



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN DE LA DINÁMICA DE CALCIO INTRACELULAR DE LOS PERICITOS  
ADENOHIPOFISIARIOS POR EL FACTOR HIPOTALÁMICO GHRH**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**DIANA CECILIA DEL RÍO VALDÉS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. TATIANA FIORELISIO COLL  
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

- **DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM**
- **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
INST. DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-UNAM**

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN DE LA DINÁMICA DE CALCIO INTRACELULAR DE LOS PERICITOS**

**ADENOHIPOFISIARIOS POR EL FACTOR HIPOTALÁMICO GHRH**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**DIANA CECILIA DEL RÍO VALDÉS**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. TATIANA FIORELISIO COLL

FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM

COMITÉ TUTOR:

- DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM
- DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
INST. DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-UNAM

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/727/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de octubre de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **DEL RÍO VALDÉS DIANA CECILIA** con número de cuenta **406071400** con la tesis titulada **“REGULACIÓN DE LA DINÁMICA DEL CALCIO INTRACELULAR DE LOS PERICITOS ADENOHIPOFISIARIOS POR EL FACTOR HIPOTALÁMICO GHRH”**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. TATIANA FIORELISIO COLL**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Vocal: DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO  
Secretario: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
Suplente: DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ  
Suplente: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”  
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de octubre de 2015

*M del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/grf\*

# Agradecimientos

Durante el tiempo transcurrido para la obtención de este grado académico, hubieron muchas personas e instituciones que me brindaron su apoyo moral, material económico e intelectual, por lo que deseo expresarles mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, y a todo el personal académico y administrativo que labora en este programa.

Al CONACyT por haberme otorgado una beca. Esta tesis fue apoyada por los proyectos de Investigación CONACYT 166430 y por PAPIIT IN222613.

Quiero agradecer a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, miembros de mi Comité Tutor, por dedicar su valioso tiempo al análisis y la discusión de mi proyecto de tesis, y por sus sabias observaciones y críticas constructivas.

## **Agradecimientos a título personal**

No tengo palabras que expresen todo mi cariño y agradecimiento para con mi familia, Marcelino, mis amigos y compañeros. Gracias por su paciencia, compañía, amistad y cariño.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis Felipe Jiménez García, a la Dra. Patricia Rivas Manzano, al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, a la Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez y a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez; por haber revisado y comentado conmigo esta tesis.

Le doy las gracias a la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, quien me ha formado desde la licenciatura, por dirigirme durante el proceso de obtención de este grado. Así mismo, agradezco el apoyo técnico proporcionado por la M. en C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez, el M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo y en especial por el M. en C. José Alfredo Jiménez Medina.

## Dedicatoria

Para Tatiana, quien es una de las personas más generosas, nobles y *multitask* que conozco, la mejor de las amigas, siempre preocupada y ocupada por el bien común y el desarrollo de la ciencia; dotada de la gracia de eliminar correos electrónicos importantes y de querer bonito.

# Índice

Agradecimientos .....	4
Agradecimientos a título personal .....	5
Dedicatoria .....	6
Lista de figuras .....	9
Resumen.....	10
Palabras clave.....	11
Pituitary pericyte´s intracellular calcium dinamic regulation by hypothalamic factor GHRH .....	12
Abstract .....	12
Keywords.....	13
Introducción .....	14
Regulación de la secreción hormonal adenohipofisiaria .....	14
Antecedentes .....	18
Los pericitos y la regulación del flujo sanguíneo.....	23
Hipótesis.....	27
Objetivos .....	28
Objetivo general:.....	28
Objetivos particulares: .....	28
Metodología .....	29
Animales.....	29
Marcaje de capilares y obtención de la glándula.....	29
Obtención de registros de calcio intracelular .....	29
Procesamiento de imágenes y análisis estadístico .....	31
Resultados .....	32
Actividad intrínseca de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos adenohipofisarios .....	32

Efecto de GHRH en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos .....	36
Efecto del NO en la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos hipofisarios.....	38
Discusión .....	40
Conclusión .....	44
Literatura citada .....	45

# Lista de figuras

Figura 1. <i>Esquematación de la secreción hormonal adenohipofisaria</i> _____	17
Figura 2. <i>Factores hipotalámicos como generadores de pulsos hormonales</i> _____	19
Figura 3. <i>Las redes celulares hipofisarias y la sincronización en la respuesta a factores hipotalámicos</i> _____	21
Figura 4. <i>Relación morfológica y funcional de las redes celulares endócrinas y la microcirculación</i> _____	22
Figura 5. <i>Velocidad del flujo sanguíneo y el del diámetro capilar</i> _____	23
Figura 6. <i>Imágenes confocales de inmunotinción triple para marcadores celulares de pericitos</i> _____	24
Figura 7. <i>Actividad contráctil de pericitos y el diámetro capilar</i> _____	25
Figura 8. <i>Propuesta del efecto de GHRH en la producción de NO y en la dinámica de <math>[Ca^{2+}]_i</math> los pericitos</i> _____	27
Figura 9. <i>Perfil de la actividad basal de <math>[Ca^{2+}]_i</math> de pericitos hipofisarios</i> _____	34
Figura 10. <i>Esquematación de la demarcación de la red vascular adenohipofisaria en "Zona 1" y "Zona 2"</i> _____	35
Figura 11. <i>Actividad basal de <math>[Ca^{2+}]_i</math> de pericitos hipofisarios y su distribución en la red vascular</i> _____	36
Figura 12. <i>Efecto de GHRH en la actividad de <math>[Ca^{2+}]_i</math> de pericitos hipofisarios</i> _____	37
Figura 13. <i>Efecto de GHRH en la actividad de <math>[Ca^{2+}]_i</math> de pericitos hipofisarios y su distribución en la red vascular</i> _____	38
Figura 14. <i>Efecto de GHRH en la actividad de <math>[Ca^{2+}]_i</math> de pericitos hipofisarios según el patrón de AE</i> _____	39
Figura 15. <i>Efecto de SNAP en la AE de pericitos hipofisarios</i> _____	40
Figura 16. <i>Efecto de 7-NI en la AE de pericitos hipofisarios</i> _____	41

# Regulación de la dinámica de calcio intracelular de los pericitos adenohipofisarios por el factor hipotalámico GHRH

## Resumen

La unidad hipotálamo-hipófisis integra diversas señales para orquestar la síntesis y secreción hormonal. Estos procesos se deben realizar de forma coordinada, adecuada y oportuna en respuesta a una circunstancia determinada, por lo que se requiere de un sistema de control sumamente preciso.

Tras la llegada de un estímulo, como un factor hipotalámico, miles de células se activan, responden individualmente, y secretan la hormona de manera pulsátil. La información codificada, en la amplitud y frecuencia de los pulsos hormonales, es decodificada por los tejidos blanco para preparar una respuesta biológica apropiada.

Durante muchos años se ha asumido que estos pulsos hormonales son debidos a cambios en las características de la secreción de los factores hipotalámicos. Sin embargo, se ha sugerido la participación conjunta, en esta actividad pulsátil, de otros elementos, como la organización de las poblaciones celulares y su disposición con la red vascular.

Las redes de células endócrinas se encuentran en estrecha asociación con lechos altamente vascularizados por capilares. Este hecho alude la existencia de una íntima relación funcional entre el evento de secreción hormonal y la microcirculación en la hipófisis. Esto implica que, en la formación de los pulsos hormonales participe un elemento más: la dinámica del flujo sanguíneo en la hipófisis.

En la hipófisis están presente un tipo de célula mural con capacidad contráctil, los pericitos. Éstos tienen procesos citoplasmáticos que extienden a lo largo y alrededor de los capilares formando una capa discontinua. Se ha demostrado, en otros tejidos, que los pericitos se contraen/relajan ocasionando el cierre/apertura del capilar en respuesta de ciertos factores vasoactivos, regulando el flujo sanguíneo.

Se ha considerado al óxido nítrico (NO) como el principal regulador del tono vascular. Éste es sintetizado por la enzima NO sintasa (NOS). En la hipófisis, diferentes tipos celulares endócrinos expresan dicha enzima; y varios péptidos, incluyendo los factores hipotalámicos y las hormonas hipofisarias pueden modular la actividad de NOS y el tono vascular. Sin embargo, los mecanismos por los que el NO actúa para disminuir el tono contráctil de los pericitos no han sido del todo esclarecidos.

Los pericitos se postulan como un fuerte candidato para la modulación del flujo sanguíneo, y por ende representar un papel importante en la formación de pulsos hormonales. Por tal motivo, el objetivo de la presente tesis fue conocer cómo está regulada en los pericitos adenohipofisarios la función contráctil, traducida en cambios en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$ , en ausencia y en presencia de un estímulo hipotalámico, por ejemplo el GHRH. Además, si esta

actividad obedece a una disposición particular de los pericitos en relación a la vasculatura en la glándula, y si podría estar regulada por el NO.

Para determinar la actividad intrínseca de calcio intracelular de los pericitos, se registró la actividad de éstas células en condiciones basales (ausencia del estímulo de GHRH). De la serie de imágenes obtenidas, se identificaron dos poblaciones, aquellos que a lo largo del registro presentan cambios en su actividad  $[Ca^{2+}]_i$ , es decir actividad espontánea (AE), y aquellos que no presentan AE, silentes. Además, se identificaron dos tipos de patrones de AE, a los que denominamos Transitorio (T) y No Transitorio (NT).

Con el objetivo de identificar una posible distribución diferencial de los pericitos en la red vascular de la glándula, se decidió demarcar esta red en dos zonas (1 y 2) con base en las características anatómicas de los capilares que las constituyen. En la zona 1 hay más pericitos con AE del tipo NT.

Con el objeto de identificar el efecto que el secretagogo GHRH en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos, se realizaron registros de la actividad de calcio previo y bajo el estímulo de GHRH 100 nm, administrado mediante un sistema de perfusión. Se observó que tras su administración, el GHRH ejerció dos tipos de efectos en los pericitos: inhibición o activación; así mismo, se observaron pericitos en los que no evocó efecto alguno. Con respecto a la zona en la que se ubican, observamos que en la z1 hay más pericitos que se activan, con respecto en la z2, en la cual hay más pericitos que se inhiben.

Con la finalidad de identificar el efecto del NO en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos, se exploraron dos escenarios diametralmente opuestos, es decir, en uno en el que se exacerba la producción de NO mediante la administración de un donador de óxido nítrico (SNAP, 200  $\mu$ M) y otro en el que se reduce la producción de NO al bloquear la NOS (7-NI, 200  $\mu$ M). Se observó que con el donador, más del triple de la población de pericitos que presentaba AE se inhibió. De manera inversa, con el bloqueador de NOS, se triplicó la población de pericitos con AE.

De esta tesis se puede concluir, que los pericitos presentan cambios intrínsecos en su  $[Ca^{2+}]_i$ , que pueden ser de forma transitoria o no transitoria, habiendo una distribución diferencial de los pericitos que las exhiben la actividad del tipo no transitorio dentro de la red vascular adenohipofisaria. Además, los pericitos modifican, activando o inhibiendo su dinámica de actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo GHRH, habiendo una regionalización de pericitos que la activan en la entrada de la glándula y que la inhiben en el resto de la hipófisis. El efecto evocado por el GHRH no está relacionado al tipo de patrón de AE. Además, al estimular/inhibir la producción de óxido nítrico, la población de pericitos con AE se incrementa/disminuye, respectivamente.

## **Palabras clave**

- Pulso hormonal
- Regulación del flujo sanguíneo
- Hipófisis

# Pituitary pericyte's intracellular calcium dynamic regulation by hypothalamic factor GHRH

## Abstract

The hypothalamic-pituitary unit integrates different signals to orchestrate the synthesis and hormone secretion. These processes must be performed in a coordinated, appropriate and timely manner in response to a specific circumstance, so it requires an extremely precise control system.

After the arrival of a stimulus, such as a hypothalamic factor, thousands of pituitary cells are individually activated and release hormones in a pulsatile secretion. The information encoded in the amplitude and frequency of hormonal pulses is decoded by target tissues to prepare an appropriate biological response.

For many years it has been assumed that these hormonal pulses are due to changes in the characteristics of the secretion of hypothalamic factors. However, it has been suggested the participation of other factors such as the organization of cell populations and their arrangement to vascular network, in this pulsating activity.

