



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LOS PATRONES DE Ca^{2+} INTRACELULAR
GENERADOS POR EL ESTÍMULO DE GnRH EN REBANADAS
DE HIPÓFISIS DE RATÓN MACHO CASTRADO E
INYECTADO CON ESTRADIOL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARIA LUISA DURÁN PASTÉN



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

(2008)



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

Formato	
1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Durán Pastén Maria Luisa 56 71 76 46 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300017991
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dra. Tatiana Fiordelisio Coll
3. Datos del sinodal co-tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del co-tutor Dr. Arturo Hernández Cruz
4. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 1 Dra. Maria Luisa Fanjul Peña
5. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 2 Dr. Román Vidal-Tamayo Ramírez
6. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 3 Biol. José Aquiles Bernal Moreno
7. Datos del trabajo escrito. Título Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito Estudio de los patrones de Ca ²⁺ intracelular generados por el estímulo de GnRH en rebanadas de ratón macho castrado e inyectado con estradiol. 45 p 2008

Todos mis anhelos tienen tu color
Tienen el latido de tu corazón
Yo no quiero nada sin tu dirección

Todos mis anhelos son de ti Señor
Todos mis sueños tienen tu pasión
No me importa nada solo tu favor.

J. A. Romero.

A mi padre que está en los cielos,
todo lo que soy es por ti.

A la mujer que más amo.
Cada logro en mi vida lo debo a ti mamá.
Te amo inmensamente.
Gracias!!!

AGRADECIMIENTOS

Mi infinito agradecimiento al Dr. Arturo Hernández, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por el tiempo, la paciencia, la confianza y los recursos invertidos en mí. Muchísimas gracias!!!!.

Tatiana, mil gracias por siempre estar dispuesta a enseñarme, por compartir tu tiempo tu conocimiento y por depositar en mí tu confianza, sin tu ayuda no lo hubiera logrado, siempre te estaré agradecida.

A cada uno de los revisores de este trabajo: Dr. Román Vidal-Tamayo, Dra. María Luisa Fanjul, Biol. Aquiles Bernal, gracias por cada una de sus observaciones.

A la Dra. Claudia Rivera, por su ayuda con las cirugías y por sus enseñanzas.

A Claudia Sánchez por ayudarme a montar la técnica de rebanadas.

Hermana...te amo, gracias por siempre estar conmigo, cada logro es gracias a tu apoyo.

Alex y Sofi, ustedes son parte fundamental en mi vida.

Andre, Adolfo, Suny y Zair, son y siempre serán un tesoro para mí.

Quetza, cada día doy gracias por los momentos que pasamos juntas, cada uno de ellos me ha ayudado a crecer.

Giuseppe, eres el mejor amigo que pude encontrar, agradezco el haberte conocido.

Calos y Lourdes sin su apoyo, comprensión y consejos no lo hubiera logrado, los amo.

Anaid, Ricardo, Fernando, Wendy, Miriam, Raquel, Adriana y Abraham, cada experiencia con ustedes durante estos años ha sido inolvidable.

A mis compañeros de laboratorio: Mariana, Pedro, Claudia, Nicolás, Adán Hdz, Omar, Adán L. y Eduardo han sido fundamentales para llegar hasta este momento

A todos ustedes...Mil Gracias!!!

ÍNDICE

1. Introducción.	
1.1 Hipófisis	1
Importancia fisiológica	1
Irrigación	3
1.2 Adenohipófisis	4
Factores de regulación hipotalámica	5
1.3 Gonadotropos	7
Secreción de LH y FSH	7
Acción de las gonadotropinas en macho	8
Estradiol y testosterona	8
1.4 El GnRH	9
Receptores de GnRH	9
Desensibilización	11
Sensibilización al GnRH o “Self Priming”	12
1.5 Dinámica de la actividad de calcio intracelular	12
Efectos de la castración en los patrones de señalización de calcio intracelular.	15
1.6 Rebanadas de Adenohipófisis	16
2. Objetivos	17
3. Hipótesis	17
4. Material y Método	18
Castración	18
Tratamiento con estradiol	18
Obtención de rebanadas de hipófisi	19
Obtención de registros de calcio intracelular en rebanadas de hipófisis.	19
Sustancias utilizadas	20
Análisis de resultados	20
5. Resultados	21
Rebanadas de hipófisis de ratón macho normal	22
Rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado	27

Rebanadas de ratón macho castrado e inyectado con estradiol.	29
6. Discusión	32
Ubicación espacial de las células con respuesta a GnRH	32
Número de células que responden a GnRH	32
Células que responden según la dosis de GnRH	33
Caracterización de la respuesta de calcio intracelular a diferentes dosis de GnRH	33
Actividad espontánea	33
Respuesta a diferentes dosis	33
7. Conclusiones	36
8. Perspectivas	37
9. Referencias	38

1. INTRODUCCIÓN.

1.1-Hipófisis

Importancia fisiológica.

La hipófisis o glándula pituitaria es un importante componente del sistema endocrino, y junto con el hipotálamo, juega un papel crucial en numerosas funciones endocrinas y no endocrinas del organismo, estableciendo un puente entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino (1). El hipotálamo regula positiva y/o negativamente la síntesis y secreción hormonal de la hipófisis a través de la liberación de varias hormonas tróficas, las cuales actúan específicamente sobre ciertos tipos celulares en la hipófisis, que a su vez secretan una variedad de hormonas esenciales para el crecimiento, desarrollo, metabolismo, reproducción así como para el funcionamiento del sistema nervioso (1). La complejidad anatómica de la glándula se debe a que posee un origen embrionario doble; el ectodermo que origina la adenohipófisis a partir de la formación de la bolsa de Rathke, al invaginarse hacia atrás y hacia arriba de la cavidad oral del organismo, y la neurohipófisis, que se forma de la evaginación del neuroectodermo del piso del tercer ventrículo y llega a conectarse con la bolsa de Rathke.

Ubicación y distribución anatómica

La hipófisis se encuentra ubicada en la silla turca, en la base de la cavidad craneal, está unida al hipotálamo por medio del *tallo infundibular*. El tallo infundibular es la zona de paso de las fibras neurosecretoras peptidérgicas que terminan en los capilares de la *pars nervosa*. Esta última está compuesta en un 42% de los axones provenientes de las neuronas de los núcleos paraventricular y el supraóptico del hipotálamo que sintetizan entre otras, dos hormonas peptídicas, la oxitocina (OX) y la hormona antidiurética o vasopresina (ADH o VP). Tomando en cuenta las diferentes nomenclaturas utilizadas, podríamos esquematizar que la glándula hipofisiaria se divide en:

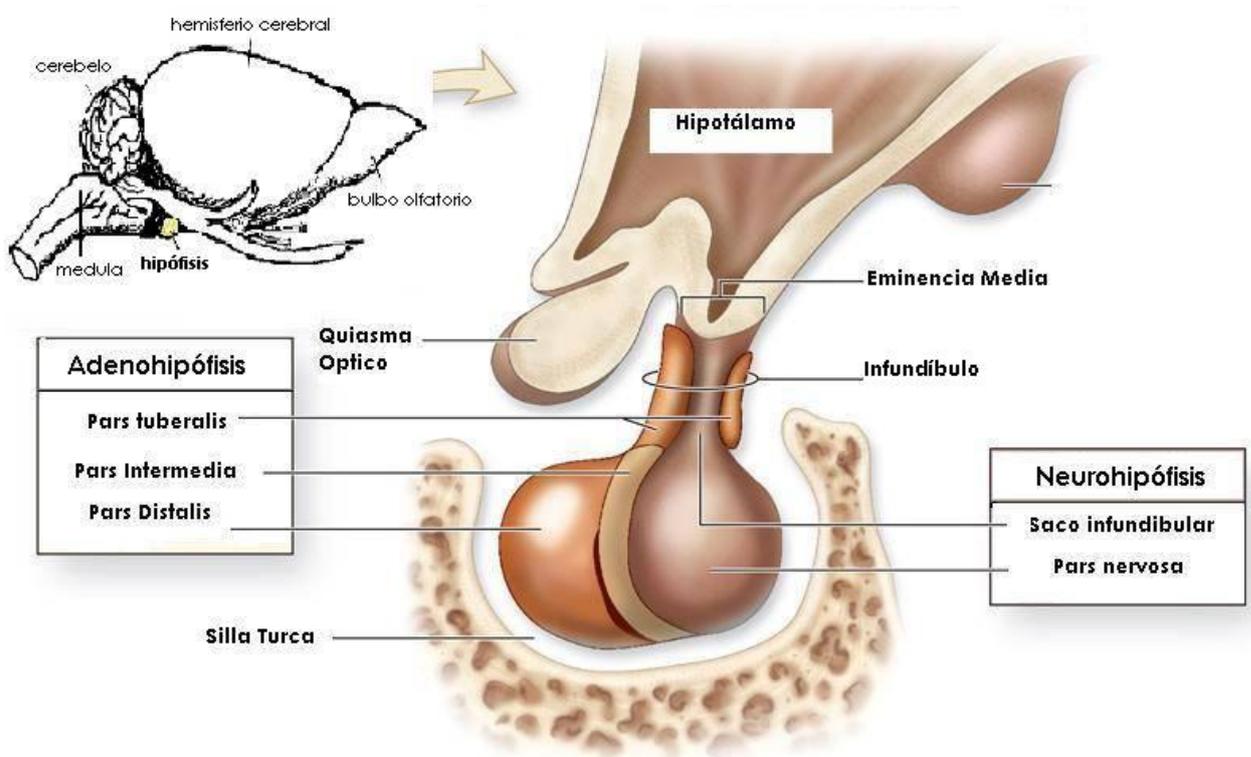
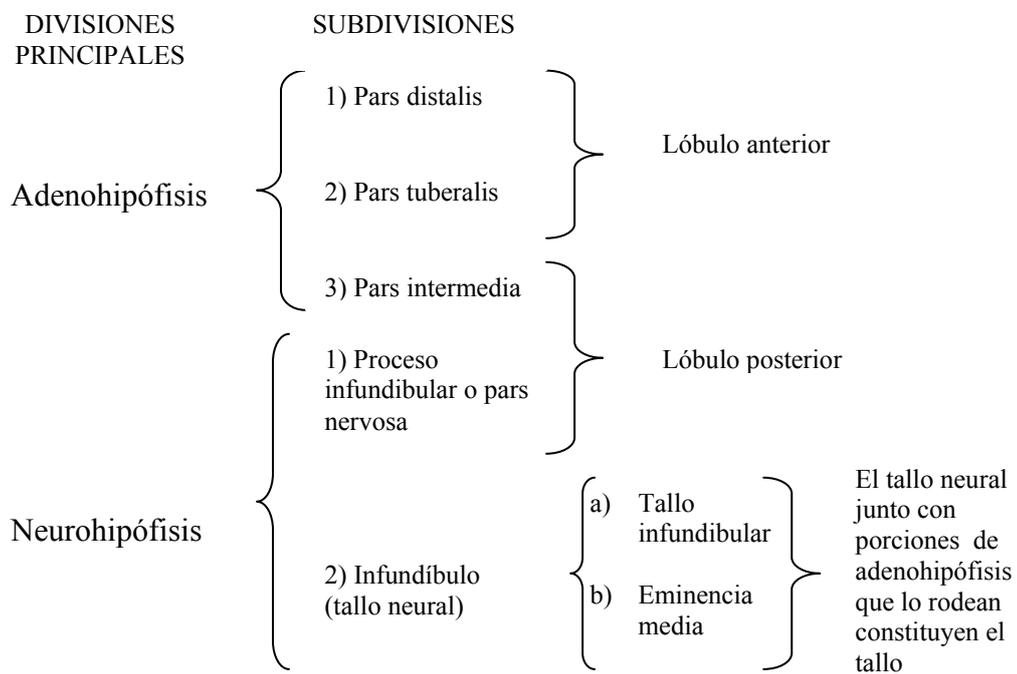


Figura 1. Ubicación y componentes de la glándula hipófisis en mamíferos. Modificado de Human Anatomy The McGraw-Hill Companies, Inc.

Entre el lóbulo posterior y el anterior, se encuentra una delgada lámina de tejido conocida como lóbulo intermedio, *pars intermedia* cuando es tomado como parte de la adenohipófisis o lóbulo neuro-intermedio cuando se encuentra fusionado al lóbulo posterior. Esta porción de la glándula se encuentra directamente inervada por las neuronas hipotalámicas. La mayor porción de células corresponden a melanotropos, células que producen el precursor de la proopimelanocorticotropina (POMC) que en el caso de los melanotropos se divide posteriormente en β -endorfina y α -hormona estimulante de melanocitos (2).

El lóbulo anterior o adenohipófisis (AH), esta dividido en *pars tuberalis* que comprende una pequeña porción del lóbulo que se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencéfalo y *pars distalis*, en la cual se encuentra la mayor parte del tejido endocrino hipofisiario.

