituitary donors (Hinojosa et al., 2004).

At ovarian level, ovaries from *nude* mice were apt to respond normally to the exogenous administration of LH (Pierpaoli and Besedovsky, 1975) and this would suggest that the abnormality caused by athymia would appear at the hypothalamo-pituitary level. In *in vivo* experiments, Hinojosa et al. (1999) documented that the admi-

exógena de LH (Pierpaoli y Besedovsky, 1975) y esto sugeriría que la anomalía ocasionada por la atimia se presentaría a nivel hipotálamo-hipofisario. En experimentos *in vivo*, se ha observado que la administración de timulina previa al tratamiento con gonadotrofina coriónica equina (eCG) indujo un incremento en el peso ovárico y en la tasa de ovulación, efecto que depende de la dosis del metalopéptido y de la edad de los ratones (Hinojosa y col., 1999). En la hembra, la timulina interviene en la función esteroideogénica ovárica, incrementando la actividad de la aromataasa. Además, se observó que los ovarios responden a la timulina mediante un incremento de las gonadotrofinas y de la progesterona (Ledwitz-Rigby y Scheid, 1991).

En nuestro estudio las hembras *nude* homocigotas exhibieron un significativo retraso en la edad de la apertura vaginal y la terapia génica neonatal (TGN) con timulina previno significativamente este retraso. Sin embargo, la edad de apertura vaginal en *nude* atímicos tratados con RAd-FTS mostró un ligero retraso, respecto a ratones controles heterocigotas. Las hembras *nude* heterocigotas de nuestro estudio tuvieron ovarios con folículos en todos los estadios y cuerpos lúteos, mientras los *nude* controles homocigotas hembras mostraron anomalías ováricas múltiples, caracterizadas por un número reducido de folículos antrales (secundarios y terciarios) y cuerpos lúteos, así como un incremento de los folículos atrésicos, comparados con sus contrapartes normales. La TGN con timulina previno la incidencia de alteraciones ováricas en hembras *nude* homocigotas. Los ovarios de ratones *nude* tratados mostraron un buen número de folículos desarrollados, cuerpos lúteos y folículos atrésicos, comparables con los controles heterocigotas (Reggiani y col., 2012b).

Se ha demostrado que la timulina inyectada i.v. en cerdos incrementó las concentraciones circulantes de testosterona. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la timulina aumentaría el efecto estimulador de la LH sobre el incremento de los andrógenos *in vitro* e *in vivo* en los testículos de ratas y cerdos (Wise, 1998; Wise y Ford, 1999). Además, en mujeres con aplasia tímica se mostró la presencia de ovarios alterados (Dunn y col., 1964). Los niveles circulantes de estrógeno y progesterona en adultos *nude* homocigotas hembras estuvieron descendidos respecto a sus contrapartes heterocigotas

nistración de thymulin before the treatment with equine chorionic gonadotropin (eCG) induced an increment in the ovarian weight and in the ovulation rate, effect that depends on the metalopeptide dosis and on the mouse age. In the female, thymulin intervenes in the ovarian steroidogenic function, increasing the activity of the aromataase. Moreover, it has been observed that ovaries respond to thymulin by increasing gonadotropins and progesterone (Ledwitz-Rigby and Scheid, 1991).

In our study, homozygous *nude* females exhibited a significant delay in the vaginal opening and NGT significantly prevented this delay. However, the age for vaginal opening in athymic *nudes* treated with RAd-FTS showed a minor delay compared to heterozygous control mice. The heterozygous *nude* mice of our study had ovaries with follicles in all the stages and corpora lutea. Female *nude* homozygous controls evidenced multiple ovarian abnormalities, characterized by a reduced number of vesicular follicles (secondary and tertiary) and corpora lutea, as well as an increment of atretic follicles, compared with their normal counterparts. NGT prevented the incidence of ovarian alterations in homozygous *nude* mice. Ovaries from treated *nude* mice showed a number of developed follicles, corpora lutea and atretic follicles comparable to heterozygous *nude* controls (Reggiani et al., 2012b).

It has been demonstrated that pigs i.p. injected with thymulin increased their circulating concentrations of testosterone. These results would support the hypothesis that thymulin would increase the stimulating effect of LH on the increment of *in vitro* and *in vivo* androgens in rat and pig testicles (Wise, 1998; Wise and Ford, 1999). Also, women with thymic aplasia evidenced the presence of altered ovaries (Dunn et al., 1964). The circulating levels of estrogen and progesterone in female homozygous *nude* adults were decreased compared to their heterozygous counterparts (Pierpaoli and Besedovsky, 1975) whereas in normal female Tx mice on day 10 after birth estrogen levels were lower than those of their intact counterparts

(Pierpaoli y Besedovsky, 1975), mientras que los ratones hembras normales con Tx de 10 días mostraron menores niveles de estrógenos, respecto sus contrapartes intactas (Alten y Groscurth, 1975). En nuestros controles homocigotas hembras hemos hallado una significativa reducción del estradiol sérico sin cambios en los niveles de progesterona. La TGN con timulina fue parcialmente capaz de prevenir los bajos niveles de estrógenos en homocigotas *nude*, mientras el tratamiento no tuvo efecto significativo en los niveles de progesterona. El efecto preventivo parcial de la TGN con timulina sugiere la función endocrina del timo, contribuyendo a la maduración del sistema reproductivo (Reggiani y col., 2012b).

Nuestro estudio inmunohistoquímico de la TGN con timulina (grupos: RAd-GFP y RAd-FTS: heterocigotas y homocigotas) muestra un aumento del número de folículo tropas y de su tamaño celular (fig. 19.12).

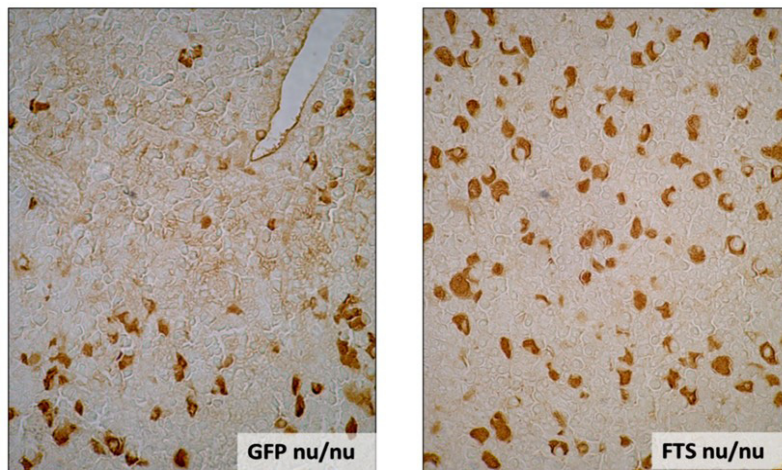


Fig. 19.12. Población folículo tropa. RAd-GFP y RAd-FTS
(EnVision peroxidasa, anti-FSH, x 400).

El análisis morfométrico de la población folículo tropa muestra un aumento en el tamaño celular (TC) ($p < 0.01$ - $p < 0.05$), en la densidad de volumen (DV) ($p < 0.05$) y en densidad de células (DC) ($p < 0.01$ - $p < 0.05$) en ratones *nude* atímicos de ambos sexos cuando se compara con las contrapartes heterocigotas (fig. 19.13).

(Alten and Groscurth, 1975). In female homozygous control we have found a significant reduction of serum estradiol with no changes in progesterone levels. NGT was partially able to prevent low levels of estrogens in nude homozygotes, whereas the treatment had no significant effect in progesterone levels. The partial preventive effect of NGT suggests an endocrine function of thymus contributing to the maturation of the reproductive system (Reggiani et al., 2012b).

Our immunohistochemical study of NGT shows an increase of the number of folliculotropes and of cell size (fig. 19.12).

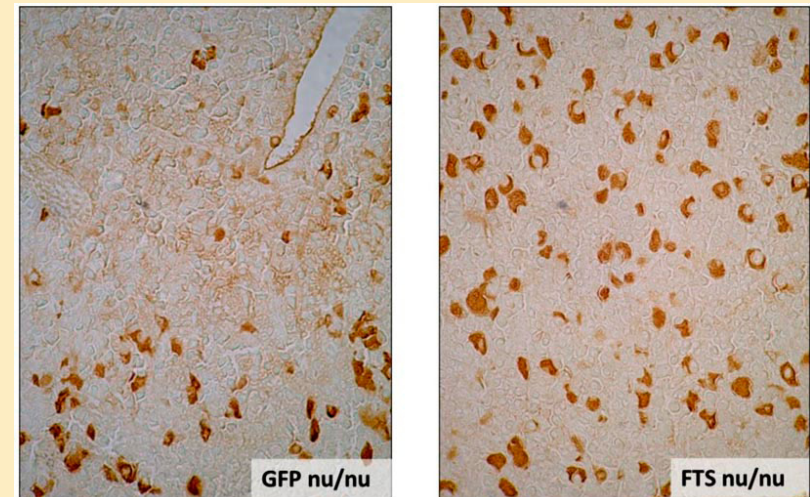


Fig. 19.12. Folliculotrope population. RAd-GFP and RAd-FTS (Peroxidase EnVision, anti-FSH, x 400).

The morphometric analysis of the folliculotrope population shows an increase of cell size (CS) ($p < 0.01$ - $p < 0.05$), volume density (VD) ($p < 0.05$) and cell density (CD) ($p < 0.01$ - $p < 0.05$) in nude athymic mice of both sexes when compared to their heterozygous counterparts (fig. 19.13).

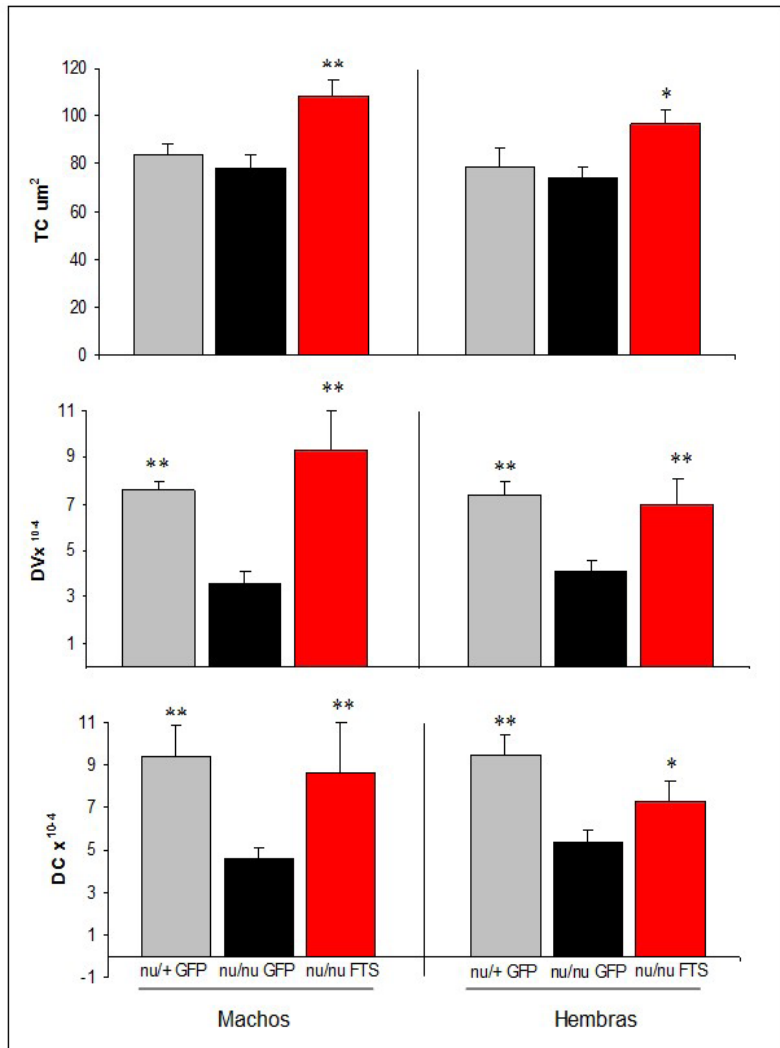


Fig. 19.13. Morfometría de la población foliculotropa. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): nu/+ GFP, nu/nu GFP y nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

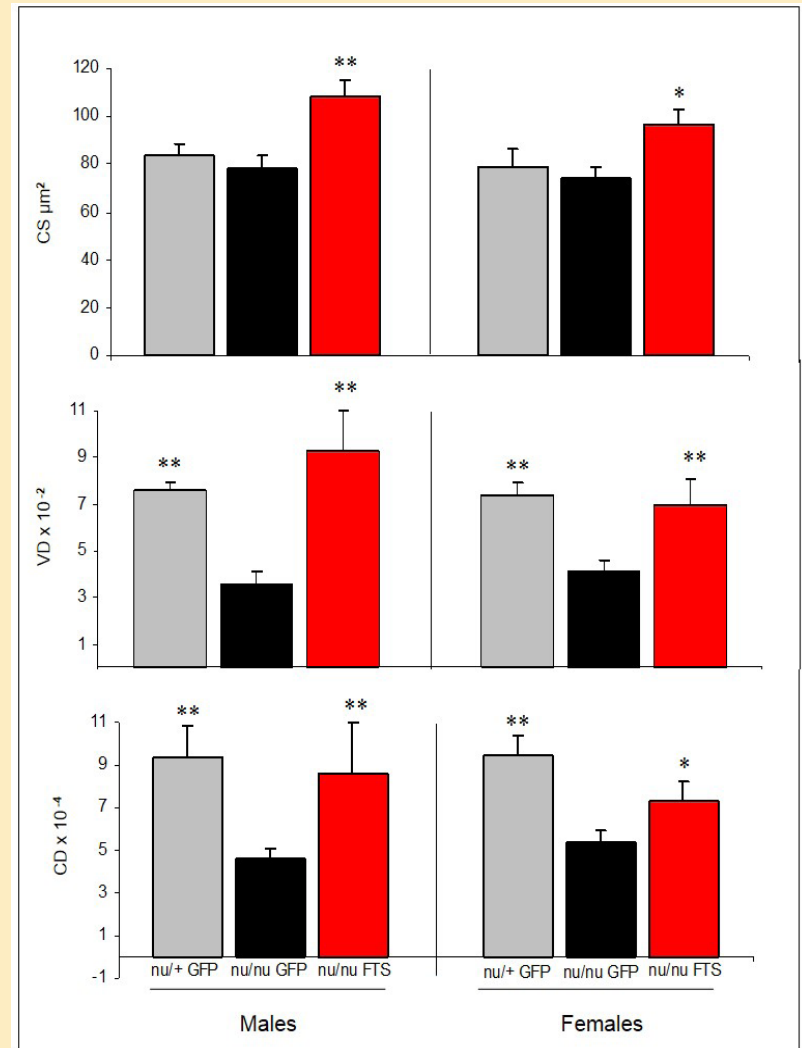


Fig. 19.13. Morphometry of the folliculotrope population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): nu/+ GFP, nu/nu GFP and nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

En la **fig. 19.14** se observa un aumento del número de células luteinizantes, con mayor tamaño celular y en la **fig. 19.15** se muestra la

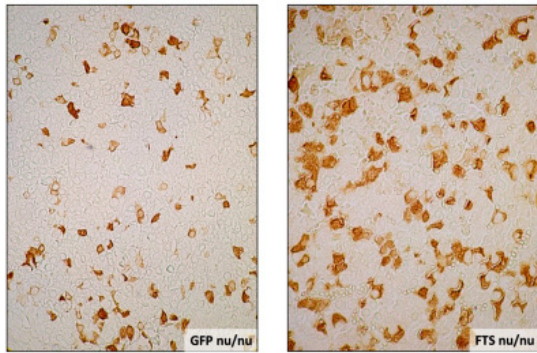


Fig. 19.14. Población luteinizante. Rad-GFP y Rad-FTS (EnVision peroxidasa, anti-LH, x 400).

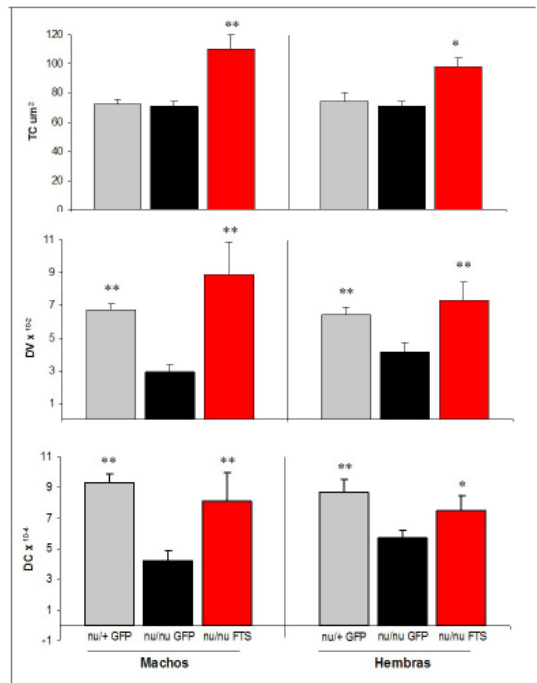


Fig. 19.15. Morfometría de la población luteinizante. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): nu/+ GFP, nu/nu GFP y nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

In **fig 19.14** there is an increase of the number of luteinizing cells, with larger cell size, and in **fig. 19.15** the morphometry of the luteinizing

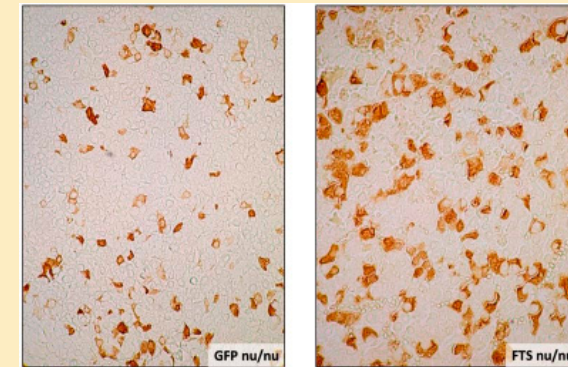


Fig. 19.14. Luteinizing population. Rad-GFP and Rad-FTS (Peroxidase EnVision, anti-LH, x 400).

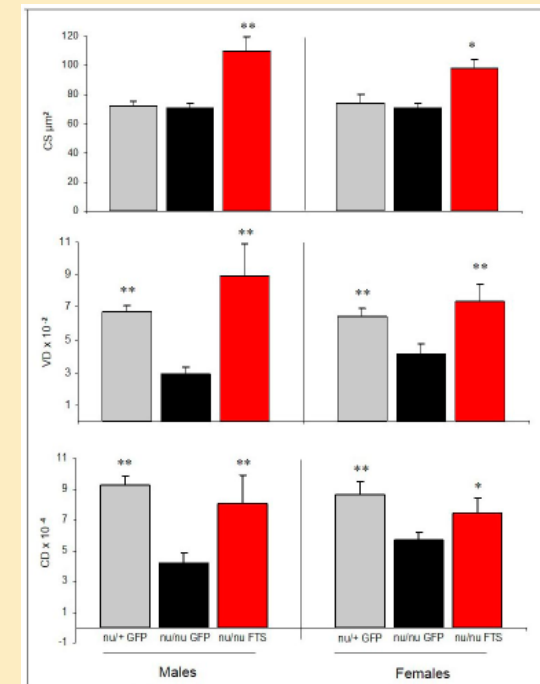


Fig. 19.15. Morphometry of the luteinizing population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): nu/+ GFP, nu/nu GFP and nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

morfometría en la población luteinizante. Se registra un aumento ($p < 0.01$ - $p < 0.05$) en la DC, DV y TC en ratones atímicos *nude* de ambos sexos cuando se compara con las contrapartes heterocigotas.

La TGN con timulina en ratones atímicos restaura los niveles séricos de las gonadotropinas ($p < 0.05$ - $p < 0.01$) de los mutantes luego de la pubertad (fig. 19.16).

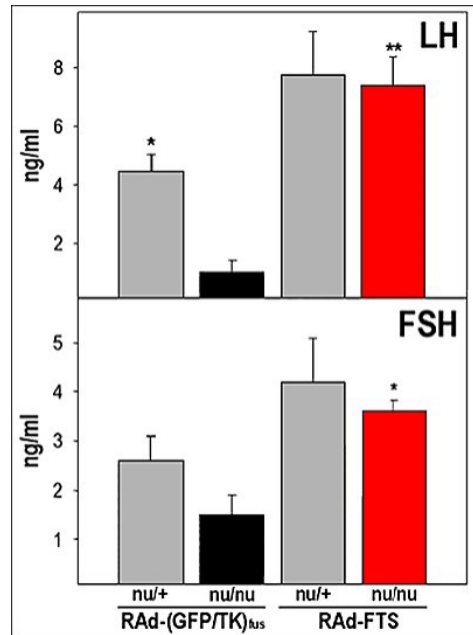


Fig. 19.16. Efectos de la TGN con timulina sobre los niveles séricos de LH-FSH (ng/ml) en ratones *nude* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Por todo lo expuesto, la timulina juega un rol fisiológico relevante en el eje timo-pituitario-gonadal (Goya y col., 2007; Reggiani y col., 2012b).

B. Eje tímico-lactotropo: se ha observado que la presencia del timo es requerida para una normal secreción de PRL y, a la inversa, la PRL es necesaria para la generación de células T (Pierpaoli y col., 1970). Se han identificado los receptores para PRL en las CET (Dar-

population is shown. An increase ($p < 0.01$ - $p < 0.05$) is reported in CD, VD and CS in nude athymic mice of both sexes when compared with their heterozygous counterparts.

NGT in athymic mice restores the serum levels of gonadotropins ($p < 0.05$ - $p < 0.01$) in mutants after puberty (fig. 19.16).

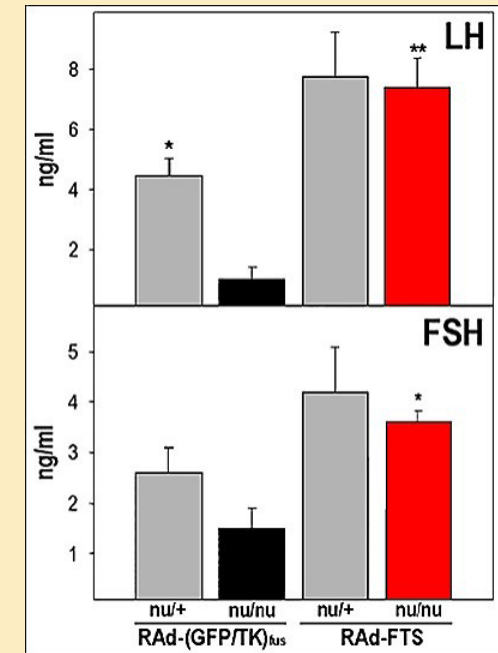


Fig. 19.16. Effects of NGT on serum levels of LH-FSH (ng/ml) in *nude* mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Considering what has been exposed, thymulin plays a relevant physiological role in the thymus-pituitary-gonadal axis (Goya et al., 2007; Reggiani et al., 2012b).

B. Thymus-lactotrope axis: it has been observed that the presence of thymus is required for the normal release of PRL and, on the contrary, PRL is necessary for the generation of T-cells (Pierpaoli et al., 1970). The receptors for PRL have been identified in TEC (Dar-

denne y col., 1981) y se ha observado que la PRL es capaz de estimular la síntesis y secreción de timulina, *in vitro* en las CET e *in vivo* en ratones viejos que poseían bajos niveles de timulina sérica (Dardenne y col., 1989). Más aún, en un modelo de hiperprolactinemia experimental, inducida por inyecciones repetidas de PRL, se observó un incremento de los niveles de timulina en animales jóvenes y viejos (Savino y Dardenne, 2000).

Por otra parte, se le ha otorgado a la PRL un rol importante en la función de los LT (Hadden, 1992; Pierpaoli y col., 1976). Algunos investigadores sugirieron que la PRL, a través de células productoras de IL-1, actuaría sobre las CET, promoviendo su proliferación y aumentando la secreción de timulina (Hadden, 1992).

Nuestra inmunomarcación muestra lactotropas con aumento significativo del tamaño celular y no significativo del número de células, por lo que la TGN con RAD-FTS previno las alteraciones morfológicas de los ratones *nude* jóvenes (**fig. 19.17**) (Martines y col., 2013).

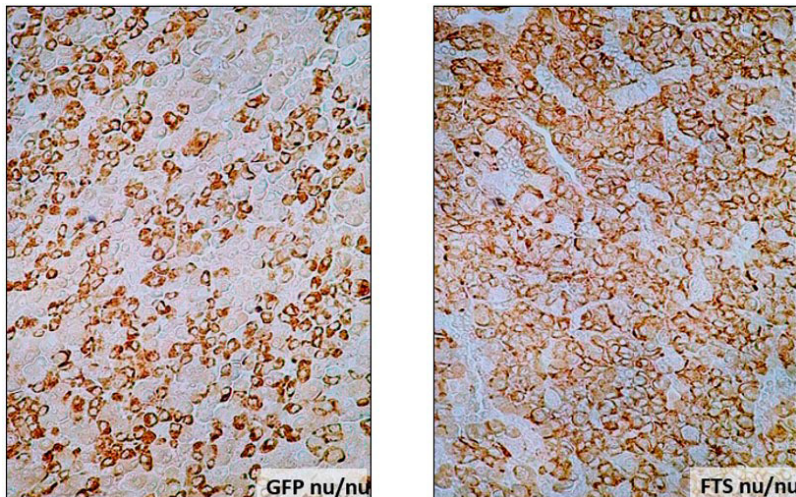


Fig. 19.17. Población lactotropa. RAD-GFP y RAD-FTS (EnVision peroxidasa, anti-PRL, x 400).

denne et al., 1981) and it has been observed that PRL is capable of stimulating the synthesis and release of thymulin, *in vitro* in TEC and *in vivo* in old mice that possessed low levels of serum thymulin (Dardenne et al., 1989). Moreover, in a model of experimental hyperprolactinemia, induced by repeated injections of PRL, an increment was observed in the thymulin levels in young and old animals (Savino and Dardenne, 2000).

On the other hand, PRL has been given an important role in the function of LT (Hadden, 1992; Pierpaoli et al., 1976). Some researchers suggested that PRL, through IL-1-producing cells, would affect TEC, promoting their proliferation and increasing the release of thymulin (Hadden, 1992).

Our immunohistochemistry shows lactotropes with significant increase of cell size, but not significant of cell number, showing that NGT with RAD-FTS prevented morphological alterations of young *nude* mice (**fig. 19.17**) (Martines et al., 2013).

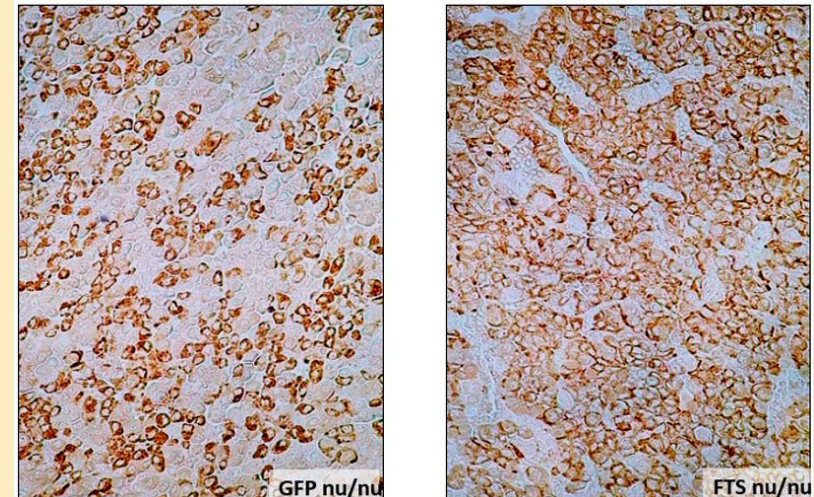


Fig. 19.17. Lactotrope population. RAD-GFP and RAD-FTS (Peroxidase EnVision anti-PRL, x 400).

Los ratones *nude* sometidos a TGN muestran un aumento significativo ($p < 0.01-0.05$) del TC y de la DV y un aumento no significativo de la DC en la población lactotropa de ratones inyectados con RAD-FTS respecto a los animales inyectados con el vector control (RAD-GFP) (fig. 19.18).

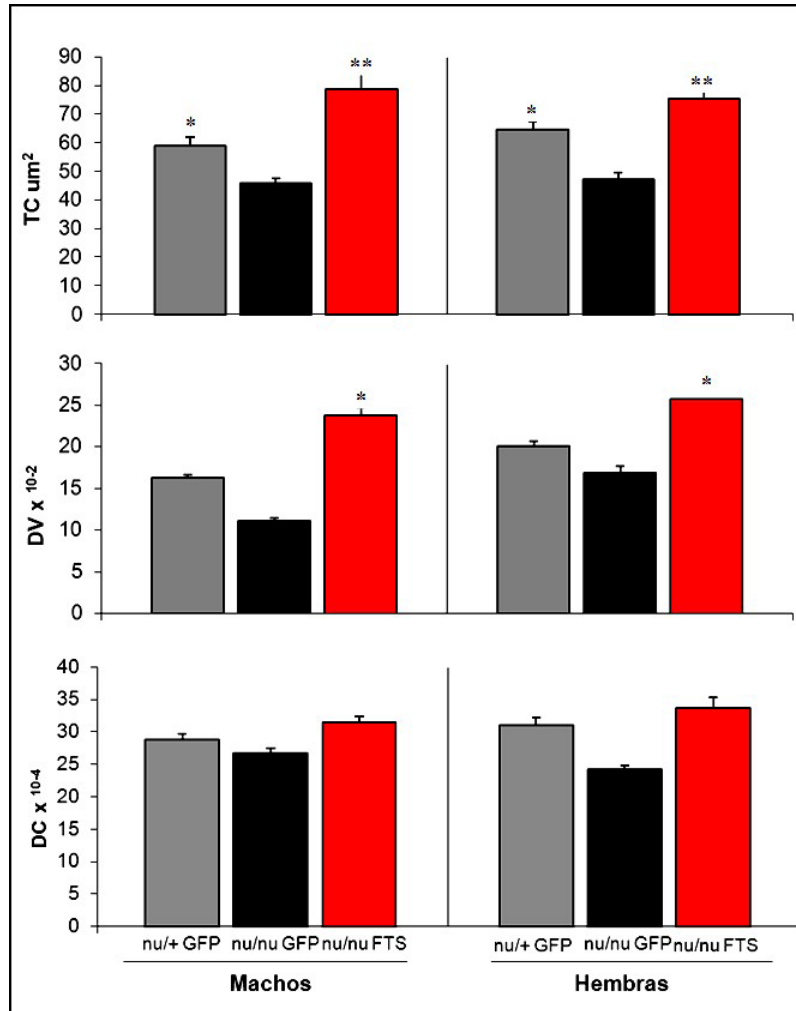


Fig. 19.18. Morfometría de la población lactotropa. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): nu/+ GFP, nu/nu GFP y nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

Nude mice submitted to NGT evidence a significant increase ($p < 0.01-0.05$) of CS and VD, and a non-significant increase of CD in the lactotrope population of Rad-FTS-injected mice compared to the animals injected with the control vector (RAD-GFP) (fig. 19.18).

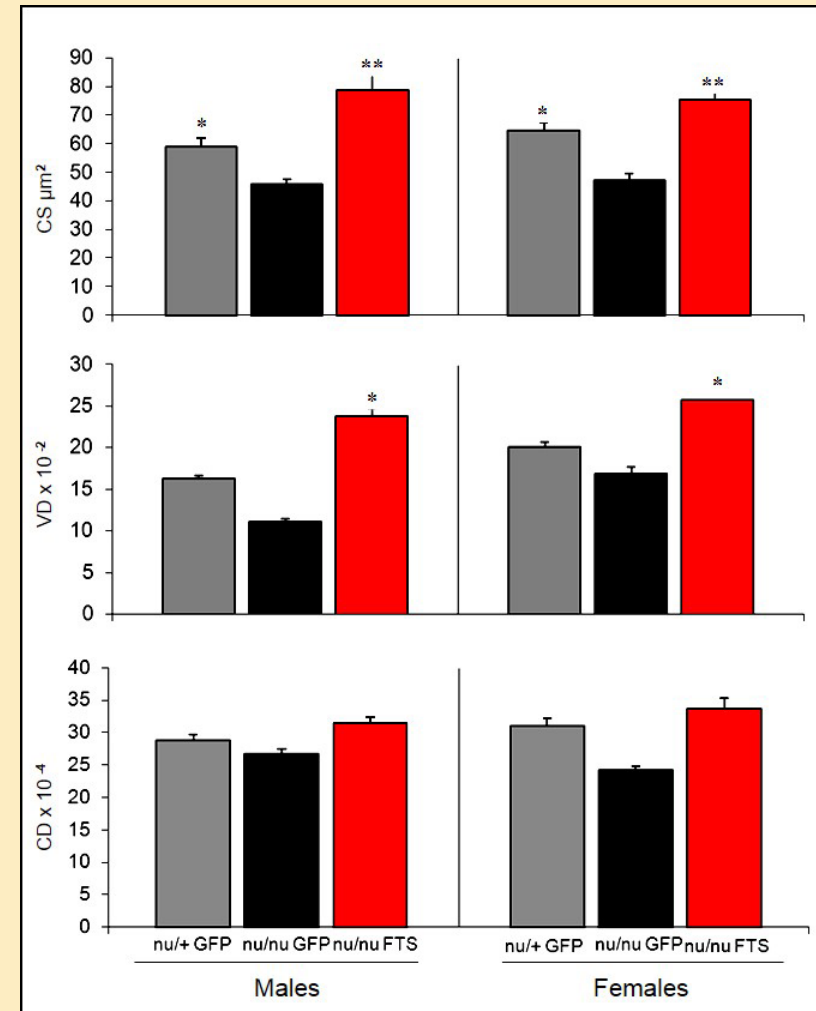


Fig. 19.18. Morphometry of the lactotrope population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): nu/+ GFP, nu/nu GFP and nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

C. Eje tímico-somatotropo: se ha observado que las fluctuaciones en los niveles de la GH modularían la síntesis y la secreción de la timulina.

En perros viejos tratados con la GH bovina se observó una restauración parcial de los bajos niveles de timulina (Goff y col., 1987). En ratones viejos, el tratamiento con GH ovina incrementó sus bajos niveles de timulina (Goya y col., 1992) y en ratas viejas, el tratamiento combinado de GH y T₄ fue capaz de restaurar parcialmente los bajos niveles de timulina (Goya y col., 1993).

La hipofisectomía en ratas condujo a una intensa, aunque transitoria, disminución de los niveles séricos de timulina. En estudios clínicos, los niños con producción deficiente de GH congénita presentaron bajos niveles de timulina sérica y cuando se los trató con GH se logró su restauración a valores normales, los cuales se correlacionaron con las cantidades de IGF-I circulantes (Mocchegiani y col., 1990b y 1996).

La GH humana recombinante estimuló la liberación de timulina a partir de las CET con receptores para dicha hormona (Ban y col., 1991). Los pacientes acromegálicos mostraron elevados niveles de la timulina sérica que se correlacionaron con niveles elevados de IGF-I, respecto a controles sanos y se observó que el efecto de la GH podía ser bloqueado con el agregado de anticuerpos contra IGF-I y contra el receptor de IGF-I, lo que ha llevado a postularlo como un posible mediador de los efectos de la GH sobre las CET (Timsit y col., 1992).

La inmunomarcación de las somatotropas muestra en la TGN con Rad-FTS un aumento del número de células y ligero incremento del tamaño celular, por lo que podemos sugerir que previno las alteraciones morfológicas detectadas en los ratones homocigotas *nude* (**fig. 19.19**) (Reggiani y col., 2012a).

Los ratones *nude* sometidos a TGN muestran un aumento significativo ($p < 0.01-0.05$) de la DC y de la DV y un ligero aumento no significativo del TC en la población somatotropa de ratones inyectados con Rad-FTS, respecto a los animales inyectados con el vector control (Rad-GFP) (**Fig. 19.20**).

C. Thymus-somatotrope axis: it has been noticed that the fluctuations in the GH levels would modulate the synthesis and secretion of thymulin. In old dogs treated with bovine GH a partial restoration of low levels of thymulin was observed (Goff et al., 1987). In old mice, the treatment with ovine GH increased their low levels of thymulin (Goya et al., 1992), whereas in old rats, the GH and T₄ combined treatment was capable of partially restoring the low levels of thymulin (Goya et al., 1993). Hypophysectomy in rats led to an intense, although transitory, decrease of thymulin serum levels.

Clinical studies revealed that children with deficient production of congenital GH presented low levels of serum thymulin and when treated with GH they were restored to normal values, which were correlated with the amount of circulating IGF-I (Mocchegiani et al., 1990b; 1996). Patients with acromegaly evidenced high levels of serum thymulin that correlated with high levels of IGF-I, compared to healthy controls (Timsit et al., 1992).

Recombinant human GH stimulated thymulin release from TEC with receptors for such hormone (Ban et al., 1991). Also, in these experiments it was observed that the effect of GH might be blocked by adding an anti-IGF-I antibody and an anti-IGF-I receptor antibody. This suggests it is a possible mediator of the effects of GH on TEC (Timsit et al., 1992).

The immunochemistry of somatotropes shows an increase of the number of cells and a slight increase of the cell size. NGT (RAD-FTS) prevented the morphologic alterations detected in *nude* homozygous mice (**fig. 19.19**) (Reggiani et al., 2012a).

Nude mice submitted to NGT show a significant increase ($p < 0.01-0.05$) of CD and VD and a slight nonsignificant increase of CS in the somatotrope population of mice injected with Rad-FTS compared to those animals injected with the control vector (RAD-GFP) (**fig. 19.20**).

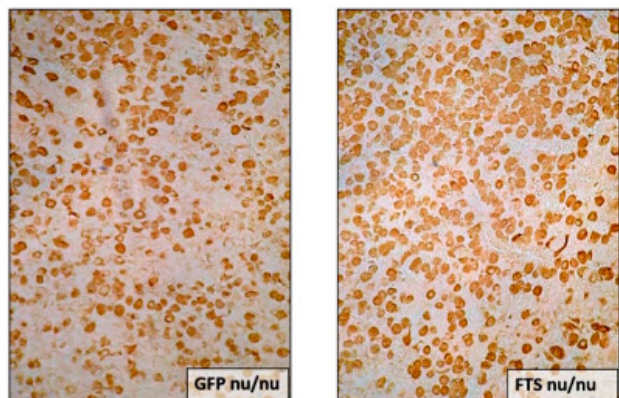


Fig. 19.19. Población somatotropa. *Rad-GFP* y *Rad-FTS* (*EnVision* peroxidasa, anti-GH, x 400).

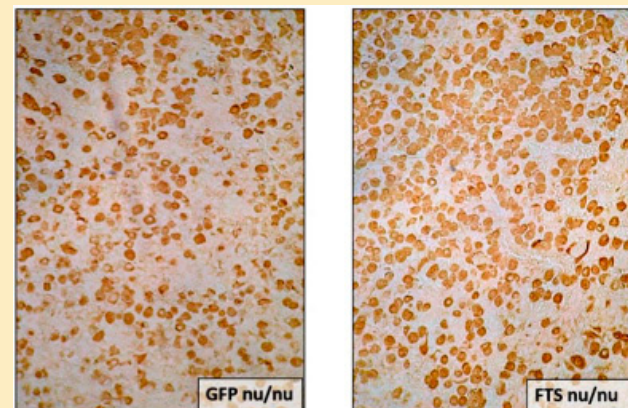


Fig. 19.19. Somatotrope population. *Rad-GFP* and *Rad-FTS* (*EnVision*, anti-GH, x 400).

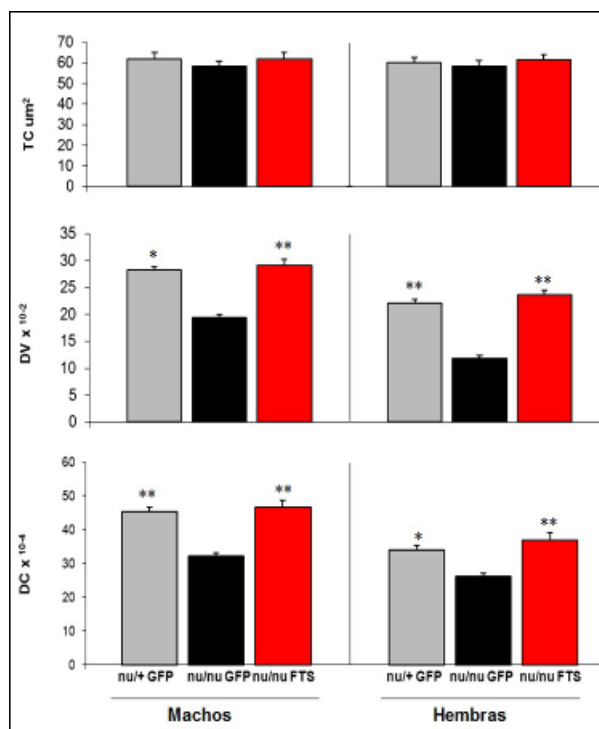


Fig. 19.20. Morfometría de la población somatotropa. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): nu/+ GFP, nu/nu GFP y nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

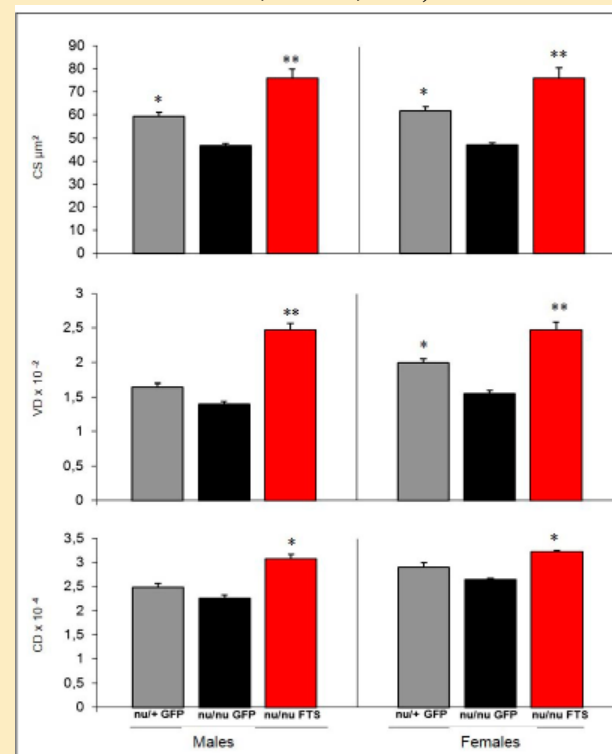


Fig. 19.20. Morphometry of the somatotrope population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): nu/+ GFP, nu/nu GFP and nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

D. Eje tímico-corticotropo: se han hecho contribuciones al estudio de la conexión entre el timo y el eje adrenal que muestran que los corticoides afectan el tamaño y la histología tímica.

Los factores hipotalámicos serían capaces de influir en la producción de la timulina mediante una acción directa sobre la actividad endocrina de las CET. En efecto, se ha observado que el tratamiento i.p. de ratones seniles con extractos hipotalámicos provenientes de ratones jóvenes corrigió el déficit de los niveles de la timulina sérica (Folch y col., 1986).

Se ha observado que la timulina estimuló la liberación de ACTH en fragmentos hipofisarios incubados de rata por una acumulación intracelular de AMPc y GMPc (Hadley y col., 1997) y que tal incremento fue dosis dependiente (Buckingham y col., 1992). La Tx neonatal en ratones normales desarrolló una inmunodeficiencia severa y alteraciones degenerativas en las glándulas adrenales que pudieron ser prevenidas mediante injertos tímicos neonatales (Pierpaoli y Sorkin, 1972). Una preparación tímica bovina estimuló la secreción en las células corticotropas (Farah y col., 1987). Un aumento en la liberación de ACTH, por ejemplo, en el pico del ciclo circadiano o durante una cirugía, coincidió con un aumento de la liberación de timulina (Safieh-Garabedian y col., 1992).

La adrenalectomía (Ax) en animales provocó una hiperplasia tímica (Fisher, 1964) y de manera inversa, la Tx disminuyó los niveles de ACTH/corticoesterona sérica en ratas recién nacidas (Deschaux y col., 1979) y de ACTH/ β -endorfinas en monos jóvenes (Healy y col., 1983). La Ax en machos y hembras, produjo una disminución transitoria de los niveles de timulina sérica, mientras que la Ax junto con la gonadectomía, produjo una disminución más prolongada (3 a 6 meses) de la timulina sérica (Dardenne y col., 1986). La terapia de reemplazo con extractos tímicos en animales Tx no sólo restauró la función inmune, sino que también normalizó los niveles de ACTH y corticoesterona (Deschaux y col., 1979). Hubo un aumento de la concentración de ti-

D. Thymus-corticotrope axis: some contributions to the study of the connection between the thymus and the adrenal axis show that corticoids affect the size and histology of the thymus. The hypothalamic factors might affect the production of thymulin via a direct action on the endocrine activity of TEC. In effect, it has been observed that the i.p. treatment of senescent mice with pituitary extract from young mice corrected the deficit of the levels of serum thymulin (Folch et al., 1986).

Thymulin has been observed to stimulate ACTH release in incubated pituitary fragments of rat by an intracellular accumulation of AMPc and GMPc (Hadley et al., 1997) and that such increase was dose-dependent (Buckingham et al., 1992).

Neonatal Tx in normal mice developed a severe immunodeficiency and degenerative alterations in the adrenal glands that were prevented with neonatal thymic grafts (Pierpaoli and Sorkin, 1972). A bovine thymic preparation stimulated the release in corticotrope cells (Farah et al., 1987). An increase in ACTH release, for example, in the peak of the circadian cycle or during surgery, coincided with an increased thymulin release (Safieh-Garabedian et al., 1992). Adrenalectomy (Ax) in animals caused a thymic hyperplasia (Fisher, 1964) and on the contrary, Tx decreased serum ACTH/corticosterone levels in newborn rats (Deschaux et al., 1979) and ACTH/ β -endorphins in young monkeys (Healy et al., 1983). Ax in males and females, produced a transitory decrease of serum thymulin levels, whereas Ax together with gonadectomy, caused a longer decrease of serum thymulin (3 to 6 months) (Dardenne et al., 1986). Replacement therapy with thymic extracts in Tx animals not only restored the immune function but also normalized the ACTH and no corticosterone levels (Deschaux et al., 1979). An increased concentration of thymulin appeared in the cell supernatants when TEC cultures were exposed to physiologic levels of glucocorticoids, estradiol, progesterone or testosterone (Savino et al., 1988).

mulina en los sobrenadantes celulares cuando los cultivos de CET se expusieron a niveles fisiológicos de glucocorticoides, estradiol, progesterona o testosterona (Savino y col., 1988).

En la **fig. 19.21** se observan las células corticotropas inmunomarcadas que corresponden a los campos representativos de la histometría realizada y puede verse el aumento del número de las corticotropas y de su tamaño celular (Martines y col., 2011b).

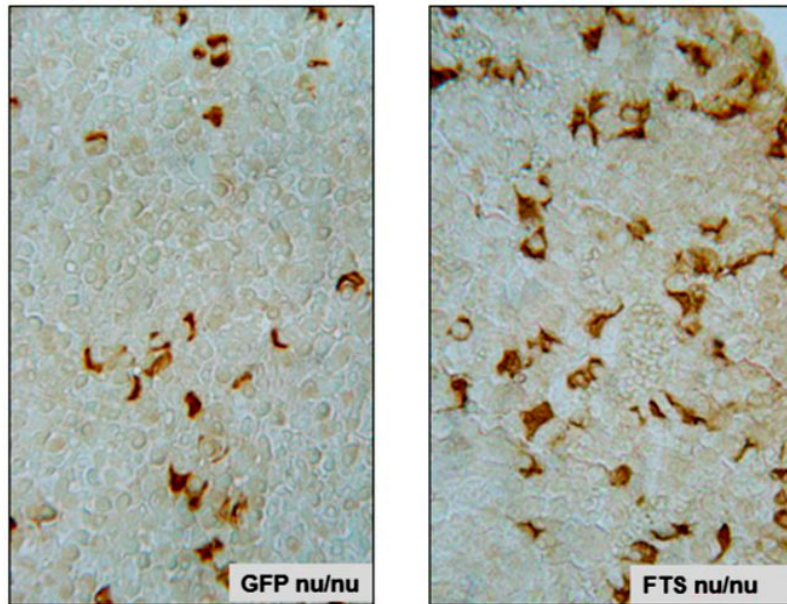


Fig. 19.21. Población corticotropa. *RAd-GFP y RAd-FTS (EnVision peroxidasa, anti-ACTH, x 400).*

La morfometría de la población corticotropa muestra un aumento en la DC ($p < 0.05$), el TC ($p < 0.01$) y la DV ($p < 0.01$) de la población corticotropa en ratones nu/nu de ambos sexos, respecto a los animales inyectados con vector control (**fig. 19.22**) (Martines y col., 2011b).

Los presentes resultados sugieren que la atimia congénita puede tener un impacto marginal sobre la morfología y el número de corti-

In **fig. 19.21** immunostained corticotropes showing the representative fields of the morphometry performed can be observed and the increase of the number of cells and of cell size can be also seen (Martines et al., 2011b).

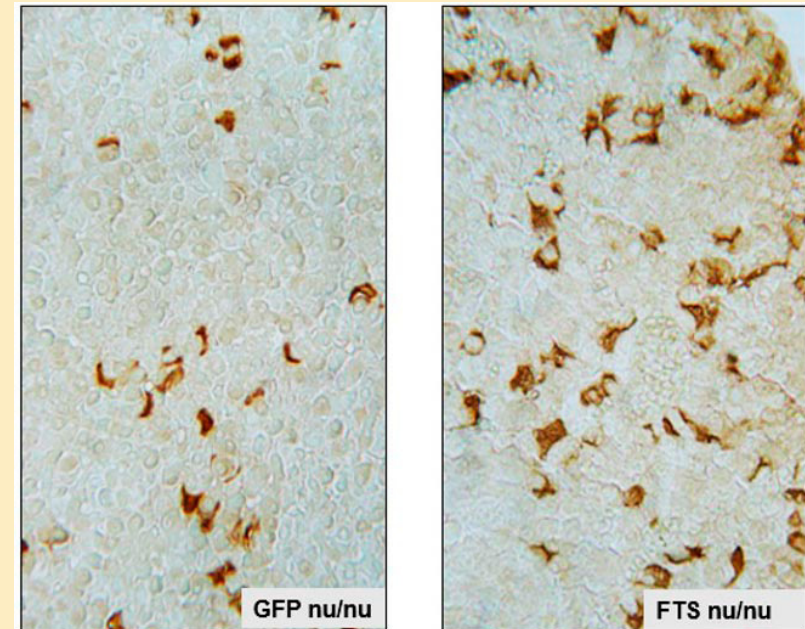


Fig. 19.21. Corticotrope population. *RAd-GFP and RAd-FTS (EnVision, anti-ACTH, x 400).*

The present results suggest that congenital athymia can only have minor impact on the morphology and number of corticotropes, as well as on the contents of hypothalamic CRH and adrenal corticosterone. It is worth noting that NGT determined an increment in the number and size of corticotropes in heterozygous and homozygous *nude* mice.

This increase is in agreement with the ACTH releasing activity of *in vitro* thymulin (Hadley et al., 1997), as well as with ACTH release

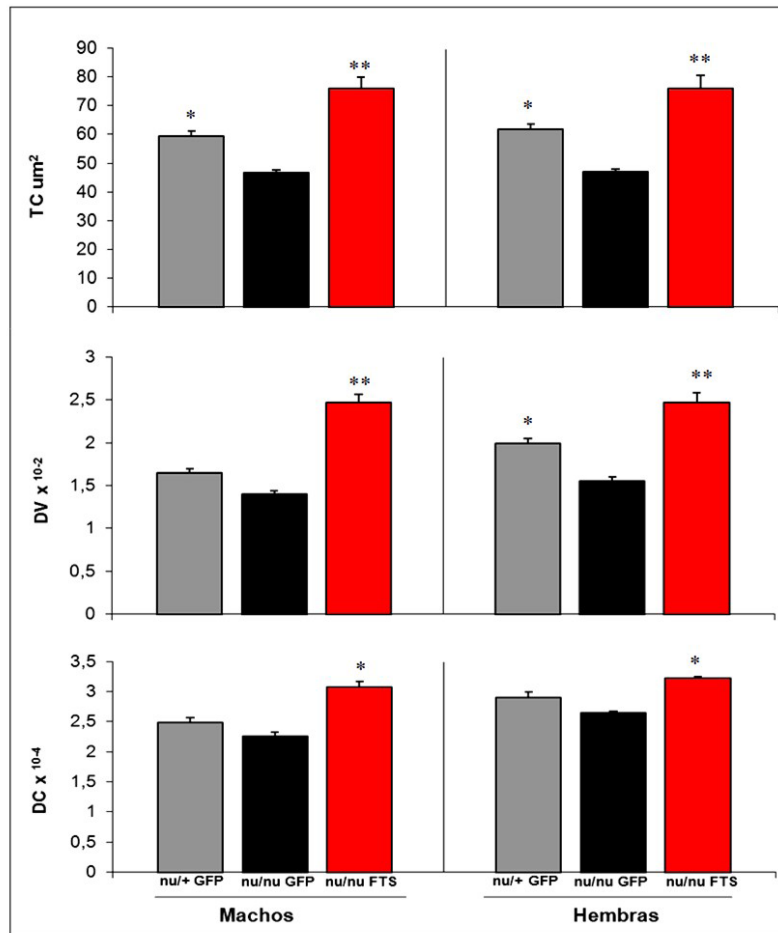


Fig. 19.22. Morfometría de la población corticotropa. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): *nu/+ GFP*, *nu/nu GFP* y *nu/nu FTS*, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

cotropas, así como sobre el contenido del CRH hipotalámico y de la corticosterona adrenal.

Es de interés remarcar que la TGN determinó un incremento en el número y tamaño de las corticotropas en ratones *nude* heterocigotas y homoci-

in induced stress and in the in vitro pituitary response to CRH that was significantly lower in *nude* Swiss mice compared to controls (Daneva et al., 1995; Gaillard et al., 1998).

The morphometry of the corticotrope population shows an increase in the CD ($p < 0.05$), CS ($p < 0.01$) and VD ($p < 0.01$) of the corticotrope population in *nu/nu* mice of both sexes compared to animals injected with the control vector (fig. 19.22) (Martines et al., 2011b).

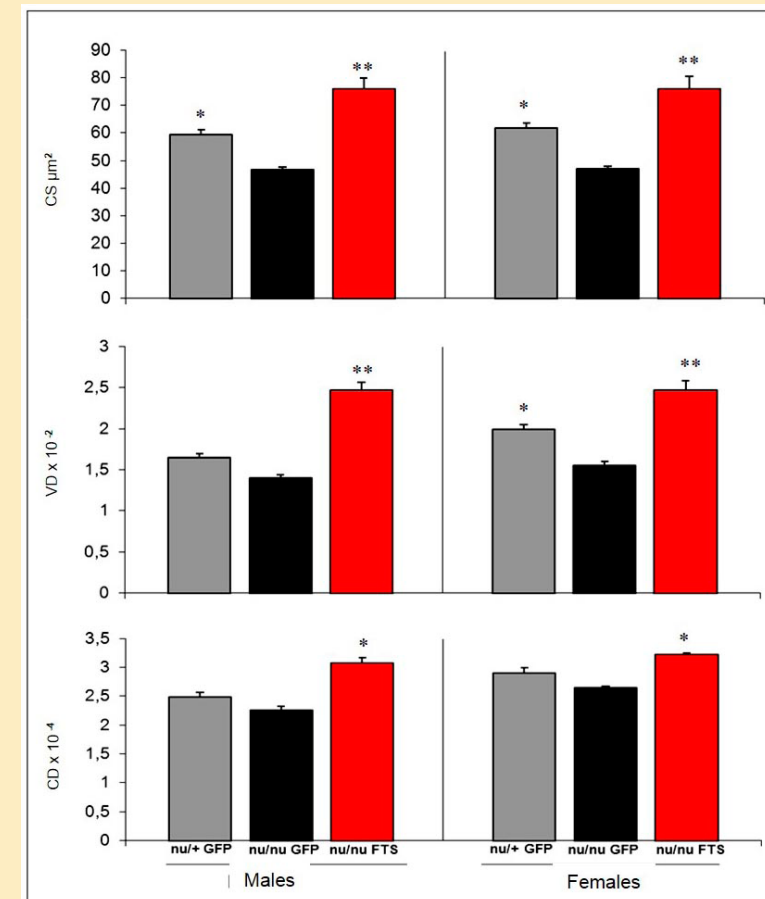


Fig. 19.22. Morphometry of the corticotrope population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): *nu/+ GFP*, *nu/nu GFP* and *nu/nu FTS*, ** $p < 0.01$ -* $p < 0.05$.

gotas. Este aumento concuerda con la actividad de la timulina *in vitro* como liberadora de ACTH (Hadley et al., 1997), en el estrés inducido y en la respuesta pituitaria *in vitro* a la CRH que fue significativamente menor en *nude* Swiss, respecto a ratones controles (Daneva et al., 1995; Gaillard et al., 1998).

E. Eje tímico-tirotrópo: hay evidencias de la existencia de una interrelación bidireccional entre la glándula tímica y el eje tiroideo. La tiroidectomía en rata causó reducción tímica y una marcada inmunodepresión (Fabris, 1973). Se ha comunicado que en los ratones machos *nude* CD-1, la TSH y tiroxina respondieron al estrés por inmovilización y frío con una menor respuesta y bajos niveles séricos basales de dichas hormonas (Goya y col., 1995). La timulina estimuló la liberación de la TSH en células pituitarias a dosis de 10^{-8} a 10^{-3} M y este efecto estimulador de la timulina declinó con la edad, sugiriendo que el envejecimiento lleva a una desensibilización de la glándula pituitaria a las señales tímicas (Brown y col., 1998). Se ha documentado que la administración de timosina y hormona homeostática tímica inhibieron la secreción de tirotrófina en ratas jóvenes, pero no en animales viejos (Goya y col., 1987). Las hormonas tiroideas también modularon la secreción de timulina y se ha detectado que el tratamiento *in vivo* con T_3 , indujo en CET de ratones y ratas jóvenes un incremento en los niveles de timulina sérica y en el número de células que contienen timulina. El efecto opuesto pudo evidenciarse con la administración de un inhibidor de la síntesis de hormonas tiroideas: el tiouracilo (Savino y col., 1984).

Los pacientes con hipertiroidismo exhibieron niveles elevados de la timulina en suero y los portadores de hipotiroidismo mostraron niveles disminuidos de la timulina sérica (Fabris y col., 1986).

En estudios *in vitro*, se observó que las hormonas tiroideas estimularon la secreción de timulina por una acción directa sobre las CET (Mocchegiani y col., 1990a; Villa-Verde y col., 1993). Además, se ha documentado que en animales viejos que presentaron niveles bajos de timulina sérica, el tratamiento con T_4 pudo revertir esta deficiencia (Fabris y col., 1989; Villa-Verde y col., 1993).

E. Thymus-thyrotrope axis: there is evidence of a bidirectional interrelation between thymic gland and thyroid axis. Thyroidectomy in rats caused thymic reduction and marked immunodepression (Fabris, 1973). It has been reported that in CD-1 *nude* male mice, TSH and thyroxine responded to immobilization stress and cold stress with a weaker response and lower basal serum levels of such hormones (Goya et al., 1995). Thymulin stimulated TSH release in pituitary cells in 10^{-8} to 10^{-3} M doses. This stimulatory effect of thymulin declined with age, suggesting that aging leads to a desensitization of the pituitary gland to the thymic signals (Brown et al., 1998). The administration of thymosin and thymic homeostatic hormone has been reported to inhibit thyrotropin release in young rats, but not in old animals (Goya et al., 1987). Thyroid hormones also modulate thymulin secretion. The *in vivo* treatment with T_3 has been detected to induce in TEC from mice and young rats an increment in the levels of serum thymulin and in the number of that contain thymulin. The opposite effect could be evidenced with the administration of an inhibitor of the synthesis of thyroid hormones, thiouracil (Savino et al., 1984). In old mice, the injection of T_4 increased the levels of serum thymulin to values similar to those of young animals. Patients with hyperthyroidism exhibited high levels of serum thymulin and hypothyroidism carriers showed diminished levels of serum thymulin (Fabris et al., 1986). In *in vitro* studies, it was observed that thyroid hormones stimulated thymulin secretion via a direct action on TEC (Mocchegiani et al., 1990a; Villa-Verde et al., 1993). Also, old animals that presented low serum thymulin levels were reported to reverse this deficiency with T_4 treatment (Fabris et al., 1989; Villa-Verde et al., 1993). Immunostained thyrotropes presented a granular cytoplasmic pattern. The representative fields of the immunohistochemistry performed can be seen in **fig. 19.23**, which shows an increase in the number of cells and cell size (Martines et al., 2011a).

Las tirotropas inmunomarcadas presentan un patrón citoplasmático granular y los campos representativos de la histometría realizada pueden verse en la **fig. 19.23**, que muestra un aumento del número de células y de su tamaño celular (Martines y col., 2011a).

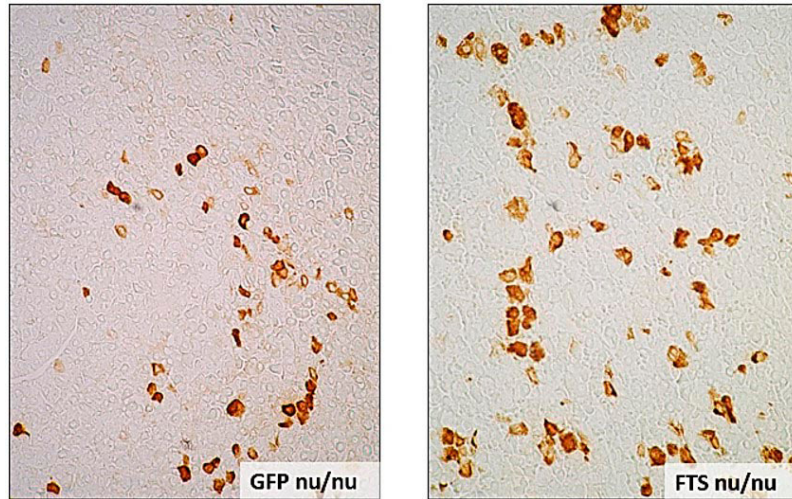


Fig. 19.23. Población tirotropa. *RAAd-GFP y RAAd-FTS (EnVision peroxidasa, anti-TSH, x 400).*

La morfometría de la TGN con timulina registra un aumento de la DC, el TC y la DV ($p < 0.01-0.05$) de la población corticotropa en ratones nu/nu de ambos sexos respecto a los ratones inyectados con vector control (**fig. 19.24**) (Martines y col., 2011a).

En la **fig. 19.25** se observa el efecto del Rad-FTS sobre los niveles séricos de timulina en ratones *nude* homo y heterocigotas de ambos sexos. La administración i.m. del vector RAAd-FTS a ratas indujo niveles suprafisiológicos de timulina bioactiva que permanecieron 112 días en ratones y 320 días en ratas (Reggiani y col., 2006; Morel y col., 2008).

Concluyendo, la terapia génica en los diferentes ejes timo-pituitarios abre nuevas rutas para su potencial aplicación en la terapéutica de diversas entidades nosológicas tímicas.

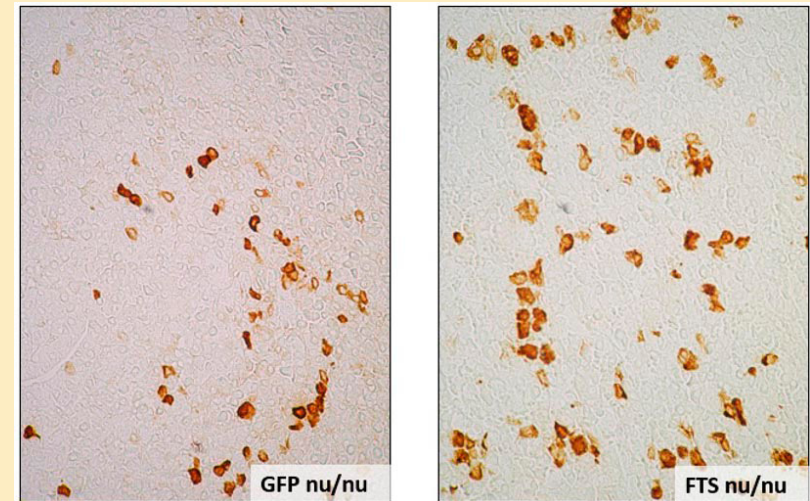


Fig. 19.23. Thyrotrope population. *RAAd-GFP and RAAd-FTS (Peroxidase EnVision, anti-TSH, x 400).*

The use of adenoviral vector l RAAd-FTS injected in the muscle of rats and Tx mice, caused a long term response in the levels of circulating thymulin. The combination of NGT and Rad-FTS managed to restore the levels of serum thymulin.

Morphometry of NGT with thymulin registers an increase of CD, CS and VD ($p < 0.01-0.05$) of the corticotrope population in nu/nu mice of both sexes compared to mice injected with the control vector (**fig. 19.24**) (Martines et al., 2011a).

In **fig. 19.25** the effect of RAAd-FTS can be observed on the thymulin serum levels in homozygous and heterozygous *nude* mice of both sexes.

Vector RAAd-FTS administered i.m. to rats and Tx mice induced supraphysiologic levels of bioactive thymulin that remained 112 days in mice and 320 days in rats (Reggiani et al., 2006; Morel et al., 2008).

To conclude, gene therapy in the different thymus-pituitary axes opens new routes to its potential application in the therapeutics of different nosologic entities.

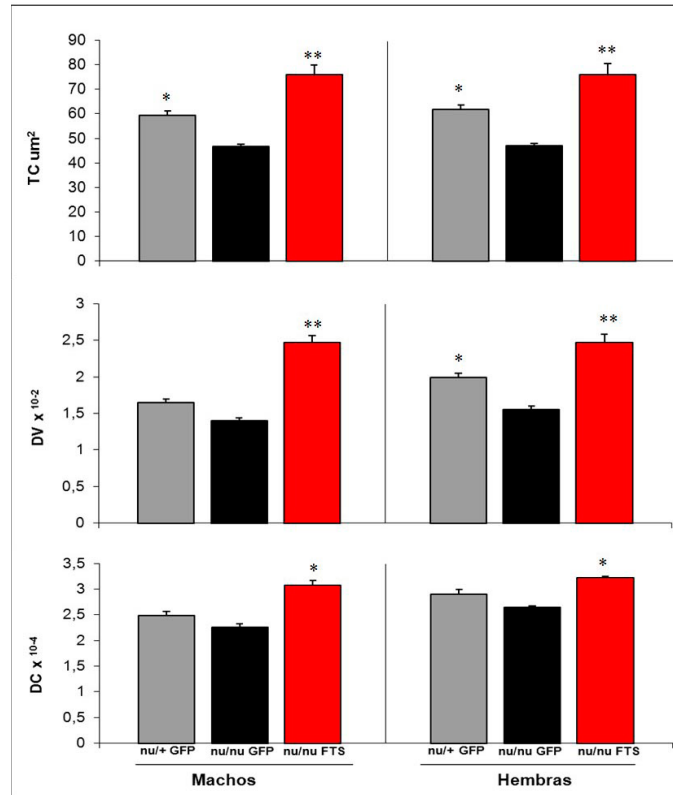


Fig. 19.24. Morfometría de la población tirotrópica. Tamaño celular (TC), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC): nu/+ GFP, nu/nu GFP y nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

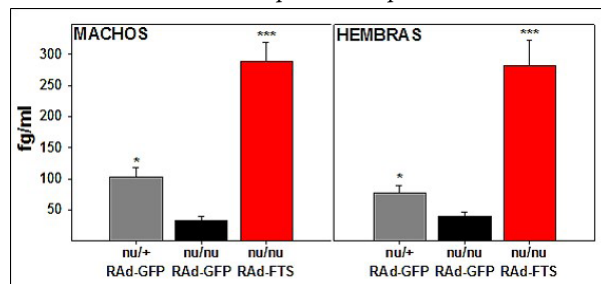


Fig. 19.25. Efecto de la TGN con timulina sobre los niveles séricos de timulina en ratones *nude* homo y heterocigotas de ambos sexos. Los valores de la timulina sérica (fg/ml) se expresaron como la media \pm ES, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

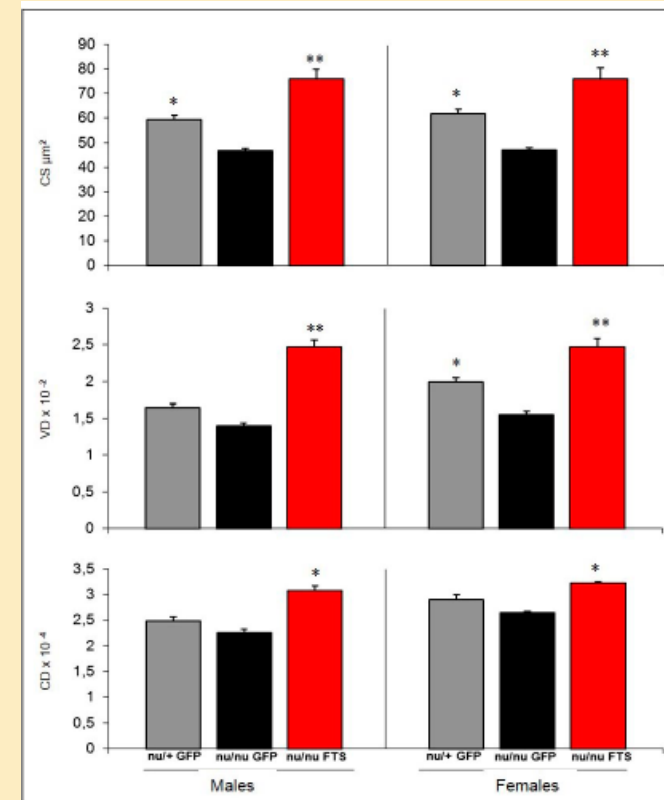


Fig. 19.24. Morphometry of the thyrotrope population. Cell size (CS), volume density (VD), cell density (CD): nu/+ GFP, nu/nu GFP and nu/nu FTS, ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$.

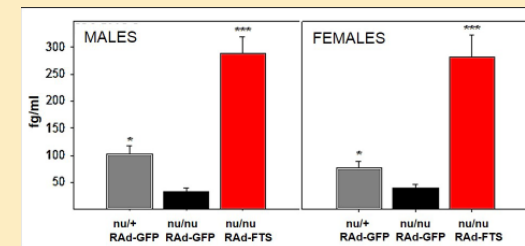


Fig. 19.25. Effect of TNGT on thymulin serum levels in homozygous and heterozygous *nude* mice of both sexes. Serum thymulin values (fg/ml) are expressed as mean \pm ES. Statistical significance compared to controls: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Referencias

- Alten HE, Groscurth P. The postnatal development of the ovary in the "nude" mouse. *Anat Embryol* 1975; 148: 35-46.
- Bach JF. Thymulin (FTS-Zn). *Clin Immunol Allergy* 1983; 3:133-156.
- Bach JF, Dardenne M, Pleau JM, Bach MA. Isolation, biochemical characteristics, and biological activity of circulating thymic hormone in the mouse and in the human. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 249:186-210.
- Bach JF, Dardenne M, Pleau JM. Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature* 1977; 266(5597):55-57.
- Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F, Dardenne M. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci* 1991; 48(22):2141-48.
- Besedovsky HO, Sorkin E. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 1974; 249(455):356-358.
- Brown OA, Sosa YE, Bolognani F, Goya RG. Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech Ageing Dev* 1998; 104(3):249-262.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. 1999. Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* 1999; 69(1):20-27.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol Biol Sci* 2000; 55(4): B170-176.
- Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover PO, Kendall MD. Interactions between the hypothalamo-pituitary adrenal axis and the thymus in the rat: a role for corticotrophin in the control of thymulin release. *J Neuroendocrinol* 1992; 4(3):295-301.
- Camihort G, Luna G, Vesenbeckh S, Ferese C, dardenne M, Goya R, Cónsole G. Morphometric assessment of impact of serum thymulin immunoneutralization on the pituitary cell populations in peripubertal mice. *Cell Tissues Organs* 2006; 184(1):23-30.

References

- Alten HE, Groscurth P. The postnatal development of the ovary in the "nude" mouse. *Anat Embryol* 1975; 148: 35-46.
- Bach JF. Thymulin (FTS-Zn). *Clin Immunol Allergy* 1983; 3:133-156.
- Bach JF, Dardenne M, Pleau JM, Bach MA. Isolation, biochemical characteristics, and biological activity of circulating thymic hormone in the mouse and in the human. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 249:186-210.
- Bach JF, Dardenne M, Pleau JM. Biochemical characterisation of a serum thymic factor. *Nature* 1977; 266(5597):55-57.
- Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F, Dardenne M. Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci* 1991; 48(22):2141-48.
- Besedovsky HO, Sorkin E. Thymus involvement in female sexual maturation. *Nature* 1974; 249(455):356-358.
- Brown OA, Sosa YE, Bolognani F, Goya RG. Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. *Mech Ageing Dev* 1998; 104(3):249-262.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. 1999. Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology* 1999; 69(1):20-27.
- Brown OA, Sosa YE, Dardenne M, Pléau JM, Goya RG. Studies on the gonadotropin-releasing activity of thymulin: changes with age. *J Gerontol Biol Sci* 2000; 55(4):B170-176.
- Buckingham JC, Safieh B, Singh S, Arduino LA, Cover PO, Kendall MD. Interactions between the hypothalamo-pituitary adrenal axis and the thymus in the rat: a role for corticotrophin in the control of thymulin release. *J Neuroendocrinol* 1992; 4(3):295-301.
- Camihort G, Luna G, Vesenbeckh S, Ferese C, Dardenne M, Goya R, Cónsole G. Morphometric assessment of impact of serum thymulin immunoneutralization on the pituitary cell populations in peripubertal mice. *Cell Tissues Organs* 2006; 184(1):23-30.

Charreire J, Bach JF. Binding of autologous erythrocytes to immature T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(8):3201-05.

Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF, Laussac JP. NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *J Biol Chem* 1988; 263(12):5574-80.

Dalmaso AP, Martinez C, Good RA. Cap. 26: Studies of immunologic characteristics of lymphoid cells from thymectomized mice. The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease. In: Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York, 1964:478-491.

Daneva T, Spinedi E, Hadid R, Gaillard RC. Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in Swiss nude athymic mice. *Neuroendocrinology* 1995; 62(1):79-86.

Dardenne M, Kelly PA, Bach JF, Savino W. Identification and functional activity of prolactin receptors in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 8:9700-04.

Dardenne M, Papiernik M, Bach JF, Stutman O. Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. *Immunology* 1974; 27(2):299-304.

Dardenne M, Pleau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J, Bach JF. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(17):5370-73.

Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J, Bach JF. Thymic hormone-containing cells. VII. Adrenals and gonads control the in vivo secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J Immunol* 1986; 136(4):1303-08.

Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 1989; 125(1):3-12.

Charreire J, Bach JF. Binding of autologous erythrocytes to immature T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(8):3201-05.

Cung MT, Marraud M, Lefrancier P, Dardenne M, Bach JF, Laussac JP. NMR study of a lymphocyte differentiating thymic factor. An investigation of the Zn(II)-nonapeptide complexes (thymulin). *J Biol Chem* 1988; 263(12):5574-80.

Dalmaso AP, Martinez C, Good RA. Cap. 26: Studies of immunologic characteristics of lymphoid cells from thymectomized mice. The thymus in immunobiology: structure, function, and role in disease. In: Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York, 1964:478-491.

Daneva T, Spinedi E, Hadid R, Gaillard RC. Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in Swiss nude athymic mice. *Neuroendocrinology* 1995; 62(1):79-86.

Dardenne M, Kelly PA, Bach JF, Savino W. Identification and functional activity of prolactin receptors in thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 8:9700-04.

Dardenne M, Papiernik M, Bach JF, Stutman O. Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the serum thymic factor. *Immunology* 1974; 27(2):299-304.

Dardenne M, Pleau JM, Nabarra B, Lefrancier P, Derrien M, Choay J, Bach JF. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(17):5370-73.

Dardenne M, Savino W, Duval D, Kaiserlian D, Hassid J, Bach JF. Thymic hormone-containing cells. VII. Adrenals and gonads control the in vivo secretion of thymulin and its plasmatic inhibitor. *J Immunol* 1986; 136(4):1303-08.

Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology* 1989; 125(1):3-12.

Deschaux P, Massengo B, Fontanges R. Endocrine interaction of the thymus with the hypophysis, adrenals and testes: effects of two thymic extracts. *Thymus* 1979; 1(1-2):95-108.

Dunn HG, Meuwissen H, Livingstone CS, Pump KK. Ataxia-telangiectasia. *Can Med Assoc J* 1964; 92:1106-18.

Eaton GJ. Hair growth cycles and wave patterns in "nude" mice. *Transplantation* 1976; 22(3):217-222.

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacine F, Pinchera A. Thyroid function modulates thymic endocrine activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(3):474-478.

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F, Pinchera A. Thyroid-thymus interactions during development and aging. *Horm Res* 1989; 31(1-2):85-89.