Endocrine cells networks are in close association with highly vascularized capillary beds. This alludes to the existence of a close functional relationship between the pituitary hormonal secretion and microcirculation. This implies that, there is one more element involved in the formation of hormonal pulses: the blood flow dynamics in the pituitary.

In the pituitary is present a type of mural cell with contractile capacity, the pericytes. These, have cytoplasmic processes extending along and around capillaries forming a discontinuous layer. It has been shown in other tissues, that pericytes contract/relax causing the closure/opening of the capillary in response to certain vasoactive factors, regulating blood flow.

It has been considered to nitric oxide (NO) as the primary regulator of vascular tone. It is synthesized by the enzyme NO synthase (NOS). In the pituitary, many endocrine cell types express this enzyme; and peptides, including hypothalamic and pituitary hormones factors can modulate NOS activity and vascular tone. However, the mechanisms by which NO acts to decrease the contractile tone of pericytes have not been fully clarified.

Pericytes are postulated as a strong candidate for the modulation of blood flow, and therefore play an important role in the formation of hormone pulses. Therefore, the aim of this thesis was to find out how it is regulated in adenohypophyseal pericytes contractile function, reflected in changes in the dynamics of  $[Ca^{2+}]_i$ , in the absence and presence of hypothalamic

stimulation, such as GHRH. Also, if this activity is due to a particular arrangement of pericytes in relation to the vasculature in the gland, and if it could be regulated by NO.

To determine the intrinsic activity of intracellular calcium pericytes, the activity of these cells under basal conditions (absence of the stimulus of GHRH) was recorded. Of the series of images obtained, two populations were identified, those along the record show changes in activity  $[Ca^{2+}]_i$ , that is spontaneous activity (SA), and those without AE, silents. In addition, two types of AE patterns were identified, which we named transient (T) and non-transient (NT).

In order to identify a possible differential distribution of pericytes in the vascular network of the gland, it was decided to demarcate this network into two zones (1 and 2) based on the anatomical characteristics of the capillaries that form it. In the Z1, there are more pericytes with NT AE type.

In order to identify the GHRH secretagogue effect on the dynamics of  $[Ca^{2+}]_i$  of pericytes, calcium records of basal activity under the stimulus of GHRH 100 nm, administered by an infusion system, were made. It was observed that after administration, the GHRH evoke two types of effects in pericytes: inhibition or activation; likewise, pericytes were observed where no evoked effect. With respect to the area in which they are located, we note more activated pericytes in the z1, with respect to the z2, in which more pericytes were inhibited.

In order to identify the effect of NO on the activity of  $[Ca^{2+}]_i$  of pericytes, we explored two diametrically opposite scenarios, *ie* one in which NO production is exacerbated by administration of a nitric oxide donor (SNAP, 200  $\mu$ M) and another in which NO production is reduced by blocking NOS activity (7-NI, 200  $\mu$ M). It was noted that with the donor, more than three times of the population of pericytes that had AE were inhibited. Conversely, with the blocker of NOS, the population pericytes with AE were triplicated.

In this thesis it can be concluded that pericytes have intrinsic changes in  $[Ca^{2+}]_i$ , which may be transient or non-transient, having a differential distribution of pericytes that exhibit no transient activity type within the pituitary vascular network. In addition, pericytes modified their dynamic of  $[Ca^{2+}]_i$  activity, activating or inhibiting, in response to GHRH stimulation, having a regionalization of the activated pericytes in the entry of the gland, and inhibit the rest of the pituitary. The effect evoked by GHRH is not related to the type of AE pattern. Furthermore, by stimulating/inhibiting the production of nitric oxide, the population of pericytes with AE increases/decreases, respectively.

## **Keywords**

- Hormonal pulse
- Blood flow regulation
- Pituitary

# Introducción

La hipófisis o pituitaria es una glándula que tiene una función central en el sistema endocrino de los vertebrados. Está constituida por dos entidades anatómica, embriológica y funcionalmente distintas: la neurohipófisis y la adenohipófisis. Ésta última es conformada por diversos tipos celulares que sintetizan y secretan una o más hormonas que, en respuesta a diversas señales, regulan procesos biológicos tales como: la reproducción, la lactancia, la respuesta al estrés, la homeostasis metabólica y el crecimiento.<sup>1, 2</sup> Por ejemplo, los somatotropos constituyen la población más abundante de tipo celular endócrino de la glándula y, ante el estímulo de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), sintetizan y secretan la hormona de crecimiento (GH), la cual controla el desarrollo del organismo.

## Regulación de la secreción hormonal adenohipofisaria

En un enfoque clásico, la hipófisis ha sido considerada como un oscilador secundario que obedece principalmente a factores hipotalámicos que modulan la secreción de las hormonas hipofisarias. Sin embargo, diversos estudios han permitido renovar la percepción de la hipófisis como un tejido complejo que desempeña un papel importante en el orquestación de las dinámicas de secreción hormonal.<sup>3</sup>

Los factores hipotalámicos llegan hasta la adenohipófisis a través del sistema de vasos sanguíneos denominado sistema porta hipofisario. El aporte sanguíneo se recibe de dos grupos de arterias: la arteria inferior hipofisaria (IHA), y la arteria superior hipofisaria (SHA). La IHA surge desde el tronco meningohipofisario, una rama del segmento cavernoso de la arteria carótida interna (ICA), y abastece a la neurohipófisis. En este lóbulo la IHA forma un seno capilar en donde recibe los productos neurosecretorios provenientes de terminales axónicas hipotalámicas, y se reestructura en una vena eferente hipofisaria que drena al seno cavernoso.<sup>4</sup>

Por su parte, la SHA consiste de una serie de pequeños vasos que surgen de la porción medial inferior de la ICA por debajo del nervio óptico o de la arteria comunicante posterior, suministra a la cara inferior del nervio y quiasma óptico, al tallo hipofisiario y a la adenohipófisis. De hecho, de todos los tejidos de los mamíferos, la adenohipófisis es el más vascularizado.<sup>4</sup>

Los vasos de la SHA se anastomosan para formar un plexo de capilares fenestrados, denominado plexo primario, que rodea a la eminencia media y a la porción superior del tallo hipofisiario. Es en este plexo capilar primario donde se colectan los estímulos hipotalámicos. Enseguida, los capilares convergen en vénulas para después formar venas portales que descienden por el tallo hipofisiario hacia el lóbulo anterior y forman otra red capilar denominada plexo secundario. Ahí se distribuyen los estímulos y se colectan los productos hormonales, los capilares se reorganizan formando venas eferentes que drenan hacia el seno cavernoso.<sup>4,5</sup>

Puede considerarse al plexo secundario como un sistema de perfusión capilar especializado, que permiten el tránsito transendotelial de moléculas de tamaño mediano a través de fenestras (*e.g.*, secretagogos como la GHRH y hormonas liberadas como la GH), o de tamaño pequeño por difusión simple (*e.g.*, oxígeno y el óxido nítrico).<sup>4,6</sup> La unidad hipotálamo-hipófisis integra señales hipotalámicas, hipofisarias y periféricas, de carácter estimulador e inhibitorio, para orquestar la síntesis y secreción hormonal.<sup>7-9</sup>

A nivel celular, cuando el factor hipotalámico llega a la adenohipófisis y se une a su receptor específico en su célula blanco, provoca la activación de vías de señalización molecular limitadas temporal y espacialmente, generando cambios coordinados en la concentración o actividad de moléculas de señalización intracelular (*e.g.*, calcio), resultando así en la activación celular. Miles de células se activan, responden y secretan la hormona correspondiente de manera pulsátil; las hormonas liberadas pasan a los capilares incorporándose a la circulación sistémica (*Figura 1*). La información de los pulsos, codificada con base en la amplitud, duración, forma e intervalo de los mismos, es decodificada por el tejido blanco para preparar una

respuesta biológica apropiada. Así pues, se establecen ejes de regulación endocrina hipotálamo-hipófisis-órgano blanco.<sup>1,9</sup>

La secreción hormonal implica un incremento en el metabolismo celular, lo cual implica un aumento en el aporte de nutrientes, oxígeno, que mantienen la homeostasis celular. Así pues, a nivel tisular, la regulación de esta secreción se remite tanto a la disposición del sistema vascular con relación a las poblaciones celulares, como a la convección dirigida que actúa para impulsar la hormona secretada en el espacio intercelular hacia los vasos sanguíneos aferentes colindantes.

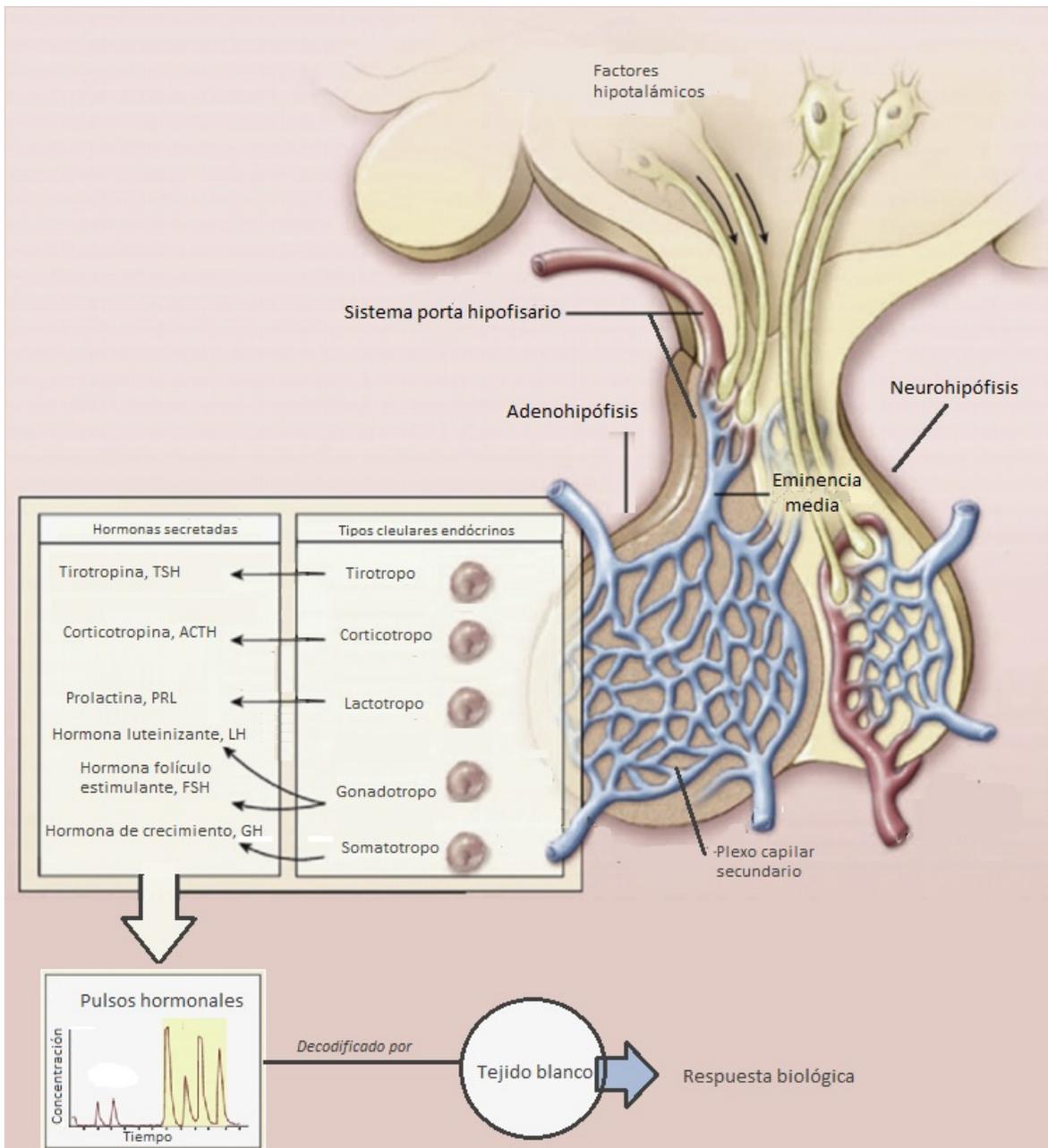


Figura 1. Esquematación de la secreción hormonal adenohipofisiaria. Los factores hipotalámicos llegan a la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisario, donde son liberados en el plexo capilar secundario. La unión específica del factor con su receptor resulta en la activación del tipo celular particular a dicho factor, y en la secreción hormonal. Ésta secreción es altamente pulsátil, y la información, codificada en la amplitud y frecuencia del pulso, es decodificada por el tejido blanco de dicha hormona, promoviendo una respuesta biológica determinada. Imagen adaptada de Melmed.<sup>10</sup>

## Antecedentes

Se puede definir “pulso hormonal” como un incremento en las concentraciones circulantes de la hormona, que se puede dar de manera episódica o en forma de ráfaga. La señalización pulsátil presenta diversas ventajas en comparación con una señalización estable. Una de éstas es mantener la capacidad de respuesta del tejido blanco, debido a que la presencia de intervalos de reposo entre sus oscilaciones permite la recuperación de los receptores presentes en el tejido.<sup>11</sup>

Los mecanismos que subyacen la generación (codificación) e interpretación (decodificación) de los pulsos hormonales no han sido del todo esclarecidos. Sin embargo Walker y colaboradores<sup>11</sup>, generaron un modelo matemático empleando el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, para comprender cómo es que se decodifican los pulsos; proponen que las células o tejido blanco sensan el intervalo entre los pulsos de manera independiente a la duración acumulativa de estos, y que las vías de señalización que se activan tras la interpretación de la señal ocurren en tres niveles posibles: en el citoplasma, en el transcriptoma, o en ambos.