La células de la *pars distalis* se pueden dividir en general en dos grandes categorías: las que secretan hormonas proteicas y aquellas cuya secreción hormonal es gluco-proteica.

Irrigación

La irrigación sanguínea en la adenohipófisis es de suma importancia, no sólo por su función de secreción endocrina hacia el resto del organismo, sino que además, debido a que no se encuentra directamente inervada, este es el principal medio por el cual se regula su función. La adenohipófisis está irrigada por vasos porta que conectan entre sí dos lechos capilares (uno en la zona externa de la eminencia media y otro en la adenohipófisis) a lo que se denomina sistema *porta-hipofisiario*. Al estar los capilares porta primarios en íntimo contacto con las terminales axónicas que provienen no sólo del núcleo arcuato sino de otras zonas del hipotálamo basal y medial (área hipofisiotrópica) estos axones pueden descargar a la luz de los capilares neurohormonas (estimuladoras o inhibitoras), que al viajar en forma descendente por el sistema porta actúan sobre la adenohipófisis.

La irrigación comienza por medio de las arterias hipofisiarias superiores, las cuales se anastomosan y se capilarizan a nivel de la eminencia media, especialmente en la zona

externa y también en el extremo superior del tallo infundibular. Estos capilares constituyen el plexo capilar primario del sistema porta-hipofisiario y son los que entran en contacto con los numerosos terminales axónicas neurosecretorios aminérgicos del sistema arcuato-eminencia media. Los capilares vuelven a unirse en vasos porta largos que corren principalmente por la cara anterior del tallo y se dirigen a la *pars distalis* donde vuelven a formar capilares, que contactan íntimamente con las células parenquimatosas de la *pars distalis* constituyendo así el plexo capilar secundario del sistema porta-hipofisiario (5).

La neurohipófisis esta irrigada por las arterias hipofisarias inferiores originadas también de las arterias carótidas internas, las cuales se dirigen hacia el plano medial para formar un anillo que rodea la neurohipófisis. De este anillo salen pequeños vasos capilares donde terminan los axones del sistema supraóptico-paraventriculo-neurohipofisiario. En la neurohipófisis existen además pequeños vasos que se dirigen hacia la *pars distalis*, donde terminan anastomosándose con los capilares adenohipofisarios, constituyendo los vasos porta cortos (5).

1.2 Adenohipófisis.

Las células de la adenohipófisis fueron originalmente clasificadas basándose en el tipo de tinción de hematoxilina-eosina que presentan, esto es en cromóforas, acidófilas o basófilas. En la actualidad las células han sido reclasificadas en somatotropos, lactotropos, corticotropos, tirotropos y gonadotropos, de acuerdo al tipo de hormona que secretan. Además de estos tipos celulares de carácter secretor en la glándula se encuentran las células foliculo estrelladas que tienen funciones de comunicación intercelular a lo largo de toda la glándula (1).

Las células acidófilas son de tres tipos: somatotropos que secretan hormona de crecimiento GH, lactotropos que secretan prolactina PRL, lactosomatotropos (secretan GH y PRL) y corticotropos, que secretan adenocorticotropina ACTH. Las células basófilas agrupan a: los tirotropos (secretan tirotropina, TSH) y gonadotropos (secretan hormona luteinizante, LH, y/o foliculo estimulante, FSH). La proporción de cada uno de estos tipos celulares pueden variar en el adulto y sobre todo en las hembras en hasta un 10% dependiendo de la edad y la etapa del ciclo reproductivo, siendo en promedio: 42%

somatotropos, 28% lactotropos, 5% tiotropos, 10% corticotropos y 15% gonadotropos (Tabla 1; 3).

Tabla 1. Tipos celulares adenohipofisarios, porcentaje promedio total de la población celular en rata y principales funciones			
TIPO CELULAR	PROMEDIO EN LA POBLACION (%)	HORMONA	FUNCION
Melanotropos		Melanotropina (MSH)	Regula síntesis de melanina en melanocitos y melanóforos
Corticotropos	10	Corticotropina (ACTH)	Regula el crecimiento y la secreción en la corteza adrenal.
Somatotropos	42	Somatotropina (GH)	Estimula el crecimiento y desarrollo somático postnatal. Regula metabolismo de proteína, carbohidratos y grasas.
Lactotropos	28	Prolactina (PRL)	Relacionada con actividad lactogénica , metabolismo lipídico y efectos sobre el sistema inmunológico.
Tiotropos	5	Tiotropina (TRH)	Regula crecimiento y metabolismo de la glándula tiroidea.
Gonadotropos	15	Folículo estimulante. Luteinizante (LH y FSH)	Relacionadas con los procesos reproductivos y de secreción de hormonas sexuales esteroideas.

Factores de regulación hipofisaria

La hipófisis puede regularse a través de asas de retroalimentación conocidas como largas y cortas, dentro de la regulación “corta” están los mecanismos autocrinos y paracrinos que varían de acuerdo a las necesidades fisiológicas del organismo. Es decir que muchas de las células adenohipofisarias poseen receptores para las hormonas que secretan o receptores para otro tipo de factores como los tróficos que son secretados por las propias células hipofisarias. El asa de retroalimentación larga participan principalmente la regulación que los productos, en su mayoría hormonales, de los órgano blanco tienen sobre la glándula; por ejemplo, la síntesis y secreción de las

hormonas esteroideas esta regulada por LH y FSH y la secreción de estas hormonas en la hipófisis es a su vez afectada por las hormonas sexuales.

El hipotálamo juega un papel sumamente importante en la regulación de las funciones de la glándula pituitaria. Mediante la formación de un conjunto de sustancias denominadas “factores liberadores o inhibidores de hormona” que llegan a la glándula pituitaria a través del sistema porta-hipofisiario.

Los factores hipotalámicos son capaces de regular la secreción hormonal actuando para ello sobre la liberación y la síntesis de las mismas. Tienen una vida media corta en la circulación y actúan rápidamente en sus células blanco. Entre los principales se encuentran los siguientes (5):

- **TRH:** hormona liberadora de tirotropina. Estimula la síntesis y liberación de TSH y prolactina.
- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas. Estimula la síntesis y liberación de LH y FSH.
- **GHRH:** hormona liberadora de GH. Estimula la síntesis y liberación de hormona de crecimiento.
- **Somatostatina:** SRIF, inhibe la liberación de GH.
- **CRH:** hormona liberadora de corticotropina. Estimula la síntesis y liberación de ACTH.
- **Dopamina:** inhibe la liberación de prolactina.

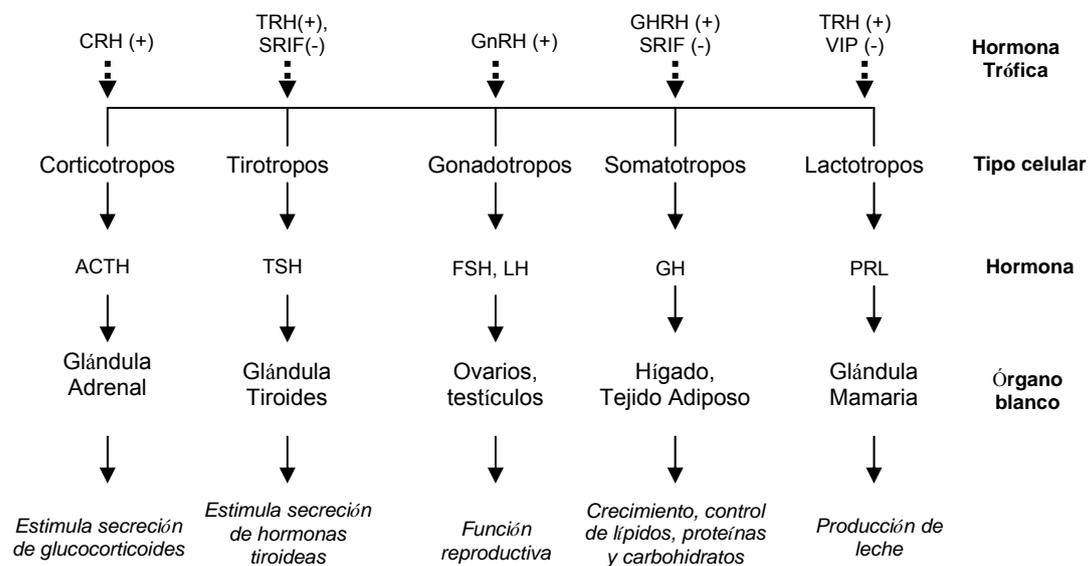


Fig.2. Esquema de la regulación de la función endocrina de la glándula pituitaria. Factores tróficos, tipos celulares de la hipófisis anterior y sus secreciones hormonales. El signo (+) indica estimulación el signo (-) indica inhibición.

1.3 Gonadotropos

Secreción de LH y FSH.

Como se menciono anteriormente, el lóbulo anterior está compuesto principalmente por cinco tipos celulares secretores, dentro de los cuales se encuentran los gonadotropos, que sintetizan las hormonas gonadotrópicas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante) al ser estimuladas por el secretagogo hipotalámico liberador de las gonadotropinas (GnRH; 1).

El control fisiológico de la secreción de GnRH hacia la hipófisis es pulsátil y la frecuencia de los pulsos regula el almacenamiento y secreción de las gonadotropinas.

Es bien conocido que la mayoría de los gonadotropos contiene ambas hormonas i.e. son bi-hormonales. Las dos hormonas se encuentran empacadas en gránulos de secreción separados (8), las células que solamente expresan LH o FSH son menos frecuentes (6, 7). La secreción de LH y FSH es en distintos tiempos y frecuencia y esta dada por la frecuencia de los pulsos de GnRH. Algunos estudios sugieren que la síntesis y secreción

de LH se estimula cuando la frecuencia de pulsos de GnRH es alta, mientras que la síntesis y secreción de FSH esta favorecida con frecuencias de pulso bajas (17, 18).

La LH es almacenada en los gonadotropos y su liberación ocurre a través de la secreción pulsátil de la hormona presintetizada que se encuentra almacenada en gránulos. Por lo tanto, su exocitosis está determinada por la frecuencia de los pulsos de GnRH. Por el contrario, la FSH es liberada principalmente a través de una ruta constitutiva, en la cual la mayor parte de la secreción ocurre como resultado de la alteración de la velocidad de síntesis, por lo que su exocitosis es esencialmente controlada por la expresión de genes y la disponibilidad de mRNA para la transcripción (6).

Acción de las gonadotropinas en el macho

Las gonadotropinas en el macho regulan la esteroidogénesis y la espermatogénesis en los mamíferos. La LH regula la producción de esteroides en las células de Leyding. Estos esteroides masculinos son requeridos para la espermatogénesis, pero su modo de acción aún se desconoce. A través de su acción en las células de Sertoli, la FSH asegura y estimula la proliferación y diferenciación de las espermatogonias. Este proceso frecuentemente involucra la producción del factor de crecimiento derivado de las células Sertoli conocido como "stem cell factor" (11).

Estradiol y testosterona

Los esteroides gonadales como la testosterona, la inhibina y el estradiol ejercen una retroalimentación sobre el hipotálamo y/o la glándula pituitaria para regular la secreción de GnRH y de las gonadotropinas.

Los esteroides gonadales alteran las características del pulso de GnRH, inhibiendo directamente en el hipotálamo su expresión y secreción, y consecuentemente disminuyendo la frecuencia de la liberación pulsátil de LH (9).

A nivel de la hipófisis, se ha visto que la exposición crónica a la testosterona (T) inhibe la secreción de LH (14), regulando la densidad y expresión de los receptores de GnRH

(21, 22). Por otro lado el estradiol puede inhibir la secreción de las gonadotropinas mediando la acción de GnRH en la pituitaria, más allá de ejercer un efecto directo sobre la transcripción de las subunidades de RNAm de los receptores de GnRH.

La testosterona y el estradiol también tienen un efecto directo de inhibición sobre la secreción de FSH (15).

Además de su bien descrita acción sobre la síntesis y secreción de la GnRH, las hormonas gonadales pueden regular los cambios en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por GnRH. En experimentos *in vitro* se ha visto que el estradiol regula la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por GnRH de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , así como la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, VOCC (voltage-operated calcium channels) (16).

1.4 El GnRH

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido sintetizado en el soma de las neuronas especializadas del hipotálamo a partir de un polipéptido precursor que pasa por un proceso enzimático, posteriormente es empacada y almacenada en gránulos que son transportados hacia la zona externa de la eminencia media. La mayoría de los vertebrados tienen al menos dos y usualmente tres formas de GnRH. La hormona es empacada en gránulos de almacenamiento que son transportados a través de los axones hasta la zona de la eminencia media y es liberada en pulsos sincronizados cada 30-120 minutos para estimular la biosíntesis y secreción de LH y FSH en los gonadotropos (13).