Fabris N, Pierpaoli W, Sorkin E. Hormones and the immunological capacity. IV. Restorative effects of developmental hormones or of lymphocytes on the immunodeficiency syndrome of the dwarf mouse. *Clin Exp Immunol* 1971; 9(2):227-240.

Fabris N. Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clin Exp Immunol* 1973; 15(4):601-611.

Farah JM, Hall NR, Bishop JF, Goldstein AL, O'Donohue TL. Thymosin fraction 5 stimulates secretion of immunoreactive beta-endorphin in mouse corticotropic tumor cells. *J Neurosci Res* 1987; 18(1):140-146.

Fisher ER. Pathology of the thymus and its relation to human disease. In: Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York, 1964:676-729.

Folch H, Eller G, Mena M, Esquivel P. Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of "facteur thymique serique" level. *Cell Immunol* 1986; 102(1):211-216.

Gaillard R, Daneva T, Hadid R, Muller K, Spinedi E. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis of athymic Swiss nude mice. The implications of T lymphocytes in the ACTH release from immune cells. *Ann NY Acad Sci* 1998; 840:480-490.

Deschaux P, Massengo B, Fontanges R. Endocrine interaction of the thymus with the hypophysis, adrenals and testes: effects of two thymic extracts. *Thymus* 1979; 1(1-2):95-108.

Dunn HG, Meuwissen H, Livingstone CS, Pump KK. Ataxia-telangiectasia. *Can Med Assoc J* 1964; 92:1106-18.

Eaton GJ. Hair growth cycles and wave patterns in "nude" mice. *Transplantation* 1976; 22(3):217-222.

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacine F, Pinchera A. Thyroid function modulates thymic endocrine activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(3):474-478.

Fabris N, Mocchegiani E, Mariotti S, Pacini F, Pinchera A. Thyroid-thymus interactions during development and aging. *Horm Res* 1989; 31(1-2):85-89.

Fabris N, Pierpaoli W, Sorkin E. Hormones and the immunological capacity. IV. Restorative effects of developmental hormones or of lymphocytes on the immunodeficiency syndrome of the dwarf mouse. *Clin Exp Immunol* 1971; 9(2):227-240.

Fabris N. Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clin Exp Immunol* 1973; 15(4):601-611.

Farah JM, Hall NR, Bishop JF, Goldstein AL, O'Donohue TL. Thymosin fraction 5 stimulates secretion of immunoreactive beta-endorphin in mouse corticotropic tumor cells. *J Neurosci Res* 1987; 18(1):140-146.

Fisher ER. Pathology of the thymus and its relation to human disease. In: Hoeber Medical Division, Harper & Row. New York, 1964:676-729.

Folch H, Eller G, Mena M, Esquivel P. Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of "facteur thymique serique" level. *Cell Immunol* 1986; 102(1):211-216.

Gaillard R, Daneva T, Hadid R, Muller K, Spinedi E. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis of athymic Swiss nude mice. The implications of T lymphocytes in the ACTH release from immune cells. *Ann NY Acad Sci* 1998; 840:480-490.

García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R, Rosas P. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J Endocrinol* 2000; 166(2):381-387.

Gastinel LN, Dardenne M, Pléau JM, Bach JF. Studies on the zinc binding site to the serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 1984; 797(2):147-155.

Goff BL, Roth JA, Arp LH, Incefy GS. Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(3):580-587.

Goya RG, Gagnerault MC, de Moraes MC, Savino W, Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymus function in aging mice. *Brain Behav Immun* 1992; 6(4):341-354.

Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bevilacqua JA, Dardenne M. Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in aging rats. *Neuroendocrinology* 1993; 58(3):338-343.

Goya R, Sosa, YE, Cónsole, GM, Dardenne, M. Altered regulation of serum prolactin in nude mice. *Med Sci Res* 1996; 24:279-280.

Goya RG, Cónsole GM, Sosa YE, Gómez Dumm CLA y Dardenne M. Altered functional responses with preserved morphology of gonadotrophic cells in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 2001; 15:85-92.

Goya RG, Reggiani PC, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P, Dardenne M. Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1):E182-187.

Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM, Dardenne M. Altered thyrotropic and somatotropic responses to environmental challenges in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 1995; 9(2):79-86.

Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL, Meites J. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent

García L, Hinojosa L, Domínguez R, Chavira R, Rosas P. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal mice: role of thymulin. *J Endocrinol* 2000; 166(2):381-387.

Gastinel LN, Dardenne M, Pléau JM, Bach JF. Studies on the zinc binding site to the serum thymic factor. *Biochim Biophys Acta* 1984; 797(2):147-155.

Goff BL, Roth JA, Arp LH, Incefy GS. Growth hormone treatment stimulates thymulin production in aged dogs. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(3):580-587.

Goya RG, Gagnerault MC, de Moraes MC, Savino W, Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymus function in aging mice. *Brain Behav Immun* 1992; 6(4):341-354.

Goya RG, Gagnerault MC, Sosa YE, Bevilacqua JA, Dardenne M. Effects of growth hormone and thyroxine on thymulin secretion in aging rats. *Neuroendocrinology* 1993; 58(3):338-343.

Goya R, Sosa, YE, Cónsole, GM, Dardenne, M. Altered regulation of serum prolactin in nude mice. *Med Sci Res* 1996; 24:279-280.

Goya RG, Cónsole GM, Sosa YE, Gómez Dumm CLA y Dardenne M. Altered functional responses with preserved morphology of gonadotrophic cells in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 2001; 15:85-92.

Goya RG, Reggiani PC, Vesenbeckh SM, Pléau JM, Sosa YE, Cónsole GM, Schade R, Henklein P, Dardenne M. Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1): E182-187.

Goya RG, Sosa YE, Cónsole GM, Dardenne M. Altered thyrotropic and somatotropic responses to environmental challenges in congenitally athymic mice. *Brain Behav Immun* 1995; 9(2):79-86.

Goya RG, Takahashi S, Quigley KL, Sosa YE, Goldstein AL, Meites J. Immune-neuroendocrine interactions during aging: age-dependent

thyrotropin- inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 1987; 41(3):219-227.

Hadden JW. Thymic endocrinology. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14(3):345-352.

Hadley AJ, Rantle CM, Buckingham JC. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4(2):62-69.

Harris GW, Levine S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *J Physiol* 1965; 181(2):379-400.

Healy DL, Bacher J, Hodgen GD. Thymic regulation of primate fetal ovarian-adrenal differentiation. *Biol Reprod* 1985; 32(5):1127-33.

Healy DL, Hodgen GD, Schulte HM, Chrousos GP, Loriaux DL, Hall NR, Goldstein AL. The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin- releasing activity in primates. *Science* 1983; 222(4630):1353-55.

Hinojosa L, Chavira R, Dominguez R, Rosas P. Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* 1999; 163(2):255-260.

Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, Castillo L, Rosas P. Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by in vitro pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci* 2004; 76(7):795-804.

Holland JM, Mitchell TJ, Gipson L, Whitaker MS. Survival and cause of death in aging germfree athymic nude and normal inbred C3Hf/He mice. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61(5):1357-61.

Holub M. Immunology of nude mice. In: Boca Raton, Fla. CRC Press, 1989.

Ledwitz-Rigby F, Scheid PG. Thymulin modulates porcine granulosa cell responsiveness to gonadotrophins in vitro. In: Signaling messages and gene expression in the ovary. In: Gibori G, ed., New York. Springer-Verlag, 1991:473-478.

thyrotropin- inhibiting activity of thymosin peptides. *Mech Ageing Dev* 1987; 41(3):219-227.

Hadden JW. Thymic endocrinology. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14(3):345-352.

Hadley AJ, Rantle CM, Buckingham JC. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4(2):62-69.

Harris GW, Levine S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *J Physiol* 1965; 181(2):379-400.

Healy DL, Bacher J, Hodgen GD. Thymic regulation of primate fetal ovarian-adrenal differentiation. *Biol Reprod* 1985; 32(5):1127-33.

Healy DL, Hodgen GD, Schulte HM, Chrousos GP, Loriaux DL, Hall NR, Goldstein AL. The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin- releasing activity in primates. *Science* 1983; 222(4630):1353-55.

Hinojosa L, Chavira R, Dominguez R, Rosas P. Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in prepubertal normal and hypothyroid mice. *J Endocrinol* 1999; 163(2):255-260.

Hinojosa L, García L, Domínguez R, Romano MC, Damián-Matsumura PG, Castillo L, Rosas P. Effects of thymulin and GnRH on the release of gonadotropins by in vitro pituitary cells obtained from rats in each day of estrous cycle. *Life Sci* 2004; 76(7):795-804.

Holland JM, Mitchell TJ, Gipson L, Whitaker MS. Survival and cause of death in aging germfree athymic nude and normal inbred C3Hf/He mice. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61(5):1357-61.

Holub M. Immunology of nude mice. In: Boca Raton, Fla. CRC Press, 1989.

Ledwitz-Rigby F, Scheid PG. Thymulin modulates porcine granulosa cell responsiveness to gonadotrophins in vitro. In: Signaling messages and gene expression in the ovary. In: Gibori G, ed., New York. Springer-Verlag, 1991:473-478.

Lintern-Moore S, Pantelouris EM. Ovarian development in athymic nude mice. The size and composition of the follicle population. *Mech Ageing Dev* 1975; 4(5-6):385-390.

Martínes E, Reggiani P, Camihort G, Luna G, Goya R, Cónsole G. The thymulin-lactotropic axis in rodents: thymectomy, immunoneutralization and gene transfer studies. *Neuroimmunomodulation* 2013; 20(5):256-263.

Martínes EV, Reggiani PC, Schwerdt JI, Goya RG, Cónsole GM. Thymulin gene therapy prevents the histomorphometric changes induced by thymulin deficiency in the thyrotrope population of mice. *Cells Tissues Organs* 2011a; 194(1):67-75.

Martínes EV, Reggiani PC, Schwerdt JI, Goya RG, Cónsole GM. Neonatal thymulin gene therapy in nude mice: Effects on the morphology of the pituitary corticotrope population. *Histol Histopathol* 2011b; 26(4):471-479.

Mendoza ME, Romano MC. Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 1989; 14(4):233-242.

Michael SD, Taguchi O, Nishizuka Y. Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol Reprod* 1980; 22(2):343-350.

Michael SD, Taguchi O, Nishizuka Y. Changes in hypophyseal hormones associated with accelerated aging and tumorigenesis of the ovaries in neonatally thymectomized mice. *Endocrinology* 1981; 108(6):2375-80.

Mink JG, Radl J, van den Berg P, Haaijman JJ, van Zwieten MJ, Benner R. Serum immunoglobulins in nude mice and their heterozygous littermates during ageing. *Immunology* 1980; 40(4):539-545.

Mocchegiani E, Amadio L, Fabris N. Neuroendocrine-thymus interactions. I. In vitro modulation of thymic factor secretion by thyroid hormones. *J Endocrinol Invest* 1990a; 13(2):139-147.

ges and gene expression in the ovary. In: Gibori G, ed., New York. Springer-Verlag, 1991:473-478.

Lintern-Moore S, Pantelouris EM. Ovarian development in athymic nude mice. The size and composition of the follicle population. *Mech Ageing Dev* 1975; 4(5-6):385-390.

Martínes E, Reggiani P, Camihort G, Luna G, Goya R, Cónsole G. The thymulin-lactotropic axis in rodents: thymectomy, immunoneutralization and gene transfer studies. *Neuroimmunomodulation* 2013; 20(5):256-263.

Martínes EV, Reggiani PC, Schwerdt JI, Goya RG, Cónsole GM. Thymulin gene therapy prevents the histomorphometric changes induced by thymulin deficiency in the thyrotrope population of mice. *Cells Tissues Organs* 2011a; 194(1):67-75.

Martínes EV, Reggiani PC, Schwerdt JI, Goya RG, Cónsole GM. Neonatal thymulin gene therapy in nude mice: Effects on the morphology of the pituitary corticotrope population. *Histol Histopathol* 2011b; 26(4):471-479.

Mendoza ME, Romano MC. Prepubertal rat thymus secretes a factor that modulates gonadotropin secretion in cultured rat pituitary cells. *Thymus* 1989; 14(4):233-242.

Michael SD, Taguchi O, Nishizuka Y. Effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol Reprod* 1980; 22(2):343-350.

Michael SD, Taguchi O, Nishizuka Y. Changes in hypophyseal hormones associated with accelerated aging and tumorigenesis of the ovaries in neonatally thymectomized mice. *Endocrinology* 1981; 108(6):2375-80.

Mink JG, Radl J, van den Berg P, Haaijman JJ, van Zwieten MJ, Benner R. Serum immunoglobulins in nude mice and their heterozygous littermates during ageing. *Immunology* 1980; 40(4):539-545.

Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E, Fabris N. Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* 1990b; 33(6):248-255.

Mocchegiani E, Sartorio A, Santarelli L, Ferrero S, Fabris N. Thymulin, zinc and insulin-like growth factor-I (IGF-I) activity before and during recombinant growth hormone (rec-GH) therapy in children and adults with GH deficiency. *J Endocrinol Invest* 1996; 19(9):630-637.

Morel GR, Reggiani PC, Cónsole GM, Rimoldi OJ, Vesenbeckh SM, Garcia-Bravo MM, Rodriguez SS, Brown OA, Goya RG. Potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Curr Gene Ther* 2008; 8(1):49-53.

Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz K, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996; 272(5263):886-889.

Nishizuka Y, Sakakura T. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* 1971; 89(3):889-893.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969; 166(3906):753-755.

Oates KK, Sztejn MB, Goldstein AL. Mechanism of action of the thymosins: modulation of lymphokines, receptors, and T-cell differentiation antigens. *Inmunol Ser* 1989; 45:273-288.

Pierpaoli W, Besedovsky HO. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin Exp Immunol* 1975; 20(2):323-338.

Pierpaoli W, Sorkin E. Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus. *Nat New Biol* 1972; 238(87):282-285.

Pierpaoli W, Bianchi E, Sorkin E. Hormones and the immunological capacity. V. Modification of growth hormone-producing cells in the adenohypophysis of neonatally thymectomized germ-free mice: an electron microscopical study. *Clin Exp Immunol* 1971; 9(6):889-901.

Mocchegiani E, Amadio L, Fabris N. Neuroendocrine-thymus interactions. I. In vitro modulation of thymic factor secretion by thyroid hormones. *J Endocrinol Invest* 1990a; 13(2):139-147.

Mocchegiani E, Paolucci P, Balsamo A, Cacciari E, Fabris N. Influence of growth hormone on thymic endocrine activity in humans. *Horm Res* 1990b; 33(6):248-255.

Mocchegiani E, Sartorio A, Santarelli L, Ferrero S, Fabris N. Thymulin, zinc and insulin-like growth factor-I (IGF-I) activity before and during recombinant growth hormone (rec-GH) therapy in children and adults with GH deficiency. *J Endocrinol Invest* 1996; 19(9):630-637.

Morel GR, Reggiani PC, Cónsole GM, Rimoldi OJ, Vesenbeckh SM, Garcia-Bravo MM, Rodriguez SS, Brown OA, Goya RG. Potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Curr Gene Ther* 2008; 8(1):49-53.

Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz K, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996; 272(5263):886-889.

Nishizuka Y, Sakakura T. Ovarian dysgenesis induced by neonatal thymectomy in the mouse. *Endocrinology* 1971; 89(3):889-893.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969; 166(3906):753-755.

Oates KK, Sztejn MB, Goldstein AL. Mechanism of action of the thymosins: modulation of lymphokines, receptors, and T-cell differentiation antigens. *Inmunol Ser* 1989; 45:273-288.

Pierpaoli W, Besedovsky HO. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin Exp Immunol* 1975; 20(2):323-338.

Pierpaoli W, Sorkin E. Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus. *Nat New Biol* 1972; 238(87):282-285.

Pierpaoli W, Bianchi E, Sorkin E. Hormones and the immunological capacity. V. Modification of growth hormone-producing cells

Pierpaoli W, Fabris N, Sorkin E. Developmental hormones and immunological maturation. *Ciba Found Study Group* 1970; 36:126-153.

Pierpaoli W, Kopp HG, Bianchi E. Interdependence of thymic and neuroendocrine functions in ontogeny. *Clin Exp Immunol* 1976; 24(3):501-506.

Rebar RW, Miyake A, Low TLK, Goldstein AL. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 1981a; 214(4521):669-671.

Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF and Petze JE. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 1981b; 108(1):120-126.

Rebar RW, Morandini IC, Petze JE, Erickson GF. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol Reprod* 1982; 27(5):1267-76.

Reggiani PC, Barbeito CG, Zuccolilli GO, Cónsole GM, Flamini AM, Dardenne M, Goya RG. Neonatal thymulin gene therapy prevents ovarian dysgenesis and attenuates reproductive derangements in nude female mice. *Endocrinology* 2012b; 153(8):3922-28.

Reggiani PC, Hereñú CB, Rimoldi OJ, Brown OA, Pléau J-M, Dardenne M, Goya RG. Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene Ther* 2006; 13(16):1214-21.

Reggiani PC, Martínez E, Ferese C, Goya R, Console GM. Morphological restoration of gonadotrope population by thymulin gene therapy in nude mice. *Histol Histopathol* 2009b; 24(6):729-735.

Reggiani PC, Martínez EV, Camihort GA, Poch B, Goya RG, Cónsole GM. Role of thymulin on the somatotropic axis in vivo. *Life Sci* 2012a; 91(5-6):166-171.

Reggiani PC, Morel GR, Cónsole GM, Barbeito CG, Rodríguez SS, Brown OA, Bellini MJ, Pléau J, Dardenne M, Goya RG. The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic

in the adenohipophysis of neonatally thymectomized germ-free mice: an electron microscopical study. *Clin Exp Immunol* 1971; 9(6):889-901.

Pierpaoli W, Fabris N, Sorkin E. Developmental hormones and immunological maturation. *Ciba Found Study Group* 1970; 36:126-153.

Pierpaoli W, Kopp HG, Bianchi E. Interdependence of thymic and neuroendocrine functions in ontogeny. *Clin Exp Immunol* 1976; 24(3):501-506.

Rebar RW, Miyake A, Low TLK, Goldstein AL. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 1981a; 214(4521):669-671.

Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF and Petze JE. The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal females. *Endocrinology* 1981b; 108(1):120-126.

Rebar RW, Morandini IC, Petze JE, Erickson GF. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol Reprod* 1982; 27(5):1267-76.

Reggiani PC, Barbeito CG, Zuccolilli GO, Cónsole GM, Flamini AM, Dardenne M, Goya RG. Neonatal thymulin gene therapy prevents ovarian dysgenesis and attenuates reproductive derangements in nude female mice. *Endocrinology* 2012b; 153(8):3922-28.

Reggiani PC, Hereñú CB, Rimoldi OJ, Brown OA, Pléau J-M, Dardenne M, Goya RG. Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in thymectomized mice and rats. *Gene Ther* 2006; 13(16):1214-21.

Reggiani PC, Martínez E, Ferese C, Goya R, Console GM. Morphological restoration of gonadotrope population by thymulin gene therapy in nude mice. *Histol Histopathol* 2009b; 24(6):729-735.

Reggiani PC, Martínez EV, Camihort GA, Poch B, Goya RG, Cónsole GM. Role of thymulin on the somatotropic axis in vivo. *Life Sci* 2012a; 91(5-6):166-171.

potential of the thymic peptide thymulin. *Ann NY Acad Sci* 2009a; 1153:98-106.

Reggiani PC, Schwerdt JI, Cónsole GM, Roggero EA, Dardenne M, Goya RG. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Current Pharm Des* 2014; 20(29):4690-96.

Reggiani PC. Terapia génica para la hormona tímica timulina en modelos de timodeficiencia. Tesis doctoral, 2009c.

Rygaard J. Thymus and self-immunobiology of the mouse mutant nude. In: Copenhagen: FADL, 1973.

Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Kanaan SA, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of cytokines and prostaglandin-E2 in thymulin induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2000; 39(9):1653-61.

Safieh-Garabedian B, Jabbur SJ, Dardenne M, Saadé NE. Thymulin related peptide attenuates inflammation in the brain induced by intracerebroventricular endotoxin injection. *Neuropharmacology* 2011; 60(2-3):496-504.

Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Jalakhian RH, Poole S, Jabbur SJ, Saadé NE. Hyperalgesia induced by low doses of thymulin injections: possible involvement of prostaglandin E2. *J Neuroimmunol* 1997; 73(1-2):162-168.

Safieh-Garabedian B, Kendall MD, Khamashta MA, Hughes GR. Thymulin and its role in immunomodulation. *J Autoimmun* 1992; 5(5):547-555.

Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad A, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience* 2003; 121(4):865-873.

Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 2000; 21(4):412-443.

Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T, Dardenne M. Thymic hormone containing cells. IX. Steroids in vitro

Reggiani PC, Morel GR, Cónsole GM, Barbeito CG, Rodríguez SS, Brown OA, Bellini MJ, Pléau J, Dardenne M, Goya RG. The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Ann NY Acad Sci* 2009a; 1153:98-106.

Reggiani PC, Schwerdt JI, Cónsole GM, Roggero EA, Dardenne M, Goya RG. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Current Pharm Des* 2014; 20(29):4690-96.

Reggiani PC. Terapia génica para la hormona tímica timulina en modelos de timodeficiencia. Tesis doctoral, 2009c.

Rygaard J. Thymus and self-immunobiology of the mouse mutant nude. In: Copenhagen: FADL, 1973.

Safieh-Garabedian B, Dardenne M, Kanaan SA, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of cytokines and prostaglandin-E2 in thymulin induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 2000; 39(9):1653-61.

Safieh-Garabedian B, Jabbur SJ, Dardenne M, Saadé NE. Thymulin related peptide attenuates inflammation in the brain induced by intracerebroventricular endotoxin injection. *Neuropharmacology* 2011; 60(2-3):496-504.

Safieh-Garabedian B, Kanaan SA, Jalakhian RH, Poole S, Jabbur SJ, Saadé NE. Hyperalgesia induced by low doses of thymulin injections: possible involvement of prostaglandin E2. *J Neuroimmunol* 1997; 73(1-2):162-168.

Safieh-Garabedian B, Kendall MD, Khamashta MA, Hughes GR. Thymulin and its role in immunomodulation. *J Autoimmun* 1992; 5(5):547-555.

Safieh-Garabedian B, Ochoa-Chaar CI, Poole S, Massaad A, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increased concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. *Neuroscience* 2003; 121(4):865-873.

- modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 1988; 30(1-6): 479-484.
- Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S, Dardenne M. Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels in vivo can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* 1984; 55(3):629-635.
- Schlake T, Schorpp M, Nehls M, Boehm T. The nude gene encodes a sequence-specific DNA binding protein with homologs in organisms that lack an anticipatory immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8):3842-47.
- Schwertd JI, Hereñú C, Rimoldi O, Cónsole G, Luna, G, Camihort G, Goya RG. Terapia génica en el eje hipotalámico-hipofisario con IGF-I en ratas hembras envejecidas. I Congreso Internacional de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 2013.
- Solomon JB. Ontogeny of defined immunity in mammals. In: Neuberger A, Tatum EL, eds. *Foetal and Neonatal Immunology*. Frontiers of Biology. New York, American Elsevier Publishing Co 1971:234-306.
- Strich G, Petze JE, Silva de Sa MF, Rebar RW. The effects of thymus-derived peptides on hypothalamic LRF and pituitary gonadotropin content in prepubertal congenitally athymic nude mice and their normal heterozygous littermates. *J Reprod Immunol* 1985; 7(4):351-359.
- Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1):183-188.
- Vesenbeckh S. *Vogelgtder Medizinischen. Fakultät der Charité. Unni-versitätsmedizin Berlin*. Doctoral thesis: Studies in mice on the role of the thymic hormone thymulin during early life as a maturational factor for the neuroendocrine system. Directors: Dr. R. Schade and Dr. R. Goya, 2006.
- Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 2000; 21(4):412-443.
- Savino W, Bartoccioni E, Homo-Delarche F, Gagnerault MC, Itoh T, Dardenne M. Thymic hormone containing cells. IX. Steroids in vitro modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J Steroid Biochem* 1988; 30(1-6): 479-484.
- Savino W, Wolf B, Aratan-Spire S, Dardenne M. Thymic hormone containing cells. IV. Fluctuations in the thyroid hormone levels in vivo can modulate the secretion of thymulin by the epithelial cells of young mouse thymus. *Clin Exp Immunol* 1984; 55(3):629-635.
- Schlake T, Schorpp M, Nehls M, Boehm T. The nude gene encodes a sequence-specific DNA binding protein with homologs in organisms that lack an anticipatory immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8):3842-47.
- Schwertd JI, Hereñú C, Rimoldi O, Cónsole G, Luna, G, Camihort G, Goya RG. Terapia génica en el eje hipotalámico-hipofisario con IGF-I en ratas hembras envejecidas. I Congreso Internacional de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 2013.
- Solomon JB. Ontogeny of defined immunity in mammals. In: Neuberger A, Tatum EL, eds. *Foetal and Neonatal Immunology*. Frontiers of Biology. New York, American Elsevier Publishing Co 1971:234-306.
- Strich G, Petze JE, Silva de Sa MF, Rebar RW. The effects of thymus-derived peptides on hypothalamic LRF and pituitary gonadotropin content in prepubertal congenitally athymic nude mice and their normal heterozygous littermates. *J Reprod Immunol* 1985; 7(4):351-359.
- Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1):183-188.

Villa-Verde DM, de Mello-Coelho V, Farias de Oliveira DA, Dardenne M, Savino W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 1993; 133(2):867-875.

Wise T, Ford JJ. Effects of the thymic peptide thymulin on in vitro and in vivo testicular steroid concentrations in white composite and Meishan boars. *J Anim Sci* 1999; 77(8):2240-51.

Wise T. In vitro and in vivo effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 66(3):129-135.

Zaidi SA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT. The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 1988; 12(4):253-264.

Vesenbeckh S. *Vogelgüter Medizinischen Fakultät der Charité. Universitätmedizin Berlin. Doctoral thesis: Studies in mice on the role of the thymic hormone thymulin during early life as a maturational factor for the neuroendocrine system.* Directors: Dr. R. Schade and Dr. R. Goya, 2006.

Villa-Verde DM, de Mello-Coelho V, Farias de Oliveira DA, Dardenne M, Savino W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 1993; 133(2):867-875.

Wise T, Ford JJ. Effects of the thymic peptide thymulin on in vitro and in vivo testicular steroid concentrations in white composite and Meishan boars. *J Anim Sci* 1999; 77(8):2240-51.

Wise T. In vitro and in vivo effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 66(3):129-135.

Zaidi SA, Kendall MD, Gillham B, Jones MT. The release of luteinizing hormone from pituitaries perfused with thymic extracts. *Thymus* 1988; 12(4):253-264.

CAPÍTULO 20

Prolactinomas experimentales: terapia génica con el factor de crecimiento insulino-símil tipo I

Los adenomas pituitarios representan las neoplasias primarias de localización intracraneana más frecuente, ya que 6.6 a 9.1% se localizan en el cerebro y en el sistema nervioso central, con una incidencia anual de 0.8 a 8 por 100.000 personas/año (Surawicz y col., 1999; Nilsson y col., 2000; Kheirollahi y col., 2015). Hay más casos en mujeres (20-45 años) al comparar con hombres (35-60 años) (Davis y col., 2000 y 2001). Los adenomas pituitarios tienen una incidencia de 16.7% según Ezzat y col. (2004). Aunque la mayor parte de los adenomas son benignos y rara vez devienen malignos, pueden tener una conducta agresiva cuando ejercen una compresión de masa asociada a una secreción hormonal alterada (Ezzat y Asa, 2006).

El estradiol y el dietilestilbestrol han sido vistos como inductores de prolactinomas en ratas hembras entre las 2 a 4 semanas. Las mujeres que toman anticonceptivos orales desarrollan a menudo un incremento de los niveles de PRL y tienen mayor incidencia de prolactinomas, aunque no todas las mujeres parecen ser igualmente susceptibles al efecto mitogénico

CHAPTER 20

Experimental prolactinomas: gene therapy with insulin-like I growth factor

Pituitary adenomas represent the most frequent intracranial primary neoplasms, since 6.6 to 9.1% localized in the brain and in the central nervous system with annual incidence of 0.8 to 8 every 100.000 people/year (Surawicz et al., 1999; Nilson et al., 2000). They are most frequent in women (20-45 years) when comparing with men (35-60 years) (Davis et al., 2000 and 2001). Pituitary adenomas have an incidence of 16.7% according to Ezzat et al. (2004). Although most adenomas are benign and rarely become malignant they can behave aggressively when exerting a mass compression associated to an altered hormonal secretion (Ezzat and Asa, 2006).

Estradiol and diethylstilbestrol have been recorded as prolactinoma inducers in female rats between weeks 2 to 4 weeks. Women who take oral contraceptives usually develop increase of PRL levels and higher incidence of prolactinomas, though not all women appear to be equally susceptible to the mitogenic effect of estradiol (Shy et al., 1983; Carol et al., 1988; Fahy et al., 1992).

del estradiol (Sarkar y col., 1982; Lloyd, 1983; Shy y col., 1983; Carol y col., 1988; Fahy y col., 1992).

La pituitaria contiene varios factores de crecimiento que afectan la proliferación de las células adenohipofisarias a través de acciones autocrinas y paracrinas. Los adenomas pituitarios resultan de una anormal producción de tales factores con pérdida de los mecanismos inhibitorios locales por activación o desregulación de las vías mitogénicas (Webster y col., 1989). Okajima y Harada (2008) comunicaron que la estimulación de las neuronas sensoriales incrementó el flujo tisular y previno la apoptosis por aumento del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) en varios tejidos. Hay un gran número de factores de crecimiento estrógeno-dependientes que regulan la proliferación, la diferenciación y/o la transformación de la población lactotropa. Algunos de estos factores estrógeno-regulados son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF α), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), las interleuquinas (IL) y los factores de crecimiento insulino-símiles tipos I y II (IGF-I/II) (Daughaday y Rotwein, 1989; Halper y col., 1992; Jones y Clemmons, 1995; Le Roith y col., 1995; Daniels y Martin, 1995; Ray y Melmed, 1997; Sarkar y col., 1998; Honda y col., 1998; Jevjovic y col., 2007). Los péptidos bioactivos demostrados comprenden: factores de crecimiento, factores hipotalámicos liberadores de hormonas, opioides y otros péptidos que actúan a nivel cerebral y digestivo (Houben y Denef, 1994). Los IGFs inhiben la liberación de la GH y la PRL en cultivos de tejidos (Goodyer y col., 1984).

El IGF-I está distribuido en los lóbulos anterior e intermedio de la pituitaria (D'Ercole y col., 1984), pero su expresión no se detectó en las células endocrinas sino en las células folículo-estelares (FE) (Bach y Bondy, 1992). Aunque el estrógeno es conocido como regulador del ARNm IGF-I en pituitarias de ratas normales (Michels y col., 1993, gran número de los adenomas pituitarios estrógeno-inducidos presentaron niveles disminuidos del mismo. Además, la remisión parcial inducida por el antiestrógeno tamoxifeno estuvo asociada al contenido pituitario de ARNm IGF-I en dichos adenomas (Hána y col., 1998). El estrógeno tuvo una acción antiproliferativa al

The pituitary gland contains several growth factors affecting the adenohipophyseal cell proliferation through autocrine and paracrine actions. Pituitary adenomas result from an abnormal production of these factors with loss of the local inhibitory mechanisms through activation or dysregulation of the mitogenic pathways (Webster et al., 1989). Okajima and Harada (2008) reported that the stimulation of sensitive neurons increased the tissue flux and prevented apoptosis as consequence of the increase of insulin-like growth factor I (IGF-I) in several tissues. There is a large number of estrogen-dependent growth factors that regulate proliferation, differentiation and/or transformation of the lactotrope population. Some of these estrogen-regulated factors form the epidermal growth factor (EGF), the platelet-derived growth factor (PDGF), the transforming growth factor α (TGF α), the fibroblast growth factor (FGF), interleukins (IL) and the insulin-like growth factors I and II (IGF-I/II) (Daughaday and Rotwein, 1989; Halper et al., 1992; Jones and Clemmons, 1995; Le Roith et al., 1995; Ray and Melmed, 1997; Sarkar et al., 1998; Honda et al., 1998; Jevjovic et al., 2007). The bioactive peptides demonstrated comprise: growth factors, hormone releasing pituitary factors, opioids and other peptides acting at brain and gut level (Houben and Denef, 1994). Release of GH and PRL in tissue cultures are inhibited by IGFs (Goodyer et al., 1984).

IGF-I is distributed throughout the anterior and intermediate pituitary lobes (D'Ercole et al., 1984), but its expression has not been detected in the endocrine cells but in the folliculo-stellate cells (FS) (Bach and Bondy, 1992). Although estrogen is known as the regulator of IGF-I mRNA in pituitaries of normal rats (Michels et al., 1993), a large number of estrogen-induced pituitary adenomas presented reduced levels of it. Also, the partial remission induced by antiestrogen tamoxifen was associated to the pituitary content of IGF-I mRNA in those adenomas (Hána et al., 1998). Estrogen presented an antiproliferative action when adding insulin or IGF-I in primary cultures of lactotropes (Kawashima et al., 2002; Ishida et al., 2007). IGF-I regulates the synthesis and secretion of PRL and GH (Fruchtman et al., 2000) and presents multiple functions in

agregar insulina o IGF-I en los cultivos primarios de lactotropas (Kawashima y col., 2002; Ishida y col., 2007). El IGF-I regula la síntesis y secreción de PRL y GH (Fruchtman y col., 2000) y tiene múltiples funciones en los procesos de crecimiento, diferenciación y supervivencia de los tejidos (Stewart y Rotwein, 1996). Los IGFs regulan el mecanismo de retroalimentación de la GH y el peso corporal (Berelowitz y col., 1981; Tannenbaum y col., 1983). La terapia con IGF-I tuvo efecto restaurativo de la función dopaminérgica hipotalámica en las ratas seniles (Hereñú y col., 2007).

Se demostró la expresión diferencial de los transcritos de ARNm de IGF-I en respuesta a los esteroides y a la GH. Las isoformas de transcripción incluyen la regulación epigenética del empalme y el uso del promotor, así como el ARN y el efecto sobre la estabilidad de los microARNs (Oberbauer, 2013).

La estereotaxia intrapituitaria del RAD-GFP, vector adenoviral que expresa una variante quimérica de la proteína fluorescente verde, indujo una significativa expresión del GFP en la periferia de una estereotáxica aguja (**fig. 20.1, flecha**), pero sin provocar daño en el resto de la glándula (**fig. 20.1, recuadro**).

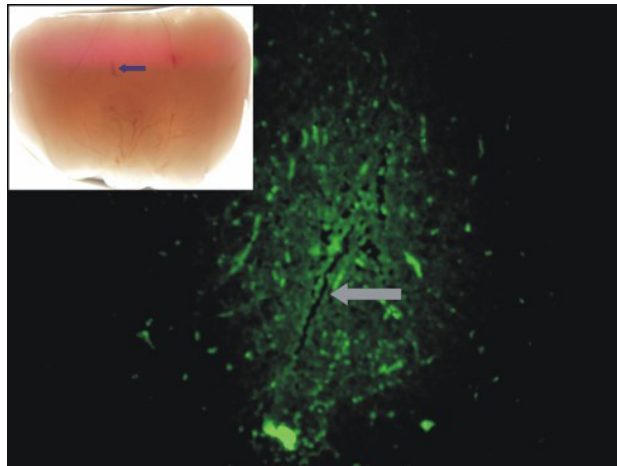


Fig. 20.1. Expresión del transgénico GFP/TK en un adenoma pituitario. El panel principal muestra la fluorescencia verde de las células transducidas alrededor del punto de entrada de la aguja estereotáxica usada para liberar el RAD-GFP/TK dentro del tumor (flecha) ($\times 200$). El recuadro presenta con bajo aumento el mismo adenoma pituitario donde puede verse el orificio de entrada de la aguja (flecha). Ningún cambio estructural es evidente como consecuencia de la inyección ($\times 40$) (Cónsole y col. 2008).

the growth processes, differentiation and survival rate of tissues (Stewart and Rotwein, 1996). IGFs regulate the feedback mechanism of GH and body weight (Berelowitz et al., 1981; Tannenbaum et al., 1983). Therapy with IGF-I had a restorative effect of the hypothalamic dopaminergic function in senile rats (Hereñú et al., 2007).

The differential expression of IGF-I mRNA transcripts has been demonstrated in response to steroids and GH. Transcription isoforms include the epigenetic regulation of splicing and promoter usage as well as RNA binding proteins and microRNA effects on transcript stability (Oberbauer, 2013).

Stereotaxic intrapituitary injection of RAD-GFP, adenoviral vector expressing a chimeric variant of green fluorescent protein, induced significant expression of GFP around the track of the needle (**fig. 20.1, arrow**), without significantly damaging the gland (**fig. 20.1, inset**).

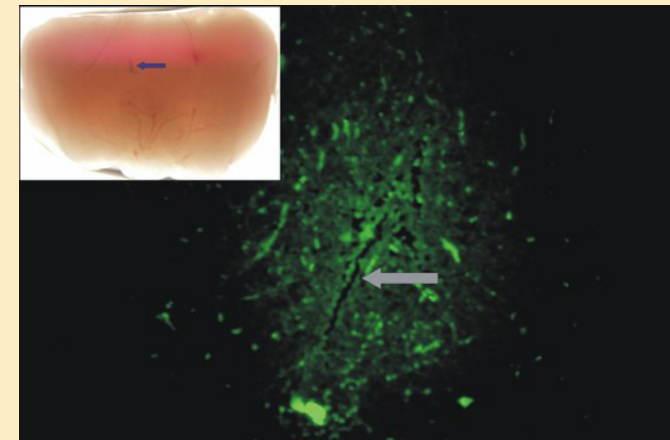


Fig. 20.1. Expression of transgenic GFP/TK in a pituitary adenoma. The main panel shows the green fluorescence of transduced cells around the entry point (arrow) of the needle used to stereotaxically deliver RAD-GFP/TK into the tumor ($\times 200$). The inset shows a low magnification view of the same pituitary adenoma where an entry point of the needle can be seen (arrow). No structural damage is evident as a consequence of the injection ($\times 40$) (Cónsole y col. 2008).

In **fig. 20.2** Immunostaining of the lactotrope population is shown in the different groups: intact, with estrogens only and with estrogens plus RAD-GFP (control) and RAD-IGF-I. We detected an increment of cellular size (CS) in the group submitted only estrogens and the group

En la **fig. 20.2** se muestra la inmunomarcación de la población lactotropa en los diferentes grupos: Intacto, sólo con estrógenos y estrógenos más adenovectores recombinantes RAD-GFP (control) y RAD-IGF-I (estrógenos 4 semanas). Se halló un aumento del tamaño celular (TC) en el grupo sometido sólo a estrógenos, con incremento de la densidad celular (DC) asociada a menor tamaño celular (TC) en el grupo Rad-IGF-I, respecto a controles.

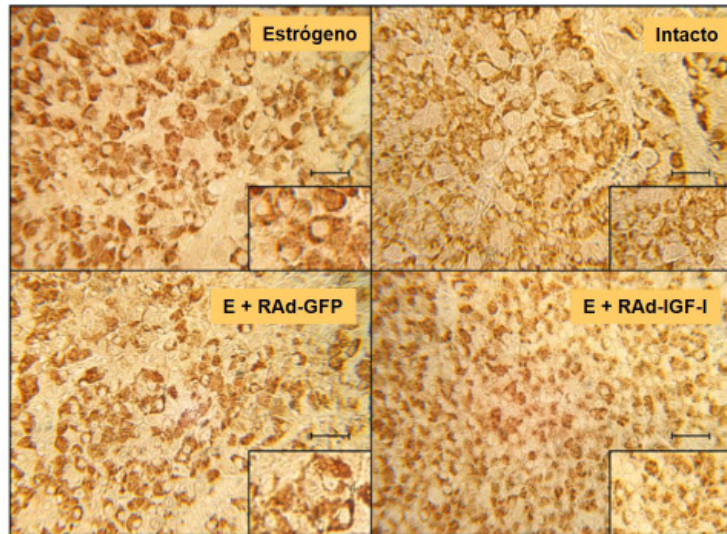


Fig. 20.2. Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre las lactotropas de los adenomas pituitarios sometidos a 4 semanas de tratamiento con estrógenos. Campos representativos de las lactotropas inmunomarcadas en las pituitarias de ratas. Grupos: intacto; sólo estrógeno; E + RAD-GFP y E + RAD-IGF-I. Recuadros: mayor aumento de las muestras (EnVision peroxidasa, anti-PRL, barra = 25 μ m; recuadro = 12.5 μ m) (Cónsole y col. 2008).

El análisis morfométrico luego de 4 semanas de estrógenos, reveló en la población lactotropa un significativo ($p < 0.01$) incremento de la densidad de células (DC) en los animales a los que se les administró estrógenos, pero no el vector control, al compararse con ratas intactas. Siete días de terapia génica en el grupo E2 + Rad-IGF-I no afectó la DC pero disminuyó el tamaño celular (TC) (**fig. 20.3**).

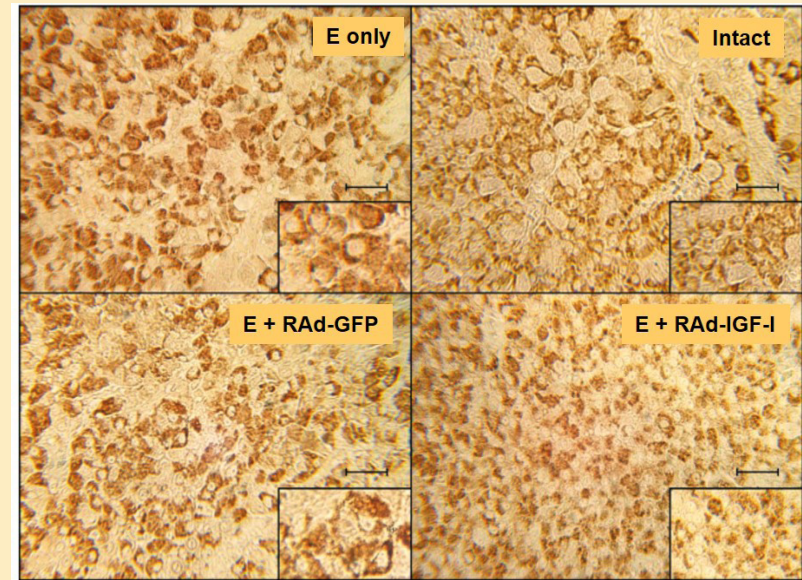


Fig. 20.2. Effect of IGF-I gene therapy on lactotrope cells of pituitary adenomas. Representative fields of specifically immunostained PRL-cells in the pituitary gland of an intact rat, an animal treated only with estrogen for 4 weeks (E only), and animal receiving estrogen for 4 weeks and RAD-GFP (E + RADGFP) or RAD-IGF-I (E + Rad.IGF-I) (adenovector during the last experimental week). Inset: Higher magnification views of the specimens. EnVision peroxidase, anti-PRL, bar = 25 μ m, inset = 12.5 μ m (Cónsole y col. 2008).

Rad-IGF-I showed a high level of cellular density (CD) associated with a decreased cellular size (CS), respect to controls.

The histomorphometric analysis after 4 weeks of estrogens, reveals in the lactotrope population a significant ($p < 0.01$) increase of cell density (CD) in those rats which were administered estrogens but not the vector or in animals which were administered E2 + RAD-GFP, compared with control intact rats. Seven-day gene therapy in group E2 + Rad-IGF-I does not affect lactotrope CD in animals treated with estrogens but diminishes cell size (CS) (**fig. 20.3**).

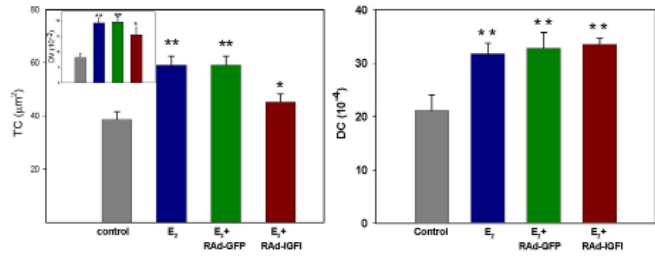


Fig. 20.3. Histometría de la población lactotropa. Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre el tamaño celular (TC) y densidad de volumen (DV) en las pituitarias de animales intactos y tratados sólo con estrógenos (sólo E₂) y E₂ + RADGFP o E₂ + Rad-IGF-I. Las columnas representan los valores promedio mientras la barras sobre las columnas marcan los valores \pm ES. Se ensayaron 5 pituitarias por grupo. Los asteriscos indican las mayores diferencias significativas respecto al grupo intacto ($p < 0.05$) (Cónsole y col., 2008).

La administración de estrógenos indujo una marcada hyperprolactinemia en animales con adenomas. Luego de 7 días de la inyección estereotáxica intrapituitaria de RAD-IGF-I, pero no de RAD-GFP, pudo verse un significativo ($p < 0.01$) descenso de la PRL sérica en ratas tratadas con estrógenos. Sin embargo, la PRL sérica de ratas tratadas con RAD-IGF-I permanecen con altos niveles propios de las ratas intactas (fig. 20.4).

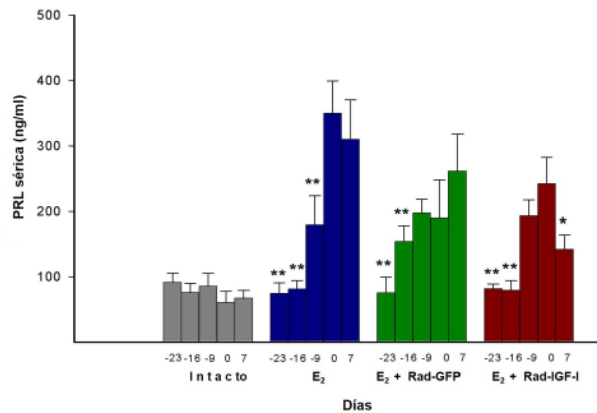


Fig. 20.4 Efecto de la terapia génica con IGF-I sobre los niveles séricos de PRL. La PRL sérica fue medida en muestras sanguíneas seriadas tomadas desde el día experimental -23 al día experimental 7. Se usaron 5 ratas en todos los grupos, excepto para el grupo E₂ + RAD-IGF-I en el que fueron ensayados 7 animales. Los asteriscos indican diferencias significativas de la PRL sérica en relación al día experimental 0 (inyección del vector), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

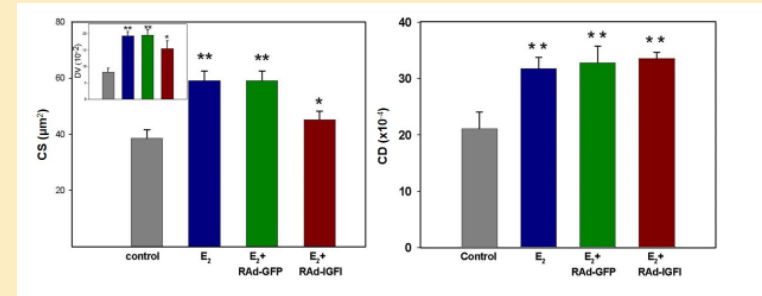


Fig. 20.3. Histometry of lactotrope population. Effect of IGF-I gene therapy on cell size (CS) and volume density (VD) in the pituitaries of intact animals, treatments: (E₂ only) and E₂ + RadGFP or E₂ + RAD-IGF-I. Columns represent mean values whereas bars over columns represent SEM values. Five pituitaries per group were assessed. Asterisks indicate a highly significant difference from the intact group ($p < 0.05$) (Cónsole y col. 2008).

Estrogen administration induces a marked hyperprolactinemia in animals with adenomas. After 7 days of stereotaxic intrapituitary injection of RAD-IGF-I, but not RAD-GFP, a significant ($p < 0.01$) decrease of serum PRL in estrogen-treated rats can be seen. However, serum PRL of rats treated with RAD-IGF-I remains with higher levels of intact rats (fig. 20.4).

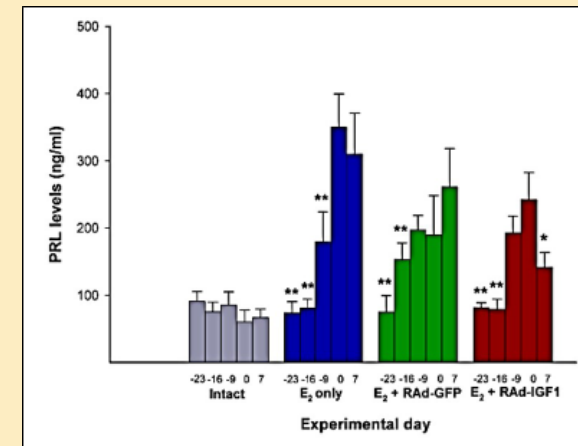


Fig. 20.4 Effect of IGF-I gene therapy on serum PRL levels. Serum PRL was measured in blood samples serially taken from experimental day -23 to experimental day 7. The number of rats used was 5 for all groups except for group E₂ + RAD-IGF-I where 7 animals were assessed. Asterisks indicate significant differences from serum PRL on experimental day 0 (vector injection), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La terapia génica con RAD-IGF-I confirmó que en los prolactinomas inducidos por estrógenos se redujo parcialmente la marcada hiperprolactinemia y se revirtieron los cambios fenotípicos en la población lactotropa (Cónsole y col., 2008).

La **fig. 20.5** muestra el efecto de la terapia génica de estrógenos + RAD-IGF-I sobre las poblaciones somatotropa, lactotropa y tirotrópica respecto al grupo E + Rad-GFP (vector control).

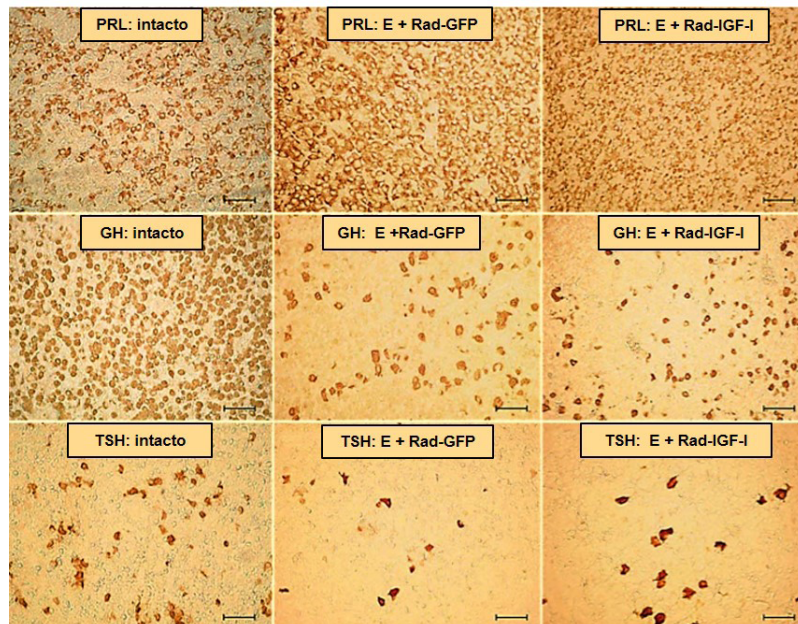


Fig. 20.5. Efectos de la terapia génica sobre las poblaciones pituitarias. Grupos : intactos, estrógenos (E) + Rad-GFP y E + Rad-IGF-I sobre las poblaciones lactotropa (PRL), somatotropa (GH) y tirotrópica (TSH). (EnVision peroxidasa, anti-PRL/GH/TSH, x 300) (Camihort y col. 2010).

La terapia génica con RAD-IGF-I en adenomas estrógeno-inducidos fue también beneficiosa para la población somatotropa. De acuerdo con Stefaneanu y col. (1999), el hecho de que la administración de RAD-IGF-I no restauró el tamaño celular de las somatotropas revela la importancia

Gene therapy with RAD-IGF-I confirmed that in estrogen-induced prolactinomas marked prolactinemia was partially reduced and phenotypical changes were reverted in the lactotrope population (Cónsole et al., 2008).

In **fig. 20.5** the effect of gene therapy with estrogen + RAD-IGF-I is shown on the somatotrope, lactotrope and thyrotrope populations with respect to group E + Rad-GFP (control vector).

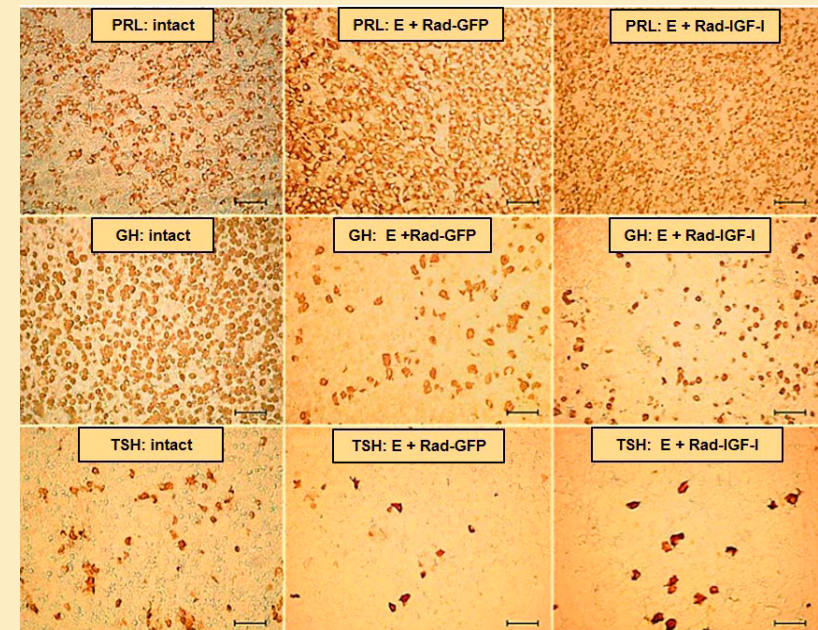


Fig. 20.5. Effects of gene therapy on pituitary populations. Groups : intact, estrogen (E) + Rad-GFP and E + Rad-IGF-I on lactotrope (PRL), somatotrope (GH) and thyrotrope (TSH) populations. (EnVision peroxidase, anti-PRL/GH/TSH, x 300) (Camihort et al. 2010).

Gene therapy with RAD-IGF-I in estrogen-induced adenomas has also been beneficial for the somatotrope population. According to Stefaneanu et al. (1999), the fact that administration of RAD-IGF-I did not restore somatotrope cell size reveals the importance of locally produ-

del IGF-I localmente producido. La administración subcutánea continua de IGF-I (7-21 µg/kg/h) demostró un descenso mayor al 50% en los niveles de GH. El IGF-I suprimió el número de pulsos de la GH y la masa de GH secretada por pulso (Ray y Melmed, 1997). En línea con estos resultados, nuestros datos mostraron que la administración intrapituitaria de RAD-IGF-I bajó los niveles de GH.

Además, Chandrashekar y Bartke (2003) especularon acerca del rol del sistema IGF-I, marcando diferencias relacionadas con diversas enfermedades que afectan los ejes somatotropo y lactotropo. Nuestro modelo experimental con RAD-IGF-I resultó efectivo para disminuir el tamaño de las somatotropas y bajar los niveles circulantes de la GH, probablemente inhibiendo su secreción (Cónsole y col., 2009).

La administración diaria de benzoato de estradiol en ratas machos llevó a un incremento de la respuesta de la TSH circulante a la TRH después de 7 días de tratamiento, mientras el nivel basal de la TSH permaneció sin cambios y también aumentó la concentración plasmática de la PRL basal en respuesta a la TRH (De Lean y Labrie, 1977). El estradiol es un importante mitógeno de las células tiroideas en ratas, estimulando la acción de la TSH y teniendo un efecto estimulador sobre la proliferación (Banu y col., 2002). El efecto estimulador del IGF-I en nuestros prolactinomas está en línea con lo comunicado en las células tiroideas, donde el IGF-I ha potenciado la proliferación inducida por TSH *in vitro*. Un incremento en la acción del IGF-I puede llevar a la potenciación de las señales de la TSH en la célula tiroidea (Kimura y col., 2001).

La administración de estradiol en ratas hembras disminuyó la respuesta de la ACTH al estrés (Young y col., 2001). Estos resultados concuerdan con nuestros datos que mostraron un efecto inhibitorio sobre la población corticotropa (Cónsole y col., 2009). El IGF-I parece ser producido en las corticotropas, indicando su particular importancia en la respuesta al estrés. El IGF-I de las células endocrinas puede controlar la síntesis y la liberación hormonal de una manera autocrina-paracrina, así como prevenir la apoptosis y estimular la proliferación (Eppler y col., 2007).

ced IGF-I. Continuous subcutaneous administration of IGF-I (7-21 µg/kg/h) demonstrated a decrease higher than 50% in GH levels. IGF-I suppressed the number of GH pulses and the GH mass secreted by pulse (Ray and Melmed, 1997). In line with these results, our data evidenced that intrapituitary administration of RAD-IGF-I reduced GH levels.

Also, Chandrashekar and Bartke (2003) speculated about the role IGF-I system, indicating differences related with different diseases affecting somatotrope and lactotrope axes. Our experimental model with RAD-IGF-I resulted effective to diminish somatotrope size and lower the circulating GH levels, probably inhibiting its secretion (Cónsole et al., 2009).

Daily administration of estradiol benzoate in male rats led to an increment of the response of circulating TSH to TRH after 7 days of treatment, whereas the basal level of TSH remained with no changes and also increased the plasmatic concentration of basal PRL in response to TRH (De Lean and Labrie, 1977). Estradiol is an important mitogen of thyroid cells in rats, stimulating TSH action and having a stimulating effect on proliferation (Banu et al., 2002). The stimulating effect of IGF-I in our prolactinomas is in line with what has been reported on thyroid cells, where IGF-I has fostered *in vitro* TSH-induced proliferation. An increment in IGF-I action may lead to the strengthening of TSH signals in the thyroid cell (Kimura et al., 2001).

Administration of estradiol to female rats diminished the response of ACTH to stress (Young et al., 2001). These results agree with our data that evidenced an inhibitory effect on the corticotrope population (Cónsole et al., 2009). Apparently, IGF-I is produced in corticotropes, thus indicating its particular importance in the response to stress. Endocrine cell IGF-I may control the hormone synthesis and release in an autocrine-paracrine manner, as well as prevent apoptosis and stimulate proliferation (Eppler et al., 2007).

According to our results, IGF-I induced a significant decrease in the CS of corticotropes, with no changes in CD compared to group E2 + RAD-GFP. These data agree with findings reported by van Wijk et al.

En nuestros resultados el IGF-I indujo un significativo descenso en el TC de las corticotropas, sin cambios en la DC, con respecto al grupo E2 + Rad-GFP. Estos datos concuerdan con los hallazgos comunicados por van Wijk y col. (1998), quienes establecieron que el IGF-I intrapituitario no tiene efectos estimulantes sobre las células tumorales corticotropas de perros.

La **fig. 20.6** muestra el efecto de la terapia génica de estrógenos + Rad-IGF-I sobre las poblaciones corticotropa, foliculotropa y luteinizante.

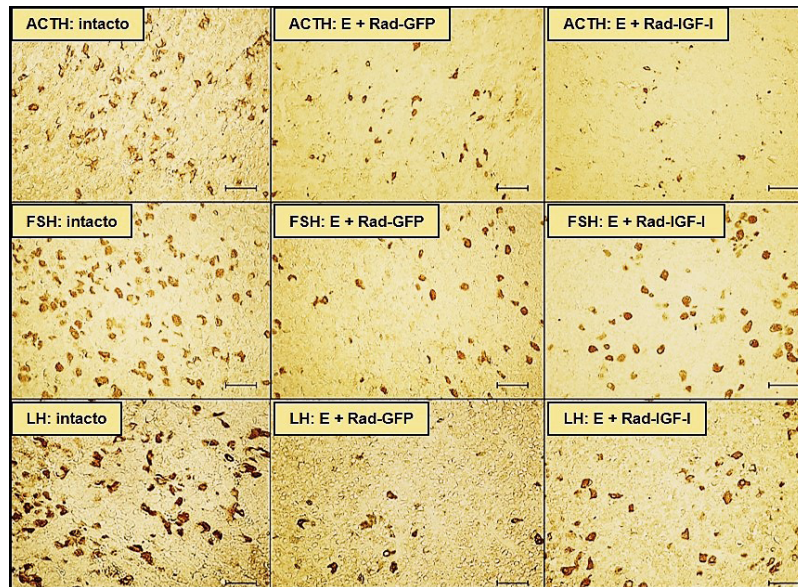


Fig. 20.6. Efectos de la terapia génica sobre las poblaciones pituitarias. Grupos : intactos, estrógenos (E) + Rad-GFP y E₂ + Rad-IGF-I sobre las poblaciones corticotropa (ACTH), foliculotropa (FSH) y luteinizante (LH). (En Vision peroxidasa, anti-ACTH/FSH/LH, x 300) (Camihort y col. 2010).

La biosíntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) están bajo el control excitatorio e inhibitorio mediante un número de factores paracrinos, incluyendo el IGF-I, el cual puede modificar la síntesis de la GnRH y sus acciones sobre las gonadotropas (Chandrashekar y Bartke, 2003). Tilemans y col. (1992) demostraron

(1998), who established that intrapituitary IGF-I does not have stimulating effects on corticotrope tumoral cells of dogs.

Fig. 20.6 shows the effect of gene therapy of estrogen + Rad-IGF-I on corticotrope, folliculotrope and luteinizing populations.

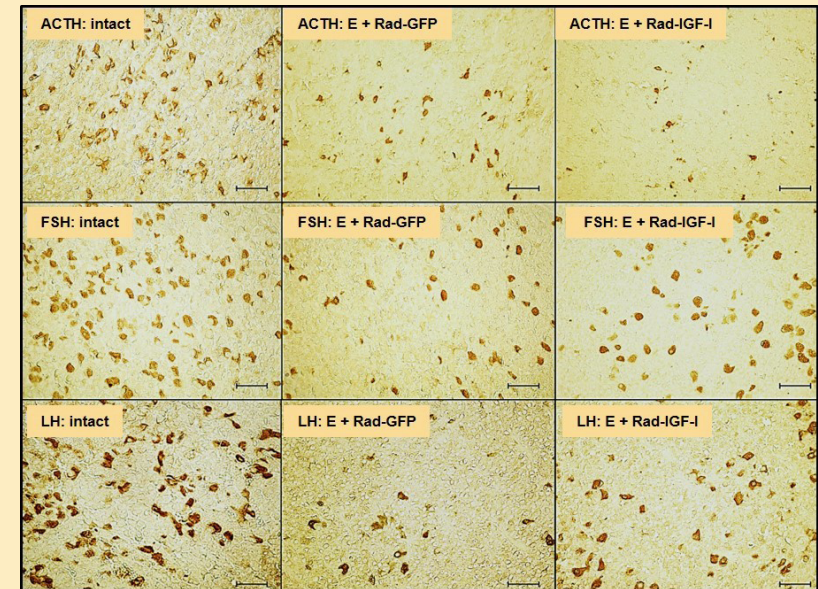


Fig. 20.6. Effects of gene therapy on pituitary populations. Groups : intact, estrogen (E) + Rad-GFP and E + Rad-IGF-I on corticotrope (ACTH), folliculotrope (FSH) and luteinizing populations. En Vision peroxidase, anti-PRL/GH/TSH, x 300) (Camihort et al. 2010).

Biosynthesis and secretion of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) are under the excitatory and inhibiting control by means of a number of paracrine factors, including IGF-I, which can modify the synthesis of GnRH and its actions on gonadotropes (Chandrashekar and Bartke, 2003). Tilemans et al. (1992) demonstrated that the development of rat lactotropes, somatotropes and corticotropes is modulated by GnRH and that this action is mediated by growth factors released by gonadotropes. Estrogen-induced changes in the *pars distalis* may be

que el desarrollo de las lactotropas, somatotropas y corticotropas de rata es modulado por la GnRH y que esta acción es mediada por factores de crecimiento liberados por las gonadotropas. Los cambios inducidos por los estrógenos en la *pars distalis* pueden estar asociados con efectos sobre las gonadotropas, relacionados con el mecanismo de retroalimentación negativo o en conexión a otras células pituitarias (Blake y col., 2005). El estradiol y el IGF-I ejercieron efectos antiapoptóticos y controlaron el tamaño de las gonadotropas (Melamed y col., 1999). Nuestro grupo E2 + RAD-IGF-I, pero no el E2 + RAD-GFP, revirtió este descenso en el tamaño y la densidad celular de las gonadotropas confirmando el efecto restaurativo del IGF-I transgénico sobre los tumores pituitarios estrógeno-inducidos (Cónsole y col., 2009). La incubación de células pituitarias con IGF-I por 7 a 10 días en salmónes resultó en una mayor liberación de FSH, con mantenimiento del contenido celular de FSH y LH (Baker y col., 2000). El efecto estimulador del IGF-I sobre la síntesis de LH en el salmón Atlántico fue ejercido a través del incremento específico del nivel de transcripción de la subunidad β (Schmitz, 2004). El IGF-I tuvo efectos diferenciales sobre las gonadotropinas de los adenomas de la pituitaria anterior, estimulando la FSH e inhibiendo o sin efecto sobre la LH *in vitro*, con un incremento de la viabilidad y del número de las células secretoras de glicoproteínas tumorales al entrar en fase S de proliferación (Atkin y col., 1993). La secreción de PRL fue inhibida de modo tónico por la dopamina hipotalámica y los esteroides ováricos controlaron su liberación, actuando sobre la población lactotropa (DeMaría y col., 2000).

Nuestro estudio resulta una efectiva terapia génica tumoral usando el gen de un péptido bioactivo. El tratamiento parece actuar principalmente sobre el tamaño de las células lactotropas y su actividad secretora, sin alteraciones en el número de células. Los datos son congruentes con los trabajos documentados en los que los adenomas pituitarios estrógeno-inducidos presentaron niveles disminuidos del contenido de ARNm IGF-I y que el tamoxifeno incrementó en los adenomas involutivos (Hána et al., 1998). Nuestros resultados también concuerdan con

associated with effects on the gonadotropes, related with the mechanisms of negative feedback or in connection with other pituitary cells (Blake et al., 2005). Estradiol and IGF-I exerted antiapoptotic effects and controlled the size of gonadotropes (Melamed et al., 1999). Our E2 + RAD-IGF-I group, but not E2 + RAD-GFP, reverted the decrease in size and cell density of gonadotropes, thus confirming the restorative effect of transgenic IGF-I on estrogen-induced pituitary tumors (Cónsole et al., 2009). Incubation of pituitary cells with IGF-I for 7 to 10 days in salmon resulted in a higher release of FSH, maintaining cell content of FSH and LH (Baker et al., 2000). The stimulating effect of IGF-I on LH synthesis in the Atlantic salmon was exerted through specific increment of the transcription level of subunit β (Schmitz, 2004). IGF-I exerted differential effects on adenoma gonadotropins of the anterior pituitary, stimulating FSH and inhibiting or causing no effect on LH *in vitro*, with an increment of the viability and number of secretory cells of tumoral glycoproteins when entering phase S of proliferation (Atkin et al., 1993). The secretion of PRL was tonically inhibited by dopamine of hypothalamic origin and ovarian steroids control the release of PRL, affecting the lactotrope population (DeMaría et al., 2000).

Our study results to be an effective tumoral gene therapy using the gene of a bioactive peptide. The treatment appears to affect mainly the cell size of lactotropes and their secretory activity, with no alterations in cell number. Data are consistent with the documented work where estrogen-induced pituitary adenomas presented decreased levels of mRNA IGF-I content and tamoxifen incremented involutive adenomas (Hána et al., 1998). Our results also agree with the evidence estrogen exerted an antiproliferative action on lactotropes in the presence of insulin or IGF-I (Kawashima et al., 2002; Ishida et al., 2007).

Although there have been important advances in the treatment of pituitary tumors with surgery, chemotherapy and pharmacological essays, a totally satisfactory response has not been obtained yet (Shimon and Melmed, 1998). In this context, gene therapy appears as an apparently potential alternative for the treatment of pituitary tumors. Early stu-

la evidencia de que el estrógeno tuvo una acción antiproliferativa sobre las lactotropas en presencia de insulina o IGF-I (Kawashima y col., 2002; Ishida y col., 2007).

Aunque se han hecho importantes avances en el tratamiento de los tumores pituitarios con cirugía, quimioterapia y ensayos farmacológicos, aun no se ha tenido una respuesta totalmente satisfactoria (Shimon y Melmed, 1998). En este contexto, la terapia génica aparece como una potencial alternativa para el tratamiento de los tumores pituitarios. Un vector adenoviral, el RAdTK, transportando el HSV-1 con el gen suicida timidina quinasa (TK), bajo control del promotor del citomegalovirus humano (hCMV), fue usado para transferir el gen TK en las células tumorales pituitarias GH₃ y AtT₂₀ de roedores con una prodroga ganciclovir que causó la destrucción de los cultivos porque la fosforilación deviene tóxico al TK viral (Windeatt y col., 2000). En el mismo estudio, los prolactinomas inducidos con estrógenos fueron inyectados mediante estereotaxia con RAdTK. Las inyecciones subsecuentes en animales huéspedes con 2 dosis diarias intrapituitarias de 25 mg de ganciclovir/kg durante 7 días determinaron una reducción parcial del tamaño tumoral y de los niveles séricos de PRL. Otro tipo de estrategia de terapia génica para el tratamiento de los tumores pituitarios se basa en la transferencia de genes con habilidad para rescatar el fenotipo normal de las células neoplásicas, en base al que se implementó en los ratones heterocigotas para el retinoblastoma con gen supresor (ratón Rb^{+/-}). El gen del retinoblastoma es el supresor tumoral prototipo. Los tumores pituitarios espontáneos melanotropos que surgen en ratones Rb^{+/-} fueron tratados con un adenovirus recombinante que lleva el ADNc RB y se logró la disminución de la proliferación tumoral (Hu y col., 1994; Riley y col., 1996).

El mecanismo por el cual la sobreexpresión pituitaria del IGF-I inhibió el crecimiento de las lactotropas y la secreción de PRL no está claro. Aunque el estrógeno es conocido que incrementa la expresión pituitaria de ARNm IGF-I, esto también aumenta la expresión del ARNm IGF-BP2 (proteína 2 unida al IGF) (Michels y col., 1993). Ya que nuestro ensayo involucra la sobreexpresión pituitaria del transgénico IGF-I, es

dies have demonstrated that a herpes simplex type-1 (*HSV-1*)-derived vector was effective *in vivo* for gene transfer in rat pituitary prolactinomas (Bolognani et al., 2001). An adenoviral vector, RAdTK, expressing HSV-1 with suicide gene thymidine kinase (TK), controlled by human cytomegalovirus (hCMV) promoter was used to transfer TK gene in the pituitary tumoral cells GH₃ and AtT₂₀ of rodents with the prodrug ganciclovir (GCV) that caused destruction of cultures since phosphorylation makes viral TK toxic (Windeatt et al., 2000). In the same study, estrogen-induced prolactinomas were stereotaxically injected with RAdTK. Subsequent injection of the host animals with 2 daily intrapituitary doses of ganciclovir (25 mg/kg) for 7 days succeeded in partially reducing tumor size and serum PRL levels. Another type of gene therapy strategy for the treatment of pituitary cancer is that based on the transfer of genes with the ability to rescue the normal phenotype of tumor cells. This approach has been implemented in heterozygous mice for the retinoblastoma tumor suppressor gene (*Rb*^{+/-} mice). Retinoblastoma gene (*Rb*) is the prototype tumor suppressors. Spontaneous melanotrope pituitary tumors that appear in *Rb*^{+/-} mice were treated with a recombinant adenoviral vector harboring RB ADNc and decrease of tumoral proliferation was achieved (Hu et al., 1994; Riley et al., 1996).

The mechanism by which pituitary overexpression of IGF-I inhibited lactotrope growth and PRL secretion is not clear. Although estrogen is known to increase pituitary expression of IGF-I mRNA, it also increases the expression of IGF-BP2 mRNA (IGF binding protein 2) (Michels et al., 1993). Since our approach involves pituitary overexpression of transgenic IGF-I, probably not paralleled by a concomitant increase in IGF-BP2, the possibility exists that high levels of free IGF-I exert an inhibitory action on lactotropes.

It is well-established that IGF-I exerts a potent negative feedback on somatotropes (Morita et al., 1987; Yamashita and Melmed, 1987). Since lactotropes and somatotropes have a common origin, it seems conceivable that pituitary concentrations of free IGF-I could have an inhibitory action on lactotropes. Serum levels of bioactive IGF-I diminished with age in healthy

probable que haya un concomitante incremento de IGF-BP2. Existe la posibilidad de que los altos niveles de IGF-I libre ejerzan un efecto inhibitorio sobre las lactotropas.

Está bien establecido que el IGF-I actúa como un potente mecanismo de retroalimentación negativo sobre las somatotropas (Morita y col., 1987; Yamashita y Melmed, 1987), ya que las lactotropas y somatotropas tienen un origen común, parece concebible de que las concentraciones pituitarias de IGF-I libre puedan tener una acción inhibitoria sobre las lactotropas. Los niveles séricos de IGF-I bioactivo disminuyeron con la edad en adultos sanos (Vestergaard y col., 2013). Además, se ha comunicado que los ratones hembras heterocigotas 129/SvPas con inactivación del receptor de IGF-I (RIGF-I) extendieron su vida útil, logrando una mayor longevidad (Xu y col., 2014).

Concluimos que la terapia génica con IGF-I tiene un efecto beneficioso sobre los tumores pituitarios estrógeno-inducidos y resta determinar si el IGF-I puede tener efectos sobre otros adenomas pituitarios. La terapia génica con IGF-I podría ser una efectiva terapia adyuvante de los tratamientos convencionales de los tumores pituitarios humanos (Rodríguez y col., 2009).

Referencias

- Atkin S, Landolt A, Jeffreys R, Hipkin L, Radcliffe J, Squire C, White M. Differential effects of insulin-like growth factor I on the hormonal product and proliferation of glycoprotein-secreting human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(4):1059-66.
- Bach M, Bondy C. Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 1992; 131(6):2588-94.
- Baker D, Davies B, Dickhoff W, Swanson P. Insulin-like growth factor I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from coho Salmon pituitary cells in vitro. *Biol Reprod* 2000; 63(3):865-871.

adults (Vestergaard et al., 2013). Also, it has been reported that 129/SvPas heterozygous female mice with inactivation of IGF-I (RIGF-I) receptor extended their lifespan, thus achieving longer longevity (Xu et al., 2014).

We conclude that IGF-I gene therapy with has a beneficial on estrogen-induced pituitary tumors. It remains to be determined whether IGF-I may have similar beneficial effects on other types of pituitary adenomas. IGF-I gene therapy might emerge as an effective adjuvant to conventional therapies for the treatment of human pituitary tumors (Rodríguez et al., 2009).

References

- Atkin S, Landolt A, Jeffreys R, Hipkin L, Radcliffe J, Squire C, White M. Differential effects of insulin-like growth factor I on the hormonal product and proliferation of glycoprotein-secreting human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(4):1059-66.
- Bach M, Bondy C. Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 1992; 131(6):2588-94.
- Baker D, Davies B, Dickhoff W, Swanson P. Insulin-like growth factor I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from coho Salmon pituitary cells in vitro. *Biol Reprod* 2000; 63(3):865-871.
- Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM. Testosterone and estradiol differentially regulate TSH-induced thyrocyte proliferation in immature and adult rats. *Steroids* 2002; 67(7):573-579.
- Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981; 212(4500):1279-81.
- Blake CA, L. Brown LM, Duncan MW, Hunsucker SW, Helmke SM. Estrogen regulation of the rat anterior pituitary proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; 230(11):800-807.

Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM. Testosterone and estradiol differentially regulate TSH-induced thyrocyte proliferation in immature and adult rats. *Steroids* 2002; 67(7):573-579.

Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981; 212(4500):1279-81.

Blake CA, L. Brown LM, Duncan MW, Hunsucker SW, Helmke SM. Estrogen regulation of the rat anterior pituitary proteome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; 230(11):800-807.

Burek JD. Pathology of aging rats. In: CRC Press, Boca Raton, FL, 1978.

Camihort GA, Hereñú CB, Luna GC, Rodriguez SS, Bracamonte MI, Goya RG, Cónsole GM. Morphological changes induced by insulin-like growth factor-I gene therapy in pituitary cell populations in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2010; 191(4):316-325.

Carol W, Lauterbach H, Klinger G, Unger A, Michels W. Prolactin stimulation using the metoclopramide test in females taking oral contraceptives. *Zentralbl Gynakol* 1988; 110(23):1515-21.

Chandrashekar V, Bartke A. The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. *Reprod Biol* 2003; 3(1):7-28.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Bracamonte MI, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Ferese C, Goya RG. Effect of insulin-like growth factor-I gene therapy on the somatotrophic axis in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(1):20-26.

Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. *Neuro Oncol* 2001; 3(3):152-158.

Bolognani F, Albariño C, Romanowski V, Carri NG, Goya RG. In vitro and in vivo herpetic vector-mediated gene transfer in the pituitary gland: impact on hormone secretion. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(4):497-503.

Burek JD. Pathology of aging rats. In: CRC Press, Boca Raton, FL, 1978.