Durante muchos años se ha asumido que los pulsos hormonales hipofisarios son generados por cambios en la secreción de los factores hipotalámicos, es decir pulsos hipotalámicos (*Figura 2*). Sin embargo, en estudios realizados en oveja, donde se hicieron mediciones simultáneas de concentración hormonal en sangre portal y periférica, se identificó la falta de relación entre un pulso hipotalámico y un pulso hipofisario; y que se mantiene una actividad pulsátil hipofisaria aún después de desconectar quirúrgicamente el hipotálamo de la hipófisis.<sup>11</sup> Además, en estudios llevados a cabo en cultivos celulares (donde se pierde la arquitectura tisular) se observó que la capacidad de los factores hipotalámicos para evocar una secreción endócrina es de 100 a 1000 veces menor que la observada en el tejido intacto.<sup>12, 13</sup>

Esto no excluye del todo a los factores hipotalámicos como generadores de los pulsos hormonales. Nuestro grupo de trabajo ha sugerido la participación conjunta en esta actividad pulsátil, de otros elementos a nivel sub-hipotalámico, como la organización de las poblaciones celulares hipofisarias y su relación con la red vascular.

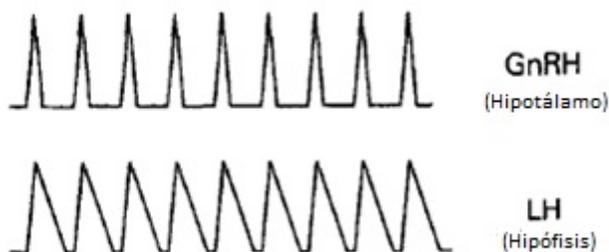


Figura 2. Factores hipotalámicos como generadores de pulsos hormonales. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es secretada por el hipotálamo, de una manera pulsátil hacia el sistema porta hipofisario. En la hipófisis, el GnRH induce a su vez la liberación pulsátil de LH, de características semejantes al pulso hipotalámico. Entonces, se propone que el pulso hipotalámico de GnRH es quien induce el pulso de LH. Replicado de Krsmanovic, *et al.*<sup>14</sup>

Las células hipofisarias diferenciadas no se encuentran distribuidas al azar en el parénquima de la glándula, sino que están organizadas en redes tridimensionales para formar poblaciones dinámicas y plásticas. Estas redes representan un mecanismo físico y fisiológico que incrementa el desempeño de la glándula al hacer posible una coordinación en la estimulación, integración y respuesta secretora sincrónica.<sup>15</sup> Se ha sugerido, que el contacto célula-célula es crucial para darle forma o diseñar el pulso hormonal.<sup>3, 16</sup>

El grupo de trabajo del Dr. Mollar, ha realizado estudios en los que concluyen que los somatotropos se encuentran organizados en redes. Éstas tras la estimulación con GHRH, son capaces de presentar respuestas coordinadas de gran escala, incrementando la amplitud y eficiencia de los eventos de señalización celular y secreción hormonal. Además observaron que, si esta red es interrumpida, hay implicaciones estructurales en la coordinación de la transmisión de la información de célula a célula (*Figura3*).<sup>17</sup>

Por otra parte, las células hipofisarias están expuestas a distintos gradientes de concentración del secretagogo, por lo que deben existir otros mecanismos para que se permita una respuesta celular coordinada ante tal estimulación tan heterogénea.<sup>15, 17</sup> Aunado a lo anterior, la exocitosis de las hormonas almacenadas en gránulos de secreción es un evento relativamente rápido, en un rango de milisegundos a segundos, que se detiene ante el cese del estímulo. En contraste, la aparición de los pulsos hormonales en el torrente sanguíneo, incluido el de GH, requiere de varias docenas de minutos. Se ha sugerido que la GH secretada puede ser almacenada el tiempo necesario en el espacio perivascular, y posteriormente ingresar en los capilares, controlando así la entrada de la hormona en el torrente sanguíneo de una manera temporalmente precisa.<sup>5</sup>

Las redes de células endócrinas se encuentran en estrecha asociación con lechos altamente vascularizados por capilares. Este hecho alude la existencia de una íntima relación funcional entre el evento de secreción hormonal y la microcirculación en la hipófisis.<sup>3</sup> Lo anterior cobra sentido al considerar que un incremento en la actividad celular endócrina durante la secreción hormonal, es precedida por un incremento en el flujo sanguíneo para satisfacer la demanda metabólica incrementada (*Figura 4*). De hecho, Mollard y colaboradores<sup>17</sup>, en registros *in vivo* encontraron que al estimular a las redes de somatotropos con GHRH, hay un aumento en la velocidad del flujo sanguíneo asociado a la secreción coordinada de GH. Para identificar eventos de hipoxia, realizaron mediciones de la presión parcial de oxígeno en distintos puntos, cercanos o lejanos de la entrada de los vasos portales a la glándula, y observaron que la presión parcial de oxígeno está estrechamente regulada y se mantiene constante en todas las zonas de medición.<sup>15, 17</sup> Además, a partir del monitoreo de la velocidad de los eritrocitos en función del diámetro de capilares en distintas regiones de la glándula, observaron que a mayor diámetro del lumen capilar, la velocidad del flujo sanguíneo tiende a ser mayor (*Figura5*).

No obstante, la difusión del oxígeno puede no ser lo suficientemente rápida, requiriendo así de ajustes locales en el flujo sanguíneo para incrementar la entrega de oxígeno a las células.<sup>15, 17, 18</sup> Así pues, la actividad celular endócrina, y su producto,

tienen que estar correlacionados temporalmente con los cambios en el flujo sanguíneo, de tal manera que se reabastezca el almacenamiento energético de la célula y se coordine el paso de la hormona a la vasculatura.<sup>5</sup> Esto implica que, en la formación de los pulsos hormonales, participe al menos un elemento más: la dinámica del flujo sanguíneo en la hipófisis.

Con el fin de entender cómo se regula la secreción hormonal, durante los últimos 50 años se han realizado numerosos estudios, pese a ello, es prácticamente nulo el conocimiento sobre cómo es que las hormonas son capturadas por los capilares fenestrados, y cómo la regulación del flujo sanguíneo contribuye a la formación de pulsos hormonales en el torrente sanguíneo.<sup>18</sup>

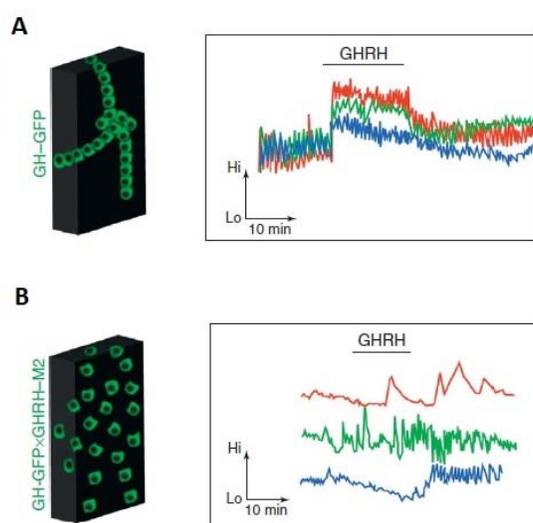


Figura 3. *Las redes celulares hipofisarias y la sincronización en la respuesta a factores hipotalámicos.* Representación esquemática de registros en tiempo real de vesículas de secreción marcadas con GFP (GH-eGFP) en respuesta a la misma dosis de GHRH (la barra indica el tiempo de administración), de somatotropos organizados en redes (A) y disociados (B), en hipófisis de ratón macho. Cuando la estructura de la red de somatotropos es destruida, la respuesta coordinada se pierde. GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento. Adaptado de Mollard.<sup>17</sup>