Mecanismo general de especificidad de la respuesta al GnRH

Receptores de GnRH

El GnRH actúa principalmente sobre el lóbulo anterior de la hipófisis a través de receptores específicos en la membrana plasmática de los gonadotropos. Cuando se produce la unión del GnRH a su receptor se desencadena una vía de segundos mensajeros que conllevan a la secreción y síntesis de gonadotropinas. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembranales acoplados a

proteínas G (GPCRs por sus iniciales en ingles; figura 3). El receptor para el GnRH (GnRH-R) fue identificado por primera vez en gonadotropos de la hipófisis; sin embargo, también se han identificado receptores locales de GnRH en varios tejidos como ovario, placenta, próstata y células endoteliales. De esta manera, la señalización intracelular de los GnRH-R puede cambiar dependiendo del tipo celular (19).

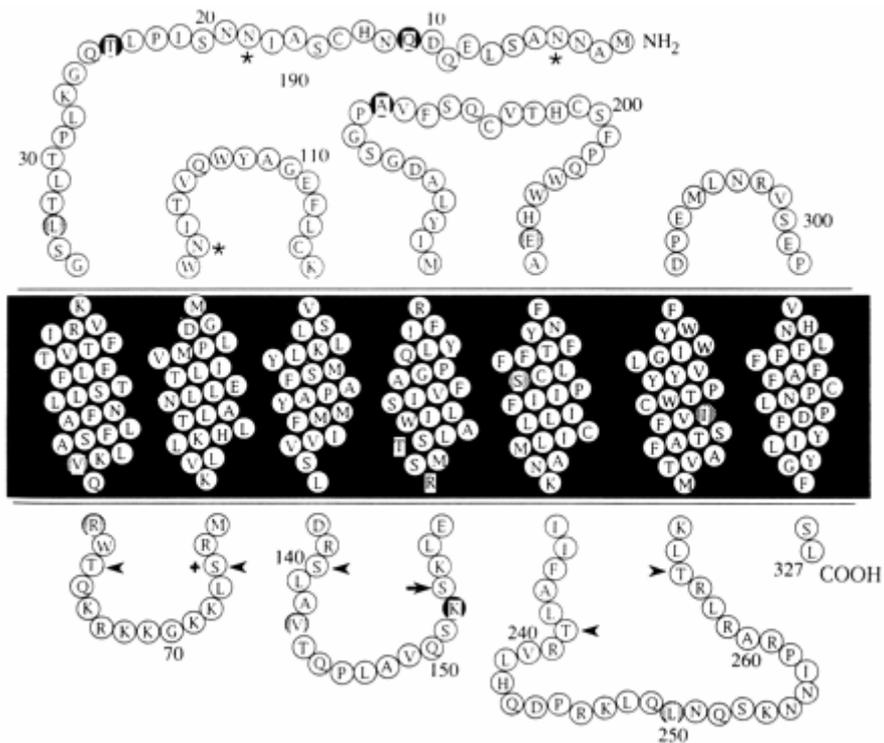


Fig. 3. Modelo estructural del GnRH-R. Los residuos de los aminoácidos en negro representan aminoácidos no conservados entre el GnRH-R de ratón y rata, I. Los asteriscos muestran los sitios potenciales de glicosilación. Sitios potenciales de fosforilación para la proteína cinasa C, están indicadas por las flechas, y para la proteína cinasa A están indicadas con una cruz. [Tomado de Kaiser et al.: Endocrine Reviews 19: 46-69 1997]

Debido a las diferentes variantes de GnRH en los vertebrados se ha sugerido que los receptores también varían y que su distribución depende del tejido y organismo. En este sentido se han identificado tres grupos de receptores de GnRH y se ha encontrado que difieren principalmente en la secuencia de aminoácidos de la tercer asa extracelular que juega un papel muy importante en la distinción de las diferentes formas de GnRH (40).

El primer grupo (GnRH-R tipo I) se encuentra distribuido únicamente en mamíferos y es resistente a la desensibilización ya que su internalización es muy lenta, mientras que

el segundo grupo (GnRH-R tipo II) se distribuye en la mayoría de los vertebrados, por lo que se sugiere que tiene un rol en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (40). Sin embargo, también se ha localizado en tejidos reproductivos como gónadas, próstata, endometrio/placenta y glándulas mamarias (40). Recientemente, se ha caracterizado un tercer tipo de receptor de GnRH en la rana toro (GnRH-R III) (40).

La respuesta de los gonadotropos al GnRH está directamente relacionada con el número de receptores en la superficie de la célula, lo cual es mediado, por lo menos en parte, por el nivel de expresión de los genes que codifican para los receptores de GnRH.

La actividad de los GnRH-R se altera durante diferentes procesos fisiológicos, como la lactancia y el ciclo estral. En este último caso, diversos factores endocrinos juegan un papel directo en la regulación del número de receptores, así como de sus niveles de mRNA, por lo tanto factores como los esteroides gonadales, estradiol, progesterona, el GnRH en sí mismo, la inhibina y activina alteran la expresión génica de los GnRH-R (20).

La castración y las lesiones hipotalámicas también cambian el número de receptores en la membrana de los gonadotropos, el incremento en la densidad de GnRH-R en la hipófisis va acompañada de una rápida elevación de gonadotropinas en suero (20).

Desensibilización

La mayoría de los receptores asociados a proteínas G, sin importar el sistema efector al que están asociados, sufren una rápida desensibilización cuando se encuentran expuestos a sus agonistas, este es un mecanismo de regulación del número y la función de los receptores de membrana (36).

Los receptores unidos a proteínas G muestran dos tipos de desensibilización. La desensibilización homóloga, en la cual el receptor es activado por su agonista y se fosforila a través de una proteína cinasa (serina/treonina) impidiendo la unión de la proteína G y propiciando la unión de una β -arrestina que funge como mediador para la internalización del receptor y su posterior degradación (36). La desensibilización

heteróloga por otro lado, se da cuando un fármaco o agonista no específico bloquea la actividad del receptor (36).

La desensibilización es dependiente de la concentración y la duración del estímulo de GnRH. Una exposición alta ($\geq 100\text{nM}$) y continua de GnRH en gonadotropos produce una desensibilización, mientras que la administración pulsátil parece disminuir la desensibilización o incluso incrementar la sensibilidad (“self priming”) de los gonadotropos al GnRH (37).

Sensibilización al GnRH o “Self-Priming”

Bajo ciertas condiciones fisiológicas, la repetitiva estimulación de la hipófisis por una serie de pulsos de GnRH resulta en una potenciación marcada de liberación de gonadotropinas. Esta habilidad de estimulación repetitiva del GnRH para facilitar la responsividad de la pituitaria se le ha llamado “self-priming” y se ha relacionado con un cambio en el número de receptores a GnRH y en la expresión de genes que codifican para estos, así como para las gonadotropinas, también se ha observado una reorganización en el citoesqueleto para permitir a los gránulos de secreción de las gonadotropinas moverse a través del citoplasma (42).

1.5 Dinámica de la actividad de calcio intracelular

Las señales intracelulares de Ca^{2+} son de importancia crítica para el control de una gran variedad de funciones celulares, incluyendo excitabilidad, exocitosis y contracción, así como crecimiento, diferenciación y división celular. Las elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurren espontáneamente o en respuesta a un estímulo dado por un agonista y se producen por la entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos en la membrana plasmática y/o a partir de la liberación de reservorios intracelulares (2). La forma en que los cambios de la concentración de calcio citosólica regula esta gran variedad de procesos depende de la velocidad, amplitud y patrones espacio-temporal con que sucede (4).

Todas las células de la hipófisis exhiben actividad eléctrica espontánea. La mayoría de los gonadotropos presentan potenciales de acción espontáneos que involucran canales de calcio sensibles al voltaje, los cuales generan señales de Ca^{2+} en el interior de la células, así como la secreción basal de gonodotripinas. Estas oscilaciones espontáneas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, son de baja amplitud y la frecuencia con la que se presentan en un periodo de 3-20 minutos (41). Sin embargo, la principal liberación de gonadotropinas se lleva a cabo por la acción del GnRH a través del aumento en la concentración de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), producida por la activación de los receptores transmembranales que activan la fosfolipasa C a través de la vía de proteínas G, resultando en la hidrólisis de

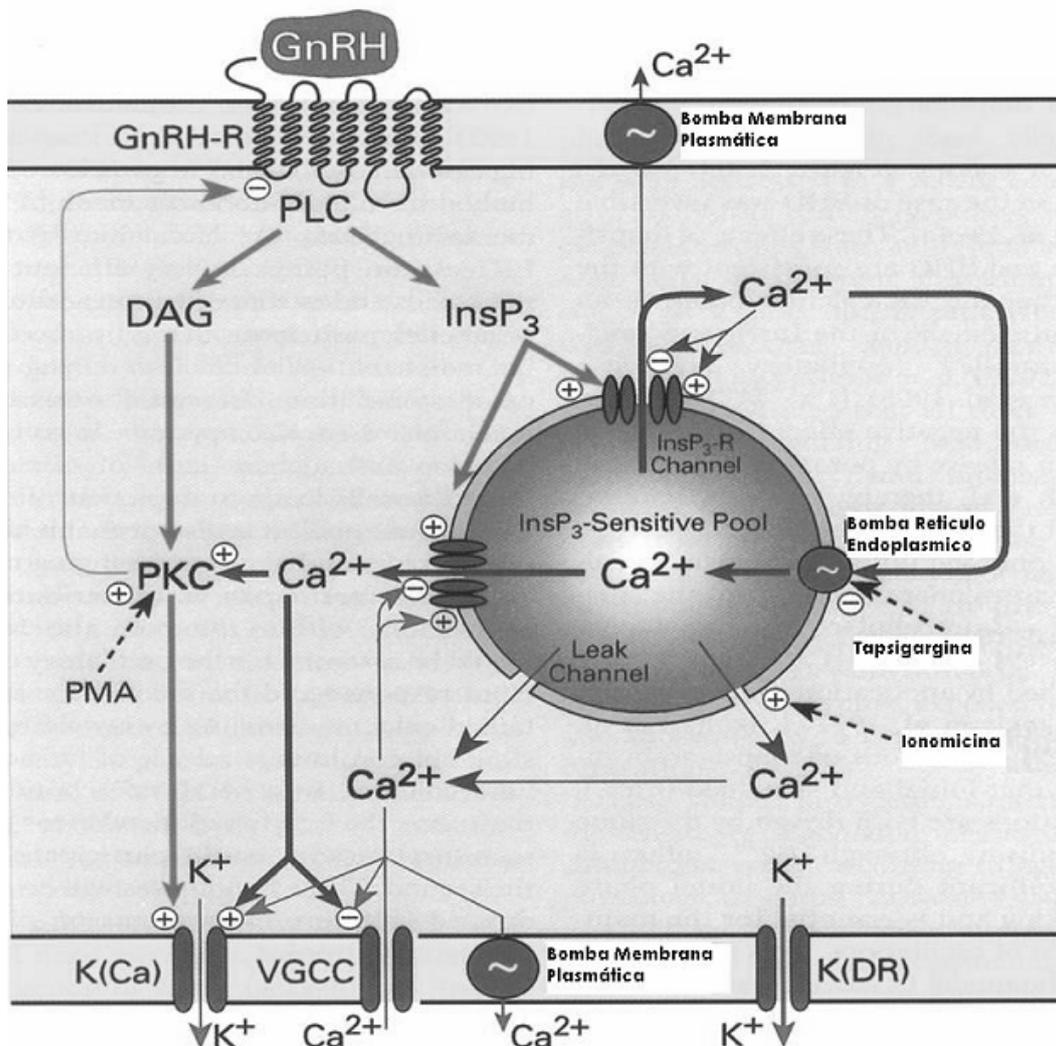


Figura 4. Representación esquemática de la señalización de Ca^{2+} en los gonadotropos de la glándula pituitaria. DAG diacilglicerol, InsP_3 Inositol trifosfato, InsP_3 -R receptor de inositol trifosfato, K(Ca) Canal de potasio controlado por calcio, PKC proteína quinasa C, PLC fosfolipasa C, PMA forbol 12-miristoato 13-acetato y VGCC canales de calcio activados por voltaje. (Tomado de Stojilkovic et al. TEM 1996 7(10):

4,5-bifosfato (PIP₂) para generar inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. El IP₃ se une a sus receptores en la membrana en los reservorios intracelulares, identificados como parte del retículo endoplásmico liso, dando como resultado en una substancial y rápida liberación de calcio, lo que se refleja en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.permitirá la apertura periódica y coordinada de los canales K⁺ de tal forma que la membrana se hiperpolariza repetitiva y transitoriamente. Estas oscilaciones en el potencial de membrana a su vez, abren y cierran otros canales iónicos sensibles a voltaje, incluyendo los de Na⁺ y Ca²⁺, resultando en la entrada de calcio a través de la membrana plasmática.

El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la unión del GnRH a su receptor se puede dividir en dos fases: la fase inicial, que consiste en la producción rápida de una espiga, la cual se debe principalmente a la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares, y la segunda fase, que consiste en una meseta sostenida, que gradualmente declina hasta llegar a la $[Ca^{2+}]_i$ pre-estimuladora. Esta segunda fase se debe primordialmente al flujo de Ca²⁺ desde el exterior de la célula a través de los canales de Ca²⁺ dependientes del voltaje de la membrana (véase la Figura 4) (23). El patrón de frecuencia y amplitud del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos depende de la concentración de GnRH aplicada. En experimentos realizados *in vitro*, se ha establecido que estos patrones se pueden clasificar en tres tipos (figura 5): a) respuestas de bajo umbral (<0.1 nM GnRH), de subida y bajada rápida en los cuales la $[Ca^{2+}]_i$ presenta una amplitud baja ($\leq 0.4 \mu\text{M}$); b) respuestas oscilatorias, que se presentan a concentraciones de 0.1 a 10 nM de GnRH en donde se observan oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ de amplitud $\geq 1 \mu\text{M}$, y c) respuestas “transitorias” definidas como bifásicas de incremento alto y sin oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ pero con una meseta, que se observan a concentraciones mayores de GnRH (>10 nM) (24, 26).

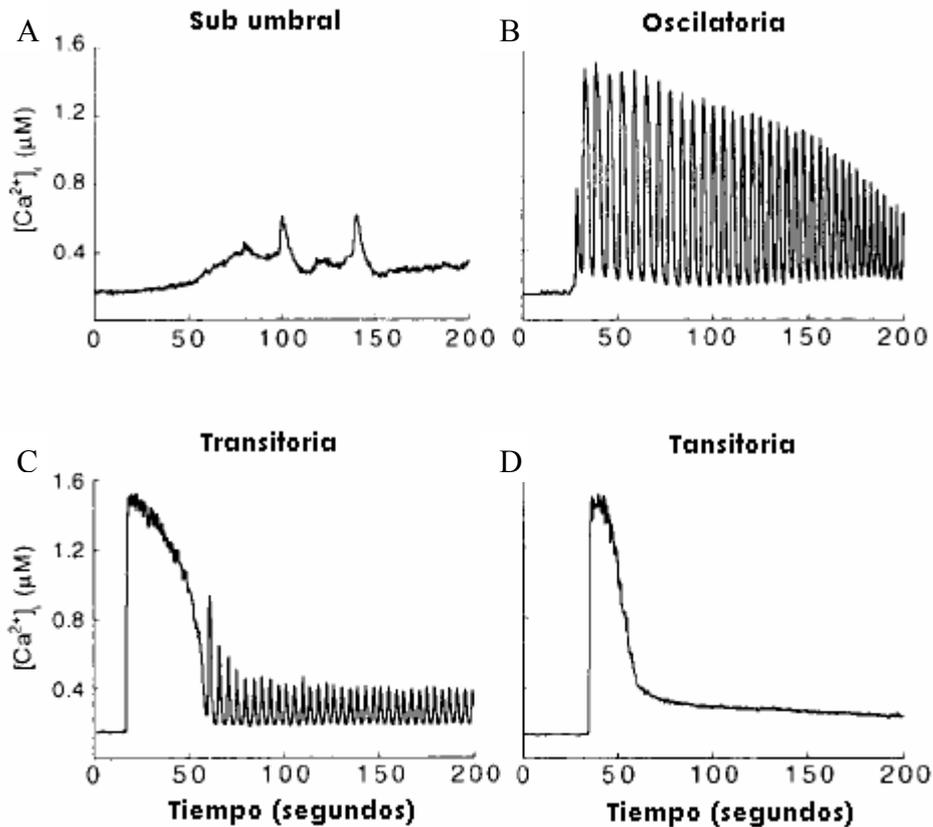


Figura 5. Patrones típicos de respuesta de Ca^{2+} al estímulo con GnRH. (A) respuesta sub umbral (B), oscilatoria (C y D) dos tipos de respuesta transitoria. Modificado de Tomić et al. *Endocrinology* 135 (5):1762-1771. 1994

Se ha demostrado que la proporción de gonadotropos que muestran respuestas espiga-meseta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ esta relacionada con la proporción de células que secretan LH, sugiriendo que la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ espiga-meseta estimula una mayor secreción, mientras la respuestas oscilatorias podrían estar envueltas en otras funciones celulares (23).

Efectos de la castración sobre los patrones de señalización de $[\text{Ca}^{2+}]$

Tobin y colaboradores demostraron que después de la castración, las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por GnRH en gonadotropos en cultivo de ratas macho cambian, así como el papel que desempeñan los esteroides y los factores gonadales en la regulación de estas señales de calcio. La relación entre la concentración de GnRH y el tipo de respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se altera después de la remoción de los factores gonadales, ya que a bajas concentraciones de GnRH (1 μM) se observa un cambio de respuestas de tipo mixtas (en ratas no castradas) a respuestas de tipo oscilatorias en la mayoría de los gonadotropos de ratas castradas. También se ha observado que este cambio en el

número de gonadotropos que responden de forma oscilatoria a bajas dosis se da de forma paulatina durante los primeros días después de la castración y que posteriormente se mantiene constante (23, 16).

1.6 Rebanadas de adenohipófisis

Se ha observado que el comportamiento de algunos tipos celulares endocrinos de la hipófisis se ve modificado cuando se estudia dentro de su contexto tisular (27). Algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de examinarlos dentro de este contexto. Recientemente se han desarrollado aproximaciones metodológicas que buscan estudiar de manera más integral la regulación y coordinación en los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y secreción hormonal, utilizando para ello la técnica de registro en rebanadas frescas de hipófisis, que ofrece la ventaja de estudiar a las células dentro de su contexto tisular, conservando de esta manera las interacciones entre las células, así como su ubicación y distribución. Esta caracterización se ha llevado a cabo principalmente en somatotropos, revelando que estas células se distribuyen en forma de red a lo largo de toda la hipófisis y que los patrones transitorios de respuesta de calcio generados por los somatotropos en tejido son más pequeños que los observados en células en cultivo (27).

Casi todos los estudios de los que se dispone actualmente sobre gonadotropos, se han llevado a cabo en células en cultivo. Sin embargo, con la finalidad de estudiar este tipo de células de forma integral en su contexto tisular, durante los últimos 5 años en el laboratorio del Dr. Arturo Hernández se implementó el estudio con técnicas ópticas de las respuestas inducidas por la aplicación de GnRH en células individuales, en rebanadas de hipófisis de rata y ratón macho, caracterizando así los patrones de respuesta de las $[Ca^{2+}]_i$.

2. OBJETIVOS

- a) Observar la distribución en la hipófisis anterior de los gonadotropos que responden al secretagogo GnRH en ratones normales, así como ratones castrados y ratones castrados e inyectados con estradiol

- b) Observar los efectos de la remoción de los factores gonadales sobre los patrones de respuesta de los gonadotropos a la aplicación de GnRH.

- c) Observar si el patrón de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, varía de acuerdo a la condición fisiológica en la que se encuentre el organismo, esto es después de la castración y del subsiguiente tratamiento con esteroides gonadales como el estradiol (feminización).

3. HIPÓTESIS.

La hipótesis de este trabajo es que en respuesta a la castración y a la castración con la aplicación de esteroides gonadales, los gonadotropos alterarán su patrón de señalización de $[Ca^{2+}]_i$, en respuesta al GnRH.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los estudios con animales se realizaron bajo un protocolo institucionalmente aceptado similar a la Guía de USPH para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Castración

Con el fin de evaluar los efectos de la castración, tres ratones machos Balb-C de 60 días de edad fueron gonadectomizados bilateralmente. El procedimiento quirúrgico fue realizado por la Dra. Claudia Rivera Cerecedo, Jefa de la Unidad Académica Bioterio del IFC bajo condiciones asépticas y anestesia general. Las gónadas fueron expuestas y extirpadas. Durante la fase de recuperación de la anestesia y el postoperatorio temprano los ratones se mantuvieron en cajas con un foco de 60 W a una distancia de aproximadamente 30cm. para ayudarlos a mantener su temperatura corporal. Posteriormente los animales se trataron durante cinco días con 0.01 mg/kg de una solución 10% de Fluorfenicol (Nuflor, Shering Plough; Kenilworth, NJ) y se examinaron periódicamente durante los 21 días siguientes para descartar una posible infección y para que las condiciones fisiológicas alteradas por la cirugía regresaran a su normalidad. Los ratones fueron mantenidos bajo régimen de 12 horas de luz-oscuridad y alimentados *ad limitum*.

Tratamiento con estradiol

El tratamiento de estrógenos se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Friend y col 1997 (21). A los 21 días posteriores a la gonadectomía, el compuesto 17 β -estradiol, 1, 3, 5 (10)-estratriene 3, 17 b-diol (Sigma) se diluyó en aceite de ajonjolí (0.03 mg/ml) y fue administrado subcutáneamente, diariamente por la mañana durante cuatro días consecutivos a un grupo de 3 ratones machos gonadectomizados (10mg/100 g de peso; en aproximadamente 0.1ml de aceite de ajonjolí inyectado por ratón).

Obtención de rebanadas de hipófisis.

Los ratones normales, castrados y castrados e inyectados con estradiol o solo el vehículo fueron sacrificados por decapitación, previa anestesia con éter, el cerebro fue removido e inmediatamente la hipófisis fue extraída y embebida en agar al 3 % (Invitrogen; Carllab Cal, USA). Una vez enfriado, el cubo de agar se colocó en la platina de un vibratomo (Leica VT1000S) y se obtuvieron rebanadas coronales de 130 μm de grosor. Durante todo este proceso, la glándula y las rebanadas se mantuvieron sumergidas en solución salina normal (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26mM de NaHCO_3 , y 10 mM glucosa), a temperatura ambiente y con burbujeo continuo con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2) para mantener el pH a 7.4. Una vez obtenidas, las rebanadas se mantuvieron por un máximo de 6 horas en estas condiciones.

Obtención de los registros de calcio intracelular en rebanadas de hipófisis.

Para realizar los registros de la actividad intracelular de Ca^{2+} , las rebanadas fueron colocadas en cubre objetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina 0.1% y se cargaron con 22.2 μM del indicador intensiométrico de calcio Fluo-4 AM (Teflabs; Austin, USA) con 0.5% de ácido pluónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA) en solución salina durante 30 minutos a 37° C.

Una vez cargadas, las rebanadas se lavaron con solución salina normal y fueron colocadas en una cámara de registro de plexiglás directamente sobre la platina del microscopio vertical Nikon Eclipse 80i, en donde se mantuvieron con perfusión constante de solución salina burbujeada (1ml/min) y fueron observadas con objetivos de inmersión en agua 40X, 0.55 NA y 20X, 0.5 NA; (Nikon).

Para el registro de los cambios en la intensidad del indicador de calcio Fluo-4, se empleó un sistema que consta de una lámpara de xenón adaptada a un monocromador Policrome V (TillPhotonics) conectada al microscopio mediante una fibra óptica. Para la excitación del colorante se utilizó una longitud de onda de 480 nm y un cubo con espejo dichroico y filtro de emisión de 520 nm (Nikon). La adquisición se realizó con una cámara digital CCD enfriada (Imago QE; TillPhotonics) y el software Till Vision

versión 4.0. Las secuencias obtenidas constan de 600 imágenes, cada imagen fue tomada con un tiempo de exposición de 10 ms y un intervalo entre imágenes de 250 ms (véase la Figura 6).

Sustancias utilizadas

Para la estimulación de los gonadotropos se empleó GnRH II de pollo (Peninsula Laboratories, Inc. Belmont CA, USA) aplicado a través de la perfusión en concentraciones crecientes de 0.1, 1, 10 y 100 nM, con un intervalo de tiempo de 30 minutos entre una dosis y otra para evitar efectos acumulativos del agonista (Figura 6).

Análisis de resultados

El análisis del aumento intracelular de calcio se realizó procesando las secuencias de imágenes (películas) con el programa Image J (NIH, USA). Para obtener una serie de imágenes corregidas se aplicó la función matemática F/F_0 a partir de la substracción: $i_2 = (i_1 - i_2) * k_1 - k_2$ donde i_1 es la secuencia de imágenes de la secuencia obtenida, i_2 la imagen promedio de las primeras 5 imágenes de la secuencia obtenida (condición basal), $k_1=1$ y $k_2=-2$.

El análisis de las células individuales se realizó en la secuencia de imágenes resultantes del procesamiento (i_2). Se seleccionaron las células que responden a cada una de las dosis, esto es, aquellas que cambian su concentración de calcio intracelular en respuesta a la estimulación de GnRH, los registros obtenidos se visualizaron en el programa Origin 6.0 discriminando así las respuestas espontáneas de las estimuladas de cada una de las células individuales.

Basados en la ubicación en la rebanada de las células que respondieron al GnRH, se obtuvieron mapas de localización celular, señalándose además la cantidad de veces que una célula respondió a cada una de las diferentes dosis.

La composición de imágenes se realizó en el programa Power Point (Microsoft Office PowerPoint 2003).

5. RESULTADOS

Con la finalidad de localizar a las células que son capaces de responder al GnRH en la rebanada fresca de hipófisis, se obtuvieron una serie de imágenes dentro de las cuales se identificaron y rotularon aquellas células que respondían al GnRH. Esto es aquellas que aumentan su $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la unión del GnRH con su receptor, cambiando así la frecuencia y amplitud de la señal de Ca^{2+} , clasificándolas en respuestas de bajo umbral, respuestas oscilatorias y respuestas de tipo transitorias(24, 26).

En la figura 7 se ejemplifica un experimento en el cual se obtuvo de manera exitosa el registro de $[Ca^{2+}]_i$ de varias células individuales en una rebanada de hipófisis de 130 μ m de grosor. En la Figura 7B se puede observar la imagen de una rebanada de un hemilóbulo de adenohipófisis cargada con el indicador Fluo-4 y tomada con un objetivo de 40X. Como era de esperarse, en la hipófisis se encontraron tanto células que responden al GnRH como células que no respondieron. Las células que responden y las que no responden fueron identificadas para cada una de las dosis (Fig. 7C; 7D). Una vez seleccionadas, se analizó la actividad y patrón de respuesta de cada una de las células que respondieron al GnRH, también se obtuvieron mapas de ubicación de las células que responden a cada una de las dosis empleadas (0.1, 1, 10 y 100 nM).

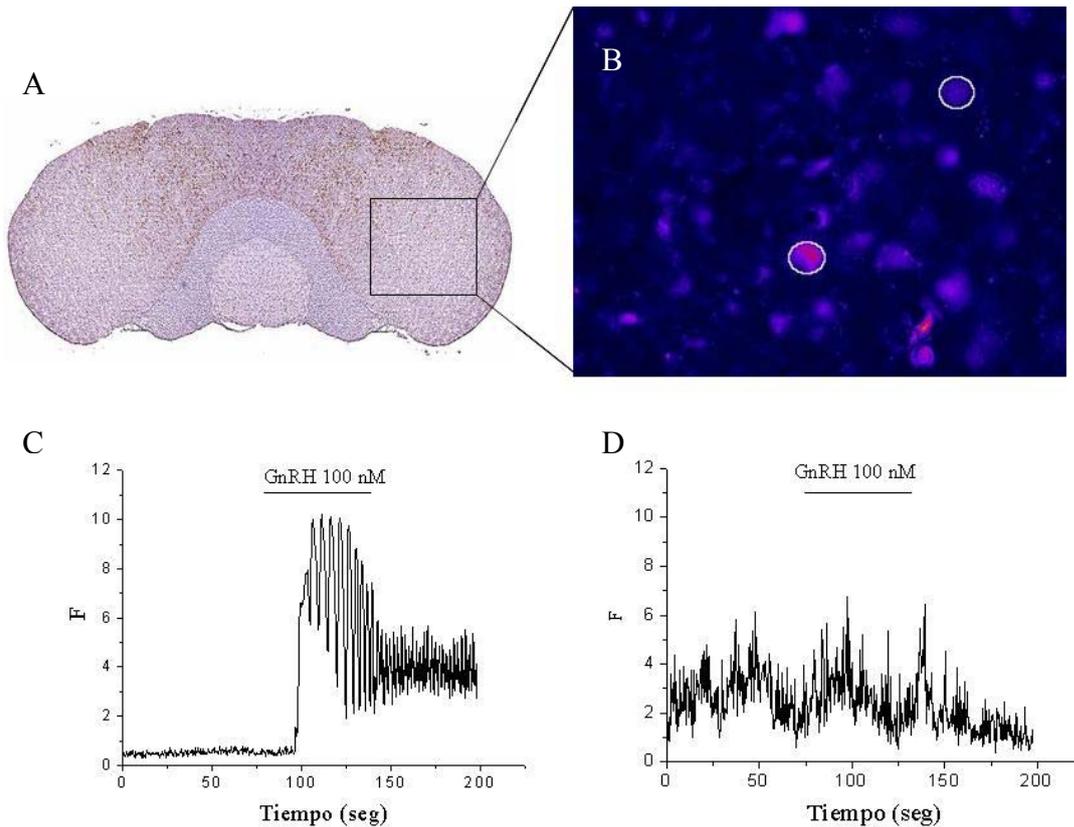


Figura 7. A) Rebanada de Hipófisis. B). Micrografía de fluorescencia de una rebanada de hipófisis cargada con el indicador fluorescente Fluo-4 AM, con un aumento de 40X. Las células marcadas en círculos blancos corresponden a ejemplos representativos de células que respondieron a GnRH. C, D, Gráficas de la fluorescencia correñida (F-Fo) en función del tiempo durante el tiempo de registro C) registro típico de una célula que respondió al GnRH (100 nM) con una respuesta mixta y D) registro de una célula que no respondió al GnRH

La aplicación de diferentes dosis de GnRH produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos por lo que, se tomaron como responsivas aquellas células que presentaron un aumento de al menos 2 desviaciones estándar (véase ejemplo Fig. 7C).

Rebanadas de hipófisis de ratón macho normal.

Para poder ubicar las células que responden a las diferentes dosis de GnRH en la rebanada, se graficó la posición X y Y de cada una de ellas (□ 0.1nM, ○ 1nM, ▽ 10nM ● 100nM GnRH) sin tomar en cuenta en este caso la amplitud y la frecuencia de las respuestas. En la figura 8 se muestra el mapa para el experimento control.

En este mapa se puede observar que las células que responden a GnRH, se encuentran distribuidas a lo largo y ancho de todo el lóbulo de la hipófisis descartando así algún tipo de regionalización, además con la ayuda de este mapa también podemos observar que no todas las células responden a todas las dosis.

Existen células que responden a la primera dosis i.e. dosis bajas (\square 0.1nM, \circ 1nM) y que no necesariamente lo hacen a las siguientes dosis y viceversa; es decir que no solamente hay un reclutamiento de nuevas células que responden a GnRH sino que además existe un recambio parcial de estas.

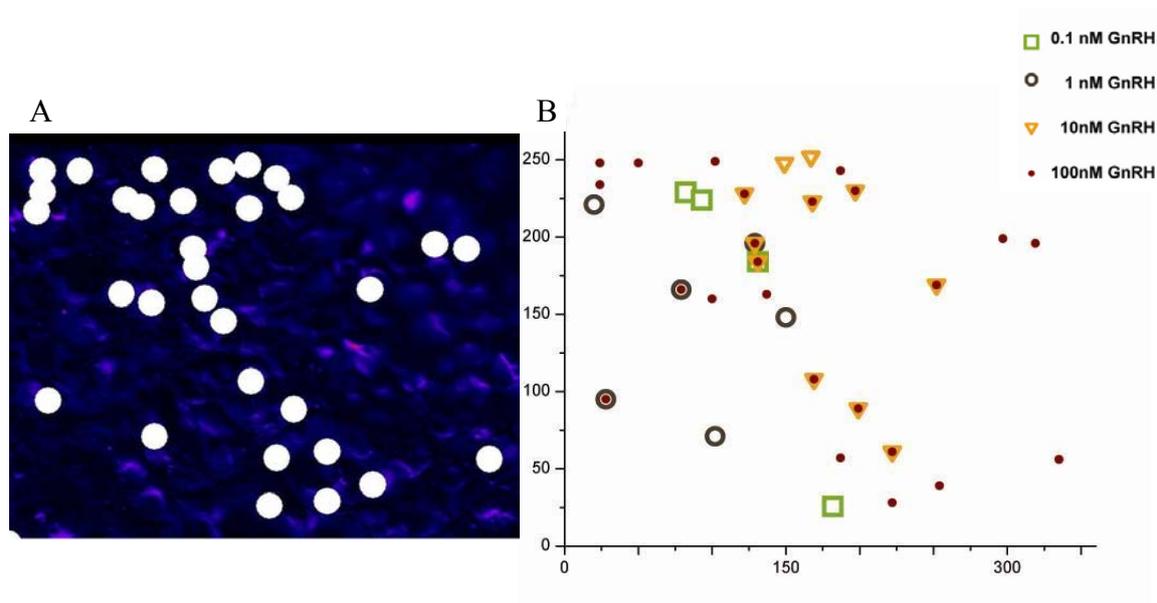


Figura 8. Mapas de la ubicación espacial de los gonadotropos que respondieron a las diferentes dosis de GnRH en rebanadas de hipófisis. A) Micrografía de fluorescencia de una rebanada de hipófisis con un aumento de 40X. Las células marcadas en círculos blancos corresponden a las células que respondieron a GnRH, en el experimento control

A pesar de no presentar una regionalización en la distribución de las células en la glándula, en el experimento control se observaron cambios en cuanto al número de gonadotropos que responden a las diferentes dosis. Se puede observar que conforme aumenta la concentración de GnRH aplicado se va dando un aumento en el número de células que responden. La figura 9A muestra como el aumento en la concentración de GnRH influye en el número de células que responden.

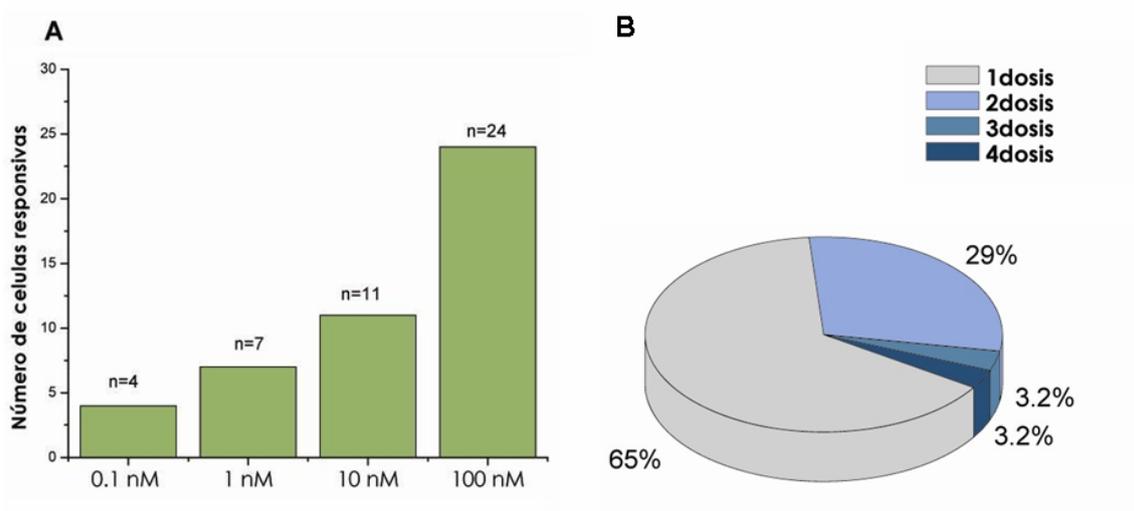


Figura 9. A) Número de células que responden a GnRH para las diferentes dosis en el experimento control. B) Porcentaje de células que responden a 1, 2, 3, 4 dosis

Sin embargo a pesar de el aumento de células con respecto a la concentración de GnRH, una misma célula puede no responder a las cuatro dosis, en la figura 9B se observa el porcentaje de células que responden a 1, 2, 3 y 4 dosis, independientemente de la concentración de GnRH; donde encontramos que el 65% de los gonadotropos responden solo a una dosis, el 29% a dos y el 3.2 % responde a 3 y 4 dosis,

Caracterización de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes dosis de GnRH

En gonadotropos en cultivo, el GnRH produce patrones de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ que varían según la concentración del secretagogo y que, como se mencionó en la introducción, comúnmente se han dividido en a) subumbrales, i.e. respuestas de bajo amplitud (concentraciones <0.1 nM de GnRH), b) oscilatoria (0.1 a 10 nM) y c) transitorias (>10 nM) (24). La figura 10 muestra los tres principales patrones de respuesta de calcio que se observaron en esta investigación. Si bien, se observaron respuestas transitorias, por la magnitud de cambio en la fluorescencia más que respuestas subumbrales las denominaremos bifásicas. En alguna de las condiciones las respuestas subumbrales también fueron identificadas como cambios transitorios de calcio pero con muy poca magnitud (figura 10).

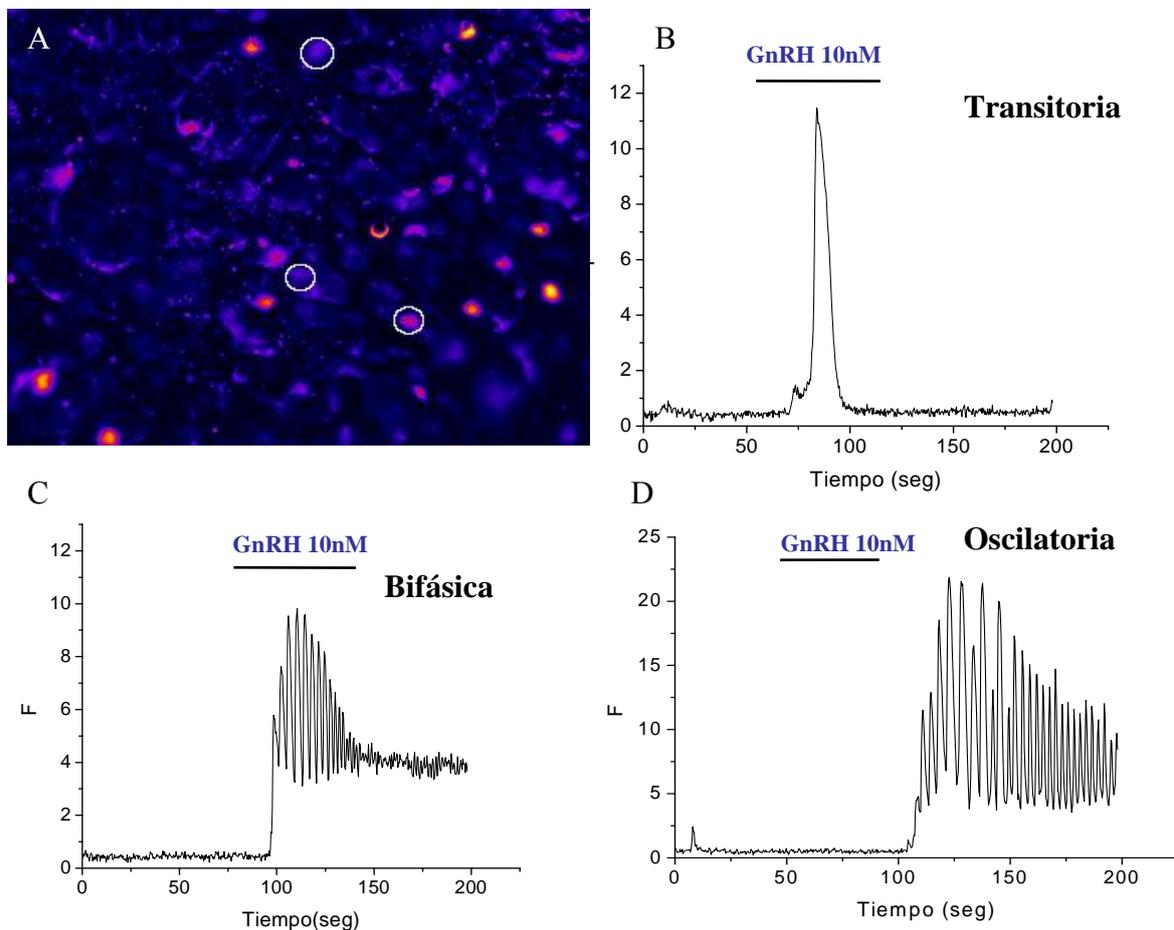


Figura 10 . Micrografía de rebanada de hipófisis cargada con Fluo-4 AM, en círculos blancos se muestran células que responden con los diferentes tipos de patrón de calcio. Patrones de calcio presentados por las células que responden a GnRH, transitoria (superior derecha), bifásica (inferior izquierda) y oscilatoria (inferior derecha).

Con el objetivo de comparar si los patrones de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ son similares en la rebanada de hipófisis con respecto a los reportados en cultivo, se analizaron los patrones de respuesta de todas las células. En la tabla 2 se observa que a diferencia de lo reportado en cultivo, en las células de hipófisis en rebanadas, a partir de dosis altas (10 nM – 100 nM) se registran respuesta transitorias de alta intensidad.

En los animales control, las células responden principalmente (52.31%) de manera bifásica y en menor grado (13%) de manera oscilatoria.

Tabla 2. Porcentaje de células que responden con diferente patrón de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes dosis de GnRH para la condición control				
Tipo de respuesta	0.1 nM GnRH	1nM GnRH	10 nM GnRH	100nM GnRH
Oscilatoria	0%	2.6%	7.8%	2.6%
Bifásica	2.6%	7.8%	15.8%	26.31%
Transitoria	0%	0%	7.8%	26.31%
Sub umbral	0%	0%	0%	0%

Rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado.

Para las rebanadas de ratones macho castrados se analizó nuevamente el número de células que respondían a las diferentes dosis de GnRH, así como la ubicación de las células que responden a las diferentes dosis de GnRH en la rebanada, por lo que se graficó la posición X y Y de cada una de ellas (\square 0.1nM, \circ 1nM, ∇ 10nM \bullet 100nM GnRH), de tal forma que se pudieron ubicar espacialmente en la rebanada del hemilóbulo de la glándula, dentro de esta ubicación no se tomó en cuenta la amplitud y la frecuencia de las respuestas de Ca^{2+} .

Una vez elaborado el mapa, se observó que la castración no afecta la distribución de las células que responden a lo largo de todo el lóbulo de la hipófisis (Figura 11) y por lo tanto tampoco hay una regionalización en la glándula..

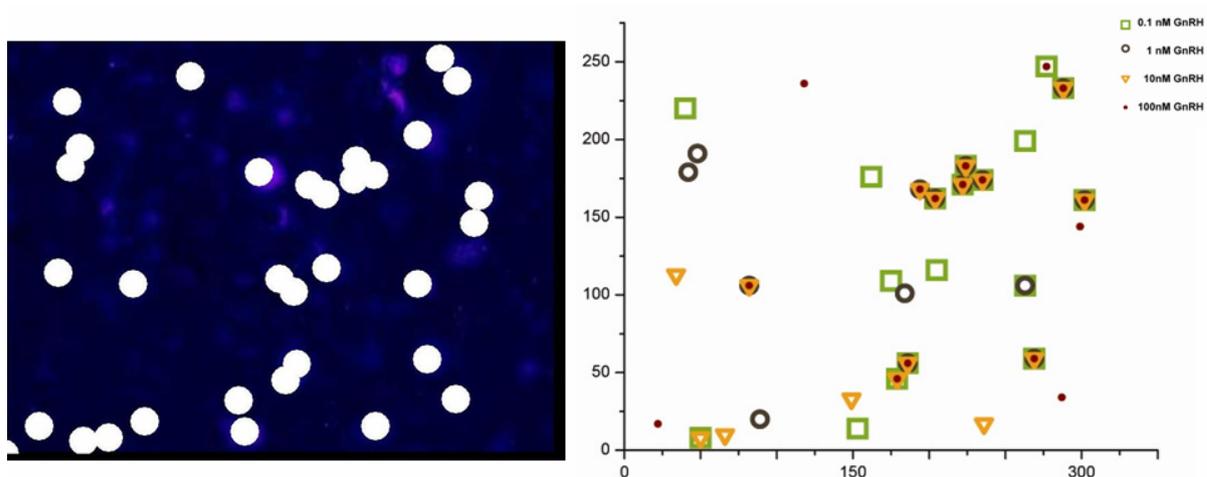


Figura 11. Mapas de la ubicación espacial de los gonadotropos que respondieron a las diferentes dosis de GnRH en rebanadas de hipófisis de ratones castrados. A) Micrografía de fluorescencia de una rebanada de hipófisis con un aumento de 40X. Las células marcadas en círculos blancos corresponden a las células que respondieron a GnRH, en el experimento de ratones castrados.

A pesar de no presentar cambios en la distribución en la glándula con respecto a la condición fisiológica de los animales, si se observan cambios en cuanto al número de gonadotropos que responden a las diferentes dosis (figura 12)

Con la castración se observó que a diferencia de lo ocurrido en las rebanadas de los animales controles se observa un mayor número de células responsivas desde las dosis bajas (0.1 nM) y su número permanece constante a lo largo de las 4 dosis (Figura 12).

La figura 12 muestra los resultados de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a las diferentes dosis aplicadas de GnRH, se observa que después de la castración estos porcentajes en cuanto

la numero de células que responde a las diferentes dosis cambian con respecto al control (Figura 12A), siendo el 25% de células que responden a una dosis, el 12% a 2 y 3 dosis y por ultimo el 30% responden a 4 dosis.

La castración no solo produce un aumento en el número de células que responden a GnRH, manteniéndose igual para todas las dosis, sino que además, aumenta el porcentaje de células que responden a todas las dosis del secretagogo, disminuyendo las que solo responden a 1 dosis (figura 12B).

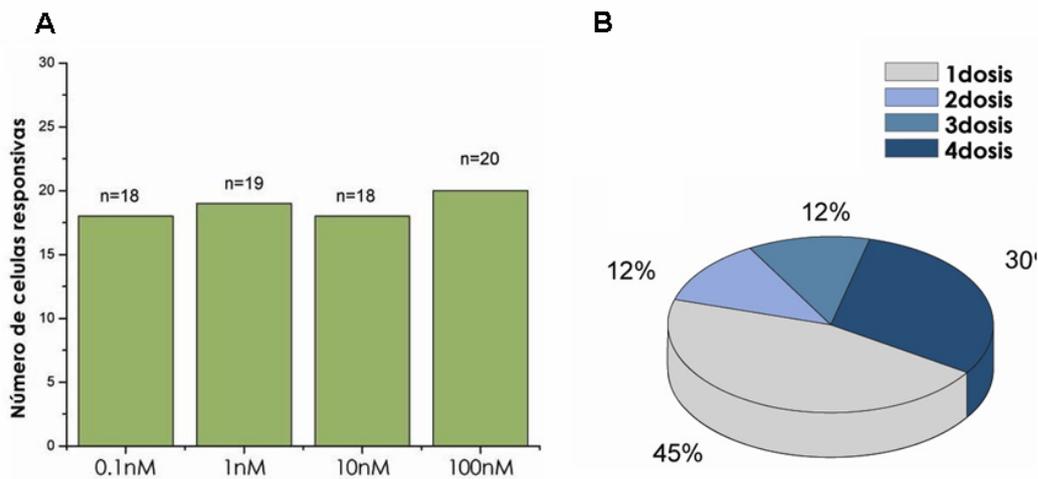


Figura 12. A) Número de células que responden a GnRH para las diferentes dosis en rebanadas de hipófisis de ratones macho castrados. B) Porcentaje de células que responden a 1, 2, 3, 4 dosis

Con el objetivo de comparar si los patrones de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ son similares en la rebanada de hipófisis de animales normales a los de ratones castrados, se analizaron los patrones de respuesta de todas las células, para cada dosis y se obtuvo el número de células que responden con determinado patrón en cada caso. En la tabla 3 se observa que en las células de hipófisis en rebanadas se registran respuestas transitorias de alta intensidad.

Para los ratones castrados la respuesta que más se presenta es la de tipo oscilatoria (43.8%), seguida por la bifásica (34.5%) y transitoria (6.6%), además de el 14% de las células presentaron respuestas denominadas subumbrales, esto es respuestas transitorias de muy poca amplitud.

Tabla 3. Porcentaje de células que responden con diferente patrón de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes dosis de GnRH en ratones castrados

Tipo de respuesta	0.1 nM GnRH	1nM GnRH	10 nM GnRH	100nM GnRH
Oscilatoria	6.6%	14.6%	9.3%	13.3%
Bifásica	14.6%	6.6%	9.3%	4%
Transitoria	0%	0%	1.3%	5.3%
Sub umbral	2.6%	4%	4%	4%

Rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado e inyectados con estradiol.

Para los ratones inyectados con estradiol, también se realizó un mapa de localización de las células que respondían al GnRH colocándolas, así como en los casos anteriores, en una posición X y Y para cada una de las dosis (\square 0.1nM, \circ 1nM, ∇ 10nM \bullet 100nM GnRH). En esta condición tampoco se encontró ningún tipo de regionalización en la glándula, las células se encuentran distribuidas homogéneamente a lo largo de la glándula

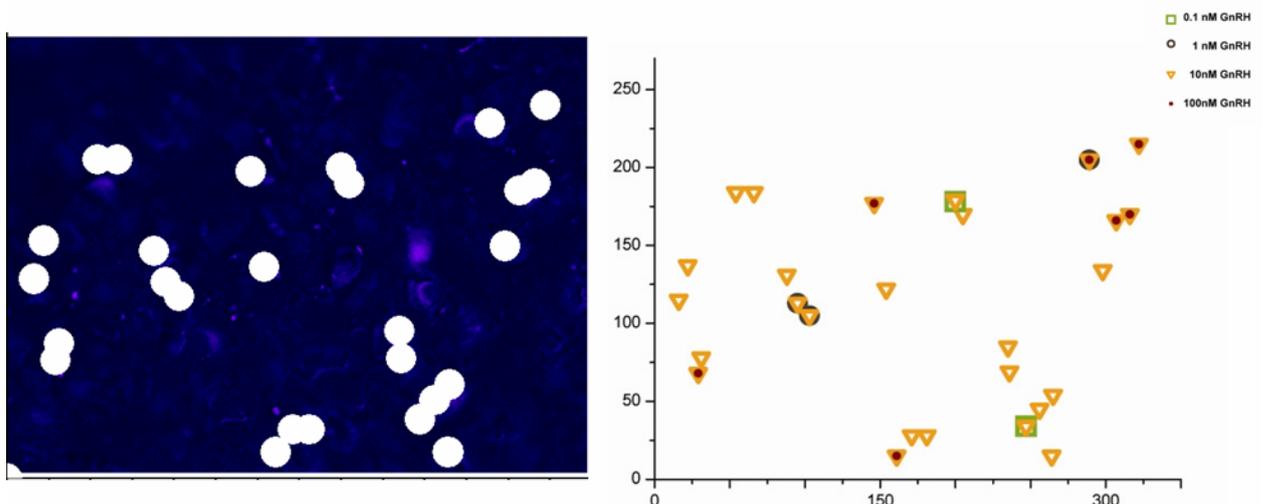


Figura 13. Mapas de la ubicación espacial de los gonadotropos que respondieron a las diferentes dosis de GnRH en rebanadas de hipófisis de ratones castrados e inyectados con estradiol A) Micrografía de fluorescencia de una rebanada de hipófisis con un aumento de 40X. Las células marcadas en círculos blancos corresponden a las células que respondieron a GnRH, rebanadas de ratones castrados e inyectados con estradiol.

A pesar de no presentar cambios en la distribución en la glándula con respecto a la condición fisiológica de los animales, interesantemente en la condición de los animales

tratados con estradiol se observa un menor número de células que responden a GnRH manteniéndose constantes y aumentando únicamente con la aplicación de 10 nM (Fig. 14A).

En la figura 14 se puede observar que en los experimentos en los cuales los animales fueron tratados con estradiol, el 67% respondieron solo a una dosis, el 30% a 2 dosis y 3.7% a 3 dosis e interesantemente no se encontraron células que respondieran a las 4 dosis. La aplicación de estradiol, disminuye el número de células que responden a GnRH y aumenta el número de células que responden a una sola dosis del secretagogo.

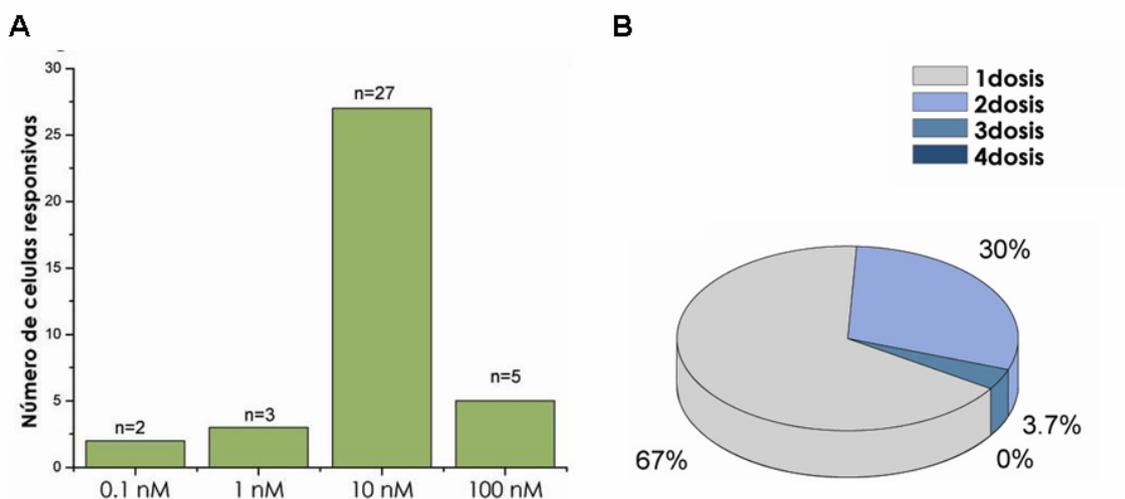


Figura 14. A) Número de células que responden a GnRH para las diferentes dosis en rebanadas de hipófisis de ratones macho castrados e inyectados con estradiol. B) Porcentaje de células que responden

Finalmente se analizarón los patrones de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ para estudiar si estos patrones se ven afectados por el tratamiento con estradiol.

En los ratones inyectados con estradiol se presentaron principalmente (63.8%) respuestas transitorias, seguida (14.9%) por el tipo de respuesta bifásica y finalmente respuestas de tipo sub umbral (8.7%), sin observarse células con respuesta de tipo oscilatoria.

Tabla 4. Porcentaje de células que responden con diferente patrón de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes dosis de GnRH en ratones castrados e inyectados con estradiol.

Tipo de respuesta	0.1 nM GnRH	1nM GnRH	10 nM GnRH	100nM GnRH
Oscilatoria	0%	0%	0%	0%
Bifásica	5.8%	2.9%	2.9%	2.9%
Transitoria	0%	2.9%	50%	10.9%
Sub umbral	0%	2.9%	2.9%	2.9%

6. DISCUSIÓN

Ubicación espacial de las células con respuesta a GnRH

Algunos estudios han mostrado que la hipófisis se encuentra regionalizada, es decir que las células tienen una distribución y arreglo específico en la glándula (29), postulando que los gonadotropos se encuentran principalmente distribuidos a través de toda la región proximal de la *pars distalis* de la hipófisis (38) o bien que se encuentran situados a lo largo de los vasos sanguíneos portales, implicando esta última, una relación entre la hipófisis, el suministro de sangre y un punto de control en la regulación hipotalámica (30). En este estudio, con la ayuda de la técnica de rebanadas, que tiene como ventaja el observar la ubicación las células espacialmente en el tejido, nos propusimos observar si existe algún tipo de regionalización en la distribución de los gonadotropos a lo largo de la glándula y si ésta distribución existe, se ve afectada por los efectos de la castración o por la administración del estradiol. Los mapas de ubicación de X y Y arrojaron como resultado que en el ratón los gonadotropos no se encuentran confinados a una región específica de la glándula, sino que por el contrario están distribuidos a lo largo de todo el lóbulo de la hipófisis. Estos mismos mapas fueron analizados para las hipófisis de los animales castrados o con el tratamiento con estradiol (E2), ninguna de las condiciones afectó la distribución de las células que responden al secretagogo ya que en ninguno de los casos se presentó una ubicación específica o concentrada en alguna zona de la glándula.

Número de células que responden a GnRH.

Además de los factores hipotalámicos, los gonadotropos también son regulados por los factores gonadales, por la compleja relación que existe en el eje, hipotálamo, pituitaria y gónadas; en este estudio se observó que la remoción de los factores gonadales a través de la castración conlleva a un aumento en la capacidad de respuesta de los gonadotropos, no solamente en el número de células que responden sino también en la cantidad de dosis de GnRH a la que responden. En los ratones macho normales (control) se presenta una relación proporcional entre el número de células que responden y la cantidad de GnRH que les es aplicado, por lo que entre mayor la concentración de GnRH mayor es la cantidad de células responsivas (Figura. 6C), este efecto podría

deberse al proceso de sensibilización o “self priming”. Sin embargo, después de la castración el número de células que responden a dosis bajas aumenta, de tal forma que para las 4 dosis (0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM) de GnRH el número de células responsivas es prácticamente el mismo y mayor que en el ratón control en todos los casos. Este aumento en la capacidad de respuesta de los gonadotropos puede deberse a diferentes razones, entre ellas, que algunos estudios han reportado que la concentración de receptores de GnRH en los gonadotropos de animales castrados es mayor que en los ratones intactos (6), por lo que sería razonable pensar que un incremento en el número de receptores aumente la sensibilidad al GnRH y con ello las células que solo respondía a dosis altas de GnRH ahora lo harán desde dosis bajas. Por otro lado, se podría dar una diferenciación de células multihormonales hacia gonadotropos. Estas células multihormonales presentan características fenotípicas compartidas por miembros de las poblaciones de somatotropos y gonadotropos, esto es antígenos para GH (hormona del crecimiento), así como mRNA para gonadotropinas (LH-β, LHβ, o FSH-β) o receptores para GnRH (28), aumentando con ello el número general de células responsivas al GnRH.

En los ratones inyectados con estradiol se observó que con excepción de la dosis de 10 nM de GnRH, para las demás dosis existe una disminución general en el número de células que respnden a GnRH. Esta disminución tan drástica podría explicarse debido a que la concentración elevada de esteroides produce una inhibición de la secreción de gonadotropinas. A nivel de la hipófisis, se ha visto que una exposición crónica a la testosterona (T) inhibe la secreción de LH (14), regulando negativamente la densidad y expresión de los receptores de GnRH (21, 22). Por otro lado el estradiol puede inhibir la secreción de las gonadotropinas mediando la acción de GnRH en la pituitaria más allá de ejercer un efecto directo sobre la trascrición de las subunidades de RNAm de los receptores de GnRH.

Células que responden según la dosis de GnRH

Los datos obtenidos en células en cultivo reportan que la mayoría de las células responde a todas las dosis de GnRH y que el aumento en la cantidad de células responsivas se debe básicamente al proceso de sensibilización o “self priming” (42), aún más, está descrito que el receptor de GnRH que tienen los gonadotropos de ratón es el

receptor de tipo II, por lo que su desensibilización es muy lenta o improbable. Estos factores explicarían que en los registros realizados en rebanadas de animales control se observe un aumento paulatino del número de células que responden a GnRH (Figura 9). Sin embargo, en un análisis más detallado se encontró que solo un porcentaje muy bajo de células responden a las cuatro dosis de GnRH (3.2%; figura 10), siendo mayor el número de células que responden a una sola dosis (65%) y aunque en su mayoría (52.17%) responden a la dosis de 100 nM, hay células (8.7%) que solo responden a 0.1 nM.

Lejos de tener una explicación contundente a esta observación, se podría pensar que en esta preparación el estímulo de GnRH produce la sensibilización de gonadotropos que a pesar de no responder visiblemente a dosis bajas, lo hacen posteriormente a dosis más altas y, la liberación de factores o interacciones celulares que produzcan la inhibición de aquellos gonadotropos que solo respondieron a la dosis aplicada en turno. Esta conclusión se puede ver reforzada por el hecho de que la castración produce una modificación en la relación de células que responden a 1, 2, 3 o 4 dosis, aumentando de 3.2 a 30% el porcentaje de células que responden a 4 dosis, que no se da solo porque las células que antes respondían solo a 100 nM ahora sean más responsivas y lo hagan también a 0.1 nM, sino también porque la posible desensibilización de las células que respondían a 0.1 nM y ya no a 100 nM se pierde.

Así, la castración no solo afecta en general el número de células que responde, sino también a cuantas dosis responden, lo cual como ya se mencionó anteriormente podría estar relacionado con el cambio en la sensibilidad de los gonadotropos al GnRH, por lo que no tan solo están apareciendo nuevas células sino que los factores gonadales están aumentando la capacidad de respuesta de las células ya existentes a las diferentes dosis y perdiéndose una posible desensibilización.

Finalmente, la exposición al estradiol no solo estaría revirtiendo el efecto de la castración sino que además parece producir una inhibición en el proceso general de respuesta de los gonadotropos al GnRH, ya que no solo disminuye en general en número de células responsivas, sino que además reduce a 0% el porcentaje de células que responden a 4 dosis, aumentando las que responden a 1 y 2 dosis y siendo éstas en mayor proporción (55.8%) las que responden a 10nM.

Caracterización de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes dosis de GnRH

Actividad espontánea

La mayoría de los gonadotropos exhiben oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$ de baja amplitud(43), en este estudio se observó un aumento de la actividad espontánea después de la castración en la población celular de la glándula; del total de células promedio (n=109) en la glándula del ratón, el 33% de las células en el ratón control presentan actividad espontánea (n=36), mientras que en el ratón castrado el porcentaje de células que presentan actividad espontánea aumentó a 79.8% (n= 87), de este porcentaje la mayoría, pero no todas las células son gonadotropos (dato no mostrado).

Este aumento en la actividad espontánea puede deberse a un aumento en los canales de calcio de la membrana de las células de la hipófisis propiciado por la remoción de los factores gonadales.

Respuesta a diferentes dosis de GnRH

Por otro lado, en células en cultivo está bien descrito que el patrón de frecuencia y amplitud del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos depende de la concentración de GnRH que le es aplicada, dividiéndose estas respuestas en a) respuestas de bajo umbral (<0.1 nM GnRH), definidas como transitorias (subida y bajada rápida) en las cuales la $[Ca^{2+}]_i$ presenta una muy baja amplitud ($\leq 0.4\mu M$); b) respuestas a concentraciones de 0.1 a 10 nM de GnRH en donde se observan oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ con alta amplitud ($\geq 1\mu M$) y c) concentraciones altas de GnRH (>10nM) en donde se observa una respuesta “bifásica” de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (24, 26).

En los registros de rebanadas de hipófisis en ratones intactos el patrón de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ observado en los gonadotropos, si bien cambia con la concentración de GnRH aplicada, no necesariamente se ajusta a los patrones descritos con anterioridad, ya que a bajas concentraciones de GnRH (0.1 nM y 1 nM) se inducen respuestas de tipo oscilatorio en la mayoría de las células. Con el incremento en la concentración de GnRH se observa un aumento en la proporción de células que produce una respuesta de tipo bifásica y transitoria (ver figura 10). Este último tipo de respuesta parecido a la respuesta de bajo umbral obtenida en cultivo, difiere en la magnitud del cambio de

concentración intracelular de calcio y aparece en respuesta a dosis altas de GnRH, sin observarse respuestas de tipo subumbral.

En este estudio se observó que en lugar de generar respuestas bifásicas a altas concentraciones de GnRH (100nM), como habría de esperarse de acuerdo a lo reportado (16), el 53% de las células de ratones castrados exhiben respuestas de tipo oscilatoria y la proporción de células con esta respuesta se mantiene relativamente constante con la aplicación de las diferentes dosis de GnRH. Así, la proporción de células que responden de manera bifásica o transitoria es significativamente menor en la hipófisis de estos animales con respecto a los controles. Interesantemente, se observan además, células con respuestas subumbrales independientemente de la dosis de GnRH aplicada. Esto último querría decir que un grupo de células comienza a expresar la maquinaria de respuesta al GnRH (receptores, segundos mensajeros), pero probablemente su concentración no alcanza aún los niveles necesarios para registrar respuestas más altas.

Como se puede constatar, los factores gonadales ejercen una función importante no solo como ya se demostró, en el número y sensibilidad de las células que responden a GnRH lo cual compensaría la demanda de gonadotropinas, sino también e importantemente en el tipo de respuesta que el secretagogo genera.

Como ha sido ampliamente demostrado, la forma en que los cambios de la concentración de calcio citosólica regulan una gran variedad de procesos depende de la velocidad, amplitud y patrones espacio-temporal con que sucede (4) y en especial, la secreción de LH y FSH que es en distintos tiempos y frecuencia, esta dada por la frecuencia de los pulsos de GnRH y con ello en las diferencias que en los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ produce. La castración trae consigo cambios en los requerimientos fisiológicos de gonadotropinas y probablemente estos cambios no solo conlleven una mayor secreción sino también la síntesis y empacamiento de LH y/o FSH. Las diferencias en que la castración produce en los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ podrían ser de vital importancia ya que, la LH es almacenada en gránulos y su liberación es a través de la secreción, por lo tanto su exocitosis es determinada por los cambios pulsátiles y elevados de $[Ca^{2+}]_i$. La FSH es liberada principalmente a través de una ruta constitutiva, por lo que su exocitosis es esencialmente controlada por la expresión de genes y la disponibilidad de mRNA para la transcripción (6) y se ve afectada por otro tipo de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$.

7. CONCLUSIONES

En conclusión se puede decir que:

- a) En la rebanada de hipófisis los gonadotropos se distribuyen homogéneamente a lo largo de la glándula y no se encuentran confinados a una región específica.
- b) En hipófisis de animales control, el número de células responsivas a GnRH aumenta con las dosis del secretagogo.
- c) La castración produce un aumento importante de la actividad espontánea de las células hipofisiarias
- d) Después de la castración se presenta un aumento en el número de células responsivas a GnRH desde dosis bajas (0.1nM).
- e) El patrón de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, varía de acuerdo a la condición fisiológica, ya que en la castración se producen mayoritariamente respuestas oscilatorias aún a dosis bajas de GnRH y con el estradiol el principal patrón de respuesta es de tipo transitorio, sin importar el tipo de dosis que le sea administradas

8. PERSPECTIVAS

1. Determinar el curso temporal del aumento en el número de células que responden a GnRH en relación con el tiempo de castración.
2. Observar si el aumento de la actividad espontánea en las células hipofisarias se relaciona con el tiempo de castración y si ésta corresponde a la actividad de los gonadotropos o si involucra también a otros tipos celulares.
3. Estudiar si los cambios observados en el patrón de respuesta al GnRH después de la castración está relacionado con cambios en la densidad de receptores a GnRH y/o IP_3 en los gonadotropos.
4. Estudiar si los cambios observados pueden revertirse mediante terapia sustitutiva de testosterona.
5. Integrar la información obtenida para intentar explicar los mecanismos a nivel celular que están involucrados en esta regulación de la función de los gonadotropos.

9. REFERENCIAS

1. Ooi T.G, Tawaadros N, Escalona R.M. 2004 *Pituitary cell lines and their endocrine applications*. Molecular and Cellular Endocrinology 228:1-21
2. Stojilkovic SS, Catt KJ. 1992. *Calium Oscilations in Anterior Pituitary Cells*. Endocrine Reviews 13:256-280
3. Horvath, E. Kovaks, K., 1998. *Fine structural cytology of the adenohipófisis in rat and man*. J. Electr. Microsc.Tech. 8:401-432
4. Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. 2000 *The versatility and universality of calcium signaling*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology 1:11-21
5. Mogulevsky JA, Schiaffini O 1972. *Hipofisis Control de secreción*. Lopez librereros Editores. 260pp.
6. McNelly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNelly JR. 2003 *The diferencial secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging*. Reproduction supplement 61:463-476
7. Lloyd JM, Childs G. 1988 *Diferential Storage and release of Luteinizing Hormone and Folicule-Realizing Hormone from individual gonadotropos separated by centrifugal elutriation*. Endocrinoogy 122(4):1282-1290
8. Thomas SG, Clarke IJ. 1997 *The positive feedback action of estrogen movilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory glanules in ovine gonadotropes* 138:1347-1350.
9. Griffin JE., Ojeda SR. 1988 *Textbook of endocrine physiology*. Oxford University Press. 351pp.
10. Schulz RW, Vischer HF, Cavaco JEB, Santos EM, Tyler CR, Goos HJ, Bogerd J. 2001 *Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish*. Comaparative Biochemistry and Physiology Part B 129:407-417
11. Tilbrook AJ, Clarke IJ. 2001 *Negative feedback regulation of the secretion and actions of Gonadotropin-Releasing Hormone in males*. Biology of reproduction. 64:735:742
12. Kraus S, Naor Z, Seger R. 2001 *Intracellular signaling pathway mediated by Gonadotropin-Realising Hormone (GnRH) receptor*. Archives of medical Research 32:499-509
13. Millar R. 2005 *GnRHs and GnRH receptors*. Animal Reproduction Science

14. Kamel F, Balz JA, Kubajak, Schneides VA. 1987 *Gonadal steroids modulate Pulsatile Luteinizing Hormone secretion by perifused rat anterior pituitary cells*. Endocrinology 120(4): 1651-1657.
15. Wilson JD, Foster D. 1992 *Williams. Textbook of endocrinology*. W.B. Saunders Company. 1712pp.
16. Tobin VA, Millar RP, Canny BJ. 1997 *Testosterone acts directly at the pituitary to regulate Gonadotropin-Releasing Hormone-induced calcium signals in male rat gonadotropes*. Endocrinology 138(8):3314-3319
17. Dalkin AC, Heisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. 1989 *The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression*. Endocrinology 125:917-924
18. Heisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall-JC, Shupnik MA 1991 *A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence of differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo*. Endocrinology 128:509-517
19. Kraus S, Naor Z, Seger R. 2001 *Intracellular signaling pathways mediate by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor*. Archives of Medical Research 18:499-509
20. Rispoli LA, Nett TM 2005 *Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor structure, distribution and regulation of expression*. Animal Reproduction Science. 1-18
21. FriendK, Resinick E, Ang L, Shupnick M. 1997 *Specific modulation of estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones*. Molecular Cell Endocrinology. 131:147-155
22. Clayton RN, Catt KJ 1981 *Regulation of pituitary gonadotropin hormone receptors by gonadal hormones*. Endocrinology 108:887-895
23. Tobin VA, Canny BJ. 1996 *Testosterone regulates Gonadotropin- Releasing Hormone- Induced Calcium Signals in male rat gonadotrophs*. Endocrinology 137:1299-1305
24. Tomic M, Cesnajak M, Catt KJ, Stojilkovic SS. 1994 *Developmental and physiological aspects of Ca²⁺ signaling in agonist-stimulated pituitary*

- gonadotrophs*. *Endocrinology*. 135(5):1762-71.
25. Tse A, Tse FW, Almers W, Hille B. 1993 *Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes*. *Science*. 260(5104):82-94.
 26. Thomas P, Waring DW. 1997. *Modulation of stimulus-secretion coupling in single rat gonadotropes*. *Journal Physiology*. 504 (Pt 3):705-19.
 27. Bonnefont X, Lacampagne A, Sanchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, Smallwood S, Carmignac D, Fontamaud P, travo P, Alonso G, Courtois – Country N, Pincus SM, Robinson IC, Mollard P. 2005 *Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102 (40):16880-5
 28. Child GV, Unabia G, Wu P. 2000 *Differential Expression of Growth Hormone Messenger Ribonucleic Acid by Somatotropes and Gonadotropes in Male and Cycling Female Rats* *Endocrinology*. 141(4): 560-570
 29. Baker BL. *Functional cytology of the hypophyseal pars distalis and pars intermedia*. 1974 In: Knobil E, Sawyer WH (eds.), *Handbook of Physiology*, sect. 7, vol. 4, pt. 1. *The Pituitary Gland and Its Neuroendocrine Control*. Washington, DC: American Physiology Society
 30. Eagle R, Tortonese D. 2000 *Characterization and distribution of gonadotropes in the Pars distalis and Pars Tubularis of the equine pituitary gland during the estrous cycle and seasonal anestrus*. *Biology of Reproduction* 63:826-832
 31. Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. 1997 *Studies Of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) actions using GnRH receptors-expressing pituitary cell lines*. *Endocrine Reviews* 18(1):46-69
 32. Childs GV, Unabia G, Wu P. 2000 *Differential expression of Growth Hormone messenger Ribonucleic Acid by Somatotropes and Gonadotropes in male and cycling female rats*. *Endocrinology* 141(4) 1560-1570
 33. Tilbrook AJ, Clarke 2001 *Negative feedback regulation of the secretion and actions of Gonadotropin-Releasing Hormone in males*. *Biology Reproduction* 64:735-742.
 34. Ortmann O, Stojilkovic S, Cesnjaj M, Emons G, Catt J. 1992. *Modulation of cytoplasmic calcium signaling in rat pituitary gonadotropes by estradiol and progesterone*. *Endocrinology* 131(3):1565-1567.
 35. Kotsuji F, Winters SJ, Attardi B, Keeping HS, Oshima H, Troen P 1988 *Effects*

- of gonadal steroids on gonadotropin secretion in males; studies with perfused rat pituitary cell.* *Endocrinology* 120:1651-1657
36. Wa Cheng K, Leung P C.K., 2000. *The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor.* *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78(12):10029-1050
37. Conn PM, McArdle CA, Andrews W, Huckle W. 1987 *The molecular basis of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action in the pituitary gonadotrope.* *Biology of reproduction* 36:17-35.
38. Zhou H, Wang X, Ko W, Wong OL, 2004 *Evidence for a novel intrapituitary Autocrine/paracrine feedback loop regulating Growth Hormone synthesis and secretion in grass carp pituitary cells by functional interaction between Gonadotrophs and Somatotrophs* *Endocrinology* 145(12) 5548-5559
39. Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA 2002. *Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone.* *Domestic Animal Endocrinology* 23 (1-2):33-42
40. McArdle CA, Franklin J, Green L, Hislop JN. 2002 *The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation.* *Archives of Physiology and Biochemistry.* 110(1-2):113-2
41. Stojilkovic SS, Zemkova H, Van Goor F. 2005 *Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling.* *Trends Endocrinology Metabolism.* 16(4):152-9.
42. Fink G. 1995 *The self-priming effect of LHRH: a unique servomechanism and possible cellular model for memory* *Frontiers in Neuroendocrinology* 16:183-190
43. Iida T, Stojilkovic SS, Izumi S, Catt K. 1991. *Spontaneous and Agonist-Induced calcium oscillations in Pituitary gonadotrophs.* *Molecular Endocrinology* 5(7):949:958.