Camihort GA, Hereñú CB, Luna GC, Rodriguez SS, Bracamonte MI, Goya RG, Cónsole GM. Morphological changes induced by insulin-like growth factor-I gene therapy in pituitary cell populations in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2010; 191(4):316-325.

Carol W, Lauterbach H, Klinger G, Unger A, Michels W. Prolactin stimulation using the metoclopramide test in females taking oral contraceptives. *Zentralbl Gynakol* 1988; 110(23):1515-21.

Chandrashekar V, Bartke A. The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. *Reprod Biol* 2003; 3(1):7-28.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Bracamonte MI, Morel GR, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna GC, Ferese C, Goya RG. Effect of insulin-like growth factor-I gene therapy on the somatotrophic axis in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(1):20-26.

D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.

Daniels GH, Martin JB. Neuroendocrine regulation and diseases of the anterior pituitary and hypothalamus. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. In: eds. Isselbacher KJ, Braunwald E., Wilson J.D., Martin J.B., Fauci A.S & Kasper D.L. McGraw-Hill, New York, 1995:1891-1918.

- Davis FG, McCarthy B. Epidemiology of brain tumors. *Curr Opin Neurol* 2000; 13(6):635-640.
- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.
- Daniels GH, Martin JB. Neuroendocrine regulation and diseases of the anterior pituitary and hypothalamus. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. In: eds. Isselbacher KJ, Braunwald E., Wilson J.D., Martin J.B., Fauci A.S & Kasper D.L. McGraw-Hill, New York, 1995:1891-1918.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10(1):68-91.
- De Laen A, Labrie F. Sensitizing effect of treatment with estrogens on TSH response to TRH in male rats. *Am J Physiol* 1977; 233(3): E235-239.
- DeMaría JE, Livingstone JD, Freeman ME. Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 2000; 879(1-2): 139-147.
- Eppler E, Jevdjovic T, Maake C, Reinecke M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor (IGF-1R) in the rat anterior pituitary. *Eur J Neurosci* 2007; 25(1):191-200.
- Fahy UM, Foster PA, Torode HW, Hartog M, Hull MG. The effect of combined estrogen/progestogen treatment in women with hyperprolactinemic amenorrhea. *Gynecol Endocrinol* 1992; 6(3):183-188.
- Fruchtman S, Jackson L, Borski R. Insulin-like growth factor I disparately regulates prolactin and growth hormone synthesis and secretion: studies using the teleost pituitary model. *Endocrinology* 2000; 141(8):2886-94.
- Goodyer CG, De Stephano L, Guyda HJ, Posner BI. Effects of insulin-like growth factors on adult male rat pituitary function in tissue culture. *Endocrinology* 1984; 115(4):1568-76.
- Halper J, Parnell P, Carter B, Ren P, Scheithauer B. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Investigation* 1992; 66(5):639-645.
- Hána V, Haluzik M, Schreiber V. Independence of estrogen-induced pituitary proliferation on local IGF-I mRNA and EGF mRNA expression. Modifying effects of tamoxifen and tergestin. *Physiol Res* 1998; 47(2):125-131.
- Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Potiansky EL, Goya RG. Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy* 2007; 14(3):237-245.

- Goodyer CG, De Stephano L, Guyda HJ, Posner BI. Effects of insulin-like growth factors on adult male rat pituitary function in tissue culture. *Endocrinology* 1984; 115(4):1568-76.
- Halper J, Parnell P, Carter B, Ren P, Scheithauer B. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Investigation* 1992; 66(5):639-645.
- Hána V, Haluzik M, Schreiber V. Independence of estrogen-induced pituitary proliferation on local IGF-I mRNA and EGF mRNA expression. Modifying effects of tamoxifen and terguride. *Physiol Res* 1998; 47(2):125-131.
- Hereñú CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becú-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL, Goya RG. Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Therapy* 2007; 14(3):237-245.
- Honda J, Takeuchi S, Fukamachi H, Takahashi S. Insulin-like growth factor-I and its receptor in mouse pituitary glands. *Zool Sci* 1998; 15(4):573-579.
- Houben H, Denef C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.
- Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; 9(4):1021-29.
- Ishida M, Takahashi W, Itoh S, Shimodaira S, Maeda S, Arita J. Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types: a study using lactotroph-enriched cells. *Endocrinology* 2007; 148(7):3131-39.
- Jevjovic T, Bernays RL, Eppler E. Insulin-like growth factor-I mRNA and peptide in the human anterior pituitary. *J Endocrinol* 2007; 19(5):335-341.
- Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16(1):3-34.
- Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S, Arita J. The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 2002; 143(7):2750-58.
- Honda J, Takeuchi S, Fukamachi H, Takahashi S. Insulin-like growth factor-I and its receptor in mouse pituitary glands. *Zool Sci* 1998; 15(4):573-579.
- Houben H, Denef C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.
- Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; 9(4):1021-29.
- Ishida M, Takahashi W, Itoh S, Shimodaira S, Maeda S, Arita J. Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types: a study using lactotroph-enriched cells. *Endocrinology* 2007; 148(7):3131-39.
- Jevjovic T, Bernays RL, Eppler E. Insulin-like growth factor-I mRNA and peptide in the human anterior pituitary. *J Endocrinol* 2007; 19(5):335-341.
- Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16(1):3-34.
- Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S, Arita J. The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 2002; 143(7):2750-58.
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont J, Roger P. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 2001; 22(5):631-656.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995; 16(2):143-163.

- Kheirollahi M, Dashti S, Khalaj Z, Nazemroaia F, Mahzouni P. Barin tumors: special characters for research and banking. *Adv Biomed Res* 2015; 4:4.
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont J, Roger P. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 2001; 22(5):631-656.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995; 16(2):143-163.
- Lloyd RV. Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1983; 113(2):198-206.
- Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z. Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of tilapia: apparent roles for insulin-like growth factor I and estradiol. *Endocrinology* 1999; 140(3):1183-91.
- Michels KM, Lee WH, Seltzer A, Saavedra JM, Bondy CA. Up-regulation of pituitary [125I]insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding and IGF binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology* 1993; 132(1):23-29.
- Morita S, Yamashita S, Melmed S. IGF-I action on rat anterior pituitary cells: effects of intracellular messengers on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1987; 121(6):2000-06.
- Nilsson B, Gustavasson-Kadaka E, Bengtsson BA, Jonsson B. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4):1420-1425.
- Oberbauer AM. The regulation of IGF-I gene transcription and splicing during development and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:39.
- Okajima K, Harada N. Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Current Med Chem* 2008; 15(29):3095-3112.
- Lloyd RV. Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1983; 113(2):198-206.
- Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z. Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of tilapia: apparent roles for insulin-like growth factor I and estradiol. *Endocrinology* 1999; 140(3):1183-91.
- Michels KM, Lee WH, Seltzer A, Saavedra JM, Bondy CA. Up-regulation of pituitary [125I]insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding and IGF binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology* 1993; 132(1):23-29.
- Morita S, Yamashita S, Melmed S. IGF-I action on rat anterior pituitary cells: effects of intracellular messengers on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1987; 121(6):2000-06.
- Oberbauer AM. The regulation of IGF-I gene transcription and splicing during development and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:39.
- Okajima K, Harada N. Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Current Med Chem* 2008; 15(29):3095-3112.
- Riley DJ, Nikitin AY, Lee WH. Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb+/- mice. *Nat Med* 1996; 2(12):1316-21.
- Rodríguez S, Castro M, Brown O, Goya R, Cónsole G. Gene therapy of the treatment of pituitary tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2009; 4(4):359-370.

- Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 1997; 18(2):206-228.
- Riley DJ, Nikitin AY, Lee WH. Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb+/- mice. *Nat Med* 1996; 2(12):1316-21.
- Rodríguez S, Castro M, Brown O, Goya R, Cónsole G. Gene therapy of the treatment of pituitary tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2009; 4(4):359-370.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites JP. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting tumors. *Science* 1982; 218:684-686.
- Sarkar DK, Hentges ST, De A, Reddy RH. Hormonal control of pituitary prolactin secreting tumors. *Front Biosci* 1998; 3:934-943.
- Schmitz M. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin subunits expression in Atlantic salmon. *Fish Physiol Biochem* 2004; 28:105-106.
- Shimon I, Melmed S. Management of pituitary tumors. *Annals Int Med* 1998; 129:472-483.
- Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS. Oral contraceptive use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *J Am Med Assoc* 1983; 249(16):2204-07.
- Stefaneanu LL, Powell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A. Somatotroph and lactotroph changes in the adenohipophysis of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 1999; 140(9):3881-89.
- Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76(4):1005-26.
- Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from Central Brain Tumor Registry of United States, 1990-1994. *Neuro Oncol* 1999; 1(1):14-25.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites JP. Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting tumors. *Science* 1982; 218:684-686.
- Sarkar DK, Hentges ST, De A, Reddy RH. Hormonal control of pituitary prolactin secreting tumors. *Front Biosci* 1998; 3:934-943.
- Schmitz M. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin subunits expression in Atlantic salmon. *Fish Physiol Biochem* 2004; 28:105-106.
- Shimon I, Melmed S. Management of pituitary tumors. *Annals Int Med* 1998; 129:472-483.
- Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS. Oral contraceptive use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *J Am Med Assoc* 1983; 249(16):2204-07.
- Stefaneanu LL, Powell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A. Somatotroph and lactotroph changes in the adenohipophysis of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 1999; 140(9):3881-89.
- Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76(4):1005-26.
- Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI. Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 1983; 220(4592):77-79.
- Tilemans D, Andries M, Denef C. Luteinizing hormone-releasing hormone and neuropeptide Y influence deoxyribonucleic acid replication in three anterior pituitary cell types. Evidence for mediation by growth factors released from gonadotrophs. *Endocrinology* 1992; 130(2):882-894.
- van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs R, Meij BP, Mol JA. Effects of corticotrophin-releasing hormone, vasopressin and insulin-like growth factor-I on proliferation of an adrenocorticotrophic hormone secretion

- Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI. Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 1983; 220(4592):77-79.
- Tilemans D, Andries M, Denef C. Luteinizing hormone-releasing hormone and neuropeptide Y influence deoxyribonucleic acid replication in three anterior pituitary cell types. Evidence for mediation by growth factors released from gonadotrophs. *Endocrinology* 1992; 130(2):882-894.
- van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs R, Meij BP, Mol JA. Effects of corticotrophin-releasing hormone, vasopressin and insulin-like growth factor-I on proliferation of an adrenocorticotrophic hormone secretion by canine corticotrophic adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 1998; 138(3):309-315.
- Vestergaard PF, Hansen M, Frystyk J, Espelund U, Christiansen JS, Jorgensen JO, Fisker S. Serum levels of bioactive IGF-I and physiological markers of ageing in healthy adults. *Eur J Endocrinol* 2013; 170(2):229-236.
- Webster J, Ham J, Bevan J, Scanlon M. Growth factors and pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab* 1989; 1(2):95-98.
- Windeatt S, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, Maleniak, T.C., Morris, I.D., Goya, RG, Klatzmann, D., Lowenstein PR, Castro MG. Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3):1296-1305.
- Xu J, Gontier G, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R (+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell* 2014; 13(1):19-28.
- Yamashita S, Melmed S. Insulin-like growth factor-I regulation of growth hormone gene transcription in primary rat pituitary cells. *J Clin Invest* 1987; 79(2):449-452.
- Young EA, Altemus M, Parkison V, Shastry S. Effects of estrogens antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(6):881-891.
- by canine corticotrophic adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 1998; 138(3):309-315.
- Vestergaard PF, Hansen M, Frystyk J, Espelund U, Christiansen JS, Jorgensen JO, Fisker S. Serum levels of bioactive IGF-I and physiological markers of ageing in healthy adults. *Eur J Endocrinol* 2013; 170(2):229-236.
- Webster J, Ham J, Bevan J, Scanlon M. Growth factors and pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab* 1989; 1(2):95-98.
- Windeatt S, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, Maleniak, T.C., Morris, I.D., Goya, RG, Klatzmann, D., Lowenstein PR, Castro MG. Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3):1296-1305.
- Xu J, Gontier G, Chaker Z, Lacube P, Dupont J, Holzenberger M. Longevity effect of IGF-1R (+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation. *Aging Cell* 2014; 13(1):19-28.
- Yamashita S, Melmed S. Insulin-like growth factor-I regulation of growth hormone gene transcription in primary rat pituitary cells. *J Clin Invest* 1987; 79(2):449-452.
- Young EA, Altemus M, Parkison V, Shastry S. Effects of estrogens antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(6):881-891.

CAPÍTULO 21

Isoformas de la prolactina

La secreción de la prolactina (PRL) está determinada por una sumatoria de factores: la luz que ajusta el ritmo circadiano, las señales provenientes del medio interno-externo y los estímulos asociados al estado reproductivo. Esta información es procesada en el hipotálamo y enviada hacia la hipófisis, a través del sistema porta hipofisario y las terminales axónicas. La PRL es una hormona clave en numerosos procesos fisiológicos que contribuyen a la supervivencia de los seres vivos de las diferentes especies.

El sistema neuroendocrino regula los ritmos biológicos mediante señales internas desencadenantes de los procesos fisiológicos, a través de la glándula hipófisis, el hipotálamo y la glándula pineal. En la hipófisis se integra la información autocrina y paracrina de la glándula que culmina con la liberación o inhibición de la secreción de la PRL (Denef, 2008). Numerosos estudios sobre la síntesis, el procesamiento y la secreción de PRL han sido realizados utilizando una línea celular GH₃ que deriva de un

CHAPTER 21

Prolactin isoforms

Prolactin (PRL) secretion is determined by a combination of factors: circadian rhythm adjusted by light, signals from the inner-outer environment and stimuli associated with reproduction. This information is processed in the hypothalamus and sent to the hypophysis through the hypophyseal portal system and axon terminals. PRL is a key hormone in numerous physiological processes that contribute to the survival of living organisms of different species.

The neuroendocrine system regulates the biological rhythms by means of inner signals triggering physiological processes through the pituitary gland, the hypothalamus and the pineal gland. In the hypophysis autocrine and paracrine information is integrated, which culminates with the release or inhibition of PRL secretion (Denef, 2008). Numerous studies on the PRL synthesis, processing and secretion have been carried out using one GH₃ cell line that derives from a pituitary tumor that can only release PRL or GH-PRL, but which is not capable of storing the

tumor hipofisario que puede liberar sólo PRL o GH-PRL, pero es incapaz de almacenar la hormona en los gránulos secretorios. Las transcripciones de los genes de PRL se degradan en las células tumorales con un fenotipo somatotropo puro y plantean la posibilidad de una transdiferenciación de mammosomatotropas a somatotropas que implica una regulación post-transcripcional de la expresión génica de la PRL (Billis y col., 1992).

El hipotálamo es un centro integrador nervioso que sintetiza neuropéptidos y neurotransmisores y un órgano endocrino productor de hormonas que regulan la actividad de la hipófisis. El polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) es producido por las neuronas hipotalámicas que llegan a la eminencia media, por lo que es sugerido como una hormona hipofisotrófica. Se estudió la actividad del PACAP en animales con lesión hipotalámica que mostraron una estimulación en la liberación de PRL *in vivo*, debido a la ausencia de dopamina (DA). En realidad, el PACAP estimularía la liberación de un factor paracrino que inhibiría a la población lactotropa (Jarry y col., 1992). Las neuronas hipotalámicas que sintetizan catecolaminas han sido clasificadas en zonas con letras A1 a A15, de acuerdo a su distribución rostrocaudal en el sistema nervioso central (SNC).

La DA es una molécula pequeña cuya atenuación o hiperactividad puede desencadenar trastornos como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia. La DA se une a receptores tipo 2 que están funcionalmente ligados a los canales de membrana y a las proteínas G, suprimiendo la actividad secretora de las lactotropas. La generación de animales transgénicos con genes sobreexpresados o mutados amplió la comprensión de las interacciones DA-PRL.

Las neuronas que sintetizan DA en los núcleos periventriculares y arcuato (A14 y A12, respectivamente) dirigen sus axones hacia los capilares primarios de la eminencia media, la *pars intermedia* y la *pars nervosa* proveyendo DA a la glándula hipófisis. Se pueden dividir en tres sistemas de acuerdo a la distribución rostrocaudal de las neuronas y a la localización hipofisaria de las terminales nerviosas. La DA actúa como un inhibidor de la PRL y la hiperprolactinemia se ha beneficiado con la generación de drogas dopaminérgicas selectivas (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001) (**fig. 21.1**).

hormone in the secretory granules. PRL genes transcripts are degraded in tumor cells displaying a pure somatotrope phenotype and which raise the possibility that the transdifferentiation of mammosomatotropes to somatotropes involves posttranscriptional regulation of PRL gene expression (Billis et al., 1992).

The hypothalamus is a nerve integrating center that synthesizes neuropeptides and neurotransmitters, and an endocrine organ that produces hormones regulating the activity of the hypophysis. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is produced by the hypothalamic neurons reaching the median eminence, suggesting that it may be a hypophysiotropic hormone. PACAP activity was studied in hypothalamus-lesioned animals that evidenced stimulation in PRL release *in vivo*, due to the absence of dopamine (DA). In fact, PACAP may stimulate the release of a paracrine factor that would inhibit the lactotrope population (Jarry et al., 1992). Hypothalamic neurons that synthesize catecholamines have been classified into zones with letters A1 to A15, according to their rostro-caudal distribution in the central nervous system (CNS).

DA is a small molecule whose reduction or hyperactivity may trigger disorders such as Parkinson's disease and schizophrenia. DA binds to type 2 receptors that are functionally bound to membrane channels and G proteins, suppressing the secretory activity of lactotropes. The generation of transgenic animals with overexpressed or mutant genes widened the understanding of DA-PRL interactions.

Neurons synthesizing DA in periventricular and arcuate nuclei (A14 and A12, respectively) direct their axons to the primary capillaries of the median eminence, *pars intermedia* and *pars nervosa* providing the pituitary gland of DA. They can be divided into three systems according to the rostrocaudal distribution of neurons and to the localization of the nerve terminals in the pituitary gland. DA acts as a PRL inhibitor and hyperprolactinemia has benefited with the generation of selective dopaminergic drugs (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001) (**fig. 21.1**).

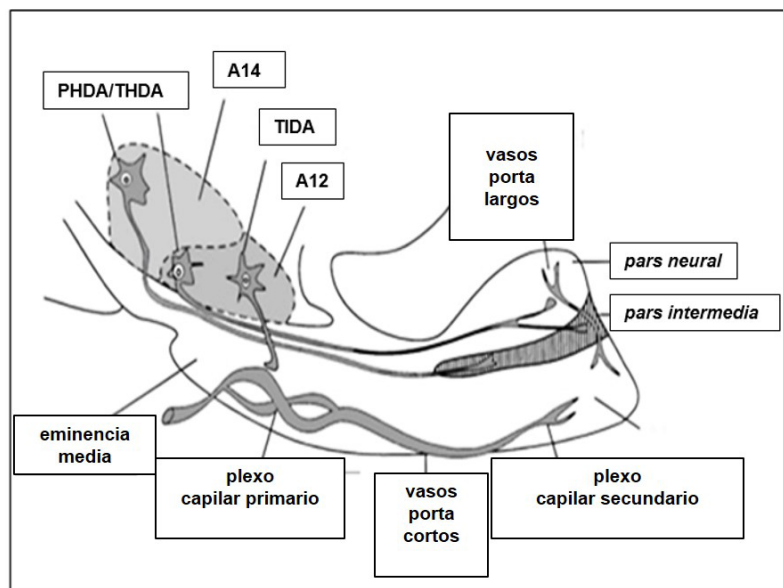


Fig. 21.1. Sistemas hipotalámicos. TIDA: sistema dopaminérgico tuberoinfundibular; PHDA: sistema dopaminérgico periventricular hipotalámico; THDA: sistema dopaminérgico tuberohipofisario (Modificada de Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

1. Sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (TIDA): constituido por neuronas de la parte dorso-medial del núcleo arcuato (A12) que proyectan sus axones a la zona externa de la eminencia media, liberando DA en el espacio perivascular de los capilares del sistema porta largo.

2. Sistema dopaminérgico periventricular hipotalámico (PHDA): formado por las neuronas del núcleo periventricular (A14) cuyos axones terminan en la *pars intermedia*.

3. Sistema dopaminérgico tuberohipofisario (THDA): corresponde a las neuronas de la zona rostral del núcleo arcuato (A12), situadas entre los dos grupos anteriores, que proyectan sus axones hacia la *pars intermedia* y *nervosa*.

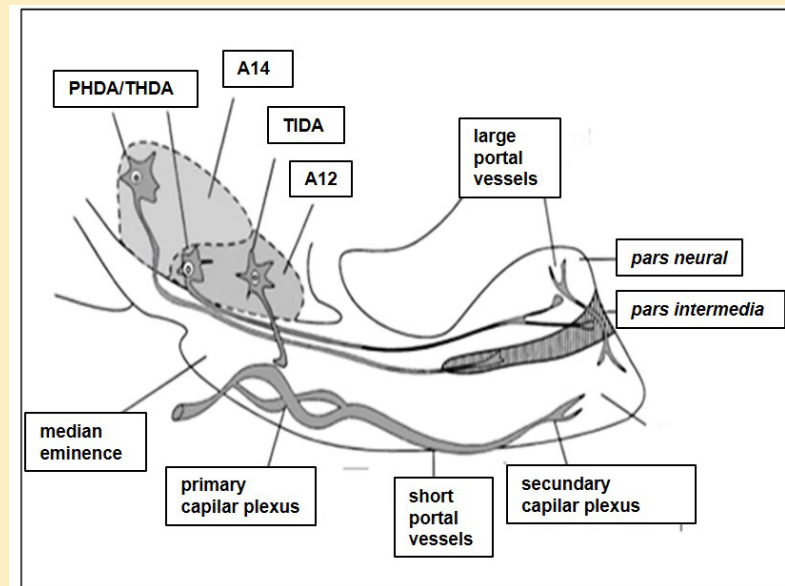


Fig. 21.1. Systems of the hypothalamus. TIDA: tubero-infundibular dopaminergic system; PHDA: periventriculo-hypophysial dopaminergic system; THDA: tubero-hypophysial dopaminergic system (Adapted from Ben-Jonathan and Hnasko, 2001).

1. Tubero-infundibular dopaminergic system (TIDA): constituted by neurons from the dorsomedial part of the arcuate nucleus (A12) that project their axons to the external zone of the median eminence, releasing DA into the perivascular space of the capillaries of the long portal system.

2. Periventriculo-hypophysial dopaminergic system (PHDA): formed by the neurons of the periventricular nucleus (A14) whose axons terminate in the *pars intermedia*.

3. Tubero-hypophysial dopaminergic system THDA): it corresponds to the neurons of the rostral zone of the arcuate nucleus (A12), located between both anterior groups, which project their axons to the *pars intermedia* and *nervosa*.

La PRL está constituida por una cadena simple de aminoácidos, PM de 23 kDa y posee tres puentes disulfuro que unen residuos de cisteína (Cis⁴-Cis¹¹, Cis⁵⁸-Cis¹⁷⁴ y Cis¹⁹¹-Cis¹⁹⁹, en la PRL humana). El péptido está formado por 199 aminoácidos en humanos y 197 en roedores. La homología en la secuencia de aminoácidos varía entre las especies: la PRL humana se asemeja 62% a la del hámster, 97% a la de monos, y 35% a la PRL del salmón (Sinha, 1995). La estructura secundaria está constituida en un 50% por α -hélice y el resto la conforman plegamientos en forma de rulos, no organizados. La estructura terciaria de la PRL humana se estudió en base a su similitud cristalográfica con la GH porcina, pudiéndose predecir la presencia de cuatro regiones de α -hélice (Goffin y col., 1995). La PRL junto con la GH y los lactógenos placentarios forman una familia de hormonas que resultaron de la duplicación de un gen ancestral (Bole-Feysot y col., 1998). La PRL aparece en una multiplicidad de formas post-traduccionales que varían en el tamaño, presentando modificaciones químicas como fosforilación o glicosilación. Se sintetiza a nivel pituitario y extrapituitario (sistema nervioso, útero, glándula mamaria, timo y bazo) (Freeman y col., 2000).

La PRL es un polipéptido secretado primariamente en las células lactotropas hipofisarias, pero también en: linfocitos T, esplenocitos y macrófagos

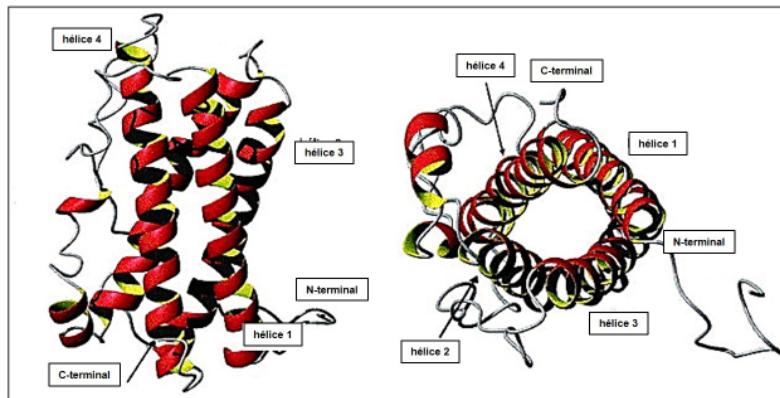


Fig. 21.2. Estructura tridimensional de la PRL humana en solución. Vista lateral de la molécula de PRL en solución, se observa la presencia de cuatro hélices alfa. Molécula de PRL girada 90° hacia atrás, vista desde la parte inferior (Teilum y col., 2005).

PRL is constituted by a single chain of amino acids, 23 kDa PM and possesses three disulfide bridges that bind cysteine residues (Cis⁴-Cis¹¹, Cis⁵⁸-Cis¹⁷⁴ and Cis¹⁹¹-Cis¹⁹⁹, in human PRL). The peptide is formed by 199 amino acids in humans and 197 in rodents. Homology in the amino acid sequence varies among species: human PRL is 62% similar to the one in hamsters, 97% to the one in monkeys, and 35% to PRL in salmon (Sinha, 1995). The secondary structure is 50% α -helical with the rest of the molecule forming unstructured loops. Human PRL tertiary structure is studied on the basis of its crystallographic similarity to porcine GH, four α -helical regions being predicted (Goffin et al., 1995). PRL together with GH and placental lactogen form a family of hormones that appear to have arisen by duplication of an ancestral gene (Bole-Feysot et al., 1998). PRL appears in a multiplicity of posttranslational forms that vary in size and present chemical modifications such as phosphorylation or glycosylation. It is synthesized at pituitary and extrapituitary level (nervous system, uterus, mammary gland, thymus and spleen) (Freeman et al., 2000).

PRL is a polypeptide mainly secreted from hypophyseal lactotrope cells, but also in T lymphocytes, splenocytes and macrophages, present-

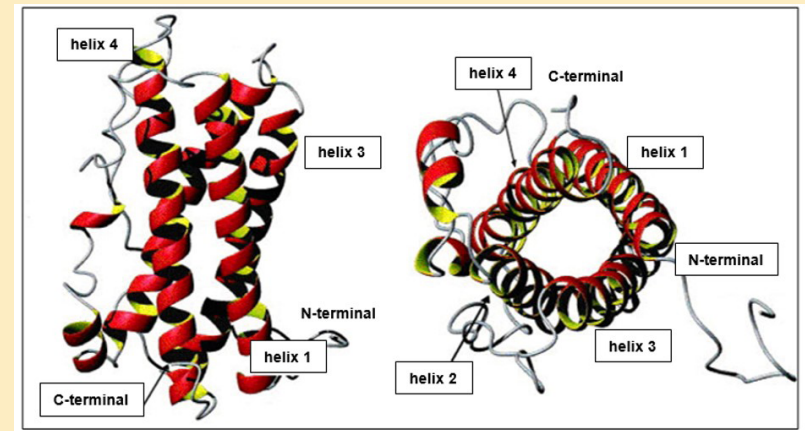


Fig. 21.2. Three-dimensional solution structure of human PRL. Lateral view of the solution PRL molecule, four alpha helices can be observed. Molecule of PRL 90° turned backwards, seen from the inferior part (Teilum et al., 2005).

gos que presentan una PRL-like con una secuencia idéntica a la hipofisaria. Sin embargo, debido a la presencia de un promotor distal, la expresión del gen linfocitario es regulada en forma diferente, como así también el control de su secreción (Gala y Shevach, 1994). En la **fig. 21.2** puede observarse la estructura tridimensional de la PRL humana en solución.

El receptor de la PRL (R-PRL) es una proteína simple unida a la membrana plasmática que pertenece a la superfamilia de los receptores de citoquinas de clase I (Boutin y col., 1988; Cosman y col., 1990). Se han caracterizado tres isoformas del receptor de acuerdo a su longitud: larga, intermedia y corta (Boutin y col., 1988; Bole-Feysot y col., 1998). Las tres isoformas contienen un dominio extracelular, uno transmembrana y otro citoplasmático (Kelly y col., 1991; Lesueur y col., 1991; Bole-Feysot y col., 1998; Kline J. y col. 1999). Se ha descrito en humanos una isoforma soluble que sería el resultado de un empalme alternativo del ARNm (Trott y col., 2003).

La activación del receptor ocurre a través de un mecanismo que involucra una molécula de PRL y dos del receptor. Inicialmente, una zona de la PRL interactúa con el dominio extracelular de una molécula del receptor y otro sitio de la misma interactúa con otro R-PRL, el cual forma un dímero con el primero. Aunque el dominio intracelular del receptor no tiene actividad enzimática intrínseca, la activación que se genera al unirse el ligando fosforila los residuos de tirosina de numerosas proteínas citoplasmáticas, incluyendo al propio receptor (Bole-Feysot y col., 1998). La proteína transdutora de señales y activadora de la transcripción (Stat5) es el transductor de la señal más importante e interactúa con otros transductores como el receptor de glucocorticoides para iniciar una respuesta específica en la célula. La PRL y los glucocorticoides expresan señales que regulan la transcripción de los genes de las proteínas de la leche en las células epiteliales mamarias (Yang y col., 2013). La Stat5 y el receptor de glucocorticoides forman un complejo molecular que coopera en la inducción de la transcripción del gen de la β -caseína (Stocklin y col., 1996 y 1997). Las acciones reproductivas de la PRL son mediadas a través del receptor corto y largo de las isoformas (Devi y Halperin, 2014).

ting a PRL-like sequence identical to the hypophyseal one. However, due to the presence of a distal promoter, the expression of the lymphocyte gene, as well as the control of its secretion, is regulated differently (Gala and Shevach, 1994). In **fig. 21.2** the three-dimensional solution structure of human PRL can be observed.

The PRL receptor (PRL-R) is a single membrane-bound protein that belongs to class I of the cytokine receptors superfamily (Boutin et al., 1988; Cosman et al., 1990). Three receptor isoforms have been characterized according to length: long, intermediate and short (Boutin et al., 1988; Bole-Feysot et al., 1998). The three isoforms contain an extracellular, a transmembrane and a cytoplasmic domain (Kelly et al., 1991; Lesueur et al., 1991; Bole-Feysot et al., 1998; Kline J. et al. 1999). A soluble receptor isoform has been described in humans, which would result from an alternative mRNA splicing (Trott et al., 2003).

The receptor activation occurs through a mechanism involving one PRL molecule and two receptor molecules. Originally, a PRL zone interacts with the extracellular domain of a receptor molecule, and another site of the same molecule interacts with another PRL-R, which forms a dimer with the former. Although the intracellular domain of the receptor has no intrinsic enzymatic activity, the activation which generates by binding of ligand phosphorylates tyrosine residues of numerous cytoplasmic proteins, including the receptor itself (Bole-Feysot et al., 1998). Signal transducer and activator of transcription 5 protein (Stat5) is the most important signal transducer and interacts with other transducers such as the glucocorticoid receptor to start a specific response in the cell. PRL and glucocorticoids express signals that regulate the transcription of milk protein genes in mammary epithelial cells. Stat5 and the glucocorticoid receptor form a molecular complex that cooperates in the induction of transcription of β -casein gene (Stocklin et al., 1996 and 1997). The reproductive actions of PRL are mediated through short and long receptor isoforms (Devi and Halperin, 2014).

Los niveles de PRL en humanos responden a un patrón bifásico. Al mediodía la concentración plasmática alcanza el valor mínimo, luego aumenta levemente en la tarde y se eleva marcadamente durante la noche. En humanos adultos, esta variación representa en promedio un aumento del 250 % respecto al mínimo. La liberación de la PRL se realiza en forma de pulsos, cuya frecuencia es característica de cada individuo, variando entre 7 y 22 pulsos en 24 hs. Esta secreción diaria de PRL responde a un ritmo circadiano generado en el núcleo supraquiásmico del hipotálamo (Waldstreicher y col., 1996). En la rata, a diferencia del humano, hay una fuerte relación entre el patrón del sueño y el nivel de PRL (Obal y col., 1997). El tono dopaminérgico hipotalámico cambia a través del día (Lerant y Freeman, 1997) y las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) disminuyen su actividad antes de la elevación diaria del nivel de PRL (Mai y col., 1994).

La PRL activa los receptores de isoformas que regulan circuitos neuronales específicos y controla funciones relevantes como la conducta maternal, el balance de energía, la ingesta de alimentos, la respuesta al estrés, la ansiedad, la neurogénesis, la migraña y el dolor. Se están estudiando las vías de señalización neuronal inducidas por la PRL y la modulación del potencial transitorio del receptor neuronal y los canales de Ca²⁺ dependientes de canales K⁺, mediante PRL (Patil y col., 2014).

La PRL estimula la proliferación celular a través de la forma larga del receptor de PRL (RPRL). La modulación del canal de K⁺ mediante PRL constituye el evento iónico primario en la señal de transducción que provoca la proliferación celular (Van Coppenolle y col., 2004). Las diferentes isoformas del RPRL ejercen una función diferente a través del dominio intracelular. Se ha documentado que la anomalía en el RPRL está relacionada con la patogénesis, la progresión y el pronóstico de las neoplasias, incluyendo el cáncer de mama (Tan y Peng, 2012).

En la **tabla 1** se presentan las isoformas moleculares de la PRL en la sangre de humanos (grande-grande, grande y monómero o pequeña) y en las lactotropas de roedores (agregados o gránulos, formas intermedias, monómeros).

Levels of human PRL respond to a biphasic pattern. At noon the plasma concentration reaches a minimum value, it slightly increases in the afternoon and markedly rises during the night. In adult humans, this variation represents on average an increase of 250 % compared to the minimum. PRL is released in pulses, and frequency varies in each individual, between 7 and 22 pulses in 24 h. This daily PRL release responds to a circadian rhythm generated in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (Waldstreicher et al., 1996). In the rat, but not in humans, there is a strong relationship between sleep pattern and PRL level (Obal et al., 1997). The dopaminergic hypothalamic tone changes during the day (Lerant and Freeman, 1997) and the tuberoinfundibular dopaminergic neurons (TIDA) diminish their activity before the daily rise in PRL level (Mai et al., 1994).

Prolactin activates PRL receptor isoforms that regulate specific neuronal circuits and control relevant functions including maternal behavior, energy balance, food intake, stress response, anxiety, neurogenesis, migraine and pain. Studies are being done on PRL-induced signaling pathways in neurons and the modulation of neuronal transient receptor potential (TRP) and Ca²⁺ dependent K⁺ channels by PRL (Patil et al., 2014).

PRL stimulates cell proliferation through the long form of PRL receptor (PRL-R). Modulation of K (+) channel by PRL constitutes the primary ionic event in signal transduction leading to cell proliferation (Van Coppenolle et al., 2004). Different PRL-R isoforms exert different function through different intracellular domain. It has been documented that abnormality of PRL-R is related to the pathogenesis, progression and prognosis of cancers including breast cancer (Tan and Peng, 2012).

In **table 1** molecular isoforms of PRL in human blood (big-big, big and monomer or small) and in rodent lactotropes (aggregates or granules, intermediate forms and monomers) are observed.

Tabla 1. Las isoformas moleculares de la PRL (Carino, 2010).

CIRCULACIÓN (humanos)	LACTOTROPAS (roedores)
BIG-BIG PM 150-170 KDa	Agregados
BIG PM 40-60 KDa	Formas intermedias
Monómero PM 23-24 KDa	Monómeros

Un único gen codifica el péptido que genera las isoformas moleculares de la hormona. Entre estas variantes se incluyen las modificaciones en la longitud que alteran el PM de la hormona y en las formas glicosiladas, fosforiladas o sulfatadas, cuyos PM difieren muy poco del péptido original. Dichos cambios afectan las propiedades biológicas e inmunológicas de la PRL, determinando su rol tanto en la fisiología como en ciertos cuadros clínicos (Leaños-Miranda y col., 2001 y 2006).

A. Variantes de la PRL de diferente PM

1. PRL de PM menor de 23kDa

Existen evidencias que indican modificaciones de longitud del péptido en el órgano blanco. Han sido encontrados pequeños péptidos en los folículos ováricos en crecimiento y en el líquido folicular de la rata (Nolin, 1980 y 1985). Se ha observado que la PRL puede ser escindida en un fragmento de 16 kDa y éste actuaría como inhibidor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Ferrara y col 1991; Clapp, 1987). La inhibición de la angiogénesis local podría ser una estrategia alternativa en el tratamiento del cáncer de mama (Goffin y col., 1999). Además, este fragmento tendría un rol en procesos inflamatorios, inmunológicos y cardiovasculares (Corbacho y col., 2000; Ignacak y col., 2012).

Un fragmento 22 kDa pudo ser detectado en extractos de hipófisis de rata, utilizando la técnica de Western blot, con un anticuerpo

Table 1. Molecular isoforms of PRL (Carino, 2010).

CIRCULATION (humans)	LACTOTROPES (rodents)
BIG-BIG PM 150-170 KDa	Aggregates
BIG PM 40-60 KDa	Intermediate forms
Monomer MW 23-24 KDa	Monomers

A single gene encodes the peptide that generates the molecular isoforms of the hormone. Among these variants are included length modifications that alter the hormone MW and in the glycosylation, phosphorylation and sulfate forms, with a slightly different MW from that of the original peptide. These changes affect biological and immunological properties of PRL, determining its role both in physiology and in certain clinical pictures (Leaños-Miranda et al., 2001 and 2006).

A. Variants of PRL with different MW

1. PRL with lower MW than 23kDa

Some evidence indicates modifications in the length of the peptide in the target organ. Small peptides have been found in the growing ovarian follicles and in the follicular fluid in the rat (Nolin, 1980 and 1985). It has been noticed that PRL can be segmented in a 16-kDa cleavage fragment and this may act as inhibitor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ferrara et al 1991; Clapp, 1987). Inhibition of local angiogenesis might be an alternative strategy in the treatment of breast cancer (Goffin et al., 1999). Also, this fragment might have a role in inflammatory, immunologic and cardiovascular processes (Corbacho et al., 2000; Ignacak et al., 2012).

A 22-kDa fragment was detected in rat pituitary extracts by Western blot using a specifically produced antibody. Production and release of

producido específicamente. La producción y liberación del fragmento proteolítico en la hipófisis es específico de las ratas hembras y es sensible a la acción inhibitoria de la DA (Anthony y col., 1993).

2. PRL de PM mayor de 23kDa

Se han descrito tres isoformas de la PRL en sangre de humanos: pequeña o monomérica (L-PRL) (PM 23 kDa), grande (B-PRL) (PM 45-60 kDa) y muy grande o macroPRL (BB-PRL) (PM 100 kDa) (Suh y Frantz, 1974; Fang y Refetoff, 1978). En individuos normales y en pacientes con hiperprolactinemia más del 80% de la PRL es una isoforma monomérica (Glezer y col., 2006). La caracterización de BB-PRL ha revelado que en la mayoría de los casos se trata de un complejo de PRL y un autoanticuerpo IgG anti-PRL (Schiettecatte y col., 2001). En muy pocos individuos, en su mayoría mujeres, predomina la BB-PRL (Larrea y col., 1987; Hattori and Inagaki, 1997). Esta forma molecular tienen menor actividad biológica que el monómero (Sinha, 1995) y en general, los pacientes no presentan los síntomas asociados con la hiperprolactinemia, tales como alteraciones en el ciclo menstrual y/o galactorrea (Whittaker y col., 1981). Se ha postulado que la ausencia de síntomas es debida al elevado PM de la BB-PRL, que no permitiría el paso de la molécula a través de la pared capilar (Leite y col., 1992). Además, en relación con su elevado PM, se retrasa su depuración y se detecta por la mayoría de los métodos inmunológicos. Esto conduciría a diagnósticos de pseudohiperprolactinemia en estos pacientes. De aquí la importancia del rol de este complejo macromolecular en la detección y el diagnóstico diferencial de los tipos de hiperprolactinemia (Cavaco y col., 1995).

Otras formas heterogéneas menos comunes han sido descritas en pacientes con prolactinomas y están compuestas por polímeros de forma monomérica, unidos en forma covalente o no-covalente, con un PM que puede alcanzar el valor de 500 kDa (Mounier y col., 2003).

B. Isoformas glicosiladas

En la **fig. 21.3** se presentan las formas glicosiladas hPRL y rPRL.

proteolytic fragments from the pituitary gland is specific to female rats and sensitive to inhibition by DA (Anthony et al., 1993).

2. PRL with higher MW than 23kDa

Three PRL isoforms have been described in human blood: small or monomeric (L-PRL) (PM 23 kDa), big (B-PRL) (PM 45-60 kDa) and very big or macro PRL (BB-PRL) (PM 100 kDa) (Such and Frantz, 1974; Fang and Refetoff, 1978). In normal subjects and in hyperprolactinemic patients more than 80% of PRL is a monomeric isoform (Glezer et al., 2006). BB-PRL characterization has revealed that in most cases a PRL complex and an IgG anti-PRL autoantibody are present (Schiettecatte et al., 2001). BB-PRL predominates in very few subjects, mainly women (Larrea et al., 1987; Hattori and Inagaki, 1997). This molecular form presents less biological activity than monomers (Sinha, 1995) and generally, patients do not present symptoms associated to hyperprolactinemia, such as alterations in the menstrual cycle and/or galactorrhea (Whittaker et al., 1981). It has been postulated that the absence of symptoms is due to the high MW of BB-PRL, which may not allow the crossing the capillary walls (Leite et al., 1992). Also, related to the high MW, depuration is delayed and is detected with most immunological methods. This would lead to diagnosis of pseudohyperprolactinemia in these patients. Hence the importance of the role of this macromolecular complex in the detection and differential diagnosis of the types of hyperprolactinemia (Cavaco et al., 1995).

Other less common heterogeneous forms have been described in patients with prolactinomas and they are formed by monomeric-shaped polymers with covalent or noncovalent bond with a MW that can reach 500 kDa (Mounier et al., 2003).

B. Glycosylated isoforms

Figure 21.3 presents hPRL and rPRL.

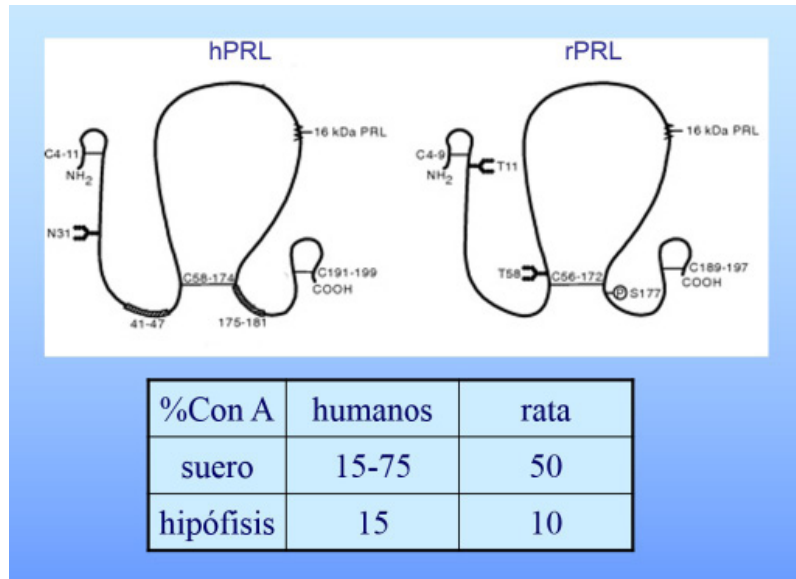


Fig. 21.3. Isoformas glicosiladas (Carino, 2010).

En la hipófisis de mamíferos, anfibios y aves ha sido encontrada PRL glicosilada. La glicosilación ocurre en el complejo de Golgi y la unión de los oligosacáridos se hace a través del nitrógeno del aminoácido asparagina (N-glicosilación) o del oxígeno de la serina o la treonina (O-glicosilación). El grado de glicosilación varía entre 1 y 60% en las diferentes especies y, dentro de ellas, según el estado reproductivo. La proporción de residuos de carbohidratos (ácido siálico, fucosa, manosa y galactosa) varía entre especies y depende del estado fisiológico o patológico del individuo (Sinha, 1995). La glicosilación modifica la carga de la molécula de PRL, disminuye la actividad biológica (Markoff y col., 1988; Sinha y col., 1991) y representa un impedimento estérico en la unión a su receptor. Además, disminuye la reactividad inmunogénica (Haro y col., 1990) y altera la depuración de la hormona. En humanos, se demostró por primera vez la existencia de PRL glicosilada utilizando cromatografía de afinidad (Shoupe y col., 1983). El único sitio N-glicosilado en humanos es el residuo de asparagina de la posición 31 (Lewis y col., 1984). La PRL

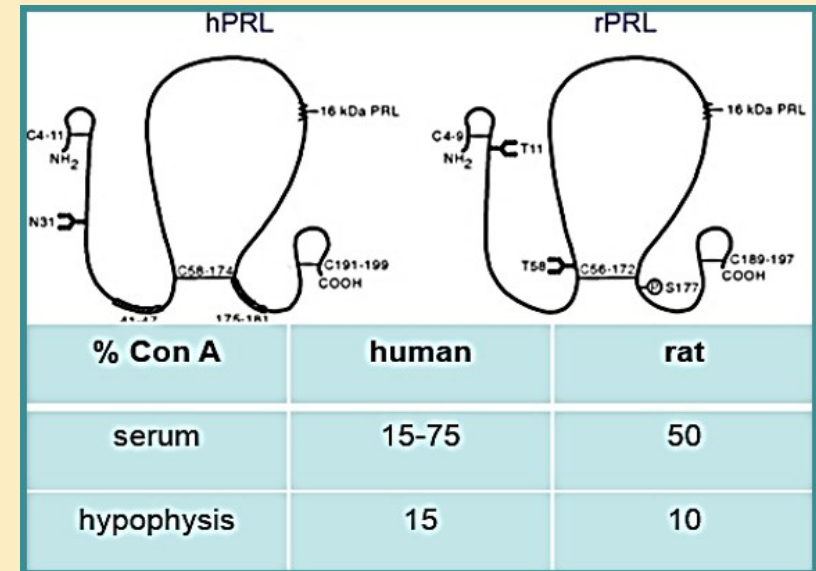


Fig. 21.3. Glycosylated isoforms (Carino, 2010).

Glycosylated PRL has been found in the pituitary gland of mammals, amphibians and birds. Glycosylation occurs in the Golgi complex and oligosaccharide-binding takes place through nitrogen of asparagine (N-glycosylation) or the oxygen of serine or threonine (O-glycosylation). The degree of glycosylation varies between 1 and 60% in the different species and, within them, according to the reproductive state. The proportion of carbohydrate residue (sialic acid, fucose, mannose and galactose) varies between species and depends on the physiologic or pathologic state of the individual (Sinha, 1995). Glycosylation modifies the charge of the PRL molecule, diminishes the biologic activity (Markoff et al., 1988; Sinha et al., 1991) and represents a steric impediment in the union to its receptor. Also, it diminishes the immunogenic reactivity (Haro et al., 1990) and alters the hormone depuration. In humans, the existence of glycosylated PRL was first demonstrated using affinity chromatography (Shoupe et al., 1983). The only N-glycosylated site in humans is the residue of asparagine at position 31 (Lewis et al., 1984). Glycosylated PRL represents 15% of pituitary PRL and

glicosilada representa el 15% de la PRL hipofisaria y el 15-25% de la plasmática (Colombani y Scaglia, 1996). Estudios realizados en PRL recombinante humana, equivalente a la PRL hipofisaria, han demostrado la presencia de una isoforma glicosilada de 25 kDa con diferentes grados de sialilación y el análisis de los oligosacáridos determinó la existencia de formas bi- y triantenarias (Price y col., 1995).

C. Otras variantes de la PRL

En las vesículas secretorias de las células lactotropas se pueden esterificar los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina. Este proceso genera, antes de la exocitosis, una molécula de PRL fosforilada con una carga neta negativa. Esto ha sido demostrado *in vitro* pero no hay datos que confirmen *in vivo* su secreción (Sinha, 1995). En hipófisis de ratas hembras, la fosforilación de la PRL y la relación PRL fosforilada/no-fosforilada estaría regulada durante el ciclo estral (Ho y col., 1993). Además, en las células lactotropas, péptidos y proteínas pueden ser desaminados. Los residuos de asparagina y glutamina pierden amonio y se genera una molécula más ácida. Si bien ha sido hallada PRL desaminada en extractos de hipófisis, no hay evidencias que indiquen su presencia en el plasma o su secreción durante estados fisiológicos (Sinha, 1995). La sulfatación de los residuos de tirosina es otra de las modificaciones post-traduccionales que ocurren en las proteínas de organismos multicelulares. Esto se ha descrito en la PRL ovina donde la sulfatación de la tirosina se hace en el trans-Golgi, pero no se conoce su significado fisiológico (Baeuerle y Huttner, 1987; Sinha, 1995).

D. Actividad biológica de las variantes moleculares

Las variantes moleculares de la hormona PRL exhiben diferente grado de actividad biológica en el bioensayo de las células Nb2 (Price, 1995; Larrea y col., 1997). Esta línea celular proviene de un linfoma de rata cuyas células T poseen características similares a los linfocitos inmaduros (Noble y col., 1980). La replicación celular es específicamente estimulada por hormonas lactogénicas, como la PRL humana, ovina, bovina y de rata, en forma dosis dependiente y en un rango de concentración de 10 pg/ml a 1 ng/ml (Ta-

15-25% plasmatic PRL (Colombani and Scaglia, 1996). Studies on human recombinant PRL, equivalent to pituitary PRL, have demonstrated the presence of a glycosylated isoform of 25 kDa with different degrees of sialylation and the analysis of oligosaccharides determined the existence of bi- and triantennary forms (Price et al., 1995).

C. Other PRL variants

In the secretory vesicles of lactotroph cells esterification of hydroxyl groups of serine and threonine can be observed. Before exocytosis, this process generates a molecule of phosphorylated PRL with a negative net charge. This has been demonstrated *in vitro* but no data can confirm *in vivo* its secretion (Sinha, 1995). In female rat pituitaries, phosphorylation of PRL and the ratio phosphorylated/non-phosphorylated PRL may be regulated during the estrous cycle (Ho et al., 1993). Also, peptides and proteins can be deaminated in lactotroph cells. Residues of asparagine and glutamine lose ammonium and a more acidic molecule is generated. Even though deaminated PRL has been found in pituitary extracts, there is no evidence indicating it is present in plasma or that it secretes during physiological stages (Sinha, 1995). Sulfation of tyrosine residues is another posttranslational modification that occurs in proteins of multicellular organisms. This has been described in ovine PRL where sulfation of tyrosine occurs in the trans-Golgi network, though its physiological meaning is unknown (Baeuerle and Huttner, 1987; Sinha, 1995).

D. Biologic activity of molecular variants

The molecular variants of PRL exhibit different degree of biological activity in the cell Nb2 bioassay (Price, 1995; Larrea et al., 1997). This cell line originates in a rat lymphoma whose T cells have characteristics that are similar to immature lymphocytes (Noble et al., 1980). Cell replication is specifically stimulated by lactogenic hormones, such as human, ovine, bovine and rat PRL, in a dose-dependent way and in a concentration range of 10 pg/ml to 1 ng/ml (Tanaka et al., 1980). Using isoelectric

naka y col., 1980). En la rata, mediante técnicas de isoelectroenfoque, han sido caracterizadas cinco isoformas de carga de PRL hipofisaria de 24.3 kDa que presentaron puntos isoeléctricos característicos y diferente actividad mitogénica en el bioensayo de células Nb2. La biopotencia relativa (relación bioactividad/inmunorreactividad) disminuyó progresivamente con el aumento en la carga ácida de la isoforma (Briski y col., 1996).

Ha sido demostrado en humanos que las isoformas glicosiladas de la hormona PRL hipofisaria poseen mayor actividad mitogénica que las isoformas no glicosiladas (Price y col., 1995). Han sido desarrollados nuevos bioensayos homólogos para lactógenos humanos, que han permitido determinar la bioactividad de isoformas de PRL humana en pacientes con hiperprolactinemia, confirmando la importancia de la especificidad de especie en la determinación de la bioactividad de la PRL (Leaños-Miranda et al., 2006).

Las subclases de inmunoglobulina G de los autoanticuerpos anti-PRL muestran predominio de IgG4. La PRL pituitaria humana estaría fosforilada en la serina 194 y la serina 163, mientras la PRL sérica está desfosforilada. En el suero de pacientes hiperprolactinémicas predominó la isoforma con punto isoeléctrico (pI) 6.58 y se detectaron isoformas de PRL más ácidas (pI: 6.43-6.29) en pacientes con autoanticuerpos anti-PRL (Hattori y col., 2005).

Nuestros estudios permitieron analizar los siguientes parámetros:

1. Peso hipofisario, contenido/concentración de la PRL hipofisaria y niveles séricos de PRL durante el desarrollo de los hámsteres machos

Se observaron variaciones significativas ($p < 0.01$) en el peso hipofisario, con un aumento entre los 15-25 días y sin variaciones entre los 30-35 días y se detectó un incremento a los 40 días de edad.

El contenido de la PRL hipofisaria (μg /hipófisis) en los hámsteres machos se modificó en forma significativa ($p < 0.01$) durante el desarrollo, aumentando entre los 15-25 días de edad, pero no se alteró a los 30 días y volvió a incrementarse entre los 35-40 días.

La concentración de la PRL hipofisaria ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) también se modificó en forma significativa ($p < 0.01$) durante el desarrollo. A partir de los 15 días de edad, el contenido y la concentración de PRL hipofisaria

focusing techniques, five isoforms with pituitary PRL charge of 24.3 kDa have been characterized and presented characteristic isoelectric points and different mitogenic characteristic in Nb2 cell bioassay. Relative biopotency (bioactivity/immunoreactivity ratio) progressively diminished with the increase of isoform acid charge (Briskiet al., 1996).

It has been demonstrated that glycosylated isoforms of human PRL possess higher mitogenic activity than non-glycosylated isoforms (Price et al., 1995). New homologous bioassays have been developed for human lactogens which have allowed determining the bioactivity of human PRL isoforms in patients with hyperprolactinemia, thus confirming the importance of species specificity in the determination of PRL bioactivity (Leaños-Miranda et al., 2006).

Immunoglobulin G subclasses of anti-PRL autoantibodies evidence predominance of IgG4. Human PRL is phosphorylated at serin 194 and 163, while serum PRL is dephosphorylated. In the serum of hyperprolactinemic isoforms of patients with isoelectric point was predominant (pI) 6.58 and more acidic PRL isoforms were detected (pI: 6.43-6.29) in patients with anti-PRL autoantibodies (Hattori et al., 2005).

Our studies allowed analyzing the following parameters:

1. Pituitary weight, content/concentration of pituitary PRL and PRL serum levels during the development of male hamsters

Significant variations ($p < 0.01$) are observed in the pituitary weight, with an increase between days 15-25 but no variations between days 30-35 with an increase detected at 40 days of age.

The content of pituitary PRL (μm /hypophysis) in male hamsters was significantly modified ($p < 0.01$) during the development, increasing at 15-25 days of age, but was not altered after 30 days and increased again at days 35-40.

The concentration of pituitary PRL ($\mu\text{m}/\text{mg}$ protein) was also significantly modified ($p < 0.01$) during the development. From the age of 15 days, the content and concentration of pituitary and serum PRL approached adult values in a regular way, with an inflection point at day 30. At 40 days of age the PRL content reached values higher than those

y sérica se aproximaron a los valores del adulto en forma regular, con un punto de inflexión a los 30 días. A los 40 días de edad, el contenido de PRL alcanzó valores superiores a la adultez, mientras que la PRL sérica registró los niveles observados en los animales adultos (tabla 2).

Tabla 2. Peso hipofisario, contenido y concentración de la PRL hipofisaria en los hámsteres machos durante el desarrollo.

Edad (días)	Peso hipofisario (mg)	Contenido PRL (µg/hipófisis)	Concentración PRL (µg/mg de proteína)
15	1,1 ± 0,1 a	0,20 ± 0,03 a	3,45 ± 0,39 a
25	2,1 ± 0,2 b	0,94 ± 0,09 b	8,94 ± 0,78 c
30	2,9 ± 0,3 c	0,93 ± 0,06 b	6,43 ± 0,62 b
35	3,0 ± 0,3 c	1,24 ± 0,13 c	8,07 ± 0,89 c
40	3,7 ± 0,2 d	2,10 ± 0,17 d	11,42 ± 1,39 d

Los datos representan la media ± ES; n=3 (número de pools: cada pool contiene 6 hipófisis). Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

Se determinaron los niveles séricos de PRL (ng/ml) mediante RIE homólogo, en hámsteres normales en desarrollo, en un período comprendido entre los 15-50 días de edad. Se observaron variaciones significativas ($p < 0.01$), mostrando un aumento entre los 15-25 días de edad, una disminución a los 30, un incremento entre los 35-40 días y luego no hubo variaciones hasta los 50 días (tabla 3).

Tabla 3. PRL sérica en hámsteres durante el desarrollo.

Edad (días)	N	PRL (ng/ml)
15	13	2,5 ± 0,3 a
25	6	14,6 ± 2,4 c
30	5	9,0 ± 0,9 b
35	5	12,7 ± 1,1 c
40	6	20,2 ± 4,1 d
50	6	21,6 ± 3,6 d

Los datos representan la media ± ES; n=6/13 animales. Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey ($p < 0.01$).

in adulthood, while serum PRL registered the levels observed in adult animals (table 2).

Table 2. Pituitary weight, content and concentration of pituitary PRL in male hamsters during development

Age (days)	Pituitary weight (mg)	PRL content (µg/hipófisis)	PRL concentration (µg/mg de proteína)
15	1.1 ± 0.1 a	0.20 ± 0.03 a	3.45 ± 0.39 a
25	2.1 ± 0.2 b	0.94 ± 0.09 b	8.94 ± 0.78 c
30	2.9 ± 0.3 c	0.93 ± 0.06 b	6.43 ± 0.62 b
35	3.0 ± 0.3 c	1.24 ± 0.13 c	8.07 ± 0.89 c
40	3.7 ± 0.2 d	2.10 ± 0.17 d	11.42 ± 1.39 d

Data represent the media ± ES; n=3 (number of pools: each pool contains 6 hypophyses). Different letters indicate significant differences. Tukey's Test, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

Serum levels of PRL (ng/ml) were detected by means of RIE homologous, in developing normal hamsters, in a period comprising the 15-50 days of age. Significant variations ($p < 0.01$) were observed, showing an increase between 15-25 days of age, a diminution at day 30, an increase between days 35-40 and no variations until day 50 (table 3).

Table 3. Serum PRL in hamsters during development.

Age (days)	N	PRL (ng/ml)
15	13	2.5 ± 0.3 a
25	6	14.6 ± 2.4 c
30	5	9.0 ± 0.9 b
35	5	12.7 ± 1.1 c
40	6	20.2 ± 4.1 d
50	6	21.6 ± 3.6 d

Data represent the media ± ES; N=6/13 animals. Different letters indicate significant differences. Tukey's Test ($p < 0.01$).

Esto indicaría que a los 40 días de edad hay un aumento en la síntesis de PRL, pero no en la liberación. Todos los datos séricos obtenidos estuvieron en concordancia con los publicados por Vomachka y Greenwald (1979).

2. Peso hipofisario, contenido/concentración de la PRL hipofisaria y niveles séricos de PRL de los hámsteres adultos machos durante el fotoperíodo normal y la fotoinhibición:

No se registraron diferencias significativas en los pesos de las hipófisis de hámsteres mantenidos en el fotoperíodo normal y la fotoinhibición durante 8, 14, 15, 16, 22 y 28 semanas. El contenido y la concentración de la PRL hipofisaria de hámsteres adultos en el fotoperíodo normal (FN) y la fotoinhibición (FI) durante 8, 14, 15, 16, 22 y 28 semanas (FI8s, FI14s, FI15s, FI16s, FI22s y FI28s) se modificaron en forma significativa ($p < 0.01$) entre los grupos FN y FI. Se detectó una variación significativa ($p < 0.01$) entre los grupos FI, con un descenso de ambos parámetros entre las 8 y 16 semanas de fotoinhibición (FI), alcanzando el valor mínimo a las 16 semanas. No se observaron diferencias significativas entre las semanas 14-15. Ambos parámetros se recuperaron en las semanas siguientes a la fotoinhibición (FI22s y FI28s) (tabla 4).

Tabla 4. Peso hipofisario, contenido y concentración de la PRL hipofisaria en los hámsteres adultos machos en el fotoperíodo normal (FN) y en la fotoinhibición (FI).

Fotoperíodo	Peso hipofisario (mg)	Contenido PRL ($\mu\text{g}/\text{hipófisis}$)	Concentración PRL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)
FN	3,6 \pm 0,3 a	1,35 \pm 0,15 a	7,15 \pm 0,92 a
FI 8s	3,7 \pm 0,4 a	0,74 \pm 0,08 b	3,82 \pm 0,42 b
FI 14s	3,8 \pm 0,8 a	0,17 \pm 0,01 e	0,87 \pm 0,91 e
FI 15s	3,5 \pm 0,8 a	0,15 \pm 0,02 e	0,60 \pm 0,53 e
FI 16s	3,7 \pm 0,4 a	0,08 \pm 0,01 d	0,38 \pm 0,44 d
FI 22s	3,7 \pm 0,4 a	0,49 \pm 0,09 d	3,16 \pm 0,12 c
FI 28s	3,0 \pm 0,5 a	0,68 \pm 0,09 c	3,27 \pm 0,29 c

FN: en fotoperíodo normal; FI: en fotoinhibición durante 8, 14, 15, 16, 22 y 28 semanas (FI 8 s, FI 14 s, FI 15 s, FI 16 s, FI 22 s y FI 28 s). Los datos representan la media \pm ES; n= 6 (número de pools: cada pool contiene 6 hipófisis). Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

This would indicate that at the age of 40 days there is an increase in PRL synthesis, but not in PRL release. All serum data obtained were in accord with those published by Vomachka and Greenwald (1979).

2. Pituitary weight, content/concentration of pituitary PRL and serum levels of PRL of male adult hamsters during normal photoperiod and photoinhibition

No significant differences were recorded in the pituitary weights of hamsters submitted to normal photoperiod and photoinhibition during 8, 14, 15, 16, 22 and 28 weeks. The content and concentration of pituitary PRL of adult hamsters in the normal photoperiod (NP) and photoinhibition (PI) during 8, 14, 15, 16, 22 and 28 weeks (PI 8w, PI 14w, PI 15w, PI 16w, PI 22w and PI 28w) were significantly modified ($p < 0.01$) among groups NP and PI. A significant variant ($p < 0.01$) was detected among PI groups, with a decrease of both parameters between weeks 8 and 16 of photoinhibition (PI), reaching the minimum value at week 16. No significant differences were observed between weeks 14-15. Both parameters were recovered in the weeks following photoinhibition (PI 22w and PI 28w) (table 4).

Table 4. Pituitary weight, content and concentration of pituitary PRL of male adult hamsters in the normal photoperiod (NP) and photoinhibition (PI).

Photoperiod	Pituitary weight (mg)	Content PRL ($\mu\text{g}/\text{hipófisis}$)	Concentration PRL ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)
NP	3.6 \pm 0.3 a	1.35 \pm 0.15 a	7.15 \pm 0.92 a
PI 8s	3.7 \pm 0.4 a	0.74 \pm 0.08 b	3.82 \pm 0.42 b
PI 14s	3.8 \pm 0.8 a	0.17 \pm 0.01 e	0.87 \pm 0.91 e
PI 15s	3.5 \pm 0.8 a	0.15 \pm 0.02 e	0.60 \pm 0.53 e
PI 16s	3.7 \pm 0.4 a	0.08 \pm 0.01 d	0.38 \pm 0.44 d
PI 22s	3.7 \pm 0.4 a	0.49 \pm 0.09 d	3.16 \pm 0.12 c
PI 28s	3.0 \pm 0.5 a	0.68 \pm 0.09 c	3.27 \pm 0.29 c

NP: in normal photoperiod; PI: in photoinhibition for 8, 14, 15, 16, 22 and 28 weeks (PI 8w, PI 14w, PI 15w, PI 16w, PI 22 w and PI 28w). Data represent media \pm ES; n= 6 (number of pools: each pool contains 6 hypophysis). Different letters indicate significant differences. Tukey's Test, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

Se observó un descenso significativo ($p < 0.01$) de la PRL sérica en los grupos FI con respecto al grupo FN. Además, se observaron variaciones significativas ($p < 0.01$) entre los diferentes grupos FI. Los niveles séricos de PRL disminuyeron en las primeras semanas de la fotoinhibición (FI8s y FI16s), alcanzando un nivel mínimo a las 16 semanas y hubo una recuperación parcial en las semanas siguientes (FI22s y FI28s) (**tabla 5**).

Tabla 5. PRL sérica en hámsteres adultos en fotoperíodo normal y en fotoinhibición.

Fotoperíodo	N	PRL (ng/ml)
FN	6	20,1 ± 1,2 a
FI 8 s	6	4,9 ± 0,4 b
FI 16 s	6	2,1 ± 0,3 c
FI 22 s	6	3,6 ± 0,2 d
FI 28 s	6	14,6 ± 1,3 e

FN: adultos en fotoperíodo normal; FI: adultos en fotoinhibición durante 8, 16, 22 y 28 semanas (FI 8 s, FI 16 s, FI 22 s y FI 28 s), n=6 animales. Los datos representan la media ± ES. Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey ($p < 0.01$).

Además, los valores hallados de la PRL hipofisaria y sérica de hámsteres adultos en fotoinhibición (FI) difieren respecto a los datos registrados en los hámsteres inmaduros. Estos resultados no coinciden con los parámetros detectados en los testículos de hámsteres inmaduros y fotoinhibidos (Frungeri y col., 1999). Sin embargo, el contenido y la concentración de la PRL hallados en la hipófisis así como la PRL sérica durante el desarrollo, presentaron valores superiores a los observados durante la FI.

3. Peso hipofisario, contenido/concentración de la PRL hipofisaria y niveles séricos de PRL de los ratones adultos hembras de la cepa salvaje y los transgénicos

En los ratones hembras adultos transgénicos (TG) de 6 y 12 meses se halló un aumento significativo ($p < 0.01$) en el contenido y la

A significant decrease ($p < 0.01$) of serum PRL was observed in PI groups with respect to NP group. Also, significant variations ($p < 0.01$) were observed among the different PI groups. PRL serum levels diminished in the first weeks of photoinhibition (PI 8w and PI 16w), reaching a minimum level at week 16 with partial recovery in the following weeks (PI 22w and PI 28w) (**table 5**).

Table 5. Serum PRL of adult hamsters in normal photoperiod and photoinhibition.

Photoperiod	N	PRL (ng/ml)
NP	6	20.1 ± 1.2 a
PI 8w	6	4.9 ± 0.4 b
PI 16w	6	2.1 ± 0.3 c
PI 22w	6	3.6 ± 0.2 d
PI 28w	6	14.6 ± 1.3 e

NP: adults in normal photoperiod; PI: adults in photoinhibition for 8, 16, 22 and 28 weeks (PI 8w, PI 16w, PI 22w and PI 28w), N=6 animals. Data represent the media ± ES. Different letters indicate significant differences. Tukey's Test ($p < 0.01$).

Also, the values from pituitary and serum PRL from adult hamsters in photoinhibition (PI) differ when compared to data recorded from immature hamsters. These results do not coincide with the parameters detected in testicles from immature and photoinhibited hamsters (Frungeri et al., 1999). However, the content and concentration of PRL found in the hypophysis as well as in serum PRL during development, presented values superior to those observed during PI.

3. Pituitary weight, content/concentration of pituitary PRL and serum levels of PRL of female adult mice of wild strain and transgenic mice

In transgenic adult female rats (TG) aged 6 and 12 months a significant ($p < 0.01$) increase was found in the content and concentration of pituitary PRL compared to wild strain mice (WS) (**table 6**).

concentración de PRL hipofisaria respecto a los ratones de la cepa salvaje (WT) (tabla 6).

Tabla 6. Peso hipofisario, contenido y concentración de la PRL hipofisaria en los ratones adultos hembras de la cepa salvaje y los transgénicos.

Grupo	Peso hipofisario (mg)	PRL (µg/hipófisis)	PRL (µg/mg de proteína)
WT 6m	3,0 ± 0,3 a	1,5 ± 0,2 a	12,3 ± 1,3 a
TG 6m	15,0 ± 0,5 b	15,1 ± 1,6 b	21,4 ± 2,1 b
WT 12m	3,0 ± 0,1 a	1,81 ± 0,3 a	12,5 ± 1,5 a
TG 12m	130,0 ± 37 c	169,0 ± 40 c	28,1 ± 2,9 c

WT 6 m y WT 12 m: cepa salvaje de 6 y 12 meses de edad, TG 6 m y TG 12 m: transgénicos de 6 y 12 meses de edad. Los datos representan la media ± ES, n=3-5 determinaciones. Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

En el modelo de ratones transgénicos (TG) que sobreexpresan hCG, se observó un aumento en el contenido y la concentración de la PRL. La hiperprolactinemia fue el resultado de una mayor síntesis y liberación de la PRL, debido al aumento de las células lactotropas a los 6 meses y a la presencia de prolactinomas a los 12 meses, los cuales serían inducidos por la exposición a elevados niveles de esteroides gonadales, presentes en este modelo experimental (Rulli y col. (2002)). En ratones TG de 6 meses de edad se detectó un aumento de las formas oligoméricas. Este valor se incrementó a los 12 meses de edad, con un ascenso significativo del porcentaje relativo de las isoformas poliméricas. En ambas edades, el incremento relativo de las isoformas oligoméricas, poliméricas o ambas se hizo a expensas de las isoformas monoméricas que disminuyeron hasta un 50% en ratones TG de 12 meses de edad. Además, en el suero de estos ratones los cambios en los porcentajes de PRL de las isoformas oligoméricas y monoméricas fueron similares a los hallados en la hipófisis. Sin embargo, no se observaron variaciones en el porcentaje de las isoformas poliméricas séricas entre los grupos mencionados, lo cual indicaría que el aumento en la

Table 6. Pituitary weight, content and concentration of PRL in female adult mice of transgenic mice and of wild strain.

Group	Pituitary weight (mg)	Content PRL (µg/hipófisis)	Concentration PRL (µg/mg de proteína)
WS 6m	3.0 ± 0.3 a	1.5 ± 0.2 a	12.3 ± 1.3 a
TG 6m	15.0 ± 0.5 b	15.1 ± 1.6 b	21.4 ± 2.1 b
WS 12m	3.0 ± 0.1 a	1.81 ± 0.3 a	12.5 ± 1.5 a
TG 12m	130.0 ± 37 c	169.0 ± 40 c	28.1 ± 2.9 c

WS 6m and WS 12m: wild strain of 6 and 12 months of age, TG 6m and TG 12m: transgenic mice of 6 and 12 months of age. Data represent the mean ± ES, n=3-5 determinations. Different letters indicate significant differences. Tuckey's Test, $p < 0.05$ (Carino, 2010).

In the model of transgenic (TG) mice overexpressing hCG, an increase in the content and concentration of PRL was observed. Hyperprolactinemia was the result of higher synthesis and release of PRL, due to the increase of lactotrope cells at 6 months and to the presence of prolactinomas at 12 months, which would be induced by exposition to high levels of gonadal steroids, present in this experimental model (Rule et al. 2002). In TG mice of 6 months of age an increase of the oligomeric forms was detected. This value was incremented at the age of 12 months, with a significant increase in the relative percentage of polymeric isoforms. In ages, the relative increment of oligomeric, polymeric or both isoforms, was done at the expense of monomeric isoforms, which diminished up to 50% in 12-month-old TG mice. Also, in the serum of these mice, changes in PRL percentages of oligomeric and monomeric isoforms were similar to those found in the hypophysis. However, no variations were observed in the percentage of serum polymeric isoforms among the mentioned groups, which would indicate that the increase in serum PRL observed in 6- and 12-month-old TG mice presented a greater contribution of PRL oligomerization.

These results indicate that in the model of hyperprolactinemia in TG mice there would exist an alteration in the releasing mechanisms of the hormone in lactotrope cells that would determine a higher percentage

PRL sérica observado en ratones TG de 6 y 12 meses de edad, presentó una contribución mayor de oligómeros de PRL.

Estos resultados indican que en el modelo de hiperprolactinemia de ratones TG existiría una alteración en los mecanismos de liberación de la hormona en las células lactotropas que determinarían un mayor porcentaje de isoformas oligoméricas de la PRL séricas. Además, las isoformas moleculares de la PRL halladas en el suero de ratones de la cepa salvaje y en sueros humanos tuvieron algunas similitudes. Los porcentajes de las isoformas poliméricas, oligoméricas y monoméricas coincidieron. Se comunicaron porcentajes de isoformas oligoméricas similares en muestras séricas de mujeres con hiperprolactinemia, en concordancia con nuestros resultados séricos de ratones transgénicos (Colombani y Scaglia, 1996) (tabla 7).

Tabla 7. La PRL sérica en los ratones hembras adultos de la cepa salvaje y los transgénicos.

Grupo	PRL sérica (µg/ml)
WT 6 m	0,04 ± 0,01 a
TG 6 m	3,20 ± 0,20 b
WT 12 m	0,10 ± 0,02 a
TG 12m	82,0 ± 39,10 b

WT 6 m y WT 12 m: ratones hembras de la cepa salvaje de 6-12 meses. TG 6 m y TG 12 m: ratones hembras transgénicos de 6-12 meses. Los datos representan la media ± ES, n=3-5 determinaciones. Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey ($p < 0.01$).

Los ratones TG de 6 y 12 meses de edad presentaron un aumento significativo ($p < 0.01$) en los niveles séricos, contenido y concentración hipofisarios de PRL, en relación a sus respectivos WT.

4. Las isoformas de PRL de diferente PM durante el desarrollo de los hámsteres machos

Para analizar las isoformas de la PRL de diferente PM cada cromatograma de exclusión molecular se dividió en intervalos correspondientes

of oligomeric isoforms of serum PRL. In addition, molecular isoforms of PRL found in serum of wild strain mice and in human serum had some similitude. There was coincidence among percentages of polymeric, oligomeric and monomeric isoform. Percentages of similar oligomeric isoforms were reported in serum samples of hyperprolactinemic, in accord with our serum results of transgenic mice (Colombani-Vidal and Scaglia, 1996) (table 7).

Table 7. Serum PRL in wild strain and transgenic adult female mice.

Group	Serum PRL (µg/ml)
WS 6m	0.04 ± 0.01 a
TG 6m	3.20 ± 0.20 b
WS 12 m	0.10 ± 0.02 a
TG 12 m	82.0 ± 39.1 b

WS 6 m and WS 12 m: wild strain 6-12-month-old female mice. TG 6 m and TG 12 m: transgenic 6-12-month-old female mice. Data represent the mean ± ES, n=3-5 determinations. Different letters indicate significant differences. Turkey's Test ($p < 0.01$).

Six- and 12-month-old TG mice presented a significant ($p < 0.01$) increase in pituitary serum levels, content and concentration of PRL, compared to their respective WS.

4. Isoforms of PRL with different MW during the development of male hamsters

In order to analyze the isoforms of PRL of different MW each exclusion chromatography was divided into corresponding intervals at 100-130, 34-100 and 12-34 kDa. Three chromatographies (n=3) of each group were taken and the percentage of PRL was estimated in each interval. Between 15-40 days of age the presence of two main peaks of different area were observed. The smaller corresponded to a PRL polymer of 100-130 kDa and the larger to a monomeric form of PRL of 12-34 kDa, with 4-5 smaller peaks. A high percentage of isoforms corresponding to the monomer or of pituitary PRL (12-34

a los PM 100-130, 34-100 y 12-34 kDa. Se realizaron tres cromatografías (n=3) de cada grupo y se calculó el porcentaje de PRL en cada intervalo. Entre los 15-40 días de edad se observó la presencia de dos picos principales de diferente área. El menor correspondió a un polímero de PRL de PM 100-130 kDa y el mayor a la forma monomérica de PRL de PM 12-34 kDa, con 4-5 picos menores. Se observó un alto porcentaje de las isoformas correspondientes al monómero o de PRL hipofisaria (PM de 12-34 kDa) a todas las edades estudiadas. No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de las diferentes isoformas de la PRL durante el desarrollo (fig. 21.4).