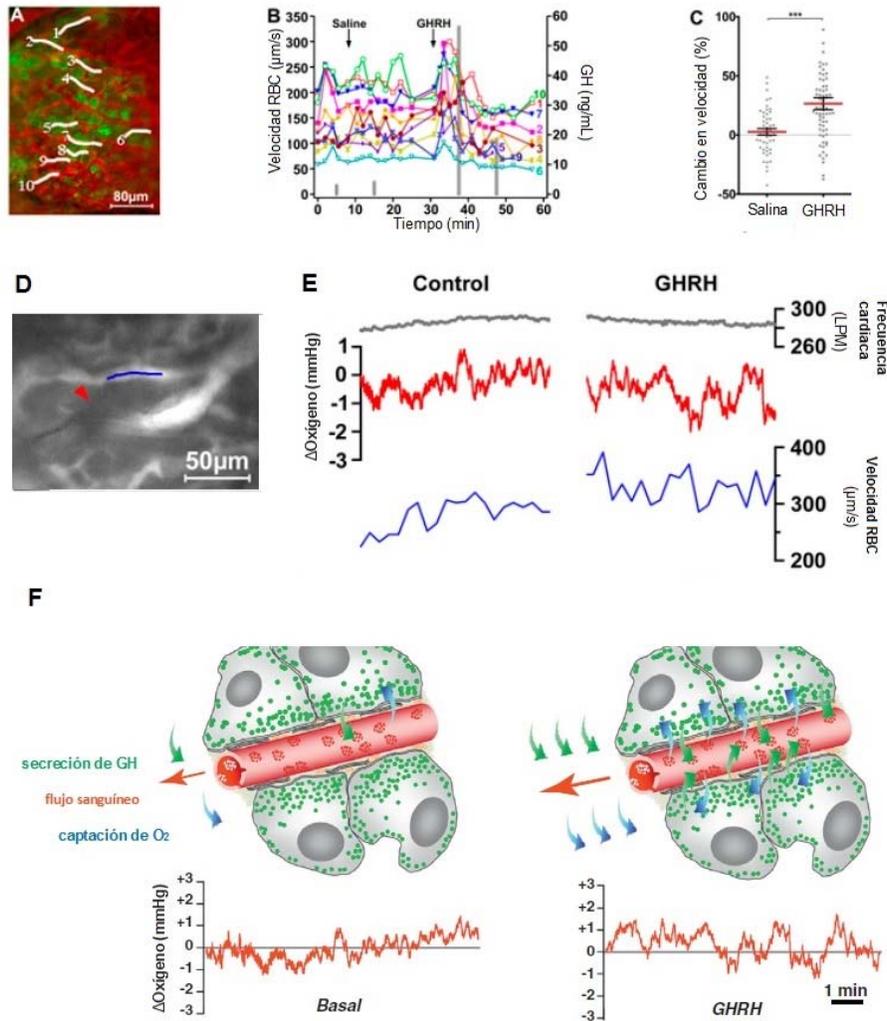


Figura 4. Relación morfológica y funcional de las redes celulares endócrinas y la microcirculación. (A) Imagenología *in vivo* del flujo sanguíneo en hipófisis de ratones transgénicos, cuya expresión de la GH conlleva a una expresión de la GFP (GH-eGFP), las líneas blancas representan los capilares en los que se midió la velocidad de los eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés). (B) Mediciones secuenciales de la velocidad de RBC (eje izquierdo) y concentración de la GH en plasma (eje derecho, barras grises verticales), previa, durante y posterior a la administración intra venosa de solución salina y GHRH, respectivamente. (C) Distribución del cambio en la velocidad (porcentaje de la velocidad de RCB del control) dentro de los 5 minutos posteriores a la administración de solución salina y GHRH. (\*\*\*) $P < 0.001$ ,  $n = 8$  animales). (D y E) Medición *in vivo* de la presión parcial de oxígeno con sensores parciales de oxígeno en ratones GH-eGFP anestesiados, a los que se les inyectó vía venosa rodamina 70kDa. (D) Se insertó la punta (5 μm) del sensor (flecha roja) dentro de una agrupación de somatotropos (no ilustrado). Se monitoreó la velocidad de RBC en un capilar cercano (línea azul). (E) Registro de la frecuencia cardíaca (arriba, gris), los cambios en la presión parcial de oxígeno (en medio, rojo) y la velocidad de RBC (abajo, azul), previo (izquierda) y posterior (derecha) a la administración de GHRH. (F) Representación esquemática de la proximidad anatómica entre las redes de somatotropos y la vasculatura, y los cambios equilibrados en el flujo sanguíneo y la captación de oxígeno que compensan los requerimientos metabólicos asociados a la secreción de GH. En registros realizados *in vivo*, en condiciones basales (izquierda), se registra una estabilidad relativa en la presión parcial de oxígeno ( $\Delta$ Oxígeno) pero, tras la administración de GHRH, la actividad intensa de la red de somatotropos requiere de mayor consumo de oxígeno (derecha), que se conjunta con un gran incremento en oxígeno debido a un aumento en la tasa de flujo sanguíneo. A-E, modificado de Lafont<sup>15</sup>; F, modificado de Mollard.<sup>17</sup>

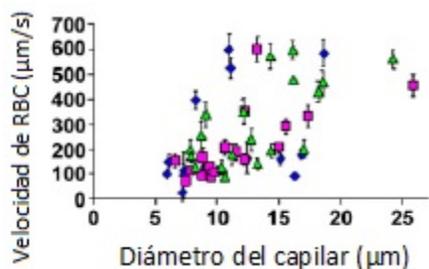


Figura 5. *Velocidad del flujo sanguíneo y diámetro capilar*. Registros *in vivo* de la velocidad de eritrocitos (RBC) en ratones GH-eGFP, en función del diámetro de vasos localizados en la región rostral (triángulos verdes), central (círculos rosas) y caudal de la glándula hipófisis (rombos azules). Modificado de Lafont<sup>15</sup>.

### Los pericitos y la regulación del flujo sanguíneo

Las células murales, regularmente las células vasculares de músculo liso (VSMC), revisten las paredes del vaso y regulan el flujo sanguíneo. La vasculatura en la hipófisis está compuesta por capilares fenestrados carentes de VSMC, por lo que deben de existir otros mecanismos para modificar el tono vascular y así regular el flujo sanguíneo.

En la hipófisis están presentes los pericitos, otro tipo de células murales con capacidad contráctil, que extienden sus procesos a lo largo y alrededor de los capilares formando una capa discontinua (*Figura 6*). Recientemente, en estudios en cerebro de rata realizados *in vivo*, y utilizando imagenología de dos fotones, se demostró que los pericitos se contraen/relajan ocasionando el cierre/apertura del capilar en respuesta de ciertos factores vasoactivos, regulando el flujo sanguíneo.<sup>5, 19</sup>

Se ha considerado al óxido nítrico (NO) como el principal regulador del tono vascular. El NO es sintetizado, utilizando L-arginina como sustrato, por tres isoformas de la enzima NO sintasa (NOS): neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). En preparaciones de pericitos de cerebelo de rata se observó que el NO (producido tras la estimulación con glutamato) evoca la dilatación del capilar, y al bloquear a la NOS dicha dilatación se reduce.<sup>19</sup> En preparaciones de pericitos retinales de rata, se observó que al aumentar la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), los pericitos constriñen a los capilares (*Figura 7*).<sup>19, 20</sup>

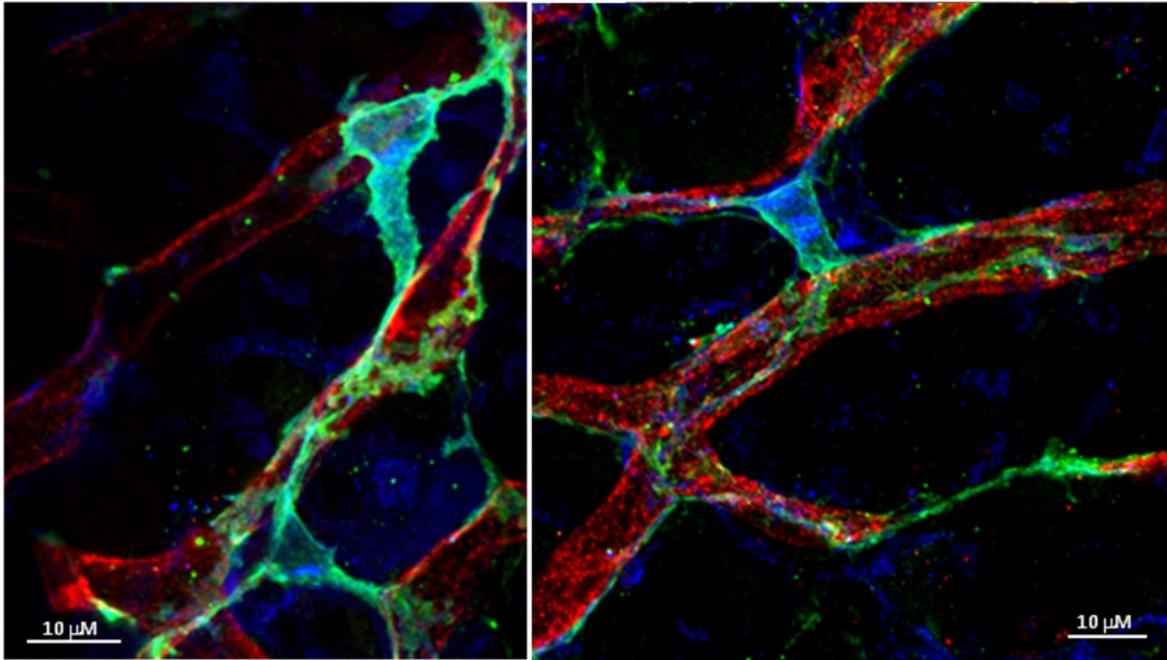


Figura 6. *Imágenes confocales de inmunotinción triple para marcadores celulares de pericitos: NG2 y PDGFR $\beta$  (verde y azul, respectivamente); y capilar, CD31-PCAM (rojo) de glándula hipófisis entera de ratón macho adulto. NG2, proteoglicano neural/glial antígeno 2; PDGFR $\beta$ , receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo beta ; CD31-PCAM, cluster de diferenciación 31-molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas. Inmunotinciones realizadas por la Dra. Tatiana Fiordeliso.*

En la hipófisis, diferentes células endócrinas, incluidos los somatotropos, expresan la nNOS, y las células endoteliales vasculares la eNOS.<sup>5</sup> En los tipos celulares adenohipofisarios, aparentemente existe una diferenciación sexual de la expresión de nNOS.<sup>21</sup> Sin embargo, los mecanismos por los que el NO actúa disminuyendo el tono contráctil de los pericitos, que se traduce en una dilatación del lumen capilar, no han sido del todo esclarecidos.

Varios péptidos, incluyendo los neuropéptidos hipotalámicos y hormonas hipofisarias pueden modular la actividad de NOS y el tono vascular.<sup>5, 20</sup> La relación entre la secreción hormonal y el cambio en el flujo sanguíneo quedó demostrada por Schaeffer y colaboradores cuando comprobaron que la secreción de GH inducida por GHRH estaba asociada a la coordinación de la actividad del somatotropo, el incremento local del flujo sanguíneo y cambios en la presión parcial de oxígeno dentro de las agrupaciones de somatotropos.<sup>5</sup> Por otra parte, el GHRH induce en los

somatotropos un incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  como resultado de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de calcio tipo L, en una manera dependiente de cAMP.<sup>22</sup> Además, eNOS y nNOS son activadas por la secreción de GH, o el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  por el estímulo de GHRH.<sup>20</sup> Por lo tanto, GHRH y GH tienen la capacidad de activar la nNOS e incrementar la producción de NO, que a su vez podría inducir la relajación de los pericitos y conducir a un incremento de flujo sanguíneo. En contraste, es de esperarse que al bloquear a la NOS, se induzca la contracción de los pericitos y la disminución consecuente del flujo sanguíneo (*Figura 8*).

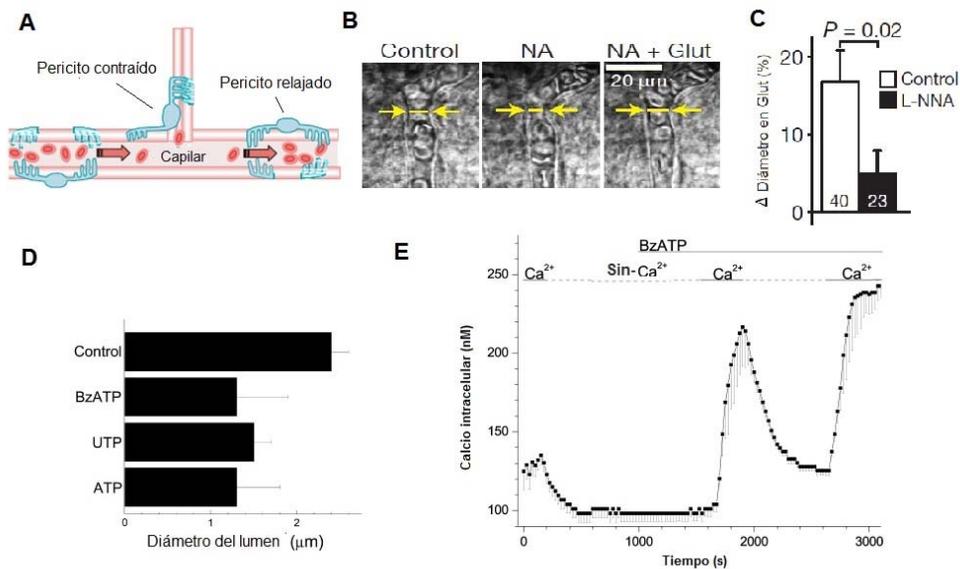


Figura 7. *Actividad contráctil de pericitos y el diámetro capilar.* En (A) se esquematiza la acción de los pericitos sobre el diámetro del lumen del capilar. (B) En preparaciones de pericitos de cerebelo de rata, Hall y colaboradores<sup>19</sup> evaluaron la respuesta capilar al administrar  $2\mu\text{M}$  del vasoconstrictor noradrenalina (NA), con superposición de  $500\mu\text{M}$  del vasodilatador glutamato (Glut), el cual induce la secreción de NO. La línea muestra el diámetro del lumen capilar. (C) Al bloquear NOS con  $100\mu\text{M}$  de L-NNA se inhibió la dilatación evocada por Glut. (D) En preparaciones de pericitos retinales de rata, Kawamura y colaboradores<sup>23</sup> evaluaron la contractibilidad de éstos al medir el diámetro vascular probando distintos agonistas a canales purinérgicos ( $100\mu\text{M}$  BzATP,  $30\mu\text{M}$  UTP y  $1\text{mM}$  ATP), en donde todos promueven la contracción. En (E) Midieron la  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos expuestos a soluciones con y sin  $Ca^{2+}$ , y en presencia de BzATP. Demostraron que la activación del receptor ocasiona el influjo de  $Ca^{2+}$ . Modificado de Peppiatt<sup>24</sup> (A).