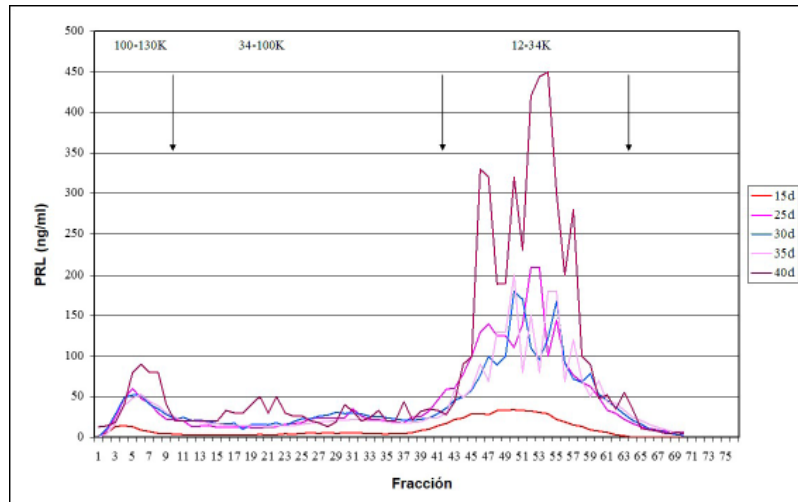


Fig. 21.4. Las isoformas de PRL hipofisaria de diferente PM en hámsteres normales durante el desarrollo (15, 25, 30, 35 y 40 días) (Sephadex G-100) (Carino, 2010).

5. Las isoformas de PRL de diferente PM en los hámsteres en el fotoperíodo normal y en la fotoinhibición

Se estudiaron las isoformas de PRL hipofisaria de diferente PM en hámsteres adultos en el fotoperíodo normal (FN) y en la fotoinhibición (FI) durante las semanas 8, 16, 22 y 28 (FI8s, FI16s, FI22s y FI28s). Se

kDa) at all studied ages. No significant differences were detected in the percentages of the different isoforms of PRL during development (fig. 21.4).

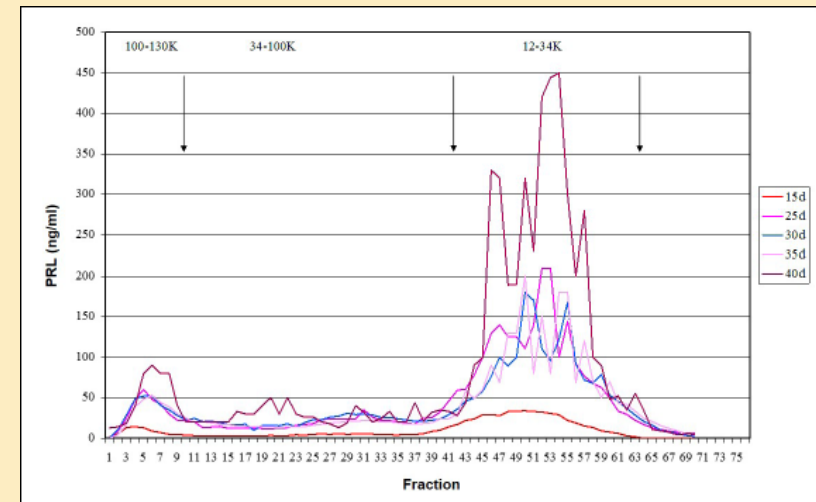


Fig. 21.4. Isoforms of pituitary PRL of different MW in normal hamsters during development (15, 25, 30, 35 and 40 days) (Sephadex G-100) (Carino, 2010).

5. PRL isoforms of different MW in hamsters in normal photoperiod and photoinhibition

Isoforms of pituitary PRL with different MW in adult hamsters in normal photoperiod (NP) and in photoinhibition (PI) at weeks 8, 16, 22 and 28 (PI 8w, PI 16w, PI 22w and PI 28w). All chromatographies evidenced the presence of two main peaks of different area. The smaller corresponded to a polymer of PRL of 100-130 kDa and the larger to the monomeric form of PRL of 12-34 kDa. The latter, in time, was formed by 4-5 minor peaks. There were no significant differences in the relative percentages of isoforms of pituitary PRL of different MW from animals submitted to normal photoperiod and photoinhibition (fig. 21.5).

observaron en todos los cromatogramas la presencia de dos picos principales de diferente área. El menor correspondió a un polímero de PRL de PM 100-130 kDa y el mayor a la forma monomérica de PRL de PM 12-34 kDa. Este último a su vez estuvo constituido por 4-5 picos menores. No hubo diferencias significativas en los porcentajes relativos de las isoformas de la PRL hipofisaria de distinto PM, provenientes de animales sometidos al fotoperíodo normal y a la fotoinhibición (fig. 21.5).

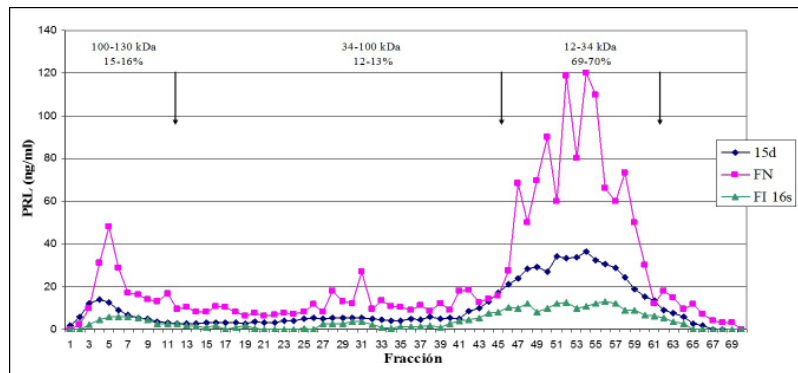


Fig. 21.5. Las isoformas de PRL hipofisaria de diferente PM en los hámsteres adultos machos en el fotoperíodo normal (FN) y en la fotoinhibición (FI) (*Sephadex G-100*) (Carino, 2010).

Torres y col. (1984), utilizando el método de extracción con urea, observaron mediante cromatografía de exclusión molecular, la presencia de la forma monomérica de la PRL en hipófisis de rata. Sin embargo, mediante la utilización de PBS, en los hámsteres adultos sometidos a FN se pudo determinar la presencia de tres isoformas de PRL hipofisaria: polímeros (PM > 100 kDa), oligómeros (12-34kDa) y monómeros (12-34 kDa). Estos últimos, constituidos por 4-5 isoformas fueron similares a las isoformas monoméricas de las PRL extraídas con PBS, descritas por Briski y col. (1996) en la hipófisis de rata. Por lo tanto, en la hipófisis no se modifica el mecanismo de almacenamiento de la PRL en las tres situaciones experimentales: hámsteres durante el desarrollo, adultos en el fotoperíodo normal y en la fotoinhibición.

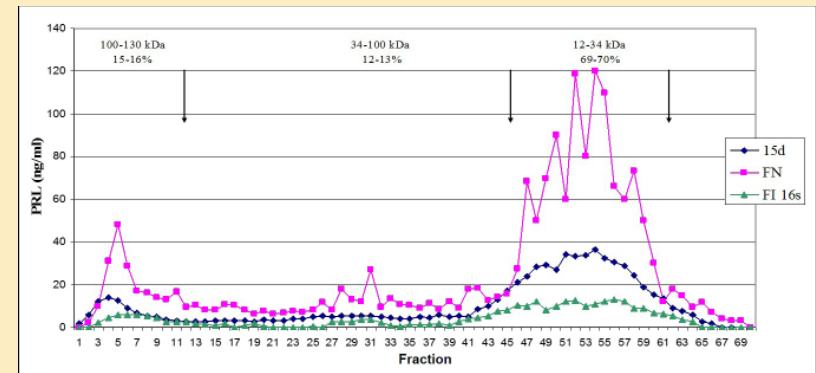


Fig. 21.5. Isoforms of pituitary PRL of different MW in male adult hamsters in normal photoperiod (NP) and photoinhibition (PI) (*Sephadex G-100*) (Carino, 2010).

Torres et al. (1984), using the extraction method in urea, observed by means of exclusion chromatography the presence of the monomeric form of PRL in rat pituitary. However, using PBS in adult hamsters submitted to NP the presence of three isoforms of pituitary PRL could be determined: polymers (MW >100 kDa), oligomers (12-34 kDa) and monomers (12-34 kDa). These latter, constituted by 4-5 isoforms were similar to monomeric isoforms of PRLs extracted with PBS, described by Briski et al. (1996) in rat pituitary. Consequently, in the hypophysis there is no modification of the deposit mechanism of PRL in the three experimental situations: hamsters during development process, adults in normal photoperiod and in photoinhibition.

No significant differences were found in the percentage of isoforms in each interval, either in normoprolactinemic or hyperprolactinemic states. Thus, the polymer present in the granules solubilized in PBS in the same proportion in I-NP, NP and PI 16w. In these latter, low levels of pituitary PRL were detected, as well as a decrease of density of immunostained lactotropes.

These results coincide with those published by Cónsole et al. (2002), where the presence of smaller size granules was noticed in the ultrastructural study. Such values would indicate that MW isoforms of PRL deposited in the granules and in PRL consecutively secreted in the pi-

No se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de las isoformas en cada intervalo, ya sea en estados de normo o hipoprolactinemia. Así, el polímero presente en los gránulos se solubilizó en PBS en la misma proporción en I-FN, FN y FI16s. En estos últimos, se detectaron niveles bajos de la PRL hipofisaria y una disminución de la densidad de las células lactotropas inmunomarcadas.

Estos resultados coinciden con los publicados por Cónsole y col. (2002), donde se observó la presencia de gránulos de menor tamaño en el estudio ultraestructural. Dichos valores indicarían que las isoformas de PM de la PRL almacenadas en los gránulos y la PRL que se secreta en forma constitutiva en la hipófisis de los hámsteres adultos o inmaduros, sometidos al fotoperíodo normal, serían las mismas que las existentes en los animales adultos en la fotoinhibición.

6. Las isoformas de PRL de diferente PM en los ratones hembras de la cepa salvaje y los transgénicos

Los resultados se presentan en la **fig. 21.6**.

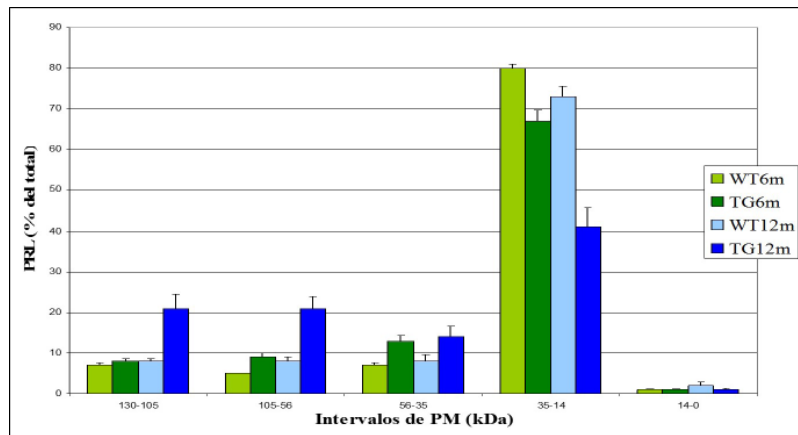


Fig. 21.6. Las isoformas de PM en los ratones hembras de la cepa salvaje y los transgénicos. WT: cepa salvaje (6-12 meses), TG: transgénicos (6-12 meses). Datos: \pm ES, $n=3-5$ cromatografías. Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey ($p < 0.05$) (Carino, 2010).

tuitaries of adult immature hamsters submitted to normal photoperiod would be the same existing in adult animals in photoinhibition.

6. Isoforms of PRL with different MW in wild strain and transgenic female mice

Results are presented in **fig. 21.6**.

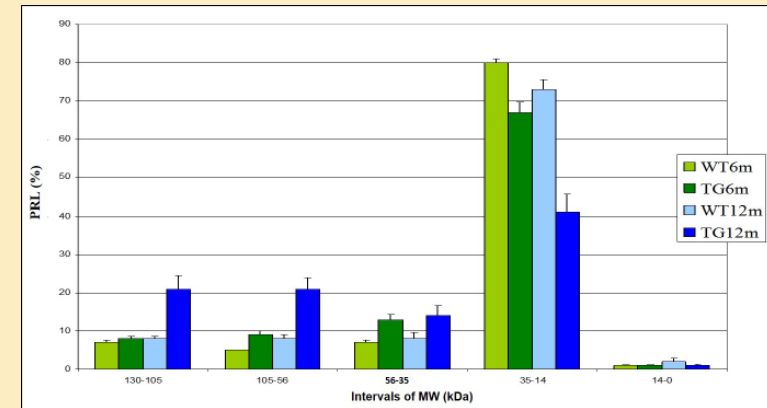


Fig. 21.6. Isoforms of MW in wild strain and transgenic female mice. WS: wild strain (6-12 months), TG: transgenic (6-12 months). Data: \pm ES, $n=3-5$ chromatographies. Different letters indicate significant differences. Tukey's Test ($p < 0.05$) (Carino, 2010).

Nonsignificant changes were detected in the percentage of isoforms of pituitary PRL in TG 6m mice compared to WT 6m ones, at intervals 105-130 and 0-14 kDa. There was a significant increase ($p < 0.05$) in TG 6m with respect to WT 6m at interval 56-105 and 35-56 kDa and a significant ($p < 0.01$) decrease at interval 14-35 kDa. In TG 12 w a significant increase was recorded with respect to WT 12 w, at intervals 56-105 and 35-56 kDa, but there was a significant ($p < 0.01$) decrease at interval 14-35 kDa.

7. Glycosylated isoforms of pituitary PRL during development of male hamsters

Affinity column chromatography on Concanavalin A (Con A) was used. This allowed studying glycosylated/non glycosylated isoforms of

No se detectaron cambios significativos en el porcentaje de las isoformas de PRL hipofisaria en los ratones TG6m respecto a los WT6m, en los intervalos 105-130 y 0-14 kDa. Hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) en TG6m respecto WT6m en el intervalo 56-105 y 35-56 kDa y una disminución significativa ($p < 0.01$) en el intervalo 14-35 kDa. En TG12 m se registró un aumento significativo respecto a los WT12 m, en los intervalos 56-105 y 35-56 kDa, pero hubo una disminución significativa ($p < 0.01$) en el intervalo 14-35 kDa.

7. Las isoformas glicosiladas de la PRL hipofisaria durante el desarrollo de los hámsteres machos

Se utilizó una cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A (Con A) que permitió estudiar las isoformas glicosiladas/no glicosiladas de PRL, a través de la interacción de ciertas estructuras de carbohidratos con la lectina Con A. Se determinó la PRL capaz de unirse a Con A en citosoles de hipófisis de los hámsteres de 15, 25, 30, 35 y 40 días de edad. La fracción de PRL que no se unió a la lectina formó un pico principal y la PRL unida a la Con A mostró un pico menor (fig. 21.7 y tabla 8).

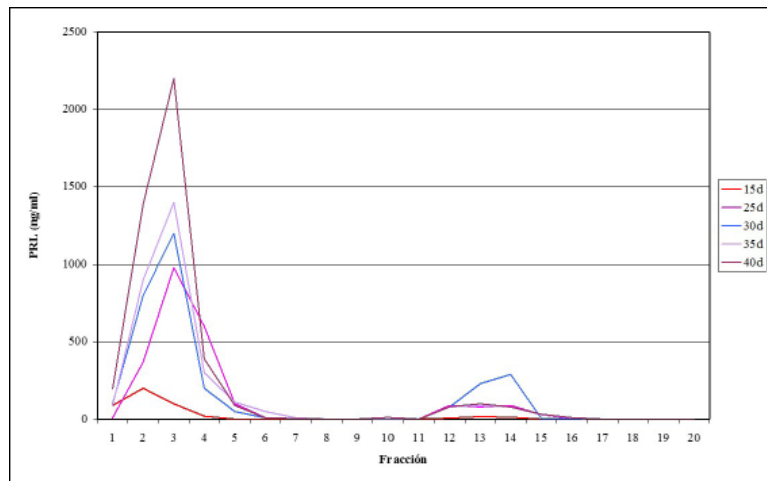


Fig. 21.7. Fraccionamiento de la PRL por cromatografía de Con A en hipófisis de los hámsteres normales durante el desarrollo (15, 25, 30, 35 y 40 días) (Carino, 2010).

PRL through the interaction of certain Con A lectin carbohydrate structures. PRL capable of binding Con A was observed in pituitary cytosols in hamsters of 15, 25, 30, 35 and 40 days of age. The fraction of PRL not binding lectin formed a main peak and PRL bound to Con A evidenced a lower peak (fig. 21.7 and table 8).

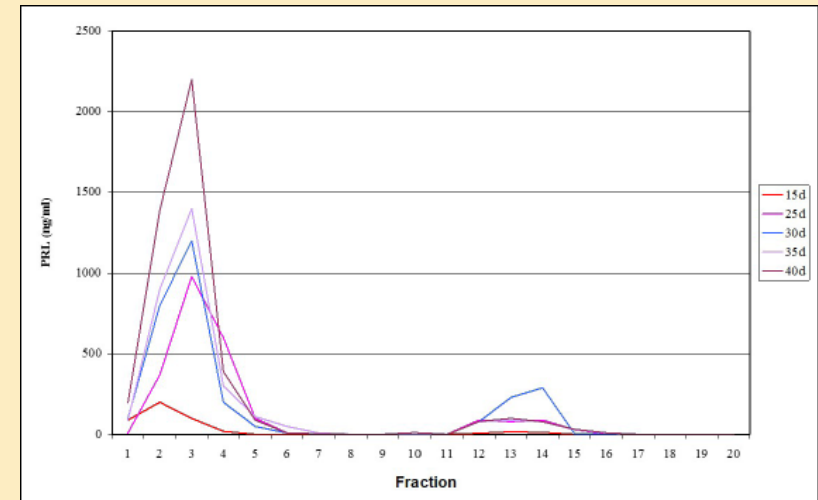


Fig. 21.7. Fractioning of PRL by means of chromatography on ConA in pituitaries of normal hamsters during development (15, 25, 30, 35 and 40 days) (Carino, 2010).

Table 8. Interaction between pituitary PRL and Con A during development.

Fraction	PRL (% of the totality at each age)				
	15d	25d	30d	35d	40d
Not Bound (1-10)	89.0 ± 3.5 a	87.0 ± 3.9 a	79.3 ± 2.2 b	88.3 ± 4.9 a	92.8 ± 7.0 a
Bound (11-20)	9.4 ± 0.8 c	11.4 ± 2.5 cd	20.4 ± 2.5 d	10.2 ± 1.9 c	7.6 ± 5.7 c

Data: ± ES; n=3 pools (each pool contains 6-10 pituitaries). Different letters indicate significant differences. Tukey's Test ($p < 0.05$) (Carino, 2010).

Tabla 8. Interacción entre la PRL hipofisaria y Con A durante el desarrollo.

Fracción	PRL (% del total en cada edad)				
	15d	25d	30d	35d	40d
No Unida (1-10)	89,0 ± 3,5 a	87,0 ± 3,9 a	79,3 ± 2,2 b	88,3 ± 4,9 a	92,8 ± 7,0 a
Unida (11-20)	9,4 ± 0,8 c	11,4 ± 2,5 cd	20,4 ± 2,5 d	10,2 ± 1,9 c	7,6 ± 5,7 c

Datos: ± ES; n=3 pools (cada pool contiene 6-10 hipófisis). Distintas letras indican diferencias significativas. Test de Tuckey ($p < 0.05$) (Carino, 2010).

Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes relativos de las isoformas que interaccionaron con la Con A de 30 días de edad, observándose una disminución en la proporción de isoformas no unidas a Con A, acompañado de un concomitante aumento en las estructuras con afinidad por la lectina. Los resultados obtenidos en los hámsteres durante el desarrollo mostraron que una fracción de la PRL hipofisaria interaccionó con la Con A y que el aumento registrado a los 30 días coincidió con un punto de inflexión en los niveles de la PRL hipofisaria y sérica. Este hecho marcaría que a los 30 días del desarrollo de los hámsteres normales ocurre un cambio en la glicosilación de la PRL hipofisaria.

8. Las isoformas glicosiladas de la PRL hipofisaria en los hámsteres en el fotoperíodo normal y en la fotoinhibición

Se analizó la interacción de la PRL con la Con A en hámsteres adultos en el FN y en la fotoinhibición durante las semanas 8, 16, 22 y 28 (FI8s, FI16s, FI22s y FI28s). Se observó en todos los grupos la presencia de un pico principal que corresponde a la fracción de PRL no unida a lectina y uno menor que corresponde a la PRL unida. No se hallaron diferencias significativas entre FN y FI (fig. 21.8).

Significant ($p < 0.05$) differences were detected in the relative percentages of isoforms that interacted with Con A of 30 days of age, with decrease of the proportion of isoforms not binding Con A, together with a concomitant increase in the structures with affinity on lectin. The results obtained in hamsters during the development evidenced that a fraction of the pituitary PRL interacted with Con A and that the increase recorded at day 30 coincided with an inflexion point in pituitary and serum PRL levels. This fact would indicate that at day 30 of the development in normal hamsters there is a change in the glycosylation of pituitary PRL.

8. Glycosylated isoforms of pituitary PRL in hamsters in the normal photoperiod and in photoinhibition

The interaction of PRL with Con A was analyzed in adult hamsters in the NP and photoinhibition during weeks 8, 16, 22 and 28 (PI 8w, PI 16w, PI 22w and PI 28w). All groups were observed to evidence a main peak corresponding to the fraction of not bound to lectin and a minor peak corresponding to bound PRL. No significant differences were found between NP and PI (fig. 21.8).

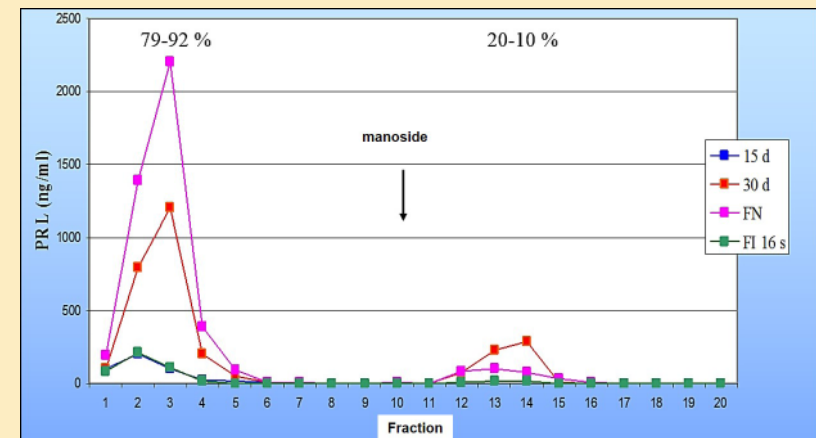


Fig. 21.8. Fractioning of PRL by means of chromatography of Con A in hypophysis of hamsters in normal photoperiod (NP) and in photoinhibition (PI) (Carino, 2010).

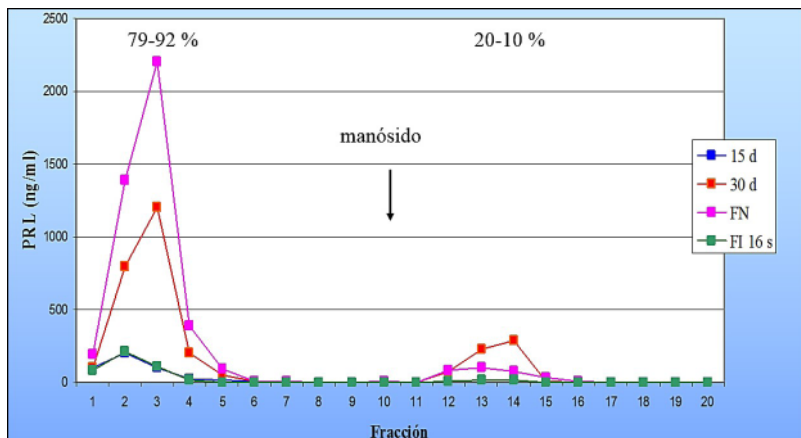


Fig. 21.8. Fraccionamiento de la PRL por cromatografía de Con A en hipófisis de los hámsteres en el fotoperíodo normal (FN) y en la fotoinhibición (FI) (Carino, 2010).

En la **tabla 9** se presentan los datos de la interacción entre la PRL hipofisaria y la Con A.

Tabla 9. Interacción entre PRL hipofisaria y Con A durante el fotoperíodo normal y la fotoinhibición.

Fracción	PRL (% del total)				
	FN	FI 8s	FI 16s	FI 22s	FI 28s
No Unida (1-10)	88,0 ± 8,8 a	89,0 ± 6,7 a	88,3 ± 8,2 a	90,2 ± 8,9 a	89,8 ± 9,0 a
Unida (11-20)	11,4 ± 1,8 b	10,4 ± 1,3 b	11,4 ± 1,5 b	9,2 ± 0,8 b	9,6 ± 0,7 b

FN: hámsteres adultos en fotoperíodo normal, FI: adultos en fotoinhibición durante las semanas 8, 16, 22 y 28 (FI8s, FI16s, FI22s y FI28s). Datos: ± ES; n=3 pools (cada pool contiene 6 hipófisis) (Carino, 2010).

9. Las isoformas glicosiladas de la PRL hipofisaria en los ratones de la cepa salvaje y los transgénicos

No se hallaron diferencias significativas cuando se comparó la interacción de la PRL-Con A en los grupos WT y TG de 6 y 12 meses de edad (fig. 21.9 y tabla 10).

In **table 9** there are present data of the interaction between pituitary PRL and Con A.

Table 9. Interaction between pituitary PRL and ConA during normal photoperiod and photoinhibition.

Fraction	PRL (% from the total)				
	NP	PI 8w	PI 16w	PI 22w	PI 28w
Not bound (1-10)	88.0 ± 8.8 a	89.0 ± 6.7 a	88.3 ± 8.2 a	90.2 ± 8.9 a	89.8 ± 9.0 a
Bound (11-20)	11.4 ± 1.8 b	10.4 ± 1.3 b	11.4 ± 1.5 b	9.2 ± 0.8 b	9.6 ± 0.7 b

NP: adult hamsters in normal photoperiod, PI: adults in photoinhibition during weeks 8, 16, 22 and 28 (PI 8w, PI 16w, PI 22w and PI 28w). Data: ± ES; n=3 pools (each pool contains 6 pituitaries) (Carino, 2010).

9. Glycosylated isoforms of pituitary PRL in wild strain and transgenic mice

No significant differences were found when comparing interaction of PRL-Con A in WS and TG groups of 6 and 12 months old (fig. 21.9 and table 10).

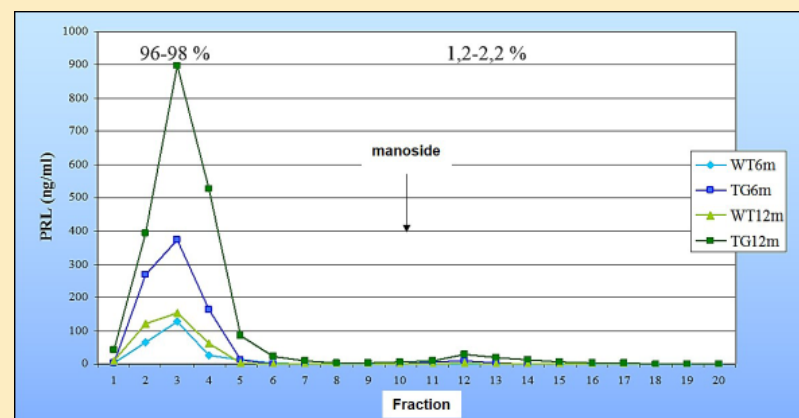


Fig. 21.9. Fraccionamiento de PRL por cromatografía de Con A en pituitarias de wild strain (WS) and transgenic (TG) mice (Carino, 2010).

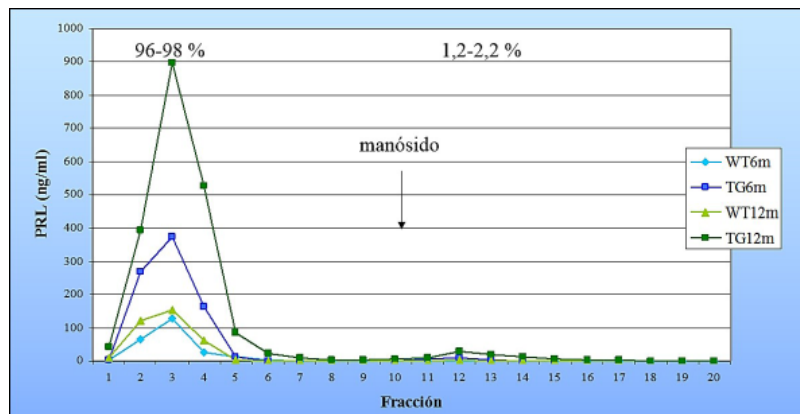


Fig. 21.9. Fraccionamiento de la PRL por cromatografía de Con A en hipófisis de los ratones de la cepa salvaje (WT) y los transgénicos (TG) (Carino, 2010).

En el modelo de ratones, la fracción de PRL unida a la lectina fue similar en todos los grupos estudiados. Además, los azúcares unidos a la PRL hipofisaria que interaccionaron con la lectina no se modificaron durante la hiperplasia lactotropa o en el prolactinoma (**tabla 10**).

Tabla 10. Fraccionamiento de la PRL por cromatografía con Con A en hipófisis de los ratones hembras de la cepa salvaje y los transgénicos de 6 y 12 meses de edad.

Fracción	PRL (% del total)			
	WT6m	WT12m	TG6m	TG12m
No Unida (1-10)	96,0 ± 8,8 a	97,0 ± 6,7 a	98,3 ± 8,2 a	97,2 ± 8,9 a
Unida (11-20)	2,9 ± 0,8 b	2,4 ± 1,3 b	2,2 ± 1,5 b	1,2 ± 1,9 b

Los resultados obtenidos en hámsteres y ratones coinciden con lo publicado por Champier y col. (1992) que hallaron menos del 10% de la PRL hipofisaria unido a la Con A en hipófisis de rata.

Table 10. Fractioning of PRL by chromatography with Con A in pituitaries of female wild strain and transgenic mice of 6 and 12 months of age.

Fraction	PRL (% from the total)			
	WS 6m	WS 12m	TG 6m	TG 12m
Not bound (1-10)	96.0 ± 8.8 a	97.0 ± 6.7 a	98.3 ± 8.2 a	97.2 ± 8.9 a
Bound (11-20)	2.9 ± 0.8 b	2.4 ± 1.3 b	2.2 ± 1.5 b	1.2 ± 1.9 b

WS: wild strain (6-12 m); TG: transgenic (6-12m). Data: ± ES, n=3-5 chromatography (Carino, 2010).

In mice model, the fraction of PRL binding to lectin was similar in all studied groups. Also, sugars bound to pituitary PRL that interacted to lectin were not modified during lactotrope hyperplasia or in prolactinoma. The results obtained in hamsters and mice coincide with what has been published by Champier et al. (1992) who found less than 10% of pituitary PRL bound to Con A rat hypophysis.

10. Charge isoforms of pituitary PRL in hamsters in normal photoperiod and photoinhibition

Isoelectric focusing of pituitary PRL in immature male hamsters of 30 days of age (I-NP) and adults in normal photoperiod (NP) and in photoinhibition of 16 weeks (PI 16w). Charge isoforms of PRL in the immature-normal photoperiod group (I-NP) were detected in the interval of pH 3.51-8.50, while in normal (NP) and in photoinhibition (PI 16w) the interval resulted between 4.01-7.00. In I-NP 88% of the totality of isoforms recovered was found in interval of pH 5.51-7.00 ($p < 0.001$). In NP 92% was detected in interval 4.01-5.50 ($p < 0.001$), whereas in PI16w 80% of isoforms were found in interval 5.01-5.50 ($p < 0.001$) (**fig. 21.10**).

10. Las isoformas de carga de la PRL hipofisaria en los hámsteres en el fotoperíodo normal y en la fotoinhibición

Se realizó el isoelectroenfoque de isoformas de la PRL hipofisaria en hámsteres machos inmaduros de 30 días de edad (I-FN) y adultos en foto-

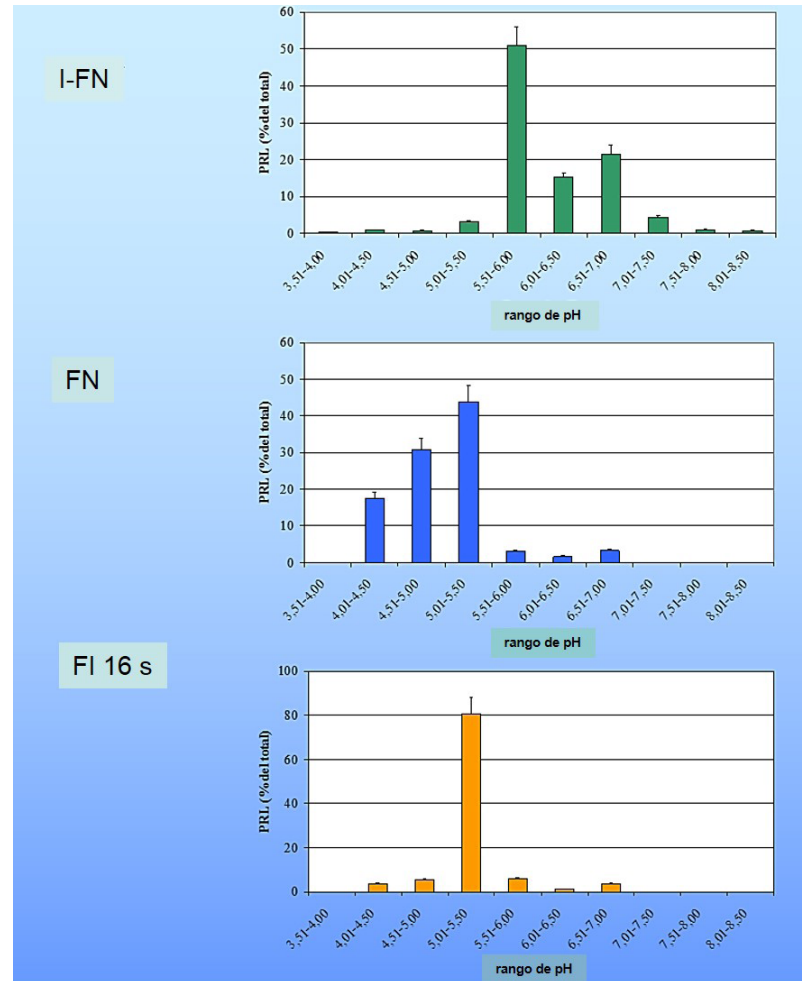


Fig. 21.10. Perfil de distribución de las isoformas de carga de la PRL hipofisaria en los hámsteres inmaduros de 30 días (I-FN), adultos en fotoperíodo normal (FN) y fotoinhibidos de 16 semanas (FI16s) (Carino, 2010).

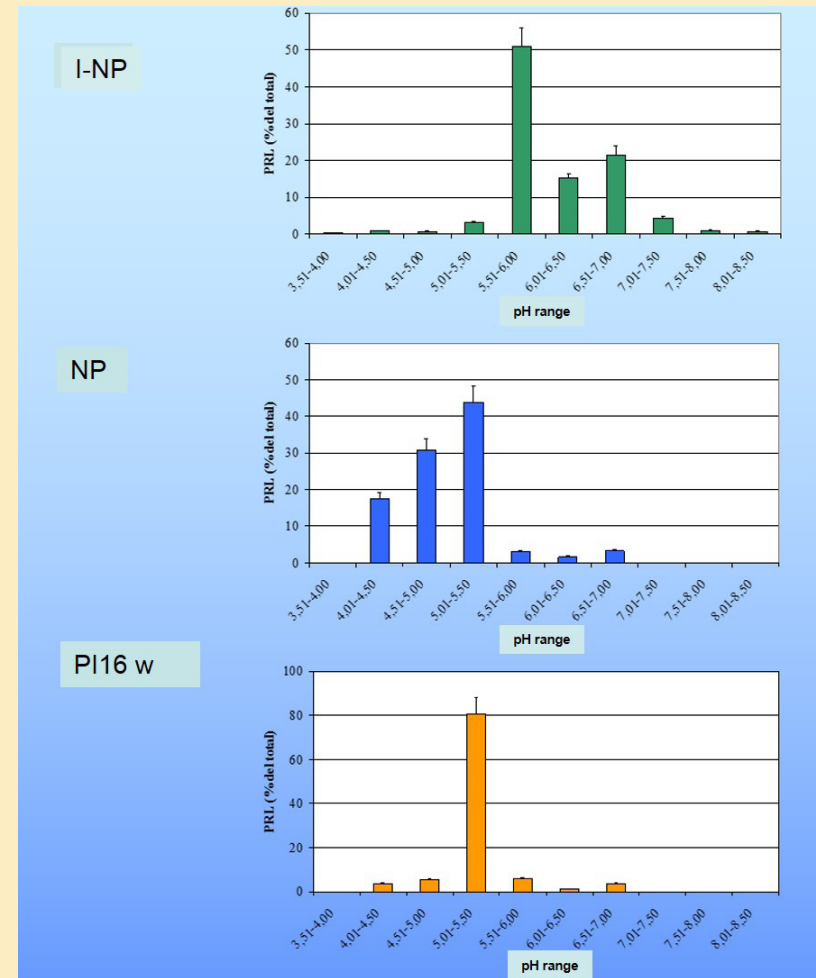


Fig. 21.10. Distribution profile of charge isoforms of pituitary PRL in immature hamsters of 30 days of age (I-NP), adults in normal photoperiod (NP) and photoinhibited adults of 16 weeks of age (PI 16w) (Carino, 2010).

Charge isoforms of PRL were more acidic than those described in the rat, whose PIs were located within range of 5.15-5.34 (Briski et al., 1996). Also, in PI 16w, it was recorded that a main isoform of pI in

período normal (FN) y en fotoinhibición de 16 semanas (FI16s). Las isoformas de carga de la PRL en el grupo inmaduro-fotoperíodo normal (I-FN) fueron detectadas en el intervalo de pH 3.51-8.50, mientras que en el fotoperíodo normal (FN) y en la fotoinhibición (FI16s) el intervalo resultó entre 4.01-7.00. En I-FN el 88% del total de las isoformas recuperadas se halló en intervalo de pH 5.51-7.00 ($p < 0.001$). En FN se detectó un 92% en el intervalo 4.01-5.50 ($p < 0.001$), mientras que en FI16s el 80% de las isoformas se hallaron en el intervalo 5.01-5.50 ($p < 0.001$) (**fig. 21.10**).

Las isoformas de carga de PRL fueron más ácidas que las descritas en la rata, cuyos pIs se ubicaron en el rango de 5.15-5.34 (Briski y col., 1996). Además, en FI16 s, se determinó la presencia de una isoforma principal de pI comprendido en el intervalo 5.01-5.50. Estos datos indican que las isoformas hipofisarias de la PRL en animales adultos sometidos a FN son más ácidas que las existentes en animales FI y esto podría deberse a la incorporación de moléculas de hidratos de carbono o grupos funcionales ácidos, hecho que ocurriría en menor proporción en la molécula de PRL durante la fotoinhibición. Si se comparan las isoformas de carga de los hámsteres inmaduros y adultos en FN, se observa que las primeras son menos ácidas. Por lo tanto, habría un aumento de la acidez de la molécula de PRL asociado a la maduración del hámster.

En todos los cromatogramas realizados en los hámsteres en FN se observaron tres isoformas cuyos puntos isoeléctricos (pI) fueron más ácidos que los hallados en I-FN. En FI16s se observó una isoforma de carga con pI comprendido entre los dos grupos anteriores (**tabla 11**).

Tabla 11. Análisis de las diferentes isoformas de carga de la PRL hipofisaria en I-FN, FN y FI16s.

Fotoperíodo	Isoformas de carga	
	% de PRL	pI
I-FN	25,6 ± 1,9	5,92 ± 0,13
	22,5 ± 2,2	6,64 ± 0,25
FN	21,2 ± 1,8	5,16 ± 0,31
	17,4 ± 0,6	4,61 ± 0,16
	6,9 ± 1,3	4,34 ± 0,21
FI16s	45,3 ± 1,0	5,44 ± 0,41

the interval 5.01-5.50 was present. These data indicate that pituitary isoforms of PRL in adult animals submitted to NP are more acidic than those existing in pI animals and this might be due to the incorporation of carbohydrate molecules or functional acidic groups, fact occurring in a smaller proportion in PRL molecules during photo-inhibition. If charge isoforms of immature and adult hamsters in NP are compared, the former are observed to less acidic. Consequently, there might be an increase in the acidity of the PRL molecule associated to hamster maturation.

In all chromatographies taken in NP hamsters three isoforms were observed, whose isoelectric points (Ip) were more acidic than those found in I-NP. In PI 16w a charge isoform with pI comprised between both groups before mentioned is recorded (**table 11**).

Table 11. Analysis of the different charge isoforms of pituitary PRL in I-NP, NP and PI 16w

Photoperiod	Charge isoforms	
	% of PRL	Ip
I-NP	25.6 ± 1.9	5.92 ± 0.13
	22.5 ± 2.2	6.64 ± 0.25
NP	21.2 ± 1.8	5.16 ± 0.31
	17.4 ± 0.6	4.61 ± 0.16
	6.9 ± 1.3	4.34 ± 0.21
PI 16w	45.3 ± 1.0	5.44 ± 0.41

The characteristics mentioned would allow presuming the presence of carbohydrates in the PRL molecule in a similar way to those described in charge isoforms of FSH in immature rats (Rulli et al., 1999; Campo et al., 2007). PRL induces the expression of cyclooxygenase 2 (COX2) and prostaglandin in the Leydig cells of the hamster through IL-1 β and the activation of P38-MAPK and JAK2. The heterogeneity of PRL detected in hamsters would be responsible of photoperiodic variations in the expression of COX2 in Leydig cells (Matzkin et al., 2012).

Las características mencionadas permitirían presumir la presencia de carbohidratos en la molécula de PRL, de un modo similar a los descriptos en las isoformas de carga de FSH en ratas inmaduras (Rulli y col., 1999; Campo y col., 2007).

La PRL induce la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2) y la prostaglandina en las células de Leydig del hámster a través de la IL-1 β y la activación de P38-MAPK y JAK2. La heterogeneidad de la PRL detectada en hámsteres sería responsable de las variaciones fotoperiódicas de la expresión de COX2 en las células de Leydig (Matzkin y col., 2012).

11. Las isoformas de carga de la PRL hipofisaria en los ratones de la cepa salvaje y los transgénicos

En los ratones WT y TG de 6-12 meses de edad las isoformas de carga de la PRL fueron halladas en el intervalo de pH= 2.51-9.50. En WT6 m el

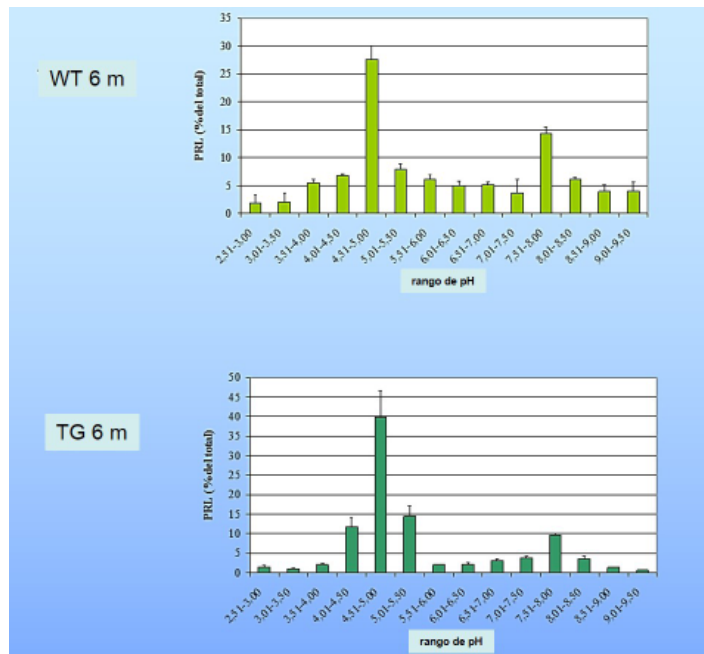


Fig. 21.11. Perfiles de distribución de las isoformas de carga de la PRL hipofisaria en los ratones de la cepa salvaje (WT) y los transgénicos (TG) de 6 meses (Carino, 2010).

11. Charge isoforms of pituitary PRL in wild strain and transgenic mice

In WS and TG mice of 6-12 months of age charge isoforms of PRL were found in the interval of pH=2.51-9.50. In WS 6m the 27% and the 14% of isoforms of PRL recovered were found in pH intervals 4.51-5.00 and 7.51-8.00 respectively ($p < 0.001$). In TG 6m the 65% and the 9% of isoforms were isolated in pH 4.01-5.5 and 7.51-8.00 ($p < 0.001$). In WS 12m 28.8% of isoforms of PRL recovered were found in pH 4.51-5.00 ($p < 0.001$). In TG 12m 79% was found in pH 3.51-5.50 ($p < 0.001$). Also, no significant differences were observed in the pH of predominant isoforms of each group (figs. 21.11 - 21.12).

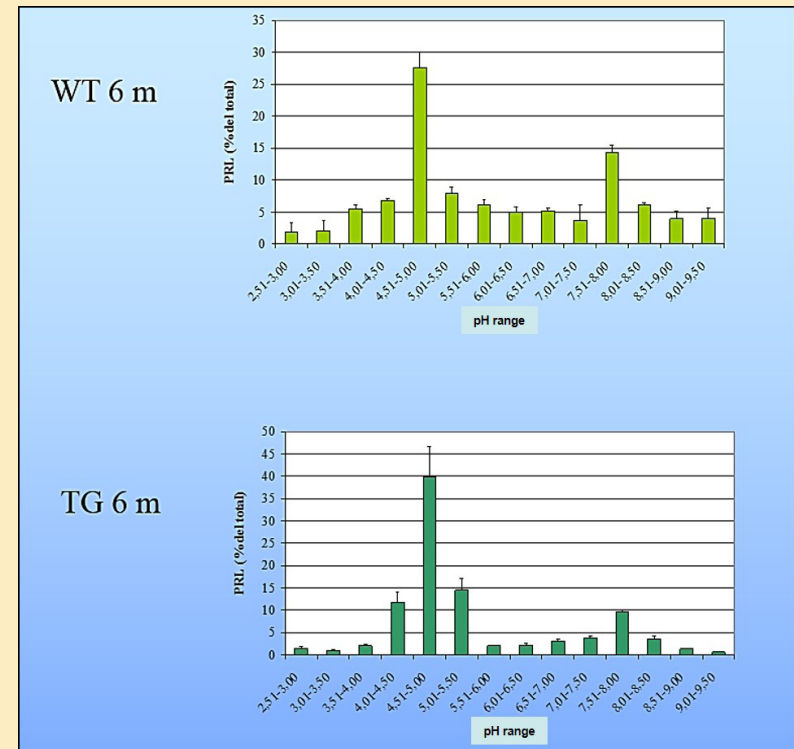


Fig. 21.11. Profiles of distribution of charge isoforms of pituitary PRL in wild strain (WS) and transgenic (TG) mice of 6 months (Carino, 2010).

27% y el 14% de las isoformas de PRL recuperadas se hallaron en los intervalos de pH 4.51-5.00 y 7.51-8.00 respectivamente ($p < 0.001$). En TG6m el 65% y el 9% de las isoformas se aislaron en pH 4.01-5.5 y 7.51-8.00 ($p < 0.001$). En WT12m el 28.8% de las isoformas de PRL recuperadas se hallaron en pH 4.51-5.00 ($p < 0.001$). En TG12m se halló el 79% en pH 3.51-5.50 ($p < 0.001$). Además, no se observaron diferencias significativas en el pH de las isoformas predominantes en cada grupo (figs. 21.11-21.12).

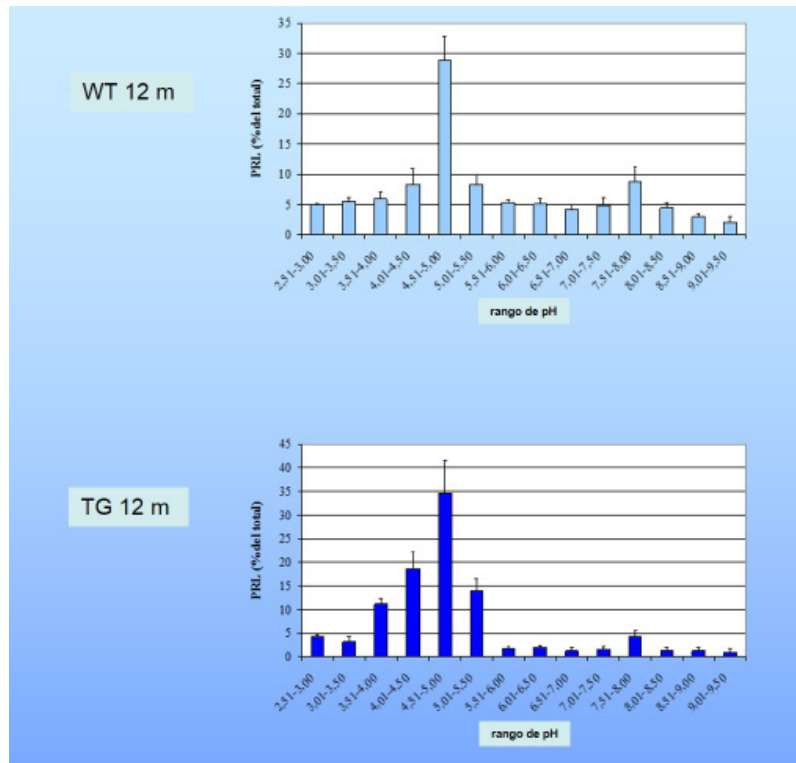


Fig. 21.12. Perfiles de distribución de las isoformas de carga de la PRL hipofisaria en los ratones de la cepa salvaje (WT) y los transgénicos (TG) de 12 meses (Carino, 2010).

Los resultados obtenidos en ratones mostraron la presencia de varias isoformas de carga de la PRL cuyos pIs estuvieron comprendidos en el

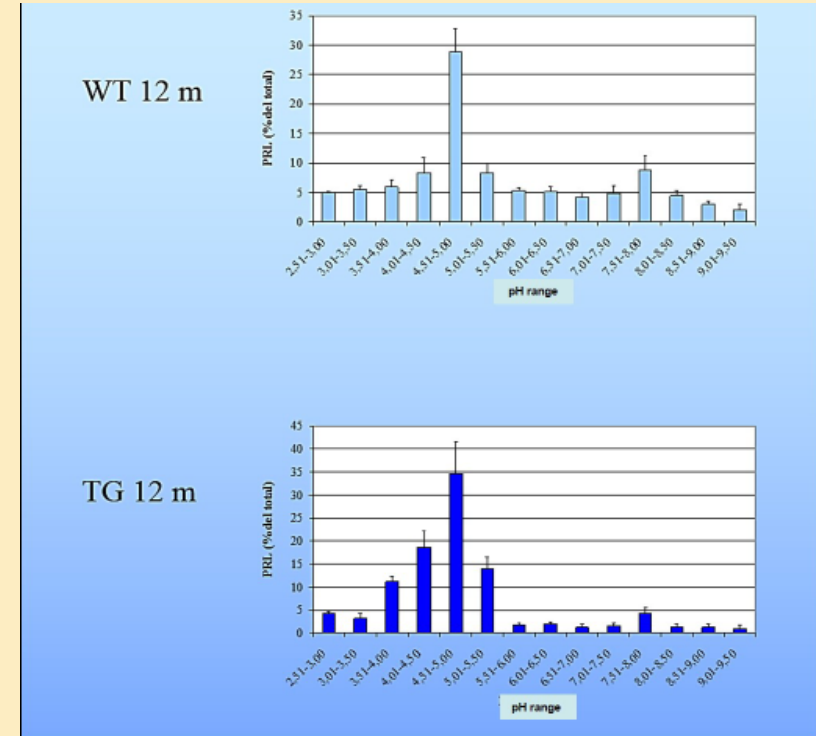


Fig. 21.12. Profiles of distribution of charge isoforms of pituitary PRL in wild strain (WS) and transgenic (TG) mice of 12 months (Carino, 2010).

The results obtained in mice evidenced the presence of various charge isoforms of PRL whose pIs were found within the range of pH 2.50-9.50. This interval was wider than that observed in adult hamsters in NP, where isoforms of PRL were found in the range of pH 4.01-5.50. In WS mice of 6 and 12m a higher percentage of charge isoforms of more basic pIs was detected.

In TG mice of 6 and 12m apart from hyperprolactinemia, there was a significant increase in the percentage of more acidic isoforms of PRL, at the expense of a basic diminution. This increase of acidic isoforms has been described in studies carried out in serum from hyperprolactinemic women (Guido et al., 1997).

rango de pH 2.50-9.50. Este intervalo fue más amplio que el observado en los hámsteres adultos en FN, donde las isoformas de PRL se hallaron en el rango de pH 4.01-5.50. En los ratones WT de 6 y 12 m se detectó un mayor porcentaje de las isoformas de carga de pIs **más básicos**.

En los ratones TG de 6 y 12 m se observó, además de la hiperprolactinemia, un aumento significativo en el porcentaje de las isoformas de PRL más ácidas, a expensas de una disminución de las más básicas. Este aumento de las isoformas ácidas ha sido descrito en estudios realizados en sueros de mujeres con hiperprolactinemia (Guido y col., 1997).

12. La actividad biológica y la biopotencia relativa de la PRL en suero e hipófisis de los hámsteres inmaduros y adultos en el fotoperíodo normal y en la fotoinhibición

Se analizó la bioactividad de la PRL a través de un bioensayo en cultivo de células Nb2, donde se determinó el índice de proliferación mediante la incorporación de timidina-³H. En cada grupo estudiado se realizaron tres determinaciones (n=3) de la PRL bioactiva (B-PRL) mediante bioensayo, tres de la PRL inmunorreactiva (I-PRL) mediante RIE y se analizó la biopotencia relativa (B/I) mediante la relación B-PRL/I-PRL. Se determinó la biopotencia relativa de la PRL en suero y en los citosoles hipofisarios de los animales inmaduros de 30 días (I-FN), adultos en fotoperíodo normal (FN) y adultos en fotoinhibición durante 16 semanas (FI16s). Los valores hallados en I-FN mostraron diferencias significativas (p < 0.01) con respecto a FN y FI16s, en suero e hipófisis (**tabla 12**) (Carino, 2010).

En todos los ensayos se obtuvieron valores muy bajos de bioactividad de la PRL y, en consecuencia, la biopotencia relativa fue menor que la unidad. Estos resultados son menores que los hallados por otros autores. Briskiet y col. (1996) observaron valores de biopotencia relativa de 3.0 y 1.9 en la PRL hipofisaria y sérica de rata, mientras que en las isoformas fue del orden de 0.7-1.8. Esta discrepancia podría evidenciar la importancia de la especificidad de especie en el bioensayo de células Nb2 cuando se utilizaron ligandos de otra especie, así como la presencia de receptores de PRL truncados que difieren de las isoformas naturales encontradas en la rata (Leaños-Miranda y col., 2006).

12. The biologic activity and relative biopotency of PRL in serum and pituitaries from immature and adult hamsters in normal photoperiod and photoinhibition

Bioactivity of PRL was analyzed by means of culture bioassay of Nb-2cells, where the index of proliferation was determined through incorporation of thymidine-³H. In each group studied three determinations (n=3) of bioactive PRL (B-PRL) were done, three determinations by bioassay, three of immunoreactive PRL (I-PRL) through RIE and the relative biopotency (B/I) was analyzed through the ratio B-PRL/I-PRL. The relative biopotency of PRL was studied in serum and in the pituitary cytosols from immature animals of 30 days (I-NP), adults in normal photoperiod (NP) and adults in photoinhibition for 16 weeks (PI 16w). The values found in I-NP evidenced significant differences (p < 0.01) compared to NP and PI 16w, in serum and hypophysis (**table 12**) (Carino, 2010).

In all essays very low values of PRL bioactivity were obtained and, consequently, relative biopotency was lower than the unit. These results are lower than those found by other authors. Briskiet al. (1996) observed values of relative biopotency of 3.0 and 1.9 in pituitary and serum PRL of rat, whereas in isoforms they were of the order of 0.7-1.8. This discrepancy might evidence the importance of species specificity in the Nb2 cell bioassay when ligands from other species were used, as well as the presence of truncated PRL receptors that differ from the natural isoforms found in the rat (Leaños-Miranda et al., 2006).

Table 12. Relative biopotency of serum and pituitary PRL in immature and adult hamsters. B-PRL: bioactive PRL, I-PRL: immunoreactive PRL and B/I: relative biopotency. Tukey's Test (p < 0.01) (Carino, 2010).

	I-NP	NP	PI 16s	PN charge of isoforms (pI)		
				4,34 ± 0,01	4,61 ± 0,06	5,16 ± 0,01
B-PRL (ng/ml)	432 ± 33 a	380 ± 86 a	30,7 ± 4,5 b	87 ± 9,5 a	166 ± 20 b	189 ± 21 b
I-PRL (ng/ml)	5.660 ± 420 a	7.300 ± 285 b	480 ± 33,2 c	426 ± 31 a	481 ± 33 b	958 ± 43 c
B/I	0,08 ± 0,007 a	0,05 ± 0,004 b	0,06 ± 0,006 b	0,2 ± 0,008 a	0,19 ± 0,007 a	0,19 ± 0,008 a

Tabla 12. Biopotencia relativa de la PRL sérica e hipofisaria en hámsteres inmaduros y adultos. B-PRL: PRL bioactiva, I-PRL: PRL inmunorreactiva y B/I: biopotencia relativa. Test de Tuckey ($p < 0.01$).

	I-FN	FN	FI 16s	FN carga de isoformas (pI)		
				4,34 ± 0,01	4,61 ± 0,06	5,16 ± 0,01
B-PRL (ng/ml)	432 ± 33 a	380 ± 86 a	30,7 ± 4,5 b	87 ± 9,5 a	166 ± 20 b	189 ± 21 b
I-PRL (ng/ml)	5.660 ± 420 a	7.300 ± 285 b	480 ± 33,2 c	426 ± 31 a	481 ± 33 b	958 ± 43 c
B/I	0,08 ± 0,007 a	0,05 ± 0,004 b	0,06 ± 0,006 b	0,2 ± 0,008 a	0,19 ± 0,007a	0,19 ± 0,008 a

Además, las isoformas de carga de la PRL en las hipófisis de los hámsteres adultos en FN son ácidas, mientras que en los hámsteres inmaduros son más básicas. Por lo tanto, la maduración sexual en el hámster se asocia con las isoformas ácidas de la PRL, con un valor intermedio entre adultos e inmaduros sometidos a la fotoinhibición de 16 semanas. El modelo de la fotoinhibición representa un estadio intermedio entre el hámster adulto y el inmaduro. En agregado, una fracción de la PRL hipofisaria permanece unida a una glicoproteína durante la electroforesis, en condiciones desnaturizantes y reductoras.

El aumento de células lactotropas determina una mayor síntesis y liberación de la PRL en los ratones transgénicos que presentaron una PRL hipofisaria monomérica glicosilada. Dichas isoformas oligoméricas de PRL aumentaron en la hipófisis de los ratones transgénicos en el estadio de hiperplasia. Las isoformas oligoméricas y poliméricas de PRL se incrementaron en los procesos de formación de los prolactinomas en los ratones transgénicos, mientras disminuyeron las isoformas monoméricas séricas. Hay un aumento de las isoformas de carga de PRL más ácidas durante el proceso de transformación de la hipófisis normal a prolactinoma. Los ratones transgénicos de 6 meses evidenciaron una hiperplasia lactotropa que a los 12 meses se transformó en un prolactinoma cromófilo.

Also, charge isoforms of PRL in pituitaries of adult hamsters in NP are acidic, whereas in immature hamsters they are more basic. Consequently, sexual maturity in hamsters is associated with acidic isoforms of PRL, with an intermediate value between adults and immature submitted to 16-week photoinhibition. The model of photoinhibition represents an intermediate stage between adult and immature hamsters. In addition, a fraction of pituitary PRL remains bound to a glycoprotein during electrophoresis, under denaturalizing and reducing conditions.

The increase in lactotrope cells determines a higher synthesis and release of PRL in transgenic mice that presented a glycosylated monomeric pituitary PRL. Such oligomeric isoforms of PRL increased in pituitaries of transgenic mice in the hyperplastic stage. Oligomeric and polymeric isoforms of PRL increased in prolactinoma formation processes in transgenic mice, whereas serum monomeric isoforms decreased. There is an increase of more acidic charge isoforms of PRL during the transformation process from normal pituitary to prolactinoma. Transgenic mice of 6 months of age evidenced a lactotrope hyperplasia that at 12 months changed into a chromophilic prolactinoma.

To conclude, the pituitary content of PRL in adult hamsters varies according to the function in the photoperiod and to the PRL synthesis-release, which decreases during photoinhibition. The same MW isoforms of PRL in immature and adult hamsters are synthesized in the NP or in PI 16w, whereas the profile of charge isoforms of PRL and FSH are recorded in the same interval of pH, indicating equal behavior in an electric field.

References

Anthony PK, Stoltz RA, Pucci ML, Powers CA. The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin, storage in

Concluyendo, el contenido hipofisario de la PRL en los hámsteres adultos varía en función del fotoperíodo y de la síntesis-liberación de la PRL, disminuyendo durante la fotoinhibición. Las mismas isoformas de PM de la PRL en los hámsteres inmaduros y adultos se sintetizan en el FN o en FI16s, mientras el perfil de las isoformas de carga de PRL y FSH se registra en el mismo intervalo de pH, lo que indica igual comportamiento en un campo eléctrico.

Referencias

- Anthony PK, Stoltz RA, Pucci ML, Powers CA. The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin, storage in secretory granules, and regulated release. *Endocrinology* 1993; 132(2):806-814.
- Bauerle PA, Huttner WB. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J Cell Biol* 1987; 105(6 Pt1):2655-64.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22(6):724-763.
- Billis WM, Delidow BC, White BA. Posttranscriptional regulation of prolactin (PRL) gene expression in PRL-deficient pituitary tumor cells. *Mol Endocrinol* 1992; 6(8):1277-84.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19(3):225-268.
- Boutin J, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly P. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; 53(1):69-77.
- Briski K, Swanson G, Sylvester P. Size and charge heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in male rat. *Neuroendocrinology* 1996; 63(5):437-445.
- secretory granules, and regulated release. *Endocrinology* 1993; 132(2):806-814.
- Bauerle PA, Huttner WB. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J Cell Biol* 1987; 105(6 Pt1):2655-64.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22(6):724-763.
- Billis WM, Delidow BC, White BA. Posttranscriptional regulation of prolactin (PRL) gene expression in PRL-deficient pituitary tumor cells. *Mol Endocrinol* 1992; 6(8):1277-84.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19(3):225-268.
- Boutin J, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly P. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; 53(1):69-77.
- Briski K, Swanson G, Sylvester P. Size and charge heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in male rat. *Neuroendocrinology* 1996; 63(5):437-445.
- Campo S, Ambao V, Creus S, Gottlieb S, Fernandez Vera G, Benencia H, Bergadá C. Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262:197-204.
- Carino M. Caracterización de la hormona prolactina: estudio bioquímico y morfológico en modelos experimentales y humanos. Tesis doctoral. Directores: Dres. RS Calandra y GM Cónsole, 2010.
- Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG. Some forms of big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(8):2342-46.

- Campo S, Ambao V, Creus S, Gottlieb S, Fernandez Vera G, Benencia H, Bergadá C. Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262:197-204.
- Carino M. Caracterización de la hormona prolactina: estudio bioquímico y morfológico en modelos experimentales y humanos. Tesis doctoral. Directores: Dres. RS Calandra y GM Cónsole, 2010.
- Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG. Some forms of big big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(8):2342-46.
- Champier J, Claustrat B, Harthe C, Chevallier P, Trouillas J. Concanavalin-A-bound and -unbound prolactin in normal and hyperprolactinemic rats. *J Endocrinol* 1992; 134(1):27-32.
- Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 1987; 121(6): 2055-64.
- Colombani M, Scaglia H. Formas moleculares de prolactina. *Boletín Informativo de la Sociedad Argentina de Andrología* 1996; 5:79-92.
- Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra R, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology and function of pituitary lactotropes in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 2002; 75(5):316-325.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman B, Clapp C. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem* 2000; 275(18):13183-86.
- Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(7):265-270.
- Denef C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(1):1-70.
- Champier J, Claustrat B, Harthe C, Chevallier P, Trouillas J. Concanavalin-A-bound and -unbound prolactin in normal and hyperprolactinemic rats. *J Endocrinol* 1992; 134(1):27-32.
- Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 1987; 121(6): 2055-64.
- Colombani M, Scaglia H. Formas moleculares de prolactina. *Boletín Informativo de la Sociedad Argentina de Andrología* 1996; 5:79-92.
- Cónsole GM, Jurado SB, Petruccelli M, Carino M, Calandra R, Gómez Dumm CL. Influence of photoinhibition on the morphology and function of pituitary lactotropes in male golden hamsters. *Neuroendocrinology* 2002; 75(5):316-325.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman B, Clapp C. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem* 2000; 275(18):13183-86.
- Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(7):265-270.
- Denef C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(1):1-70.
- Devi YS, Halperin J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1):400-410.
- Fang VS, Refetoff S. Heterogeneous human prolactin from a giant pituitary tumor in a patient with panhypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47(4):780-787.
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 1991; 129(2):896-900.

- Devi YS, Halperin J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1):400-410.
- Fang VS, Refetoff S. Heterogeneous human prolactin from a giant pituitary tumor in a patient with panhypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47(4):780-787.
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 1991; 129(2):896-900.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80(4):1523-1631.
- Gala RR, Shevach EM. Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205(1):12-19.
- Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Glannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(3):1048-55.
- Goffin V, Martial JA, Summers NL. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng* 1995; 8(12):1215-31.
- Goffin V, Touraine P, Pichard C, Bernichtein S, Kelly PA. Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151(1-2): 79-87.
- Guido R, Valenti S, Foppiani L, De Martini D, Cossu M, Giusti M. Prolactin decrease and shift to a normal-like isoform profile during treatment with quinagolide in patient affected by an invasive prolactinoma. *J Endocrinol Invest* 1997; 20(5):289-293.
- Haro LS, Lee DW, Singh RN, Bee G, Markoff E, Lewis UJ. Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(2):379-383.
- Hattori N, Ikekubo K, Nakaya Y, Kitagawa K, Inagaki C. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolactinemia due to anti-PRL autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):3036-44.
- Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9):3107-10.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80(4):1523-1631.
- Gala RR, Shevach EM. Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205(1):12-19.
- Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Glannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(3):1048-55.
- Goffin V, Martial JA, Summers NL. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng* 1995; 8(12):1215-31.
- Goffin V, Touraine P, Pichard C, Bernichtein S, Kelly PA. Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151(1-2): 79-87.
- Guido R, Valenti S, Foppiani L, De Martini D, Cossu M, Giusti M. Prolactin decrease and shift to a normal-like isoform profile during treatment with quinagolide in patient affected by an invasive prolactinoma. *J Endocrinol Invest* 1997; 20(5):289-293.
- Haro LS, Lee DW, Singh RN, Bee G, Markoff E, Lewis UJ. Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(2):379-383.
- Hattori N, Ikekubo K, Nakaya Y, Kitagawa K, Inagaki C. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolac-

- tinemia due to anti-PRL autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):3036-44.
- Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9):3107-10.
- Ho TW, Leong FS, Olaso CH, Walker AM. Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 1993; 58(2):160-165.
- Ignacak A, Kasztelnik M, Silva T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin-not only lactotrophin. A "new" view of the old hormone. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63(5): 435-443.
- Jarry H, Leonhardt S, Schmidt WE, Creutzfeld W, Wuttke W. Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vivo and in vitro prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci* 1992; 51(11):823-930.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12(3):235-251.
- Kline J, Roehrs H, Clevenger CV. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(50):35461-8.
- Larrea F, Escorza A, Granados J, Valencia X, Valero A, Cravioto MC, Pérez-Palacios G. Familial occurrence of big-big prolactin as the predominant immunoreactive human prolactin species in blood. *Fertil Steril* 1987; 47(6):956-963.
- Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, Alarcón-Segovia D. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11):3664-69.
- Leaños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Rivera-Laños R, Ulloa-Aguirre A, Goffin V. Application of new homologous in vitro bioassays for human lactogens to assess the actual bioactivity of human
- HoTW, Leong FS, Olaso CH, Walker AM. Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 1993; 58(2):160-165.
- Ignacak A, Kasztelnik M, Silva T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin-not only lactotrophin. A "new" view of the old hormone. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63(5): 435-443.
- Jarry H, Leonhardt S, Schmidt WE, Creutzfeld W, Wuttke W. Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vivo and in vitro prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci* 1992; 51(11):823-930.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12(3):235-251.
- Kline J, Roehrs H, Clevenger CV. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(50):35461-8.
- Larrea F, Escorza A, Granados J, Valencia X, Valero A, Cravioto MC, Pérez-Palacios G. Familial occurrence of big-big prolactin as the predominant immunoreactive human prolactin species in blood. *Fertil Steril* 1987; 47(6):956-963.
- Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, Alarcón-Segovia D. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11):3664-69.
- Leaños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Rivera-Laños R, Ulloa-Aguirre A, Goffin V. Application of new homologous in vitro bioassays for human lactogens to assess the actual bioactivity of human prolactin isoforms in hyperprolactinemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 6582:146-153.

- prolactin isoforms in hyperprolactinemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65(2):146-153.
- Leaños-Miranda A, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44(4):866-875.
- Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clinical Endocrinol (Oxf)* 1992; 37(4):365-372.
- Lerant A, Freeman ME. Dopaminergic neurons in periventricular and arcuate nuclei of proestrous and ovariectomized rats: endogenous diurnal rhythm of Fos-related antigens expression. *Neuroendocrinology* 1997; 65(6):436-445.
- Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA, Djiane J. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(3):824-828.
- Lewis UJ, Singh RN, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(2):385-389.
- Mai LM, Shieh KR, Pan JT. Circadian changes of serum prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in ovariectomized rats treated with or without estrogen: the role of the supra-chiasmatic nuclei. *Neuroendocrinology* 1994; 60(5):520-526.
- Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 1988; 123(3):1303-06.
- Matzkin ME, Ambao V, Carino MH, Rossi SP, González L, Turyn D, Campo S, Calandra RS. Prolactin (PRL) induction of cyclooxygenase 2 (COX2) expression and prostaglandin (PG) production in hamster Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348(1): 33-46.
- Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. Macroprolactinemia associated with prolactin adenoma. *Hum Reprod* 2003; 18(4):853-857.
- Leaños-Miranda A, Chávez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44(4):866-875.
- Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clinical Endocrinol (Oxf)* 1992; 37(4):365-372.
- Lerant A, Freeman ME. Dopaminergic neurons in periventricular and arcuate nuclei of proestrous and ovariectomized rats: endogenous diurnal rhythm of Fos-related antigens expression. *Neuroendocrinology* 1997; 65(6):436-445.
- Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA, Djiane J. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(3):824-828.
- Lewis UJ, Singh RN, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(2):385-389.
- Mai LM, Shieh KR, Pan JT. Circadian changes of serum prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in ovariectomized rats treated with or without estrogen: the role of the supra-chiasmatic nuclei. *Neuroendocrinology* 1994; 60(5):520-526.
- Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 1988; 123(3):1303-06.
- Matzkin ME, Ambao V, Carino MH, Rossi SP, González L, Turyn D, Campo S, Calandra RS. Prolactin (PRL) induction of cyclooxygenase 2 (COX2) expression and prostaglandin (PG) production in hamster Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348(1): 33-46.
- Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. Macroprolactinemia associated with prolactin adenoma. *Hum Reprod* 2003; 18(4):853-857.

Noble RL, Beer CT, Gout PW. Evidence in vivo and in vitro of a role for the pituitary in the growth of malignant lymphomas in Nb rats. *Cancer Res* 1980; 40(7):2437-40.

Nolin JM. Target cell prolactin, II. *Int Rev Cytol* 1985; 95:45-60.

Nolin JM. Incorporation of endogenous prolactin by granulosa cells and dictyate oocytes in the postpartum rat: effects of estrogen. *Biol Reprod* 1980; 22(2):417-422.

Obál F, Kacsóh B, Bredow S, Guha-Thakurta N, Krueger JM. Sleep in rats rendered chronically hyperprolactinemic with anterior pituitary grafts. *Brain Res* 1997; 755(1): 130-136.

Patil MJ, Henry MA, Akopian AN. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)* 2014; 8(3):193-202.

Price AE, Logvinenko KB, Higgins EA, Cole ES, Richards SM. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology* 1995; 136(11):4827-33.

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.

Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2002; 143(10):4084-95.

Schiettecatte J, De Schepper J, Velkeniers B, Smitz J, van Steirteghem A. Rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin G complexes by immunoprecipitation with anti-human IgG-agarose. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(12):1244-48.

Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7):A465-470.

Shoupe D, Montz FJ, Kletzky OA, di Zerega GS. Prolactin molecular heterogeneity. Response to thyrotropin-releasing hormone stimulation of concanavalin A-bound and -unbound immunoassayable

Noble RL, Beer CT, Gout PW. Evidence in vivo and in vitro of a role for the pituitary in the growth of malignant lymphomas in Nb rats. *Cancer Res* 1980; 40(7):2437-40.

Nolin JM. Target cell prolactin, II. *Int Rev Cytol* 1985; 95:45-60.

Nolin JM. Incorporation of endogenous prolactin by granulosa cells and dictyate oocytes in the postpartum rat: effects of estrogen. *Biol Reprod* 1980; 22(2):417-422.

Obál F, Kacsóh B, Bredow S, Guha-Thakurta N, Krueger JM. Sleep in rats rendered chronically hyperprolactinemic with anterior pituitary grafts. *Brain Res* 1997; 755(1): 130-136.

Patil MJ, Henry MA, Akopian AN. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)* 2014; 8(3):193-202.

Price AE, Logvinenko KB, Higgins EA, Cole ES, Richards SM. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology* 1995; 136(11):4827-33.

Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga SB, Calandra RS, Campo S. Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70(4):255-260.

Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2002; 143(10):4084-95.

Schiettecatte J, De Schepper J, Velkeniers B, Smitz J, van Steirteghem A. Rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin G complexes by immunoprecipitation with anti-human IgG-agarose. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(12):1244-48.

- prolactin during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147(5):482-487.
- Sinha Y. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16(3):354-369.
- Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, Singh RN, Jacobsen BP, Scott KE, Lewis UJ. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 80(1-3): 203-213.
- Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 1996; 383(6602):726-728.
- Stocklin E, Wissler M, Moriggl R, Groner B. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11):6708-16.
- Suh H, Frantz A. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39(5):928-935.
- Tan DY, Peng XP. Progress in prolactin receptor research. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2012; 43(1): 17-23.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer RL, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(5):1058-63.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB. Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* 2005; 351(4):810-823.
- Torres AI, Haggi ES, Aoki A. Isolation of two different pools of pituitary prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 107(1):25-30.
- Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 2003; 30(1):31-47.
- van Coppenolle F, Skryma R, Ouadid-Ahidouch H, Slomianny C, Roudbaraki M, Delcourt P, Dewailly E, Humez S, Crepin A, Gourdou I, Djiane J, Bonnal JL, Mauroy B, Prevarskaya N. Prolactin stimulates Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7):A465-470.
- Shoupe D, Montz FJ, Kletzky OA, di Zerega GS. Prolactin molecular heterogeneity. Response to thyrotropin-releasing hormone stimulation of concanavalin A-bound and -unbound immunoassayable prolactin during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147(5):482-487.
- Sinha Y. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16(3):354-369.
- Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, Singh RN, Jacobsen BP, Scott KE, Lewis UJ. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 80(1-3): 203-213.
- Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 1996; 383(6602):726-728.
- Stocklin E, Wissler M, Moriggl R, Groner B. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11):6708-16.
- Suh H, Frantz A. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39(5):928-935.
- Tan DY, Peng XP. Progress in prolactin receptor research. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2012; 43(1): 17-23.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer RL, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(5):1058-63.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB. Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* 2005; 351(4):810-823.

cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J* 2004; 377(Pt 3): 569-578.

Vomachka AJ, Greenwald GS. The development of gonadotropin and steroid hormone patterns in male and female hamsters from birth to puberty. *Endocrinology* 1979; 105(4):960-966.

Waldstreicher J, Duffy JF, Brown EN, Rogacz S, Allan JS, Czeisler CA. Gender differences in the temporal organization of prolactin (PRL) secretion: evidence for a sleep-independent circadian rhythm of circulating PRL levels- a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(4):1483-87.

Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53(4):863-866.

Yang X, Meyer K, Frield A. STAT5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promotes angiogenesis. *J Biol Chem* 2013; 288(29):21184-96.

Torres AI, Haggi ES, Aoki A. Isolation of two different pools of pituitary prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 107(1):25-30.

Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 2003; 30(1):31-47.

van Coppenolle F, Skryma R, Ouadid-Ahidouch H, Slomianny C, Roudbaraki M, Delcourt P, Dewailly E, Humez S, Crepin A, Gourdou I, Djiane J, Bonnal JL, Mauroy B, Prevarskaya N. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J* 2004; 377(Pt 3): 569-578.

Vomachka AJ, Greenwald GS. The development of gonadotropin and steroid hormone patterns in male and female hamsters from birth to puberty. *Endocrinology* 1979; 105(4):960-966.

Waldstreicher J, Duffy JF, Brown EN, Rogacz S, Allan JS, Czeisler CA. Gender differences in the temporal organization of prolactin (PRL) secretion: evidence for a sleep-independent circadian rhythm of circulating PRL levels- a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(4):1483-87.

Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53(4):863-866.

Yang X, Meyer K, Frield A. STAT5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promotes angiogenesis. *J Biol Chem* 2013; 288(29):21184-96.

CAPÍTULO 22

Adenomas hipofisarios: caracterización morfológico-funcional y estrategias terapéuticas

Los tumores hipofisarios representan las neoplasias intracranenas primarias más comunes, siendo 6.6 a 9.1% de los tumores de cerebro y del sistema nervioso central, con una incidencia anual de 0.8 a 8 por cada 100.000 personas/año (Surawicz y col., 1999; Nilsson y col., 2000). Son más frecuentes en mujeres (20-45 años) respecto a hombres (35-60 años) (Davis y col., 2001). Los adenomas hipofisarios tienen una prevalencia de 16.7% (Ezzat y col., 2004). Aunque la mayoría de los adenomas son benignos y rara vez se malignizan, se comportan de modo agresivo al ejercer una compresión de masa en sitios muy delicados y se asocian a una secreción hormonal alterada (Ezzat y Asa, 2006).

El tratamiento de primera línea para la mayoría de los tumores, excepto para los prolactinomas, es la resección quirúrgica con/sin radioterapia. Sin embargo, algunos adenomas pituitarios invasivos no pueden ser controlados por dichos tratamientos. Los tumores hipofisarios son comunes en la población general y con los nuevos recursos se diagnosti-

CHAPTER 22

Pituitary adenomas: morphological-functional characterization and therapeutical strategies

Pituitary tumors represent the most frequent primary intracranial neoplasias, 6.6 to 9.1 % of them being located in the brain and central nervous system, with an annual incidence of 0.8 to 8 per 100.000 person-year (Surawicz et al., 1999; Nilson et al., 2000). They are most frequent in women (20-45 years old) compared with men (35-60 years old) (Davis et al., 2001). Pituitary adenomas have an incidence of 16.7 % (Ezzat et al., 2004). Although most adenomas are benign and rarely become malignant, they behave aggressively when they exert a mass compression associated with an altered hormonal secretion (Ezzat and Asa, 2006).

The cutting edge treatment for most tumors, except for prolactinomas, is the surgical resection with or without radiotherapy. However, some invasive pituitary adenomas cannot be controlled by those treatments. Pituitary tumors are usual in the general population and they are more frequently diagnosed thanks to the new resources avai-

can con mayor frecuencia. La mayor parte de los mismos son adenomas benignos, ya que los carcinomas son raros. Datos recientes sugieren que 1 de cada 5 individuos de la población general están afectados por adenomas pituitarios no funcionantes. Esto tiene implicancias diagnósticas y terapéuticas (Mete y Asa, 2012 y 2013). El estudio de las hipófisis en necropsias detectó adenomas en el 20 % de los casos (Kovacs y Horvath, 1986b; Lloyd, 1993; Asa y Ezzat, 1998). La tomografía axial computada (TAC) y la resonancia nuclear magnética (RNM) incrementaron su prevalencia clínica (Molicht y col., 1997). En la **fig. 22.1** se observa un adenoma hipofisario con el signo del 8 o del muñeco de nieve.

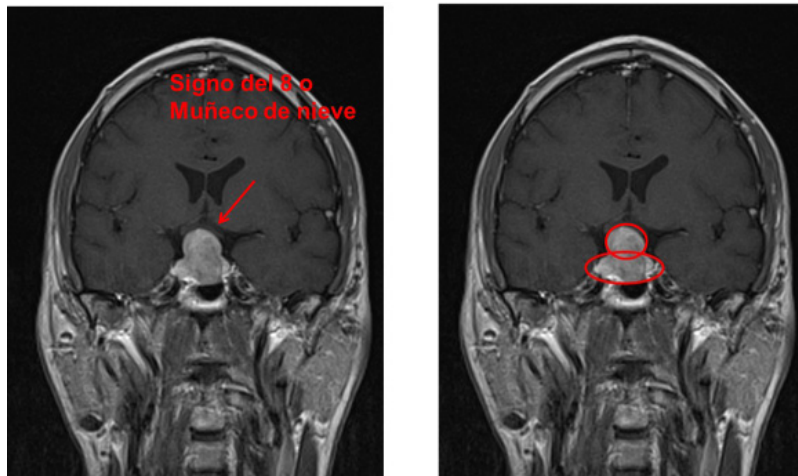


Fig. 22.1. Adenoma hipofisario. Signo del 8 o del muñeco de nieve:
consultadeneurología.com

Los adenomas hipofisarios derivan de las células progenitoras o de las células diferenciadas secretoras de hormonas. Se ha documentado un origen monoclonal a partir de una célula con mutación genética, pero una mitad es aneuploide con inestabilidad genética (Alexander y col., 1990; Herman y col., 1990; Jacoby y col., 1990; Melmed, 2011). Un pequeño porcentaje, en su mayoría prolactinomas, están asociados con el síndrome hereditario de neoplasia endocrina múltiple tipo I (Melmed, 2003).

lable. Most of them are benign since carcinomas are extremely rare. Recent data suggest that 1 every 5 individuals of the general population are affected by clinically non-functioning pituitary adenomas, which presents diagnostic and therapeutical implications (Mete and Asa, 2013). The study of hypophysis in autopsies detected adenomas in 20 % of the cases (Kovacs et al., 1986 b; Lloyd, 1993; Asa, 1998). The X-ray computed tomography (X-ray CT) and the nuclear magnetic resonance (NMR) increased their clinical prevalence (Molicht et al., 1997). In **fig. 20.1** a pituitary adenoma can be observed to present a sign of 8 or snowman appearance.

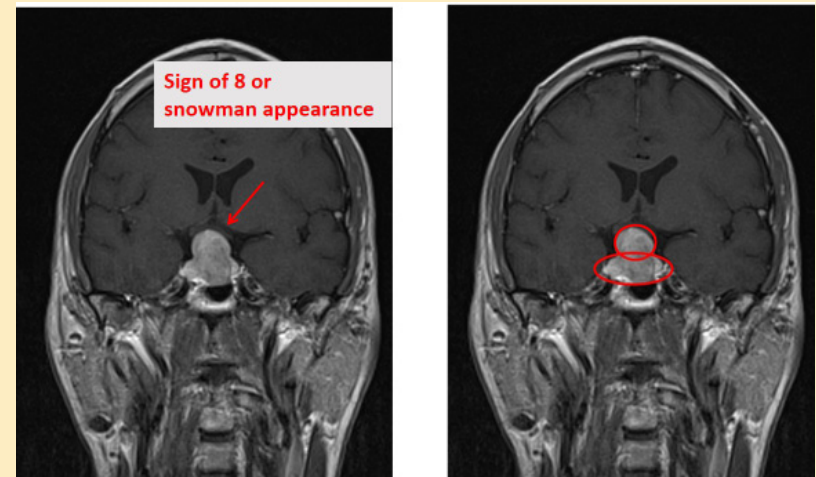


Fig. 20.1. Pituitary adenoma. Sign 8 or snowman appearance:
consultadeneurología.com

Pituitary adenomas derive from stem cells or from hormone secreting cell differentiation. A monoclonal origin from a cell with genetic mutation has been reported, but half of all pituitary adenomas are aneuploid and potentiate genetic instability (Alexander et al., 1990; Herman et al., 1990; Jacoby et al., 1990; Melmed, 2011). A small percentage, mostly prolactinomas, is related to the hereditary syndrome of multiple endocrine neoplasia type I (Melmed, 2003).

La tumorigénesis es promovida por las hormonas y los factores de crecimiento implicados en el desarrollo de la pituitaria. Los adenomas pituitarios tendrían su origen en la desregulación de los mecanismos de señalización. Las células madre han sido estudiadas mediante biomarcadores: CD133, CD44, nestin, nanog, enzima aldehído deshidrogenasa y tendrían capacidad para desarrollar adenomas pituitarios (Weiss y col., 2009; Lloyd y col., 2013). El marcador neurotrófico factor 2 del receptor α (GFR α 2) de células madre se halló en el remanente de la bolsa de Rathke de pituitarias normales y en gonadotropinomas, donde podría ser explicado su rol en la tumorigénesis hipofisaria (Mathioudakis y col., 2014). El Sox2 fue detectado en las células embrionarias y en células madre pituitarias capaces de diferenciarse en los diferentes linajes de células productoras de hormonas y tendría incidencia en la oncogénesis pituitaria (Andoniadou y col., 2013). En los adenomas pituitarios se han detectado oncogenes y genes supresores de tumores como PKC, Ras, p53 y Rb, responsables de su progresión (Ezzat, 2008; Melmed, 2011). Las herramientas del análisis genómico generadas por computadora identificaron los genes del tejido normal y de los adenomas en los que se hallaron 33 genes subexpresados que codifican las proteínas ribosomales con importancia en la tumorigénesis (de Lima y col., 2012). La baja regulación de los microARNs tiene un papel fundamental en la tumorigénesis hipofisaria humana (Palmieri y col., 2012).

Pease y col. (2013), en un estudio sistemático de 1.082 casos de adenomas pituitarios, extrajeron 47 según criterios de inclusión. El análisis permitió demostrar un alto porcentaje de susceptibilidad a la modificación epigenética que tendría un rol clave en la tumorigénesis y en la progresión tumoral. La sobreexpresión de CUL4A reguló la proliferación celular pituitaria, contribuyendo a la progresión de los adenomas pituitarios (Xu y col., 2014). Se identificaron 4.545 genes en modelos experimentales de prolactinomas inducidos mediante estrógenos, 1.177 genes se asociaron a prolactinomas humanos y se le otorgó papel crítico a Myc, E2F1, CEBPD y Sp1 (Tong y col., 2012). Los pacientes con tumores familiares portaron mutaciones genéticas y epigenéticas en los genes supresores de la línea germinal con inactivación por la vía Rb y p53 (Zhou y col., 2014).

Tumorigenesis is promoted by hormones and growth factors involved in the development of the pituitary gland. Pituitary adenomas would originate in the deregulation of the signaling mechanisms. Stem cells have been studied using biomarkers including: CD133, CD44, nestin, nanog, aldehyde dehydrogenase enzyme, and would develop pituitary adenomas (Weiss et al., 2009; Lloyd et al., 2013). The stem cell marker neurotrophic factor receptor α 2 (GFR α 2) was localized in Rathke's remnant of normal pituitaries and in gonadotropinomas; thus, its role in pituitary tumorigenesis might be explained (Mathioudakis et al., 2014). Sox2 was detected in embryonic stem cells and pituitary stem cells capable of differentiating into different hormone-producing lineages and would have a role in pituitary oncogenesis (Andoniadou et al., 2013). Oncogenes and tumor suppressor genes such as PKC, Ras, p53 and Rb have been detected in pituitary adenomas, responsible of adenoma progression (Ezzat, 2008; Melmed, 2011). Computer-generated genomic analysis tools identified genes in normal tissue and in adenomas, which showed 33 underexpressed genes encoding ribosomal proteins related to tumorigenesis (de Lima et al., 2012). Downregulation of microRNAs plays a critical role in human pituitary tumorigenesis (Palmieri et al., 2012).

Pease et al. (2013) systematically studied 1082 cases of pituitary adenomas and extracted 47 adenomas meeting inclusion criteria. The analysis allowed demonstrating a high percentage of susceptibility to epigenetic modification which would have a key role in tumorigenesis and in tumoral progression. Underexpression of CUL4A regulates pituitary cell proliferation and would contribute to the progression of pituitary adenomas (Xu et al., 2014). In experimental models of estrogen-induced prolactinomas 4545 genes were identified and 1177 genes were identified in human prolactinomas. A critical role was suggested for Myc, E2F1, CEBPD and Sp1 (Tong et al., 2012). Patients with family tumors carry genetic and epigenetic mutations in the suppressor genes of the germline which are mainly inactivated by Rb and p53 (Zhou et al., 2014).

Muchos factores de transcripción como el FoxL2 se expresaron en el desarrollo pituitario normal y en diversos adenomas hipofisarios. Se lo halló en un 20% de las células pituitarias normales (en especial en gonadotropas) y en núcleos de células adenomatosas de gonadotropinomas. Se cree que el FoxL2 contribuye a la diferenciación de las gonadotropas y de los adenomas en general (Egashira y col., 2011). El Sox2 detectado en las células madre y diferenciadas de la pituitaria mantiene la homeostasis y tendría capacidad para inducir tumores (Andoniadou y col., 2013). Duong y col. (2012) presentaron un análisis cuantitativo del genoma en adenomas hipofisarios esporádicos (14.000 genes) y en la metilación del ADN, permitiendo identificar los biomarcadores que predicen los patrones de crecimiento.

Las modificaciones epigenéticas se refieren a una expresión génica que no altera la secuencia del ADN del gen. La más común es la metilación del ADN (Dudley y col., 2009). Muchos genes silenciados por un proceso de hipermetilación desempeñarían un papel clave en la tumorigénesis. Entre los oncogenes se puede citar la mutación GNAS que inactiva la GTPasa, aumentando el AMPc, con mayor síntesis y secreción de la GH (Melmed, 2011). El P13K/AKT está implicado en la regulación de la proliferación celular y juega un papel crítico en la tumorigénesis (Musat y col., 2005). La mutación del PIK3CA aparecería en adenomas agresivos y recurrentes (Lin y col., 2009), mientras el aumento de expresión del denominado gen de transformación tumoral pituitaria (PTTG) se asocia con invasión y alto índice de proliferación celular (Yu y Melmed, 2004).

Respecto a los genes supresores de tumores se puede citar el GADD45γ regulado por p53 e implicado en la supresión del crecimiento celular y la apoptosis (Zhang y col., 2002), la proteína AIP que actúa como supresora tumoral (Vandeva y col., 2010), el MEN1 que regula la transcripción y la proliferación celular (Melmed, 2003) y el PRKAR1A que se asocia con la tumorigénesis endocrina (Bertherat y col., 2009). El oncogén PTTG se expresa en prolactinomas experimentales y humanos y está influenciado por los estrógenos, pero no se correlacionó con los niveles de PRL, el tamaño tumoral y el descenso del control dopaminérgico (Cristina et al., 2007). Los pacientes con tumores familiares presentaron mutacio-

Many transcription factors such as FoxL2 were expressed in normal pituitary development and in different pituitary adenomas. It was found in 20% of normal pituitary cells (especially in gonadotropes) and in the nuclei of gonadotropinoma adenomatous cells. It is believed that FoxL2 contributes to the differentiation of gonadotropes and adenomas (Egashira et al., 2011). Homeostasis is maintained by Sox2 detected in pituitary stem and differentiated cells and it would have tumor-inducing potential (Andoniadou et al., 2013). Duong et al. (2012) presented a quantitative analysis of DNA in sporadic pituitary adenomas (14000 genes) and DNA methylation, permitting the identification of the biomarkers that predict the growth patterns.

Epigenetic modifications refer to a gene expression that does not alter the DNA sequence of the gene. The most common is DNA methylation (Dudley et al., 2009). Silencing of many genes by a process of hypermethylation would have a key role in tumorigenesis. Among oncogenes, GNAS mutation inactivates GTPase increasing cAMP, with higher GH synthesis and secretion (Melmed, 2011). P13K/AKT is involved in the regulation of cell proliferation and plays a critical role in tumorigenesis (Musat et al., 2005). Mutation of PIK3CA would be found in aggressive and recurrent adenomas (Lin et al., 2009). The increase expression of termed pituitary tumor transforming gene (PTTG) is associated with invasion and high cell proliferation (Yu y Melmed, 2004).

With reference to tumor suppressor genes we can mention GADD45γ regulated by p53 and involved in cell growth suppression and apoptosis (Zhang et al., 2002), protein AIP which has a tumoral suppressor function (Vandeva et al., 2010), MEN1 which regulates transcription and cell proliferation (Melmed, 2003) and PRKAR1A which is associated with endocrine tumorigenesis (Bertherat et al., 2009). The oncogene PTTG is expressed in experimental and human prolactinomas and is influenced by estrogens, but does not correlate with PRL levels, tumor size and the decrease of dopaminergic control (Cristina et al., 2007). Patients with familial tumors carry germline mutations in predisposition genes (AIP, MEN1 y PRKAR1A). Zhou et al. (2014) propose that the

nes en la línea germinal a nivel de los genes predispuestos (AIP, MEN1 y PRKAR1A). Zhou y col. (2014) propusieron que la función de supresión tumoral de estos genes está principalmente mediada por las vías Rb y p53.

Existe un número de reguladores del ciclo celular como Rb1, p16, p21, p27, ciclina D1 y E que jugarían un papel importante en la tumorigénesis (Melmed, 2011). Los microARN son una clase de ARN no codificantes cortos que regulan la postranscripción y la traducción y están involucrados en la progresión del tumor (Bartel, 2004; Calin y col., 2004; Mao y col., 2010; Zhou y col., 2013). Los miR23a, miR23b y miR24-2 estuvieron aumentados en prolactinomas y somatotropinomas (Bottoni y col., 2005). Los microARN pueden funcionar como oncogénicos o como supresores tumorales (Butz y col., 2010). Los ARN largos no codificantes constituyen un subgrupo con más de 200 nucleótidos, entre los que puede citarse el MEG3 (IncARN) (Zhang y col., 2010). En los estudios de tumorigénesis se han agregado microARNs y ARN largos no codificantes (Zhou y col., 2013; Shi y col., 2012). También se han detectado mutaciones genéticas variadas (Daly y col., 2007; Marko y Weil, 2012). El proceso tumorigénico en pacientes con adenomas familiares AIP+ y AIP- mejoró las opciones diagnósticas y terapéuticas (Gadelha y col., 2013). En el 33% de los corticotropinomas se observó la pérdida de la función Brg1 que se correlaciona con la expresión de la ciclina E y la pérdida del inhibidor del ciclo celular p27 en el proceso de tumorigénesis hipofisaria (Roussel-Gervais y col., 2010). La desregulación epigenética es común y resulta de un control del ciclo celular y de la apoptosis (Asa y Ezzat, 2013).

Se necesita el desarrollo de líneas celulares de adenomas para clarificar el complejo proceso de tumorigénesis pituitaria y los recientes avances han impactado sobre la clasificación de los adenomas hipofisarios, permitiendo establecer las características clínicas específicas y los cambios genéticos que predicen los protocolos terapéuticos (Mete y Asa, 2012). Resulta de gran valor el estudio de los cambios genéticos y epigenéticos involucrados en la tumorigénesis de los adenomas pituitarios, ya que se focalizan en el rol de los genes supresores, oncogenes y microARNs (Jiang y Zhang, 2013). Una serie de expresión génica (SAGE) permitió elaborar una biblioteca de somatotropinomas y de tejido pituitario normal.

tumor suppression function of these genes is mainly mediated by the Rb and p53 pathways.

Some cell cycle regulators such as Rb1, p16, p21, p27, cyclin D1 and E would have an important role in tumorigenesis (Melmed, 2011). MicroRNAs are a class of short non-coding RNAs that regulate post-transcription and transduction and are involved in tumor progression (Bartel, 2004; Calin et al., 2004; Mao et al., 2010; Zhou et al., 2013). For example, miR23a, miR23b and miR24-2 have increased prolactinomas and somatotropinomas (Bottoni et al., 2005). MicroRNAs can have an oncogene or tumor suppressor function (Butz et al., 2010). Long non-coding RNAs constitute a subgroup with more than 200 nucleotides among which MEG3 (IncARN) can be mentioned (Zhang et al., 2010). In tumorigenesis studies microARNs and long noncoding RNAs have been added (Zhou et al., 2013; Shi et al., 2012). Varied genetic mutations have also been identified (Daly et al., 2007; Marko and Weil, 2012). The process of tumorigenesis in patients with familial pituitary adenomas AIP+ and AIP- improved the diagnostic and therapeutic options (Gadelha et al., 2013). In 33% of human corticotropinomas Brg1 loss of function observed correlates with cyclin E expression and with loss of the cell cycle inhibitor p27(Kip1) expression in the process of pituitary tumorigenesis (Roussel-Gervais et al., 2010). Epigenetic dysregulation is common, resulting in cell cycle and apoptosis regulation (Asa and Ezzat, 2013).

The development of adenoma cell lineages is necessary to clarify the complex process of pituitary tumorigenesis and recent advances have had an impact on the classification of pituitary adenomas, allowing determining the specific clinical characteristics and the genetic changes predicted by therapeutic protocols (Mete and Asa, 2012). The study of genetic and epigenetic changes involved in the tumorigenesis of pituitary adenomas is highly interesting, since it focuses on the role of suppressor genes, oncogenes and microRNAs (Jiang and Zhang, 2013). A serial analysis of gene expression (SAGE) allowed the construction of a library of normal pituitary tissue and somatotropinomas.

La apoptosis representa la muerte celular programada y se produce en el remodelado fisiológico y en lesiones neoplásicas. Las moléculas Bcl/Bax, Fas/FasL y caspasas regulan el proceso de apoptosis. Kapranos y col. (2004) mostraron la morfología, la regulación molecular y la importancia de la apoptosis en adenomas, carcinomas e hiperplasias de la glándula pituitaria. Existen dos vías de activación de la apoptosis: la intrínseca (mitocondrial) y la extrínseca (muerte del receptor) y ambas desencadenan reacciones enzimáticas que conducen a la fragmentación celular y a la posterior fagocitosis. Esto se produce en estados fisiológicos y patológicos que controlan la proliferación, la diferenciación y la remodelación tisular. En la bolsa de Rathke se hallaron numerosas células apoptóticas, mientras que en la adenohipófisis el porcentaje de apoptosis fue significativamente menor. Un desequilibrio en los genes que controlan el proceso de apoptosis marca el límite entre el desarrollo y el crecimiento neoplásico (Guzzo y col., 2014).

La PRL de 16 kDa (fragmento de PRL derivado de N-terminales) induce apoptosis e inhibe la proliferación celular, siendo modulada por los estrógenos. En la rata, un aumento en la tasa de apoptosis se produce en el proestro, mientras el pico de proliferación se detecta en el estro (Ferraris y col., 2011). La PRL endógena regula sus propias acciones biológicas en la pituitaria anterior mediante la inhibición de la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL y actuaría como un factor antiproliferativo y proapoptótico para las células adenohipofisarias mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. El receptor de PRL (RPRL) se expresa mediante tres isoformas (una larga y dos cortas) que traducen señales intracelulares con efectos diferentes en un mismo tejido. Las fallas en la señalización de la PRL contribuirían a la progresión de los adenomas hipofisarios (Ferraris y col., 2012). Concluyendo: **1.** La hiperprolactinemia aguda inducida en ratas ovariectomizadas, usando inyección de PRL o un antagonista de la dopamina, aumentó la apoptosis y descendió la proliferación lactotropa. **2.** Las deficiencias parciales o totales del RPRL pueden resultar en hiperplasia y en un eventual desarrollo de prolactinoma (Ferraris y col., 2014).

Se han señalado marcadores de proliferación en los tumores hipofisarios humanos para predecir su comportamiento. Wierinckx y col.

Apoptosis, or programmed cell death, occurs in physiological remodeling and neoplastic lesions. Molecules such as Bcl/Bax, Fas/FasL and caspases regulate the apoptotic process. Kapranos et al. (2004) showed the morphology, molecular regulation and the significance of apoptosis in pituitary adenomas, carcinomas and in pituitary hyperplasias. Two different activation pathways are known, the intrinsic pathway (or mitochondrial) and extrinsic (or death-receptor pathway), both pathways trigger enzymatic reactions that lead cells to break up and be phagocytized. This process is common in physiological and pathological states, participating in the control of cell proliferation, differentiation and remodeling of tissues. Numerous apoptotic cells were detected in Rathke's pouch, while in the adenohipophysis, the ratio of apoptosis was significantly lower. An unbalancing in the genes controlling the apoptosis process is the boundary between development and tumor growth (Guzzo et al., 2014).

It was reported that 16 kDa PRL (N-terminal-derived PRL fragment) induces apoptosis, inhibits cell proliferation, and is modulated by estrogens. In the rat, an increase in the rate of apoptosis occurs at proestrus, whereas a peak of proliferation takes place at estrus (Ferraris et al., 2011). Endogenous PRL regulates its own biological actions in the anterior pituitary by means of the inhibition of the expression of the long isoform of the PRL receptor and would have the function of an anti-proliferative and pro-apoptotic factor for the adenohipophyseal cells by means of autocrine and paracrine mechanisms. The receptor of PRL (PRLR) is expressed by means of three isoforms (a long one and two short ones) that translate intracellular signals with different effects on one same tissue. Failure in PRL signaling would contribute to the progression of pituitary adenomas (Ferraris et al., 2012). To conclude: **1.** Acute hyperprolactinemia induced in ovariectomized rats using a PRL injection or a dopamine antagonist increased apoptosis and decreased lactotrope proliferation. **2.** Partial or total deficiencies in PRLR may result in hyper

Proliferation markers in human pituitary tumors have been shown to predict their behavior. Wierinckx et al. (2010) revised the pituitary

(2010) revisaron el transcriptoma tumoral pituitario y analizaron la expresión génica que involucra el crecimiento celular, la proliferación y el ciclo celular. Los biomarcadores sirven para evaluar las funciones celulares que incluyen la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la apoptosis, la adhesión celular y la vascularización tumoral. Salehi y col. (2010) detectaron: Ki-67, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), marcadores de apoptosis, p53, metaloproteinasas de la matriz, ciclooxigenasa-2 y galectina-3. Sav y col. (2012) presentan otra gama de biomarcadores de tumores hipofisarios que permitirían esclarecer los mecanismos patogénicos: apoptosis, p53, ciclooxigenasa-2, galectina-3 y PTTG.

Los adenomas pituitarios exhiben diferentes patrones de crecimiento tisular: difuso, papilar y sinusoidal (Kovacs y Horvath, 1986a). La reticulina permite diferenciar un adenoma de una hiperplasia y también, la inmunotinción del colágeno IV es un método sencillo para el diagnóstico de adenomas pituitarios, ya que está disminuido en sus membranas basales (Jarzembowski y col., 2007). Las técnicas histoquímicas diferencian adenomas acidófilos (células GH y PRL), basófilos o PAS+ (células ACTH, TSH, LH y FSH), cromóforos (sin gránulos secretorios) y oncocíticos (con gran número de mitocondrias) mediante las tinciones: H-E, PAS y PAS-orange (Kovacs y Horvath, 1986a-b; Lloyd, 1993). La inmunohistoquímica ha permitido marcar de modo específico los distintos tipos de adenomas hipofisarios según las hormonas detectadas en los gránulos secretorios (Kovacs y col., 1978; 1982 y 1989; Katz y col., 1980; Felix y col., 1981; Mukai, 1983; Horvath y col., 1983 y 1984; Heitz y col., 1987; Bassetti y col., 1988; Robert y col., 1988; Newman y col., 1989; Sano y col., 1990; Chinezu y col., 2013).

Los estudios ultraestructurales de los adenomas pituitarios han aportado una mejor comprensión de su fisiopatología (Guyda y col., 1973; Corenblum y col., 1976; Horvath y col., 1983, 2005 y 2010; Horvath y Kovacs, 1984, 1988; 1986a-b y 1988; Trouillas y col., 1980 y 1981; Felix y col., 1981; Saeger y Ludecke, 1982; Neumann y col., 1984 y 1985; Bassetti y col., 1986) (**figs. 22.2 a 22.21**).

tumor transcriptome and analyzed the expression of genes involved in cell growth, proliferation and the cell cycle. Biomarkers are useful to evaluate the cell functions involved in cell-cycle progression, cell proliferation, apoptosis, cellular adhesion and tumor vascularization. Salehi et al. (2010) recorded the following markers: Ki-67, vascular endothelial growth factor, fibroblastic growth factor, apoptotic markers, p53, matrix metalloproteinases, cyclooxygenase-2 and galectin-3. Sav et al. (2012) presented another spectrum of pituitary tumor biomarkers that may shed light upon these pathogenic mechanisms: apoptosis, p53, cyclooxygenase-2, galectin-3 and PTTG.

Pituitary adenomas exhibit different growth patterns: diffuse, papillary and sinusoidal (Kovacs and Horvath, 1986a). Reticulin stain allows differentiating between adenoma and hyperplasia. Also, type IV collagen immunostaining is a simple method of diagnosing pituitary adenomas, which have decreased type IV collagen in their basement membranes (Jarzembowski et al., 2007). Histochemical techniques distinguish acidophilic adenomas (GH and PRL cells), basophilic or PAS+ (ACTH, TSH, LH and FSH cells), chromophores and oncocytic (with a large number of mitochondria) adenomas using H-E, PAS and PAS-orange staining methods (Kovacs and Horvath, 1986a-b; Lloyd, 1993). Immunohistochemistry has allowed specific staining of the different types of pituitary adenomas (Kovacs et al., 1978; 1982 and 1989; Mukai, 1983; Katz et al., 1980; Horvath et al., 1983; Mukai, 1983; Horvath and Kovacs, 1984; Bassetti et al., 1988; Robert et al., 1988; Heitz et al., 1987; Felix et al., 1981; Newman et al., 1989; Sano et al., 1990).

Ultrastructural studies of pituitary adenomas have allowed a better understanding of their physiopathology (Guyda et al., 1973; Corenblum et al., 1976; Horvath et al., 1983; Horvath and Kovacs, 1984; 1986a-b and 1988; Trouillas et al., 1980 and 1981; Felix et al., 1981; Saeger and Ludecke, 1982; Neumann et al., 1984 and 1985; Bassetti et al., 1986;) (**figs. 20.2 to 20.21**).

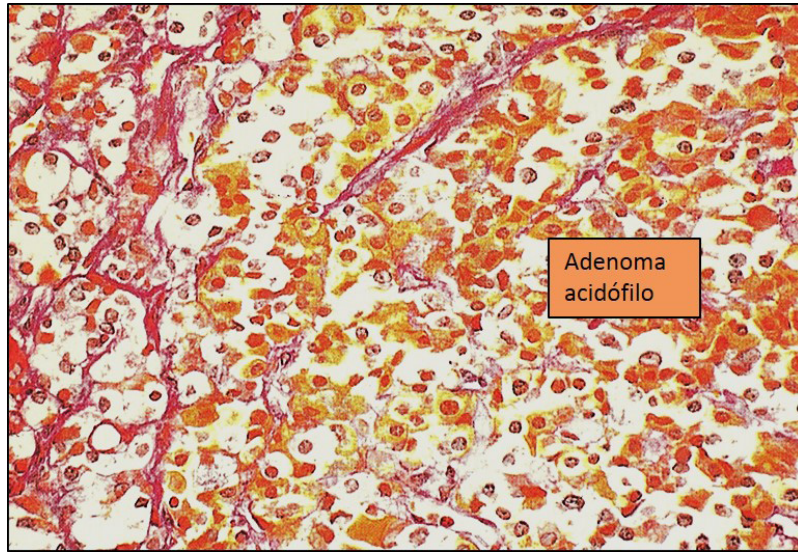


Fig. 22.2. Adenoma acidófilo. Células lactotropas o somatotropas orangiófilas (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

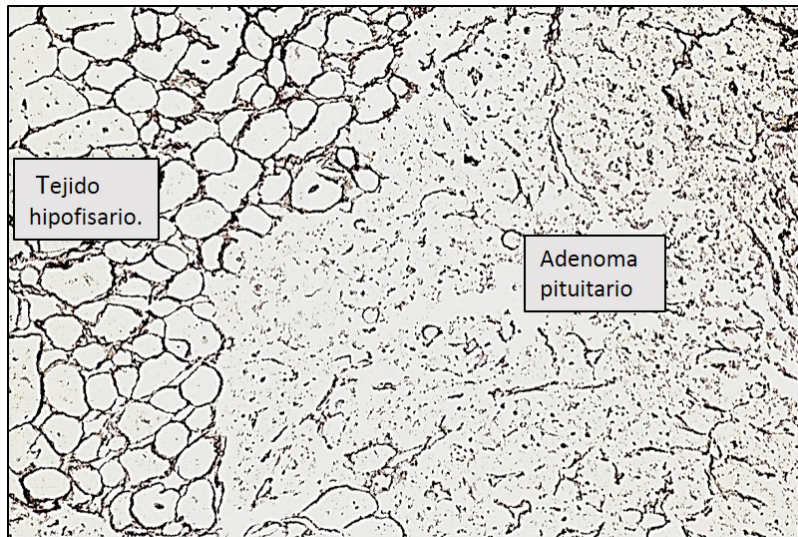


Fig. 22.3. Diferenciación entre adenoma (derecha) y tejido normal (izquierda). (Reticulina, x 300, igual campo de Fig. 20.2). Atlas OMS, 1980.

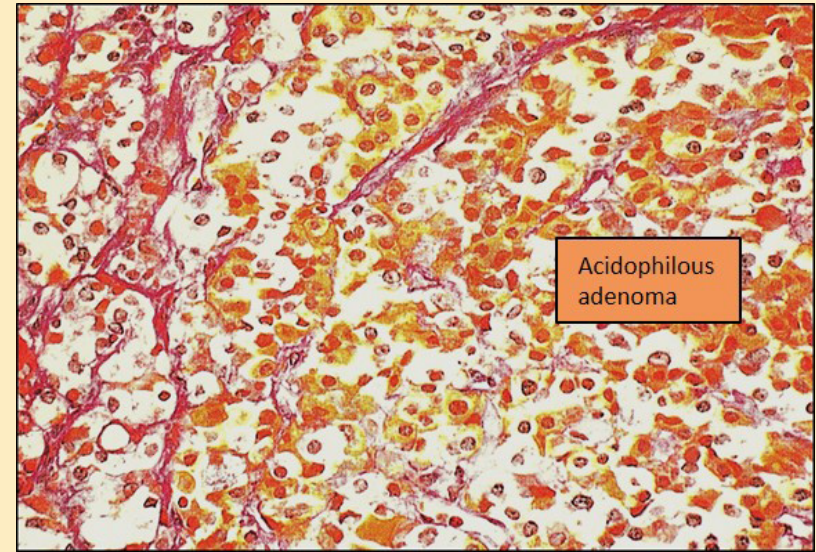


Fig. 20.2. Acidophilous adenoma. Orangeophilic lactotropes or somatotropes (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

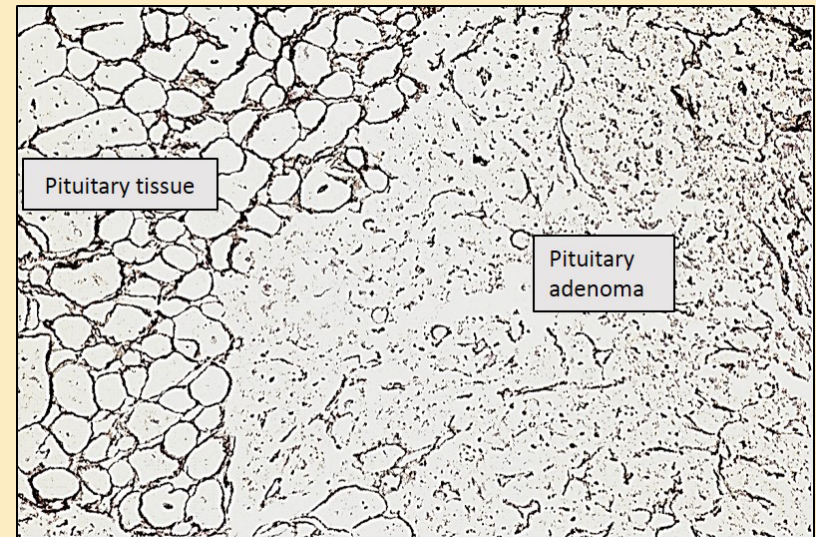


Fig. 20.3. Differentiation between adenoma (right) and normal tissue (left) (reticulin, x 300, same field as in Fig. 20.2). Atlas OMS, 1980.

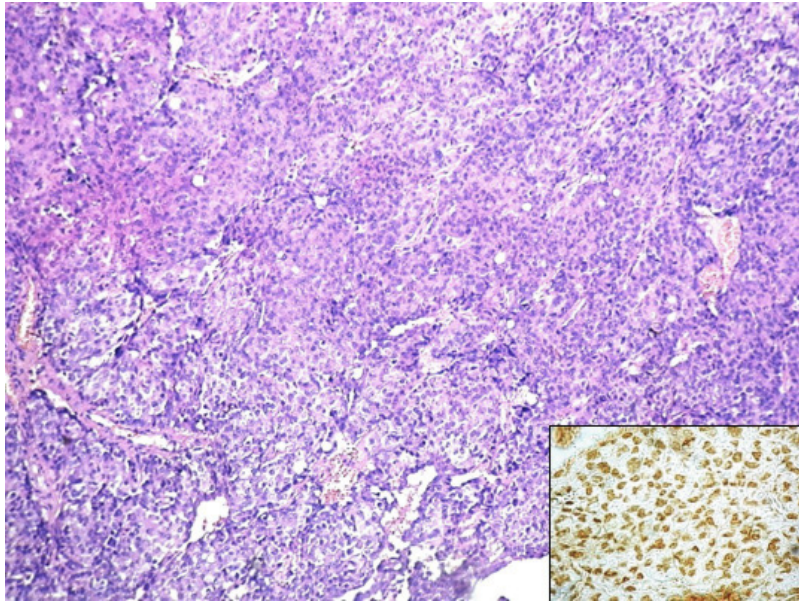


Fig. 22.4. Prolactinoma (H-E, x 300; recuadro: IHQ anti-PRL) (Balestra, 2003).

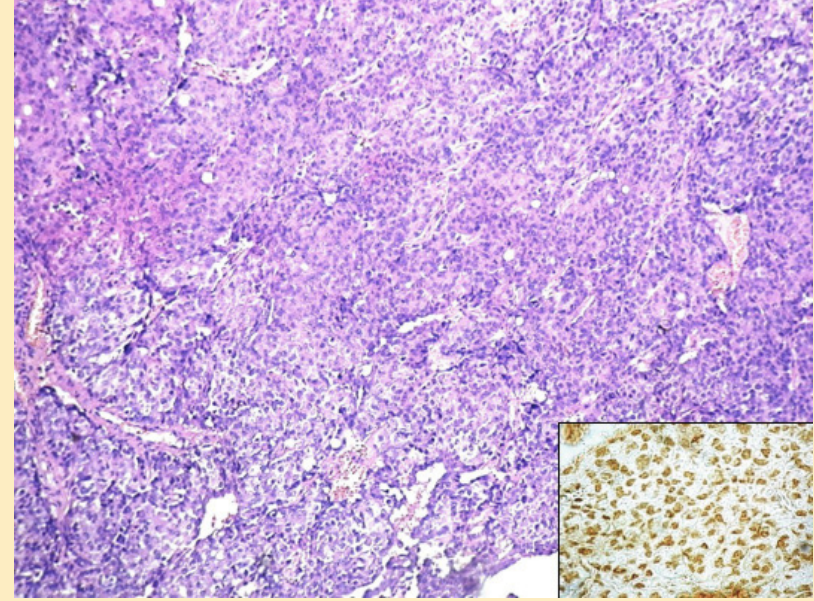


Fig. 20.4. Prolactinoma (H-E, x 300; inset: ICQ anti-PRL) (Balestra and Cónsole, 2003).

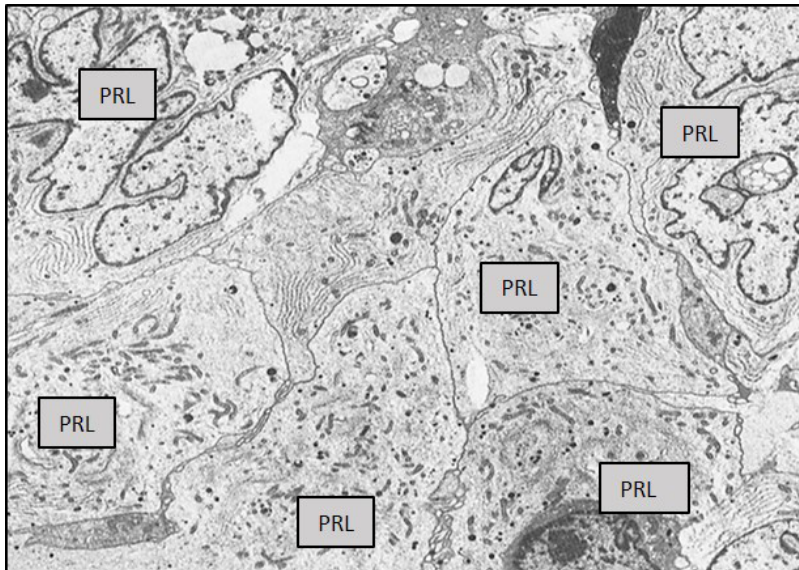


Fig. 22.5. Prolactinoma escasamente granulado (x 4.200) (Lloyd, 1993).

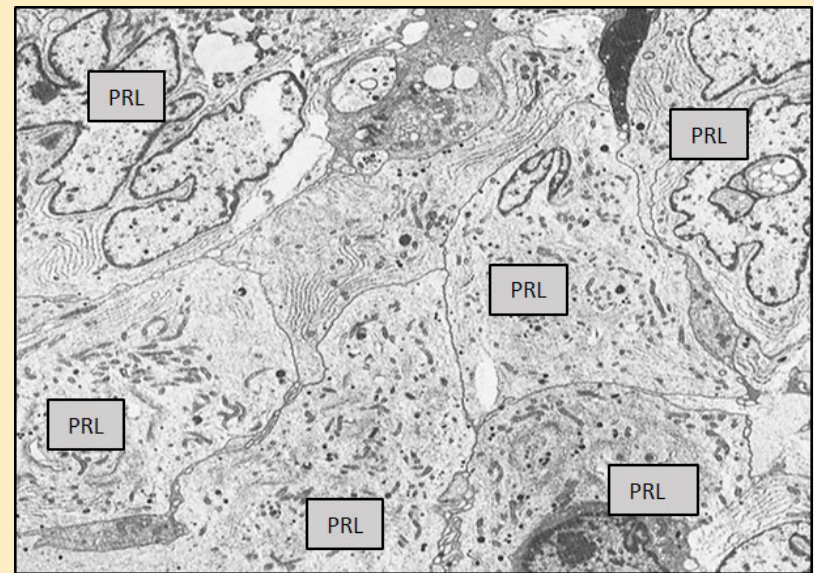


Fig. 20.5. Scarcely granulated prolactinoma (x 4.200) (Lloyd, 1993).

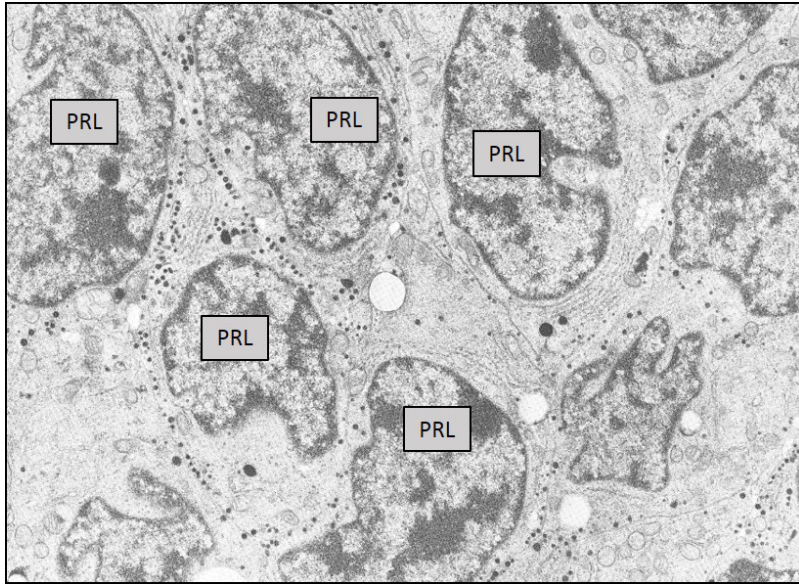


Fig. 22.6. Prolactinoma con bromocriptina. Núcleos heterocromáticos, Golgi y RER involutivos (x 2.400) (Lloyd, 1993).

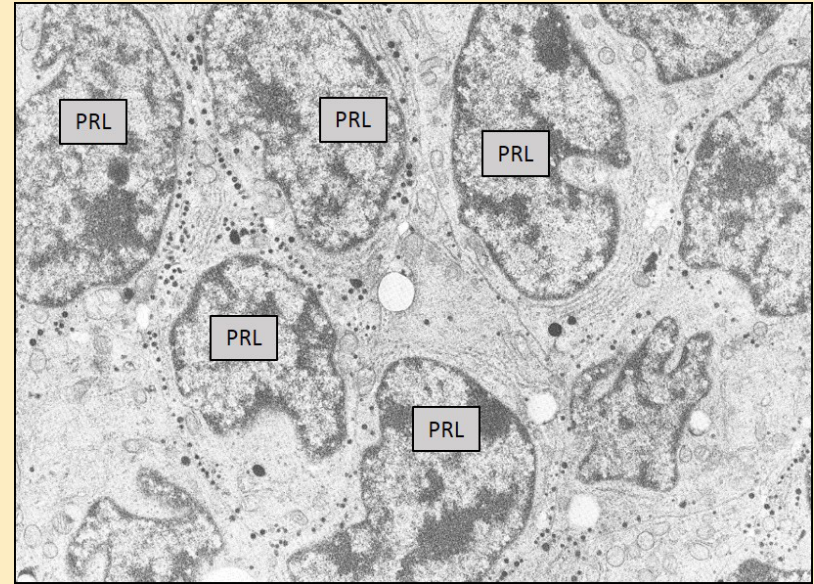


Fig. 20.6. Prolactinoma with bromocriptine. Heterochromatic nuclei, involutive Golgi and RER (x 2.400) (Lloyd, 1993).

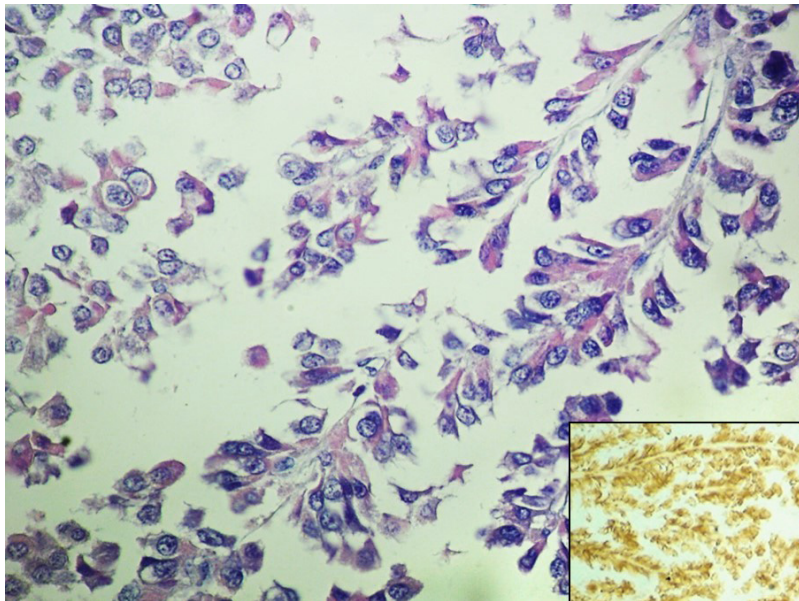


Fig. 22.7. Somatotropinoma (H-E - recuadro: IHQ anti-GH) (Balestra, 2003).

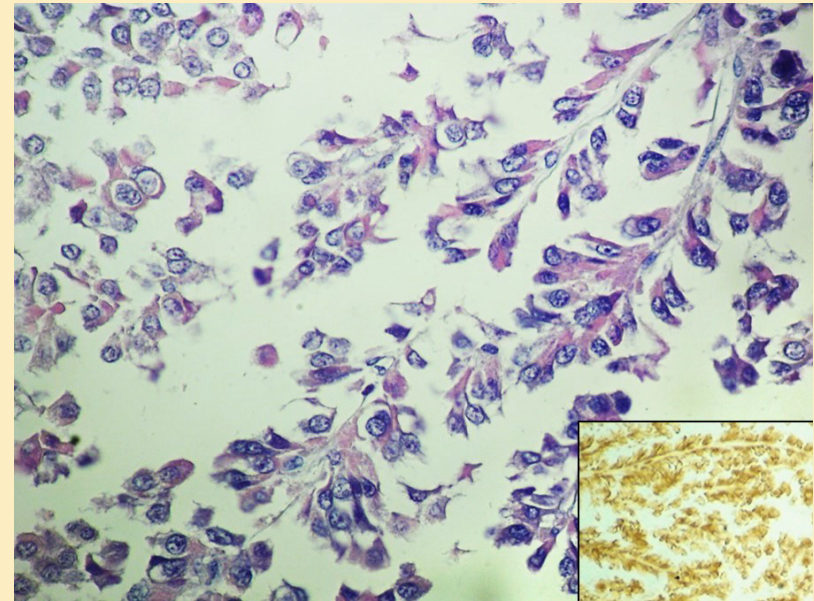


Fig. 20.7. Somatotropinoma (H-E x300; inset: ICQ anti-GH) (Balestra and Cónsole, 2003).



Fig. 22.8. Somatotropinoma densamente granulado (x 6.400) (Lloyd, 1993).

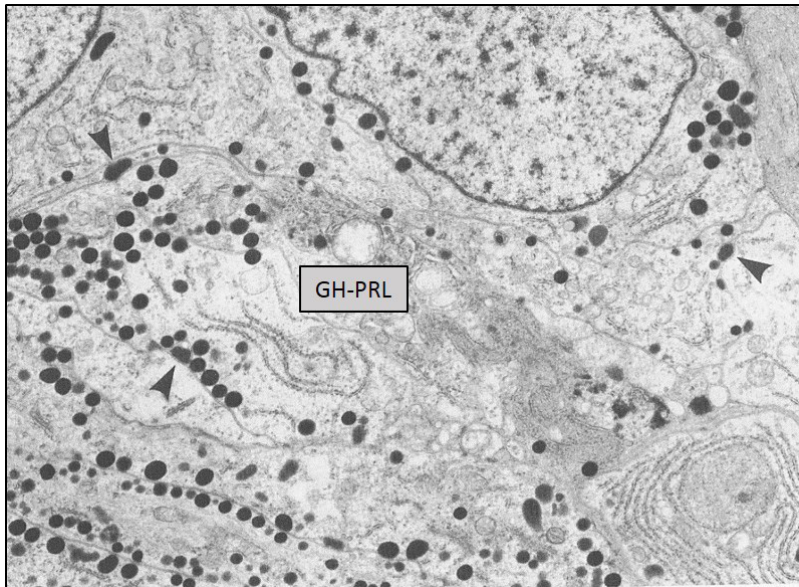


Fig. 22.9. Mammosomatotropinoma. Exocitosis con extrusión de gránulos → (x 8.100) (Lloyd, 1993).

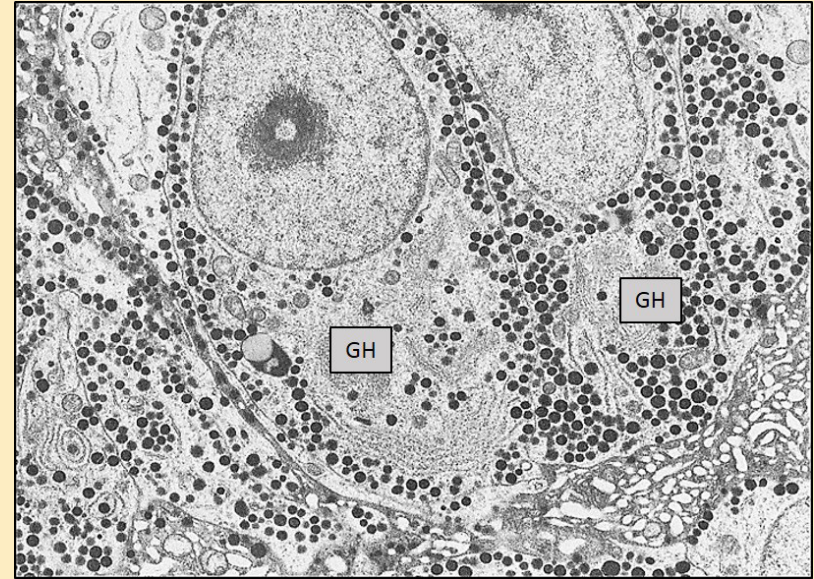


Fig. 20.8. Densely granulated somatotropinoma (x 6.400) (Lloyd, 1993).

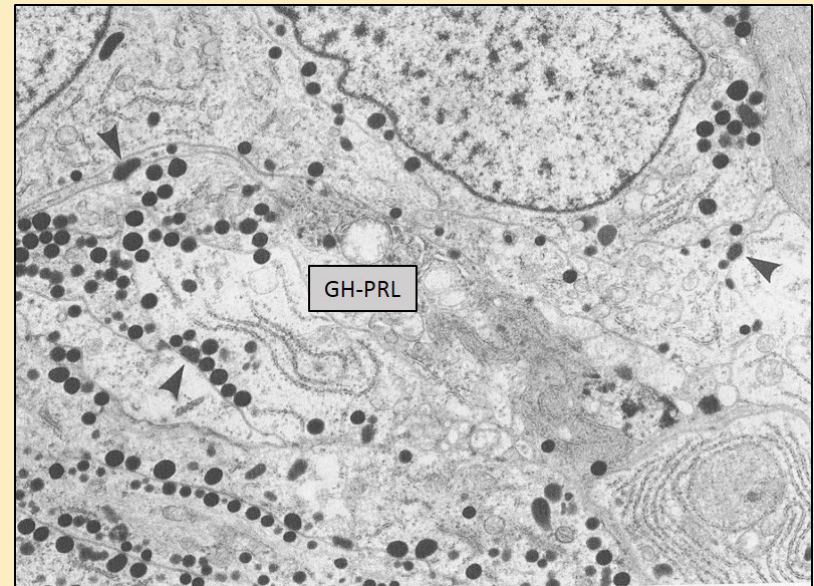


Fig. 20.9. Mammosomatotropinoma. → Exocytosis with extrusion of granules (x 8.100) (Lloyd, 1993).

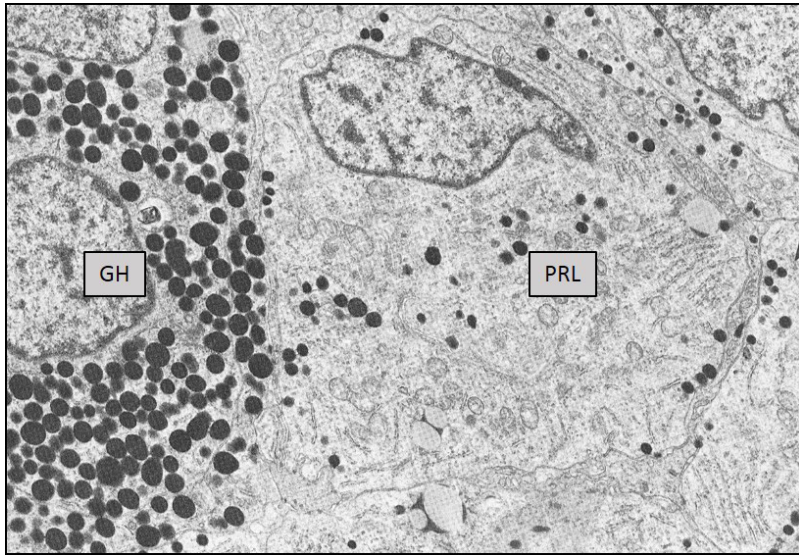


Fig. 22.10. Adenoma mixto. Izquierda: somatotropa; derecha: lactotropa (x 6.700).

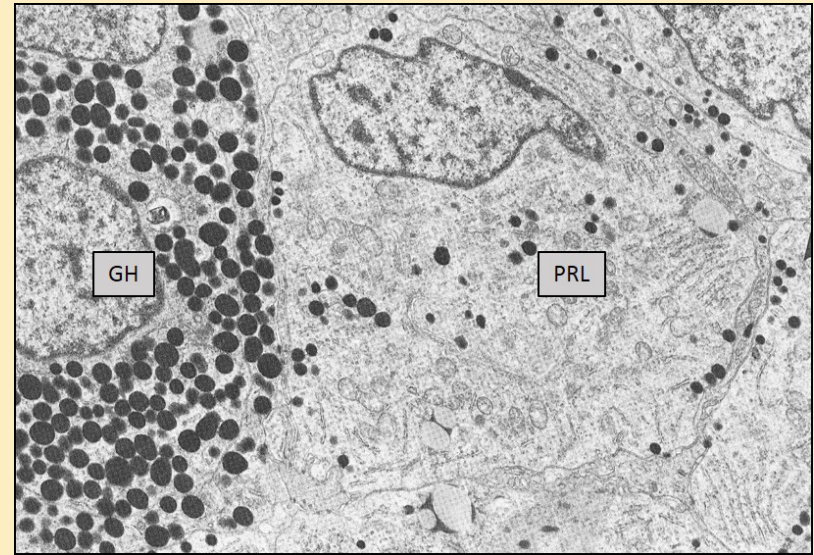


Fig. 20.10. Mixed-cell adenoma: somatotropes and lactotropes (x 6.700).

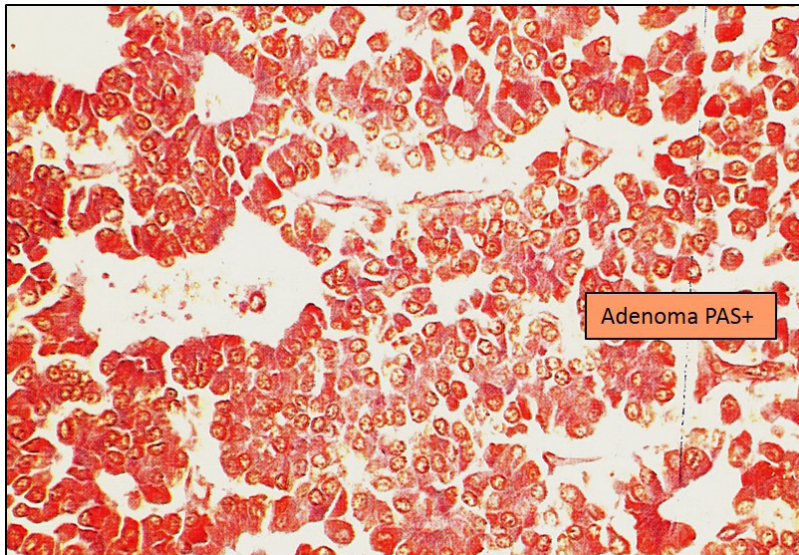


Fig. 22.11. Adenoma de células PAS+ (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

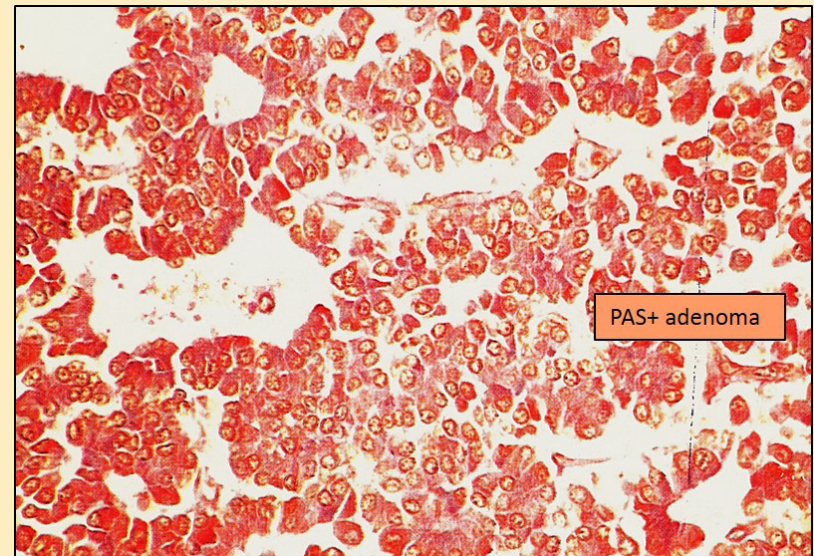


Fig. 20.11. PAS+ cell adenoma (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

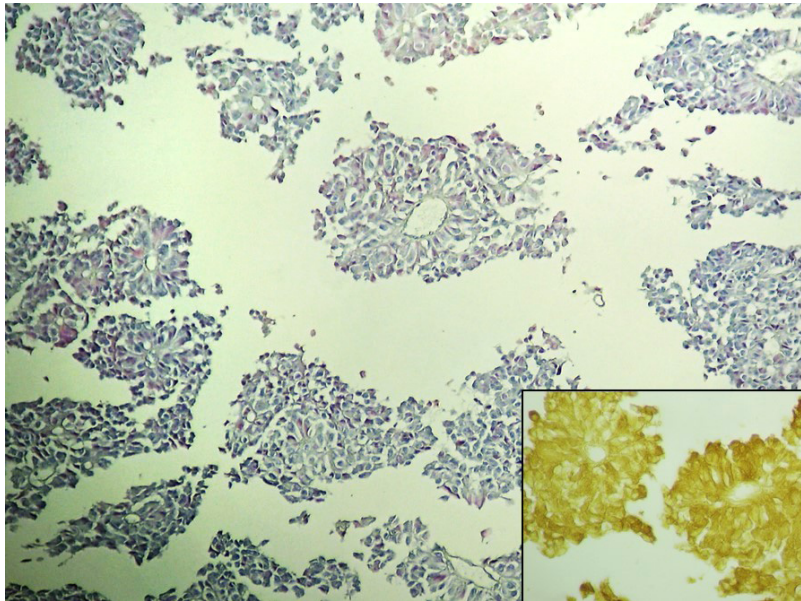


Fig. 22.12. Corticotropinoma (H-E - recuadro: IHQ anti-ACTH) (Balestra, 2003).

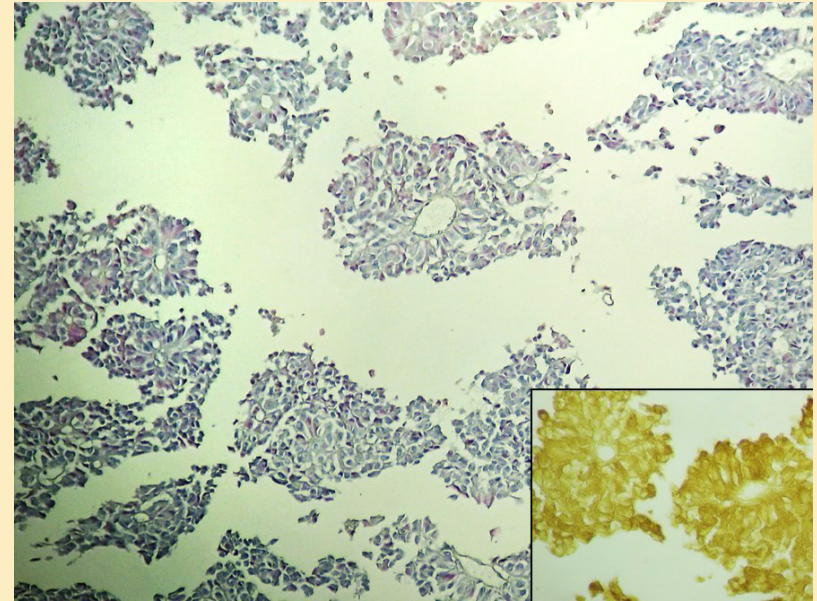


Fig. 20.12. Corticotropinoma (H-E x 300; inset: ICQ anti-ACTH) (Balestra and Cónsole, 2003).

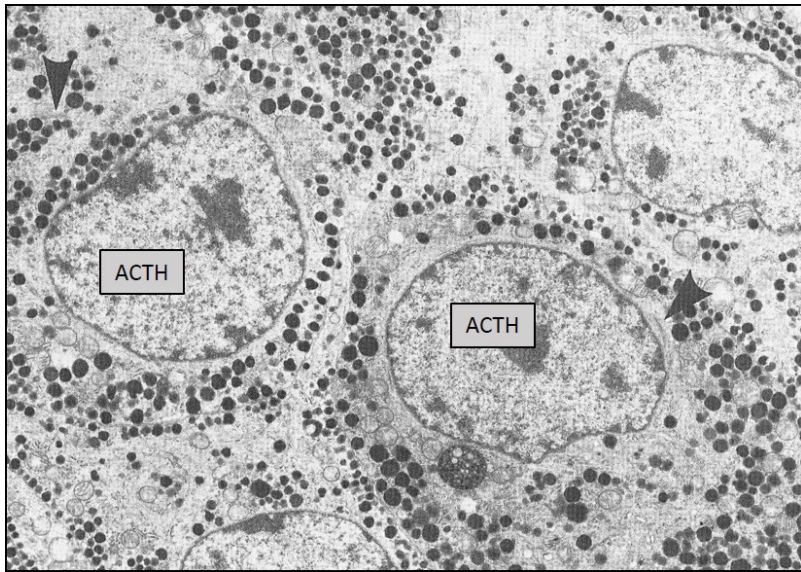


Fig. 22.13. Corticotropinoma densamente granulado (x 6.500) (Lloyd, 1993).

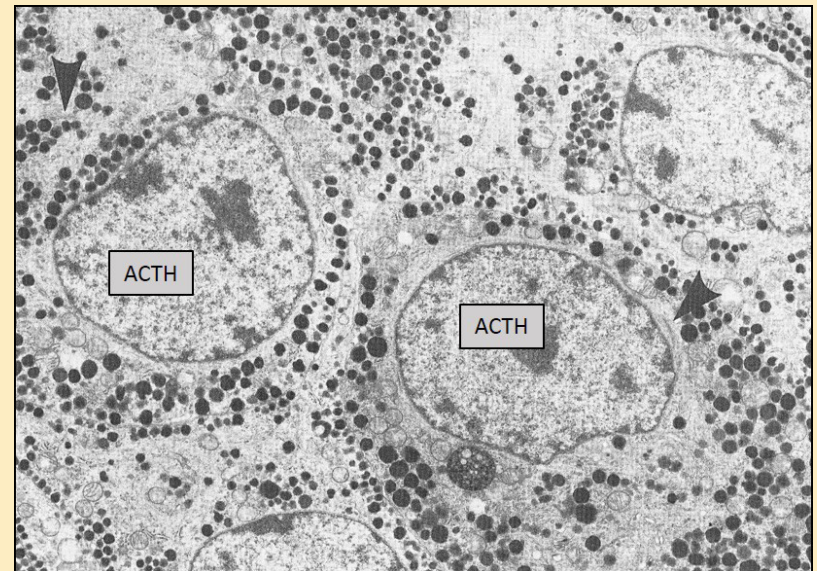
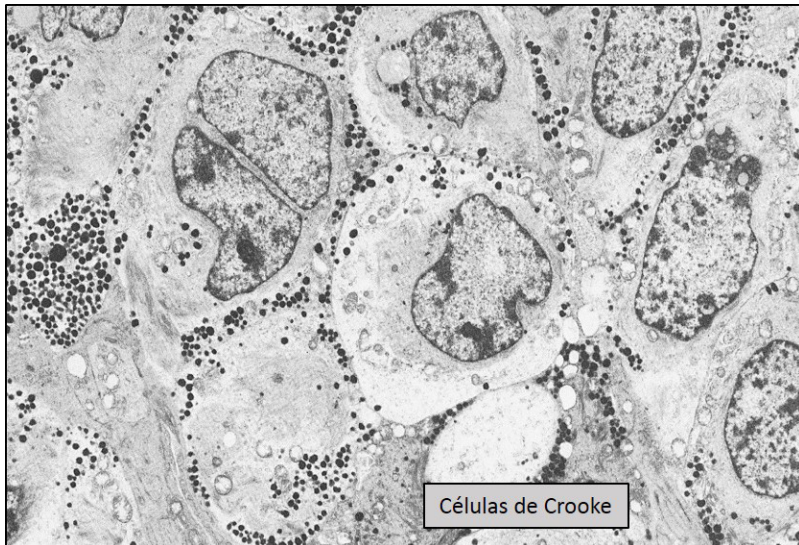


Fig. 20.13. Densely granulated corticotropinoma (x 6.500) (Lloyd, 1993).



Adenoma con células de Crooke

Fig. 22.14. Adenoma con células de Crooke (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.



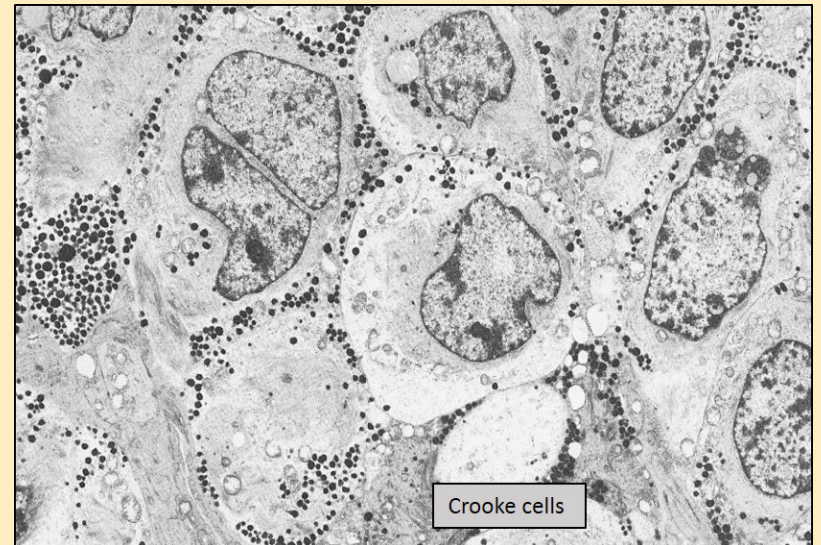
Células de Crooke

Fig. 22.15. Adenoma de células de Crooke. Gránulos secretorios periféricos y filamentos perinucleares tipo 1 (x 4.300) (Lloyd, 1993).



Adenoma of Crooke cells

Fig. 20.14. Crooke cell adenoma (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.



Crooke cells

Fig. 20.15. Crooke cell adenoma. Peripheral secretory granules and type I perinuclear filaments (x 4.300) (Lloyd, 1993).

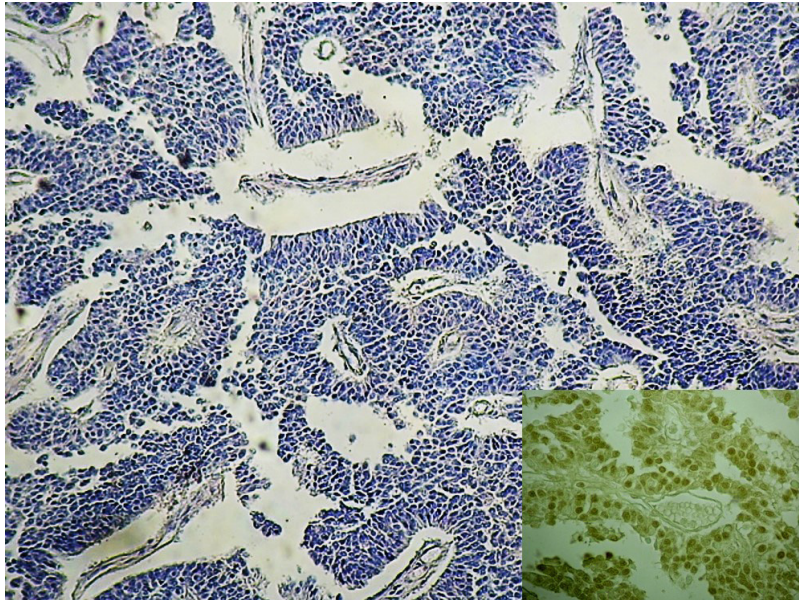


Fig. 22.16. Gonadotropinoma (H-E - recuadro: IHQ anti-LH) (Balestra, 2003).

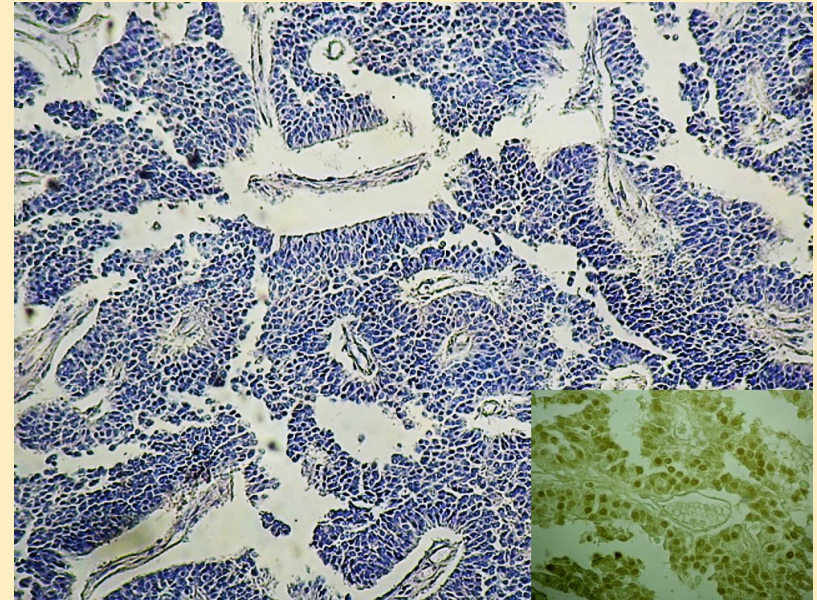


Fig. 20.16. Gonadotropinoma (H-E x 300; inset: ICQ anti-LH) (Balestra and Cónsole, 2003).

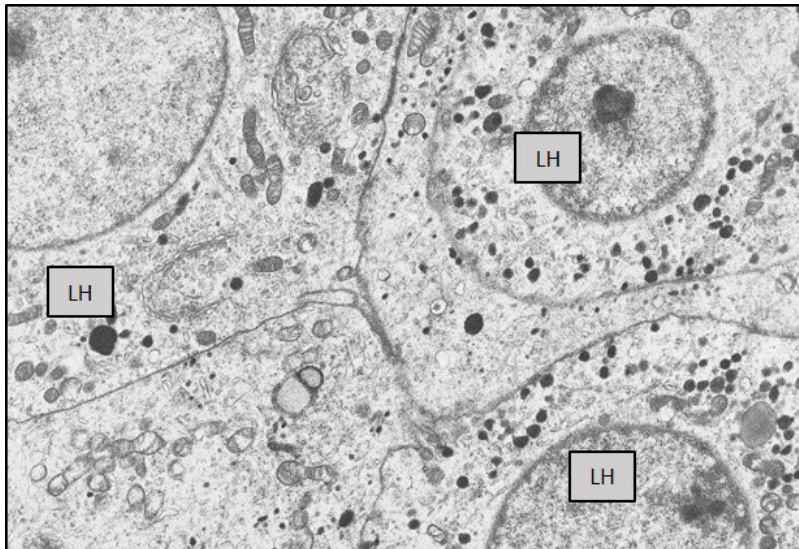


Fig. 22.17. Gonadotropinoma. Pequeños gránulos secretorios de diferente electrodensidad (x 9.100) (Lloyd, 1993).

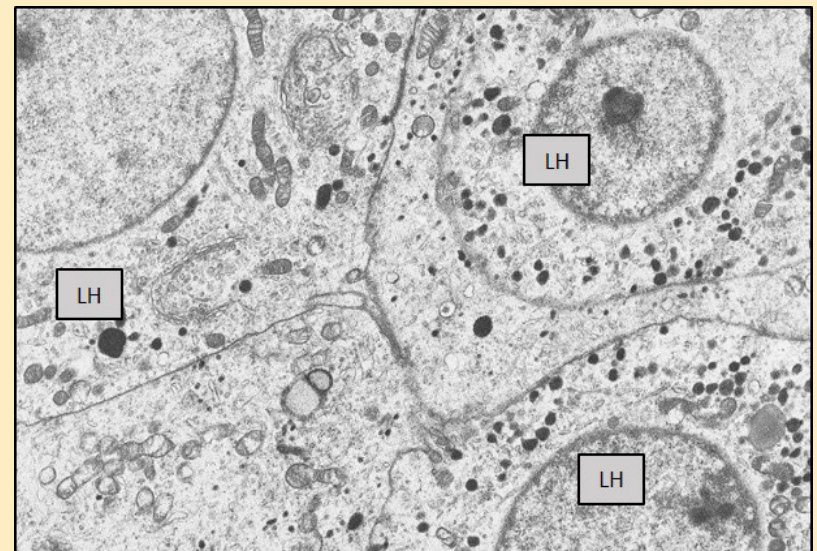


Fig. 20.17. Gonadotropinoma. Small secretory granules of different electron density (x 9.100) (Lloyd, 1993).