En la determinación de la función y metabolismo hipofisario, se ha demostrado que la vasculatura desempeña un papel importante.<sup>17</sup> Además, en modelos de ratones transgénicos con marcadores fluorescentes específicos, empleando aproximaciones microquirúrgicas y nuevas herramientas de análisis de imágenes, se demostró que la

microcirculación hipofisaria y la red de somatotropos están correguladas de forma funcional a través de la estimulación de GHRH.<sup>15</sup>

No se ha descrito alguna función específica para los pericitos adenohipofisarios, y no existe evidencia publicada de la presencia de receptores de GHRH u otros secretagogos en los vasos sanguíneos hipofisarios o en los pericitos. No obstante, es probable que las alteraciones locales en el flujo sanguíneo sean consecuencia de la actividad secretora de células endócrinas. En consecuencia, la acción de los pericitos en la función hipofisaria podría estar asociada con el control del flujo sanguíneo, correlacionado con la secreción de células endócrinas y la estimulación o inhibición de ciertos secretagogos.

Por lo anterior, los pericitos se postulan como fuertes candidatos para la modulación del flujo sanguíneo, y por ende representar un papel importante en la formación de pulsos hormonales. Por tal motivo, es de interés conocer cómo está regulada en los pericitos adenohipofisarios la función contráctil, expresada en cambios en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$ , en ausencia y en presencia de un estímulo hipotalámico, por ejemplo el GHRH. Además, si esta actividad obedece a una disposición particular de los pericitos en relación a la vasculatura en la glándula, y si podría estar regulada por el NO.

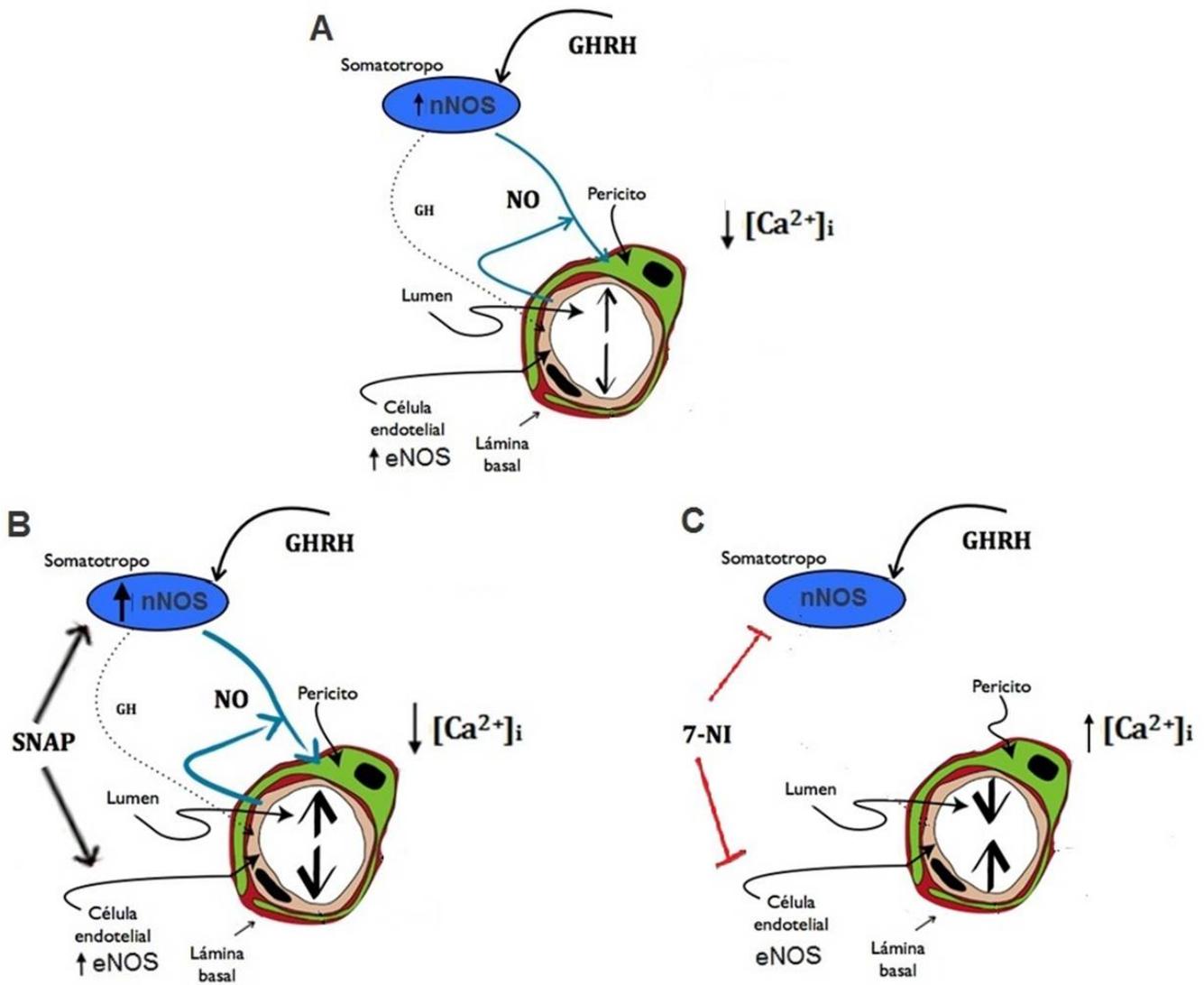


Figura 8. Propuesta del efecto de GHRH en la producción de NO y en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos. (A) El GHRH estimula al somatotropo (azul) ocasionando por una parte el incremento en la activación de nNOS y la producción y liberación de NO, y por otra la secreción de GH, que a su vez estimula la producción de NO por la eNOS en la células endoteliales (rosa). El NO, secretado tanto por el somatotropo como por la célula endotelial, ocasiona una disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$  del pericito (verde), provocando la relajación del mismo y en consecuencia el aumento del diámetro del lumen capilar. (B) Escenario posible en presencia de SNAP, un donador de NO, en donde se exagera la producción de NO por las NOS, y se potencia la disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  y por ende una mayor dilatación del capilar. (C) De forma inversa, en presencia de 7-NI, un bloqueador de NOS, se mengua el aporte de NO, el pericito se contrae al incrementar el  $[Ca^{2+}]_i$  lo que ocasiona la constricción capilar.

## Hipótesis

La dinámica de calcio intracelular de los pericitos hipofisarios es regulada por el factor hipotalámico GHRH dependiendo de la ubicación de estas células en la red vascular de la glándula, y esta dinámica será dependiente de óxido nítrico.

# Objetivos

## **Objetivo general:**

Determinar si el GHRH regula la dinámica de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos adenohipofisarios, dependiendo de la ubicación de éstos en la red vascular de la glándula, y si existe una relación entre dicha actividad y el óxido nítrico.

## **Objetivos particulares:**

- Caracterizar la dinámica de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos, en ausencia de GHRH, dependiendo de su ubicación en la red vascular de la glándula.
- Determinar el efecto que induce el GHRH en dicha dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos.
- Identificar el efecto del NO en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos.

# Metodología

## Animales

Los procedimientos con animales se realizaron bajo los lineamientos de un protocolo institucional para el uso y cuidado de animales de laboratorio, y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999), referentes a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ratones macho Balb-C adulto de dos meses de edad fueron producidos y mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias, con disposición de alimento *ad libitum*, regulación de ciclo de luz/obscuridad 12:12, y a una temperatura constante de 22°C.

## Marcaje de capilares y obtención de la glándula

Con el fin de visualizar los capilares adenohipofisarios se realizó el marcaje de éstos. Para ello, se realizó una perfusión intracardiaca con el marcador de vasos sanguíneos lectina de *Ricinus communis* acoplada con rodamina, RCA 5µg/mL (Vector; Burlingame CA, USA ), empleando para ello una bomba de perfusión (ISMATEC; Vernon Hills IL, USA) a una velocidad de 1.5 mL/min. Este marcador se une con la β-galactosa presente en el endotelio, por lo que posibilitará visualizar y distinguir los capilares, empleando para ello una longitud de onda de emisión y excitación de 510-590 nm, respectivamente.

Después de la perfusión y decapitación de los ratones, se procedió a abrir el cráneo y remover el cerebro, quedando expuesta la glándula hipófisis y posibilitando la extracción de la misma.

## Obtención de registros de calcio intracelular

Se realizaron registros de las fluctuaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos adenohipofisarios mediante espectrometría e imagenología del indicador intensiométrico sensible a  $Ca^{2+}$  Oregon-Green BAPTA-1 AM (488-523 nm), en una preparación *ex vivo* de la glándula

hipófisis. Estos registros constaron de fotomicrografías secuenciales realizadas en un microscopio estereoscópico de fluorescencia.

Para lograr la incorporación del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , se incubó la glándula durante 13min a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ , en condiciones de oscuridad, en una solución  $20\mu\text{M}$  de Oregon-Green BAPTA-1 AM (Invitrogen; Eugene OR, USA), 0.1% dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma, St. Louis MO, USA) con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St. Louis MO, USA) en  $200\mu\text{L}$  de solución fisiológica "fluido cerebroespinal artificial" -ACSF por sus siglas en inglés- ( $118\text{ mM NaCl}$ ,  $3\text{ mM KCl}$ ,  $0.9\text{ mM HEPES}$ ,  $2.5\text{ mM NaHCO}_3$ ,  $2.5\text{ mM CaCl}_2$ ,  $2.4\text{ mM MgCl}_2$ ,  $11\text{ mM glucosa}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ).

Después de la incubación, se colocó la glándula sobre una gota de agar 3% (Invitrogen; Eugene OR, USA) en una cámara de registro de plexiglás, donde se mantuvo bajo perfusión constante con ACSF para mantener a las células vivas.

La cámara de registro fue montada sobre la platina del microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica M205FA), equipado con un objetivo PlanAPO 2.0X (0.35NA), con una lámpara de mercurio como fuente de iluminación. La adquisición de las imágenes ( $300\text{ ms}$  de exposición - $100\text{ ms}$  de intervalo entre cada imagen) se realizó con una cámara CCD enfriada (RS Photometrics SenSys) acoplada al microscopio.

Para caracterizar la dinámica de la actividad de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de los pericitos, en ausencia de GHRH, se realizaron los registros administrándoles únicamente solución fisiológica (ACSF) en el sistema de perfusión. Posteriormente, para determinar el efecto que induce el GHRH en esta dinámica, se realizó el registro continuo previo, durante y posterior a la administración de GHRH  $100\text{ nM}$  durante  $30\text{ s}$  ( $100\text{ nM}$ ) mediante el sistema de perfusión. Con el fin de identificar el efecto del NO en la actividad de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de los pericitos, se realizaron registros previos y posteriores a la incubación durante  $15\text{ minutos}$ , ya sea del donador de óxido nítrico S-Nitroso-N-Acetil-DL-penicillamine, SNAP  $200\mu\text{M}$  (Sigma, St. Louis MO, USA) o del inhibidor de NOS 7-Nitroindazole, 7-NI  $200\mu\text{M}$  (Sigma, St. Louis MO, USA). Para determinar la viabilidad de las células, se administró al final del registro una solución de alto potasio KCl ( $50\text{ mM KCl}$ ,  $120\text{ mM NaCl}$ ,  $10\text{ mM HEPES}$ ,  $2\text{ mM CaCl}_2$ ,  $\text{pH } 7.4$ ). Una vez terminados los registros de la

dinámica de calcio intracelular, se tomaron imágenes de la vasculatura utilizando una longitud de onda de excitación de 510nm y 575nm de emisión.

### **Procesamiento de imágenes y análisis estadístico**

El procesamiento de las secuencias de imágenes se realizó utilizando los programas de cómputo Image J (NIH, USA), Igor Pro (Wavemetrics, USA) y Origin Pro8 (Microcal software, USA)

Con el programa Image J se seleccionaron y analizaron las células que por su morfología y ubicación respecto a los capilares identificamos como pericitos. En este programa se realiza la transformación de los valores de intensidad de fluorescencia a datos numéricos correspondientes a los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , así como la distribución espacial (x-y) de las células seleccionadas.