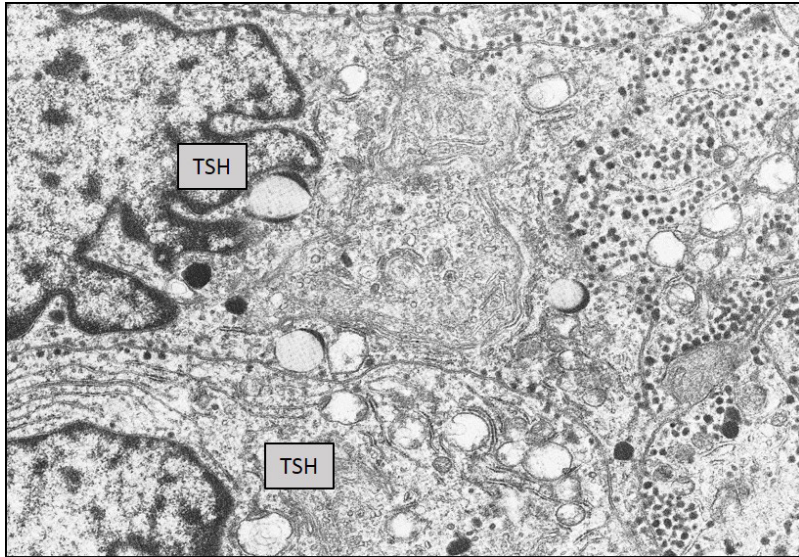


Fig. 22.18. Tirotopinoma. Golgi con numerosas vesículas y gránulos secretorios pequeños (x 11.900) (Lloyd, 1993).

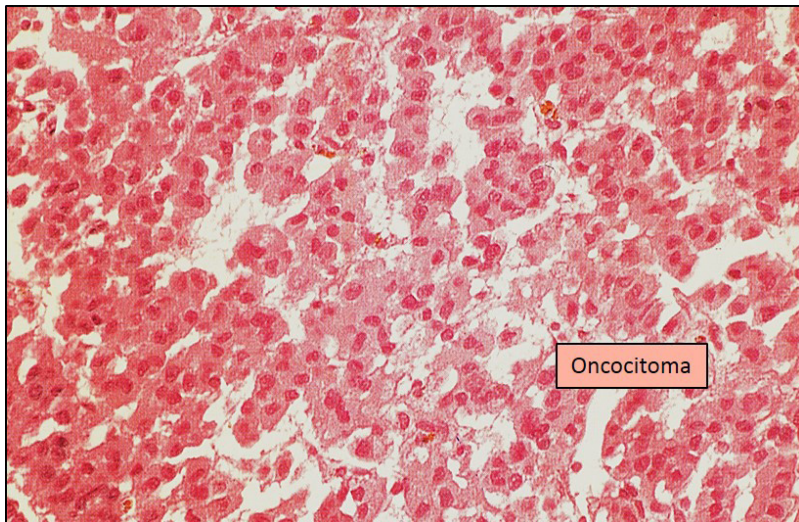


Fig. 22.19. Oncocitoma. Acidofilia: mitocondrias (H-E, x 300). Atlas OMS, 1980.

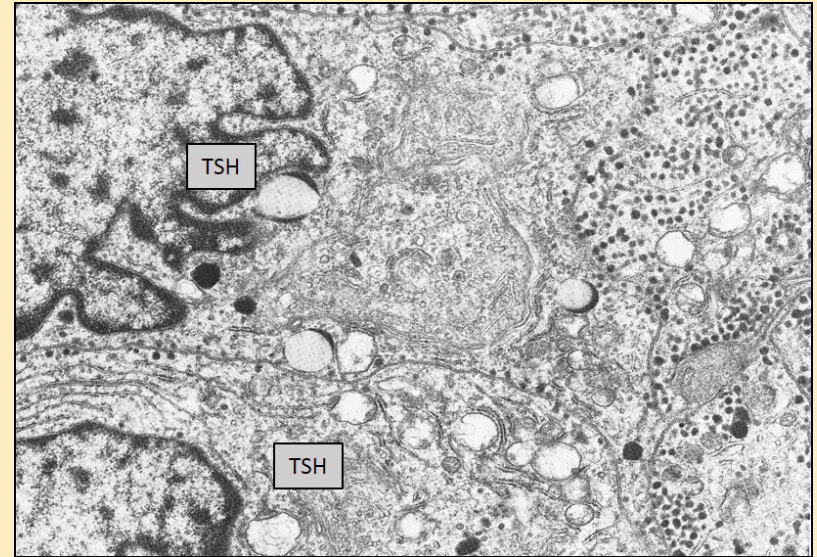


Fig. 20.18. Thyrotropinoma. Golgi with numerous vesicles and small secretory granules (x 11.900) (Lloyd, 1993).

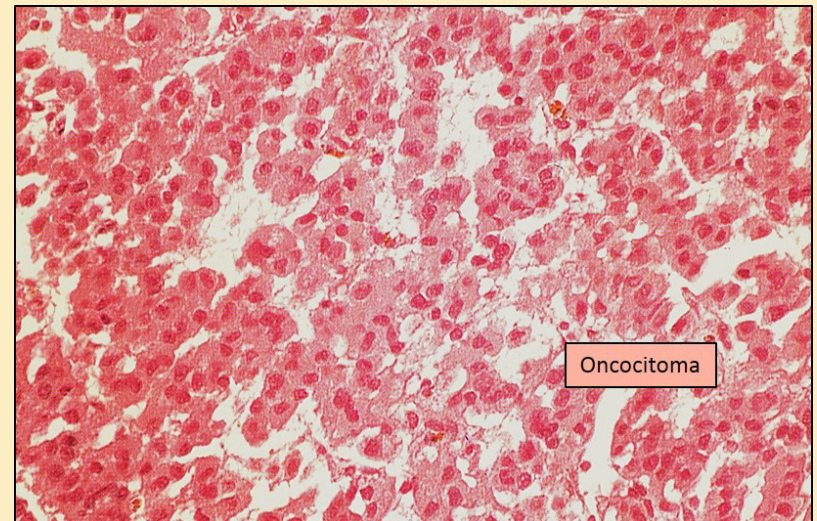


Fig. 20.19. Oncocitoma: with mitochondria (H-E, x 300). Atlas OMS, 1980.



Fig. 22.20. Oncocitoma. Se ven numerosas mitocondrias (x 7.700) (Lloyd, 1993).

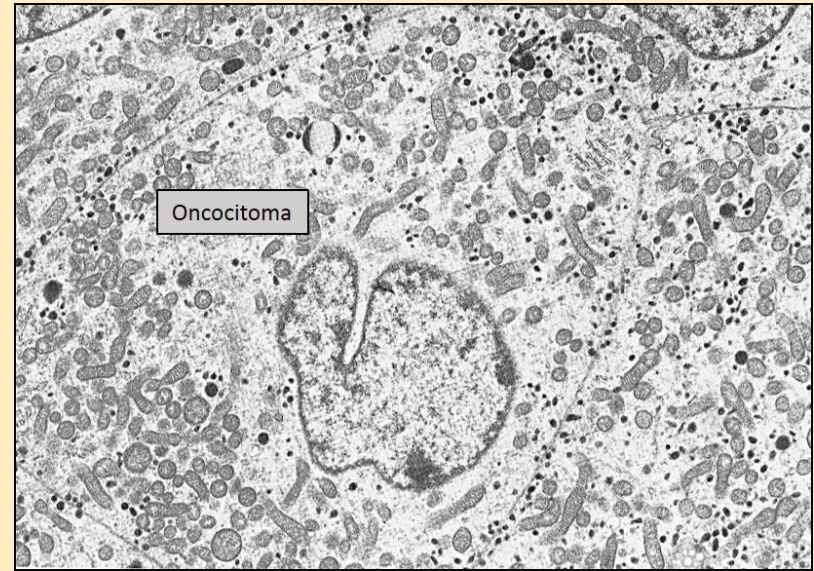


Fig. 20.20. Oncocitoma: with numerous mitochondria (x 7.700) (Lloyd, 1993).



Fig. 22.21. Adenoma cromófono (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

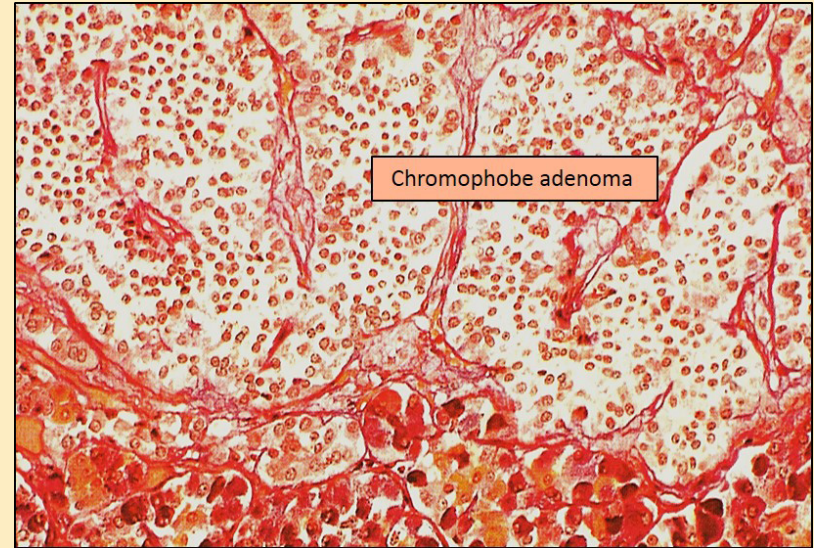


Fig. 20.21. Chromophobe adenoma (PAS-orange, x 300). Atlas OMS, 1980.

Los aportes dados por la microscopía electrónica, los radioinmunoensayos, la inmunohistoquímica, la neuroimagen y la genética molecular han abierto nuevos horizontes en el estudio de la patología hipofisaria (Asa y Mete, 2014). De acuerdo al orden de frecuencia se citan: prolactinomas (25-41%), somatotropinomas (10-15%) y corticotropinomas (10%). Los demás tipos son menos frecuentes. Kjaer (2015) revisó las neuroimágenes de la silla turca que han contribuido a la localización precisa de la patología hipofisaria y demostró las desviaciones de la pared anterior en asociación con el desarrollo frontonasal y de la pared posterior en relación a malformaciones (por ejemplo: en cerebelo). Los macroadenomas (> 1 cm) pueden llevar a: alteraciones del campo visual, compresión de los nervios craneanos, hipopituitarismo e infiltración de los senos cavernosos. Un tercio de los adenomas no son funcionantes y los funcionantes muestran un patrón hormonal específico (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación inmunohistoquímica de los tumores hipofisarios (Raverot y col., 2014)

Tipo tumoral	Inmunoperfiles
Prolactinoma Densamente granulado Escasamente granulado	PRL PRL, α -SU
Somatotropinoma Monohormonal Densamente granulado Escasamente granulado	GH, (α -SU), Ck, (CgA) GH, (α -SU), Ck, (CgA)
Plurihormonal GH-PRL Mamosomatotropinoma	GH, PRL, (α -SU, β -TSH) GH, PRL, (α -SU, β -TSH)
Corticotropinoma Densamente granulado Escasamente granulado	ACTH, β -endorfina, β -LPH, Ck, (CgA) ACTH, β -endorfina, β -LPH, Ck, (CgA)
Tirotropinoma Monohormonal Plurihormonal	β -TSH, α -SU β -TSH, α -SU, GH, PRL
Gonadotropinoma No inmunoreactivo Tumores silenciosos	β -FSH, β -LH, (α -SU), CgA (CgA)
Mono-plurihormonal ACTH GH TSH	ACTH, β -endorfina, β -LPH GH, PRL, (β -TSH) β -TSH, α -SU, GH, PRL

The data provided by electron microscopy, molecular genetic studies, neuroimaging, radioimmunoassays and immunohistochemistry have opened new horizons in the field of pituitary pathology (Asa and Mete, 2014). According to their frequency rate we can mention: prolactinomas (25-41%), somatotropinomas (10-15%) and corticotropinomas (10%). The other types are less frequent. Kjaer (2015) revised the neuroimages of the *sella turcica* that have contributed to the precise situation of pituitary pathology and demonstrated that deviations in the anterior wall are associated with frontonasal development, while deviations in the posterior wall are connected with malformations in the posterior structures (e.g. in cerebellum). Macroadenomas (> 1 cm) can lead to alterations in the visual field, compression of cranial nerves, hypopituitarism and infiltration of the cavernous sinus. A third of adenomas are nonfunctioning and functioning ones show a specific hormonal pattern (table 1).

Table 1. Immunohistochemical classification of pituitary tumors (Raverot et al., 2014)

Tumour type	Immunoprofiles
PRL tumour Densely granulated Sparsely granulated	PRL PRL, α -SU
GH tumour Monohormonal Densely granulated Sparsely granulated	GH, (α -SU), Ck, (CgA) GH, (α -SU), Ck, (CgA)
Plurihormonal GH-PRL Mamosomatotrope	GH, PRL, (α -SU, β -TSH) GH, PRL, (α -SU, β -TSH)
ACTH tumour Densely granulated Sparsely granulated	ACTH, β -endorfina, β -LPH, Ck, (CgA) ACTH, β -endorfina, β -LPH, Ck, (CgA)
Tirotropinoma Monohormonal Plurihormonal	β -TSH, α -SU β -TSH, α -SU, GH, PRL
FSH-LH tumours Non immunoreactive Silent tumours	β -FSH, β -LH, (α -SU), CgA (CgA)
Mono-plurihormonal ACTH GH TSH	ACTH, β -endorphin, β -LPH GH, PRL, (β -TSH) β -TSH, α -SU, GH, PRL

Los tumores pituitarios son históricamente considerados benignos. Sin embargo, varias piezas de evidencia clínica y los recientes avances en los datos patológicos y moleculares sugieren la necesidad de que estos tumores sean considerados más que una enfermedad endocrina, a pesar de la baja incidencia de metástasis. Trouillas (2014) cree que la mejor clasificación de estos tumores y la identificación de los marcadores pronósticos ayudarán a los médicos para escoger el manejo terapéutico adecuado. En la **tabla 2** se presenta la clasificación clinicopatológica de los tumores hipofisarios.

Tabla 2. Clasificación clinicopatológica pronóstica de los tumores hipofisarios (Raverot y col., 2014)

Clasificación clinicopatológica pronóstica de los tumores pituitarios
1. Tamaño del tumor: micro (< 10mm), macro (> 10mm) y gigante (> 40mm).
2. Tipo tumoral: GH, PRL, ACTH, FSH/LH y TSH mediante inmunohistoquímica.
3. Grado: Criterios:
A. Invasión de senos cavernoso o esfenoidal.
B. Proliferación: al menos 2 de los 3 marcadores: Mitosis (> 2 en 10 campos de mayor aumento). Ki-67 (> 3%). P53 (positivo: > 10 núcleos + en 10 campos de mayor aumento).
Grados: 1a: no invasivo. 1b: no invasivo y proliferante. 2a: invasivo. 2b: invasivo y proliferante. 3: metastásico.

Los adenomas pituitarios requieren pruebas endocrinas y estudios neurológicos para un diagnóstico preciso (**tabla 3**).

Pituitary tumors are historically considered benign. However, various pieces of clinical evidence and recent advances in pathological and molecular data suggest the need to consider that these tumors are more than an endocrinological disease, despite the low incidence of metastasis. Trouillas (2014) believe that a better classification of these tumors and the identification of prognostic markers will help the clinician to choose the appropriate therapeutic management. In **table 2** stages of pituitary adenomas are presented.

Table 2. Clinicopathological classification of the pituitary tumours (Raverot et al., 2014)

Prognostic clinicopathological classification of the pituitary tumours
1. Tumour size: micro (< 10mm), macro (> 10mm) and giant (> 40mm).
2. Tumoral type: GH, PRL, ACTH, FSH/LH y TSH by immunohistochemistry.
3. Grade: Criteria:
A. Invasion of cavernous or sphenoid sinus.
B. Proliferation: at least 2 of 3 markers: Mitoses (> 2/10 HPF). Ki-67 (> 3%). P53 (positive: > 10 nuclei/10 HPF).
Grades: 1a: non-invasive. 1b: non-invasive and proliferative. 2a: invasive. 2b: invasivo and proliferative. 3: metastatic.

Pituitary adenomas require endocrine tests and neurological studies for accurate diagnosis (**table 3**).

Tabla 3. Diagnóstico de los adenomas hipofisarios.

<p>PRUEBAS ENDOCRINAS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Dosajes de hormonas hipofisarias.- Prolactinemia: PRL > 22 ng/ml.- Acromegalia: GH > 6 ng/ml.- No se inhibe con carga de glucosa. <p>ESTUDIOS NEUROLÓGICOS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Campimetría.- Serie Rx de cráneo.- TAC.

Los adenomas hipofisarios muestran síntomas endocrinos de hiperfunción/ hipofunción glandular y síntomas neurológicos: cefalea, afección de los pares craneanos, hemianopsia bitemporal, hipertensión endocraneana.

Las manifestaciones clínicas de los adenomas pituitarios se presentan con una sobreproducción de hormonas en los microadenomas o un “efecto de masa” en los macroadenomas (Klibanski y Zervas, 1991). Los “efectos de masa” de los macroadenomas usualmente incluyen defectos en los campos visuales resultantes de la compresión de los nervios ópticos, cefaleas, hipopituitarismo y, raramente, invasión de la base de cráneo con dolencias en los nervios intracraneanos. Sólo de modo excepcional, los tumores pituitarios son verdaderamente malignos con metástasis a distancia (Kaltsas y col., 2005).

En la **tabla 4** se señalan las principales manifestaciones clínicas de los adenomas hipofisarios y su expresión hormonal.

Table 3. Diagnosis of pituitary adenomas.

<p>ENDOCRINE TESTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- Dosage of pituitary hormones:- Prolactinemia: PRL > 22 ng/ml- Acromegalia: GH > 6 ng/ml- Not inhibited by glucose load <p>NEUROLOGICAL STUDIES:</p> <ul style="list-style-type: none">- Visual field campimetry- Skull series- CAT scan- MRI
--

Pituitary adenomas show endocrine symptoms of gland hyperfunction or hypofunction and neurological symptoms: headache, bitemporal hemianopsia, affection of the cranial bones and endocranial hypertension.

The clinical manifestations of the pituitary adenomas appear with overproduction of hormones in the microadenomas or a “mass effect” in macroadenomas (Klibanski and Zervas, 1991). These “mass effects” in macroadenomas usually include visual field abnormalities that result from the compression of visual nerves, headache, hypopituitarism and rarely, skull base invasion, causing multiple intracranial nerve diseases. Only exceptionally, pituitary tumors are really malignant and present distant metastasis (Kaltsas et al., 2005).

In **table 4** the main clinical manifestations of pituitary adenomas and their hormonal expression are shown.

Tabla 4. Principales manifestaciones clínicas de los adenomas pituitarios

Subtipos de adenomas	Porcentaje	Expresión hormonal	Principales manifestaciones clínicas
Prolactinoma	25-41	PRL	Galactorrea. Amenorrea.
Somatotropinoma Mamosomatotropinoma	10-20	GH (GH + PRL)	Acromegalia.
Corticotropinoma	5-15	ACTH	Síndrome de Cushing.
Gonadotropinoma	10-15	FSH, LH, subunidad α	Irregularidades menstruales. Hipopituitarismo. Efectos de masa tumoral.
Tirotropinoma	0.5-2	TSH, subunidad α	Hipertiroidismo.
Adenoma de células nulas	5-10	Ninguna	Efectos de masa tumoral. Hipopituitarismo.

Los tumores secretores de PRL y de GH causan anomalías reproductivas y síndrome de acromegalia, respectivamente (Monson, 2000). Los tumores productores de ACTH producen la enfermedad de Cushing (Arafah y Nasrallah, 2001) y los secretores de gonadotropinas y TSH provocan anomalías en sus respectivos ejes (Smallridge, 1987).

Giometto y col. (1997) inmunomarcaron las células folículo-estelares (FE) con S100, GFAP, vimentina y marcadores de macrófagos y las consideraron macrófagos residentes de la pituitaria. Iwaki y col. (1986); Miyazaki y col. (1988) y Li (1990) observaron una hiperplasia de células FE en adenomas pituitarios. Dicha hiperplasia de células FE puede ser inducida por el microambiente inflamatorio y presenta un fenotipo de células dendríticas con coexpresión S100 y HLA-DR que las transforma en células presentadoras de antígeno. Es decir, serían capaces de ejercer una inmunovigilancia tumoral que explicaría su presencia en la periferia de los adenomas pituitarios (Miyazaki y col., 1988; Vajtai y col., 2007). Horvath y col. (2010) estudiaron las neoplasias selares con folículos típicos de la pituitaria y tejido pituitario fetal con diferenciación endocrina y asumieron que las células FE de la hipófisis humana serían células madre adultas con potencial neoplásico.

Los adenomas hipofisarios familiares aislados comprenden 2% de los adenomas pituitarios. El receptor aril de hidrocarburo interactúa con la

Table 4. Main clinical manifestations of pituitary adenomas

Adenoma Subtypes	Percentage	Hormonal expression	Main clinical manifestations
Prolactinoma	25-41	PRL	Galactorrhea. Amenorrhea.
Somatotropinoma	10-20	GH (GH + PRL)	Acromegaly.
Corticotropinoma	5-15	ACTH	Cushing's syndrome.
Gonadotropinoma	10-15	FSH, LH, subunit α	Menstruation disorders. Hypopituitarism. Tumoral mass effects.
Thyrotropinoma	0.5-2	TSH, subunit α	Hyperthyroidism.
Null-cell Adenoma	5-10	None	Tumoral mass effects. Hypopituitarism.

Prolactin (PRL) and growth hormone (GH) secretory tumors cause reproductive abnormalities and acromegaly syndrome, respectively (Monson, 2000). ACTH-secreting tumors cause Cushing's disease (Arafah and Nasrallah, 2001) and those secreting gonadotropins (FSH-LH) and thyrotropin (TSH) produce abnormalities in their axes (Smallridge, 1987).

In most patients with gonadotropin secretory tumors symptoms are similar to those appearing in patients with null cell adenomas. These gonadotrophic tumors start as nonfunctioning tumors in the clinic. Null cell adenomas that produce none of the hormones mentioned may be considered to be the sixth type of pituitary adenomas (Swensen and Kirsch, 2002; Melmed and Kleinberg, 2008).

Giometto et al. (1997) immunostained FS cells with S-100, GFAP, vimentin and macrophage markers, and considered them to be pituitary-resident macrophages. Iwaki et al. (1986); Miyazaki et al. (1988) and Li (1990) observed hyperplasia of FS cells in pituitary adenomas. This hyperplasia may be induced by the inflammatory microenvironment and presents an immunophenotype of dendritic cells with S-100 and HLA-DR co-expression which transforms them into cells that perform antigen presentation. That is to say, they may be able to exert tumoral immunosurveillance explaining their presence in the periphery of pituitary tumors (Miyazaki et al., 1988; Vajtai et al., 2007). Horvath et al. (2010) studied sellar neoplasias with follicles which are typical of the pituitary and fetal human pituitary tissue

proteína del gen (AIP) y se lo ha identificado como causante de la predisposición familiar (Beckers y col., 2013). También, debe hacerse un análisis genético en los pacientes jóvenes con macroadenomas esporádicos que presentan mutaciones de la línea germinal con neoplasia múltiple tipo 1 (MEN1) (Cuny y col., 2013). Los análogos de somatostatina modulan los adenomas somatotropos AIP mediante el regulador de dedo zinc de la apoptosis y la detención del ciclo celular (ZAC1) (Chahal y col., 2012; Oriola y col. (2012) estudiaron las mutaciones en la línea germinal del gen AIP en somatotropinomas resistentes a los análogos la somatostatina. Philippon y col. (2012) mostraron un control a largo plazo de un carcinoma MEN 1 secretor de PRL después del tratamiento con temozolomida.

Los prolactinomas constituyen los adenomas hipofisarios funcionantes más frecuentes (> 40%) (McComb y col., 1984 y 1985; Gillam y col., 2006; Melmed y col., 2011). La incidencia de microprolactinomas es de un 27% en la población general, siendo un 41% inmunorreactivos para PRL. Una de cada diez personas muere con un prolactinoma sin ser diagnosticado (Burrow y col., 1981; Colao y col., 1998). Los prolactinomas tienen mayor incidencia en mujeres entre la segunda y quinta década de la vida. Hay una relación 14 a 1 entre mujeres y hombres durante la tercera década. Después de la quinta década, la incidencia de prolactinomas es mayor en los hombres. Son más frecuentes los macroprolactinomas en los hombres y los microprolactinomas en las mujeres adultas, debido a la expresión temprana de la sintomatología (Velkeniers y Hooghe-Peters, 1998). El tratamiento con DA sola representa la terapia de primera línea en los macroprolactinomas: cirugía y radioterapia deberían ser reservadas para pacientes ya sea intolerantes o resistentes a la DA (Green y col., 2014). Tirosh y col. (2014) detectaron que los macroprolactinomas en hombres causaban hipopituitarismo parcial, afectando la testosterona en todos los adenomas y el cortisol en los pacientes con macroadenomas.

La hiperprolactinemia causa alteraciones en la reproducción, descenso de la libido, amenorrea y galactorrea (Ezzat 2003). Los prolactinomas producen cefales, trastornos visuales, hipopituitarismo y parálisis de los nervios craneanos por compresión de las estructuras vecinas.

with endocrine differentiation, and assumed that human FS cells may be adult stem cells with neoplastic potential.

Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) comprise 2% of pituitary adenomas. The aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene has been identified as causing familial cases of pituitary adenoma predisposition (Beckers et al., 2013). Also, a genetic analysis should be done in young patients with sporadic pituitary macroadenomas that present germline mutations with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) (Cuny et al., 2013).

Somatostatin analogs modulate AIP in somatotrope adenomas by zinc finger regulator of apoptosis and cycle arrest (ZAC1) (Chahal et al., 2012) and Oriola et al. (2012) studied the germline mutations of AIP gene in somatotropinomas resistant to somatostatin analogues. Philippon et al. (2012) showed a long-term control of MEN1 PRL-secreting pituitary carcinoma after temozolomide treatment.

Prolactinomas constitute the most frequent functioning pituitary adenomas (> 40 %) (McComb et al., 1984 and 1985; Gillam et al., 2006; Melmed et al., 2011). The incidence of microprolactinomas is of 27% in the general population, and 41% is immunoreactive for PRL. One out of 10 people die having a prolactinoma which has not been diagnosed (Burrow et al., 1981; Colao et al., 1998). Prolactinomas show higher incidence in women between the second and fifth decade of life. There is a ratio of 14 to 1 between women and men during the third decade. After the fifth, incidence of prolactinomas is higher in men. Macroprolactinomas are more frequent in men and microprolactinomas are more frequent in adult women, due to the early expression of symptomatology (Velkeniers and Hooghe-Peters, 1998).

Treatment with DA alone represents the optimal first-line therapy in macroprolactinomas: surgery and radiotherapy should be reserved for patients who are either intolerant of or resistant to DA (Green et al., 2014). Tirosh et al. (2014) detected that macroprolactinomas in men caused partial hypopituitarism, affecting testosterone in all adenoma size groups and cortisol more in patients with macroadenomas.

Hyperprolactinemia causes alterations in reproduction, decrease of the libido, amenorrhea and galactorrhea. Compression of neighboring struc-

Expresan el receptor de dopamina (RD2) y se tratan con medicamentos dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina, pero un 20 % de los pacientes desarrollan resistencia o recidivan (Melmed y col., 2011).

Resulta de interés su caracterización genómica en ratas y humanos. Drewett y col. (1993) hallaron aumento de apoptosis en una hiperplasia lactotropa inducida mediante estrógenos y tratada con bromocriptina. Salazar-López Ortiz y col. (2014) presentan una guía clínica práctica para el diagnóstico y tratamiento de la hiperprolactinemia en pacientes embarazadas y no embarazadas.

La macroprolactina, un complejo monomérico de PRL con inmunoglobulina G, puede ser causa de un diagnóstico de laboratorio de hiperprolactinemia. Beda-Maluga y col. (2014) propusieron la evaluación de la hiperprolactinemia con el uso de los intervalos de PRL después de la separación de las macroformas y Jamaluddin y col. (2013) evaluaron la macroprolactinemia mediante cromatografía de precipitación con polietilenglicol y filtración en gel. Vilar y col. (2014) remarcan la necesidad de definir la etiología de la hiperprolactinemia ya que un nivel de 200-250 ng/ml puede no corresponder a un prolactinoma y 25% de los pacientes con microprolactinomas pueden presentar niveles de PRL inferiores a 100 ng/ml.

En las **tablas 5-6** se presentan los síntomas (hombre y mujer) y se establecen las causas de hiperprolactinemia: deficiencia de DA hipotálamica, deficiencia de su transporte a la adenohipofisis, insensibilidad de las lactotropas a la DA y estimulación de las lactotropas. Debe remarcar que niveles superiores a 150-200 ng/ml de PRL se consideran diagnósticos de prolactinoma.

Tabla 5. Síntomas de la hiperprolactinemia

MUJER	HOMBRE
Amenorrea	Menor libido
Galactorrea	Impotencia
Irregularidades menstruales	Infertilidad
Hirsutismo	Ginecomastia
Ovario poliquístico	Galactorrea
Infertilidad	
Osteopenia	

tures produce headache, visual field disturbances, paralysis of the cranial nerves and hypopituitarism. They express dopamine 2 receptor (D2R) and are treated with dopaminergic drugs such as bromocriptine and cabergoline (Melmed et al., 2011). Prolactinomas are efficiently treated by means of dopamine antagonists, but 20 % of patients develop resistance or relapse.

It is interest to notice their genomic characterization in rats and humans. Drewett et al. (1993) found increase of apoptosis in a lactotropa hyperplasia induced by means of estrogens and treated with bromocriptine. Salazar-López-Ortiz et al. (2014) present a clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of hyperprolactinemia in pregnant and non-pregnant patients.

Macroprolactin, a complex of monomeric PRL with immunoglobulin G, may be a cause of laboratory diagnosed hyperprolactinemia. Beda-Maluga et al. (2014) proposed the evaluation of hyperprolactinemia with the use of the intervals for PRL after macroforms separation and Jamaluddin et al. (2013) evaluated macroprolactinemia by polyethylene glycol precipitation and gel filtration chromatography. Vilar et al. (2014) point out the need to define the etiology of hyperprolactinemia since as much as 25% of patients with microprolactinomas may present PRL levels < 100 ng/ml. In **tables 5-6** the causes of hyperprolactinemia and symptoms according to sex are determined. Levels higher than 150-200 ng/ml de PRL are usually considered diagnoses of hyperprolactinemia.

Table 5. Causes of hyperprolactinemia

1. Hypothalamic dopaminergic deficiency:

- Hypothalamic diseases: tumors, malformations.
- Caused by drugs: methyl dopa, reserpine, metoclopramide, cimetidine, domperidone, verapamil.

2. Deficiency in the transport of dopamine to the adenohipophysis.

Section of the stalk, micro- and macroadenomas.

3. Insensitivity of lactotropes to domapine:

- Micro- and macroadenoma.
- Drugs: phenothiazines, butyrophenones.

4. Stimulation of lactotropes:

- TRH (hypothyroidism).

Tabla 6. Causas de hiperprolactinemia

- 1. Deficiencia de la dopamina hipotalámica:**
 - Enfermedades hipotalámicas: tumores, malformaciones.
 - Secundaria a drogas: metildopa, reserpina, metoclopramida, cimetidina, doperidona, verapamil.
- 2. Deficiencia en el transporte de la dopamina hacia la adenohipófisis:**
 - Sección del tallo, micro-macroadenoma.
- 3. Insensibilidad de lactotropas a la dopamina:**
 - Micro-macroadenoma.
 - Drogas: fenotiazinas, butifenonas.
- 4. Estimulación de las lactotropas:**
 - TRH (hipotiroidismo).

Los somatotropinomas muestran altos niveles de GH/IGF-I y se tratan con análogos de la somatostatina (octreótido), provocando descenso de la grelina. En un estudio de Somm y col. (2013) se usó un inhibidor de la secreción del dominio de la hormona liberadora de GH (GHRH) y del dominio de la endopeptidasa de la toxina botulínica (SXN101742) que ejerció una acción inhibitoria sobre el eje somatotropo con fuerte inhibición de la síntesis pituitaria de la GH.

D'Angelo y col. (2012) identificaron microARN (miARN) que son reguladores de la expresión génica en somatotropinomas: miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548C-3p, miR-570 y miR-603. Su baja regulación podría contribuir a la tumorigénesis hipofisaria. Los microARNs (miR-26b y miR-128) regularon el crecimiento del mamosomatotropinoma a través de la activación de la vía PTEN-AKT (Palumbo y col., 2013). Trivellin y col. (2012) detectaron una sobreexpresión del microARN miR-107 en adenomas pituitarios y una inhibición de la expresión de la proteína del receptor de aril hidrocarburo.

Kovacs y col. (1996) realizaron valiosos estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* de los corticotropinomas. El estudio comparativo de los tumores con síntomas de hipercorticismismo demostró que un 45% eran corticotropinomas y 15% eran tumores extrapituitarios con secreción ectópica de ACTH.

Se analizaron parámetros clínicos, hormonales y morfológicos. Se estudiaron 46 corticotropinomas y 37 tumores neuroendocrinos se-

Table 6. Symptoms of hyperprolactinemia

WOMAN	MAN
Amenorrhea	Decreased libido
Galactorrhea	Impotence
Menstruation disorders	Infertility
Hirsutism	Gynecomastia
Polycystic ovary	Galactorrhea
Infertility	
Osteopenia	

Somatotropinomas evidence high levels of GH/IGF-I and are treated with somatostatin analogues (octreotide) causing decrease in ghrelin. A secretion inhibitor of GHRH domain and the endopeptidase domain of the botulinum toxin (SXN101742) was used in a study by Somm et al. (2013), where SXN101742 exerted an inhibitory action on the somatotrophic axis and a strong inhibition of pituitary GH synthesis.

D'Angelo et al. (2012) identified microRNAs (miRNA), which are regulators of gene expression in somatotropinoma: miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548C-3p, miR-570 and miR-603, whose downregulation might contribute to pituitary tumorigenesis. MicroRNAs (miR-26b and miR-128) regulated of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway (Palumbo et al., 2013). According to Trivellin et al. (2012) miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interaction protein.

Kovacs et al. (1996) carried out valuable immunohistochemical and *in situ* hybridization studies in corticotropinomas. A comparative study of tumors with symptoms of hypercorticism was done and 45 % were found

cretores de ACTH. La estructura histológica de los corticotropinomas fue benigna en comparación con el grado de malignidad/invasión de los tumores neuroendocrinos (Lapshina y col., 2013; Kolesnikova y col., 2013).

En la mayor parte de los pacientes con tumores secretores de gonadotropinas, los síntomas son similares a los que presentan los pacientes con adenomas de células nulas. Dichos tumores gonadotróficos comienzan como tumores no funcionantes en la clínica. Los adenomas de células nulas que no producen ninguna de las mencionadas hormonas, pueden ser considerados como el sexto tipo de adenomas pituitarios (Swensen y Kirsch, 2002; Melmed y Kleinberg, 2008).

Yamada y col. (2014) estudiaron las características clínicopatológicas y los resultados terapéuticos de 90 casos de adenomas secretores de TSH (18% microadenomas y 82% macroadenomas). La cirugía y el tratamiento con análogos de somatostatina lograron eutirodismo en el 83%, la reducción del tumor fue hallada en el 55% y no se presentó recurrencia en el 84% de los pacientes.

Los adenomas multihormonales muestran inmunorreactividad para más de una hormona. Las combinaciones más comunes incluyen adenomas GH, PRL y una subunidad de glicoproteína (β TSH, β FSH, β LH y α SU) (Bassetti y col., 1986; Salehi y col., 2006; Luk y col., 2012). También hay rarezas como la combinación ACTH-GH (Rasul y col., 2014) (tabla 7).

Tabla 7. Adenomas multihormonales

Tipos	%	ACTH	GH	LH/FSH	PRL	TSH	GSU	Número
PRL	27				X		X	Escaso
Sin hormonas	25							Común-escaso
GH	14		X			X	X	Escaso
ACTH	8	X			X		X	Escaso
GH-PRL	6		X		X			Muy común
LH-FSH	6			X	X			Detectable
TSH	1		X		X	X		Común
Plurihormonal	4		X	X	X	X	X	Detectable

to be corticotropinomas and 15 % ectopic ACTH-secreting extrapituitary tumors. Clinical, hormonal and morphological parameters were analyzed and 46 corticotropinomas and 37 ACTH-secreting neuroendocrine tumors were studied. The histologic structure of corticotropinomas was benign compared to the degree of malignancy and invasiveness of neuroendocrine tumors (Lapshina et al., 2013; Kolesnikova et al., 2013).

In most patients with gonadotropin secreting tumors, symptoms are similar to those presented by patients with null cell adenomas. These gonadotropic tumors appear as clinically nonfunctioning tumors. Null cell adenomas producing none of the before mentioned hormones may be considered to be the sixth type of pituitary adenomas (Swensen and Kirsch, 2002; Melmed and Kleinberg, 2008).

Yamada et al. (2014) studied the clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in 90 cases of thyrotropin-secreting pituitary adenomas (18% microadenomas and 82% macroadenomas). Euthyroidism was achieved in 83% of patients, tumor shrinkage was found in 84% and 55% experienced no recurrence after surgery and pharmacological treatment.

Plurihormonal adenomas show immunoreactivity for more than one hormone. The most common combinations in these adenomas include GH, PRL, and one or more glycoprotein subunits (β TSH, β FSH, β LH and α SU). The rare combination ACTH-GH was also reported (Rasul et al., 2014) (table 7).

Table 7. Plurihormonal adenomas

Types	%	ACTH	GH	LH/FSH	PRL	TSH	GSU	Number
PRL	27				X		X	Scarce
No hormones	25							Common-scarce
GH	14		X			X	X	Scarce
ACTH	8	X			X		X	Scarce
GH-PRL	6		X		X			highly common
LH-FSH	6			X	X			Detectable
TSH	1		X		X	X		Common
Plurihormonal	4		X	X	X	X	X	Detectable

Los adenomas subclínicos, silenciosos o incidentalomas se caracterizan por la ausencia de manifestaciones clínicas, son hallazgos de necropsias o neuroimágenes y requieren un equipo multidisciplinario para su tratamiento con atención longitudinal (Scanga y Laws, 2013). Los adenomas silenciosos (no funcionantes) representan 14-28% de los tumores hipofisarios, causan síntomas de deficiencia por compresión y se detectan por RNM. La cirugía transesfenoidal es la primera opción para resolver los síntomas compresivos que provocan. Cazabat y col. (2014) detectaron múltiples microquistes en 76% de los adenomas corticotropos silenciosos mediante RNM ponderada en T2.

Buurman y Saeger (2006) estudiaron 3.048 autopsias, hallando 334 adenomas silenciosos por lo que no se reportaron síntomas de secreción hormonal: prolactinomas poco granulados: 39%, células nulas: 22%, oncocitomas: 31%, corticotropinomas: 46%, gonadotropinomas: 22%, somatotropinomas: 7% y tirotropinomas: 2%. Los adenomas GH silenciosos constituyen un reto diagnóstico y terapéutico. Se presentan como macroadenomas invasivos en mujeres jóvenes y requieren: determinación preoperatoria de GH-IGF-I, inmunohistoquímica del tumor (GH, PRL, expresión del receptor de somatostatina) y evaluación del grado de proliferación (mitosis, Ki67 y p53) (Chinezu y col., 2013). Wade y col. (2011) comunicaron somatotropinomas silentes, sin aumento de la GH ni acromegalia y que parecen ser más comunes de lo que se pensaba (1/3 de los somatotropinomas). Salhi y col. (2006) estudiaron las correlaciones clínico-patológicas de 4 corticotropinomas silenciosos sin síndrome de Cushing. Se presentaron como macroadenomas con cefaleas, alteraciones del campo visual e inmunomarcación positiva para ACTH luego de la resección.

Mezzomo y col. (2012) evaluaron la expresión de los reguladores negativos de crecimiento celular MEG3 GADD45 γ que se pierden en la mayoría de los adenomas pituitarios humanos esporádicos clínicamente no funcionantes. Marko y col. (2012) remarcan la importancia de las estrategias clínicas y moleculares integradas para predecir la recurrencia temprana en los adenomas pituitarios no funcionantes resecados por cirugía y utilizan la expresión génica basada en microensayos para bus-

Subclinical adenomas, silents or incidentalomas are characterized by the absence of clinical manifestations; they are findings from necropsies or neuroimages and require multidisciplinary equipment for its treatment and longitudinal care (Scanga and Laws, 2013). Silent adenomas (non-functioning) represent 14-28 % of pituitary tumors, cause symptoms of deficiency by compression and are detected by MRI. Transsphenoidal surgery is the first option to solve the compressing symptoms caused. According to Cazabat et al. (2014) multiple microcysts were present in 76% of silent corticotrope adenomas after *T2-weighted MRI sequences*.

Buurman and Saeger (2006) studied 3048 autopsies, finding 334 pituitary silent adenomas with no subsequent report of symptoms of hormonal secretion: slightly granulated prolactinomas 39%, null cells (22%), oncocitomas (31%), corticotropinomas (46%), gonadotropinomas (22%), somatotropinomas (7%) and thyrotropinomas (2%). Silent GH adenomas constitute a diagnostic and therapeutic challenge. They usually appear as invasive macroadenomas in young women and require pre-surgical determination of GH-IGF-I, immunohistochemistry of the tumor (GH, PRL, expression of somatostatin receptor) and assessment of the degree of proliferation (mitosis, Ki67 and p53) (Chinezu et al., 2013). Wade et al. (2011) reported silent somatotropinomas, with no increase of GH or acromegaly, and which are apparently more common than previously appreciated (1/3 of somatotropinomas). Salhi et al. (2006) studied the clinical-pathological correlations of 4 silent corticotropinomas without Cushing syndrome. They were characterized by the presentation of headache and visual field alterations, and positive ACTH immunostaining after resection.

Mezzomo et al. (2012) stated that the expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 γ is lost in most sporadic clinically non-functioning human pituitary adenomas. Marko et al., 2012 pointed out the importance of integrated molecular and clinical strategies to predict early recurrence in surgically resected non-functional pituitary adenomas by using microarray-based gene expression to search for genotypically distinct subgroups. Molitch (2014) studied non-functioning

car subgrupos de diferente genotipo. Molitch (2014) estudió los tumores pituitarios no funcionantes y, en ausencia de hipersecreción, hipopituitarismo o defectos del campo visual, puntualiza que deben ser seguidos con cribado periódico por RNM.

La inmunomarcación positiva para un subtipo de adenoma hipofisario puede ser clínicamente silenciosa y, por ejemplo, los corticotropinomas silenciosos siguen un curso más agresivo (Cooper y Melmed, 2012).

El estudio de los tumores de la glándula pituitaria se hace mediante RNM con administración dinámica de un agente de contraste y la región selar debe ser mapeada en rodajas finas (Jesser y col., 2014).

El tratamiento de los adenomas pituitarios comprende: **cirugía, radiocirugía y terapia farmacológica**: somatotropinomas (octeodina-pasireotida), prolactinomas (cabergolina-bromocriptina; acromegalia (pegvisomant); tumores agresivos (temozolomida) y en un futuro: terapia génica (McCance y col., 1989; Dannanberg y Dalkin, 1993; Melmed, 1997; Kopzak y col., 2014). La terapia depende del tipo de adenoma hipofisario y debería ser manejada por un equipo de endocrinología y neurocirugía (Lake y col., 2013). Las terapias convencionales para los tumores pituitarios incluyen neurocirugía, radioterapia y tratamientos farmacológicos para algunos tipos tumorales (Tomita y col., 1981; Vance y col., 1985; Halperin y col., 1987; Halberg y Sheline, 1987; Wemeau y col., 1988; Vos y col., 1988; Lamberts y col., 1989; Shimon y Melmed, 1998).

La **cirugía transesfenoidal** (endonasal endoscópica) ha probado ser altamente efectiva en los microadenomas, pero puede tener complicaciones postquirúrgicas, como la aparición de una nueva disfunción pituitaria, diabetes insípida y, a veces, la formación de una fístula, desarrollada aun en pacientes operados por un neurocirujano especialista (Tindall y Tindall, 1984; McCutcheon y col., 1990; Friedman y col., 1989; Sudhakar y col., 2004; Laws y col., 2004), con control operativo y perioperativo (Christian y col., 2014).

Los objetivos del tratamiento son suprimir la excesiva secreción hormonal, remover la masa tumoral, preservar la función hipofisaria residual y prevenir la recurrencia o progresión del adenoma. Los pacientes

pituitary tumors and, in the absence of hypersecretion, hypopituitarism, or visual field defects, pointed out that patients may be followed by periodic screening by MRI.

Positive immunostaining for a subtype of pituitary adenoma might be clinically silent and, for example, silent corticotroph adenomas follow a more aggressive course (Cooper and Melmed, 2012). Pituitary gland tumors are studied using dynamic contrast-enhanced MRI and the sellar region should be mapped in thin slices (Jesser et al., 2014).

The treatment of pituitary adenomas comprises: **surgery, radiosurgery, pharmacologic treatment**, and future use of **gene therapy** (McCance et al., 1989; Dannanberg and Dalkin, 1993; Melmed, 1997; Kopzak et al., 2014). Therapy depends on the type of pituitary adenoma and should be managed by an endocrinology and neurosurgery team (Lake et al., 2013). Conventional therapies for pituitary tumors include neurosurgery and radiotherapy, as well as pharmacological treatment for some types of tumor (Tomita et al., 1981; Vance et al., 1985; Halperin et al., 1987; Halberg and Sheline, 1987; Wemeau et al., 1988; Vos et al., 1988; Lamberts et al., 1989; Shimon and Melmed, 1998).

Transsphenoidal surgery (endoscopic endonasal) has proved to be highly effective for microadenomas, but may present post-operative complications, such as new pituitary dysfunction, diabetes insipidus and, sometimes, the formation of a fistula developed even in patients after surgery by specialized neurosurgeons (Tindall and Tindall, 1984; McCutcheon et al., 1990; Fredman et al., 1989; Sudhakar et al., 2004; Laws et al., 2004) and the implementation of an operative and perioperative checklist (Christian et al., 2014).

The objectives of the treatment are suppressing the excessive secretion of PRL, removing the tumoral mass, preserving the residual pituitary function and preventing the recurrence or progression of the adenoma. Patients with microprolactinomas and with no symptoms should be submitted to an expecting behavior, with periodical follow-up by means of serum PRL dosage and imaging studies of the sellar region (Molitch, 1999). Pharmacological therapies with dopamine agonists (bromocrip-

con microprolactinomas y sin síntomas debe ser sometidos a una conducta expectante, con un seguimiento periódico mediante dosajes de la PRL sérica y estudios de imágenes de la región selar (Molitch, 1999). Las terapias farmacológicas con agonistas de la dopamina (bromocriptina, cabergolina y quinagolida) actuarían sobre receptores D2 presentes en las membranas de las lactotropas, provocando un descenso de la proliferación celular y de la hiperprolactinemia en pacientes portadores de prolactinomas secretores (Tindall y col., 1982; Crosignani, 1982; Landolt y col., 1983 y 1984; Molitch y col., 1985; Molitch, 1989, 1997 y 1999; Dalkin y Marshall, 1989; Pellegrini y col., 1989; Melis y col., 1989; Colao y col., 1998; Serri y col., 2003). Los macroprolactinomas redujeron su tamaño con bromocriptina (Bassetti y col., 1984; Bevan y col., 1989; Kocijancic y col., 1990) (**tabla 8**).

Tabla 8. Tratamiento de los prolactinomas secretores.

1. **MÉDICO:** Bromocriptina, cabergolina, pergolina, lisurida, quinagolida.
2. **QUIRÚGICO:** Hipofisectomía transesfenoidal.
3. **RADIOTERAPIA.**

La terapia con bromocriptina resultó útil para el tratamiento de los prolactinomas invasivos (Cho et al., 2013). Sin embargo, un significativo porcentaje presentó efectos adversos tales como náuseas, vómitos, hipotensión postural, cefaleas y constipación (Webster y col., 1994).

En pacientes portadores de somatotropinomas secretores, los análogos de somatostatina y las preparaciones de depósito (octreotide) pueden bajar la hipersomatotropinemia a niveles compatibles con una calidad de vida aceptable en el largo plazo. La supresión de la hipersecreción de la GH, el descenso de la producción del IGF-I y el control de los síntomas, han sido beneficiosos en dicha terapia. Además,

cabergoline and quinagolide) would act on D2 receptors present in the lactotrope membranes, causing a decrease in cell proliferation and hyperprolactinemia in patients with secretory prolactinomas (Tindall et al., 1982; Crosignani, 1982; Landolt et al., 1983 and 1984; Dalkin and Marshall, 1989; Molitch, 1985; 1989; 1997; Pellegrini et al., 1989; Melis et al., 1989; Colao et al., 1998; Molitch, 1999; Serri et al., 2003).

Macroprolactinomas reduced their size with bromocriptine (Bassetti et al., 1984; Bevan et al., 1989; Kocijancic et al., 1990) (**table 8**).

Table 8. Treatment of secretory prolactinomas.

1. **MEDICAL:** Bromocriptine, cabergoline, pergolin, lisuride, quinagolide.
2. **SURGICAL:** Transsphenoidal hypophysectomy.
3. **RADIATION THERAPY.**

Bromocriptine therapy became useful for the treatment of invasive prolactinomas (Cho et al., 2013). However, when long-term treatments used such drugs, a significant percentage evidenced side effects such as nausea, vomiting, postural hypotension, headache and constipation (Webster et al., 1994).

In patients with secretory somatotropinoma, somatostatin analogues and octreotide depot preparations can lower hypersomatotropinemia to levels compatible with acceptable long-term quality of life. Suppression of growth hormone (GH) hypersecretion, lowering of the insulin-like growth factor I (IGF-I) production and control of symptoms, have proved to be benefits of therapy. In addition, significant tumor shrinkage was reported in numerous studies, especially in patients undergoing primary medical therapy (Clemmons et al., 1979; Melmed et al., 1983; Jackson et al., 1988; Daughaday, 1990; Ho, 1990; Fredstorp et al., 1990;

una significativa reducción del tumor se comunicó en numerosos estudios, en especial en pacientes que sobrellevan una terapia médica primaria (Clemmons y col., 1979; Melmed y col., 1983; Jackson y col., 1988; Daughaday, 1990; Ho, 1990; Fredstorp y col., 1990; Bevan, 2005; Somm y col., 2013). Ninguno de los tratamientos farmacológicos cura los tumores que pueden tener recurrencias si se discontinúan. Chinezú y col. (2014) comunicaron la expresión de los receptores de somatostatina (SSTR2A y SSTR5) en 108 tumores pituitarios endocrinos mediante detección inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales específicos que pueden ayudar en la elección de un tratamiento médico postoperatorio.

El diagnóstico bioquímico de acromegalia se basa en la medición de IGF-I y de GH (Kannan y Kennedy, 2013). Los análogos de somatostatina son de elección en la terapia médica de la acromegalia (**tabla 9**) (Barkan, 1989; Bevan, 2005; Espinosa de Monteros y col., 2014).

Tabla 9. Tratamiento de la acromegalia.

<p>1. MÉDICO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Análogos de la somatostatina: Octreótido. - Antagonistas del receptor GH: Pregvisomant. <p>2. QUIRÚGICO: Hipofisectomía transesfenoidal.</p> <p>3. RADIOTERAPIA.</p>
--

Arihara y col. (2014) comunicaron que la bromocriptina, potente agonista de la dopamina D2, suprime el aumento de secreción de la GH en la mayoría de los pacientes con acromegalia, pero el somatotropino debe tener receptores para dopamina D2.

La cirugía seguida de radioterapia o radiocirugía en caso de tumores remanentes o recurrentes, siguen siendo la piedra angular de los adenomas hipofisarios no funcionantes (Pereira and Biermasz, 2012).

Bevan, 2005). None of the pharmacological treatments is a cure for those tumors with risk of recurrence if medication is discontinued. Chinezú et al. (2014) reported the expression of somatostatin receptors (SSTR2A and SSTR5) in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemistry with new specific monoclonal antibodies that could help direct the choice of postoperative medical treatment.

Biochemical diagnosis of acromegaly relies on measurements of IGF-I and GH (Kannan and Kennedy, 2013). Somatostatin analogues are the first choice medical therapy in acromegaly (**table 9**) (Barkan, 1989; Bevan, 2005; Espinosa de Monteros et al., 2014).

Table 9. Treatment of acromegaly.

<p>1. MEDICAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analogues of somatostatine: Octreotide. - GH receptor antagonists: Pegvisomant. <p>2. SURGICAL: Transsphenoidal hypophysectomy.</p> <p>3. RADIATION THERAPY.</p>

Arihara et al. (2014) reported that bromocriptine, a potent D2-dopamine receptor agonist, suppresses GH secretion in most patients with acromegaly, but the somatotroph adenoma revealed to be positive for D2- dopamine receptors.

Surgery, followed by radiotherapy or radiosurgery in case of remnant or recurrence, remains the cornerstone of treatment of nonfunctioning pituitary adenomas (Pereira and Biermasz, 2012). Sparsely granulated somatotrope adenomas, silent corticotrope adenomas and mammosomatotrope adenomas can exhibit a potentially aggressive behavior (Raverot et al., 2014). Some aggressive silent somatotrope adenomas were resistant to temozolomide (Batisse et al., 2013). Pituitary adenomas frequently invade adjacent sinuses or recur after first surgery. Endothe-

Los somatotropinomas escasamente granulados, los corticotropinomas y los mammosomatotropinomas silenciosos tienen conducta potencialmente agresiva (Raverot y col., 2014). Algunos somatotropinomas silenciosos agresivos fueron resistentes a la temozolomida (Batisse y col., 2013). Los adenomas hipofisarios invaden con frecuencia los senos adyacentes o recidivan luego de la primera cirugía. La expresión de endocan, un proteoglicano secretado por las células endoteliales de los adenomas, puede ser un inmunomarcador relevante del comportamiento agresivo de los tumores pituitarios (Cornelius y col., 2012; Matano y col., 2014). La terapia con anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) resultó efectiva en carcinomas pituitarios (Ortiz y col., 2012a-b; Raverot y col., 2012). Roelfsema y col. (2012) estudiaron los factores clínicos implicados en la recurrencia de los adenomas pituitarios después de la remisión quirúrgica y detectaron que el nivel hormonal basal postoperatorio es el predictor más importante de recurrencia de los adenomas funcionantes. Un estudio inmunohistoquímico y molecular demostró que la expresión de galectina-3 (Lgals3) sería un factor predictivo en la conducta agresiva de los adenomas hipofisarios (Righi y col., 2013). En los adenomas agresivos se utiliza temozolomida que logra controlarlos en el 40% de los casos (Raverot y col., 2012; Di Ieva y col., 2014; Cámara Gómez, 2014).

Hirohata y col. (2013) demostraron que la temozolomida preservó la función de la proteína de reparación de genes (MSH6) en las neoplasias malignas de la pituitaria y Jouanneau y col. (2012) evaluaron la eficacia antitumoral del everolimus en el carcinoma pituitario resistente a la temozolomida.

La detección temprana de un fenotipo agresivo de prolactinoma debe permitir el establecimiento rápido de la estrategia terapéutica terapéutica óptima asociando cirugía y radioterapia para retrasar o inhibir las metástasis (Zemmoura y col., 2013).

La radioterapia es usualmente empleada como un tratamiento adyuvante después de la cirugía tumoral pituitaria (Sutton, 1985; Halberg y Sheline, 1987; Grigsby y Sheline, 1990; Sheppard, 1994 y 2005). Aunque

lial expression of endocan, a proteoglycan secreted by endothelial cells, may be a relevant marker of aggressive behavior in pituitary tumors (Cornelius et al., 2012; Matano et al., 2014). Anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) therapy was effective to treat pituitary carcinomas (Ortiz et al., 2012, Raverot et al., 2012). Roelfsema et al. (2012) studied the clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission and detected that the postoperative basal hormone level is the most important predictor for recurrence in functioning adenomas. An immunohistochemical and molecular study demonstrated that galectin-3 (Lgals3) expression appeared to be a predicting factor of the aggressive behavior of pituitary adenomas (Righi et al., 2013). Aggressive adenomas are treated with temozolomide, which achieves control in 40% of the cases (Raverot et al., 2012; Di Ieva et al., 2014; Cámara Gómez, 2014).

Hirohata et al. (2013) showed that temozolomide preserved DNA mismatch repair protein (MSH6) in malignant pituitary neoplasms and Jouanneau et al. (2012) evaluated the antitumoral efficacy of everolimus in pituitary carcinoma resistant to temozolomide. The early detection of an aggressive phenotype of prolactin pituitary tumor should permit the earlier establishment of the optimum therapeutic strategy associating surgery and radiotherapy to delay or inhibit metastasis (Zemmoura et al., 2013).

Radiotherapy is usually an adjuvant treatment after surgery of pituitary tumors (Sutton, 1985; Jalberg and Sheline, 1987; Grigsby PW and Sheline, 1990; Sheppard, 2005). Although irradiation is effective to prevent tumor regrowth, it usually causes complications, hypopituitarism being the most frequent (58 to 83%) (Littley et al., 1989). In some cases, there is injury to the optic nerve (2%) and radiation necrosis of the brain (0.2%). Although infrequent, there may be radiation-induced fibrosarcomas and osteosarcomas. Radiation therapy, either multiple radiation arc stereotactic or gamma knife can be utilized on a small area, and has the advantage of reducing injury to normal pituitary tissues as well as to surrounding neuronal and vascular structures (Kaltsas et al., 2005; Laws et al., 2004; Kovacs, 2014). Elson et al. (2014) studied the effect of treat-

la irradiación resulta efectiva para prevenir la recidiva tumoral, causa complicaciones, siendo la más frecuente el hipopituitarismo (58 a 83%) (Littlely y col., 1989). En algunos casos se ve lesión del nervio óptico (2%) y necrosis cerebral por radiación (0,2%). Aunque es infrecuente, la radiación puede inducir fibrosarcomas y osteosarcomas. La radioterapia focalizada, ya sea en la forma de radioterapia multiarco estereotáxica o en corte gamma que pueden ser aplicadas en un área pequeña, tiene la ventaja de reducir el daño de los tejidos normales pituitarios y de las estructuras vasculares y neuronales vecinas (Kaltsas y col., 2005; Laws y col., 2004; Kovacs, 2014). Elson y col. (2014) estudiaron el efecto del tratamiento del eje hipotálamo-pituitario con radioterapia conformacional 3D basada en un acelerador lineal con tomoterapia de intensidad modulada (IMRT) o radiocirugía estereotáxica con cuchillo gamma y presentaron la dosimetría máxima. Granov y col. (2013) mostraron los resultados de la efectiva radiocirugía con protones en los adenomas pituitarios endoselares.

La validez de los denominados “tumores atípicos” propuesta el 2004 por WHO es ahora debatible. Raverot y col. (2012 y 2014) proponen llamar al grado tumoral 2b con alto riesgo de recurrencia como “*tumor sospechado de malignidad*” ya que tiene evidencias clínicas, patológicas y moleculares que sugieren la posibilidad de desarrollar metástasis y deberían ser tratados con estrategias terapéuticas intensivas y personalizadas.

En síntesis, aunque se han hecho importantes avances en el tratamiento de los tumores pituitarios, no hay una terapia totalmente satisfactoria y, en este contexto, la terapia génica aparece como una alternativa promisoriosa para el tratamiento de los adenomas pituitarios.

Referencias

Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal origin. *J Clin Invest* 1990; 86(1):336-340.

ments on the hypothalamo-pituitary axis using gamma knife stereotactic radiosurgery followed by TomoTherapy-based intensity modulated radiation therapy (IMRT) and Linac-based 3D-conformal radiation therapy (CRT). Maximal dosimetric avoidance of the hypothalamus was achieved using these treatments. Granov et al. (2013) showed the effective results of proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas.

The validity of the term “atypical tumors” proposed by the 2004 WHO pituitary tumor classification is now debatable. Raverot et al. (2014) proposed naming grade 2b tumors with high risk of recurrence as “tumor suspected of malignancy”. Indeed, clinical, pathological and molecular evidence suggest that some of these tumors may develop metastasis during follow-up and should be treated with a more intensive and personalized therapeutic strategy.

In summary, although important advances have been made in the treatment of pituitary tumors, a fully satisfactory therapy is not yet available and, in this context, gene therapy appears as a promising alternative for the treatment of pituitary adenomas.

References

- Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal origin. *J Clin Invest* 1990; 86(1):336-340.
- Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP. Sox2 (+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell* 2013; 13(4):433-445.
- Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(4):287-305.

- Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP. Sox2 (+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell* 2013; 13(4):433-445.
- Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(4):287-305.
- Arihara Z, Sakurai K, Yamashita R, Niitsuma S, Ueno T, Yamamura N, Yamada S, Inoshita N, Takahashi K. Bromocriptine, a dopamine agonist, increases growth hormone secretion in a patient with acromegaly. *Tohoku J Exp Med* 2014; 234(2):129-135.
- Asa SL and Mete O. A history of pituitary pathology. *Endocr Pathol* 2014; 25(1):6-11.
- Asa SL, Ezzat S. Genomic approaches to problems in pituitary neoplasia. *Endocr Pathol* 2013; 25(3):209-213.
- Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998; 19(6):798-827.
- Balestra L. Trabajo de Especialización Universitaria en Endocrinología: Diagnóstico y tratamiento de adenomas hipofisarios. Cátedra Postgrado de Clínica de la Nutrición y Endocrinología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Dirección: Dra. Cónsole GM, 2003.
- Barkan AL. Acromegaly. Diagnosis and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18(2):277-310.
- Bartel F, Harris LC, Wurl P, Taubert H. MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Res* 2004; 2(1):29-35.
- Bassetti M, Arosio M, Spada A, Brina M, Bazzoni N, Faglia G, Giannattasio G. Growth hormone and prolactin secretion in acromegaly: correlations between hormonal dynamics and immunocytochemical findings. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(6):1195-1204.
- Bassetti M, Spada A, Arosio, Vallar L, Brina M, Giannattasio G. Morphological studies on mixed growth hormone (GH)- and prolactin secreting human pituitary adenomas. Coexistence of GH and PRL in the same secretory granule. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(6):1093-1100.
- Bassetti M, Spada A, Pezzo G, Giannattasio G. Bromocriptine treatment reduces the cell size in human macroprolactinomas: a morphometric study. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(2):268-273.
- Batisse M, Raverot G, Maqdasy S, Durando X, Sturm N, Montoriol PF, Kemeny JL, Chazal J, Trouillas J, Tauveron I. Aggressive silent GH secreting pituitary adenomas: a new entity? *Endocr Pathol* 2014; 25(1):6-11.
- Asa SL, Ezzat S. Genomic approaches to problems in pituitary neoplasia. *Endocr Pathol* 2013; 25(3):209-213.
- Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998; 19(6):798-827.
- Balestra L. Trabajo de Especialización Universitaria en Endocrinología: Diagnóstico y tratamiento de adenomas hipofisarios. Cátedra Postgrado de Clínica de la Nutrición y Endocrinología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Dirección: Dra. Cónsole GM, 2003.
- Barkan AL. Acromegaly. Diagnosis and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18(2):277-310.
- Bartel F, Harris LC, Wurl P, Taubert H. MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Res* 2004; 2(1):29-35.
- Bassetti M, Arosio M, Spada A, Brina M, Bazzoni N, Faglia G, Giannattasio G. Growth hormone and prolactin secretion in acromegaly: correlations between hormonal dynamics and immunocytochemical findings. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(6):1195-1204.
- Bassetti M, Spada A, Arosio, Vallar L, Brina M, Giannattasio G. Morphological studies on mixed growth hormone (GH)- and prolactin secreting human pituitary adenomas. Coexistence of GH and PRL in the same secretory granule. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(6):1093-1100.
- Bassetti M, Spada A, Pezzo G, Giannattasio G. Bromocriptine treatment reduces the cell size in human macroprolactinomas: a morphometric study. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(2):268-273.
- Batisse M, Raverot G, Maqdasy S, Durando X, Sturm N, Montoriol PF, Kemeny JL, Chazal J, Trouillas J, Tauveron I. Aggressive silent GH secreting pituitary adenomas: a new entity? *Endocr Pathol* 2014; 25(1):6-11.

- (PRL)-secreting human pituitary adenomas. Coexistence of GH and PRL in the same secretory granule. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(6):1093-1100.
- Bassetti M, Spada A, Pezzo G, Giannattasio G. Bromocriptine treatment reduces the cell size in human macroprolactinomas: a morphometric study. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(2):268-273.
- Batisse M, Raverot G, Maqdasy S, Durando X, Sturm N, Montoriol PF, Kemeny JL, Chazal J, Trouillas J, Tauveron I. Aggressive silent GH pituitary tumor resistant to multiple treatments, including temozolomide. *Cancer Invest* 2013; 31(3):190-196.
- Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene. *Endocr Rev* 2013; 34(2):239-277.
- Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, Swietoslowski J, Fuss-Chmielewska J, Winczik K. Evaluation of hyperprolactinaemia with the use of the intervals for prolactin after macroforms separation. *J Physiol Pharmacol* 2014; 65(3):359-364.
- Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grbar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bordeau I, Bei T, Clauser E, Calender K, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5' - monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 9(6):2085-91.
- Bevan JS, Sussman J, Roberts A, Hourihan M, Peters JR. Development of an invasive macroprolactinoma: a possible consequence of prolonged oestrogen replacement. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96(12):1440-44.
- Bevan JS. Clinical review: the antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1856-63.
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 2005; 204(1):280-285.
- pituitary tumor resistant to multiple treatments, including temozolomide. *Cancer Invest* 2013; 31(3):190-196.
- Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene. *Endocr Rev* 2013; 34(2):239-277.
- Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, Swietoslowski J, Fuss-Chmielewska J, Winczik K. Evaluation of hyperprolactinaemia with the use of the intervals for prolactin after macroforms separation. *J Physiol Pharmacol* 2014; 65(3):359-364.
- Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grbar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bordeau I, Bei T, Clauser E, Calender K, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5' - monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 9(6):2085-91.
- Bevan JS, Sussman J, Roberts A, Hourihan M, Peters JR. Development of an invasive macroprolactinoma: a possible consequence of prolonged oestrogen replacement. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96(12):1440-44.
- Bevan JS. Clinical review: the antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1856-63.
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 2005; 204(1):280-285.
- Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC, Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med* 1981; 304(3):156-158.
- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(10): E181-191.

- Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC, Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med* 1981; 304(3):156-158.
- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rác K, Patócs A. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(10): E181-191.
- Buurman H, Saeger W. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *Eur J Endocrinol* 2006; 154(5):753-758.
- Calin GA, Seviganni C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9):2999-3004.
- Cámara Gómez R. Non-functioning pituitary tumors: 2012 update. *Endocrinol Nutr* 2014; 61(3):160-170.
- Cazabat L, Dupuy M, Boulin A, Bernier M, Baussart B, Foubert L, Raffin-Sanson ML, Caron P, Nertherat J, Gaillard S. Silent, but non unseen: multimicrocystic aspect on T2-weighted MRI in silent corticotroph adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 81(4):566-572.
- Chahal HS, Trivellin G, LeontiouCA, Alband N, Fowkes RC, Tahir A, Igreja SC, Chapple JP, Jordan S, Lupp A, Schulz S, Ansorge O, Karavitaki N, Carlsen E, Wass JA, Grossman AB, Korbonits M. Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(8): E1411-20.
- Chinezu L, Jouanneau E, Vasiljevic A, Trouillas J, Raverot G. Silent GH pituitary tumor: diagnostic and therapeutic challenges. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013; 74(5-6):491-495.
- Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, Raverot G. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 2014; 45(1):71-77.
- Buurman H, Saeger W. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *Eur J Endocrinol* 2006; 154(5):753-758.
- Calin GA, Seviganni C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9):2999-3004.
- Cámara Gómez R. Non-functioning pituitary tumors: 2012 update. *Endocrinol Nutr* 2014; 61(3):160-170.
- Cazabat L, Dupuy M, Boulin A, Bernier M, Baussart B, Foubert L, Raffin-Sanson ML, Caron P, Nertherat J, Gaillard S. Silent, but non unseen: multimicrocystic aspect on T2-weighted MRI in silent corticotroph adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014; 81(4):566-572.
- Chahal HS, Trivellin G, LeontiouCA, Alband N, Fowkes RC, Tahir A, Igreja SC, Chapple JP, Jordan S, Lupp A, Schulz S, Ansorge O, Karavitaki N, Carlsen E, Wass JA, Grossman AB, Korbonits M. Somatostatin analogs modulate AIP in somatotroph adenomas: the role of the ZAC1 pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(8): E1411-20.
- Chinezu L, Jouanneau E, Vasiljevic A, Trouillas J, Raverot G. Silent GH pituitary tumor: diagnostic and therapeutic challenges. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013; 74(5-6):491-495.
- Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, Raverot G. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 2014; 45(1):71-77.
- Cho KR, Jo KI, Shin HJ. Bromocriptine therapy for the treatment of invasive prolactinoma: the single institute experience. *Brain Res Treat* 2013; 1(2):71-77.
- Christian E, Harris B, Wrobel B, Zada G. Endoscopic endonasal transphenoidal surgery: implementation of an operative and perioperative checklist. *Neurosurg Focus* 2014; 37(4): E1.

- Cho KR, Jo KI, Shin HJ. Bromocriptine therapy for the treatment of invasive prolactinoma: the single institute experience. *Brain Res Treat* 2013; 1(2):71-77.
- Christian E, Harris B, Wrobel B, Zada G. Endoscopic endonasal transphenoidal surgery: implementation of an operative and perioperative checklist. *Neurosurg Focus* 2014; 37(4): E1.
- Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridway EC, Kliman B, Kjelberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N Engl J Med* 1979; 301(21):1138-42.
- Colao A, Annunziato L, Lombardi G. Treatment of prolactinomas. *Ann Med* 1998; 30(5):452-459.
- Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(4):447-460.
- Corenblum B, Sirek AM, Horvath E, Kovacs K, Ezrin C. Human mixed somatotrophic and lactotrophic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(5):857-863.
- Cornelius A, Corte-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert MH, Prevot V, Lassalle P, Trouillas J, Delehedde M, Maurage CA. Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol* 2012; 22(6):757-764.
- Cristina C, Díaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Pérez Millán MI, Passos VQ, Giannella-Neto D, Bronstein MD, Becu-Villalobos D. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 2007; 6:4.
- Crosignani PG, Ferrari C, Liuzzi A, Benco R, Mattei A, Rampini P, Dellabonzana D, Scarduelli C, Spelta B. Treatment of hyperprolactinemic states with different drugs: a study of bromocriptine, metergoline and lisuride. *Fertil Steril* 1982; 37(1):61-67.
- Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, Odou MF, Tabarin A, Nunes ML, Delemer B, Rohmer V, Desaillood R, Kerlan V, Chabre O, Sadoul JL, Cogne M, Caron P, Cortet-Rudelli C, Lienhardt A, Raingeard I, Guedj AM, Brue T, Beckers A, Weryha E, En-
- Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridway EC, Kliman B, Kjelberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-c. *N Engl J Med* 1979; 301(21):1138-42.
- Colao A, Annunziato L, Lombardi G. Treatment of prolactinomas. *Ann Med* 1998; 30(5):452-459.
- Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(4):447-460.
- Corenblum B, Sirek AM, Horvath E, Kovacs K, Ezrin C. Human mixed somatotrophic and lactotrophic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(5):857-863.
- Cornelius A, Corte-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert MH, Prevot V, Lassalle P, Trouillas J, Delehedde M, Maurage CA. Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol* 2012; 22(6):757-764.
- Cristina C, Díaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Pérez Millán MI, Passos VQ, Giannella-Neto D, Bronstein MD, Becu-Villalobos D. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 2007; 6:4.
- Crosignani PG, Ferrari C, Liuzzi A, Benco R, Mattei A, Rampini P, Dellabonzana D, Scarduelli C, Spelta B. Treatment of hyperprolactinemic states with different drugs: a study of bromocriptine, metergoline and lisuride. *Fertil Steril* 1982; 37(1):61-67.
- Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, Odou MF, Tabarin A, Nunes ML, Delemer B, Rohmer V, Desaillood R, Kerlan V, Chabre O, Sadoul JL, Cogne M, Caron P, Cortet-Rudelli C, Lienhardt A, Raingeard I, Guedj AM, Brue T, Beckers A, Weryha E, En-
- Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridway EC, Kliman B, Kjelberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-c. *N Engl J Med* 1979; 301(21):1138-42.
- Colao A, Annunziato L, Lombardi G. Treatment of prolactinomas. *Ann Med* 1998; 30(5):452-459.
- Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(4):447-460.
- Corenblum B, Sirek AM, Horvath E, Kovacs K, Ezrin C. Human mixed somatotrophic and lactotrophic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(5):857-863.
- Cornelius A, Corte-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert MH, Prevot V, Lassalle P, Trouillas J, Delehedde M, Maurage CA. Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol* 2012; 22(6):757-764.
- Cristina C, Díaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Pérez Millán MI, Passos VQ, Giannella-Neto D, Bronstein MD, Becu-Villalobos D. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 2007; 6:4.
- Crosignani PG, Ferrari C, Liuzzi A, Benco R, Mattei A, Rampini P, Dellabonzana D, Scarduelli C, Spelta B. Treatment of hyperprolactinemic states with different drugs: a study of bromocriptine, metergoline and lisuride. *Fertil Steril* 1982; 37(1):61-67.
- Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, Odou MF, Tabarin A, Nunes ML, Delemer B, Rohmer V, Desaillood R, Kerlan V, Chabre O, Sadoul JL, Cogne M, Caron P, Cortet-Rudelli C, Lienhardt A, Raingeard I, Guedj AM, Brue T, Beckers A, Weryha E, En-
- D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, Fedele M, Croce CM, Trouillas J, Fusco A. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation

- jalbert A, Barlier A. Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; 168(4):533-541.
- D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, Fedele M, Croce CM, Trouillas J, Fusco A. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): E1128-1138.
- D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, Fedele M, Croce CM, Trouillas J, Fusco A. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): E1128-38.
- Dalkin A, Marshall JC. Medical therapy of hyperprolactinemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18(2):259-268.
- Daly AF, Vanbellinthen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(5):1891-96.
- Dannanberg J, Dalkin AC. Medical treatment of pituitary adenomas. Cap. 14. Major problems in Pathology. Vol. 27. In: Sanders Company, 1993.
- Daughaday WH. Octreotide is effective in acromegaly but often results in cholelithiasis. *Ann Intern Med* 1990; 112(3):159-160. - Davis JR, Farrel WE, Clayton RN. Pituitary tumours. *Reproduction* 2001; 121(3):363-371.
- de Lima DS, Martins CS, Paixao BM, Amaral FC, Colli LM, Saggioro FP, Neder L, Machado HR, dos Santos AR, Pinheiro DG, Moreira AC, Silva WA, Castro M. SAGE analysis highlights the putative role of underexpression of ribosomal proteins in GH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2012; 167(6):759-768.
- Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas-diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(7):423-435.
- of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): E1128-1138.
- D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, Fedele M, Croce CM, Trouillas J, Fusco A. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(7): E1128-38.
- Dalkin A, Marshall JC. Medical therapy of hyperprolactinemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18(2):259-268.
- Daly AF, Vanbellinthen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(5):1891-96.
- Dannanberg J, Dalkin AC. Medical treatment of pituitary adenomas. Cap. 14. Major problems in Pathology. Vol. 27. In: Sanders Company, 1993.
- Daughaday WH. Octreotide is effective in acromegaly but often results in cholelithiasis. *Ann Intern Med* 1990; 112(3):159-160. - Davis JR, Farrel WE, Clayton RN. Pituitary tumours. *Reproduction* 2001; 121(3):363-371.
- de Lima DS, Martins CS, Paixao BM, Amaral FC, Colli LM, Saggioro FP, Neder L, Machado HR, dos Santos AR, Pinheiro DG, Moreira AC, Silva WA, Castro M. SAGE analysis highlights the putative role of underexpression of ribosomal proteins in GH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2012; 167(6):759-768.
- Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas-diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(7):423-435.
- Drewet N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.
- Dudley KJ, Revill K, Clayton RN, Farrell WE. Pituitary tumours: all silent on the epigenetics front. *J Mol Endocrinol* 2009; 42(6):461-468.