Los datos obtenidos fueron graficados con el programa Igor Pro, donde se utilizó una rutina semi-automática escrita por el Dr. Piere Fontaneaud (Insitute of Functional Genomics, Montpellier Francia) para obtener la función  $\Delta F = F - F_0$ , para restarle el fondo a la secuencia de imágenes. De igual manera, para visualizar en una gráfica la actividad de todas las células con respecto al tiempo, se utilizó el protocolo descrito por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM). Las gráficas resultantes se visualizaron en el programa Origin Pro8.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Prism6 (GraphPad software Inc). Se identificó la distribución en la red vascular de las células seleccionadas, y se procedió a comparar el porcentaje de poblaciones de pericitos en relación al registro de actividad de calcio y su localización en la glándula. Como queremos explorar la dinámica de calcio entre los pericitos de ambas zonas y tratamiento (actividad intrínseca y ante el estímulo de GHRH), los datos fueron sometidos a una prueba de ANOVA de dos vías con una prueba Sidak de comparación múltiple. Los datos obtenidos relacionados con la actividad del NO, fueron sometidos a una prueba t-student pareada.

# Resultados

Los resultados obtenidos a partir del protocolo presentado fueron los siguientes:

## **Actividad intrínseca de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos adenohipofisarios**

Para determinar la actividad intrínseca de calcio intracelular de los pericitos, se registró la actividad de éstas células en condiciones basales (ausencia del estímulo de GHRH). De la serie de imágenes obtenidas, se identificaron -en proporciones similares- dos poblaciones, aquellos que a lo largo del registro presentan cambios en su actividad  $[Ca^{2+}]_i$ , es decir actividad espontánea (AE), y aquellos que no presentan AE, denominados silentes.

En un análisis de la dinámica de cambio de  $[Ca^{2+}]_i$  en los pericitos con AE, se identificaron dos tipos de patrones (*Figura 9*). En uno de ellos, el aumento de calcio es transitorio (T), es decir, sube y baja en un tiempo relativamente corto (8.5 s, duración promedio aproximada); y otro, en el que se observaron cambios en la actividad de calcio de forma irregular y con presencia de mesetas (44.5 s, duración promedio aproximada) al que se nombró no transitorio (NT).

## Perfil de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ basal de pericitos hipofisarios

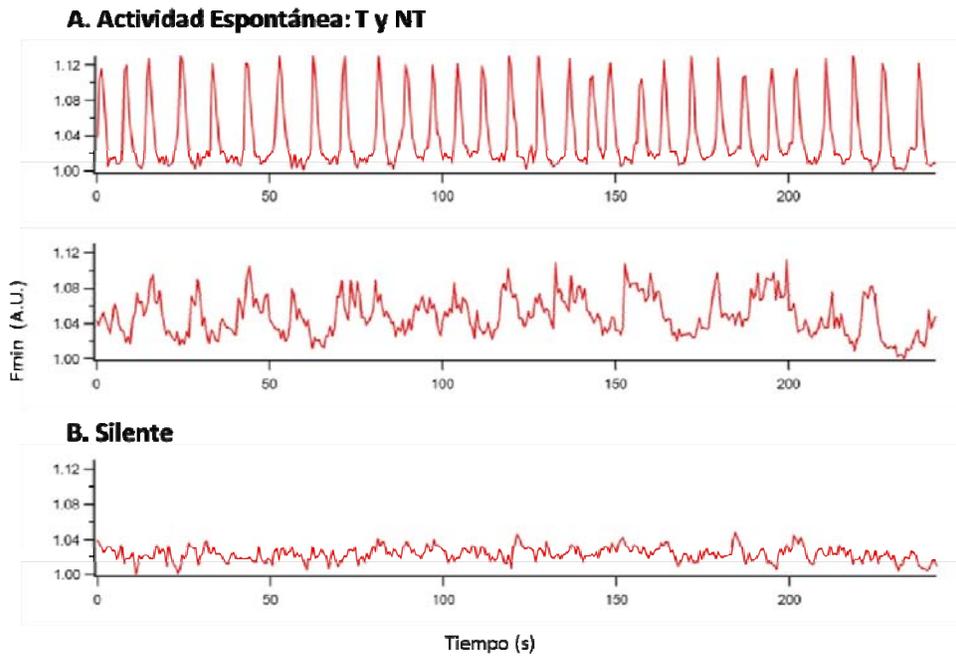


Figura 9. Perfil de la actividad basal de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos hipofisarios. **A.** Perfil representativo del cambio de calcio intracelular intrínseco a lo largo del tiempo, de una célula con actividad espontánea del tipo transitorio (superior), y no transitorio (inferior). **B.** Perfil representativo de una célula silente. T, Transitorio; NT, No Transitorio.

Con el objetivo de identificar una posible distribución diferencial de los pericitos en la red vascular de la glándula, se decidió demarcar esta red en dos zonas con base en las características anatómicas de los capilares que las constituyen (*Figura 10*). Se denominó "zona 1" (z1) a aquella región en la cual ingresa la vasculatura a la adenohipófisis, (disposición rostral, ventral) en donde fue posible identificar capilares largos sin o con una sola ramificación evidente; en contraparte, se le denominó "zona 2" (z2) a la región en la cual se observaron múltiples ramificaciones de los capilares.

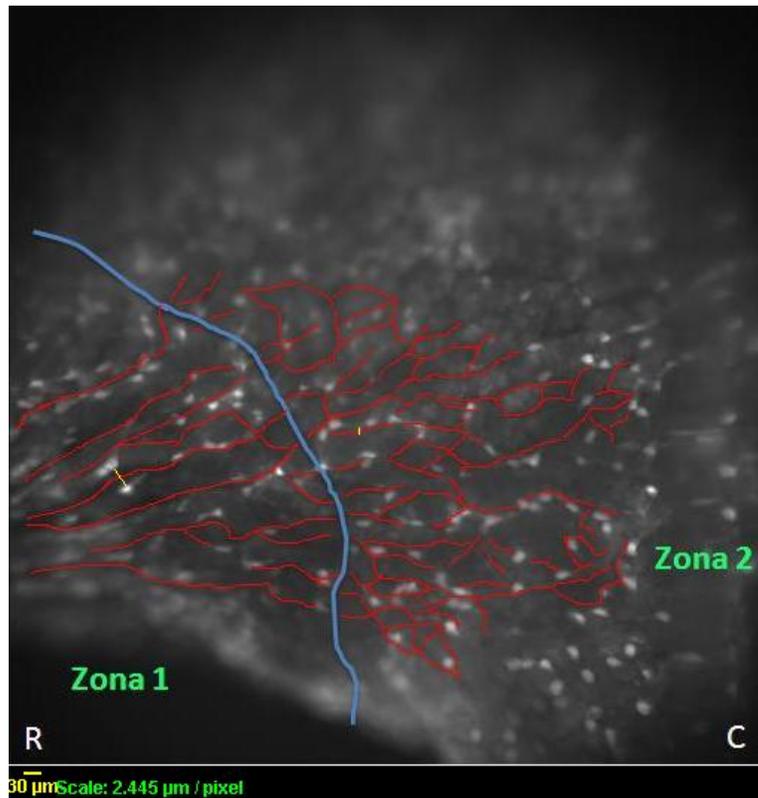
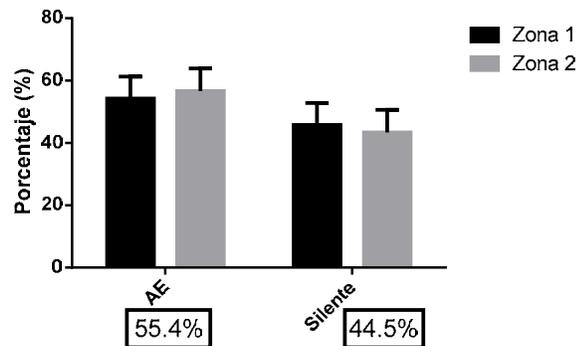


Figura 10. Esquematación de la demarcación de la red vascular adenohipofisiaria en "Zona 1" y "Zona 2". R, región rostral; C, región caudal.

Para reconocer una posible relación en la actividad basal de los pericitos y su distribución en la red vascular de la hipófisis, realizamos el marcaje de la vasculatura con lectina e hicimos el registro de calcio intracelular. De estos registros, se estimó el porcentaje de pericitos con AE y silentes, tanto en la z1 como en la z2 (Figura 11). No obstante que no se encontraron diferencias significativas en la distribución de pericitos con AE y silentes (55 y 44%, respectivamente;  $p=0.98$ ) podemos observar que existe una posible regionalización del tipo de patrón de AE, habiendo en la z1 el doble de pericitos con AE del tipo NT, con respecto a la z2 (65 y 34%, respectivamente;  $p=0.0042$ ). En la z2, se observa una tendencia de que la población de pericitos con AE del tipo NT sea mayor.

**A**

Actividad basal de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos en relación a su distribución en la red vascular de la hipófisis

**B**

Patrón de AE y su distribución en la red vascular

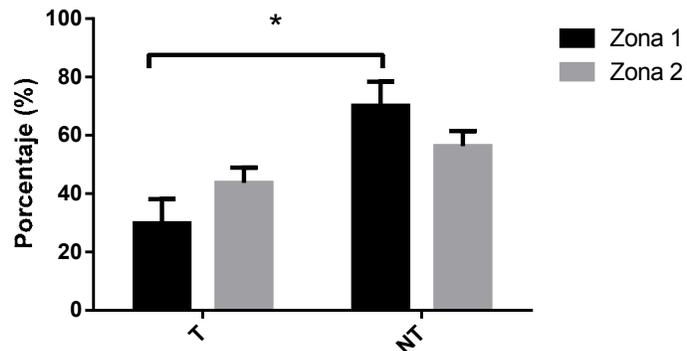


Figura 11. Actividad basal de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos hipofisarios y su distribución en la red vascular. **A.** Porcentaje de pericitos con AE y silentes en las zonas 1 y 2. **B.** Porcentaje de pericitos con AE del tipo T y NT en las zonas 1 y 2. AE, Actividad Espontánea; T, Transitorio; NT, No transitorio. \*  $p < 0.005$ , prueba Sidak de comparación múltiple, ANOVA 2 vías, zonas y actividad basal (**A**), zonas y patrón de AE (**B**). Se contabilizaron 728 células en 7 réplicas.

## Efecto de GHRH en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos

Con el objeto de identificar el efecto que el secretagogo GHRH en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos, se realizaron registros de la actividad de calcio previo y bajo el estímulo de GHRH 100 nm, administrado mediante un sistema de perfusión. Se observó que tras su administración, el GHRH ejerció dos tipos de efectos en los pericitos: inhibición o activación (44 y 24%, respectivamente); así mismo, se observaron pericitos en los que no evocó efecto alguno (32%) (Figura 12). Al analizar los resultados con respecto a la zona en la que se ubican (Figura 13), observamos que en la z1 hay un 30% de pericitos que se activan (1.5 veces más que en la z2,  $p=0.019$ ), de forma inversa, en la z2 hay un 50% de pericitos que se inhiben, es decir 2.5 veces más que en la z1 ( $p=0.010$ ).

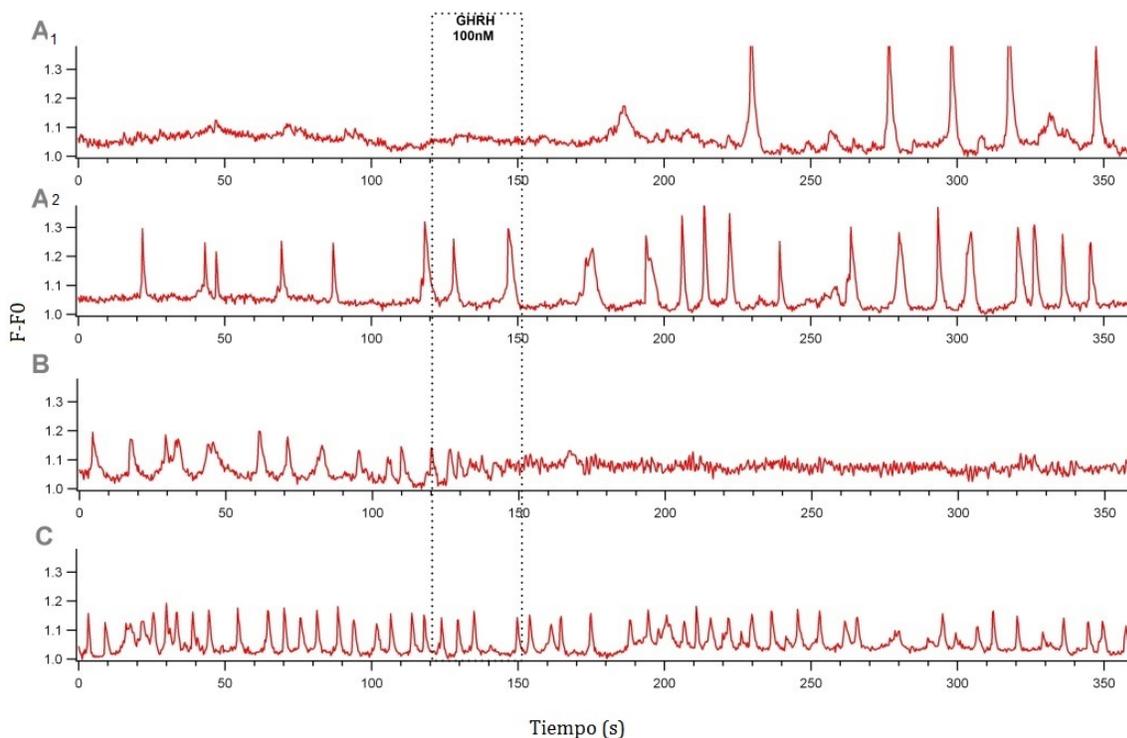


Figura 12. Efecto de GHRH en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos hipofisarios. Perfil representativo de cambios de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo, asociados a cambios en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de una célula que tras el estímulo con GHRH 100 nM fue activada (**A1 y A2**), inhibida (**B**) o no modificó su actividad (**C**). Las líneas punteadas demarcan el intervalo en el que se administró el GHRH.

**Efecto de GHRH en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos y su distribución en la red vascular hipofisiaria**

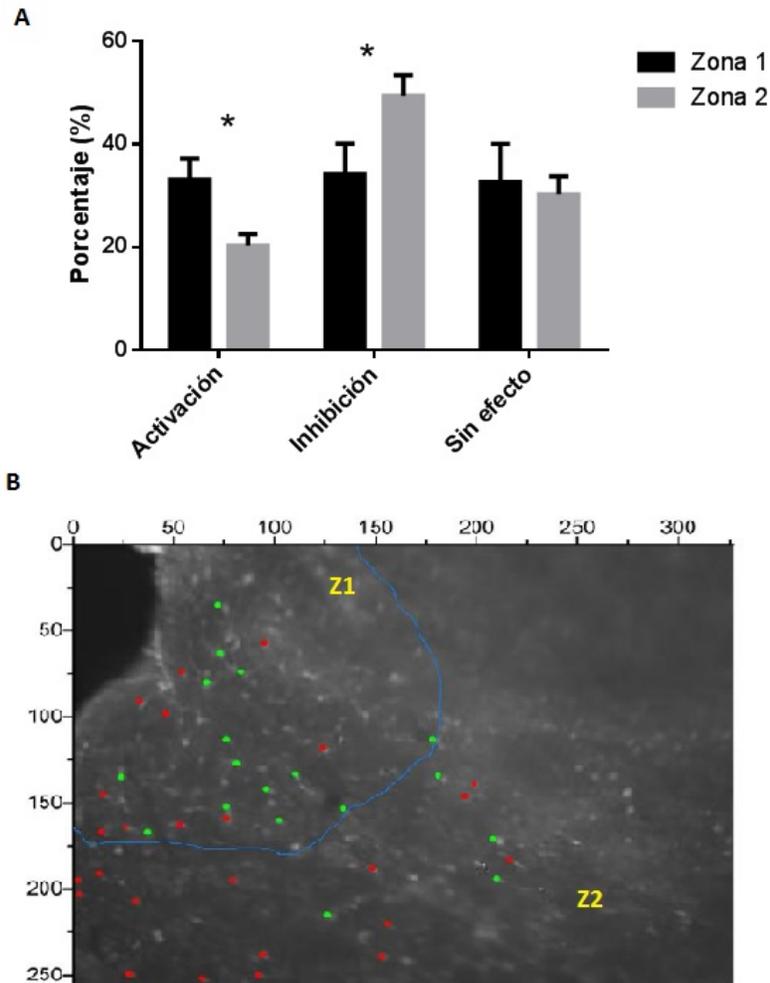


Figura 13.- Efecto de GHRH en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos hipofisarios y su distribución en la red vascular. Porcentaje poblaciones de pericitos (A), y gráfica representativa de su distribución (B) que se activaron (verde), inhibieron (rojo) o no mostraron efecto, ante el estímulo con GHRH 100Nm, ubicados en la zona 1 (Z1) y zona 2 (Z2). \* $p < 0.05$ , prueba de comparación múltiple, ANOVA 2 vías, zonas y efecto de GHRH. Se contabilizaron 287 células en 5 réplicas.

Además, para discernir si el efecto del GHRH en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  está relacionado al tipo de patrón de AE que presentaba el pericito, se estimó el porcentaje de células con AE de tipo T y NT que se activaron, inhibieron o no modificaron su actividad (Figura 14). Observamos que en general, en ambas poblaciones tienen al menos 2.5 veces más pericitos que ante el estímulo de GHRH se inhiben (T=51%; NT=42%) con respecto a los que se activan (T=20%; NT=16%).

### Efecto de GHRH en la $[Ca^{2+}]_i$ de pericitos según el patrón de AE

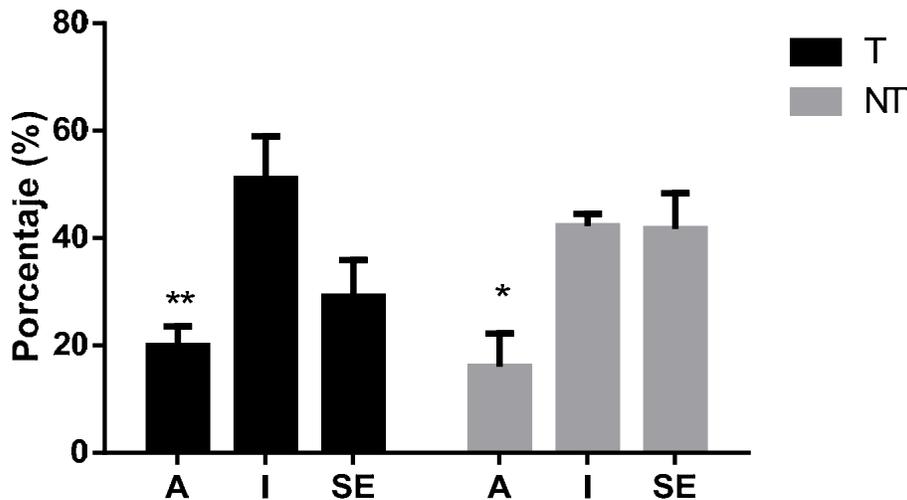


Figura 14. Efecto de GHRH en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de pericitos hipofisarios según el patrón de AE. Porcentaje poblaciones de pericitos se activaron (A), inhibieron (I) o no mostraron efecto (SE), ante el estímulo con GHRH 100Nm, que presentaron un patrón de actividad espontánea (AE) del tipo transitorio (T) o no transitorio (NT). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , prueba de comparación múltiple, ANOVA 2 vías. Se contabilizaron 158 células en 5 repeticiones.

### Efecto del NO en la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de los pericitos hipofisarios

Con la finalidad de identificar el efecto del NO en la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos, se exploraron dos escenarios diametralmente opuestos, es decir, en uno en el que se exacerba la producción de NO mediante la administración de un donador de óxido nítrico (SNAP, 200  $\mu$ M) y otro en el que se reduce la producción de NO al bloquear la NOS (7-NI, 200  $\mu$ M). Para ello, se estimó la población de pericitos con AE previa y posterior a la incubación ya sea con SNAP (Figura 15) o con 7-NI (Figura 16). Se observó que posterior a la incubación con SNAP, más del triple de la población de pericitos que presentaba AE se inhibió ( $p=0.025$ ). De manera inversa, posterior a la incubación con 7-NI, se triplicó ( $p=0.0045$ ) la población de pericitos con AE.

## Efecto de SNAP en la AE de pericitos

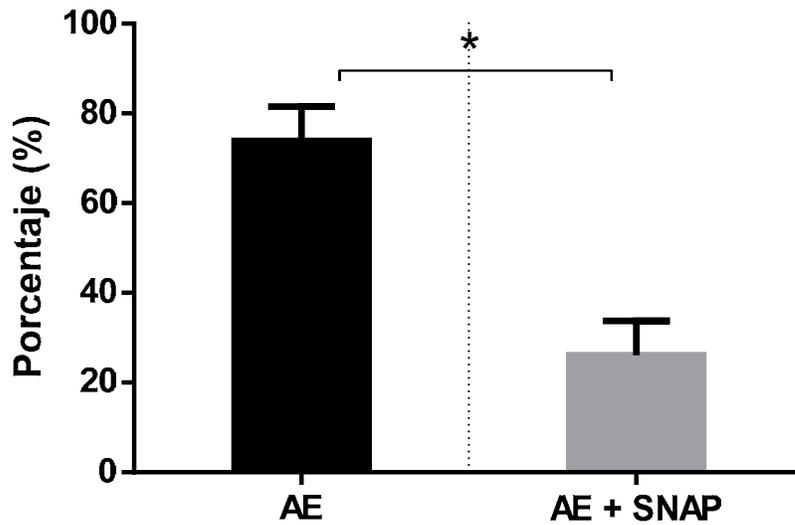


Figura 15. *Efecto de SNAP en la AE de pericitos hipofisarios.* Porcentaje de pericitos con actividad espontánea (AE) y posterior a la incubación con el donador de NO, SNAP 200 $\mu$ M (AE + SNAP). NO, óxido nítrico; SNAP, S-Nitroso-N-Acetil-DL-penicillamine. \* $p < 0.05$ , prueba de t-student, pareada. Se contabilizaron 36 células en n=2 réplicas.

## Efecto de 7-NI en la AE de pericitos

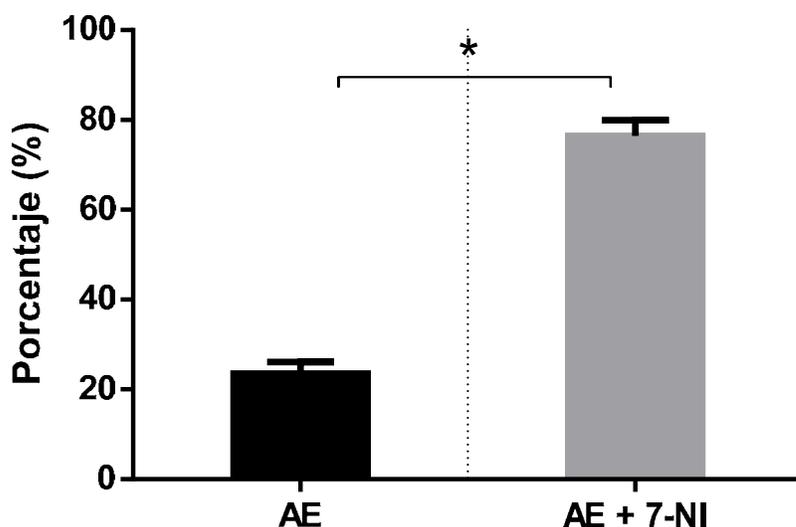


Figura 16. *Efecto de 7-NI en la AE de pericitos hipofisarios.* Porcentaje de pericitos con actividad espontánea (AE) y posterior a la incubación con el bloqueador de la NOS, 7-NI 200 $\mu$ M (AE + 7-NI). NOS, óxido nítrico sintetasa; 7-NI, 7-Nitroindazol. \* $p < 0.005$ , prueba de t-student pareada. Se contabilizaron 84 células en n=2 réplicas.

## Discusión

La aportación de esta tesis, debe ser vista como una aproximación más a la dilucidación de los elementos que participan en la formación de pulsos hormonales, desde el enfoque de la regulación del flujo sanguíneo por los pericitos.

Con base en nuestra perspectiva de estudio, el propósito más importante de esta tesis fue determinar si el factor hipotalámico GHRH regula la dinámica de la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos adenohipofisarios, dependiendo de la ubicación de éstos en la red vascular de la glándula.

Para ello, era primordial caracterizar en primer lugar la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  intrínseca, es decir AE, de los pericitos en ausencia del factor GHRH. Se observaron poblaciones de pericitos sin y con AE. Se identificaron dos tipos de patrones de AE, a los que se les denominó T y NT. En preparación de pericitos aislados, Wu y colaboradores<sup>25</sup>

correlacionaron el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  con la contracción del pericito y con la constricción del lumen capilar, por ello, la presencia de mesetas en los cambios de  $[Ca^{2+}]_i$  de las células con AE del tipo NT, permite pensar que estas células tienen un aumento de  $Ca^{2+}$  sostenido y que posteriormente baja. Esto supone que los pericitos con AE del tipo NT podrían mantener un mayor tono contráctil que aquellas que exhiben un patrón del tipo T, los cuales podrían tener un evento de contracción-relajación inmediato. Esto implicaría que tal vez aquellos pericitos que exhiben una AE del tipo NT, al mantener el tono contráctil están parcialmente contraídos, el diámetro capilar no está abierto o cerrado por completo, regulando la velocidad del flujo sanguíneo, redistribuyendo la presión sanguínea en los capilares de diferentes tamaños. Es permisible considerar que esta heterogeneidad en la actividad intrínseca de los pericitos es debida a la diferencia en la expresión de distintos elementos de señalización de calcio y/o filamentos contráctiles compuestos de vimentina y actina de músculo liso tipo alfa ( $\alpha$ SMA) dependientes de  $Ca^{2+}$ .

Dado lo anterior, fue imperioso identificar si existía una regionalización, es decir una distribución diferencial de los pericitos en los capilares de la zona rostral-ventral de la glándula según el tipo de patrón de AE que los pericitos exhiben. Para ello, primero se realizó la sectorización de la misma con base en las características anatómicas de los capilares que las constituyen y que fueron referidos como z1 y z2. Con base en los resultados obtenidos, a pesar de que la distribución de pericitos silentes y con AE es similar en ambas zonas, se percibió que en la zona 1, es decir, aquella región más próxima a la entrada de la eminencia media a la hipófisis, con capilares largos con una sola ramificación evidente o sin ella, hay el doble de pericitos con AE del tipo NT (en semejanza con la z1, en la z2 se percibe una tendencia de mayor número de pericitos con NT). Al haber un predominio de pericitos con AE del tipo NT en la zona 1, éstos podrían estar manteniendo un tono contráctil para la redistribución de la circulación sanguínea hacia toda la glándula. En comunión con esta observación, se ha reportado que pericitos que se encuentran en la transición de arteriolas a capilares expresan una mayor concentración de proteínas contráctiles, lo cual sugiere que podrían estar actuando como un tipo de esfínter. <sup>26</sup>

Observamos que el factor GHRH ejerció dos tipos de efectos en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos: inhibición y activación. También se observaron pericitos en los que dicho factor no modificó la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  de estas células. El efecto del GHRH no estuvo relacionado al tipo de patrón de AE, es decir, que sin importar el tipo de AE que se presentara, podían activarse, inhibirse o no modificar su actividad. Esto podría implicar que la respuesta no necesariamente depende del estatus contráctil previo, sino posiblemente del estatus de los reservorios intracelulares de  $Ca^{2+}$ ; y que el efecto es independiente, es decir, no se anula el mecanismo de acción intrínseco con el mecanismo de acción que pudiese tener el GHRH en el pericito.

De manera notable, la z1 está constituida por una mayor cantidad de pericitos que se activan, en cambio en la z2, la población inhibida fue mayor. Es decir, que la zona de entrada de la glándula tenemos más pericitos que se activan, y en el resto de la glándula más que se inhiben. Ello podría traducirse entonces, en que los pericitos de la entrada se estarían contrayendo y modulando el flujo sanguíneo disminuyendo la velocidad del mismo. El efecto contrario pasaría en la z2, donde tenemos el grueso del parénquima de la glándula y a la mayoría de los somatotropos, al inhibirse el pericito estaría éste relajándose, incrementando el lumen del capilar y por ende el flujo sanguíneo, y así podría llegar la sangre con mayor rapidez al resto de la glándula, e incrementar el suplemento de oxígeno, propiciando en parte una respuesta celular coordinada. Se ha observado que tanto los gonadotropos como los somatotropos están en estrecha proximidad con los capilares de la glándula en distintas regiones de la misma<sup>17</sup>, ocupando los gonadotropos preferencialmente la z1 y los somatotropos la z2, lo cual concuerda con los resultados previamente mencionados. De hecho, Laffont y colaboradores<sup>15</sup> reportaron que al administrar GHRH estimularon la actividad de la red de somatotropos y la secreción de GH, y que esto tuvo una asociación temporal con el incremento en la tasas de flujo sanguíneo y el suministro y consumo de oxígeno.

Así pues, se ha descrito que agentes vasoactivos, como por ejemplo el NO, son capaces de modular localmente el flujo sanguíneo a través de su efecto en la actividad contráctil de los pericitos.<sup>9</sup> En la hipófisis existen diversas fuentes que pueden

producir NO, como somatotropos y gonadotropos que expresan la nNOS, más aun, se ha relacionado que la GH secretada induce la liberación de NO por las células endoteliales.<sup>27</sup> Por ello, estudiamos la posible relación entre la actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  de los pericitos y el NO, mediante la exacerbación de la producción de NO con el donador SNAP, o su ablación con el bloqueador de NOS 7-NI. Observamos que al aumentar la producción de NO, más del triple de la población de pericitos que presentaba AE se inhibió, por el contrario, al bloquear a la enzima se triplicó la población de pericitos con AE. Cobra sentido este resultado, ya que los somatotropos están en alta proximidad con los capilares, y por ende el pericito está sujeto a la acción de NO producido por la eNOS (células endoteliales) y la nNOS (gonadotropos, somatotropos, lactotropos, células folículo estrelladas).<sup>18</sup> El por qué no se hayan inhibido todos los pericitos al producir el NO puede deberse a diversas causas; podría ser que las células próximas a estos pericitos tuviesen una expresión diferencial de estas enzimas, o que éstas no se encontraran en su forma activa, por ejemplo, que no estuviese la eNOS de las células endoteliales vecinas en la membrana plasmática<sup>28</sup>; o que se obedezca a un gradiente de concentración del mismo. Así pues, la producción de NO presenta diversos mecanismos por las que puede ser regular<sup>28</sup>, por lo tanto, no resulta difícil suponer que toda la población debiese ser inhibida/activada y que al menos la principal vía de inhibición de la actividad de  $Ca^{2+}$  de los pericitos es por NO.

La generación de un pulso hormonal envuelve un contexto de asociación funcional entre las redes de células endócrinas y el flujo sanguíneo.<sup>9</sup> El desarrollo de técnicas *in vivo*, así como el uso de animales transgénicos que permiten visualizar tipos celulares, permitirá que se realicen estudios más finos, que podrán integrar con mayor facilidad variables que ayuden a identificar los mecanismos que subyacen la regulación del flujo sanguíneo dentro del microambiente tisular.

## Conclusión

De esta tesis se puede concluir, que los pericitos presentan cambios intrínsecos en su  $[Ca^{2+}]_i$ , que pueden ser de forma transitoria o no transitoria, habiendo una distribución diferencial de los pericitos que exhiben la actividad del tipo no transitorio dentro de la red vascular adenohipofisaria. Además, los pericitos modifican, activando o inhibiendo su dinámica de actividad de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo del factor hipotalámico GHRH, habiendo una regionalización de pericitos que se activan en la entrada de la vascularización capilar en la adenohipófisis, y que la inhiben en el resto de ésta. El efecto evocado por el GHRH no está relacionado al tipo de patrón de AE. Además, al estimular/inhibir la producción de óxido nítrico, la población de pericitos con AE se incrementa/disminuye, respectivamente.

## Literatura citada

1. Hodson, D.J., Molino, F., Fontanaud, P., Bonnefont, X. & Mollard, P. Investigating and modelling pituitary endocrine network function. *J Neuroendocrinol* **22**, 1217-1225 (2010).
2. Dasen, J.S. & Rosenfeld, M.G. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 327-55 (2001).
3. Hodson, D.J. & Mollard, P. Navigating pituitary structure and function - defining a roadmap for hormone secretion. *J Neuroendocrinol* **25**, 674-5 (2013).
4. Amar, A.P. & Weiss, M.H. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am* **14**, 11-23, v (2003).
5. Schaeffer, M., Hodson, D.J., Lafont, C. & Mollard, P. Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *J Mol Endocrinol* **47**, R59-66 (2011).
6. Bilezikjian, L.M., Blount, A.L., Leal, A.M., Donaldson, C.J., Fischer, W.H. & Vale, W.W. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* **225**, 29-36 (2004).
7. Melmed, S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 257-266 (2011).
8. Yeung, C.M., Chan, C.B., Leung, P.S. & Cheng, C.H. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1441-9 (2006).
9. Hodson, D.J., Romano, N., Schaeffer, M., Fontanaud, P., Lafont, C., Fiordelisio, T. & Mollard, P. Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ. *Cell Calcium* **51**, 222-30 (2012).
10. Melmed, S. The pituitary (Academic Press, Amsterdam ; Boston, 2011).
11. Walker, J.J., Terry, J.R., Tsaneva-Atanasova, K., Armstrong, S.P., McArdle, C.A. & Lightman, S.L. Encoding and Decoding Mechanisms of Pulsatile Hormone Secretion. *Journal of Neuroendocrinology* **22**, 1226-1238 (2010).
12. Bonnefont, X. et al. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16880-5 (2005).
13. Sartor, O., Bowers, C.Y. & Chang, D. Parallel studies of His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub> and human pancreatic growth hormone-releasing factor-44-NH<sub>2</sub> in rat primary pituitary cell monolayer culture. *Endocrinology* **116**, 952-7 (1985).
14. Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S. & Catt, K.J. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends Endocrinol Metab* **7**, 56-9 (1996).
15. Lafont, C. et al. Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4465-70 (2010).
16. Le Tissier, P.R., Hodson, D.J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M. & Mollard, P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* **33**, 252-66 (2012).
17. Mollard, P., Hodson, D.J., Lafont, C., Rizzoti, K. & Drouin, J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 261-9 (2012).
18. Schaeffer, M., Hodson, D.J., Lafont, C. & Mollard, P. Functional importance of blood flow dynamics and partial oxygen pressure in the anterior pituitary. *Eur J Neurosci* **32**, 2087-95 (2010).
19. Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O'Farrell, F.M., Buchan, A.M., Lauritzen, M. & Attwell, D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55-60 (2014).

20. Kostic, T.S., Andric, S.A. & Stojilkovic, S.S. Receptor-controlled phosphorylation of alpha(1) soluble guanylyl cyclase enhances nitric oxide-dependent cyclic guanosine 5'-monophosphate production in pituitary cells. *Molecular Endocrinology* **18**, 458-470 (2004).
21. Gonzalez-Hernandez, T. & Gonzalez, M.C. Gender differences and the effect of different endocrine situations on the NOS expression pattern in the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* **48**, 1639-48 (2000).
22. Tsumori, M., Murakami, Y., Koshimura, K. & Kato, Y. Growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone stimulate nitric oxide production in 17beta-estradiol-primed rat anterior pituitary cells. *Endocrine* **17**, 215-8 (2002).
23. Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D.M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K. & Puro, D.G. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* **551**, 787-99 (2003).
24. Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P. & Attwell, D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700-4 (2006).
25. Wu, D.M., Kawamura, H., Sakagami, K., Kobayashi, M. & Puro, D.G. Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H2083-90 (2003).
26. van Dijk, C.G., Nieuweboer, F.E., Pei, J.Y., Xu, Y.J., Burgisser, P., van Mulligen, E., el Azzouzi, H., Duncker, D.J., Verhaar, M.C. & Cheng, C. The complex mural cell: pericyte function in health and disease. *Int J Cardiol* **190**, 75-89 (2015).
27. Boger, R.H. Nitric oxide and the mediation of the hemodynamic effects of growth hormone in humans. *J Endocrinol Invest* **22**, 75-81 (1999).
28. Bredt, D.S. & Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**, 175-95 (1994).