- Drewet N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM. Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1993; 57(1):89-95.
- Dudley KJ, Revill K, Clayton RN, Farrell WE. Pituitary tumours: all silent on the epigenetics front. *J Mol Endocrinol* 2009; 42(6):461-468.
- Duong CV, Emes RD, Wessely F, Yacqub-Usman K, Clayton RN, Farrell WE. Quantitative, genome-wide analysis of the DNA methylome in sporadic pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19(6):805-816.
- Egashira N, Takekoshi S, Takei M, Teramoto A, Osamura RY. Expression of FOXL2 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2011; 24(6):765-773.
- Elson A, Bovi J, Kaur K, Maas D, Sinson G, Schultz C. Effect of treatment modality on the hypothalamic-pituitary function of patients treated with radiation therapy for pituitary adenomas: hypothalamic dose and endocrine outcomes. *Front Oncol* 2014; 4:73.
- Espinosa de los Monteros AL, Carrasco CA, Albarrán AA, Gadelha M, Abreu A, Mercado M. The role of primary pharmacological therapy in acromegaly. *Pituitary* 2014; Suppl 1: S4-10.
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101(3):613-619.
- Ezzat S, Asa SL. Mechanisms of disease: the pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(4):220-230.
- Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003; 169(6):575-581.
- Ezzat S. Epigenetic control in pituitary tumors. *Endocr* 2008; 55(6):951-957. - Felix IA, Horvath E, Kovacs K. Massive Crooke's hyalinization in corticotroph cell adenomas of the human pituitary. A histological, immunocytological and electron microscopic study of three cases. *Acta Neurochir (Wien)* 1981; 58(3-4):235-243.
- Ferraris J, Boutillon F, Bernadet M, Seilicovich A, Goffin V, Pisera D. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(3): E356-364.
- Ferraris J, Radl DB, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, Clapp C, Seilicovich A, Pisera D. N-terminal prolactin-derived fragments, vaso-inhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS One* 2011; 6(7): E21806.
- Duong CV, Emes RD, Wessely F, Yacqub-Usman K, Clayton RN, Farrell WE. Quantitative, genome-wide analysis of the DNA methylome in sporadic pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19(6):805-816.
- Egashira N, Takekoshi S, Takei M, Teramoto A, Osamura RY. Expression of FOXL2 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2011; 24(6):765-773.
- Elson A, Bovi J, Kaur K, Maas D, Sinson G, Schultz C. Effect of treatment modality on the hypothalamic-pituitary function of patients treated with radiation therapy for pituitary adenomas: hypothalamic dose and endocrine outcomes. *Front Oncol* 2014; 4:73.
- Espinosa de los Monteros AL, Carrasco CA, Albarrán AA, Gadelha M, Abreu A, Mercado M. The role of primary pharmacological therapy in acromegaly. *Pituitary* 2014; Suppl 1: S4-10.
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101(3):613-619.
- Ezzat S, Asa SL. Mechanisms of disease: the pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(4):220-230.
- Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003; 169(6):575-581.
- Ezzat S. Epigenetic control in pituitary tumors. *Endocr* 2008; 55(6):951-957. - Felix IA, Horvath E, Kovacs K. Massive Crooke's hyalinization in corticotroph cell adenomas of the human pituitary. A histological, immunocytological and electron microscopic study of three cases. *Acta Neurochir (Wien)* 1981; 58(3-4):235-243.
- Ferraris J, Boutillon F, Bernadet M, Seilicovich A, Goffin V, Pisera D. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(3): E356-364.
- Ferraris J, Radl DB, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, Clapp C, Seilicovich A, Pisera D. N-terminal prolactin-derived fragments, vaso-inhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS One* 2011; 6(7): E21806.

- cell turnover and prolactin receptor expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(3): E356-364.
- Ferraris J, Radl DB, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, Clapp C, Seilicovich A, Pisera D. N-terminal prolactin-derived fragments, vaso-inhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS One* 2011; 6(7): E21806.
- Ferraris J, Zárate S, Jaita G, Boutillon F, Bernadet M, Auffret J, Seilicovich A, Binart N, Goffin V, Pisera D. Prolactin induces apoptosis of lactotropes in female rodents. *PLoS One* 2014; 9(5): E97383.
- Fredstorp L, Harris A, Haas G, Werner S. Short term treatment of acromegaly with the somatostatin analog octreotide: the first double-blind randomized placebo-controlled on its effects. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(5):1189-94.
- Friedman RB, Oldfield EH, Nieman LK, Chrousos GP, Doppman JL, Cutler GB, Loriaux DL. Repeat transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Neurosurg* 1989; 71(4):520-527.
- Gadelha MR, Trivellin T, Hernández Ramírez LC, Korbonits M. Genetics of pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2013; 41:111-140.
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006; 27(5):485-534.
- Giometto B, Miotto D, Botteri M, Alessio L, Scanarini M, An SF, Tavolato B. Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology* 1997; 65(1):47-52.
- Granov AM, Shalek RA, Karlin DL, Vinogradov VM, Ialynych NN, Pushkareva TV, Zargarova PO, Gerasimov SV, Koshkin IUA. The results of proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas. *Vopr Onkol* 2013; 59(4):465-469.
- Green AI, Sherlock M, Stewart PM, Gittoes NJ, Toogood AA. Extensive experience in the management of macroprolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2014; 81(1):85-92.
- Ferraris J, Zárate S, Jaita G, Boutillon F, Bernadet M, Auffret J, Seilicovich A, Binart N, Goffin V, Pisera D. Prolactin induces apoptosis of lactotropes in female rodents. *PLoS One* 2014; 9(5): E97383.
- Fredstorp L, Harris A, Haas G, Werner S. Short term treatment of acromegaly with the somatostatin analog octreotide: the first double-blind randomized placebo-controlled on its effects. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(5):1189-94.
- Friedman RB, Oldfield EH, Nieman LK, Chrousos GP, Doppman JL, Cutler GB, Loriaux DL. Repeat transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Neurosurg* 1989; 71(4):520-527.
- Gadelha MR, Trivellin T, Hernández Ramírez LC, Korbonits M. Genetics of pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2013; 41:111-140.
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006; 27(5):485-534.
- Giometto B, Miotto D, Botteri M, Alessio L, Scanarini M, An SF, Tavolato B. Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology* 1997; 65(1):47-52.
- Granov AM, Shalek RA, Karlin DL, Vinogradov VM, Ialynych NN, Pushkareva TV, Zargarova PO, Gerasimov SV, Koshkin IUA. The results of proton radiosurgery for pituitary endosellar adenomas. *Vopr Onkol* 2013; 59(4):465-469.
- Green AI, Sherlock M, Stewart PM, Gittoes NJ, Toogood AA. Extensive experience in the management of macroprolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2014; 81(1):85-92.
- Guyda H, Robert F, Colle E, Hardy J. Histologic, ultrastructural and hormonal characterization of a pituitary tumor secreting both hGH and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(3):531-547.

- Grigsby PW, Sheline GE. Pituitary. Principles and Practice of Radiation Oncology. In: Perez CA, Bray LA eds., Lippincott, Philadelphia, USA, 1990:564-582.
- Guyda H, Robert F, Colle E, Hardy J. Histologic, ultrastructural and hormonal characterization of a pituitary tumor secreting both hGH and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36(3):531-547.
- Guzzo MF, Carvalho LR, Bronstein MD. Apoptosis: its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue. *Pituitary* 2014; 17(2):157-162.
- Halberg FE, Sheline GE. Radiotherapy of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(3):667-684.
- Halperin I, Rodriguez MD, Cardenal C, Casamitjana R, Matinez Osaba MJ, Lienas V, Vilardell E. Treatment of pituitary macroadenomas secreting PRL, HGH or ACTH with long-acting bromocriptine. *J Endocrinol Invest* 1987; 10(3):277- 282.
- Heitz PU, Landolt AM, Zenklusen hR, Kasper M, Reubi JC, Oberholzer M, Roth J. Immunocytochemistry of pituitary tumors. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(9):1005-11.
- Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(6):1427-33.
- Hirohata T, Asano K, Ogawa Y, Takano S, Amano K, Isozaki O, Iwai Y, Sakata K, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Fujio S, Arita K, Takano K, Tominaga A, Hizuka N, Ikeda H, Osamura RY, Tahara S, Ishii Y, Kawamata T, Shimatsu A, Teramoto A, Matsuno A. DNA mismatch repair protein (MSH6) correlated with the responses of atypical adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: the national cooperative study by Japan Society for hypothalamic and pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(3):1130-1136.
- Ho KY, Weissberger AJ, Marbach P, Lazarus GF. Therapeutic efficacy of the somatostatin analog SMS 201-995 (octreotide) in acromegaly. Effects of dose and frequency and long-term safety. *Ann Intern Med* 1990; 112(3):173-181.
- Guzzo MF, Carvalho LR, Bronstein MD. Apoptosis: its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue. *Pituitary* 2014; 17(2):157-162.
- Halberg FE, Sheline GE. Radiotherapy of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(3):667-684.
- Halperin I, Rodriguez MD, Cardenal C, Casamitjana R, Matinez Osaba MJ, Lienas V, Vilardell E. Treatment of pituitary macroadenomas secreting PRL, HGH or ACTH with long-acting bromocriptine. *J Endocrinol Invest* 1987; 10(3):277- 282.
- Heitz PU, Landolt AM, Zenklusen hR, Kasper M, Reubi JC, Oberholzer M, Roth J. Immunocytochemistry of pituitary tumors. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(9):1005-11.
- Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(6):1427-33.
- Hirohata T, Asano K, Ogawa Y, Takano S, Amano K, Isozaki O, Iwai Y, Sakata K, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Fujio S, Arita K, Takano K, Tominaga A, Hizuka N, Ikeda H, Osamura RY, Tahara S, Ishii Y, Kawamata T, Shimatsu A, Teramoto A, Matsuno A. DNA mismatch repair protein (MSH6) correlated with the responses of atypical adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: the national cooperative study by Japan Society for hypothalamic and pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(3):1130-1136.
- Ho KY, Weissberger AJ, Marbach P, Lazarus GF. Therapeutic efficacy of the somatostatin analog SMS 201-995 (octreotide) in acromegaly. Effects of dose and frequency and long-term safety. *Ann Intern Med* 1990; 112(3):173-181.
- Horvath E, Coire CI, Kovacs K, Smyth HS. Folliculo-stellate cells of the human pituitary as adult stem cells: examples of their neoplastic potential. *Ultrastruct Pathol* 2010; 34(3):133-139.
- Horvath E, Kovacs K, Scheithauer BW, Randall RV, Laws ER, Thorner MO, Tindall GT, Barrow DL. Pituitary adenomas producing growth hormone, prolactin, and one or more glycoprotein hormones: a his-

- Horvath E, Coire CI, Kovacs K, Smyth HS. Folliculo-stellate cells of the human pituitary as adult stem cells: examples of their neoplastic potential. *Ultrastruct Pathol* 2010; 34(3):133-139.
- Horvath E, Kovacs K, Scheithauer BW, Randall RV, Laws ER, Thorner MO, Tindall GT, Barrow DL. Pituitary adenomas producing growth hormone, prolactin, and one or more glycoprotein hormones: a histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of four surgically removed tumors. *Ultrastruct Pathol* 1983; 5(2-3):171-183.
- Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Cusimano M, Singer W. Silent adenoma subtype 3 of the pituitary-immunohistochemical and ultrastructural classification: a review of 29 cases. *Ultrastruct Pathol* 2005; 29(6):511-524.
- Horvath E, Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohipophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 1988; 8(4):401-432.
- Horvath E, Kovacs K. Gonadotroph adenomas of the human pituitary: sex-related fine structural dichotomy. A histologic, immunocytochemical and electron microscopy study of 30 tumors. *Am J Pathol* 1984; 117(3):429-440.
- Horvath E, Kovacs K. Pathology of growth hormone-producing tumors of the human pituitary. *Semin Diagn Pathol* 1986a; 3(1):18-33.
- Horvath E, Kovacs K. Pathology of prolactin adenomas of the human pituitary. *Semin Diagn Pathol* 1986b; 3(1):4-17.
- Iwaki T, Kondo A, Takeshita I, Nakagaki H, Kitamura K, Tateishi J. Proliferating potential of folliculo-stellate cells in human pituitary adenomas. Immunohistochemical and electron microscopic analysis. *Acta Neuropathol* 1986; 71(3-4):233-242.
- Jackson IMD, Barnard L, Cobb W, Hein M, Perez R. Long-term treatment of resistant acromegaly with a somatostatin analog (SMS 102-995, Sandostatin). Sandostatin in the treatment of acromegaly. In: Lamberts SWJ eds., New York. Springer 1988:133-139.
- Jacoby LB, Hedley-Whyte ET, Pulaski K, Seizinger BR, Martuza RL. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1990; 73(5):731-735.
- tologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of four surgically removed tumors. *Ultrastruct Pathol* 1983; 5(2-3):171-183.
- Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Cusimano M, Singer W. Silent adenoma subtype 3 of the pituitary-immunohistochemical and ultrastructural classification: a review of 29 cases. *Ultrastruct Pathol* 2005; 29(6):511-524.
- Horvath E, Kovacs K. Fine structural cytology of the adenohipophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech* 1988; 8(4):401-432.
- Horvath E, Kovacs K. Gonadotroph adenomas of the human pituitary: sex-related fine structural dichotomy. A histologic, immunocytochemical and electron microscopy study of 30 tumors. *Am J Pathol* 1984; 117(3):429-440.
- Horvath E, Kovacs K. Pathology of growth hormone-producing tumors of the human pituitary. *Semin Diagn Pathol* 1986a; 3(1):18-33.
- Horvath E, Kovacs K. Pathology of prolactin adenomas of the human pituitary. *Semin Diagn Pathol* 1986b; 3(1):4-17.
- Iwaki T, Kondo A, Takeshita I, Nakagaki H, Kitamura K, Tateishi J. Proliferating potential of folliculo-stellate cells in human pituitary adenomas. Immunohistochemical and electron microscopic analysis. *Acta Neuropathol* 1986; 71(3-4):233-242.
- Jackson IMD, Barnard L, Cobb W, Hein M, Perez R. Long-term treatment of resistant acromegaly with a somatostatin analog (SMS 102-995, Sandostatin). Sandostatin in the treatment of acromegaly. In: Lamberts SWJ eds., New York. Springer 1988:133-139.
- Jacoby LB, Hedley-Whyte ET, Pulaski K, Seizinger BR, Martuza RL. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1990; 73(5):731-735.
- Jamaluddin FA, Sthaneshwar P, Hussein Z, Othman N, Chan SP. Importance of screening for macroprolactin in all hyperprolactinaemic sera. *Mlays J Pathol* 2013; 35(1):59-63.
- Jarzembowski J, Lloyd R, McKeever P. Type IV collagen immunostaining is a simple, reliable diagnostic tool for distinguishing between adenomatous and normal pituitary glands. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(6):931-935.

- Jamaluddin FA, Sthaneshwar P, Hussein Z, Othman N, Chan SP. Importance of screening for macroprolactin in all hyperprolactinaemic sera. *Mlays J Pathol* 2013; 35(1):59-63.
- Jarzembowski J, Lloyd R, McKeever P. Type IV collagen immunostaining is a simple, reliable diagnostic tool for distinguishing between adenomatous and normal pituitary glands. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(6):931-935.
- Jesser J, Schlamp K, Bendszus M. Pituitary gland tumors. *Radiologe* 2014; 54(10):981-988.
- Jiang X, Zhang X. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metabol (Seoul)* 2013; 28(4):245-254.
- Jouanneau E, Wierinckx A, Ducray F, Favrel V, Borson-Chazot F, Honorat J, Trouillas J, Raverot G. New targeted therapies in pituitary carcinoma resistant to temozolomide. *Pituitary* 2012; 15(1):37-43.
- Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. Clinical review: diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):3089-99.
- Kannan S, Kennedy L. Diagnosis of acromegaly: state of the art. *Expert Opin Med Diagn* 2013; 7(5):443-453.
- Kapranos N, Kontogeorgos T, Horvath E, Kovacs K. Morphology, molecular regulation and significance of apoptosis in pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2004; 32:217-234.
- Katz MS, Gregerman RI, Horvath E, Kovacs K, Ezrin E. Thyrotroph cell adenoma of the human pituitary gland associated with primary hypothyroidism: clinical and morphological features. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 95(1):41-48.
- Kjaer I. Sella turcica morphology and the pituitary gland -a new contribution to craniofacial diagnostic based on histology and neuroradiology. *Eur J Orthod*, 2015; 37(1):28-36.
- Klibanski A, Zerbas NT. Diagnosis and management of hormone-secreting pituitary adenomas. *N Engl J Med* 1991; 324(12):822-831.
- Kocijancic K, Prezel J, Vrhovec I, Lancranjan I. Parlodel LAR in the treatment of macroprolactinomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122(2):272-276.
- Jesser J, Schlamp K, Bendszus M. Pituitary gland tumors. *Radiologe* 2014; 54(10):981-988.
- Jiang X, Zhang X. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metabol (Seoul)* 2013; 28(4):245-254.
- Jouanneau E, Wierinckx A, Ducray F, Favrel V, Borson-Chazot F, Honorat J, Trouillas J, Raverot G. New targeted therapies in pituitary carcinoma resistant to temozolomide. *Pituitary* 2012; 15(1):37-43.
- Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. Clinical review: diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):3089-99.
- Kannan S, Kennedy L. Diagnosis of acromegaly: state of the art. *Expert Opin Med Diagn* 2013; 7(5):443-453.
- Kapranos N, Kontogeorgos T, Horvath E, Kovacs K. Morphology, molecular regulation and significance of apoptosis in pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2004; 32:217-234.
- Katz MS, Gregerman RI, Horvath E, Kovacs K, Ezrin E. Thyrotroph cell adenoma of the human pituitary gland associated with primary hypothyroidism: clinical and morphological features. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 95(1):41-48.
- Kjaer I. Sella turcica morphology and the pituitary gland -a new contribution to craniofacial diagnostic based on histology and neuroradiology. *Eur J Orthod*, 2015; 37(1):28-36.
- Klibanski A, Zerbas NT. Diagnosis and management of hormone-secreting pituitary adenomas. *N Engl J Med* 1991; 324(12):822-831.
- Kocijancic K, Prezel J, Vrhovec I, Lancranjan I. Parlodel LAR in the treatment of macroprolactinomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; 122(2):272-276.
- Kolesnikova GS, Lapshina AM, Voronkova IA, Marova IE, Arapova SD, Goncharov NP, Dedov II. Comparative analysis of clinical, hormonal and morphological studies in patients with neuroendocrine AC-TH-producing tumours. *Int J Endocrinol* 2013;659232.
- Kopczak A, Renner U, Karl Stalla G. Advances in understanding pituitary tumors. *F1000Prime Rep* 2014; 6:5.

Kolesnikova GS, Lapshina AM, Voronkova IA, Marova IE, Arapova SD, Goncharov NP, Dedov II. Comparative analysis of clinical, hormonal and morphological studies in patients with neuroendocrine ACTH-producing tumours. *Int J Endocrinol* 2013;659232.

Kopczak A, Renner U, Karl Stalla G. Advances in understanding pituitary tumors. *F1000Prime Rep* 2014; 6:5.

Kovacs K and Horvath E. Pathology of growth hormone-producing tumors of human pituitary. *Sem Diagn Pathol* 1986b; 3(1):18-33.

Kovacs K and Horvath E. Tumors of the pituitary gland. *Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 21*. In: Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1986a; 1-269.

Kovacs K, Horvath E, Ezrin C, Weiss MH. Adenoma of the human pituitary producing growth hormone and thyrotropin. A histologic, immunocytologic, and fine-structural study. *Virchows Arch A* 1982; 395(1):59-68.

Kovacs K, Horvath E, Van Loon GR, Rewcastle NB, Ezrin C, Rosenbloom AA. Pituitary adenomas associated with elevated blood follicle-stimulating hormone levels. A histologic, immunocytologic and electron microscopy study of two cases. *Fertil Steril* 1978; 29(6):622-628.

Kovacs K, Lloyd R, Horvath E, Asa SL, Stefaneanu L, Killinger DW, Smyth S. Silent somatotroph adenomas of the human pituitary. A morphologic study of three cases including immunocytochemistry, electron microscopy, in vitro examination, and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989; 134(2):345-353.

Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Buchfelder M, Fahbulsch R, Althoff PH, Moore C. Pituitary corticotroph adenoma in a woman with long-standing Addison's disease: a histologic, immunocytochemical, electron microscopic, and in situ hybridization study. *Endocr Pathol* 1996; 7(1):91-97.

Kovacs K. Editorial: Gamma knife radiosurgery and nonfunctionary pituitary adenomas. *J Neurosurg* 2014, 120(3):645.

Lake MG, Krook LS, Cruz SV. Pituitary adenomas: an overview. *Am Fam Physician* 2013; 88(5):319-327.

Kovacs K and Horvath E. Pathology of growth hormone-producing tumors of human pituitary. *Sem Diagn Pathol* 1986b; 3(1):18-33.

Kovacs K and Horvath E. Tumors of the pituitary gland. *Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 21*. In: Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1986a; 1-269.

Kovacs K, Horvath E, Ezrin C, Weiss MH. Adenoma of the human pituitary producing growth hormone and thyrotropin. A histologic, immunocytologic, and fine-structural study. *Virchows Arch A* 1982; 395(1):59-68.

Kovacs K, Horvath E, Van Loon GR, Rewcastle NB, Ezrin C, Rosenbloom AA. Pituitary adenomas associated with elevated blood follicle-stimulating hormone levels. A histologic, immunocytologic and electron microscopy study of two cases. *Fertil Steril* 1978; 29(6):622-628.

Kovacs K, Lloyd R, Horvath E, Asa SL, Stefaneanu L, Killinger DW, Smyth S. Silent somatotroph adenomas of the human pituitary. A morphologic study of three cases including immunocytochemistry, electron microscopy, in vitro examination, and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989; 134(2):345-353.

Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Buchfelder M, Fahbulsch R, Althoff PH, Moore C. Pituitary corticotroph adenoma in a woman with long-standing Addison's disease: a histologic, immunocytochemical, electron microscopic, and in situ hybridization study. *Endocr Pathol* 1996; 7(1):91-97.

Kovacs K. Editorial: Gamma knife radiosurgery and nonfunctionary pituitary adenomas. *J Neurosurg* 2014, 120(3):645.

Lake MG, Krook LS, Cruz SV. Pituitary adenomas: an overview. *Am Fam Physician* 2013; 88(5):319-327.

Lamberts SW, Uitterlinden P, Klijjn JM. The effect of the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 on ACTH secretion in Nelson's syndrome and Cushing's disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 120(6):760-766.

Landolt AM, Mindler H, Osterwalter V, Landolt TA. Bromocriptine reduces the size of cells in prolactin-secreting pituitary adenomas. *Experientia* 1983; 39(6):625-626.

- Lamberts SW, Uitterlinden P, Klijn JM. The effect of the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 on ACTH secretion in Nelson's syndrome and Cushing's disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 120(6):760-766.
- Landolt AM, Mindler H, Osterwalter V, Landolt TA. Bromocriptine reduces the size of cells in prolactin-secreting pituitary adenomas. *Experientia* 1983; 39(6):625-626.
- Landolt AM, Osterwalder V. Perivascular fibrosis and prolactinomas: is it increased with bromocriptine? *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(6):1179-83.
- Lapshina AM, Voronkova IA, Marova IE. Histological and immunohistochemical characteristics of ACTH-secreting tumors. *Arkh Patol* 2013; 75(3):8-13.
- Laws ER, Sheehan JP, Sheehan JM, Jagnathan J, Jane JA, Oskouian R. Stereotactic radiosurgery for pituitary adenomas: a review of the literature. *J Neurooncol* 2004; 69(1-3):257-272.
- Li YL. Immunohistochemical study of folliculo-stellate cells in human adenohypophysis and in pituitary adenomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1990; 19(3):188-190.
- Lin Y, Jiang X, Shen Y, Li M, Ma H, Xing M, Lu Y. Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(1):301-310.
- Little MD, Shalet SM, Beardwell CG, Robinson EL, Sutton ML. Radiation-induced hypopituitarism is dose-dependent. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 31(3):363-373.
- Lloyd RV, Hardin H, Montemayor-García C, Rotondo F, Siro LV, Horvath E, Kovacs K. Stem cells and cancer stem-like cells in endocrine tissues. *Endocr Pathol* 2013; 24(1):1-10.
- Lloyd RV. Surgical pathology of pituitary gland. Vol 27. Major problems in Pathology. In: Sanders Company, 1993.
- Luk CT, Kovacs K, Rotondo F, Horvath E, Cusimano M, Booth GL. Plurihormonal pituitary adenoma immunoreactive for thyroid-stimulating hormone, growth hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin. *Endocr Pract* 2012; 18(5): e121-126.
- Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2010; 5:79.
- Marko NF, Coughlan C, Weil RJ. Towards an integrated molecular and clinical strategy to predict early recurrence in surgically re-

- ting, growth hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin. *Endocr Pract* 2012; 18(5): e121-126.
- Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ. Differential expression of microARNs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2010; 5:79.
- Marko NF, Coughlan C, Weil RJ. Towards an integrated molecular and clinical strategy to predict early recurrence in surgically resected non-functional pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* 2012; 19(11):1535-1540.
- Marko NF, Weil RJ. Pituitary gland: new pathways in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8(10):572-573.
- Matano F, Yoshida D, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Morita A. Endocan, a new invasion and angiogenesis marker of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2014; 117(3):485-491.
- Mathioudakis N, Sundaresh R, Larsen A, Ruff W, Schiller J, Guerrero-Cáceres H, Burger P, Salvatori R, Quiñones-Hinojosa A. Expression of pituitary stem/progenitor marker GFR α 2 in human pituitary adenomas and normal pituitary. *Pituitary* 2015; 18(1):31-41.
- Mc Comb DJ, Hellmann P, Kovacs K, Scott D, Evans WS, Burdman JA, Thorner MO. Spontaneous sparsely-granulated prolactin-producing pituitary adenomas in aging rats. A prospective study of the effect of bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1985; 41(3):201-211.
- Mc Comb DJ, Kovacs K, Beri J, Zak F. Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: a histologic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73(5):1143-66.
- McCance DR, McIlrath E, Mc Neill A, Gordon DS, Hadden DR, Kennedy L, Sheridan B, Atkinson AB. Bilateral inferior petrosal sinus sampling as a routine procedure in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 30(2):157-166.
- McCutcheon IE, Weintraub BD, Oldfield EH. Surgical treatment of thyrotropin-secreting pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1990; 73(5):674-683.
- sected non-functional pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* 2012; 19(11):1535-1540.
- Marko NF, Weil RJ. Pituitary gland: new pathways in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8(10):572-573.
- Matano F, Yoshida D, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Morita A. Endocan, a new invasion and angiogenesis marker of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2014; 117(3):485-491.
- Mathioudakis N, Sundaresh R, Larsen A, Ruff W, Schiller J, Guerrero-Cáceres H, Burger P, Salvatori R, Quiñones-Hinojosa A. Expression of pituitary stem/progenitor marker GFR α 2 in human pituitary adenomas and normal pituitary. *Pituitary* 2015; 18(1):31-41.
- Mc Comb DJ, Hellmann P, Kovacs K, Scott D, Evans WS, Burdman JA, Thorner MO. Spontaneous sparsely-granulated prolactin-producing pituitary adenomas in aging rats. A prospective study of the effect of bromocriptine. *Neuroendocrinology* 1985; 41(3):201-211.
- Mc Comb DJ, Kovacs K, Beri J, Zak F. Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: a histologic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73(5):1143-66.
- McCance DR, McIlrath E, Mc Neill A, Gordon DS, Hadden DR, Kennedy L, Sheridan B, Atkinson AB. Bilateral inferior petrosal sinus sampling as a routine procedure in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 30(2):157-166.
- McCutcheon IE, Weintraub BD, Oldfield EH. Surgical treatment of thyrotropin-secreting pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1990; 73(5):674-683.
- Melmed S, Braunstein GD, Horvath E, Ezrin C, Kovacs K. Pathophysiology of acromegaly. *Endocr Rev* 1983; 4(3):271-290.
- Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactine-

- Melis GB, Gambacciani M, Paoletti AM, Mais V, Sghedoni D, Fioretti P. Reduction in the size of prolactin-producing pituitary tumor after cabergoline administration. *Fert Steril* 1989; 52(3):412-415.
- Melmed S, Braunstein GD, Horvath E, Ezrin C, Kovacs K. Pathophysiology of acromegaly. *Endocr Rev* 1983; 4(3):271-290.
- Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(2):273-288.
- Melmed S, Kleinberg D. Anterior pituitary. *Textbook of Endocrinology*. In: ed. Kornenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2008:115-261.
- Melmed S. General aspects of the management of pituitary tumors by surgery or radiation therapy. *Endocrinology*. In: DeGrott IJ (ed.), Sanders, Philadelphia, USA, 1997:497-503.
- Melmed S. Mechanisms of pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 2003; 112(11):1603-18.
- Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(5):257-266.
- Mete O, Asa SL. Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Brain Pathol* 2012; 22(4):443-453.
- Mete O, Asa SL. Therapeutic implications of accurate classification of pituitary adenomas. *Sem Diag Pathol* 2013; 30(3):158-164.
- Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC, Kohek MB. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 α is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary* 2012; 15(3):420-427.
- Miyazaki H, Taya S, Otani M, Kameya T, Wada C. Folliculo-stellate cells in normal adenohypophyses and in pituitary adenomas. *No Shunkei Geka* 1988; 16(6):713-719.
- Molitch ME, Elton RL, Blackwell RE, Caldwell B, Change J, Jaffe R, Joplan G, Robbins RJ, Tyson J, Thorner MO. Bromocriptine as primary therapy for prolactin-secreting macroadenomas: results of a multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(4):698-705.
- Molitch ME, Thorner MO, Wilson C. Management of prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):996-1000.
- Molitch ME. Management of prolactinomas. *Annu Rev Med* 1989; 40:225-232.
- Molitch ME. Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28(1):143-169.
- mia: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(2):273-288.
- Melmed S, Kleinberg D. Anterior pituitary. *Textbook of Endocrinology*. In: ed. Kornenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2008:115-261.
- Melmed S. General aspects of the management of pituitary tumors by surgery or radiation therapy. *Endocrinology*. In: DeGrott IJ (ed.), Sanders, Philadelphia, USA, 1997:497-503.
- Melmed S. Mechanisms of pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 2003; 112(11):1603-18.
- Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(5):257-266.
- Mete O, Asa SL. Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Brain Pathol* 2012; 22(4):443-453.
- Mete O, Asa SL. Therapeutic implications of accurate classification of pituitary adenomas. *Sem Diag Pathol* 2013; 30(3):158-164.
- Mezzomo LC, Gonzales PH, Pesce FG, Kretzmann Filho N, Ferreira NP, Oliveira MC, Kohek MB. Expression of cell growth negative regulators MEG3 and GADD45 α is lost in most sporadic human pituitary adenomas. *Pituitary* 2012; 15(3):420-427.
- Miyazaki H, Taya S, Otani M, Kameya T, Wada C. Folliculo-stellate cells in normal adenohypophyses and in pituitary adenomas. *No Shunkei Geka* 1988; 16(6):713-719.
- Molitch ME, Elton RL, Blackwell RE, Caldwell B, Change J, Jaffe R, Joplan G, Robbins RJ, Tyson J, Thorner MO. Bromocriptine as primary therapy for prolactin-secreting macroadenomas: results of a multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(4):698-705.
- Molitch ME, Thorner MO, Wilson C. Management of prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):996-1000.
- Molitch ME. Management of prolactinomas. *Annu Rev Med* 1989; 40:225-232.
- Molitch ME. Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28(1):143-169.

- therapy for prolactin-secreting macroadenomas: results of a multi-center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(4):698-705.
- Molitch ME, Thorner MO, Wilson C. Management of prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):996-1000.
- Molitch ME. Management of prolactinomas. *Annu Rev Med* 1989; 40: 225-232.
- Molitch ME. Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28(1):143-169.
- Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors. *Handb Clin Neurol* 2014; 124:167-184.
- Monson JP. Growth hormone (GH) replacement therapy: cancer in adults treated with GH. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10(Suppl A): S50-51.
- Mukai K. Pituitary adenomas. Immunocytochemical study of 150 tumors with clinicopathologic correlation. *Cancer* 1983; 52(4):648-653.
- Musat M, Korbonits M, Kola B, Broboli N, Hanson MR, Nanzer AM, Grigson J, Jordan S, Morris DG, Gueoguiev M, Coculescu M, Basu S, Grossman AB. Enhanced protein kinase B/Akt signaling in pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12(2):423-433.
- Neuman PE, Goldman JE, Horoupian DS, Hess MA. Fibrous bodies in growth hormone-secreting adenomas contain cytokeratin filaments. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109(6):505-508.
- Neuman PE, Horoupian DS, Goldman JE, Hess MA. Cytoplasmic filaments of Crooke's hyaline change belong to the cytokeratin class. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1984; 116(2):214-222.
- Newman GR, Jasani B, Williams ED. Multiple hormone storage by cells of the human pituitary. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(8):1183-92.
- Nilsson B, Gustavasson-Kadaka E, Bengtsson BA, Jonsson B. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4):1420-1425.
- Oriola J, Lucas T, Halperin I, Mora M, Perales MJ, Alvarez-Escolá C, Paz de MN, Díaz Soto G, Salinas I, Julián MT, Olaizola I, Bernabeu I, Marazuela M, Puig-Domingo M. Germline mutations of AIP gene in
- Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors. *Handb Clin Neurol* 2014; 124:167-184.
- Monson JP. Growth hormone (GH) replacement therapy: cancer in adults treated with GH. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10(Suppl A):S50-51.
- Mukai K. Pituitary adenomas. Immunocytochemical study of 150 tumors with clinicopathologic correlation. *Cancer* 1983; 52(4):648-653.
- Musat M, Korbonits M, Kola B, Broboli N, Hanson MR, Nanzer AM, Grigson J, Jordan S, Morris DG, Gueoguiev M, Coculescu M, Basu S, Grossman AB. Enhanced protein kinase B/Akt signaling in pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12(2):423-433.
- Neuman PE, Goldman JE, Horoupian DS, Hess MA. Fibrous bodies in growth hormone-secreting adenomas contain cytokeratin filaments. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109(6):505-508.
- Neuman PE, Horoupian DS, Goldman JE, Hess MA. Cytoplasmic filaments of Crooke's hyaline change belong to the cytokeratin class. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1984; 116(2):214-222.
- Newman GR, Jasani B, Williams ED. Multiple hormone storage by cells of the human pituitary. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(8):1183-92.
- Nilsson B, Gustavasson-Kadaka E, Bengtsson BA, Jonsson B. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4):1420-1425.
- Oriola J, Lucas T, Halperin I, Mora M, Perales MJ, Alvarez-Escolá C, Paz de MN, Díaz Soto G, Salinas I, Julián MT, Olaizola I, Bernabeu I, Marazuela M, Puig-Domingo M. Germline mutations of AIP gene in somatotropinomas resistant to somatostatin analogues. *Eur J Endocrinol* 2012; 168(1):9-13.
- Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Ersen A, Uribe H, Fadul CE, Rotondo F, Horvath E, Kovacs K. Anti-VEGF therapy in pituitary carcinoma. *Pituitary* 2012a; 15(3):445-449.
- Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Rotondo F, Uribe H, Fadul CE, Horvath E, Kovacs K. Temozolomide in aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)* 2012b; 67(Suppl1):119-123.

- somatotropinomas resistant to somatostatin analogues. *Eur J Endocrinol* 2012; 168(1):9-13.
- Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Ersen A, Uribe H, Fadul CE, Rotondo F, Horvath E, Kovacs K. Anti-VEGF therapy in pituitary carcinoma. *Pituitary* 2012a; 15(3):445-449.
- Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Rotondo F, Uribe H, Fadul CE, Horvath E, Kovacs K. Temozolomide in aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)* 2012b; 67(Suppl1):119-123.
- Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro O, Wierinckx A, Fedele M, Trouillas J, Fusco A. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* 2012; 31(34):3847-3865.
- Palumbo T, Faucez FR, Azevedo M, Xekouki P, Iliopoulos D, Stratakis CA. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTE-AKT pathway. *Oncogene* 2013; 32(13): 1651-59.
- Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *PLoS One* 2013; 8(12):82619.
- Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynek CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(3):500-509.
- Pereira AM, Biermasz NR. Treatment of nonfunctioning pituitary adenomas: what were the contributions of the last 10 years? A critical view. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(2):111-116.
- Phillippon M, Morange I, Barrie M, Barlier A, Taieb D, Dufour H, Conte-Devolx B, Brue T, Castinetti F. Long-term control of a MEN1 prolactin secreting pituitary carcinoma after temozolomide treatment. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(3):225-229.
- Rasul FT, Jaunmuktane Z, Khan AA, Phadke R, Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report
- Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro O, Wierinckx A, Fedele M, Trouillas J, Fusco A. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* 2012; 31(34):3847-3865.
- Palumbo T, Faucez FR, Azevedo M, Xekouki P, Iliopoulos D, Stratakis CA. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTE-AKT pathway. *Oncogene* 2013; 32(13): 1651-59.
- Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *PLoS One* 2013; 8(12):82619.
- Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynek CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(3):500-509.
- Pereira AM, Biermasz NR. Treatment of nonfunctioning pituitary adenomas: what were the contributions of the last 10 years? A critical view. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(2):111-116.
- Phillippon M, Morange I, Barrie M, Barlier A, Taieb D, Dufour H, Conte-Devolx B, Brue T, Castinetti F. Long-term control of a MEN1 prolactin secreting pituitary carcinoma after temozolomide treatment. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(3):225-229.
- Rasul FT, Jaunmuktane Z, Khan AA, Phadke R, Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report
- Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro O, Wierinckx A, Fedele M, Trouillas J, Fusco A. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* 2012; 31(34):3847-3865.
- Palumbo T, Faucez FR, Azevedo M, Xekouki P, Iliopoulos D, Stratakis CA. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTE-AKT pathway. *Oncogene* 2013; 32(13): 1651-59.
- Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *PLoS One* 2013; 8(12):82619.
- Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynek CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(3):500-509.
- Pereira AM, Biermasz NR. Treatment of nonfunctioning pituitary adenomas: what were the contributions of the last 10 years? A critical view. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(2):111-116.
- Phillippon M, Morange I, Barrie M, Barlier A, Taieb D, Dufour H, Conte-Devolx B, Brue T, Castinetti F. Long-term control of a MEN1 prolactin secreting pituitary carcinoma after temozolomide treatment. *Ann Endocrinol (Paris)* 2012; 73(3):225-229.
- Rasul FT, Jaunmuktane Z, Khan AA, Phadke R, Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report

- of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)* 2014; 156(1):141-146.
- Raverot G, Castinetti F, Jouanneau E, Morange I, Figarella-Branger D, Dufour H, Trouillas J, Brue T. Pituitary carcinomas and aggressive pituitary tumours: merits and pitfalls of temozolomide treatment. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2012; 76(6):769-775.
- Raverot G, Jouanneau E, Trouillas J. Management of endocrine disease: clinicopathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 2014; 170(4):R121-132.
- Righi A, Morandi L, Leonardi E, Farnedi A, Marucci T, Sisto A, Frank T, Faustini-Fustini M, Zoli M, Mazzatenta D, Agati R, Foschini MP. Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum Pathol* 2013; 44(11):2400-09.
- Robert F, Pelletier G, Serri O, Hardy, J. Mixed growth hormone and prolactin-secreting human pituitary adenomas: a pathologic, immuno-cytochemical, ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Hum Pathol* 1988; 19(11):1327-34.
- Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary* 2012; 15(1):71-83.
- Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, Berthelet F, Lacroix A, Figarella-Branger D, Brue T, Drouin J. Cooperation between cyclin E and p27 (Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 2010; 24(9):1835-45.
- Saeger W and Ludecke DK. Pituitary adenomas with hyperfunction of TSH. Frequency, histological classification, immunocytochemistry and ultrastructure. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982; 394(3):255-267.
- Sahli R, Christ ER, Seiler R, Kappeler A, Vajtai I. Clinicopathologic correlations of silent corticotroph adenomas of the pituitary: report of four cases and literature review. *Pathol Res Pract* 2006; 202(6):457-464.
- Salazar-López Ortiz CG, Hernández Bueno JA, González Bárcena D, López Gamboa M, Ortiz Plata, A, Porias Cuellar HL, Rembao Bojórquez JD, Sandoval Huerta GA, Tapia Serrano R, Vázquez Castillo CG, Vital Reyes VS. *Ginecol Obstet Mex* 2014; 82(2):123-142.
- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Loyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). *Neurosurgery* 2010; 67(6): 1790-1798.
- Salehi F, Cohen S, Syro LV, Uribe H, Horvath E, Kovacs K, Asa SL. Pluri-hormonality in pituitary adenomas associated with acromegaly. *Endocr Pathol* 2006; 17(3):291-296.
- tumours for personalized therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 2014; 170(4): R121-132.
- Righi A, Morandi L, Leonardi E, Farnedi A, Marucci T, Sisto A, Frank T, Faustini-Fustini M, Zoli M, Mazzatenta D, Agati R, Foschini MP. Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum Pathol* 2013; 44(11):2400-09.
- Robert F, Pelletier G, Serri O, Hardy, J. Mixed growth hormone and prolactin-secreting human pituitary adenomas: a pathologic, immuno-cytochemical, ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Hum Pathol* 1988; 19(11):1327-34.
- Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary* 2012; 15(1):71-83.
- Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, Berthelet F, Lacroix A, Figarella-Branger D, Brue T, Drouin J. Cooperation between cyclin E and p27 (Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 2010; 24(9):1835-45.
- Saeger W and Ludecke DK. Pituitary adenomas with hyperfunction of TSH. Frequency, histological classification, immunocytochemistry and ultrastructure. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982; 394(3):255-267.
- Sahli R, Christ ER, Seiler R, Kappeler A, Vajtai I. Clinicopathologic correlations of silent corticotroph adenomas of the pituitary: report of four cases and literature review. *Pathol Res Pract* 2006; 202(6):457-464.
- Salazar-López Ortiz CG, Hernández Bueno JA, González Bárcena D, López Gamboa M, Ortiz Plata, A, Porias Cuellar HL, Rembao Bojórquez JD, Sandoval Huerta GA, Tapia Serrano R, Vázquez Castillo CG, Vital Reyes VS. *Ginecol Obstet Mex* 2014; 82(2):123-142.
- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Loyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). *Neurosurgery* 2010; 67(6): 1790-1798.
- Salehi F, Cohen S, Syro LV, Uribe H, Horvath E, Kovacs K, Asa SL. Pluri-hormonality in pituitary adenomas associated with acromegaly. *Endocr Pathol* 2006; 17(3):291-296.

jórquez JD, Sandoval Huerta GA, Tapia Serrano R, Vázquez Castillo CG, Vital Reyes VS. *Ginecol Obstet Mex* 2014; 82(2):123-142.

Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Loyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). *Neurosurgery* 2010; 67(6): 1790-1798.

Salehi F, Cohen S, Syro LV, Uribe H, Horvath E, Kovacs K, Asa SL. Pluri-hormonality in pituitary adenomas associated with acromegaly. *Endocr Pathol* 2006; 17(3):291-296.

Sano T, Kovacs K, Asa SL, Smyth HS. Immunoreactive luteinizing hormone in functioning corticotroph adenomas of the pituitary. *Immunohistochemical and tissue culture studies of two cases. Virchows Arch A* 1990; 417(4):361-367.

Sav A, Rotondo F, Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K. Biomarkers of pituitary neoplasms. *Anticancer Res* 2012; 32(11):4639-54.

Scangas GA, Laws ER. Pituitary incidentalomas. *Pituitary* 2014; 17(5):486-491.

Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003; 169(6):575-581.

Sheppard MC. Aims of treatment and definition of cure. Treatment acromegaly, 100 years on. In: Wass JAH, ed. *Society of Endocrinology*, Bristol, UK, 1994:17-31.

Sheppard MC. GH and mortality in acromegaly. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(11):75-77.

Shi Z, Johnson JJ, Stack MS. Fluorescence in situ hybridization for microRNA detection in archived oral cancer tissues. *J Oncol* 2012; 903581. - Shimon I, Melmed S. Management of pituitary tumors. *Ann Intern Med* 1998; 129(6):472-483.

Smallridge RC. Thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(3):765-792.

Somm E, Bonnet N, Zizzari P, Tolle V, Toulotte A, Jones R, Epelbaum J, Martínez A, Huppi PS, Aubert ML. Comparative inhibition of the GH/IGF-I axis obtained with either the targeted secretion inhibitor

Sano T, Kovacs K, Asa SL, Smyth HS. Immunoreactive luteinizing hormone in functioning corticotroph adenomas of the pituitary. *Immunohistochemical and tissue culture studies of two cases. Virchows Arch A* 1990; 417(4):361-367.

Sav A, Rotondo F, Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K. Biomarkers of pituitary neoplasms. *Anticancer Res* 2012; 32(11):4639-54.

Scangas GA, Laws ER. Pituitary incidentalomas. *Pituitary* 2014; 17(5):486-491.

Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003; 169(6):575-581.

Sheppard MC. Aims of treatment and definition of cure. Treatment acromegaly, 100 years on. In: Wass JAH, ed. *Society of Endocrinology*, Bristol, UK, 1994:17-31.

Sheppard MC. GH and mortality in acromegaly. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(11):75-77.

Shi Z, Johnson JJ, Stack MS. Fluorescence in situ hybridization for microRNA detection in archived oral cancer tissues. *J Oncol* 2012; 903581. - Shimon I, Melmed S. Management of pituitary tumors. *Ann Intern Med* 1998; 129(6):472-483.

Smallridge RC. Thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16(3):765-792. - Somm E, Bonnet N, Zizzari P, Tolle V, Toulotte A, Jones R, Epelbaum J, Martínez A, Huppi PS, Aubert ML. Comparative inhibition of the GH/IGF-I axis obtained with either the targeted secretion inhibitor SXN101959 or the somatostatin analog octreotide in growing male rats. *Endocrinology* 2013; 154(11):4237-48.

Sudhakar N, Ray A, Vafidis JA. Complications after trans-sphenoidal surgery: our experience and a review of the literature. *Br J Neurosurg* 2004; 18(5):507-512.

Surawicz TS, Mc Carthy BJ, Kupelian V, Jurich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol* 1999; 1(1):14-25.

- SXN101959 or the somatostatin analog octreotide in growing male rats. *Endocrinology* 2013; 154(11):4237-48.
- Sudhakar N, Ray A, Vafidis JA. Complications after trans-sphenoidal surgery: our experience and a review of the literature. *Br J Neurosurg* 2004; 18(5):507-512.
- Surawicz TS, Mc Carthy BJ, Kupelian V, Jurich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol* 1999; 1(1):14-25.
- Sutton ML. Adult central nervous system. In: *Radiotherapy of malignant disease*. Easson Ec, Pointon RCS (eds.), Springer, New York, USA, 1985:215-236. - Swenden R, Kirsch W. Brain neoplasm in women: a review. *Clin Obstet Gynecol* 2002; 45(3):904-927.
- Tindall G, Tindall S. Transsphenoidal surgery for acromegaly: long-term results in 50 patients. *Secretory tumors of the pituitary gland*. In: Black P, Zervas NT, Ridway EC, Martin JB (eds.), New York, Raven Press, 1984:175-178.
- Tindall GT, Kovacs K, Horvath E, Thorner MO. Human prolactin-producing adenomas and bromocriptine: a histological, immunocytochemical, ultrastructural, and morphometric study. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55(6):1178-1183.
- Tirosh A, Benbassat C, Lifshitz A, Shimon I. Hypopituitarism patterns and prevalence among men with macroprolactinomas. *Pituitary* 2015; 18(1):108-115.
- Tomita A, Susuki S, Hara I, Oiso Y, Mizuno S, Yogo H, Kuwayama A, Kageyama N. Follow-up study on treatment in 27 patients with Cushing's disease: adrenalectomy, transsphenoidal adenomectomy and medical treatment. *Endocrinol Jpn* 1981; 28(2):197-205.
- Tong Y, Zheng Y, Zhou J, Oyesiku NM, Koeffler HP, Melmed S. Genomic characterization of human and rat prolactinomas. *Endocrinology* 2012; 153(8): 3679-91.
- Trivellin G, Butz H, Delhove J, Igreja S, Chahal HS, Zikovic V, McKay T, Patocs A, Grossman AB, Korbonits M. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303(6): E708-719.
- Trouillas J, Girod C, Lheritier M, Claustrat B, Dubois MP. Morphological and biochemical relationships in 31 human pituitary adenomas with acromegaly. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1980; 389(2):127-142.
- Trouillas J, Girod C, Sassolas G, Claustrat B, Lheritier M, Dubois MP, Goutelle A. Human pituitary gonadotropic adenoma: histological,

- reexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303(6):E708-719.
- Trouillas J, Girod C, Lheritier M, Claustrat B, Dubois MP. Morphological and biochemical relationships in 31 human pituitary adenomas with acromegaly. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1980; 389(2):127-142.
- Trouillas J, Girod C, Sassolas G, Claustrat B, Lheritier M, Dubois MP, Goutelle A. Human pituitary gonadotropic adenoma: histological, immuno-cytochemical, and ultrastructural and hormonal studies in eight cases. *J Pathol* 1981; 135(4):315-336.
- Trouillas J. A search of a prognostic classification of endocrine tumors. *Endocr Pathol* 2014; 25(2):124-132.
- Vajtai I, Kappeler A, Sahli R. Folliculo-stellate cells of “true dendritic” type are involved in the inflammatory microenvironment of tumor immunosurveillance of pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2007; 2:20.
- Vance ML, Ridway EC, Thorner MO. Follicle-stimulating hormone- and alpha-subunit-secreting pituitary tumor treated with bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61(3):580-584.
- Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(3):461-476.
- Velkeniers B, Hooghe-Peters EL. From prolactin cell to prolactinoma: implications of ontogenic mechanisms in diagnosis and management. *Endocrine-Related Cancer* 1998; 5:27-36.
- Vilar L, Fleseriu M, Bronstein MD. Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58(1): 9-22.
- Vos BP, Croughs RJ, Thijssen JH, van't Verlaat JW, van Ginkel LA. Response of luteinizing hormone secreting pituitary adenoma to a long-acting somatostatin analogue. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118(4):587-590.
- immuno-cytochemical, and ultrastructural and hormonal studies in eight cases. *J Pathol* 1981; 135(4):315-336.
- Trouillas J. A search of a prognostic classification of endocrine tumors. *Endocr Pathol* 2014; 25(2):124-132.
- Vajtai I, Kappeler A, Sahli R. Folliculo-stellate cells of “true dendritic” type are involved in the inflammatory microenvironment of tumor immunosurveillance of pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2007; 2:20.
- Vance ML, Ridway EC, Thorner MO. Follicle-stimulating hormone- and alpha-subunit-secreting pituitary tumor treated with bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61(3):580-584.
- Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(3):461-476.
- Velkeniers B, Hooghe-Peters EL. From prolactin cell to prolactinoma: implications of ontogenic mechanisms in diagnosis and management. *Endocrine-Related Cancer* 1998; 5:27-36.
- Vilar L, Fleseriu M, Bronstein MD. Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58(1): 9-22.
- Vos BP, Croughs RJ, Thijssen JH, van't Verlaat JW, van Ginkel LA. Response of luteinizing hormone secreting pituitary adenoma to a long-acting somatostatin analogue. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118(4):587-590.
- Wade AN, Baccon J, Grady MS, Judy KD, O'Rourke DM, Snyder PJ. Clinically silent somatotroph adenomas are common. *Eur J Endocrinol* 2011; 165(1):39-44.
- Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline comparative study group. *N Engl J Med* 1994; 331(14):904-909.
- Weiss S, Siebzehrnubel FA, Kreutzer J, Blumcke I, Buslei R. Evidence for a progenitor cell population in the human pituitary. *Clin Neuropathol* 2009; 28(4): 309-318.

- Wade AN, Baccon J, Grady MS, Judy KD, O'Rourke DM, Snyder PJ. Clinically silent somatotroph adenomas are common. *Eur J Endocrinol* 2011; 165(1):39-44.
- Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline comparative study group. *N Engl J Med* 1994; 331(14):904-909.
- Weiss S, Siebzehnruhl FA, Kreutzer J, Blumcke I, Buslei R. Evidence for a progenitor cell population in the human pituitary. *Clin Neuropathol* 2009; 28(4): 309-318.
- Wemeau JL, Dewailly D, Leroy R, D'Herbomez M, Mazzuca M, Decoulx M, Jaquet P. Long term treatment with the somatostatin analog SMS 201-995 in a patient with a thyrotropin- and growth hormone-secreting pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(3):636-639.
- Wierinckx A, Raverot G, Nazaret N, Jouanneau E, Auger C, Lachuer J, Trouillas J. Proliferation markers of human pituitary tumors: contribution of a genome-wide transcriptome approach. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 326(1-2):30-39.
- Xu Y, Wang Y, Ma G, Wang Q, Wei G. CUL4A is overexpressed in human pituitary adenomas and regulates pituitary tumor cell proliferation. *J Neurooncol* 2014; 116(3):625-632.
- Yamada S, fukuhara N, Horiguchi K, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Takeshita A, Yakeucho Y, Ito J, Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg* 2014; 19:1-12.
- Yu R, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene: an update. *Front Horm Res* 2004; 32:175-185.
- Zemmoura I, Wierinckx A, Vasiljevic A, Jan M, Trouillas J, Francois P. Aggressive and malignant prolactin pituitary tumors: pathological diagnosis and patient management. *Pituitary* 2013; 16(4):515-522.
- Wemeau JL, Dewailly D, Leroy R, D'Herbomez M, Mazzuca M, Decoulx M, Jaquet P. Long term treatment with the somatostatin analog SMS 201-995 in a patient with a thyrotropin- and growth hormone-secreting pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(3):636-639.
- Wierinckx A, Raverot G, Nazaret N, Jouanneau E, Auger C, Lachuer J, Trouillas J. Proliferation markers of human pituitary tumors: contribution of a genome-wide transcriptome approach. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 326(1-2):30-39.
- Xu Y, Wang Y, Ma G, Wang Q, Wei G. CUL4A is overexpressed in human pituitary adenomas and regulates pituitary tumor cell proliferation. *J Neurooncol* 2014; 116(3):625-632.
- Yamada S, fukuhara N, Horiguchi K, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Takeshita A, Yakeucho Y, Ito J, Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg* 2014; 19:1-12.
- Yu R, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene: an update. *Front Horm Res* 2004; 32:175-185.
- Zemmoura I, Wierinckx A, Vasiljevic A, Jan M, Trouillas J, Francois P. Aggressive and malignant prolactin pituitary tumors: pathological diagnosis and patient management. *Pituitary* 2013; 16(4):515-522.
- Zhang X, Grand RJ, McCabe CJ, Franklyn JA, Gallimore PH, Turnell AS. Transcriptional regulation of the human glycoprotein hormone common alpha subunit gene by cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300 and p53. *Biochem J* 2002; 368(Pt 1):191-201.
- Zhang X, Zhou Y, Klisanski A. Isolation and characterization of novel pituitary tumor related genes: a cDNA representational difference approach. *Mol cell Endocrinol* 2010; 326(1-2):40-47.
- Zhou Y, Wu D, Tao J, Qu P, Zhou Z, Hou J. MicroRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting epidermal growth

Zhang X, Grand RJ, McCabe CJ, Franklyn JA, Gallimore PH, Turnell AS. Transcriptional regulation of the human glycoprotein hormone common alpha subunit gene by cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300 and p53. *Biochem J* 2002; 368(Pt 1):191-201.

Zhang X, Zhou Y, Klibanski A. Isolation and characterization of novel pituitary tumor related genes: a cDNA representational difference approach. *Mol cell Endocrinol* 2010; 326(1-2):40-47.

Zhou Y, Wu D, Tao J, Qu P, Zhou Z, Hou J. MicroRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting epidermal growth factor receptor and its downstream effector proteins in bladder cancer. *Scand J Urol* 2013; 47(5):423-432.

Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 386(1-2):16-33.

factor receptor and its downstream effector proteins in bladder cancer. *Scand J Urol* 2013; 47(5):423-432.

Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 386(1-2):16-33.

CAPÍTULO 23

Adenomas hipofisarios: aportes de la terapia génica experimental

La pérdida, mutación o alteración de los genes que codifican moléculas involucradas en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular marcan el inicio del desarrollo neoplásico, con activación de genes promotores del crecimiento, protooncogenes e inactivación de genes supresores tumorales. Hay componentes hereditarios que afectan algunas formas de neoplasias endocrinas, pero la mayoría de las mutaciones son somáticas y se deberían a carcinógenos químicos, físicos (radiaciones) o farmacológicos. La neoplasia surge de la progresión de múltiples defectos genéticos y epigenéticos que llevan a la desregulación de las redes de señalización (Yan y col., 2014). El análisis de los modelos de ratones modificados genéticamente que desarrollaron adenomas pituitarios ha revelado la presencia de moléculas reguladoras del ciclo celular, genes supresores tumorales y la señalización del factor de crecimiento en el proceso de tumorigénesis (Fukuoka y Takahashi, 2014)

CHAPTER 23

Pituitary adenomas: contributions of experimental Gene therapy

Loss, mutation or alteration of genes encoding molecules involved in cell growth regulation and differentiation show the beginning of neoplastic development, with activation of growth promoter genes, protooncogenes, and inactivation of tumoral suppressor genes. Hereditary components affect some forms of endocrine neoplasias, but most mutations are somatic and possibly due to chemical, physical (radiations) or pharmacological carcinogens. Neoplasia arises from the progression of multiple genetic and epigenetic defects that lead to the deregulation of signaling networks (Yan et al., 2014). The analysis of genetically modified mouse models exhibiting pituitary adenomas has revealed the presence of cell cycle regulatory molecules, tumor suppressors, and growth factor signaling involved in pituitary tumorigenesis (Fukuoka and Takahashi, 2014).

Pituitary adenomas are benign neoplasias originated in the adenohypophyseal populations and represent the most frequent neuroendocrine pathology (prevalence of 16.7%) in humans (Ezzat et al., 2004) and in

Los adenomas pituitarios son neoplasias de tipo benigno originadas en las poblaciones adenohipofisarias y representan la patología neuroendocrina más frecuente en humanos (prevalencia de 16.7%) (Ezzat y col., 2004) y en ratas hembras envejecidas (Burek, 1978). Los tumores pituitarios rara vez generan metástasis a distancia. Aunque esta característica permite al neurocirujano esparcir tejido pituitario sin riesgo de diseminación celular tumoral, las células neoplásicas infiltrantes del parénquima pituitario normal pueden llevar a recidivas del tumor. La cirugía tumoral pituitaria se complementa con radioterapia y aunque esta combinación terapéutica es a menudo efectiva para prevenir la recidiva tumoral, puede cursar con hipopituitarismo debido a la excesiva destrucción del parénquima pituitario normal (Littlely y col., 1989).

En este contexto, la terapia génica parece ser una alternativa superior a la radioterapia para el tratamiento de los tumores pituitarios. En efecto, después de la remoción tumoral, la inyección intraquirúrgica de un vector suicida apropiado dentro del parénquima pituitario puede llevar a la completa eliminación de las células neoplásicas remanentes, sin afectar a las células sanas (Castro y col., 2001). La pérdida excesiva de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) durante el envejecimiento de la rata se asocia con una progresiva hiperprolactinemia y subsecuente desarrollo de micro y/o macroprolactinomas. El mismo tipo de prolactinomas puede ser inducido mediante la administración crónica de estrógenos, los cuales en altas dosis poseen efectos tóxicos sobre las neuronas TIDA. Los prolactinomas representan la patología prevalente en ratas hembras envejecidas (Burek, 1978).

La glándula pituitaria produce varios factores de crecimiento (Webster y col., 1989; Halper y col., 1992) y péptidos bioactivos que pueden afectar la función y la proliferación de las células pituitarias a través de acciones autocrinas o paracrinas (Houben y Deneff, 1994). La terapia génica emplea portadores virales y no virales para el transporte del gen específico y facilita la producción de la proteína

aging rats (Burek, 1978). Pituitary tumors rarely generate distant metastasis. Although this characteristic enables the surgeon to spread pituitary tissue without disseminating tumor cells, infiltrating neoplastic cells from the normal pituitary parenchyma may lead to tumor recurrences. Pituitary tumor surgery is complemented with radiotherapy, but although this therapeutic combination is often effective to prevent tumor recurrence, it is accompanied by hypopituitarism due to the excessive destruction of the normal pituitary parenchyma (Littlely et al., 1989).

In this context, gene therapy seems to be an alternative superior to radiotherapy for the treatment of pituitary tumors. In effect, after tumor removal, intrasurgical injection of an appropriate suicide vector within the pituitary parenchyma may cause the complete elimination of remaining neoplastic cells, without affecting healthy cells (Castro et al., 2001). The excessive loss of tuberoinfundibular dopaminergic neurons (TIDA) during rat aging is associated with a progressive hyperprolactinemia and subsequent development of micro and/or macroprolactinomas. The same type of prolactinomas may be induced by the chronic administration of estrogens, high doses of which have toxic effects on TIDA neurons. Prolactinomas represent the most prevalent pathology in old female rats (Burek, 1978).

The pituitary gland produces various growth factors (Webster et al., 1989; Halper et al., 1992) and bioactive peptides that may affect the function and proliferation of pituitary cells through autocrine or paracrine actions (Houben and Deneff, 1994). Gene therapy uses viral and non-viral carriers to transport the specific gene and facilitates the production of the desirable therapeutic protein (Bakhtiar et al., 2014). The insulin-like growth factor I (IGF-I) is distributed through the anterior and intermediate pituitary lobe (D'Ercole et al., 1984) and has proved to be promising for the treatment of experimental pituitary tumors. Therapy with IGF-I caused regression of estrogen-induced prolactinomas in rats (Cónsole et al., 2008 and 2009).

Gene therapy may be defined as a pharmacological tool that utilizes nucleic acids (DNA or RNA) as drugs to cure or prevent a disease. Gene therapy may transmit genes, gene fragments or antiparallel sequences to the gene to annul its function, as well as regulating sequences of the transcription

terapéutica deseable (Bakhtiar y col., 2014). El factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) está distribuido a través de los lóbulos anterior e intermedio de la pituitaria (D'Ercole y col., 1984) y se ha demostrado como prometedor para el tratamiento de los tumores pituitarios experimentales. La terapia con IGF-I provocó regresión de los prolactinomas estrógeno-inducidos en ratas (Cónsole y col., 2008 y 2009).

La terapia génica puede ser definida como una herramienta farmacológica que utiliza ácidos nucleicos (ADN o ARN) como drogas para curar o prevenir una enfermedad. La terapia génica puede transmitir genes, fragmentos de genes o secuencias en sentido anti-paralelo al gen para anular su función, así como secuencias reguladoras de la transcripción del gen a transferir (Jain, 1998). La terapia génica utiliza vectores o vehículos para administrar los ácidos nucleicos. Los vectores pueden ser no virales (ADN desnudo, liposomas y complejos ADN-proteína) y virales (retrovirus, herpesvirus, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus). Aunque la terapia génica requiere de una profunda investigación antes de que pueda ser usada para el tratamiento de enfermedades pituitarias en humanos, la versatilidad de esta técnica ofrece posibilidades únicas para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. Esto incluye la regresión tumoral, la suplementación de genes anormales y la normalización de la secreción hormonal. Cuando los tumores pituitarios no responden a las estrategias terapéuticas convencionales, la terapia farmacológica no está bien tolerada, el tumor deviene agresivo o se dificulta su tratamiento, la terapia génica puede ser una atractiva opción. Con la neurocirugía, la terapia génica podría potenciarse y proveer una remisión a largo plazo. Las terapias convencionales como la quimioterapia y la radioterapia se asocian a bajas tasas de supervivencia, debido a la resistencia a los fármacos y a la falla en el blanco, con efectos adversos sobre las células sanas. Existen diferentes estrategias de terapia génica (**tabla 1**).

of the gene to be transferred (Jain, 1998). Gene therapy utilizes vectors or vehicles to administer nucleic acids. Vectors may be non-viral (nude DNA, liposomes and DNA-protein complexes) and viral (retrovirus, herpesvirus, adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus). Although gene therapy requires deep research before it can be used for the treatment of pituitary diseases in humans, versatility of this technique offers unique possibilities for the development of new therapeutic tools. This includes tumoral regression, supplementation of abnormal genes and normalization of hormonal secretion. When pituitary tumors do not respond to conventional therapeutic strategies, pharmacological therapy is not well tolerated or the tumor becomes aggressive or its treatment is hindered, gene therapy may be an attractive option. With neurosurgery, gene therapy might be improved and it may provide long-term remission. Conventional therapies such as chemotherapy and radiotherapy are related with low survival rates due to resistance to drugs and missing of the target, with adverse effects on healthy cells. There are different gene strategies (**table 1**).

Table 1. Gene therapy strategies.

- 1. Corrective gene therapy:**
 - Inactivation of oncogenes.
 - Introduction of tumor suppressor genes.
- 2. Anti-angiogenic gene therapy.**
- 3. Suicide gene therapy.**
- 4. Immunomodulating gene therapy:**
 - Active immunization.
 - Genetically engineered immune cells.

1. Corrective gene therapy: a correct copy of the suppressor gene is introduced to restore the normal cellular growth or to induce apoptosis in neoplastic cells. For example, *antisense* gene therapy uses oligonucleotides that suppress the expression of harmful genes. These *antisense* oligonucleotides are small chains of modified ARN that contain a complementary sequence to a target RNA, interfering in its transportation, sectioning and

Tabla 1. Estrategias de terapia génica.

- 1. Terapia génica correctiva:**
 - Inactivación de oncogenes.
 - Introducción de genes tumorales supresores.
- 2. Terapia génica anti-angiogénica.**
- 3. Terapia génica suicida.**
- 4. Terapia génica inmunomoduladora:**
 - Inmunización activa.
 - Modificación genética de las células inmunes.

1. Terapia génica correctiva: se introduce una copia correcta del gen supresor para restaurar el crecimiento celular normal o para inducir apoptosis en las células neoplásicas. Por ejemplo, la terapia génica *antisense* usa oligonucleótidos que suprimen la expresión de genes nocivos. Estos oligonucleótidos *antisense* son pequeñas cadenas de ARN modificado que contienen una secuencia complementaria a un ARN blanco, interfiriendo en su transporte, corte y traslación. Para la introducción de estos oligonucleótidos se han usado vectores virales y no virales. La terapia génica para el tratamiento de los tumores pituitarios está basada en la transferencia de genes con habilidad para rescatar el fenotipo normal de las células neoplásicas, en base al que se implementó en los ratones heterocigotas para el retinoblastoma con gen supresor (ratón Rb^{+/-}). El gen del retinoblastoma es el supresor tumoral prototipo. Los tumores pituitarios espontáneos melanotropos que surgen en ratones Rb^{+/-} fueron tratados con un adenovirus recombinante que lleva el ADNc RB, logrando la disminución de la proliferación tumoral (Hu y col., 1994), con restablecimiento de la innervación mediante neuronas dopaminérgicas reguladoras del crecimiento asociado a una mayor supervivencia comparada con los controles no transfectados (Riley y col., 1996).

2. Terapia génica anti-angiogénica: el crecimiento tumoral y su capacidad metastizante dependen de la habilidad de las células tumorales para establecer un flujo sanguíneo mediante *neoangiogénesis*.

translation. To introduce these oligonucleotides several viral and non-viral vectors have been used. Gene therapy for the treatment of pituitary tumors is based on the transference of genes with the ability to rescue the normal phenotype of neoplastic cells, based on what has been implemented on heterozygous mice for the retinoblastoma with suppressing gene (mice Rb^{+/-}). The retinoblastoma gene is the prototypic tumor suppressor. Spontaneous pituitary melanotrope tumors that arise in Rb^{+/-} mice were treated with a recombinant adenovirus carrying RB cADN, thus decreasing tumor cell proliferation (Hu et al., 1994), and re-establishing innervation by growth-regulatory dopaminergic neurons associated with a prolonged lifespan when compared to nontransfected controls (Riley et al., 1996).

2. Anti-angiogenic gene therapy: tumor growth and its metastizing capacity depend on the ability of tumor cells to reestablish blood flux by means of *neoangiogenesis*. This process is stimulated by the vascular endothelial growth factor (VEGF), a growth factor derived from platelets, basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) and interleukin 8 (IL-8). Other factors act as angiogenesis inhibitors of: thrombospondin 1, platelet factor 4 (PF4), angiostatin and endostatin. Anti-angiogenic therapy inhibits the expression of angiogenic molecules by means of overexpression of anti-angiogenic molecules or by means of lysis of endothelial cells that lead to tumor regression due to apoptosis (O'Reilly et al., 1997).

3. Suicide gene therapy: therapy with suicide genes has been widely used in pituitary tumors, *in vitro* and *in vivo*. A recombinant adenoviral (RA_d) vector, el RA_dTK, harboring the HSV-1 thymidine kinase suicide gene, under the control of the human cytomegalovirus promoter (hCMV), was used to transfer the TK gene to GH₃ and AtT₂₀ cells, and when treated with the prodrug ganciclovir ample destruction of the cultures was caused, since it becomes toxic after phosphorylation. Sulpiride- and oestrogen-induced prolactinomas were stereotaxically injected with RA_dTK. The subsequent injection of host animals with daily doses of ganciclovir for a week partially reduced the size of the prolactinoma and PRL levels (Windeatt et al., 2000).

Este proceso está estimulado por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), el factor de crecimiento epidérmico (FGE) y la interleuquina 8 (IL-8). Otros factores actúan como inhibidores angiogénicos: trombospondina 1, factor plaquetario 4 (FP4), angiostatina y endostatina. La terapia anti-angiogénica inhibe la expresión de las moléculas angiogénicas mediante sobreexpresión de las moléculas anti-angiogénicas o por medio de una lisis de las células endoteliales que conduce a una regresión tumoral debida a apoptosis (O'Reilly y col., 1997).

3. Terapia génica suicida: la terapia con genes suicidas ha sido ampliamente usada en tumores pituitarios, *in vitro* e *in vivo*.

Un vector adenoviral recombinante (RAD), el RADTK, transportando el gen suicida HSV-1 timidina kinasa, bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMVh), fue usado para transferir el gen de la TK a células de las líneas tumorales GH₃ y AtT₂, y al ser tratadas con la prodroga ganciclovir se produjo gran destrucción de los cultivos, ya que deviene tóxica luego de su fosforilación. Los prolactinomas inducidos con estrógeno/sulpirida fueron estereotáxicamente inyectados con RADTK. La subsecuente inyección de los animales huéspedes con dos dosis diarias de ganciclovir durante una semana, redujo parcialmente el tamaño del prolactinoma y los niveles de PRL (Windeatt y col., 2000). La terapia génica, usando vectores adenovirales transportadores del gen de TK bajo el control de promotores hormonales pituitarios, por lo común las subunidades β-promotoras de GH humana y hormonas glicoproteicas, fueron efectivas para el tratamiento de las líneas tumorales *in vitro* (Lee y col., 1999). Un vector adenoviral, codificando el gen TK bajo el control del promotor de PRLh fue efectivo para inducir apoptosis en células GH₃ en un cultivo expuesto a ganciclovir. Sin embargo, esto no redujo de modo significativo el crecimiento y el porcentaje de PRL secretada en prolactinomas estrógeno-inducidos *in vivo* (Southgate y col., 2000). Los vectores adenovirales,

Gene therapy with adenoviral vectors harboring TK gene under the control of pituitary hormone promoters, usually human GH and glycoprotein hormone β-subunit, were effective for the treatment of *in vitro* tumor cell lines (Lee et al., 1999). An adenoviral vector, harboring TK gene under control of hPRL promoter was effective to induce apoptosis in GH₃ cells in culture exposed to ganciclovir. However, growth and percentage of PRL secreted in *in vivo* estrogen-induced prolactinomas were not significantly decreased (Southgate et al., 2000). Adenoviral vectors harboring TK gene under the control of promoters hCMV and hPRL, showed expression of transgene for over 3 months *in situ* in normal anterior pituitary rat (Southgate et al., 2001), whereas nude mice harboring subcutaneous tumors grafted with GH₃ cells were successfully treated with an adenoviral vector harboring TK gene, under the control of hGH promoter (Lee et al., 1999).

4. Immunomodulating gene therapy: genetic modification of tumor cells allows the expression of different cytokines (IL-2, IL-12), granulocyte-macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor which are chemotactic factors for the antigen-presenting cells and immune response activators. Also, vectors can be used that induce the expression of antigens associated to tumors under the form of recombining vaccines (Tang et al., 1992).

Although the actual methods of gene transference comprise viral and non-viral essays, the application of the latter for the treatment of pituitary tumors is not yet well documented. The use of recombinant viral vectors is due to its high efficiency. Viral vectors include **retrovirus** (Kohn et al., 1987; Gilboa, 1988; Short et al., 1990; Prel et al., 2013; Miller, 2014; Kobayashi et al., 2014), **herpes simplex virus type 1** (Roizman, 1996; Wolfe et al., 1999; Tomasec et al., 1996; Goins et al., 2014), **adenovirus** (Hitt et al., 1995; Parks et al., 1996; Bergelson et al., 1997; Hidaka et al., 1999; Williams et al., 2001; Castro et al., 1997; 2001; 2014), **adeno-associated virus** (Balakrishnan and Jayandharan, 2014) and **lentivirus** (Blesch, 2004; Vogel et al., 2004; Segura et al., 2013; Nasri et al., 2014; Ghanbari et al., 2014), whereas non-viral vectors include **liposomes** (Zong et al., 2014; Ding et al., 2014) and **nude DNA** (Zhan et al., 2014; Zhang et al., 2014). Oncolytic viruses have received great attention

transportadores del gen de la TK, bajo ambos promotores CMVh y PRLh, mostraron expresión del transgén por más de 3 meses *in situ* en pituitaria anterior normal de rata (Southgate y col., 2001), mientras que los ratones *nude* portadores de tumores subcutáneos injertados con células GH₃ fueron tratados exitosamente con un vector adenoviral transportador del gen de la TK, bajo el control del promotor de la GHh (Lee y col., 1999).

4. Terapia génica inmunomoduladora: la modificación genética de las células tumorales permite que expresen diferentes citoquinas (IL-2, IL-12), factor estimulante de la colonia granulocítica-macrofágica y factor de necrosis tumoral que son factores quimiotácticos para las células presentadoras de antígenos y activadores de la respuesta inmune. También pueden usarse vectores que induzcan la expresión de antígenos asociados a tumores bajo la forma de vacunas recombinantes (Tang y col., 1992).

Aunque los métodos actuales de transferencia génica comprenden ensayos virales y no-virales, la aplicación de los últimos para el tratamiento de los tumores pituitarios no está aun bien documentada. La utilización de los vectores virales recombinantes es debida a su gran eficiencia. Los vectores virales incluyen **retrovirus** (Kohn y col., 1987; Gilboa, 1988; Short y col., 1990; Prel y col., 2013; Miller, 2014; Kobayashi y col., 2014), **virus herpes simple tipo 1** (Roizman, 1996; Wolfe y col., 1999; Tomasec y col., 1996; Goins y col., 2014), **adenovirus** (Hitt y col., 1995; Parks y col., 1996; Bergelson y col., 1997; Hidaka y col., 1999; Williams y col., 2001; Castro y col., 1997; 2001; 2014), **virus adeno-asociados** (Balakrishnan y Jayandharan, 2014) y **lentivirus** (Blesch, 2004; Vogel y col., 2004; Segura y col., 2013; Nasri y col., 2014; Ghanbari y col., 2014), mientras que los vectores no virales incluyen **liposomas** (Zong y col., 2014; Ding y col., 2014) y **ADN desnudo** (Zhan y col., 2014; Zhang y col., 2014). Los virus oncolíticos han recibido gran atención por su potencial para innovar la terapia génica en cáncer. Las telomerasas de vectores adenovirales oncolíticos

for its potential for gene therapy innovation in cancer. Many telomerase- promoter-regulated oncolytic adenoviral vectors that retain E1A and E1B in the adenoviral replication turn to be efficient on neoplastic cells (Wei et al., 2014).

In the pituitary gland, gene therapy strategies are related with the application of vectors derived from adenoviruses used with basic research purposes and in therapeutic applications in the neuroendocrine system. Adenoviruses are DNA viruses with no membrane, 36 Kb genome and with

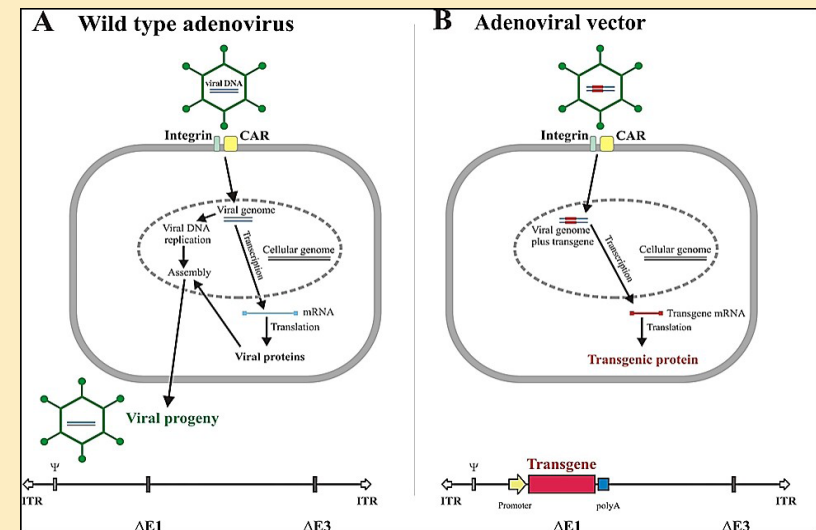


Fig. 23.1. Infection cycle of an adenovirus (Ad) and a recombinant adenoviral vector (RAD).

A) Adenovirus (Ad): A wild type Ad binds to specific cell membrane receptors and is subsequently endocytosed. Then the viral DNA is translocated to the nucleus where it remains as an **episome**. After viral DNA replication, late viral genes coding for structural proteins are expressed. Most newly synthesized viral proteins are targeted to the nucleus where they self assemble to generate viral **capsids**. Viral DNA is then packaged thus generating mature adenoviral particles which replenish the host cell, finally leading to cell lysis and virus release.

B) Recombinant adenoviral vector (RAD): Replication-defective adenoviral vectors enter target cells and translocate their DNA to the nucleus as described above. However, as the Ad vector's genome lacks the E1 genomic region, viral DNA replication does not occur. The transgene (usually under the control of a strong promoter) is actively expressed, giving rise to high levels of transgenic protein. New viral particles are not generated and host cell lysis does not occur. The corresponding viral genomes are diagrammatically shown at the bottom (Rodríguez et al., 2009).

que conservan E1A y E1B en la replicación adenoviral resultan eficaces sobre las células neoplásicas (Wei y col., 2014).

En la glándula pituitaria, las estrategias de la terapia génica se relacionan con la aplicación de los vectores derivados de adenovirus que se usan con fines de investigación básica y en aplicaciones terapéuticas en el sistema neuroendocrino. Los adenovirus son virus ADN sin membra-

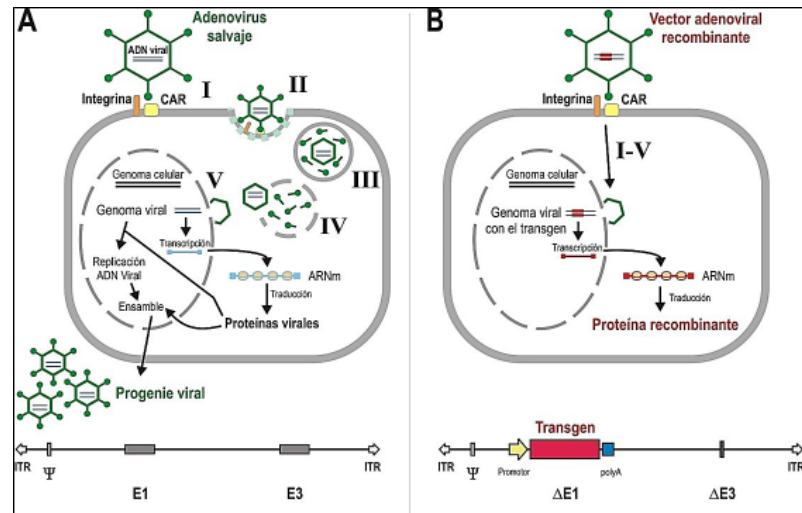


Fig. 23.1. Ciclo de infección de adenovirus (Ad) y de vector adenoviral recombinante (RAd).

A) Adenovirus (Ad): Un Ad de tipo salvaje se une de modo específico a receptores de membrana y a continuación es endocitado. Luego el ADN viral es transferido al núcleo donde permanece como un **episoma**. Después de la replicación viral, se expresan genes virales que endocodifican proteínas estructurales. La mayor parte de las proteínas recién sintetizadas van al núcleo donde se ensamblan para generar **cápsides**. El ADN viral es luego empaquetado generando partículas adenovirales maduras que llenan la célula huésped y por citólisis liberan los virus.

B) Vectores adenovirales recombinantes (RAd): Los vectores adenovirales en replicación defectuosa entran a las células blanco y transfieren su ADN al núcleo como ya se describió. Sin embargo, como el genoma del vector Ad no tiene una región genómica E1, no ocurre la replicación del ADN viral. El **transgén** (usualmente bajo el control de promotor fuerte) es activamente expresado, dando altos niveles de proteína transgénica. No se generan nuevas partículas virales y no ocurre citólisis. Los genomas virales correspondientes se muestran diagramados abajo (Rodríguez et al., 2009).

capacity to infect a wide variety of resting or mitotic cells. Cell receptors for adenoviruses are those referred to as high affinity CARs (Coxsackie and Adenovirus Receptor) that adhere to the viral protein (Bergelson et al., 1997) and to integrins $\alpha_v \beta_{3/5}$ that interact with the viral pentameric basis (Hidaka et al., 1999). The infection cycle of the adenovirus (Ad) and of the recombinant adenoviral vector (RAd) is shown in **fig. 23.1**.

A) Wild adenovirus: it is bound to the cell membrane receptors and it is endocytosed. The viral DNA is translocated to the nucleus where an *episome* is formed. After the viral replication of DNA, viral genes are expressed which encode for structural proteins which are directed to the nucleus where they generate viral capsids. Mature particles are released by cytolysis. **B) Recombinant adenoviral vector:** it enters the target cells and transfers its DNA to the nucleus. The vector genome lacks genome region E1 and DNA replication of viral DNA does not occur. The expression of the transgene takes place by producing high levels of transgenic protein, no new viral particles are produced and there is no cytolysis.

In the last decade it has been proved that the oncogene triggers the potential fight against cancer and interference RNA (iRNA) results to be a valuable tool to identify oncogenes in the new therapeutic strategies (Yan et al., 2014). The delivery of potential therapeutic genes to cancer cells provides new perspectives: **a.** Replacement therapy with suppressor tumor genes; **b.** Immune gene therapy and **c.** Prodrug-based therapy (Bakhtiar et al., 2014).

Gene therapies with vectors using a specific therapeutic transgene are being used, which cause the death of neoplastic cells but respect healthy cells (Pazarentzos and Mazarakis, 2014). Gene expression is inhibited by iRNA through degradation of specific mRNA target, causing gene silencing. Its use in combination with genetically engineered viral vectors allows high delivery and/or integration efficiency with genomic DNA in the treatment of neoplasias (Stovall et al., 2012). A combined iRNA acts on multiple objectives in cancer therapy (Fei et al., 2012) and iRNA screens have been constructed that identify homeodomains (for example: PHF5a), applicable to human brain tumors (Hubert et al., 2013). Inhibin, a member of the transforming growth

na, genoma de 36 Kb y con capacidad para infectar una amplia variedad de células en reposo o en mitosis. Los receptores celulares para adenovirus son los denominados receptores de alta afinidad CAR (Coxackie y Adenovirus Receptor) que se adhieren a la proteína viral (Bergelson y col., 1997) y a las integrinas $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ que interactúan con la base pentamérica viral (Hidaka y col., 1999). El ciclo de infección de adenovirus (Ad) y del vector adenoviral recombinante (RAd) se muestra en la **fig. 23.1**.

A) Adenovirus salvaje: se une a los receptores de la membrana celular y es endocitado. El ADN viral es transferido al núcleo donde forma un *episoma*. Luego de la replicación viral del ADN, se expresan genes virales que codifican para proteínas estructurales que van al núcleo donde generan cápsides virales. Las partículas maduras se liberan por citólisis. **B) Vector adenoviral recombinante:** entra en las células blanco y transfiere su ADN al núcleo. El genoma del vector carece de región genómica E1 y la replicación del ADN viral no sucede. El transgén se expresa produciendo niveles altos de proteína transgénica, no se generan nuevas partículas virales y no hay citólisis.

En la última década, el oncogén gatilla la potencial lucha contra el cáncer y el ARN de interferencia (ARNi) resulta una herramienta valiosa para identificar los oncogenes en las nuevas estrategias terapéuticas (Yan y col., 2014). La entrega de genes terapéuticos potenciales a las células cancerosas abre nuevas perspectivas: **a.** Terapia de reemplazo con genes tumorales supresores; **b.** Terapia génica inmune y **c.** Terapia basada en prodrogas (Bakhtiar y col., 2014).

Se están aplicando terapias génicas con vectores que utilizan un transgén terapéutico específico, causando la muerte de las células neoplásicas y respetando a las células sanas (Pazarentzos y Mazarakis, 2014). El ARNi inhibe la expresión génica mediante la degradación del ARNm diana específico, provocando el silenciamiento de los genes. Su uso en combinación con los vectores virales de ingeniería genética permite una alta eficiencia de entrega y/o integración con el ADN genómico en el tratamiento de las neoplasias (Stovall y col., 2012). Existe

factor beta (TGF- β) superfamily, is a suppressor of FSH release through the mechanism of feedback to regulate follicular development that can be annulled by an iRNA. Inhibin silencing led to an increased mRNA and apoptosis in the anterior pituitary (Han et al., 2013). The iRNA technology investigates the gene function and can improve the oncolytic virotherapy (Mahoney and Stojdl, 2013). Also, RNA oligonucleotides capable of inducing immunostimulation, with oncogene silencing through iRNA, provide a mechanism of synergic inhibition of neoplastic cell growth (Sajeesh et al., 2014).

The purpose of the development of viral vectors is the transference of transgenes of with specificity of cell type and vector design, with the incorporation of the transgene within the cell, the expression of which is regulated by means of small molecules. Cell type specificity was obtained in *in vivo* animal models by selectively conducting the transgene expression, under the control of GH promoters (Lee et al., 2000), α and β -glycoprotein (Lee et al., 2000), POMC (Lee et al., 2001 a) and PRL (Castro et al., 1997; Davis et al., 2001; Southgate et al., 2001) for pituitary tumor cells. Early inducible gene expression systems encountered limitations, such as pleiotropic effects of the inducer, toxicity of inducing agents and low level of expression. However, control of non toxic transgene expression was made by tetracycline gene control system (Gossen and Bujard, 1992). Two types of Tet gene control systems have been communicated. The Tet-Off systems is composed by a Tet transactivator, an HSV-1 bound to regulatory *E. coli*-derived from operon Tet-resistance within promoter CMV (tetO/minCMV). The second type of gene control system is the Tet-On system. Here, tTA is modified by four aminoacids with an analogue Tet, doxycycline (DOX) is bound to the tetO/minCMV region and induces high levels of the transgene expression. A number of Tet regulatable viral systems have been developed, including the Tet-off dual adenoviral system for β -gal reporter gene with DNA sequences encoding tTA transactivator, located under the control of hPRL promoter. With this system, the expression of the specific transgene in rodent lactotropes was done *in vitro* and *in vivo*. Also, this expression can be turned off by administering DOX and re-activated when antibiotics are removed (Smith-Arica et al., 2001).

un ARNi combinado que actúa sobre objetivos múltiples en la terapia del cáncer (Fei y col., 2012) y se han confeccionado pantallas de ARNi que identifican homeodominios (ejemplo: PHF5a), aplicables a tumores cerebrales humanos (Hubert y col., 2013). La inhibina, un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es un supresor de la FSH liberada a través del mecanismo de retroalimentación para regular el desarrollo folicular que puede ser anulada por un RNAi. El silenciamiento del gen de la inhibina produjo un aumento de ARNm y un efecto de apoptosis en la pituitaria anterior (Han y col., 2013). La tecnología ARNi sondea la función del gen y puede mejorar la viroterapia oncolítica (Mahoney y Stojdl, 2013). Además, los oligonucleótidos de ARN capaces de inducir una inmunostimulación, con silenciamiento del oncogén mediante el ARNi, proporcionan un mecanismo de inhibición sinérgica del crecimiento de las células neoplásicas (Sajeesh y col., 2014).

El desarrollo de los vectores virales tiene por fin la transferencia de los transgenes con especificidad del tipo celular y el diseño de vectores, con la incorporación del transgén dentro de la célula que es regulada en su expresión mediante pequeñas moléculas. La especificidad del tipo celular se obtuvo en modelos animales *in vivo* conduciendo de manera selectiva la expresión del transgén, bajo el control de los promotores de GH (Lee y col., 2000), α y β -glicoproteína (Lee y col., 2000), POMC (Lee y col., 2001a) y PRL (Castro y col., 1997; Davis y col., 2001; Southgate y col., 2001) para células tumorales pituitarias. Los sistemas de expresión génica con inducción temprana encontraron limitaciones tales como los efectos pleiotrópicos del inductor, la toxicidad de los agentes inductores y el bajo nivel de expresión. Sin embargo, el control de la expresión del transgén no tóxico fue hecho mediante el sistema de control génico de la tetraciclina (Gossen y Bujard, 1992). Dos tipos de sistemas de control génico de Tet han sido comunicados. Un sistema Tet-Off que está compuesto por un transactivador Tet, un HSV-1 que se une a reguladores *E. coli*-derivados del operon Tet-resistencia dentro del promotor CMV (tetO/minCMV). El segundo tipo de sistema

A similar system of regulatable adenoviral vector has been constructed, in this case, expressing tyrosine hydroxylase (TH) under the control of hCMV promoter. Since TH is an enzyme that restricts dopamine synthesis, the growth of estrogen-induced prolactinomas was significantly inhibited when co-transduced with the components of both vectors of the regulatable vector system TH. Expression of TH may be turned off by means of DOX and turned on with the removal of antibiotics (Williams et al., 2001). Some partial results in the gene therapy of pituitary tumors emerge as a promising area. Lactotropes of human adenomas were successfully transduced with an adenoviral vector bearing cADN for human TH. Transduced cells not only express TH detectable through immunocytochemistry but also release high levels of L-DOPA and dopamine, thus markedly reducing the release of PRL in the middle of the culture (Freese et al., 1996).

Adenoviral vectors may cause inflammation in the pituitary gland and this adverse effect might be prevented by using bidirectional viral vectors expressing the gene for HSV-1 TK and the gene for the anti-inflammatory peptide of the thymulin type. Alternatively, the use of viral vectors is less immunogenic, such as adeno-associated viral vectors, might be taken into account for the treatment of pituitary tumors. It must be pointed out that although suicide system HSV1-TK-GCV has been used to implement a destructive experimental gene therapy of pituitary tumors, other toxic systems may offer advantages on TK-GCV system.

Studies with adenoviral recombinating vectors bearing scADN for three toxic genes usually codified as HSV1-TK, *E. coli* cytosine deaminase and deoxycytidine kinase evidenced that cytosine deaminase present higher efficiency to reduce the growth of different cell lines of lung carcinoma (Hoganson et al., 1996). Dominant and *antisense* negative gene therapies may construct alternative strategies for the treatment of pituitary tumors. The suppression of the expression of basic endogenous fibroblastic growth factor (bFGF), by means of an adenoviral vector bearing the *antisense* transgene for bFGF, caused inhibition of the proliferation of human gliomatous cells. The same effect was achieved by the adenoviral vector bearing the transgene for the receptor FGF (Aoki et al., 2002). As it has been mentioned before,

de control génico es el sistema Tet-On. Aquí el tTA es modificado por cuatro aminoácidos con un Tet análogo, la doxiciclina (DOX) se une a la región tetO/minCMV e induce altos niveles de la expresión del transgén. Un número de sistemas virales regulables Tet han sido desarrollados, incluyendo el sistema adenoviral dual Tet-off para el gen reporter β -gal con secuencias ADN codificadoras del transactivador tTA, ubicado bajo el control del promotor hPRL. Con este sistema, la expresión del transgén específico en las lactotropas de roedores fue realizada *in vitro* e *in vivo*. Además, esta expresión puede ser apagada mediante la administración de DOX y nuevamente activada cuando se remueven los antibióticos (Smith-Arica y col., 2001).

Se ha construido un sistema similar de vector adenoviral regulable, en este caso expresando tirosina hidroxilasa (TH) bajo el control de un promotor CMVh. Como la TH es una enzima limitante de la síntesis de dopamina, el crecimiento de los prolactinomas estrógeno-inducidos estuvieron significativamente inhibidos cuando co-transdujeron con los componentes de los dos vectores del sistema vector regulable TH. La expresión de TH puede apagarse mediante DOX y activarse mediante la remoción del antibiótico (Williams y col., 2001). Algunos resultados parciales en la terapia génica de los tumores pituitarios emergen como un área prometedora. Las lactotropas de adenomas humanos fueron exitosamente transducidos con un vector adenoviral transportador del ADNc para TH humana. Las células transducidas no sólo expresan TH detectable por inmunocitoquímica, sino que también liberan altos niveles L-DOPA y dopamina, reduciendo marcadamente la liberación de PRL en el medio de cultivo (Freese y col., 1996).

Los vectores adenovirales pueden provocar inflamación en la glándula pituitaria y este efecto adverso sería prevenido usando vectores virales bidireccionales que expresen el gen para HSV-1 TK y un gen para el péptido anti-inflamatorio del tipo de la timulina. Alternativamente, el uso de los vectores virales menos inmunogénicos, como los vectores virales adeno-asociados, podría ser considerado para el tratamiento de tumores pituitarios. Aunque el

the critical limitation of adenoviral vectors derives from a strong immune response against viral particles and infected cells. Such immune response limits the long-term expression of transgenes cytotoxic since T lymphocytes destroy infected cells and prevent the re-administration of the vector.

Common strategies to control the immune responses induced by adenoviruses include the use of adenoviral vectors bearing immunosuppressive genes (Ideguchi et al., 2000); also, immunosuppressive drugs such as cyclosporine were administered (Geddes et al., 1996) and oral tolerance to viral antigens is used (Ilan et al., 1997).

Adenoviral vectors present several advantages compared to other viral vector (**table 2**).

Table 2. Characteristics of the different types of viral vectors (Rodríguez et al., 2009).

Characteristics	Adenovirus (Ads)		Virus Herpes Simplex		Retrovirus		AAV
	1st generation recombinant adenoviruses	HD-Ads	Ampliphicons	Recombinant	Classical	Lentivirus	
Genome- hostage integration	No	No	No	No	Yes	yes	Yes
Capacity: Maximal size for insertion	8 Kb	36 Kb	15 Kb	Depend of selected genes.	7 Kb	7 Kb	4 Kb
Proliferation In infected cells	Rest Mitosis	Rest Mitosis	Rest Mitosis	Rest Mitosis	Mitosis	Rest Mitosis	Rest Mitosis
Immunogenicity in host	High	Low	Low	Variable	Low	Low	Low
Long-term expression	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Preparation and manipulation	Easy	Difficulty: Elimination of stocks. Apply scale.	Easy manipulation. Contaminant: Collaborative viruses.	Easy	Easy	Easy	Difficulty: Purify. Apply scale
Advantages for the treatment	Good tropism and transduction. High titers.	Good tropism. Infection. High expression of the transgene.	Good tropism. Low toxicity.	Good tropism. Transgene capacity.	Persistent transgene expression.	Good tropism and transduction	None
Disadvantages for clinical use	Inflammation. Short-term transgene expression.	Contaminates with helper virus	Transient non neuronal expression.	Transient non neuronal expression.	Insertional mutagenesis.	Potential ineffective activity.	Insertional mutagenesis.

AAV: associated adenovirus; Ads: adenoviruses; HD-Ads: helper-dependent adenoviruses.

sistema suicida HSV1-TK-GCV ha sido usado para implementar una terapia génica experimental destructiva en la terapia de tumores pituitarios, otros sistemas tóxicos pueden ofrecer ventajas sobre el sistema TK-GCV.

Los estudios con vectores recombinantes adenovirales portadores de ADNsc para tres genes tóxicos, comúnmente codificados como el HSV1-TK, el *E. coli* citosina deaminasa y el deoxicitidina kinasa, mostraron que la citosina deaminasa tiene mayor eficacia para reducir el crecimiento de diferentes líneas celulares del carcinoma pulmonar (Hoganson y col., 1996). Las terapias génicas negativas dominantes y *antisense* pueden constituir estrategias alternativas para el tratamiento de los tumores pituitarios. La supresión de la expresión del factor de crecimiento fibroblástico endógeno básico (FGFb), por medio de un vector adenoviral transportador del transgén *antisense* para FGFb, causó inhibición de la proliferación de células gliomatosas humanas. El mismo efecto fue logrado por medio del vector adenoviral transportador del transgén para el receptor FGF (Aoki y col., 2002). Como se mencionó, la limitación crítica de los vectores adenovirales proviene de una fuerte respuesta inmune contra las partículas virales y las células infectadas. Dicha respuesta inmune limita la expresión a largo plazo de los transgenes porque los linfocitos T citotóxicos destruyen a las células infectadas y previenen la re-administración de dicho vector.

Las estrategias comunes para vencer las respuestas inmunes inducidas por adenovirus incluyen el uso de los vectores adenovirales transportando genes inmunosupresores (Ideguchi y col., 2000); también se administran drogas inmunosupresoras como la ciclosporina (Geddes y col., 1996) y se utiliza la tolerancia oral a antígenos virales (Ilan y col., 1997).

Los **vectores adenovirales** tienen varias ventajas respecto a los otros vectores virales (**tabla 2**).

Adenoviral vectors present some **advantages:** **a)** Capacity to transport large quantities of DNA; **b)** Possibility of *in vivo* gene transfer into a wide variety of cells (benign or malign); **c)** Ability to infect mitotic and post-mitotic cells **d)** Ability for vector production. Adenoviruses possess double DNA chain and after transfection, gene expression decreases in no more than 4 weeks. Also, these viruses do not integrate to the target cell adenoma. The entry process of the virus into the cell initiates with the binding to a membrane protein termed Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) and then is internalized at cytoplasmic level. A progressive diminution in endosomal pH causes a conformational change of capsid proteins of virion, which results in the release of the viral capsid in the cytoplasm. Afterwards, it continues to the nucleus where a new replication begins. One of the disadvantages of these vectors is that they are highly immunogenic, what turns their new administration into less effective as the immune response develops. In order to avoid this, new adenoviral vectors have been designed which result to be less immunogenic. Stereotaxic injection of adenoviral vectors bearing *E. coli* β -galactosidase (β -gal) gene under the control of PRL (hPRL) or hCMV promoters in sheep pituitary leads to high levels of transgene expression up to 7 days after surgery. The histological exam of these pituitaries revealed variable degrees of inflammatory response with periglandular fibrosis, lymphocytic infiltrates and vasculitis in almost all cases (Davis et al., 2002). In other *in vivo* studies in rats it has been demonstrated that adenoviral vectors administered by intravascular injection, bearing β -gal gene under the control of promoters of glycoprotein hormone β -subunits, fail to express the transgene at pituitary level. On the contrary, the stereotaxic injection of these vectors in the rat pituitary was successful for the selective expression of transgenes in the specific adenohipophyseal populations (Lee et al., 2000). Vector *tsK* was effective for *in vivo*

Tabla 2. Características de los diferentes tipos de vectores virales (Rodríguez y col., 2009).

Características	Adenovirus (Ads)		Virus Herpes Simplex		Retrovirus		AAV
	1° generación adenovirus recombinantes	HD-Ads	Amplificones	Recombinante	Clásicos	Lentivirus	
Integración genoma- huésped	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí
Capacidad: Tamaño máximo de inserción	8 Kb	36 Kb	15 Kb	Depende de los genes delecionados.	7 Kb	7 Kb	4 Kb
Proliferación en células infectadas	Reposo Mitosis	Reposo Mitosis	Reposo Mitosis	Reposo Mitosis	Mitosis	Reposo Mitosis	Reposo Mitosis
Immunogenicidad en huésped	Alta	Baja	Baja	Variable	Baja	Baja	Baja
Expresión a largo plazo	No	Sí	No	No	No	Sí	Sí
Preparación y manipulación	Fácil	Dificultad: Eliminación de stocks. Poner en escala.	Fácil manipulación. Se contamina con virus colaboradores.	Fácil	Fácil	Fácil	Dificultad: Purificar. Poner en escala.
Ventajas para el tratamiento	Buen tropismo y transducción. Altos títulos.	Buen tropismo. Infección. Mayor expresión del transgén.	Buen tropismo Baja toxicidad	Buen tropismo Capacidad transgénica.	Expresión transgénica persistente.	Buen tropismo y transducción	Ninguna
Desventajas para uso clínico	Inflamación. Expresión transgen: Corto plazo.	Contamina con virus helpers.	Expresión no neuronal transitoria.	Expresión no neuronal transitoria.	Mutagénesis Insercional.	Potencial actividad infective.	Mutagénesis insercional.

AAV: adenovirus asociado; Ads: adenovirus; HD-Ads: adenovirus helper dependiente.

Los **vectores adenovirales** tienen **ventajas**: **a)** Capacidad de transporte de grandes cantidades de ADN; **b)** Posibilidad de lograr transferencias *in vivo* en una amplia variedad de células (benignas o malignas); **c)** Habilidad para infectar células mitóticas y post-mitóticas y **d)** Facilidad para la producción del vector. Los adenovirus poseen doble cadena de ADN y luego de la transfección, la expresión del gen decrece en no

transfer of gene β -gal in rat prolactinomas (Bolognani et al., 2001; Carri et al., 2005).

Adenoviral genes may be classified as **early genes** encoding regulatory proteins expressed before DNA replication and **late genes**, expressed after DNA replication and which encode structural proteins. Early genomic region E1 is selected in adenoviral vectors to render them replication-defective. This genomic region E1 must be complemented in a *trans* position (in a separate DNA) to replicate the vector provided by means of a cell line such as HEK 293, transfected with the deleted viral genes (Hitt et al., 1995). First generation recombinant adenoviral vectors are devoid of genomic regions E1 and E3, the latter being deleted in order to make more space in the exogenous sequences. The expression of the viral protein stimulates a strong immune response, characterized by cytotoxic T-lymphocytes that eliminate the infected cells (Yang et al., 1994). In order to overcome this limitation, other genomic regions were deleted to obtain new adenoviral vectors. The most promising ones are those referred to as “**Helper-Dependent**” (HD) adenovectors, in which adenoviral genes are deleted and retain only the inverted terminal repeats (ITR). These terminals are necessary for viral replication and encapsidation signal. Since the vector cannot express any viral protein, generation of DH vectors requires that all adenoviral genes provided be provided *in trans*, usually by coinfection with an adenovirus, called “helper virus” (Parks et al., 1996). Since this virus, used for generating HD vectors, remains as a contaminant, several systems have been designed to minimize helper titers in HD viral stocks (Parks and Graham, 1997). A specific adenoviral vector of somatotrope cells was constructed in a DNA fragment, flanked by two loxP sequences, located between the hGH promoter and the diphtheria toxin (GHp-loxP-DT) gene. When the GH-producing cell line GH₄ was co-transduced with this vector and with another one harboring the expression cassette for GHp-Cre, destruction of the cultures occurred. Also, subcutaneous GH₄ tumors, generated

más de 4 semanas. Además, estos virus no se integran al genoma de la célula blanco. El proceso de entrada del virus a la célula es iniciado por su unión a una proteína de membrana denominada Receptor de Cock-sakie y Adenovirus (CAR) y luego se internaliza a nivel citoplasmático. Una disminución progresiva en el pH del endosoma causa un cambio conformacional de las proteínas de la cápside del virión y esto resulta en la liberación de la cápside viral en el citoplasma. Luego sigue su camino hasta el núcleo donde comienza la replicación. Una de las desventajas de estos vectores es que resultan altamente inmunogénicos, lo que hace que su nueva administración sea menos efectiva, a medida que se desarrolla la respuesta inmune. Para evitarlo, se han diseñado nuevos vectores adenovirales que resultan menos inmunogénicos. La inyección estereotáxica de los vectores adenovirales transportando el gen de la *E. coli* β -galactosidasa (β -gal) bajo el control de los promotores de PRL (PRLh) o CMVh en la pituitaria de oveja lleva a altos niveles de la expresión del transgén hasta 7 días después de la cirugía. El examen histológico de estas pituitarias reveló grados variables de respuesta inflamatoria con fibrosis periglandular, infiltrados linfocíticos y vasculitis en casi todos los casos (Davis y col., 2002). En otros estudios *in vivo* en ratas se ha demostrado que la administración intravascular de vectores adenovirales, llevando el gen β -gal bajo el control de promotores de β -subunidades de hormonas glicoproteicas, fallan para expresar el transgén a nivel pituitario. Por el contrario, la inyección estereotáxica de estos vectores en la pituitaria de ratas fue exitosa para la expresión selectiva de transgenes en las poblaciones adenohipofisarias específicas (Lee y col., 2000). El vector *tsK* fue efectivo para la transferencia *in vivo* del gen β -gal en prolactinomas de rata (Bolognani y col., 2001; Carri y col., 2005).

Los genes adenovirales pueden ser clasificados como **genes tempranos** que codifican proteínas reguladoras expresadas antes de la replicación del ADN y **genes tardíos**, expresados después de la replicación de ADN y que codifican proteínas estructurales. La región genómica temprana E1 es deletada en los vectores adenovirales para tomarlos como replicación-defectivos. Esta región genómica E1 debe ser complementada en posición

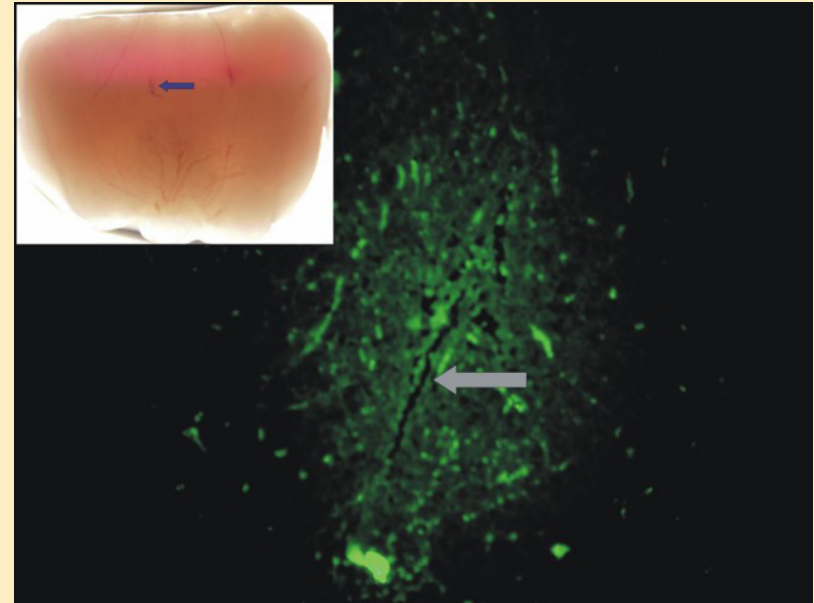


Fig. 23.2. Expression of transgenic (GFP/TK)_{fus} in a rat pituitary adenoma. The main panel shows the green fluorescence of transduced cells around the entry point (arrow) of the needle used to stereotaxically deliver RAD-(GFP/TK)_{fus} into the tumor. Obj. x20. The inset shows a low magnification view of the same pituitary adenoma where an entry point of the needle can be seen (arrow). No structural damage is evident as a consequence of the injection, IF x 400 (Console et al., 2008)

in nude mice, involuted when topically injected with those vectors (Lee and Jameson, 2002) (**fig. 23.2**).

This vector evidenced that it expresses high fluorescence levels in cultures of lung and smooth cancer cell line A549 when ganciclovir was added to cultures (**fig. 23.3**).

Incubation of GH3 cells with RAD's expressing the genes for tumoral necrosis factor- α (TNF α) genes or ligand FasL (membrane protein of the TNF family), two pro-apoptotic molecules whose receptors are present on lactotrope membranes, increased apoptotic activity in those cells (Lee et al., 2001 b; Candolfi et al., 2006). Pro-apoptotic gene therapy may constitute a possible alternative for TK

trans (en un ADN separado) para replicar el vector que es provisto por medio de una línea celular como la HEK 293, transfectada con los genes virales delecionados (Hitt y col., 1995). La primera generación de vectores adenovirales recombinantes adolece de las regiones genómicas E1 y E3, siendo la última delecionada para hacer más espacio en las secuencias exógenas. La expresión de la proteína viral estimula una fuerte respuesta inmune, caracterizada por linfocitos T citotóxicos que eliminan las células infectadas (Yang y col., 1994). Para superar esta limitación, otras regiones genómicas se delecionaron para obtener nuevos vectores adenovirales. Los más prometedores son los denominados adenovectores “**Helpers-Dependientes**” (HD), en los cuales los genes adenovirales son delecionados y conservan sólo las terminales repetidas invertidas (TRI). Dichas terminales son necesarias para la replicación viral y para la señal de encapsulación. Como el vector no puede expresar ninguna proteína viral, la generación de los vectores HD requiere que todos los genes adenovi-

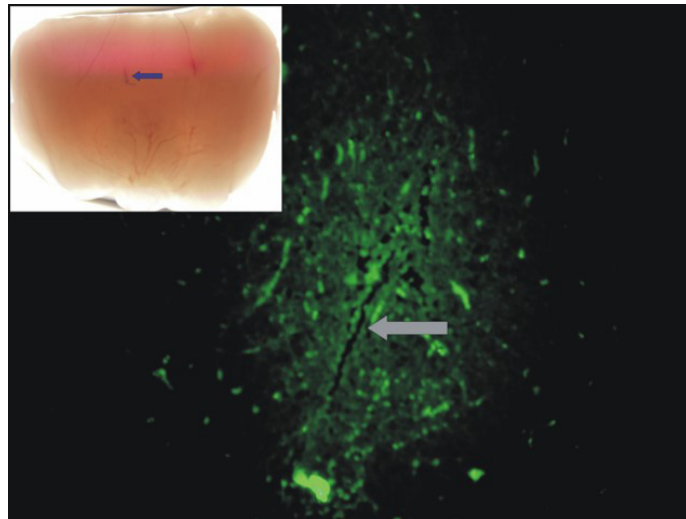


Fig. 23.2. Expresión de (PFV/TK)_{fus} en un adenoma pituitario de rata. La fluorescencia verde muestra las células transducidas alrededor del orificio de entrada (flecha) de la aguja usada para inyectar RAD-(GFP/TK)_{fus} en el tumor mediante estereotaxia (IF x 400). Recuadro: se aprecia el mismo adenoma pituitario en el que se puede ver el orificio de entrada de la aguja (flecha) (Rodríguez y col., 2009).

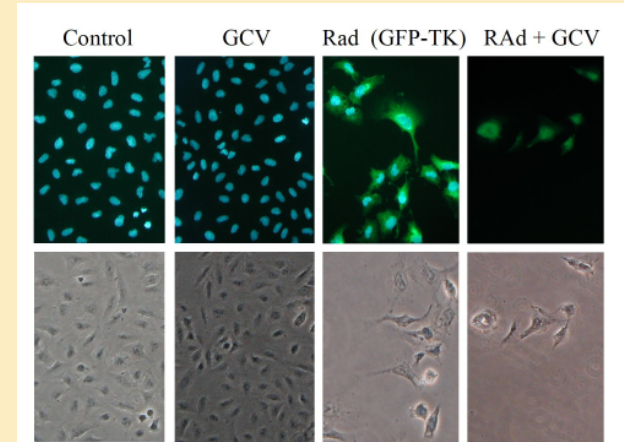


Fig. 23.3. Suicide activity of a GFP/TK fusion protein. The suicide activity of an adenoviral vector, RAD-(GFP/TK)_{fus}, harboring a DNA sequence coding for the fusion protein (GFP/TK)_{fus}, between eGFP and HSV-1 TK was tested in the A549 human lung tumor cell line. Upper panels correspond to fluorescence images whereas lower panels correspond to phase contrast images.

The leftmost panel corresponds to control cells (nuclei were labeled with DAPI and show blue fluorescence). Second panel from the left corresponds to cells incubated for 4 days with 100 μM ganciclovir (GCV), and shows that the viability of the cells was not affected by GCV alone. Third panel from the left corresponds to cells incubated for 4 days with RAD-(GFP/TK)_{fus}. As expected green fluorescence is observed in the cytoplasm of transduced cells.

The rightmost panel corresponds to cells incubated during 4 days with the vector plus 100 μM GCV. A substantial reduction in the number of cells was observed which confirms the suicide activity of the fusion protein (Rodríguez y col., 2009).

gene therapy, in the treatment of certain types of pituitary tumors such as prolactinomas.

Another type of vectors used for gene transfer in the pituitary gland corresponds to those derived from **herpes simplex virus type 1 (HSV-1)**. It is a DNA virus with double band with a cover derived from hostage cells. The virus contains 38 genes that are not essential for the viral cycle and that may be deleted, thus generating recombi-

rales provistos estén en posición *trans*, usualmente mediante coinfección con un adenovirus, denominado “virus colaborador” (Parks y col., 1996). Dicho virus, usado para generar los vectores HD, permanece a modo de contaminante. Varios sistemas se diseñaron para minimizar los títulos de virus colaboradores en los stocks virales HD (Parks y Graham, 1997). Un vector adenoviral específico de células somatotropas fue construido en un fragmento de ADN, flanqueado por dos secuencias loxP, siendo ubicado entre el promotor de GHh y el gen de la toxina diftérica (GHp-loxP-DT). Cuando la línea celular GH₄ productora de GH fue cotransducida con este vector y con otra que expresa el cassette para GHp-Cre, hubo destrucción de los cultivos. Además, los tumores subcutáneos GH₄, generados en ratones *nude*, involucionaron cuando fueron topicados con dichos vectores (Lee y Jameson, 2002) (fig. 23.2).

Este vector mostró que expresa altos niveles de fluorescencia en cultivos de células de la línea A549 de un tumor pulmonar y lisó dichas células cuando el ganciclovir fue agregado a los cultivos (fig. 23.3).

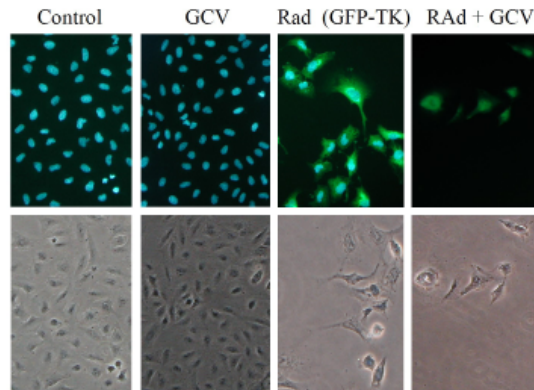


Fig. 23.3. Actividad suicida de una proteína de fusión PFV/TK. Paneles superiores: imágenes de fluorescencia y paneles inferiores: contraste de fases. Panel extremo izquierdo: células control (DAPI: fluorescencia azul). Segundo panel izquierdo: células incubadas 4 días con 100 μ M de ganciclovir (GCV), con buena viabilidad celular. Tercer panel: células incubadas durante 4 días con Rad-(PFV/TK)_{fus}. Células transducidas: fluorescencia verde. Panel derecho: células incubadas 4 días con el vector con 100 μ M GCV: actividad suicida de la proteína de fusión (IF x 200) (Rodríguez y col., 2009).

nant vectors with enough space to clone more than 1 transgene or regulating sequences used as specific promoters. HSV-1 may establish two types of infections: lytic cycle or, in some neurons, latency state. The lytic cycle is characterized by a cytopathic effect, partly due to defects in the proteins of infected cells, codified by early genes. One of these proteins, PCI4, is the main factor implied in the transition of an intermediate early phase to an early phase of the lytic cycle. In latency state, there is very low level of gene transcription, which results in diminished levels of associated latent viral RNAs (Roizman, 1996). There are two types of vectors derived from HSV-1: **ampliphicons** and **recombinant viruses**. In the latter, the transgene is cloned within HSV-1 genome (Wolfe et al., 1999). There are two main types of these, termed **first** and **second generation** of HSV-1 derived vectors. First generation vectors present mutation or deletion in an essential gene. A relevant example of these vectors is the *tsK*, the only type of vector derived from HSV used in the pituitary gland. This vector is a HSV-1 mutant, sensitive to temperature, with a mutation point in gene IE3 to prevent the replication process at 37° C, but not at 31° C. Gene IE3 was chosen because its protein product, PCI4, is the main *trans* activator of early genes, and consequently, early and late viral expression of genes is reduced when IE3 is not active. Transgenes are cloned in the locus of thymidine kinase (TK) under control of active promoter HSV-1 IE. Wild revertants originate with relative frequency during preparation and contaminate viral reserves with replication competent viruses. A negative characteristic of herpes vectors derived from first generation is toxicity that appears when expressing toxic viral genes (Tomasec et al., 1996). Recombinant vectors of second generation present deletions in more than one gene, what makes them more cytotoxic and consequently, they have not yet been used in the pituitary gland.

Hybrid cDNA encodes a chimeric protein that corresponds to HSV1-TK and is fused to the green fluorescent protein (GFP) that retains suicide TK activity (Paquin et al., 2001). The same was

La incubación de células GH3 con RAD's expresando los genes para el factor de necrosis tumoral- α (TNF α)- o el ligando FasL (proteína de membrana de la familia del TNF), dos moléculas pro-apoptóticas cuyos receptores están presentes sobre las membranas de células lactotropas, aumentó la actividad apoptótica en dichas células (Lee y col., 2001b; Candolfi y col., 2006). La terapia génica pro-apoptótica puede constituir una alternativa posible para la terapia génica TK, en el tratamiento de ciertos tipos de tumores pituitarios como los prolactinomas.

Otro tipo de vectores usados para la transferencia génica en la glándula pituitaria corresponde a los **derivados de herpes virus simple de tipo 1 (HSV-1)**. Es virus ADN de doble banda con una cubierta derivada de la célula huésped. El virus tiene 38 genes que no son esenciales para el ciclo viral y pueden ser deletados, generando vectores recombinantes con suficiente espacio para clonar más de 1 transgén o secuencias reguladoras usadas como promotores específicos. El HSV-1 puede establecer dos tipos de infecciones: ciclo lítico o, en algunas neuronas, estado de latencia. El ciclo lítico está caracterizada por efecto citopático, en parte debido a defectos en las proteínas de las células infectadas, codificadas mediante genes tempranos. Una de estas proteínas, la PCI4, es el principal factor implicado en la transición de una fase temprana inmediata a una fase temprana del ciclo lítico. En estado de latencia, hay muy bajo nivel de transcripción de genes que resulta en niveles disminuidos de los ARNs virales de latencia asociados (Roizman, 1996). Hay dos tipos de vectores derivados de **HSV-1: amplificones y virus recombinantes**. En los últimos, el transgén es clonado dentro del genoma del HSV-1 (Wolfe y col., 1999). Hay dos tipos principales de éstos, denominados vectores derivados de HSV-1 de **primera y segunda generación**. Los vectores de primera generación tienen una mutación o delección en el gen esencial. El ejemplo relevante de estos vectores es el *tsK* que es el único tipo de vector derivado de HSV usado en la glándula pituitaria. Este vector es un mutante del HSV-1, sensible a la temperatura, con

cloned within an adenoviral vector RAd-(PFV/TK)_{fus}, which successfully transduced *in vivo* rat experimental pituitary adenomas. Human gonadotrope and somatotrope adenomatous cells were transduced *in vitro* by using a vector derived from human immunodeficiency virus (HIV)-type 1 which stimulated GFP gene under the control of phosphoglycerate kinase promoter (Roche et al., 2004). Initial studies with vectors derived from adenovirus and herpes virus demonstrated that both vector systems may be efficiently used to transfer different types of genes into cell in primary cultures, such as corticotrope tumoral lines AtT₂₀ and mammosomatotrope GH₃ of the rat normal anterior pituitary (Castro et al., 1997; Goya et al., 1998 y 2004). It is worth noticing that adenohipofyseal neoplastic cells were more susceptible to transduction mediated by vectors than to normal cells.

Lentiviruses are RNA viruses considered to be advantageous since they are integrators. In order to obtain high titers of retroviral vectors in experimental or therapeutical applications, they have been designed by means of genetic engineering to produce viral proteins that prevent the formation of replicative-defective particles. In this way, vectors are produced that can transmit therapeutic genes, but that cannot replicate in the target cells. The ability to incorporate to the host allows the therapeutic gene to be always present in the genome of infected cells, which can be passed on to future generations of these cells. The stable integration of genes transported by the retrovirus in the host cell genome results in a long-term expression, which in some cases exceeds the year. Some characteristics should be considered before selecting a retrovirus for gene therapy. First, the integration of the vector into the host cell genome is a random process. This aleatory process might result in mutagenesis with oncogene activation or inactivation of tumor suppressing genes. However, up to this moment, there is no documentation of malign transformation as consequence of the use of these vectors in humans. Secondly, large scale production of retroviral vectors necessary for the *in vivo*

un punto de mutación en el gen IE3 para impedir el proceso de replicación a 37° C, pero no a 31° C. El gen IE3 fue elegido porque su producto proteico: el PCI4 que es el principal activador *trans* de genes tempranos, y consecuentemente, la expresión viral temprana y tardía de genes está reducida cuando el IE3 está inactivo. Los transgenes son clonados en el locus de la timidina kinasa (TK) bajo el control del promotor activo HSV-1 IE. Los revertientes salvajes se originan con relativa frecuencia durante la preparación y contaminan las reservas virales con virus de replicación competentes. Una característica negativa de los vectores herpes derivados de la primera generación es su citotoxicidad que nace al expresar genes virales tóxicos (Tomasec y col., 1996). Los vectores recombinantes de segunda generación tienen deleciones en más de 1 gen, lo que los hace más citotóxicos y, por ello, no han sido usados en la glándula pituitaria.

El híbrido ADNc codifica una proteína quimérica correspondiente al HSV1-TK y fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) que retiene la actividad TK suicida (Paquin y col., 2001). El mismo fue clonado dentro de un vector adenoviral, denominado RAD-(PFV/TK)^{fus}, que transdujo con éxito en los adenomas pituitarios experimentales de ratas *in vivo*. Las células adenomatosas gonadotropas y somatotropas humanas fueron transducidas *in vitro* usando un vector derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)-tipo 1 que estimuló el gen de la GFP bajo el promotor de la fosfoglicerato kinasa (Roche y col., 2004). Estudios iniciales con los vectores derivados de los adenovirus y herpes virus demostraron que los dos sistemas de vectores pueden ser usados eficientemente para transferir diferentes tipos de genes a las células en cultivos primarios, como las líneas tumorales corticotropa AtT₂₀ y la mammosomatotropa GH₃ de la pituitaria anterior normal de rata (Castro y col., 1997; Goya y col., 1998 y 2004). Es de remarcar, que las células neoplásicas adenohipofisarias fueron más susceptibles a la transducción mediada por vectores que las células normales.

Los **lentivirus** son retrovirus complejos que tienen la capacidad de infectar y expresar sus genes en células mitóticas y post-mitóticas.

treatment of solid tumors might result in the generation of retroviruses with the ability of replication or infection.

Lentiviruses are complex retroviruses that have the ability to infect and express their genes in mitotic and post-mitotic cells. The most common is the human immunodeficiency virus (HIV). After the extraction of the infectious and replicative particles this derived vector is transfected. Lentiviruses possess an additional advantage due to their ability to transduce to mitotic and resting cells (Blesch, 2004; Vogel et al., 2004). However, the disadvantage exists of the possibility of insertional mutagenesis when integration takes place within the oncogene, which can result in cancer (Li et al., 2002; Thomas et al., 2003). With lentiviruses, recombination may unfortunately infect patients with HIV. However, these vectors have been constructed in such a way that recombination is an insignificant possibility.

Different preclinical assays have been successfully applied using different criteria of gene therapy for the treatment of diseases of the anterior hypophysis, but the development of a more specific expression of therapeutic transgenes and more efficient viral adenovectors is needed (Seilicovich et al., 2005).

Gene therapy in pituitary tumors might be used in combination with conventional therapies, since it provides the possibility of applying directed receptors that may modify the signal transduction pathways and tumorigenesis mechanisms.

References

- Aoki T, Kato S, Fox JC, Okamoto K, Sakata K, Morimatsu M, Shigemori M. Inhibition of autocrine fibroblast growth factor signaling by the adenovirus-mediated expression of an antisense transgene or a dominant negative receptor in human glioma cells in vitro. *Int J Oncol* 2002; 21(3):629-636.

El más conocido es el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Luego de la extracción de las partículas infectantes y replicativas este vector derivado es transfectado. Los lentivirus tienen una ventaja adicional debido a su habilidad para transducir a células en división y en reposo (Blesch, 2004; Vogel y col., 2004), pero existe una desventaja que es la posibilidad de mutagénesis insercional, al hacerse una integración dentro del oncogén que puede llevar al cáncer (Li y col., 2002; Thomas y col., 2003). Con los lentivirus, el temor es que la recombinación lleve a la infección en pacientes con terapia HIV. Sin embargo, estos vectores han sido construidos de tal modo que la recombinación es una posibilidad despreciable.

Se han aplicado con éxito diferentes ensayos preclínicos que utilizan diferentes criterios de terapia génica para el tratamiento de enfermedades de la hipófisis anterior, pero todavía se requiere el desarrollo de una expresión más específica de transgenes terapéuticos y de vectores virales más eficientes (Seilicovich y col., 2005).

La terapia génica de los tumores pituitarios podría ser utilizada en combinación con las terapias convencionales, ya que aporta la posibilidad de aplicar receptores dirigidos que modifiquen las vías de transducción de señales y los mecanismos tumorogénicos.

Referencias

Aoki T, Kato S, Fox JC, Okamoto K, Sakata K, Morimatsu M, Shigemori M. Inhibition of autocrine fibroblast growth factor signaling by the adenovirus-mediated expression of an antisense transgene or a dominant negative receptor in human glioma cells in vitro. *Int J Oncol* 2002; 21(3):629-636.

Bakhtiar A, Sayyad M, Rosli R, Maruyama A, Chowdhury EH. Intracellular delivery of potencial therapeutic genes: prospects in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2014; 14(4):247-257.

Bakhtiar A, Sayyad M, Rosli R, Maruyama A, Chowdhury EH. Intracellular delivery of potencial therapeutic genes: prospects in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2014; 14(4):247-257.

Balakrishnan B, Jayandharan GR. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 2014; 14(2):86-100.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275(5304):1320-23.

Blesch A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* 2004; 33(2):164-172.

Bolognani F, Albariño C, Romanowski V, Carri NG, Goya RG. In vitro and in vivo herpetic vector-mediated gene transfer in the pituitary gland: impact on hormone secretion. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(4):497-503.

Burek JD. Pathology of aging rats. In. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1978.

Candolfi M, Jaita G, Pisera D, Ferrari L, Barcia C, Liu C, Yu J, Liu G, Castro MG, Seilicovich A. Adenoviral vectors encoding tumor necrosis factor-alpha and FasL induce apoptosis of normal and tumoral anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 2006; 189(3):681-690.

Carri NG, Sosa YE, Brown OA, Albariño C, Romanowski V, Goya RG. Studies on in vivo gene transfer in pituitary tumors using herpes-derived and adenoviral vectors. *Brain Res Bull* 2005; 65(1):17-22.

Castro MG, Candolfi M, Wilson TJ, Calinescu A, Paran C, Kamran N, Koschmann C, Moreno-Ayala MA, Assi H, Lowenstein PR. Adenoviral vector-mediated gene therapy for gliomas: coming of age. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14(9):1241-57.

Castro MG, Goya RG, Sosa YE, Rowe J, Larregina AT, Morelli AE, Lowenstein PR. Expression of transgenes in normal and neoplastic

Balakrishnan B, Jayandharan GR. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 2014; 14(2):86-100.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275(5304):1320-23.

Blesch A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* 2004; 33(2):164-172.

Bolognani F, Albariño C, Romanowski V, Carri NG, Goya RG. In vitro and in vivo herpetic vector-mediated gene transfer in the pituitary gland: impact on hormone secretion. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(4):497-503.

Burek JD. Pathology of aging rats. In. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1978.

Candolfi M, Jaita G, Pisera D, Ferrari L, Barcia C, Liu C, Yu J, Liu G, Castro MG, Seilicovich A. Adenoviral vectors encoding tumor necrosis factor-alpha and FasL induce apoptosis of normal and tumoral anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 2006; 189(3):681-690.

Carri NG, Sosa YE, Brown OA, Albariño C, Romanowski V, Goya RG. Studies on in vivo gene transfer in pituitary tumors using herpes-derived and adenoviral vectors. *Brain Res Bull* 2005; 65(1):17-22.

Castro MG, Candolfi M, Wilson TJ, Calinescu A, Paran C, Kamran N, Koschmann C, Moreno-Ayala MA, Assi H, Lowenstein PR. Adenoviral vector-mediated gene therapy for gliomas: coming of age. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14(9):1241-57.

Castro MG, Goya RG, Sosa YE, Rowe J, Larregina AT, Morelli AE, Lowenstein PR. Expression of transgenes in normal and neoplastic anterior pituitary cells using recombinant adenoviruses: long term expression, cell cycle dependency, and effects on hormone secretion. *Endocrinology* 1997; 138(5):2184-94.

anterior pituitary cells using recombinant adenoviruses: long term expression, cell cycle dependency, and effects on hormone secretion. *Endocrinology* 1997; 138(5):2184-94.

Castro MG, Southgate T, Lowenstein PR. Molecular therapy in a model of neuroendocrine disease: developing clinical gene therapy for pituitary tumours. *Trends Endocrinol Metab* 2001, 12(2):58-64.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna CG, Bracamonte MI, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13-18.

Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna CG, Ferese C, Goya RG. Effect of insulin-like growth factor-I gene therapy on somatotrophic axis in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(1):20-26.

D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.

Davis JR, McMahan RF, Lowenstein PR, Castro MG, Lincoln GA, McNeilly AS. Adenovirus-mediated gene transfer in the ovine pituitary gland is associated with hypophysitis. *J Endocrinol* 2002; 173(2):265-271.

Davis JR, McVerry J, Lincoln GA, Windeatt S, Lowenstein PR, Castro MG, McNeilly AS. Cell type-specific adenoviral transgene expression in the intact ovine pituitary gland after stereotaxic delivery: an in vivo system for long-term multiple parameter evaluation of human pituitary gene therapy. *Endocrinology* 2001; 142(2):795-801.

Ding W, Li Y, Hou X, Li T. Bleomycin A6-loaded anionic liposomes with in situ gel as a new antitumoral drug delivery system. *Drug Deliv* 2014; 20:1-7.

- Castro MG, Southgate T, Lowenstein PR. Molecular therapy in a model of neuroendocrine disease: developing clinical gene therapy for pituitary tumours. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(2):58-64.
- Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna CG, Bracamonte MI, Goya RG. Insulin-like growth factor-I gene therapy reverses morphologic changes and reduces hyperprolactinemia in experimental rat prolactinomas. *Mol Cancer* 2008; 7:13-18.
- Cónsole GM, Hereñú CB, Camihort GA, Luna CG, Ferese C, Goya RG. Effect of insulin-like growth factor-I gene therapy on somatotrophic axis in experimental prolactinomas. *Cells Tissues Organs* 2009; 190(1):20-26.
- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(3):935-939.
- Davis JR, McMahon RE, Lowenstein PR, Castro MG, Lincoln GA, McNeilly AS. Adenovirus-mediated gene transfer in the ovine pituitary gland is associated with hypophysitis. *J Endocrinol* 2002; 173(2):265-271.
- Davis JR, McVerry J, Lincoln GA, Windeatt S, Lowenstein PR, Castro MG, McNeilly AS. Cell type-specific adenoviral transgene expression in the intact ovine pituitary gland after stereotaxic delivery: an in vivo system for long-term multiple parameter evaluation of human pituitary gene therapy. *Endocrinology* 2001; 142(2):795-801.
- Ding W, Li Y, Hou X, Li T. Bleomycin A6-loaded anionic liposomes with in situ gel as a new antitumoral drug delivery system. *Drug Deliv* 2014; 20:1-7.
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101(3):613-619.
- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 2004; 101(3):613-619.
- Fei LN, Wang QZ, Xu RA. Combinatorial RNAi and its application in cancer gene therapy. *Yao Xue Xue Bao* 2012; 47(5):573-579.
- Freese A, During MJ, Davidson BL, Gennarelli TA, Kaplitt MG, Flamm ES, Snyder PJ. Transfection of human lactotroph adenoma cells with an adenovirus vector expressing tyrosine hydroxylase decreases prolactin release. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(6):2401-04.
- Fukuoka H, Takahashi Y. The role of genetic and epigenetic changes in pituitary tumorigenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014; 54(12):943-957.
- Geddes BJ, Harding TC, Hughes DS, Byrnes AP, Lightman SL, Conde G, Uney JB. Persistent transgene expression in the hypothalamus following stereotaxic delivery of a recombinant adenovirus: suppression of the immune response with cyclosporin. *Endocrinology* 1996; 137(11):5166-69.
- Ghanbari JA, Salehi M, Zadeh AK, Zadeh SM, Beigi VB, Ahmad HK, Mahaki B, Beiraghdar M. A preliminary step of a novel strategy in suicide gene therapy with lentiviral vector. *Adv Biomed Res* 2014; 3:7.
- Gilboa E. Retroviral gene transfer: applications to human therapy. *Adv Exp Med Biol* 1988; 241:29-33.
- Goins WF, Huang S, Cohen JB, Glorioso JC. Engineering HSV-1 vectors for gene therapy. *Methods Mol Biol* 2014; 1144:63-79.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(12):5547-51.
- Goya RG, Rowe J, Sosa YE, Tomasec P, Lowenstein PR, Castro MG. Use of recombinant herpes simplex virus type I vectors for gene transfer

Fei LN, Wang QZ, Xu RA. Combinatorial RNAi and its application in cancer gene therapy. *Yao Xue Xue Bao* 2012; 47(5):573-579.

Freese A, During MJ, Davidson BL, Gennarelli TA, Kaplitt MG, Flamm ES, Snyder PJ. Transfection of human lactotroph adenoma cells with an adenovirus vector expressing tyrosine hydroxylase decreases prolactin release. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(6):2401-04.

Fukuoka H, Takahashi Y. The role of genetic and epigenetic changes in pituitary tumorigenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014; 54(12):943-957.

Geddes BJ, Harding TC, Hughes DS, Byrnes AP, Lightman SL, Conde G, Uney JB. Persistent transgene expression in the hypothalamus following stereotaxic delivery of a recombinant adenovirus: suppression of the immune response with cyclosporin. *Endocrinology* 1996; 137(11):5166-69.

Ghanbari JA, Salehi M, Zadeh AK, Zadeh SM, Beigi VB, Ahmad HK, Mahaki B, Beiraghdar M. A preliminary step of a novel strategy in suicide gene therapy with lentiviral vector. *Adv Biomed Res* 2014; 3:7.

Gilboa E. Retroviral gene transfer: applications to human therapy. *Adv Exp Med Biol* 1988; 241:29-33.

Goins WF, Huang S, Cohen JB, Glorioso JC. Engineering HSV-1 vectors for gene therapy. *Methods Mol Biol* 2014; 1144:63-79.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(12):5547-51.

Goya RG, Rowe J, Sosa YE, Tomasec P, Lowenstein PR, Castro MG. Use of recombinant herpes simplex virus type I vectors for gene transfer into tumour and normal anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 139(1-2):199-207.

Goya RG, Sarkar DK, Brown OA, Hereñu CB. Potential of gene therapy for treatment of pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 2004; 4(1):79-87.

Halper J, Parnel PG, Carter BJ, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.

into tumour and normal anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 139(1-2):199-207.

Goya RG, Sarkar DK, Brown OA, Hereñu CB. Potential of gene therapy for treatment of pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 2004; 4(1):79-87.

Halper J, Parnel PG, Carter BJ, Ren P, Scheithauer BW. Presence of growth factors in human pituitary. *Lab Invest* 1992; 66(5):639-645.

Han L, Wu C, Riaz H, Bai L, Chen J, Zhen Y, Guo A, Yang L. Characterization of the mechanism of inhibin α -subunit gene in mouse anterior pituitary cells by RNA interference. *PLoS One* 2013; 8(10): E74596.

Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P, Crystal RG. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1999; 103(4):579-587.

Hitt M, Bett AJ, Addisson CL, Prevec L, Graham FL. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Meth Mol Gen* 1995; 7:13-30.

Hoganson DK, Batra RK, Olsen JC, Boucher RC. Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(6):1315-23.

Houben H, Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.

Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; 9(4):1021-27.

Hubert CG, Bradley RK, Ding Y, Toledo CM, Herman J, Skutt-Kakaria K, Girard EJ, Davison J, Bernt J, Corrin P, Hardcastle J, Basom R, Delrow JJ, Webb T, Pollard SM, Lee J, Olson JM, Paddison PJ. Geno-

Han L, Wu C, Riaz H, Bai L, Chen J, Zhen Y, Guo A, Yang L. Characterization of the mechanism of inhibin α -subunit gene in mouse anterior pituitary cells by RNA interference. *PLoS One* 2013; 8(10): E74596.

Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P, Crystal RG. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1999; 103(4):579-587.

Hitt M, Bett AJ, Addisson CL, Prevec L, Graham FL. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Meth Mol Gen* 1995; 7:13-30.

Hoganson DK, Batra RK, Olsen JC, Boucher RC. Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(6):1315-23.

Houben H, Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 1994; 15(3):547-582.

Hu N, Gutsmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994; 9(4):1021-27.

Hubert CG, Bradley RK, Ding Y, Toledo CM, Herman J, Skutt-Kakaria K, Girard EJ, Davison J, Bernt J, Corrin P, Hardcastle J, Basom R, Delrow JJ, Webb T, Pollard SM, Lee J, Olson JM, Paddison PJ. Genome-wide RNAi screens in human brain tumor isolates reveal a novel viability requirement for PHF5A. *Genes Dev* 2013; 27(9):1032-45.

Ideguchi M, Kajiwaru K, Yoshikawa K, Uchida T, Ito H. Local adenovirus-mediated CTLA4-immunoglobulin expression suppresses the immune responses to adenovirus vectors in the brain. *Neuroscience* 2000; 95(1):217-226.

me-wide RNAi screens in human brain tumor isolates reveal a novel viability requirement for PHF5A. *Genes Dev* 2013; 27(9):1032-45.

Ideguchi M, Kajiwaru K, Yoshikawa K, Uchida T, Ito H. Local adenovirus-mediated CTLA4-immunoglobulin expression suppresses the immune responses to adenovirus vectors in the brain. *Neuroscience* 2000; 95(1):217-226.

Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona V, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury NR, Chowdhury JR. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997; 99(5):1098-1106.

Jain KK. *Textbook of gene therapy*. In: Hogrefe and Huber publishers, Seattle, 1998.

Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Murauchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444(3):319-324.

Kohn DB, Kantoff PW, Eglitis MA, McLachlin JR, Moen RC, Karson E, Zwiebel JA, Nienhuis A, Karlsson S, O'Reilly R, et al. Retroviral-mediated gene transfers into mammalian cells. *Blood Cells* 1987; 13(1-2):285-298.

Lee EJ, Anderson LM, Thimmapaya B, Jameson JL. Targeted expression of toxic genes directed by pituitary hormone promoters: a potential strategy for adenovirus-mediated gene therapy of pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999a; 84(2):786-794.

Lee EJ, Duan WR, Jakacka M, Gehm BD, Jameson JL. Dominant negative ER induces apoptosis in GH pituitary lactotrope cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Endocrinology* 2001a; 142(9):3756-63.

Lee EJ, Jameson JL. Cell-specific Cre-mediated activation of the diphtheria toxin gene in pituitary tumor cells: potential for cytotoxic gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002; 13(4):533-542.

- Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona V, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury NR, Chowdhury JR. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 1997; 99(5):1098-1106.
- Jain KK. Textbook of gene therapy. In: Hogrefe and Huber publishers, Seattle, 1998.
- Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444(3):319-324.
- Kohn DB, Kantoff PW, Eglitis MA, McLachlin JR, Moen RC, Karson E, Zwiebel JA, Nienhuis A, Karlsson S, O'Reilly R, et al. Retroviral-mediated gene transfers into mammalian cells. *Blood Cells* 1987; 13(1-2):285-298.
- Lee EJ, Anderson LM, Thimmapaya B, Jameson JL. Targeted expression of toxic genes directed by pituitary hormone promoters: a potential strategy for adenovirus-mediated gene therapy of pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999a; 84(2):786-794.
- Lee EJ, Duan WR, Jakacka M, Gehm BD, Jameson JL. Dominant negative ER induces apoptosis in GH pituitary lactotrope cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Endocrinology* 2001a; 142(9):3756-63.
- Lee EJ, Jameson JL. Cell-specific Cre-mediated activation of the diphtheria toxin gene in pituitary tumor cells: potential for cytotoxic gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002; 13(4):533-542.
- Lee EJ, Martinson F, Kotlar T, Thimmapaya B, Jameson JL. Adenovirus-mediated targeted expression of toxic genes to adrenocorticotropin-producing pituitary tumors using the proopiomelanocortin promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001b; 86(7):3400-09.
- Lee EJ, Thimmapaya B, Jameson JL. Stereotactic injection of adenoviral vectors that target gene expression to specific pituitary cell types: implications for gene therapy. *Neurosurgery* 2000; 46(6):1461-68.
- Lee EJ, Martinson F, Kotlar T, Thimmapaya B, Jameson JL. Adenovirus-mediated targeted expression of toxic genes to adrenocorticotropin-producing pituitary tumors using the proopiomelanocortin promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001b; 86(7):3400-09.
- Lee EJ, Thimmapaya B, Jameson JL. Stereotactic injection of adenoviral vectors that target gene expression to specific pituitary cell types: implications for gene therapy. *Neurosurgery* 2000; 46(6):1461-68.
- Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296(5567):497.
- Little MD, Shalet SM, Beardwell CG, Ahmed SR, Applegate G, Sutton ML. Hypopituitarism following external radiotherapy for pituitary tumours in adults. *Q J Med* 1989; 70(262):145-160.
- Mahoney DJ, Stojdl DF. Functional genomic screening to enhance oncolytic virotherapy. *Br J Cancer* 2013; 108(2):245-249.
- Miller AD. Retroviral vector production. *Curr Protoc Hum Genet* 2014; 80: Unit 12.5.
- Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology* 2014; 66(6):1031-38.
- O'Reilly MS, Bohem T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2):277-285.
- Paquin A, Jaalouk DE, Galipeau J. Retrovector encoding a green fluorescent protein-herpes simplex virus thymidine kinase fusion protein serves as a versatile suicide/reporter for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther* 2001; 12(1):13-23.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper vi-

- Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296(5567):497.
- Littley MD, Shalet SM, Beardwell CG, Ahmed SR, Applegate G, Sutton ML. Hypopituitarism following external radiotherapy for pituitary tumours in adults. *Q J Med* 1989; 70(262):145-160.
- Mahoney DJ, Stojdl DF. Functional genomic screening to enhance oncolytic virotherapy. *Br J Cancer* 2013; 108(2):245-249.
- Miller AD. Retroviral vector production. *Curr Protoc Hum Genet* 2014; 80: Unit 12.5.
- Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology* 2014; 66(6):1031-38.
- O'Reilly MS, Bohem T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2):277-285.
- Paquin A, Jaalouk DE, Galipeau J. Retrovector encoding a green fluorescent protein-herpes simplex virus thymidine kinase fusion protein serves as a versatile suicide/reporter for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther* 2001; 12(1):13-23.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24):13565-70.
- Parks RJ, Graham FL. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol* 1997; 71(4):3293-98.
- Pazarentzos E, Mazarakis ND. Anticancer gene transfers for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 2014; 818:255-280.
- rus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24):13565-70.
- Parks RJ, Graham FL. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol* 1997; 71(4):3293-98.
- Pazarentzos E, Mazarakis ND. Anticancer gene transfers for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol* 2014; 818:255-280.
- Prel A, Sensebe L, Pages JC. Influence of untranslated regions on retroviral mRNA transfer and expression. *BMC Biotechnol* 2013; 13:35.
- Riley DJ, Nikitin AY, Lee WH. Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb+/- mice. *Nat Med* 1996; 2(12):1316-21.
- Roche C, Zamora AJ, Taieb D, Lavaque E, Rasolonjanahary R, Dufour H, Bagnis C, Enjalbert A, Barlier A. Lentiviral vectors efficiently transduce human gonadotroph and somatotroph adenomas in vitro. Targeted expression of transgene by pituitary hormone promoters. *J Endocrinol* 2004; 183(1):217-233.
- Rodríguez S, Castro M, Brown O, Goya R, Cónsole G. Gene therapy of the treatment of pituitary tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2009; 4(4):359-370.
- Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21):11307-12.
- Sajeesh S, Lee TY, Hong SW, Dua P, Choe JY, Kang A, Yun WS, Song C, Park SH, Kim S, Li C, Lee DK. Long dsRNA-mediated RNA interference and immunostimulation: a targeted delivery approach using polyethyleneimine based nano-carriers. *Mol Pharm* 2014; 11(3):872-884.
- Segura MM, Mangion M, Gaillet B, Garnier A. New developments in lentiviral vector design, production and purification. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(7):987-1011.

- Prel A, Sensebe L, Pages JC. Influence of untranslated regions on retroviral mRNA transfer and expression. *BMC Biotechnol* 2013; 13:35.
- Riley DJ, Nikitin AY, Lee WH. Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph tumors in Rb+/- mice. *Nat Med* 1996; 2(12):1316-21.
- Roche C, Zamora AJ, Taieb D, Lavaque E, Rasolonjanahary R, Dufour H, Bagnis C, Enjalbert A, Barlier A. Lentiviral vectors efficiently transduce human gonadotroph and somatotroph adenomas in vitro. Targeted expression of transgene by pituitary hormone promoters. *J Endocrinol* 2004; 183(1):217-233.
- Rodríguez S, Castro M, Brown O, Goya R, Cónsole G. Gene therapy of the treatment of pituitary tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2009; 4(4):359-370.
- Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21):11307-12.
- Sajeesh S, Lee TY, Hong SW, Dua P, Choe JY, Kang A, Yun WS, Song C, Park SH, Kim S, Li C, Lee DK. Long dsRNA-mediated RNA interference and immunostimulation: a targeted delivery approach using polyethyleneimine based nano-carriers. *Mol Pharm* 2014; 11(3):872-884.
- Segura MM, Mangion M, Gaillet B, Garnier A. New developments in lentiviral vector design, production and purification. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(7):987-1011.
- Seilicovich A, Pisera D, Sciascia SA, Candolfi M, Puntel M, Xiong W, Jaita G, Castro MG. Gene therapy for pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 2005; 5(6):559-572.
- Short MP, Choi BC, Lee JK, Malick A, Breakefield XO, Martuza RL. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res* 1990; 27(3):427-439.
- Seilicovich A, Pisera D, Sciascia SA, Candolfi M, Puntel M, Xiong W, Jaita G, Castro MG. Gene therapy for pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 2005; 5(6):559-572.
- Short MP, Choi BC, Lee JK, Malick A, Breakefield XO, Martuza RL. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res* 1990; 27(3):427-439.
- Smith-Arica JR, Williams JC, Stone D, Smith J, Lowenstein PR, Castro MG. Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology* 2001; 142(6):2521-32.
- Southgate TD, Stone D, Williams JC, Lowenstein PR, Castro MG. Long-term transgene expression within the anterior pituitary gland in situ: impact on circulating hormone levels, cellular and antibody-mediated immune responses. *Endocrinology* 2001; 142(1):464-476.
- Southgate TD, Windeatt S, Smith-Arica J, Gerdes CA, Perone MJ, Morris I, Davis JR, Klastzmann D, Lowenstein PR, Castro MG. Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombinant adenovirus vectors in vitro and in vivo in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic anterior pituitaries. *Endocrinology* 2000; 141(9):3493-3505.
- Stovall DB, Wan M, Zhang Q, Dubey P, Sui G. DNA vector-based RNA interference to study gene function in cancer. *J Vis Exp* 2012; 4(64): E4129.
- Tang DC, De Vit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356(6365):152-154.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4(5):346-358.
- Tomasec P, Bain D, Castro MG, Preston CM, Lowenstein PR. Herpes simplex virus temperature-sensitive mutant tsK as a vector

- Smith-Arica JR, Williams JC, Stone D, Smith J, Lowenstein PR, Castro MG. Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology* 2001; 142(6):2521-32.
- Southgate TD, Stone D, Williams JC, Lowenstein PR, Castro MG. Long-term transgene expression within the anterior pituitary gland in situ: impact on circulating hormone levels, cellular and antibody-mediated immune responses. *Endocrinology* 2001; 142(1):464-476.
- Southgate TD, Windeatt S, Smith-Arica J, Gerdes CA, Perone MJ, Morris I, Davis JR, Klastzmann D, Lowenstein PR, Castro MG. Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombinant adenovirus vectors in vitro and in vivo in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic anterior pituitaries. *Endocrinology* 2000; 141(9):3493-3505.
- Stovall DB, Wan M, Zhang Q, Dubey P, Sui G. DNA vector-based RNA interference to study gene function in cancer. *J Vis Exp* 2012; 4(64): E4129.
- Tang DC, De Vit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356(6365):152-154.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4(5):346-358.
- Tomasec P, Bain D, Castro MG, Preston CM, Lowenstein PR. Herpes simplex virus temperature-sensitive mutant tsK as a vector for neuronal gene transfer. In: *Protocols for gene transfer in neuroscience: Towards gene therapy of neurological disorders*. In: Lowenstein PR, Enquist LW, eds. Wiley, Chichester, UK, 1996:169-186.
- Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet, J. A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 2004; 15(2):157-165.
- for neuronal gene transfer. In: *Protocols for gene transfer in neuroscience: Towards gene therapy of neurological disorders*. In: Lowenstein PR, Enquist LW, eds. Wiley, Chichester, UK, 1996:169-186.
- Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet, J. A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 2004; 15(2):157-165.
- Webster J, Ham J, Bevan JS, Scanlon MF. Growth factors and pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab* 1989; 1(2):95-98.
- Wei F, Wang H, Chen X, Li C, Huang Q. Dissecting the roles of E1A and E1B in adenoviral replication and RCAd-enhanced RAd transduction efficacy on tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(10):1358-66.
- Williams JC, Stone D, Smith-Arica JR, Morris ID, Lowenstein PR, Castro MG. Regulated adenovirus-mediated delivery of tyrosine hydroxylase suppresses growth of estrogen-induced pituitary prolactinomas. *Mol Ther* 2001, 4(6):593-602.
- Windeatt S, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, Maleniak TC, Morris ID, Goya RG, Klastzmann D, Lowenstein PR, Castro MG. Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 85(3):1296-1305.
- Wolfe D, Goins WF, Yamada M, Moriuchi S, Krisky DM, Oligino TJ, Marconi PC, Fink DJ, Glorioso JC. Engineering herpes simplex virus vectors for CNS applications. *Exp Neurol* 1999; 159(1):34-46.
- Yan R, Hallam A, Stockley PG, Boyes J. Oncogene dependency and the potential of targeted RNAi-based anti-cancer therapy. *Biochem J* 2014; 461(1): 1-13.
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10):4407-11.

Webster J, Ham J, Bevan JS, Scanlon MF. Growth factors and pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab* 1989; 1(2):95-98.

Wei F, Wang H, Chen X, Li C, Huang Q. Dissecting the roles of E1A and E1B in adenoviral replication and RCAd-enhanced RDAd transduction efficacy on tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(10):1358-66.

Williams JC, Stone D, Smith-Arica JR, Morris ID, Lowenstein PR, Castro MG. Regulated adenovirus-mediated delivery of tyrosine hydroxylase suppresses growth of estrogen-induced pituitary prolactinomas. *Mol Ther* 2001, 4(6):593-602.

Windeatt S, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, Maleniak TC, Morris ID, Goya RG, Klatzmann D, Lowenstein PR, Castro MG. Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 85(3):1296-1305.

Wolfe D, Goins WF, Yamada M, Moriuchi S, Krisky DM, Oligino TJ, Marconi PC, Fink DJ, Glorioso JC. Engineering herpes simplex virus vectors for CNS applications. *Exp Neurol* 1999; 159(1):34-46.

Yan R, Hallam A, Stockley PG, Boyes J. Oncogene dependency and the potential of targeted RNAi-based anti-cancer therapy. *Biochem J* 2014; 461(1): 1-13.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10):4407-11.

Zahn P, Jiang Q, Wang ZG, Li N, Yu H, Ding B. DNA nanostructure-based imaging probes and drug carriers. *Chem Med Chem* 2014; 9(9):2013-20.

Zhang Q, Jiang Q, Li N, Dai L, Liu Q, Song L, Wang J, Li Y, Tian J, Ding B, Du Y. DNA origami as in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS Nano* 2014; 8(7):6633-43.

Zong T, Mei L, Gao H, Cai W, Zhu P, Shi K, Chen J, Wang Y, Gao F, He Q. Synergistic dual-ligand Doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Mol Pharm* 2014; 11(7):2346-57.

Zahn P, Jiang Q, Wang ZG, Li N, Yu H, Ding B. DNA nanostructure-based imaging probes and drug carriers. *Chem Med Chem* 2014; 9(9):2013-20.

Zhang Q, Jiang Q, Li N, Dai L, Liu Q, Song L, Wang J, Li Y, Tian J, Ding B, Du Y. DNA origami as in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS Nano* 2014; 8(7):6633-43.

Zong T, Mei L, Gao H, Cai W, Zhu P, Shi K, Chen J, Wang Y, Gao F, He Q. Synergistic dual-ligand Doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Mol Pharm* 2014; 11(7):2346-57.

La obra **Glándula hipofisaria: morfología normal y patológica** integra y actualiza las investigaciones morfológicas normales y patológicas del eje hipotálamo-hipofisario desarrolladas en el Laboratorio de Investigaciones Neuroendocrinas de la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (período 1990-2016).

Los estudios morfológicos de la glándula pituitaria aportan una revisión de la embriología molecular, la histología óptica y ultraestructural de las diferentes poblaciones hipofisarias, las interacciones paracrinas adenohipofisarias y la fisiología del eje hipotálamo-hipofisario.

En los diferentes capítulos se presentan los estudios colaborativos con equipos de investigación dirigidos por reconocidos especialistas en el campo de la Neuroendocrinología que aportaron aspectos bioquímicos, fisiológicos y de terapia génica neuroendocrina. Se abordan diversos diseños experimentales: envejecimiento, malnutrición, obesidad por denervación hipotalámica, fotoperíodos, antiandrógenos no esteroides, sialilación de la hormona folículo-estimulante, retardo del crecimiento intrauterino, isoformas de prolactina y numerosos ensayos de terapia génica con el factor neurotrófico insulino similar tipo I (IGF-I) aplicados al eje timo-pituitario, a los prolactinomas experimentales y a los procesos de neurodegeneración, utilizando adenovectores de última generación.

Además, se aporta una caracterización morfológico-funcional de los adenomas hipofisarios y una actualización de las estrategias terapéuticas, haciendo énfasis en los promisorios ensayos con terapia génica experimental.

Gloria Cónsole-Avegliano es profesora titular e investigadora de la Cátedra B de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina