



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Organización funcional de gonadotropos de ratón macho

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. José Alfredo Jiménez Medina

Tutor principal:

Dra. Tatiana Fiordeliso Coll. Facultad de Ciencias, UNAM.

Miembros del comité tutor:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo. Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 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

Organización funcional de gonadotropos de ratón macho

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. José Alfredo Jiménez Medina

Tutor principal:

Dra. Tatiana Fiordeliso Coll. Facultad de Ciencias, UNAM.

Miembros del comité tutor:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo. Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

OFICIO FCIE/DEP/566/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

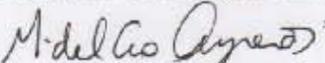
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de febrero de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **JIMÉNEZ MEDINA JOSÉ ALFREDO** con número de cuenta **301294245** con la tesis titulada "**Organización funcional del gonadotropos de ratón macho**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. TATIANA FIORELISIO COLL**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Vocal: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
Secretario: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Suplente: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA
Suplente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de agosto de 2015


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/gr*



Agradecimientos

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ampliar mi formación académica y personal.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al proyecto CONACyT de ciencia básica 153353 y 166430 así como al proyecto PAPPIT IN222613 por el financiamiento necesario para llevar a cabo mi proyecto de maestría.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso por guiar y dirigir este proyecto de maestría, así como a los miembros de mi comité tutor Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por sus valiosos comentarios y observaciones durante el desarrollo de este proyecto

Agradecimientos a título personal

A la Dra. Tatiana Fiordelisis no solo por la dirección de este trabajo, sino por su amistad, confianza, guía y apoyo en todo momento. Gracias por transmitirme tu pensamiento crítico, innovador y mostrarme que con trabajo y esfuerzo se puede mejorar en el quehacer científico, eres un ejemplo a seguir.

A mis papas Cuqui y Quique por sus enseñanzas de vida, por su amor incondicional, por sus consejos, regaños, apoyo, confianza y todos los bellos momentos que me han hecho pasar. A mis hermanos Carlos, Pao y Bety por tanta alegrías y momentos que he pasado con ustedes, gracias por todo no veo mi vida sin todos ustedes.

A Erandi por tu amor, paciencia y apoyo incondicional que han sido vitales para mí, he sido muy afortunado de encontrarte y tenerte en mi vida.

A mi segunda familia, Pavel, Víctor, Nallely y Sacbel, gracias por tantas aventuras y momentos que hemos pasado. Y todos mis amigos que he tenido la fortuna de encontrar durante toda mi formación académica: Martha, Rubén, Diana, Ramiro, Gerardo, Verónica, Itzi, Pablo, Claudia, Alejandro, Erendira.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Neurofisiología Comparada: Luca, Luis, Daniel, Paulina, Vicente, Midori, Lucio, Paola por hacer las largas horas de trabajos más divertidas y por compartir su conocimiento conmigo.

Índice

ABREVIACIONES	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS	5
HIPÓFISIS.....	5
<i>Localización y estructura</i>	5
<i>Irrigación</i>	7
REGULACIÓN DE LA HIPÓFISIS	9
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS	10
<i>Gonadotropos</i>	10
EL GNRH	11
<i>Receptor de GnRH</i>	12
DINÁMICA DE Ca^{2+} INTRACELULAR EN GONADOTROPOS HIPOFISARIOS	14
ANTECEDENTES	16
<i>Patrones de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de GnRH</i>	16
<i>Preparaciones tisulares</i>	17
REDES CELULARES	19
<i>Redes endocrinas y vasculatura</i>	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
MÉTODO	23
ANIMALES	23
OBTENCIÓN DE REBANADAS DE HIPÓFISIS	23
MARCADO DE CAPILARES.	24
IMAGENOLOGÍA DE CALCIO.	24
FIJACIÓN Y REALIZACIÓN DE INMUNOTINCIONES	26
ADQUISICIÓN	26
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
RESULTADOS	28
REBANADAS DE RATÓN MACHO Y TINCIÓN DE LA VASCULATURA	28
PATRONES DE RESPUESTA DE Ca^{2+} INTRACELULAR ANTE LA APLICACIÓN DE GNRH EN GONADOTROPOS DE RATÓN MACHO.	30
REGIONALIZACIÓN DE GONADOTROPOS SEGÚN SU RESPUESTA ANTE LA ESTIMULACIÓN CON GNRH.....	32
CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE $[Ca^{2+}]_i$ ANTE LA APLICACIÓN DE GNRH	35
TAMAÑO DE LOS GONADOTROPOS	38
ROSETAS DE GONADOTROPOS Y VASCULATURA	40
DISCUSIÓN	43
PATRONES DE RESPUESTA DE Ca^{2+} INTRACELULAR PROMOVIDO POR GNRH EN REBANADAS DE RATÓN MACHO.	43
REGIONALIZACIÓN DE GONADOTROPOS.....	44
REGIONALIZACIÓN FUNCIONAL	44
ROSETAS DE GONADOTROPOS Y REDES CELULARES	46

CONCLUSIONES 48
BIBLIOGRAFÍA..... 49

Abreviaciones

GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
GHRH	Hormona liberadora de hormonas de crecimiento
GH	Hormona de crecimiento
PRL	Prolactina
FSH	Hormona Folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
ACTH	Hormona adenocorticotropina
DA	Dopamina
HHG	Hipotálamo-hipófisis-gónadas
GnRH-R	Receptor de la Hormonas liberadora de gonadotropinas
Ca ²⁺	Calcio libre ionizado
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
PLC-β	Fosfolipasa C-β
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
InsP ₃	1,4,5 inositol trifostato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína cinasa C
VGCC	Canales de calcio activados por voltaje
K ⁺	Potasio
SSN	Solución salina normal

Resumen

El eje reproductor hipotálamo-hipófisis-gónadas es controlado centralmente por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual al unirse a su receptor en la membrana plasmática de los gonadotropos hipofisarios, modula la concentración de Ca^{2+} intracelular y desencadena la secreción de gonadotropinas. Recientemente, empleando preparaciones tisulares hipofisarias para explorar la dinámica de calcio intracelular, se demostraron diferencias con los resultados en células en cultivo, dando indicios de posibles interacciones entre distintos componentes celulares que afecten la respuesta celular ante un estímulo. En este trabajo, se ocupó imageneología de calcio para registrar los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular promovidos por la aplicación de GnRH 10nM en rebanadas de ratón macho adulto.

Se exploró el efecto de este secretagógo en toda la glándula, analizando las respuestas desde el nivel dorsal al ventral. Se observó que las células en rebanada presentan todos los tipos de patrones de respuesta (oscilatoria, bifásica oscilatoria, bifásica no oscilatoria y transitoria) antes descritos. Sin embargo, cuando se aborda desde una perspectiva tridimensional, podemos observar claras diferencias en la cantidad de células con por ejemplo un patrón oscilatorio entre la región ventral y la dorsal de la hipófisis.

Del mismo modo la actividad oscilatoria tiende a diferir en amplitud y frecuencia, presentándose una mayor movilización de calcio intracelular en la región central de la porción ventral; esto puede ser debido a una regionalización del propio tamaño de los gonadotropos, ya que se presentan células de mayor tamaño en la región ventral. Por último los gonadotropos forman grupos que tienden a responder con el mismo patrón de respuesta de calcio; estos grupos parecen estar delimitados por capilares que forman nichos vasculares. Se podría pensar que la delimitación generada por la vasculatura produce condiciones específicas que crean una coordinación de los gonadotropos que se encuentran en este espacio.

Abstract

The reproductive axis forming by hypothalamus-pituitary-gonads is controlled mainly by the gonadotropin release hormone (GnRH), which to binding a its receptor in the plasmatic membrane of the gonadotrope, modulating the intracellular Ca^{2+} concentration and triggers the gonadotropin secretion. Recently they have been used tissular preparations of pituitary of exploring the intracellular calcium dynamics, it has been shown difference with the culture results, giving evidence of possible interactions between different cellular components affecting it the cellular response.

In this work, will occupy calcium imageonology for recording the changes of the intracellular calcium concentration promoted by the apply of 10 Nm of GnRH in slices of pituitary of adult male mice, we explored the effect of the secretagoge in all the gland, analyzing the responses from the dorsal to a ventral region. It was observed that cells in slice, have all types of response patterns (oscillatory, biphasic oscillatory, biphasic non-oscillatory and transient) described. However, when it is approached from a three-dimensional perspective, we can see clear differences in the number of cells with such an oscillatory pattern between the ventral region and the dorsal of the pituitary gland. In the same way the oscillatory activity tends to differ in amplitude and frequency, presenting a greater mobilization of intracellular calcium in the central region of the ventral portion; This can be due to a regionalization of the size of the gonadotropos, since larger cells are present in the ventral region.

Finally the gonadotropos form groups that tend to respond with the same pattern of calcium response, these groups seem to be delimited by capillaries which form vascular niche. You might think that the delimitation generated by the vasculature produces specific conditions that create a coordination of the gonadotropos that are in this space.

Introducción

Eje hipotálamo-hipófisis

El sistema neuroendocrino es el encargado de transmitir e integrar de manera rápida y eficiente la información de las diferentes partes del cuerpo. Está compuesto por el sistema nervioso y el sistema endocrino los cuales se complementan, comunican e interactúan para poder responder ante cualquier cambio externo e interno y mantener la homeostasis de un organismo (2, 4).

La principal conexión entre el sistema nervioso y el sistema endócrino es el hipotálamo; esta región del cerebro constituye menos del 1% de su volumen; a través de la secreción de hormonas tróficas estimula positiva y/o negativamente la glándula hipófisis. A su vez, las hormonas secretadas por la hipófisis regulan la función de otras glándulas y tejidos del organismo, modulando así distintas funciones tales como la reproducción, lactancia y metabolismo, entre otras. Esta estrecha asociación entre el hipotálamo y la hipófisis establece un eje regulatorio conocido como eje hipotálamo-hipófisis(4, 5) .

Hipófisis

Localización y estructura

La glándula hipófisis se localiza en el hueso esfenoidal sobre la silla turca en la base de la cavidad craneal; se encuentra unida al hipotálamo por medio del tallo infundibular, región donde se proyectan los axones provenientes de las neuronas hipotalámicas (6). Esta glándula está compuesta por dos entidades embriológica, anatómica y funcionalmente distintas: la neurohipófisis y la adenohipófisis. La neurohipófisis incluye el lóbulo posterior, mientras que la adenohipófisis está conformada por los lóbulos anterior e intermedio (Figura 1) (7) .

En el lóbulo posterior se encuentran las terminales axónicas provenientes de las neuronas hipotalámicas de los núcleos supraóptico y paraventricular, las cuales sintetizan y secretan vasopresina y oxitocina (Figura 3) (8).

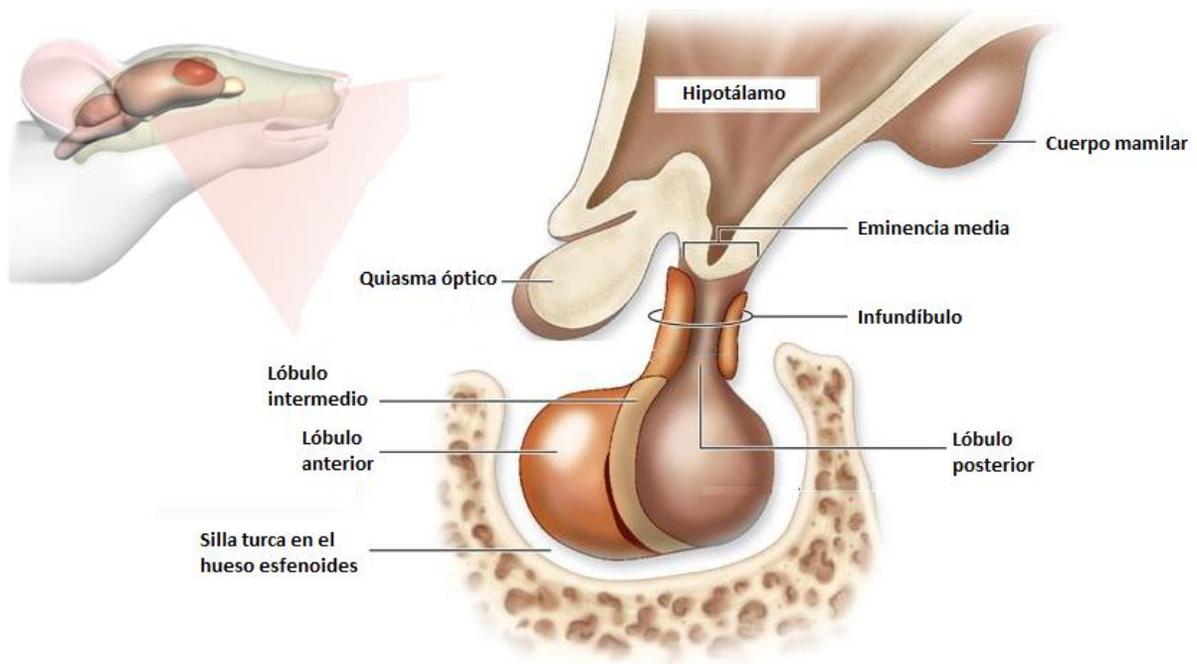


Figura 1 . Glándula Hipófisis. Localización anatómica y estructura de la hipófisis de ratón modificada de Human anatomy MacGraw Hill companies.

En la adenohipófisis el lóbulo intermedio está poblado por melanotropos que sintetizan y secretan melanotropina; mientras que el lóbulo anterior está constituido por cinco tipos celulares endócrinos (corticotropos, tirotropos, somatotropos, lactotropos y gonadotropos) que sintetizan y secretan seis principales hormonas que regulan una gran cantidad de procesos biológicos (Figura 2). Además, el lóbulo anterior tiene poblaciones celulares no endócrinas, como las células folículo estrelladas y los pericitos (8).

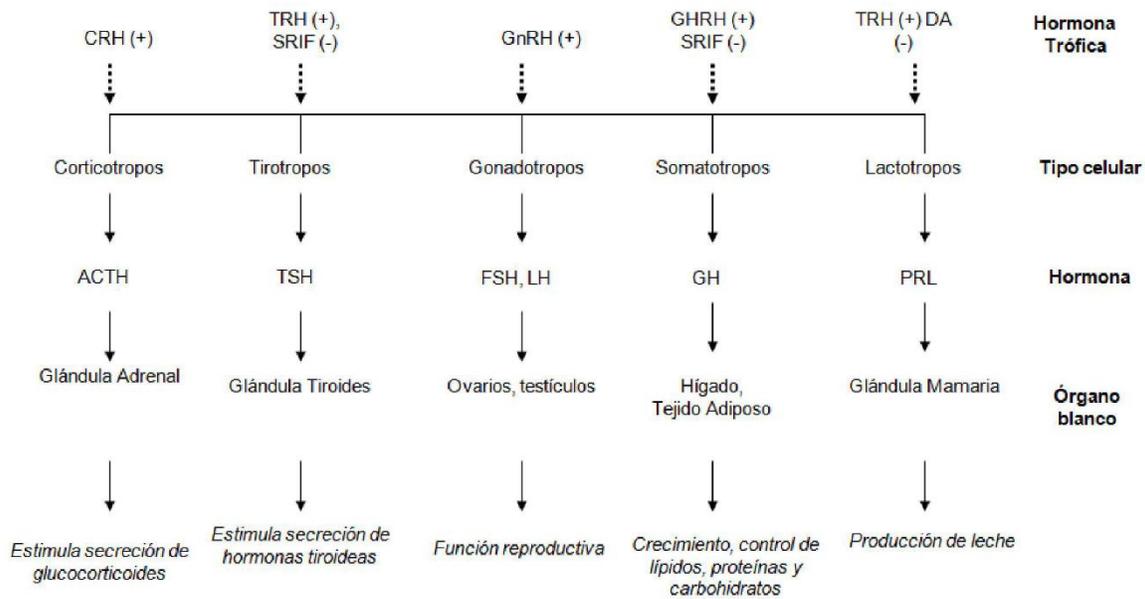


Figura 2. Hormonas tróficas hipotálamicas, tipos celulares adenohipofisarios, su secreción hormonal y principales efectos en el organismo. Las hormonas tróficas pueden regular inhibiendo o estimulando un grupo específico de células adenohipofisarias, quienes a su vez secretarán hormonas que actúan en glándulas específicas controlando diversos procesos fisiológicos (3).

Irrigación

La irrigación sanguínea de la hipófisis procede de las arterias hipofisarias superior e inferior; esta última suministra de sangre principalmente a la neurohipófisis, mientras que la arteria superior suministra a la adenohipófisis. La irrigación sanguínea en esta región es de suma importancia, no solo porque por este medio llegan todos los compuestos necesarios para el metabolismo celular y se colectan las hormonas adenohipofisarias secretadas que son liberadas a la circulación sistémica hasta llegar a su órgano blanco, sino también por que debido a que la adenohipófisis carece de inervación neuronal, los factores reguladores hipotálamicos son liberados en el torrente sanguíneo y llegan por este medio a la adenohipófisis (9, 10).

La irrigación adenohipofisaria fluye descendentemente, es decir, desde el hipotálamo hacia la hipófisis y se le conoce como sistema portal hipotálamo-hipófisis. El término “sistema portal” es utilizado para describir el patrón de circulación que va de capilares a venas, posteriormente de éstas a capilares, y nuevamente a venas (9, 10).

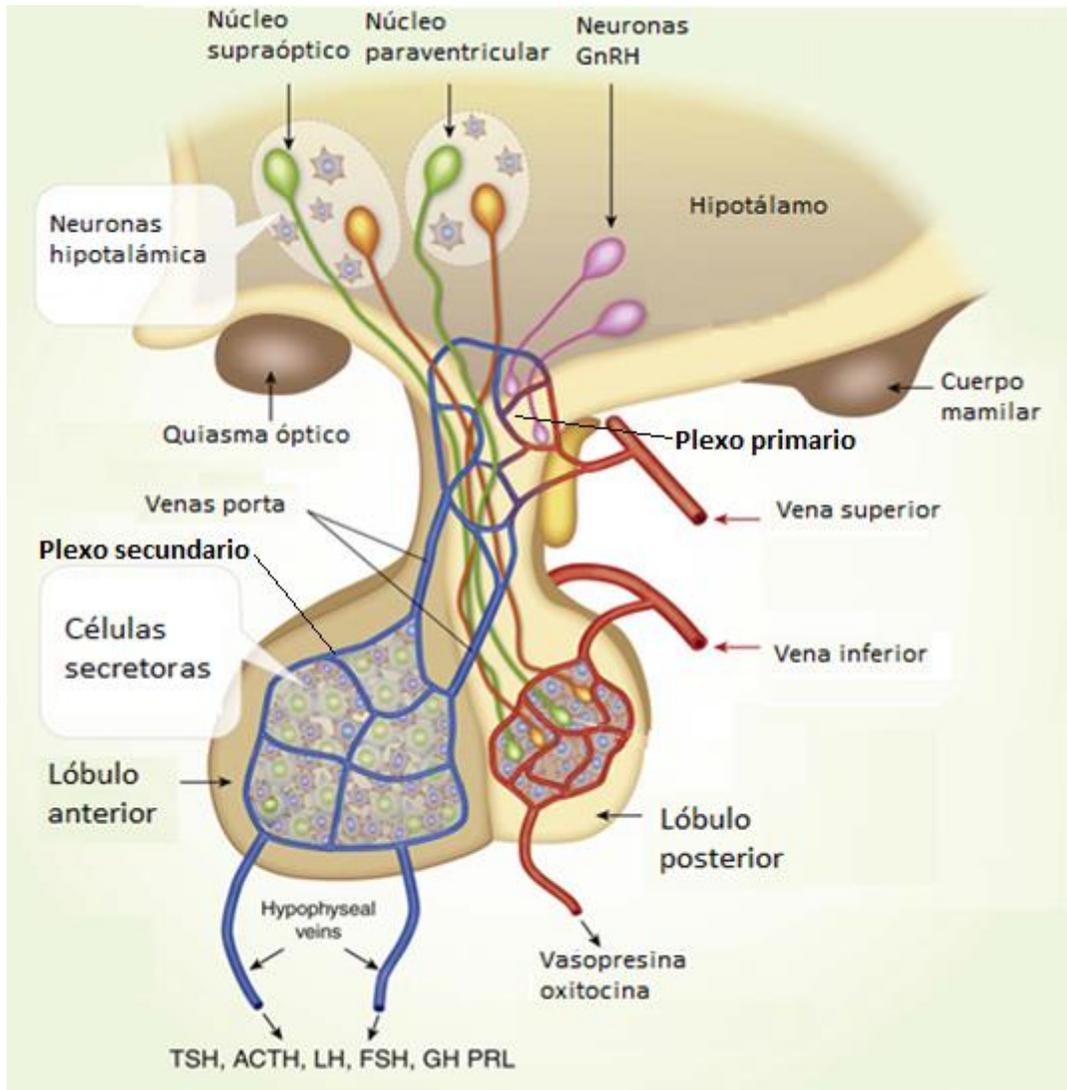


Figura 3. Sistema porta hipofisario. Esquematización anatómica del sistema porta hipofisario y proyecciones hipotálamicas que liberan factores hipotálamico inhibidores y estimuladores (2).

El sistema porta hipotálamo-hipofisario está formado por dos plexos capilares, primario y secundario, conectados entre sí por los vasos portales largos. El plexo primario, se forma en la eminencia media y el infundíbulo; en esta zona, la arteria superior suministra de sangre y las terminales axónicas que liberan las hormonas hipotálamicas. Los capilares de este plexo confluyen hasta formar los vasos portales largos que llegan a la parte inferior del tallo hipofisario, ramificándose en la adenohipófisis y dando origen a la segunda red de capilares que conforman el plexo secundario (11).

El plexo secundario también está formada por una red de capilares fenestrados y se distribuye por toda la adenohipófisis, permitiendo el abastecimiento de oxígeno, nutrientes y factores hipotalámicos a todas las células adenohipofisiarias. Además, en este plexo se colectan las hormonas sintetizadas y secretadas en la adenohipófisis, y subsecuentemente transportadas hacia la circulación sistémica (Figura 3).

Regulación de la hipófisis

Como hemos mencionado anteriormente la hipófisis regula una gran variedad de funciones corporales mediante la interacción de múltiples hormonas; este hecho pone en manifiesto la importancia de la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisiaria.

La hipófisis puede regularse a tres niveles. El primer nivel es a través de los factores hipotalámicos, los cuales tienen una vida media corta en la circulación, y actúan rápidamente en sus células blanco ya sea ejerciendo una respuesta inhibitoria o estimuladora (12). Los principales factores hipotalámicos inhibitorios son la dopamina y la somatostatina; mientras que dentro de los estimulatorios encontramos a la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (3).

El segundo nivel (asa de retroalimentación corta) de regulación es ejercido por mecanismos parácrinos y/o autócrinos (Inhibina, folistatina y activinas, etc) en la hipófisis. Finalmente, los productos hormonales hipofisarios tendrán su acción fisiológica en distintos órganos blanco induciendo una secreción de diversos factores u hormonas, estos pueden establecer un asa de retroalimentación larga tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Figura 3) (9) y constituir el tercer nivel de regulación conocido como eje hipotálamo- hipófisis-órgano blanco.

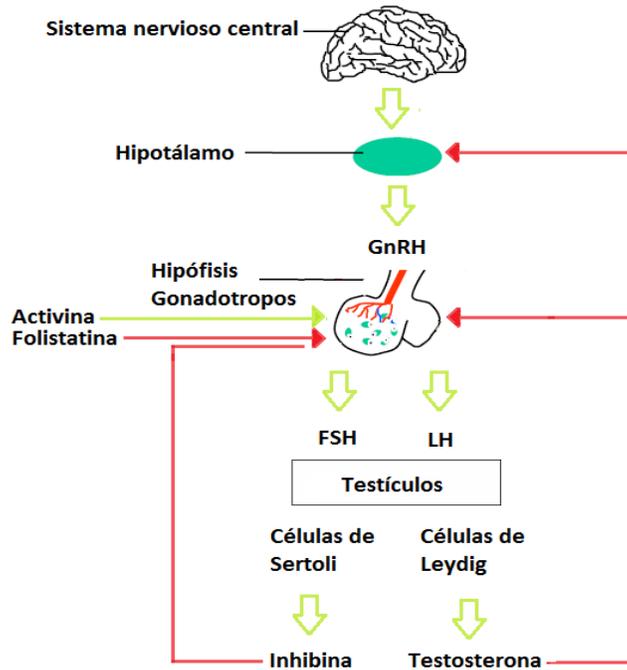


Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en el macho (HHG). Distintos niveles de regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG), las flechas verdes indican una acción estimulatoria, mientras que las flechas rojas indican una acción inhibitoria (9).

Eje Hipotálamo-hipófisis-gónadas

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas regula la función reproductiva y la maduración sexual. En este eje el hipotálamo sintetiza y secreta GnRH en la eminencia media, quien llega al plexo secundario de donde difunde hacia la adenohipófisis, en donde se encuentran sus células blanco, los gonadotropos. El GnRH es el principal estimulador de los gonadotropos, quienes a su vez, sintetizan y secretan la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), glicoproteínas diméricas que comparten la subunidad α , mientras que la subunidad β es diferente y es codificada por genes distintos (13). Estas dos hormonas juegan un rol esencial en el control de la estereoidogénesis, gametogénesis y ovulación al actuar sobre las gónadas (Figura 4) (14).

Gonadotropos

Los gonadotropos, objeto de estudio del presente trabajo, se diferencian en etapas tempranas del desarrollo fetal de la hipófisis; en el adulto constituyen aproximadamente 7-15 % de la población celular endócrina (15); son células de tamaño medio 10-20 micras, de forma ovalada

o irregular y con un prominente núcleo. Los gránulos secretores vistos al microscopio electrónico son electro-densos y varían en su tamaño, los grandes de 350 a 450 nm y los más pequeños de 150-250 nm. Los gránulos secretores pueden estar constituidos por sólo una hormona (monohormonales) o por ambas (bihormonales). Aproximadamente el 70% de los gonadotropos en la hipófisis de rata adulta contienen en sus gránulos de secreción tanto FSH como LH, en gránulos independientes, es decir son bihormonales, mientras que sólo el 15 % contiene gránulos de una sola hormona (9).

La síntesis y secreción de FSH y LH son eventos independientes. Se ha observado que la secreción de FSH es mayoritariamente constitutiva, ya que ocurre como resultado de la velocidad de síntesis de su subunidad β (16). Por el contrario, la LH es secretada predominantemente a través de una vía regulada, pues es sintetizada y almacenada, y su liberación ocurre de manera pulsátil una vez que se presenta la estimulación del GnRH (17).

Sin embargo, existen estudios que sugieren que la síntesis y secreción de gonadotropinas es regulada por la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH. Los pulsos de secreción de GnRH con frecuencias altas (8 min) estimulan la síntesis y secreción de LH, frecuencias intermedias (30 min) estimulan tanto a la subunidad α , como a LH β y FSH β , mientras que la síntesis y secreción de FSH es favorecida con frecuencia de pulsos de GnRH baja (13, 16).

El GnRH

El GnRH es un decapeptido sintetizado y liberado en pulsos sincronizados cada 30-120 minutos (13) desde neuronas denominadas GnRHérgicas, localizadas en el hipotálamo basal en el núcleo arcuato (18). Se han identificado 23 formas de GnRH, los cuales tienen en su NH₂ y COOH terminal secuencias de aminoácidos conservados y entre estas regiones presentan secuencias no conservadas. En los vertebrados se presenta el GnRH II, el cual tiene una estructura completamente conservada desde los peces óseos hasta el humano. Se presume que es la primera forma evolucionada con funciones críticas. Además, el GnRH I es la forma hipofisiotrófica, mientras que solo en algunos vertebrados podemos encontrar el GnRH III (19).

En mamíferos se encuentran principalmente la isoforma GnRH I y GnRH II (19) . La modificación de la amplitud y frecuencia de la secreción pulsátil de GnRH I regula la síntesis y secreción de gonadotropinas y altera el funcionamiento reproductivo(16).

Receptor de GnRH

La acción de GnRH se da principalmente a través de la unión con su receptor específico, el receptor de GnRH (GnRH-R). Este receptor es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G del tipo rodopsina; presenta siete dominios transmembranales unidos entre sí por una serie de asas intracelulares y extracelulares con el dominio amino terminal en la región extracelular y el carboxilo terminal en la intracelular (Figura 5) (20). Las asas extracelulares, son típicamente responsables de los eventos de unión, especialmente en la tercera asa extracelular, las asas intracelulares y el carboxilo terminal median la transducción de señales, como la unión a la proteína G, eventos de propagación de señales, desensibilización e internalización del receptor de GnRH (21).

En vertebrados se han identificado tres formas del GnRH-R nombrados como tipo I, II y III. Los distintos tipos de receptores difieren en la secuencia de aminoácidos de la tercer asa extracelular, la cual determina la selectividad del receptor por las distintas variantes del GnRH, así como en el tamaño del carboxilo terminal, el cual está relacionado con la desensibilización e internalización del receptor de GnRH (16, 21).

Dinámica de Ca^{2+} intracelular en gonadotropos hipofisarios

La exocitosis en las células excitables es un proceso altamente dependiente de un aumento en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Las elevaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurren espontáneamente o en respuesta a la estimulación de una agonista y comúnmente son expresadas como oscilaciones de Ca^{2+} ; estas oscilación pueden depender de la entrada de calcio extracelular o/y la liberación de depósitos intracelulares (25).

Los gonadotropos, al igual que otras células endócrinas hipofisarias, presentan potenciales de acción espontáneos que involucran la apertura de canales de calcio activados por voltaje; éstos potenciales generan señales de Ca^{2+} en el interior de la células sin evocar la secreción de gonadotropinas (25, 26). La secreción en los gonadotropos es generada por un incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido principalmente por la unión del GnRH con su receptor específico (GnRH-R) en la membrana plasmática y la activación de una cadena de segundos mensajeros.

Tras la unión del GnRH al GnRH-R la subunidad α de la proteína Gq/11 se disocia y activa la fosfolipasa C (PLC- β) lo cual crea una rápida hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), y genera dos segundos mensajeros: 1,4,5 inositol trifostato (InsP_3) y diacilglicerol (DAG); este último activa la proteína cinasa C (PKC), la cual reduce la hiperpolarización mediada por la entrada de Ca^{2+} e incrementa la secreción de gonadotropinas. Por otro lado el InsP_3 se une a su receptor específico ubicado en la membrana del retículo endoplásmico provocando una rápida liberación de calcio; esto se refleja como un incremento rápido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A este proceso se lo conoce como oscilador citoplasmático (Figura 6) (1, 25).

También existe el mecanismo conocido como oscilador de membrana, cuya activación permite a la célula mantener la señal oscilatoria de calcio mediante la entrada de Ca^{2+} y el reabastecimiento de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares a través de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. La actividad sincronizada de los dos osciladores proporciona una señal de larga duración que mantiene la secreción de gonadotropinas (13).

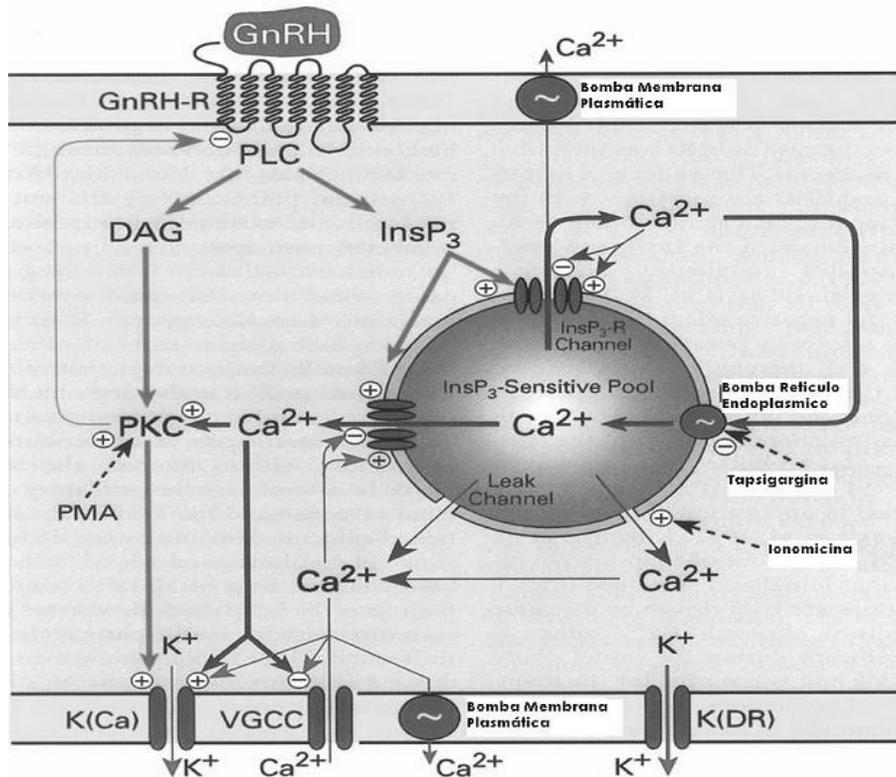


Figura 6. Representación esquemática de la señalización de Ca^{2+} en los gonadotropos. PLC fosfolipasa C, DAG diacilglicerol, InsP_3 inositol trifosfato, InsP_3R , receptor de inositol trifosfato, PKC proteína cinasa C, VGCC canales de calcio activados por voltaje.

Antecedentes

Patrones de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de GnRH

La caracterización de la dinámica de los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos ante la aplicación de dosis crecientes de GnRH se ha estudiado en células aisladas (cultivo celular). En esta preparación se ha estereotipado la progresión de la respuesta a concentraciones crecientes de GnRH; a concentraciones subumbrales se producen pequeños transitorios monofásicos de calcio; en [0.1-10 nM] de GnRH se observan oscilaciones Ca^{2+} intracelular de gran amplitud con una frecuencia modulada ante el incremento de la [GnRH]; al llegar a [50- 100 nM] de GnRH, se han reportado respuestas bifásicas con amplitud modulada con dos variantes; bifásica oscilatoria y bifásica no oscilatoria (Figura 7) (1, 25).

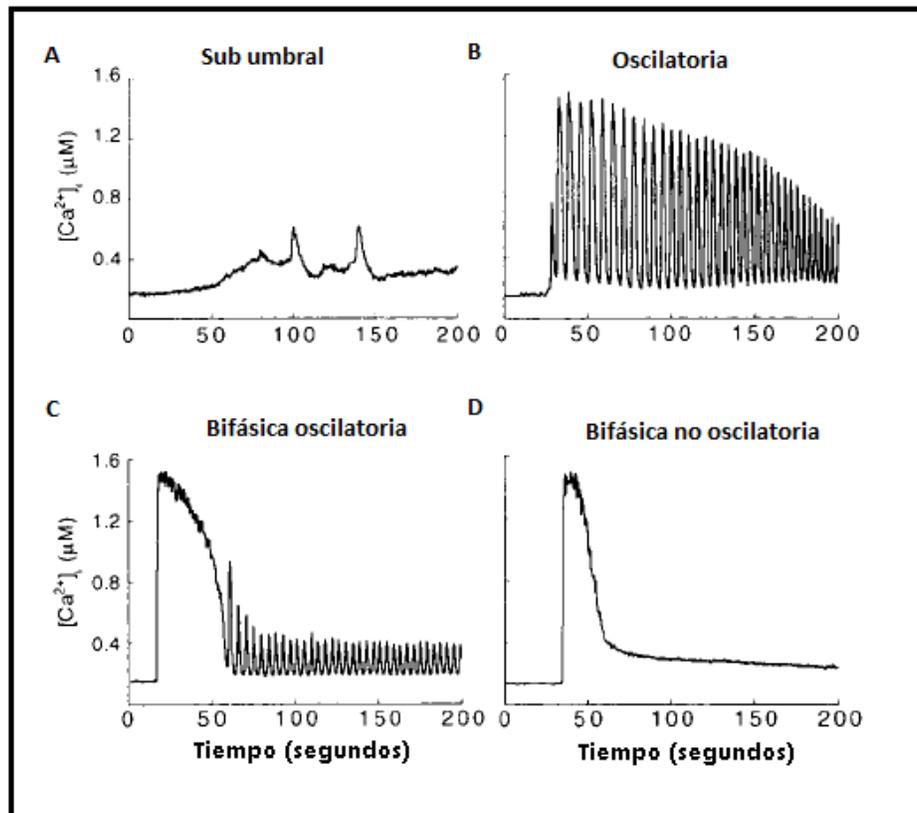


Figura 7. Patrones típicos de respuesta de Ca^{2+} intracelular ante el estímulo con GnRH en gonadotropos en cultivo primario. (A) Respuesta subumbral (B), oscilatoria, (C) bifásica oscilatoria y (D) bifásica no oscilatoria. Modificado de Tomic (1).

Se ha sugerido que los patrones de cambio de $[Ca^{2+}]_i$ codifican diversas funciones en los gonadotropos; así, las respuestas bifásicas oscilatorias son asociadas con la secreción de LH y las

respuestas oscilatorias con la síntesis de la subunidad beta de LH. Sin embargo, recientemente se ha establecido que tanto las respuestas en meseta como las oscilatorias pueden desencadenar la secreción de LH (26).

Preparaciones tisulares

La mayoría de los trabajos en torno a la caracterización de las respuestas a los estímulos fisiológicos en las distintas poblaciones celulares hipofisarias, se han realizado en condiciones *in vitro* y se ha explorado poco la posible regionalización de éstas. Sin embargo, en trabajos descriptivos, de reciente publicación, se ha propuesto que la hipófisis no es un mosaico de células productoras de hormonas distribuidas aleatoriamente como se pensó durante mucho tiempo (6, 27, 28), sino que está conformado por redes celulares altamente organizadas e interdigitadas con interacciones de redes homotípicas y heterotípicas (29).

Aunado a lo anterior, algunos estudios fisiológicos empleando preparaciones organotípicas como las rebanadas de tejido, han demostrado que los gonadotropos no presentan el mismo tipo de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de distintas concentraciones de GnRH que los gonadotropos en cultivo (30, 31).

Estudios en rebanadas de hipófisis de ratón muestran que en el 58% de los gonadotropos, los patrones de señalización de Ca^{2+} intracelular ante la estimulación con dosis crecientes de GnRH, exhiben una progresión en los patrones de respuesta llamada "no canónica", refiriendo a diferencias en la progresión con los patrones establecidos en cultivo (mencionados anteriormente); el 3.6% de estos gonadotropos responde de una forma atípica (no oscilatoria) (Figura 8); en adición la respuesta ante el GnRH varía considerablemente de una célula a otra (26).

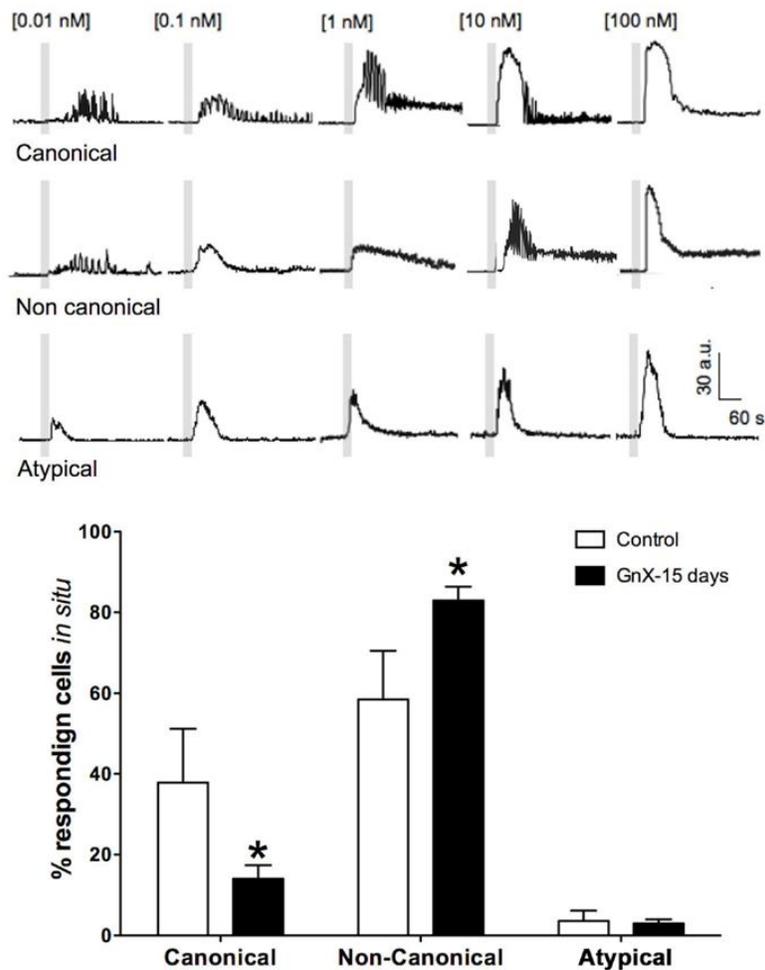


Figura 8. Progresión de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ ante la estimulación con dosis crecientes de GnRH en gonadotropos en rebanadas de tejido. La progresión de la respuesta ante la estimulación con distintas dosis de GnRH en rebanada de hipófisis (respuesta no canónica en la mayoría de las células) difiere de la respuesta descrita en cultivo celular (canónica) e inclusive hay un pequeño porcentaje de células con una respuesta atípica.

Además de las variaciones en la progresión de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, se ha reportado un aumento de los gonadotropos que responden ante dosis crecientes de GnRH, a pesar de que no todas las células responden a todas las dosis, existiendo células que responden sólo a una o dos dosis. Lo cual nos sugiere que no sólo hay un reclutamiento si no también un recambio de nuevas células responsivas al GnRH (30).

De igual forma, se pudo observar que los gonadotropos que responden con un mismo patrón de cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ tienden a formar grupos anatómicamente cercanos; estos grupos están distribuidos en todo el lóbulo adenohipofisario. Es por ello que si bien no se encontró una

ubicación específica para los gonadotropos, se observa que las células que responden con un mismo patrón a un estímulo de GnRH tienden a formar pequeños grupos (Figura 9) (30).

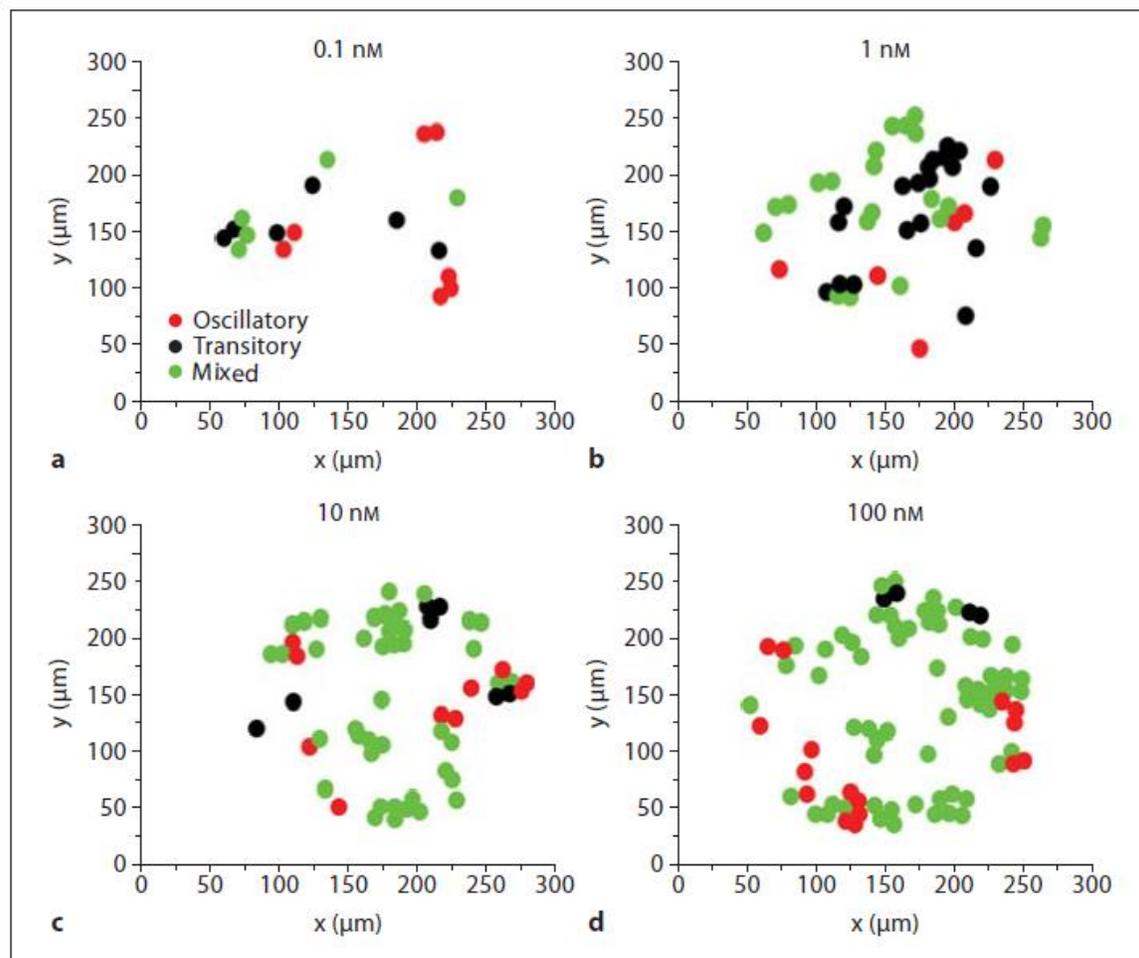


Figura 9. Distribución espacial de gonadotropos que responden a GnRH. Se observan tanto respuestas bifásicas, transitorias y mixtas en todas las dosis así como formación de pequeños grupos de células con el mismo patrón de respuesta (30).

Redes celulares

Ahora es conocido que las células endocrinas están organizadas en redes tridimensionales, lo cual facilita y promueve la coordinación de la actividad de cientos de células individuales para responder a diferentes factores regulatorios y lograr una adecuada secreción hormonal (6, 26, 32).

Las redes celulares se han estudiado principalmente en el cerebro. En este órgano se sabe que las neuronas se organizan en redes funcionales en donde neuronas individuales con elementos

de procesamiento básicos trabajan de manera eficiente y colectiva, integrando y propagando información compleja y mediando funciones importantes como procesos visuales y formación de memoria (6). Además las redes neuronales contribuyen a la plasticidad ante la demanda de distintas condiciones fisiológicas (33, 34). Sin embargo, se ha puesto poca atención a la organización de redes celulares homotípicas y heterotípicas que forman a otros órganos y su función biológica (35).

En la hipófisis la noción de redes de células endocrinas es nueva y recientemente se ha estudiado la organización de distintos linajes celulares; hasta ahora se conoce que la distribución de las células endocrinas no es al azar como durante mucho tiempo se creyó (32). Esta distribución no aleatoria puede estar relacionada con la adecuada generación de pulsos hormonales, ya que no solo se requiere una gran cantidad de energía para ello, sino también la sincronización de centenas de células y la entrada en un tiempo preciso de toda la secreción hormonal en el torrente sanguíneo para una adecuada señalización cascada abajo y por ende una correcta respuesta fisiológica (36, 37).

Redes endocrinas y vasculatura

Ya que es por medio de la vasculatura que los factores hipotalámicos son liberados y las hormonas hipofisarias son colectadas no es difícil suponer que la vasculatura también este organizada dentro de una red de capilares y que la relación de esta red con las redes celulares de la hipófisis sea de gran importancia para la función de la glándula. Hasta el momento se ha demostrado una disposición no aleatoria entre las redes endocrinas y la vasculatura; los somatotropos se encuentran en proximidad a la vasculatura formando cumulos (32, 37), los lactotropos se encuentran posicionados en estructura de panel de abejas rodeados por capilares (38), los gonadotropos están íntimamente ligados con la vasculatura formando cumulos, mientras que los corticotropos son más distantes pero presentan extensiones que tienen contacto con los capilares (35).

Además de las redes homotípicas se sabe que las distintas redes endocrinas pueden interaccionar. Algunas investigaciones recientes sugieren que la organización de los distintos tipos celulares se ven influenciados por esta interacción, como las observaciones de las redes de gonadotropos y corticotropos las cuales parecen estar entrelazadas (35). Se ha observado, que en ratones genéticamente modificados en los cuales se produce una nula diferenciación de corticotropos los gonadotropos presentan una hiperproliferación e hipertrofia. La interacción entre los lactotropos y los gonadotropos también se ha sugerido, ya que una ablación de los gonadotropos afecta el desarrollo de la red y parece tener una afectación directa en la organización de los lactotropos (39).

Tanto las redes homotípicas como heterotípicas podrían darle robustez, modularidad y conectividad a la glándula, permitiendo una correcta comunicación y coordinación que permitiera una precisa estimulación espacio-temporal de la actividad de los componentes de las redes para asegurar con ello la generación de un pulso hormonal (32).

La organización de los gonadotropos con la vasculatura y la interacción con otras redes de células endocrinas podría generar un microambiente en el cuál los gonadotropos tengan una “inhibición” temporal que permita a estas células recargar el grupo vesicular de secreción para poder responder a subsecuentes estímulos.

Estos microambientes podrían comunicarse de manera similar a como lo hacen las células foliculo estrelladas, quienes exhiben un sistema de comunicación de larga distancia y son capaces de generar y transmitir señales regenerativas, como ondas de Ca^{2+} o moléculas que difunden célula-célula a través de la red glandular (40, 41). La regulación de los microambientes podría darse a través de distintos factores y componentes locales que los integran, además de las interacciones de las distintas poblaciones endócrinas que interactúan con los gonadotropos en estos nichos, las cuales podrían afectar paracrinamente la distribución espacial y temporal del tipo de respuesta al GnRH durante un estímulo. Éste microambiente, podría generar condiciones específicas que ocasionaran que los gonadotropos que se encuentran en estas zonas respondieran de forma similar.

Hipótesis

Se presentará una regionalización funcional (actividad intracelular de calcio) de gonadotropos ante la aplicación de una dosis de GnRH 10 nM. Las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el estímulo de GnRH serán similares en los gonadotropos localizados en un mismo espacio tisular delimitado por la vasculatura en la adenohipófisis de ratón macho.

Objetivo

Determinar las posibles diferencias de actividad de calcio intracelular y de regionalización que muestren los gonadotropos que responden a GnRH, así como reconocer el posible establecimiento de grupos de gonadotropos con un mismo patrón de respuesta por la delimitación de la vasculatura.

Objetivos particulares

Caracterizar:

- I) La regionalización de los gonadotropos responsivos a GnRH 10nM tanto bidimensionalmente (central-lateral) como tridimensionalmente (dorsal-ventral).
- II) Los patrones de respuesta de calcio intracelular de los gonadotropos al estímulo de GnRH.
- III) La distribución de los gonadotropos con respecto a la microvasculatura y con el tipo de respuesta de calcio intracelular producida por el estímulo de GnRH.

Método

Animales

Todos los estudios fueron realizados con ratones macho Balb-C adultos de dos meses de edad. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias, con un ciclo de luz/obscuridad 12:12 a una temperatura constante de 22 °C, con acceso al alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo la Norma oficial mexicana NOM-062-zoo-1999 de especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se ocupó una n=6 para la regionalización.

Obtención de rebanadas de hipófisis

Los ratones macho Balb-c fueron anestesiados con pentobarbital sódico (20 mg/kg) vía intraperitoneal y sacrificados por decapitación. El cerebro fue extirpado dejando expuesta la hipófisis que fue cuidadosamente extraída e inmediatamente embebida en agar al 3% (Invitrogen; Eugene Or, USA) preparado en solución ringer normal (SRN) que contiene (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCL, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaH₂CO₃ y 10 glucosa, ajustada a un pH 7.4. Una vez solidificado el cubo de agar se colocó en la platina de un vibratomo (Leica VT1000S). El recipiente del vibratomo se llenó con SRN fría (~4 °C), la solución se burbujeó con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para mantener el pH. Se obtuvieron rebanadas transversales de 130 µm de grosor, las cuales fueron reservadas en SRN a temperatura ambiente y posteriormente fueron clasificadas del nivel más dorsal al más ventral del 1 al 4, como se muestra en la figura 10.

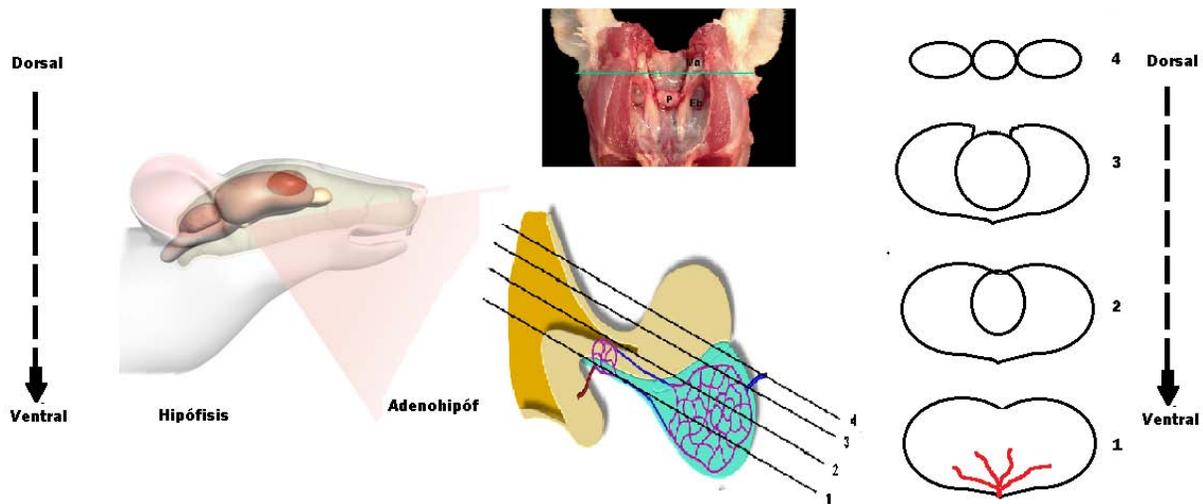


Figura 10. Rebanadas de hipófisis de ratón macho. Clasificación de las rebanadas de hipófisis según su posición de dorsal a ventral.

Marcado de capilares.

Para el marcado de los vasos sanguíneos, se utilizó lectina de *Ricinus communis* acoplada con rodamina (RCA); esta lectina tiene la característica de unirse con la β -galactosa presente en el endotelio de la vasculatura, por lo que la tinción es específica. Las rebanadas fueron incubadas en oscuridad durante 5 minutos a 37 °C con RCA a 5 μ g/ ml, en una atmosfera saturada de 95% O_2 y 5% CO_2 . Una vez terminado el tiempo de incubación las rebanadas fueron lavadas con SRN.

Imageneología de calcio.

Para los registros de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ todas las rebanadas obtenidas se incubaron en la oscuridad con 22 μ M del sensor intensiométrico de calcio acetoximetil de Fluo-4 (Fluo-4AM) (Invitrogen; Eugene Or, USA) en 0.1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St Louis MO, USA) con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA) en 1 ml de SRN durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 .

Una vez terminado el tiempo de incubación las rebanadas se lavaron con SRN y se montaron en una cámara de registro de plexiglás previamente tratada con poly-L-lisina al 30% (Sigma, St Louis

MO, USA) donde se mantuvieron bajo perfusión constante (2ml/min) con SRN a temperatura ambiente con burbujeo de 95% O₂ y 5% CO₂.

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). La excitación del fluoróforo se realizó con una lámpara de arco de mercurio, la luz emitida fue filtrada y se seleccionó la longitud de onda de 488 nm para excitar el fluoróforo; gracias al espejo dicróico la luz seleccionada llega al espécimen y la luz emitida puede ser filtrada con una longitud de onda de 510 nm, como se muestra en la figura 11.

La adquisición se realizó con una cámara CCD enfriada (SenSys), acoplada al microscopio estereoscópico; se registraron secuencias de 300 imágenes, cada imagen fue tomada a 300 ms de exposición.

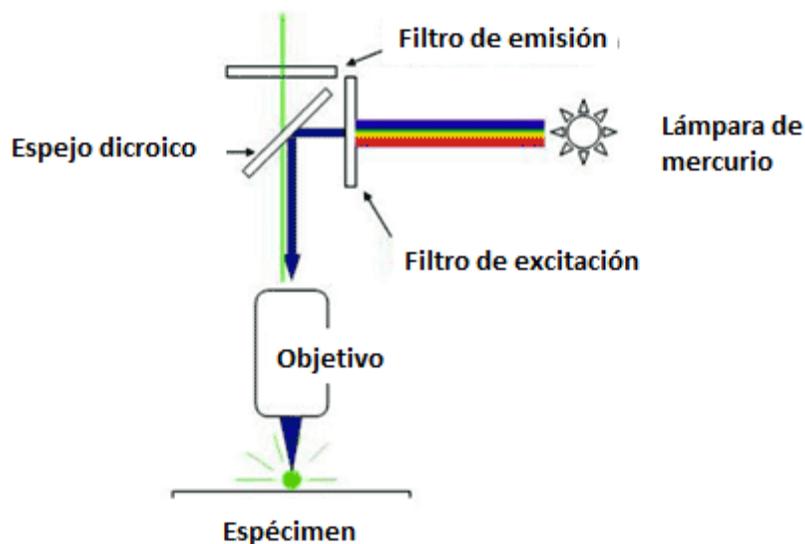


Figura 11. Esquema básico de iluminación de un microscopio de fluorescencia. Se muestra los componentes necesarios para filtrar la luz blanca y seleccionar tanto las longitudes de excitación como de emisión deseadas.

El protocolo consistió en un registro con la perfusión de SRN, para observar la actividad basal, una vez terminado este registro se dio un lapso de 10 minutos para realizar el siguiente registro, el cual consistió en 20 segundos de actividad basal, la solución perfundida fue cambiada a una

SRN con GnRH 10 nM, esta solución fue perfundida durante 30 segundos, concluido este lapso la solución fue cambiada por SRN para realizar el lavado durante el resto del registro.

Para determinar la viabilidad, y la capacidad de respuesta de la rebanada se agregó una solución alta en potasio la cual contiene (en mM): 50 KCl, 120 NaCl, 10 HEPES y 2 CaCl₂ a un pH de 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 510 nm y 575 nm de emisión.

Fijación y realización de inmunotinciones

Una vez terminado el registro de calcio intracelular se fijó la rebanada con N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocilrido (EDAC), durante 90 minutos a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad; cada pozo contenía 250 µL de EDAC (40 mg/ml) en PBS 1X. Después se transfirieron las rebanadas a paraformaldehído 4% (PFA) durante 30 minutos y por último a metanol 100% durante 20 minutos en el congelador. Se realizaron 6 lavados con PBS 1X. Esta fijación nos permite preservar la fluorescencia de aquellas células que incorporan el Fluo-4AM.

Para las inmunotinciones se utilizó anticuerpo primario policlonal anti-βFSH, anti-βLH ambos hechos en conejo (Biogenesis Lan; Poole UK) diluidos 1:500 en solución de bloqueo y permeabilización (2% BSA (p/v) y 0.1 % triton X100 en PBS). El anticuerpo primario se incubó durante una noche en agitación a 4 °C, después se realizaron tres lavados de 30 segundos y dos de 3 minutos con PBS. Se incubaron las rebanadas con un anticuerpo secundario IgG de conejo acoplado con Cy5 diluido 1:100 con solución de bloqueo y permeabilización por dos horas a temperatura ambiente, seguido por lavados con PBS y se montaron las hipófisis en un cubreobjetos; se ocupó medio de montaje de fluorescencia (DAKO) y se dejaron polimerizar para poder ser observadas posteriormente.

Adquisición

Se adquirieron imágenes con un microscopio confocal de disco giratorio (Olympus BX-51W1), la luz de excitación fue a través de una lámpara de mercurio, la adquisición fue con una cámara CCD enfriada (Hamamatsu C9100-02). Con ayuda del software Stereo investigator se fijaron los

parámetros para la adquisición. Se seleccionaron los filtros para la observación de los gonadotropos que incorporaron el Fluo-4AM (488/510), vasculatura (550/575), LH y FSH (647/680). Se utilizaron objetivos de inmersión en agua 20x (0.5 NA) y 40X (1.15 NA) y de inmersión en aceite 60X (1.12 NA).

Procesamiento de imágenes y análisis estadísticos

El procesamiento de las secuencias de imágenes se realizó con ayuda del programa Image J (National Institute of Health), Igor Pro (Wavemetrics) y Origin Pro8 (Microcal software).

La selección de las células que respondieron a GnRH se realizó con el programa Image J; esta selección fue realizada directo en los registros obtenidos. En este programa se transformaron los datos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de digitales a numéricos, así como la distribución espacial (x-y) de las células responsivas. Todas las células seleccionadas fueron inspeccionadas manualmente para eliminar artefactos.

Los datos obtenidos fueron graficados en el programa Igor Pro, donde se utilizó una rutina semi-automática escrita por el Dr. Pierre Fontaneaud (Institute of functional Genomics, Montpellier Francia), para obtener la función $\Delta F = F - F_0$, generando datos corregidos, así como una rutina escrita por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM), para visualizar a través de una gráfica la actividad de todas la células con respecto al tiempo. De estas gráficas pueden ser extraídos los trazos de la actividad de células individuales.

El área bajo la curva fue calculada semi-automáticamente con la ayuda del programa Origin Pro. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa GraphPad Pris V5 (GraphPad Software Inc, California, USA.), y sometidos a una prueba de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tuckey's. Para la figura 20 se realizó una t de Student y para la figura 21 un análisis de correlación, todos con el mismo programa.

Resultados

Rebanadas de ratón macho y tinción de la vasculatura

En años recientes se han estudiado los cambios en la concentración de calcio intracelular de células adenohipofisarias, manteniendo el contexto tisular; para seguir estos cambios se han empleado indicadores fluorescentes sensibles a calcio en rebanadas de hipófisis (42). Con esta técnica podemos tener una resolución espacial y temporal adecuada para observar los patrones de la respuesta de decenas de células en un mismo tiempo; además podemos observar su organización y localización. En la figura 12A se observa un ejemplo de una rebanada después de ser incubada con fluo-4AM y lectina.

Como es conocido las células endocrinas adenohipofisarias presentan actividad de calcio espontánea, la cual se observa como pequeños cambios en la intensidad de fluorescencia con el método intensiométrico de medición empleado en este trabajo; en la figura 12A se observa la actividad basal de las células endocrinas (actividad espontánea) y la respuesta ante la aplicación de GnRH 10nM (12B). Debido a que como se describió en la introducción, en la hipófisis hay 5 tipos celulares endócrinos, solo aquellas células (gonadotropos) que tengan el GnRH-R responderán al estímulo. La tinción de los vasos sanguíneos fue específica y se logró observar la distribución y acomodo de los gonadotropos con respecto a la vasculatura, figura 12 D y E.

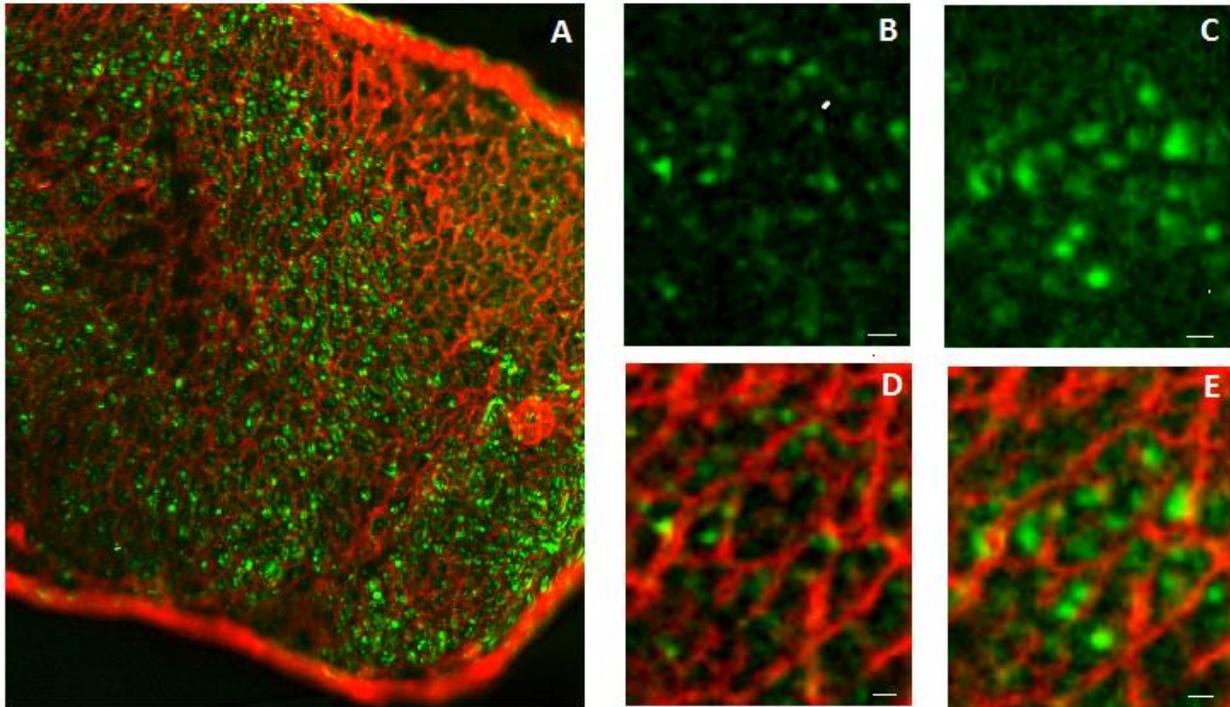


Figura 12. Incorporación del Fluo-4AM y lectina. A) Se presenta una rebanada de hipófisis después de la incubación con Fluo-4AM (Verde) y lectina (rojo), B) Actividad basal de las células endocrinas adenohipofisarias, C) respuesta de los gonadotropos ante el GnRH, D y E) Fusión de la actividad basal y estimulada con la vasculatura. La barra blanca corresponde 20 μm . El aumento en la intensidad de fluorescencia del Fluo-4AM corresponde a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Las células que fueron identificadas como gonadotropos se contabilizaron para cada una de las rebanadas en el eje dorso-ventral; el número de células contabilizadas fue normalizado al área, como se puede observar en la figura 13, en la cual podemos observar que el número de gonadotropos no presenta diferencias significativas ($P < 0.763$) a lo largo del eje dorso-ventral; sin embargo como mostraremos más adelante funcionalmente los gonadotropos tienden a tener diferencias en las distintas regiones estudiadas.

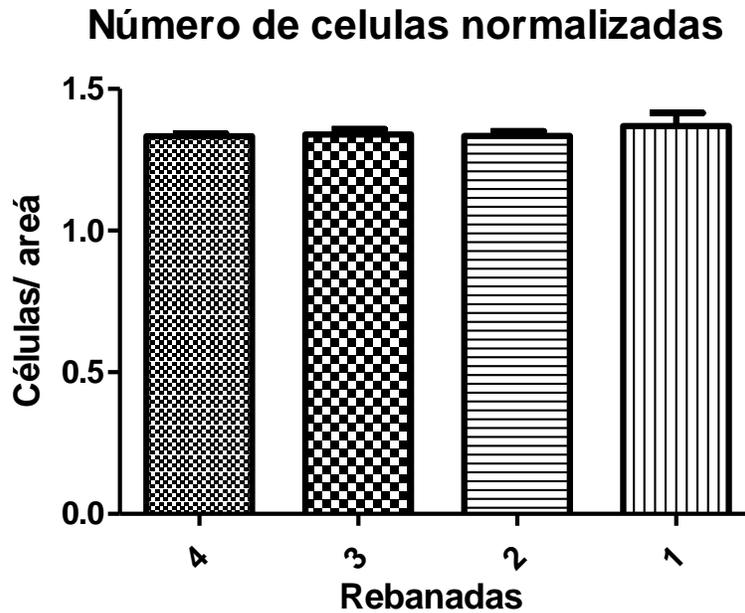


Figura 13. Número de gonadotropos normalizados al área. La cantidad de gonadotropos en cada rebanada de la región mas dorsal (4) a la mas ventral (1) no presenta diferencias significativa ($P < 0.763$). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía ($P < 0.001$) y pruebas de comparación múltiple de Tuckey.

Patrones de respuesta de Ca^{2+} intracelular ante la aplicación de GnRH en gonadotropos de ratón macho.

En los registros de la dinámica de Ca^{2+} intracelular se seleccionaron los contornos de aquellas células que respondieron a GnRH con un cambio en frecuencia y/o amplitud en la $[Ca^{2+}]_i$; estas células fueron utilizadas para la cuantificación de la media del ΔF (cambio de fluorescencia) a lo largo del tiempo y fueron consideradas como gonadotropos.

Las respuestas de las células fueron representadas en una gráfica multicelular, en la cual cada línea representa una célula y se observan los ΔF poblacional con respecto al tiempo. Los ΔF en estos gráficos se representan por cambios en la intensidad del tono de color. Un ejemplo de este tipo de gráficos se muestra en la figura 14A, donde se observa tanto la actividad basal como la estimula de por GnRH y KCl de aproximadamente 200 células (eje Y) en el tiempo (eje X); ya que la estimulación solo fue de aproximadamente de 30 segundos, se observa durante este periodo un aumento en la intensidad de fluorescencia y después de transcurrido este tiempo la disminución de la actividad, la cual se observan con tonos más oscuros (figura 14A).

La respuesta de cada célula se graficó individualmente como se muestra en la figura 14B; los gonadotropos fueron clasificados por sus características de latencia y frecuencia, y clasificados como con respuesta oscilatoria, bifásica o transitoria (figura 15).

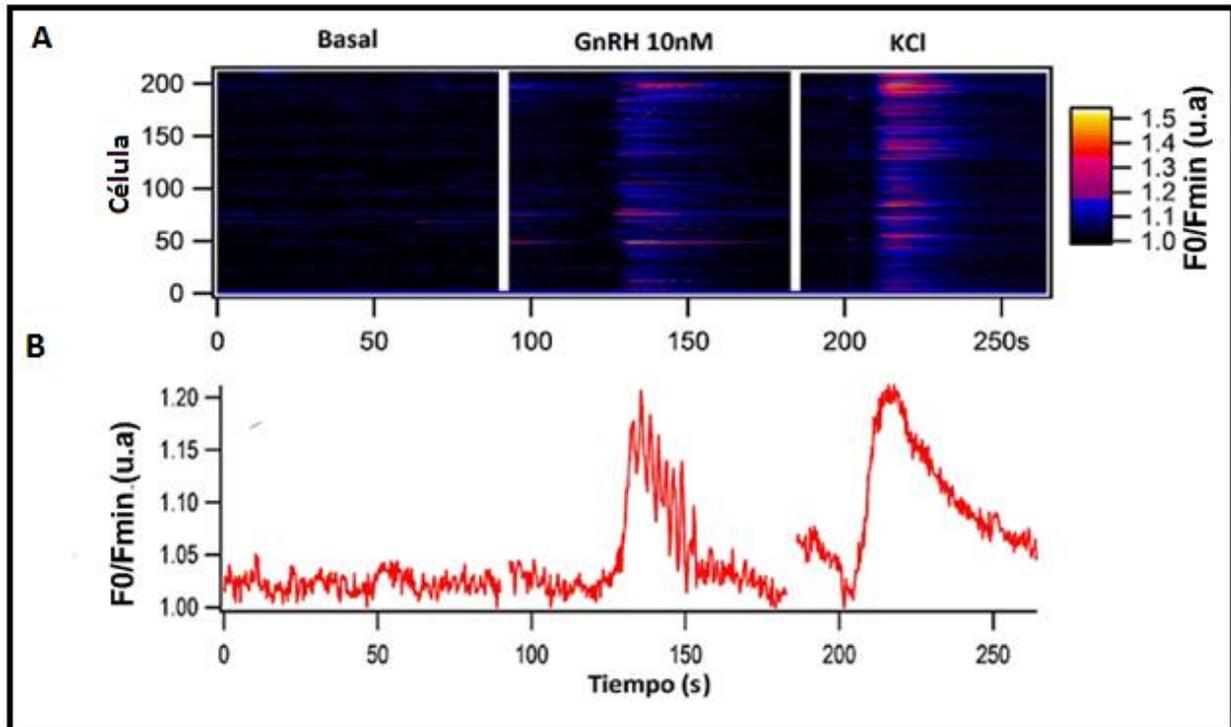


Figura 14. Gráfica multi-celular y unicelular. A) Cambios en la intensidad de fluorescencia de 200 gonadotropos durante su actividad basal y ante la aplicación de GnRH y KCl. B) Gráfica representativa de la actividad de calcio intracelular de un gonadotrope.

Una vez realizada la clasificación de las respuestas, encontramos que los patrones de cambio promovidos por la aplicación de GnRH en las rebanadas de hipófisis de ratón macho son similares a los patrones descritos en cultivo celular (figura 7). Sin embargo, a diferencia de lo reportado en cultivo (1, 25) no encontramos una progresión del tipo de respuesta dependiente de la concentración de GnRH aplicada. En nuestra preparación pudimos identificar los distintos patrones (oscilatorio, bifásico no oscilatorio, bifásico oscilatorio y transitorio) ante la estimulación de una sola concentración de GnRH (10nM) (figura 15).

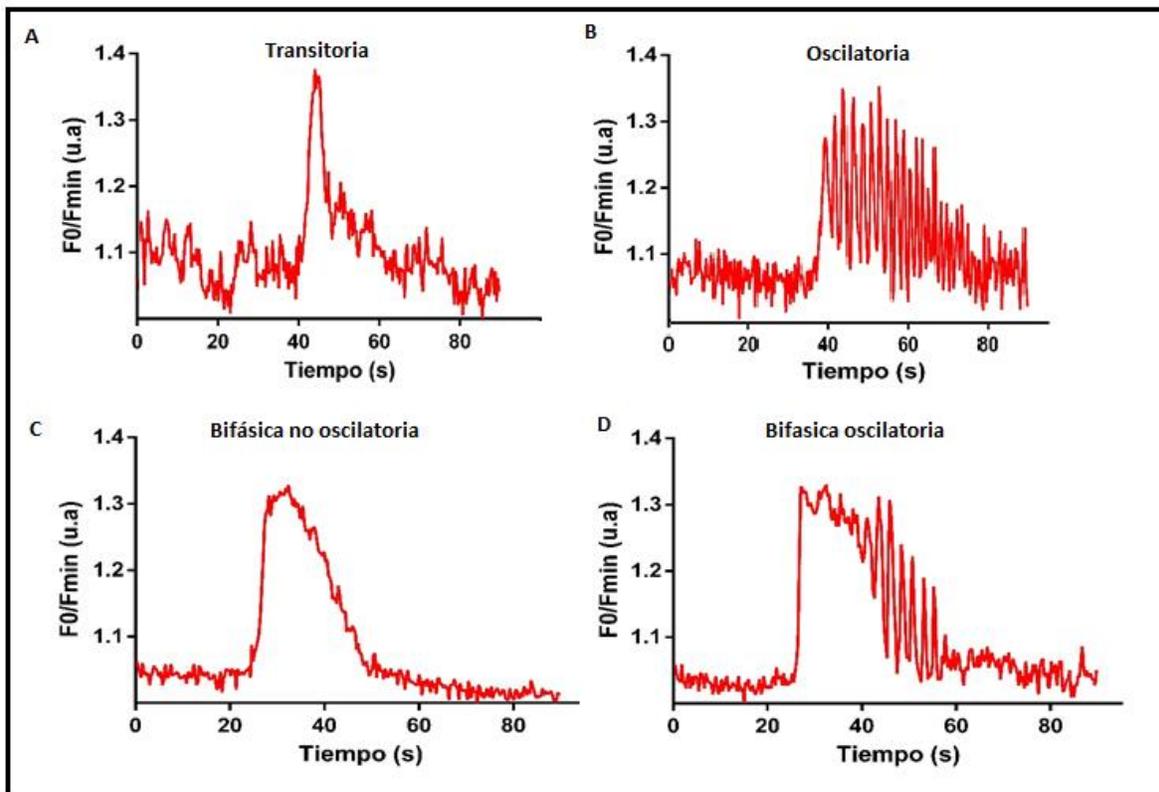


Figura 15. Patrones de respuesta de calcio intracelular de gonadotropos ante el estímulo de GnRH. A) Respuesta transitoria, B) oscilatoria, C) bifásica no oscilatoria y d) bifásica oscilatoria

Regionalización de gonadotropos según su respuesta ante la estimulación con GnRH

Después de ser identificados los gonadotropos que respondieron a GnRH se exploró su ubicación en las rebanadas de hipófisis. Para este propósito utilizamos un enfoque novedoso que consistió de la visualización de una organización funcional tridimensional. Para ello, de una misma glándula, se realizó el registro y análisis de todas las rebanadas obtenidas, que fueron divididas según su posición en el animal, de la región más ventral (rebanada 1) a la más dorsal (rebanada 4). Cada rebanada fue analizada tomando en cuenta la región central y lateral (Figura 10).

Una vez establecidos los parámetros de arreglo tridimensional, se ubicaron los gonadotropos según su tipo de respuesta (figura 16), y se graficaron las posiciones XY de cada gonadotropo con un color según el tipo de respuesta; oscilatorio (rojo), bifásico (azul) y transitorio (verde). En este grafico podemos observar la formación de grupos de células con el mismo patrón de respuesta a GnRH, tema que analizaremos más adelante.

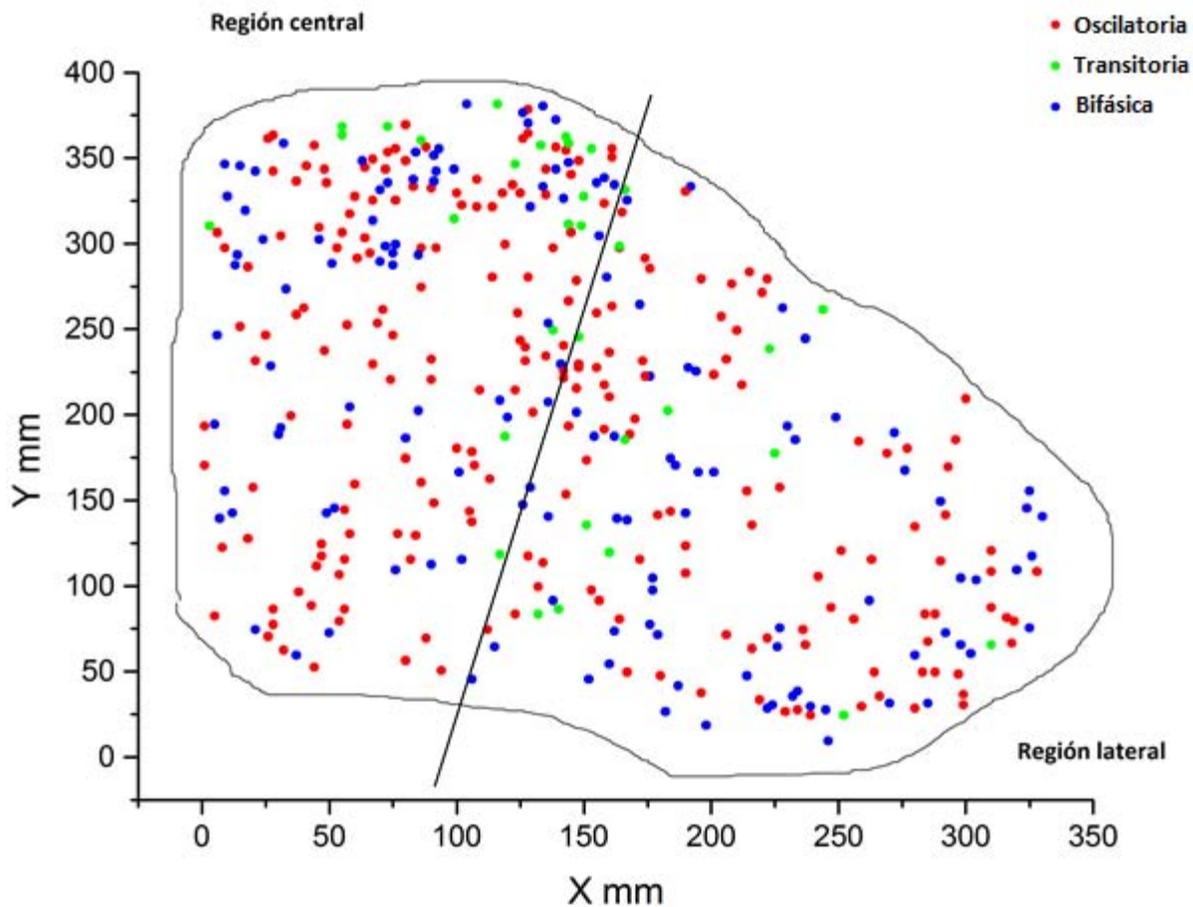


Figura 16. Distribución de los gonadotropos en la hipófisis de ratón macho, según el tipo de respuesta de calcio intracelular que presentan ante el estímulo de GnRH. Gráfica de las posiciones XY de los gonadotropos que respondieron a una dosis de 10 nM de GnRH; cada punto de color representa un gonadotropo, el color está asociado al tipo de respuesta que exhibió el gonadotropo, siendo oscilatoria (rojo), bifásica (azul) y transitoria (verde). La línea representa la división de la región central y lateral.

Encontramos que los gonadotropos se encuentran distribuidos en toda la glándula, en su porción central y lateral (figura 16) y desde la región ventral hasta la dorsal. En todas las regiones estudiadas obtuvimos los distintos tipos de patrones de respuesta a GnRH (figura 17). Las respuestas que predominan son las respuestas oscilatorias y bifásicas (48.8% y 45.7% respectivamente), con un 5.5% de respuestas transitorias. Sin embargo, con este trabajo logramos observar que los gonadotropos presentan una regionalización dependiendo del patrón de Ca intracelular exhibido, no solo en la misma rebanada (central-lateral), sino también una regionalización tridimensional (ventral-dorsal).

Cuando realizamos el análisis bidimensional en cada rebanada, pudimos corroborar que existen diferencias entre la región central con respecto a la lateral. Para las respuestas oscilatorias se presenta una diferencia en el número de células con este tipo de patrón entre la mayoría de las rebanadas ($P < 0.001$). Mientras que para las respuestas bifásicas se encontró una diferencia significativa entre la rebanada 4 y 3 ($P < 0.001$). La regionalización tridimensional, mostro que la región lateral presenta diferencias no significativas ($P < 0.72$) para los tres tipos de respuestas (oscilatoria, bifásica y transitoria) (figura 17). Sin embargo, a diferencia de la región lateral, la región central tiene una diferencia significativa tanto para el patrón oscilatorio como bifásico ($P < 0.001$) en todas las rebanadas (figura 17).

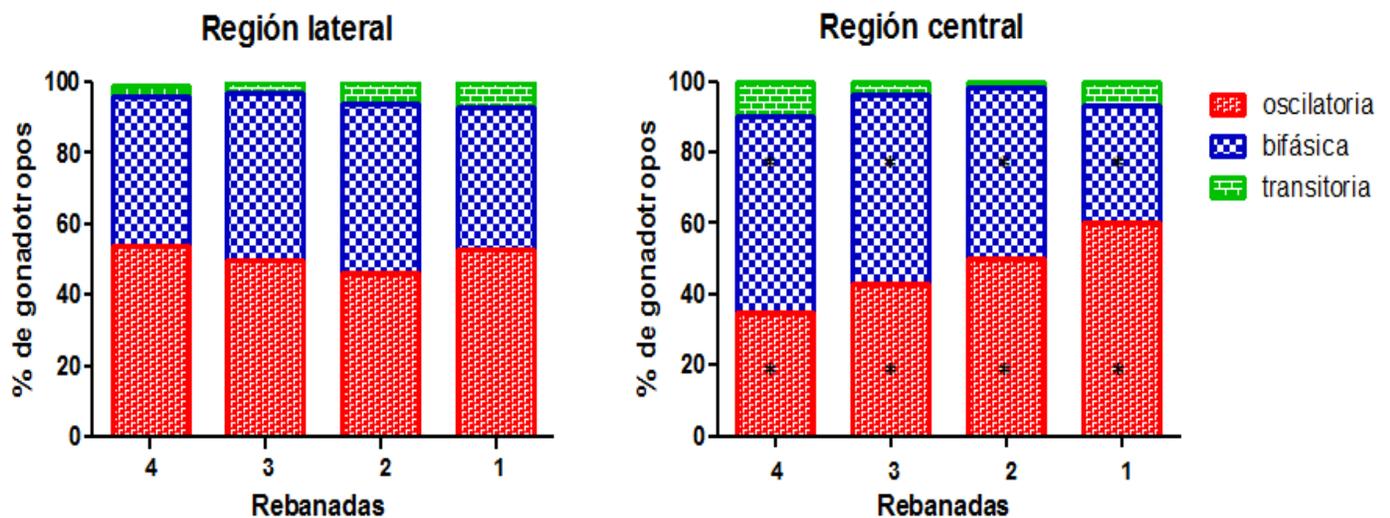


Figura 17. Porcentaje de gonadotropos según los patrones de respuesta de Ca^{2+} promovidos por la aplicación de GnRH 10 nM. Los porcentajes de cada uno de los patrones (oscilatorio=rojo, bifásica=azul y transitoria= verde) se presentan en la rebanada de la región mas dorsal (4) a la mas ventral (1). A) Porcentaje de células en la region lateral. B) Porcentaje de células en la region central. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía ($P < 0.001$) y pruebas de comparación múltiple de Tuckey. Los asteriscos muestran diferencias significativas.

Además de presentar diferencias en el número de células con respuesta oscilatoria observamos que hay una progresión de la región dorsal a ventral, presentando un mayor número de gonadotropos con respuesta a GnRH de tipo oscilatorio la rebanada más ventral (Figura 18).

Respuestas oscilatorias

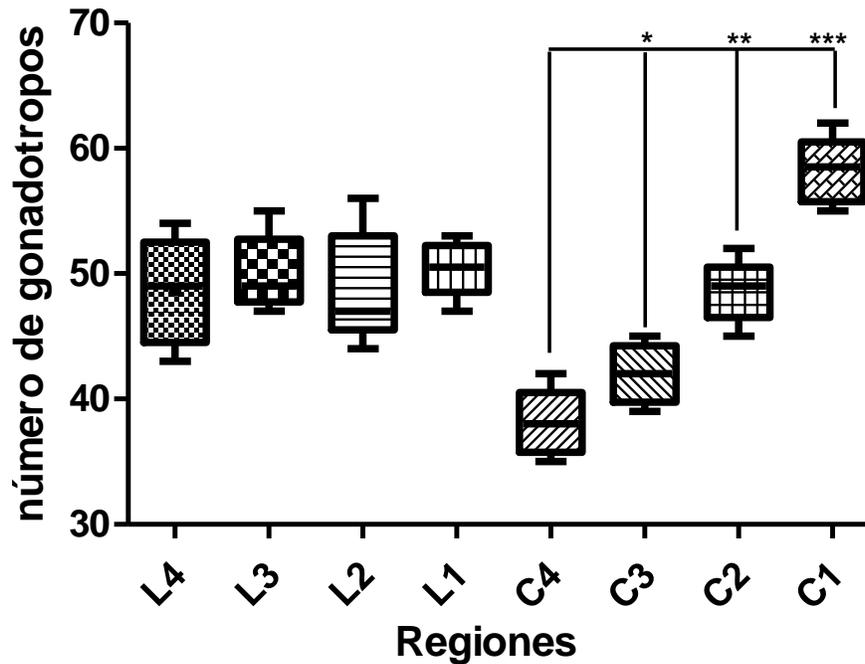


Figura 18. Número de gonadotropos que responden a GnRH con un patrón oscilatorio. La región lateral no presenta diferencias, mientras que la región central presenta diferencias en el número de células con este patrón. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía ($P < 0.001$) y pruebas de comparación múltiples de Tukey. Los asteriscos muestran diferencias significativas. En el eje de las X las letras representan: L=Lateral y C=Central, los números representan las rebanadas de la región más dorsal 4 a la más ventral 1.

Caracterización de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de GnRH

Hasta el momento sabemos que hay diferencias entre la región central-lateral y ventral-dorsal, en cuanto al tipo de respuestas a GnRH de los gonadotropos. En adición a estas diferencias, al examinar el patrón oscilatorio pudimos encontrar cambios en la amplitud y frecuencia de esta señal de calcio intracelular (figura 19). En la figura 19 podemos observar ejemplos representativos de la respuesta oscilatoria de gonadotropos ante la estimulación de GnRH desde la región dorsal (figura A) hasta la región ventral (figura D). Cabe mencionar que las respuestas bifásicas fueron más complicadas de categorizar, ya que presentan múltiples variantes, lo cual difiere a lo reportado en cultivo celular.

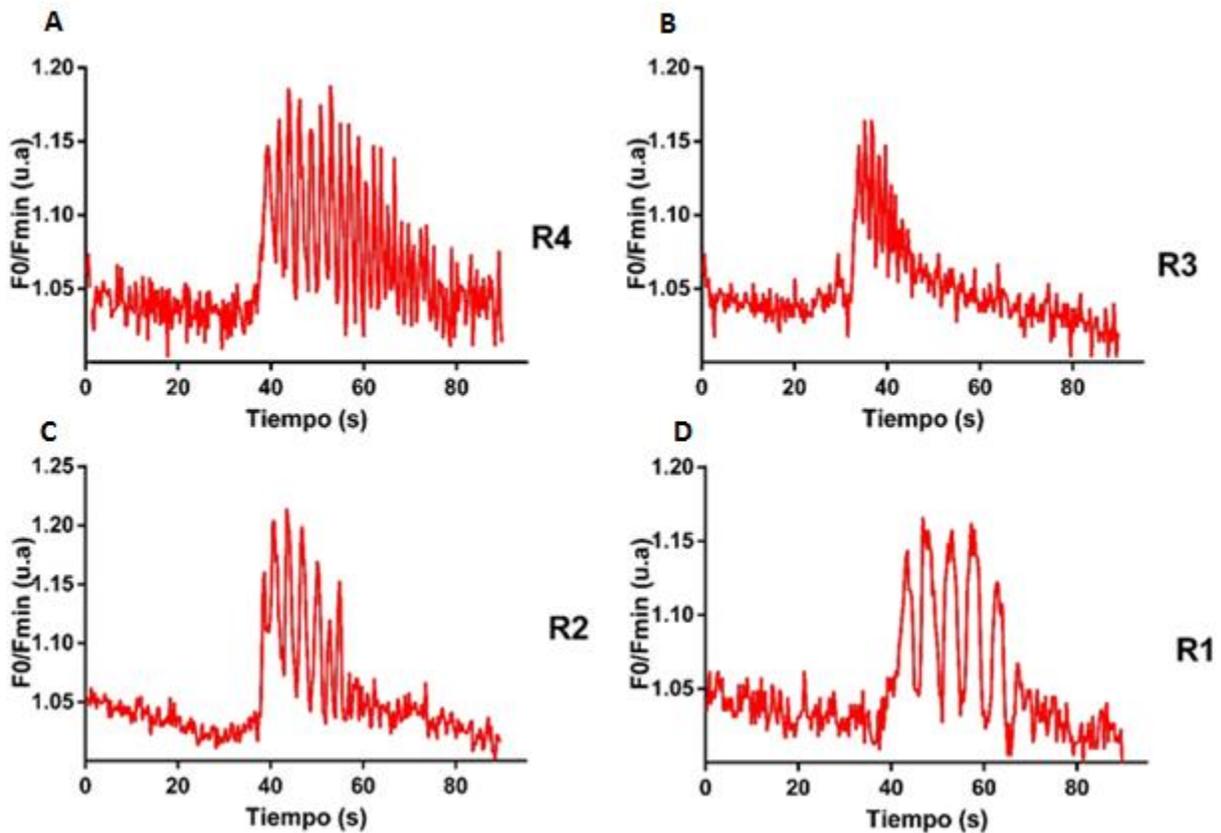


Figura 19. Patrones de actividad oscilatoria presentado por gonadotropos en respuesta a GnRH 10 nM. Trazos representativos de la movilización de calcio intracelular de gonadotropos con un patrón de respuesta oscilatorio promovido por la aplicación de GnRH 10 nM. Se grafica de la región más dorsal (A) a la más ventral (D).

Ya que en las respuestas oscilatorias las mayores diferencias se presentan entre la rebanada más dorsal comparada con la más ventral, seleccionamos estas dos regiones de la glándula para cuantificar estas diferencias (frecuencia y amplitud). Encontramos que en la porción más dorsal de la glándula las respuestas oscilatorias presentan un mayor número de picos (frecuencia), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) con respecto a las respuestas oscilatorias de la porción ventral que presenta menos oscilaciones (figura 20A). Sin embargo, en ésta última zona la respuesta oscilatoria, se caracteriza por presentar una mayor amplitud de sus espigas (figura 20D).

La amplitud y el número de picos de la señal están relacionados con la movilización de calcio intracelular que se provoca en los gonadotropos al ser estimulados con GnRH. Por ello, para tener una medición indirecta de la cantidad de calcio que se moviliza en los gonadotropos de cada zona

de la glándula, se decidió medir el área bajo la curva de las respuestas oscilatorias y bifásicas. Interesantemente, los gonadotropos de la rebanada más ventral a pesar de tener el menor número de picos en su respuesta ($\bar{X} = 3.45$), presentan una mayor área bajo la curva ($\bar{X} = 5.5$ u.a), tanto en la porción lateral como central de la glándula a comparación de la región dorsal en la cual los gonadotropos tienen una respuesta con mayor número de picos ($\bar{X} = 7.5$) pero menor movilización de calcio ($\bar{X} = 2.4$), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) (figura 20B). Cuando se grafica (figura 20D) el área bajo la curva (eje y) y la frecuencias de espigas durante la estimulación (eje x) que presentan los gonadotropos de la región más dorsal (rojo) y más ventral (azul), se observa una clara tendencia en la que en la porción dorsal de la hipófisis, los gonadotropos presentan mayoritariamente respuestas con alta frecuencia y poca área bajo la curva (2 a 4 u.a), mientras que los gonadotropos de la zona ventral de la glándula presentan respuestas oscilatorias con poca (2 a 5 u.a.) o mucha área bajo la curva (5 a 10 u.a.) pero una misma frecuencia (3 a 6); sin embargo, la mayoría de las células se pueden distinguir como dos grupos separados.

Otra característica que podemos notar es que los gonadotropos de la región central-ventral son los que movilizan más calcio ya que tanto para las respuestas bifásicas como oscilatorias presentan una mayor área bajo la curva (figura 20 B y C). Cabe mencionar que las respuestas bifásicas movilizan mayor cantidad de Ca^{2+} ($\bar{X} = 5.25$ u.a) con respecto a las respuestas oscilatorias ($\bar{X} = 3.25$ u.a); esto puede ser debido a la meseta que caracteriza este tipo de respuestas (figura 19 C).

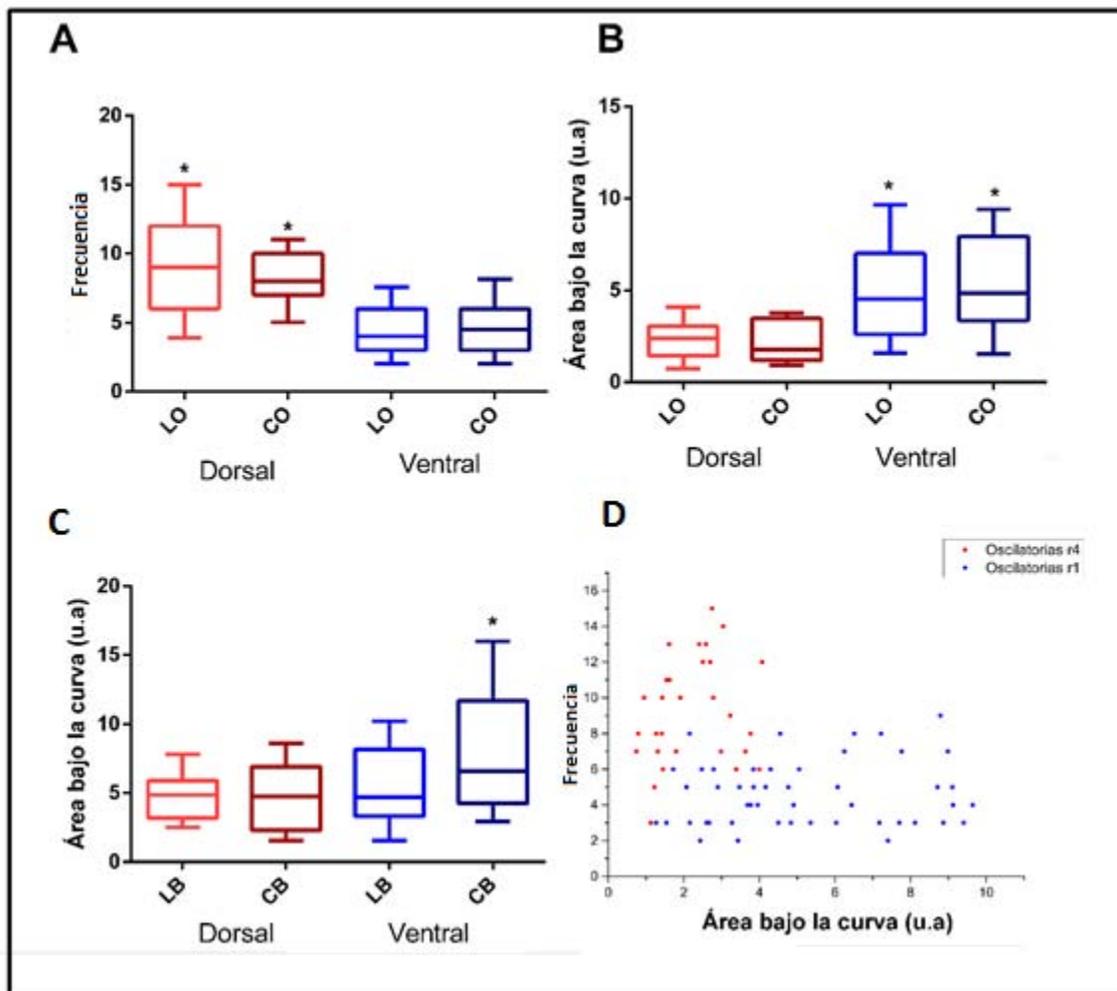


Figura 20. Numero de pico y área bajo la curva. A) Numero de picos de la región dorsal y ventral. B) Comparación de los números de picos vs área bajo la curva. C) y D) Área bajo la curva de las respuestas bifásicas y oscilatorias de la región dorsal y ventral. El número de picos y el área bajo la curva fue analizado con ANOVA de una vía ($P < 0.001$) y pruebas de comparación múltiples de Tuckey. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($P < 0.001$). Lateral oscilatorio (LO), lateral bifásico (LB), central oscilatorio (CO) y lateral oscilatorio (LO)

Tamaño de los gonadotropos

Una posibilidad que explique los cambios en las características de la señal de calcio intracelular es la diferencia en el tamaño de los gonadotropos. Para estudiar el tamaño de éstas células, medimos a los gonadotropos y encontramos que la región más central de la rebanada ventral presenta gonadotropos más grandes ($\bar{X} = 34.2 \mu\text{m}$). La figura 21A muestra la comparación en el tamaño de los gonadotropos tanto en la región central-ventral como en la región central-dorsal; este parámetro presenta diferencias significativas ($P < 0.002$). En la imagen 20 B y C observamos

inmuntinciones para visualizar la vasculatura y LH; en estos dos paneles podemos notar la diferencia en tamaño, así como la distribución y densidad que presentan los gonadotropos en la región central y periférica de la adenohipófisis.

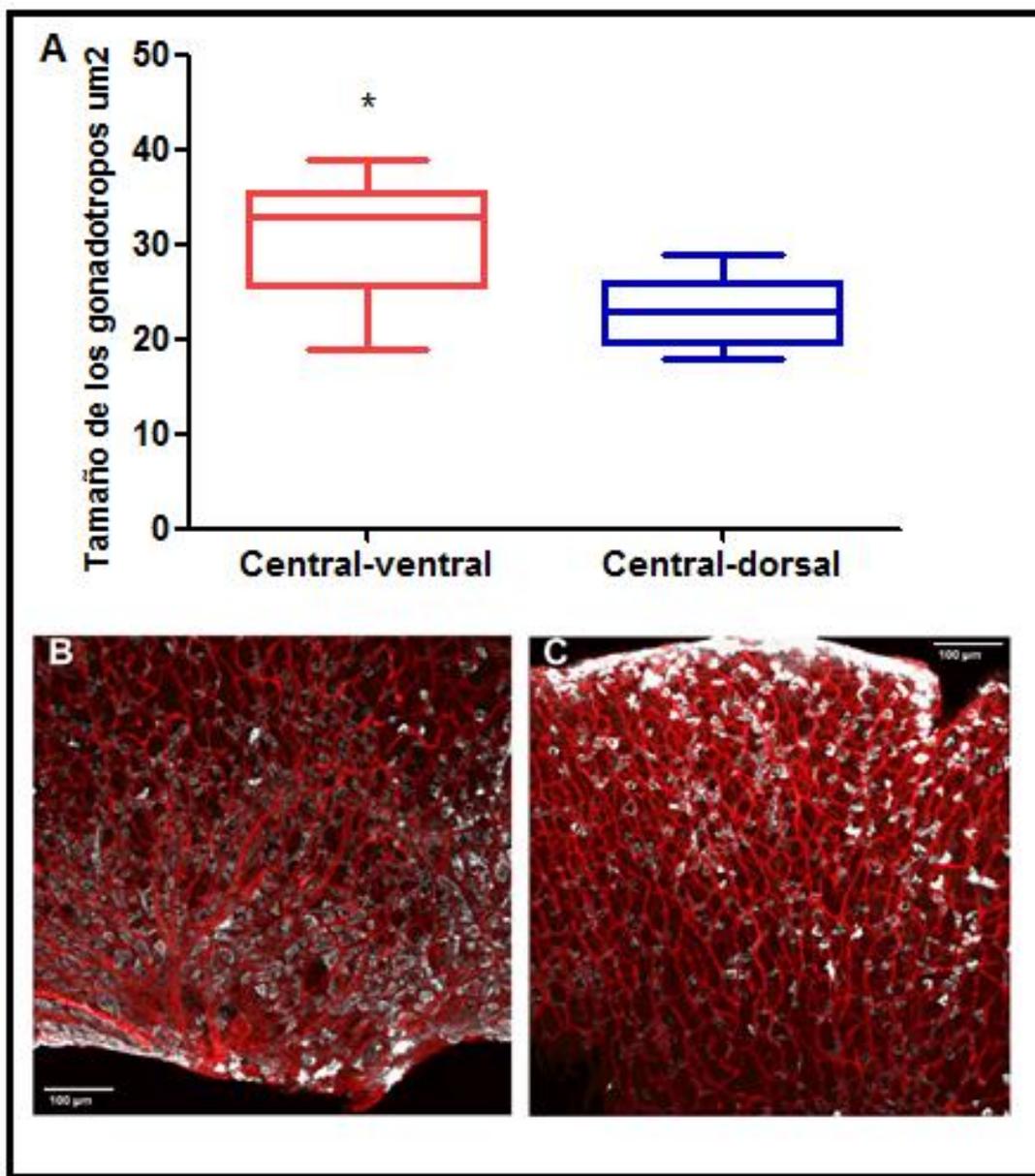


Figura 21. Tamaño de los gonadotropos. A) comparación de tamaño entre los gonadotropos de la región ventral vs dorsal; el asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.002$) después de un análisis de t de Student. Inmuntinción de LH (blanco) y CD31/PCAM (vasculatura, rojo) en B) Región central y C) periférica. La barra de color blanco representa 100 μm .

Rosetas de gonadotropos y vasculatura

Como mencionamos anteriormente ante la aplicación de GnRH los gonadotropos parecen formar grupos de células con el mismo patrón de respuesta (figura 16); a estos grupos los llamaremos roseta. En un análisis más detallado como el que se muestra en el ejemplo de la figura 22, se observa la actividad de dos gonadotropos adyacentes con el mismo patrón de respuesta (figura 22A), mientras que en el panel 22 B se grafica la actividad de dos gonadotropos adyacentes con una actividad distinta. El análisis de correlación arrojó que las rosetas con el mismo patrón de respuesta tienen un coeficiente de correlación alto $R=0.77$ y como era de esperarse las células que están adyacentes y presentan un patrón de respuesta diferente su coeficiente de correlación fue bajo $R= 0.17$, Estos resultados nos sugieren que podría haber ciertos factores para que algunas células adyacentes respondan de la misma manera mientras que otras responden distinto.

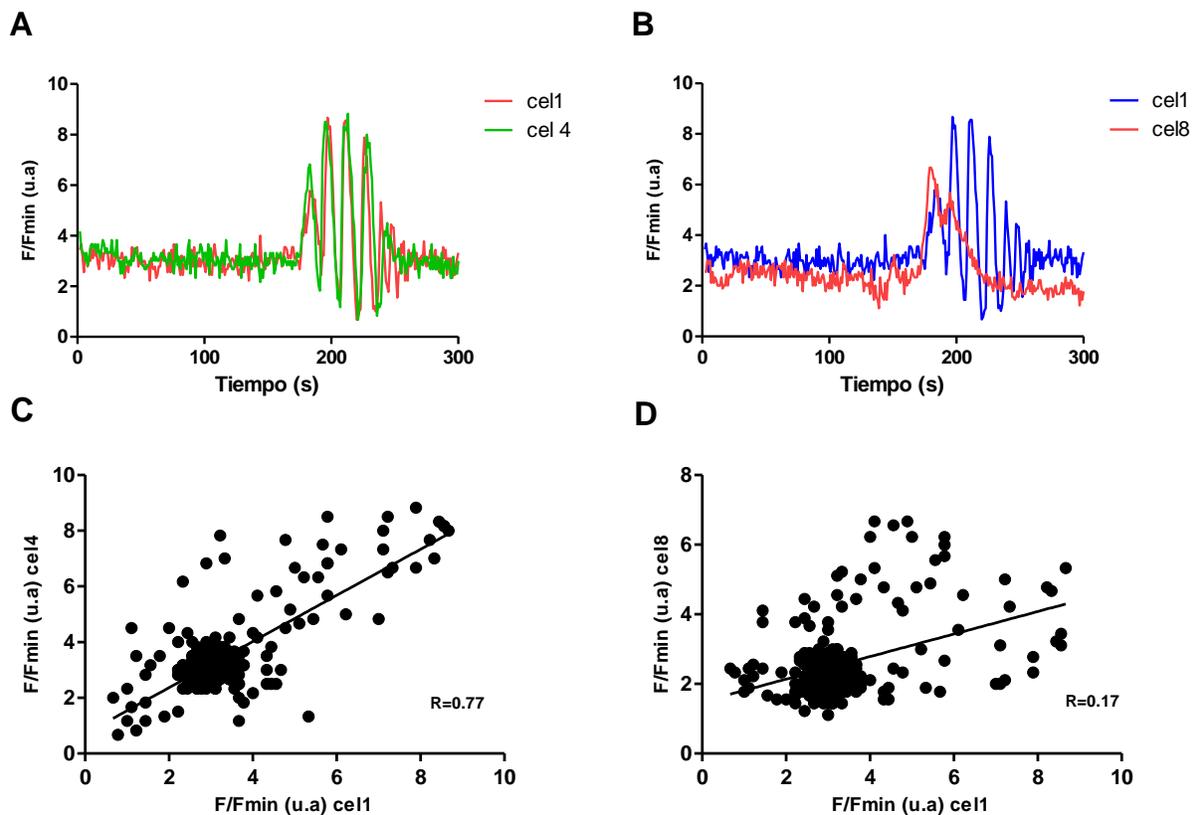


Figura 22. Patrón de respuesta y correlación de la misma en gonadotropos adyacentes. En el panel A y B, se muestran los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos sobre la actividad de gonadotropos adyacentes por la aplicación de una dosis 10 nM. A dichas respuestas se le aplicó un análisis de correlación tanto para el par de células con el mismo patrón (C) como con un patrón distinto (D).

Es posible que la diferencia en el tamaño y la cercanía con otras células influya en el comportamiento y respuesta de los gonadotropos. En adición, estudios recientes han reportado una estrecha relación estructural entre la vasculatura y los gonadotropos, y se conoce que en cierto tipos celulares este tipo de asociación puede coordinar la distribución y respuesta celular (32, 43). Por tal motivo nos preguntamos si ¿Podría esta misma asociación tener un factor funcional y estar generando rosetas de gonadotropos con el mismo patrón de actividad?. Para aportar en el entendimiento de esta pregunta se implementó un método, en el cual después de los registros de calcio intracelular se hicieron fijaciones con EDAC e inmunotinciones contra LH y FSH; una vez tomadas las imágenes se buscaron los campos donde se había registrado actividad de calcio intracelular durante la aplicación de GnRH en el experimento y se identificaron dichas células.

Con este método observamos que los gonadotropos se encuentran organizados en grupos discretos (rosetas) en asociación con la vasculatura como se muestra en la figura 23A, en donde podemos apreciar una inmunotinción de los vasos sanguíneos (morado), de los gonadotropos (rojo) identificados como aquellas células que fueron positivos a LH y/o FSH, células que incorporaron el Fluo-4 AM (verde) el cual fue fijado con EDAC y los dobles positivos, es decir las células que son positivas para el Fluo-4AM y son gonadotropos (amarillo).

Si bien estos grupos de células ya se habían descrito con anterioridad (30), esas observaciones tomaron en cuenta solo parámetros estructurales. En este trabajo, observamos distintas rosetas de gonadotropos con una actividad coordinada. En la figura 23B, en la cual se grafican las respuestas que presentan los gonadotropos de tres rosetas ante la aplicación de GnRH, cuya diferencia es encontrarse todas en el mismo espacio pericapilar (R2) o cercanas pero en espacios pericapilares diferentes (separadas por distintos capilares; R1 y R3), se puede observar que en estos últimos, aunque los grupos de gonadotropos se encuentran cercanos unos de otros el patrón de respuesta de calcio intracelular que exhiben es distinto. Sin embargo, en el caso de los gonadotropos R2 el patrón de respuesta de calcio intracelular que muestran al ser estimulados por GnRH es muy semejante. Estas observaciones, nos dan pistas sobre la posible relación de la vasculatura con el funcionamiento de los gonadotropos y el microambiente que se genera.

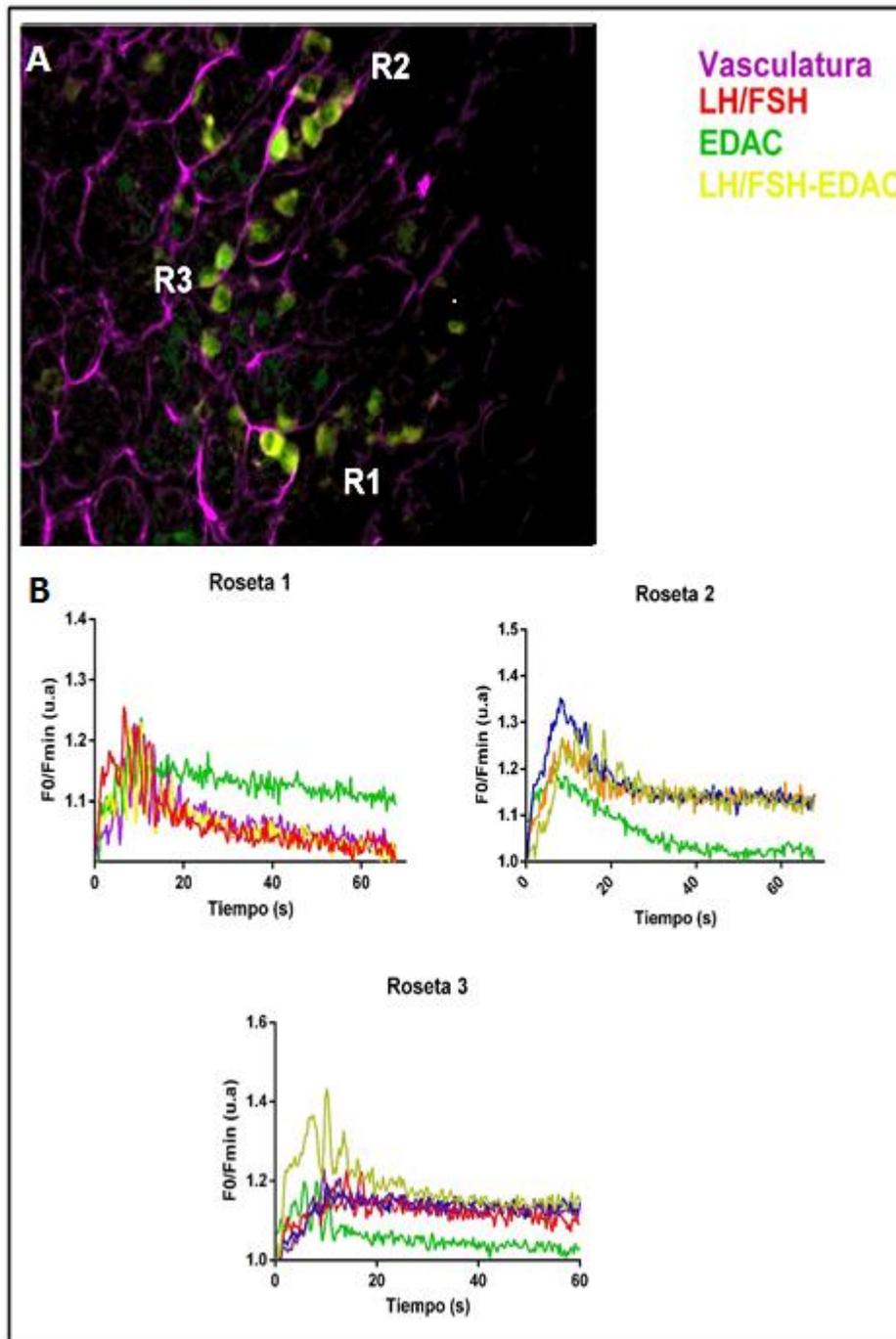


Figura 23. Rosetas de gonadotropos y vasculatura. En el panel A se muestra la Inmunotinción de LH y FSH (rojo), vasculatura (morado) y Fluo-4AM (verde) de una rebanada de hipófisis después de haber sido registrados sus cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos por el estímulo de GnRH. (B) Actividad de $[Ca^{2+}]_i$ durante la aplicación de GnRH de distintas rosetas de gonadotropos.

Discusión

Patrones de respuesta de Ca^{2+} intracelular promovido por GnRH en rebanadas de ratón macho.

A la fecha, los estudios hechos con preparaciones tisulares de hipófisis que han explorado de una manera bidimensional este tejido, han descrito diferencias en los atributos anatómicos y funcionales en distintos grupos celulares, dependiendo de la región (central o lateral) en la que se encuentran (27, 28). Estos trabajos han mostrado además, la importancia de emplear preparaciones biológicas más apegadas al medio in vivo y han generado una mayor información sobre el comportamiento y distribución de distintos grupos celulares endocrinos (44). Así, y como se observa en este trabajo, las preparaciones organotípicas tienen la ventaja de mantener el ambiente tisular y con ello las interacciones entre células, constituyendo un buen modelo para el estudio a nivel de célula única pero con la información generada por centenares de ellas en su posición topológica original (42, 44).

En estas condiciones de trabajo, nuestros experimentos muestran que los gonadotropos en un contexto tisular, presentan todos los tipos de patrones de respuesta de calcio intracelular (oscilatoria, bifásica no oscilatoria, bifásica oscilatoria y transitoria) provocados por una misma concentración de GnRH (10nM). A diferencia de esto, en células en cultivo se ha descrito una progresión del tipo de respuesta según la dosis de GnRH, observándose que a una concentración de 10nM se presentan solo respuestas bifásicas oscilatorias. Esto nos da una idea de la importancia del mantenimiento de contexto tisular no solo por las múltiples interacciones o regulaciones posibles a nivel parácrino o autócrino (45), sino también por la posible interacción con elementos estructurales como la vasculatura que podrían estar influyendo en el funcionamiento y organización de un grupo celular como son los gonadotropos (este tema se tratará con más detalle en la sección de redes celulares).

Regionalización de gonadotropos

La mayoría de las descripciones sobre la regionalización de los gonadotropos en la hipófisis se han realizado en corte fijados. En estos trabajos se han reportado diferentes distribuciones que van desde que se encuentran distribuidos en una zona sexual (región postero-lateral de la glándula) (46), con una distribución dorso-ventral, o periférica en algunas zonas de la glándula (47), hasta una distribución homogénea (30). Estas diferencias pueden deberse al tipo de marcajes que se emplearon. Sin embargo, en años recientes se han empleado animales genéticamente modificados, en los que la expresión de cada tipo hormonal hipofisario se asoció a un fluoróforo, y se ha realizado una descripción de la distribución de varios linajes celulares endocrinos. En estos estudios, se describe que los gonadotropos tienen una distribución en forma de cadenas de células interconectadas que van de la parte más ventral hacia el centro de la glándula (32).

A diferencia de éstos reportes, en este trabajo con el estudio de una regionalización funcional, permitiéndonos tener un panorama más amplio de la distribución y función de los gonadotropos, y encontrando diferencias en su distribución según su patrón de respuesta a GnRH y su ubicación bidimensional (central-lateral) y tridimensional (dorsal-ventral). Si solo comparamos el número de gonadotropos no presenta una diferencia de la región más ventral a la más rostral; sin embargo, como lo hemos mencionado estas regiones presentan diferencias funcionales.

Regionalización funcional

Como mencioné anteriormente, se ha reportado que la transición de un tipo de patrón de respuesta de calcio intracelular a otro está determinada solo por el GnRH, ya que la cantidad de calcio liberado es dependiente de la dosis aplicada de este secretagogo (1). Así, las mayores diferencias encontradas en la regionalización de estas células en la glándula no tienen que ver solamente con su número, sino con el agrupamiento de las células con el mismo patrón de respuesta.

Así, en la región ventral-rostral de la adenohipófisis además de encontrar un mayor número de gonadotropos estos responden mayoritariamente con oscilaciones de baja frecuencia y alta

amplitud, invirtiéndose esta relación conforme se avanza de la región ventral-rostral a dorsal-caudal, donde observamos gonadotropos con respuestas bifásicas y transitorias.

Dado que se conoce que los gonadotropos pueden modular y ser regulados por factores parácrinos y autócrinos, podría pensarse que esta modulación se da diferencialmente en las zonas donde se encuentran los gonadotropos (45, 48). Aunado a esto, está el hecho de que durante el desarrollo del organismo y de la hipófisis, se genera una primera onda de migración de gonadotropos, en la cual estas células se establecen en la superficie media-ventral, formando grupos de células que después migran hacia las regiones laterales hasta formar cadenas de células que se extienden de la superficie ventral a través del centro de la glándula (29). Una segunda onda de establecimiento para los gonadotropos se da en una etapa postnatal; estos gonadotropos solo se encuentran sobre la superficie de la región dorsal formando cadenas y no ingresan hacia el centro de la glándula (29, 35). El posible significado funcional de estas dos etapas de migración de los gonadotropos no se ha establecido, por lo que es posible que las claras diferencias encontradas en este trabajo puedan estar relacionadas con este fenómeno.

Además, podríamos pensar que las diferencias observadas en la movilización de calcio intracelular presentadas por los gonadotropos de las regiones ventral hasta dorsal, están ligadas al tamaño de las células, es decir entre mayor tamaño mayor movilización de calcio. En este trabajo, empleando inmunotinciones para LH/FSH, encontramos que efectivamente los gonadotropos de la región ventral rostral, son más grandes que los de la región caudal. En trabajos previos realizados en hipófisis de ratones machos castrados, se ha demostrado que esta operación, induce el aumento del tamaño de los gonadotropos y en los registros fisiológicos de respuesta a GnRH, se observa que presentan una movilización de calcio menor a la observada en condiciones normales (31). Por tal motivo las diferencias encontradas no son debido al mayor tamaño que presentan los gonadotropos; mas bien, nosotros pensamos que dado que las características de una señal de calcio intracelular son producidas por varios factores como la disponibilidad de: receptores a GnRH, canales de calcio, componentes intracelulares de señalización, cantidad de calcio en los reservorios intracelulares, etc., es posible que algunos de estos elementos sean los que contribuyen a la generación de las diferencias que encontramos en este trabajo en la respuesta de calcio.

Funcionalmente, el hecho de tener una región de la glándula donde se tengan características diferentes (patrones de respuesta, tamaño y mayor movilización de calcio) al resto, podría dar lugar a pensar en una zona especializada en la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, estos hallazgos necesitan de una mayor investigación para establecerlos con certeza.

Rosetas de gonadotropos y redes celulares

Existen evidencias que muestran que la interacción de los gonadotropos con otros grupos celulares puede tener un efecto en su desarrollo y organización (48). Cuando éstas células son purificadas en una etapa inmadura, tienden a convertirse en gonadotropos hipertróficos que se caracterizan por un aumento de tamaño, además de tener diferencias en la secreción (49). Estas diferencias se presentan naturalmente entre los gonadotropos de hembras y machos (50). Las dos vías de comunicación que pueden ser propuestas para esta regulación son interacciones entre células endocrinas e interacciones entre células endocrinas y células no endocrinas (como las células folículo esteladas) (40, 46), que podrían no solo interactuar a través de uniones comunicantes sino de la liberación de factores modulares (ATP, DA, activina, etc.) (45).

En nuestro trabajo, encontramos que para la generación de respuestas coordinadas, no solamente es necesaria la cercanía entre gonadotropos, sin implicar el contacto entre ellos, sino éstos deben encontrarse en el mismo espacio parénquimal delimitado por la vasculatura. Se conoce que distintos grupos celulares endocrinos tienden a formar grupos de células que se comunican y se coordinan para responder ante una demanda fisiológica. En el caso de los somatotropos, se han descrito redes homotípicas funcionales (37). En registros in vivo con animales que expresan GH-GFP se ha demostrado que los somatotropos no están distribuidos aleatoriamente, sino están arreglados dentro de una red tridimensional restringida y las células de esta red ante la estimulación GHRH muestran una coordinación temporal y a larga escala de la respuesta de calcio (6).

Para los gonadotropos se ha mostrado que pueden interactuar con lactotropos, somatotropos y corticotropos. Esta estrecha relación con los lactotropos se observa cuando en el animal adulto

al eliminar los gonadotropos el número, tamaño y agrupaciones de lactotropos se reduce significativamente (45). Es sabido, que el rol de las redes heterotípicas, es la modificación y adaptación celular en distintas condiciones fisiológicas, por factores parácrinos, juxtocrino y autócrinos, generando cierta plasticidad de respuesta en las redes que están asociadas (32).

Algunos tipos celulares hipofisarios también forman redes organizadas topológicamente en estrecha asociación con la vasculatura (36). Además de los somatotropos, los lactotropos también están estrechamente ligados a los capilares hipofisarios; estas células endócrinas, cambian su organización tridimensional con respecto a la vasculatura dependiendo del estímulo al que sean sometidas, por ejemplo la lactancia. Es muy probable que tanto las interacciones y la agrupación de los gonadotropos en las rosetas descritas en este trabajo, y que presentan un mismo patrón de respuesta y características de frecuencia y latencia similares, pueda deberse a los nichos que genera la vasculatura, ya que podría estar restringiendo la regulación de factores parácrinos secretados por los distintos tipos celulares que se encuentren dentro de este espacio restringido, así como el acomodo de otros grupos endocrinos y no endocrinos.

El hecho de que se puedan generar distintos patrones de respuesta con una sola dosis de GnRH y que las células se puedan organizar y sincronizar, podría otorgarle a la glándula un cierto nivel de robustez y plasticidad que le permita responder y satisfacer las necesidades del organismo para generar un pulso de LH y FSH, al mismo tiempo que se sintetiza más hormona para el siguiente pulso.

Conclusiones

Este trabajo muestra por primera vez una regionalización funcional tridimensional de la actividad de calcio intracelular de gonadotropos ante la aplicación de GnRH. Obtuvimos resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura (tipo de patrones, oscilatorio, bifásico y transitorio). Sin embargo, todos los patrones pueden generarse a una sola concentración de GnRH, por lo que podemos suponer una regulación más compleja para la generación de respuesta que solo la dependencia de la concentración de GnRH. Mostramos que la región ventral presenta una gran cantidad de gonadotropos con un patrón oscilatorio con una progresión en el número de células de la región ventral-dorsal; la movilización de calcio intracelular es mayor en la región central de la rebanada más ventral. Por último los gonadotropos forman grupos que tienden a responder con el mismo patrón de respuesta de calcio; estos grupos al parecer se delimitan por nichos vasculares, por lo que los componentes que se encuentren dentro de este nicho podrían estar aportando factores que modulen la respuesta ante la aplicación de GnRH, generando condiciones específicas para la coordinación de los gonadotropos que se encuentran en este espacio.

Es importante mencionar que aunque se obtuvieron resultados interesantes faltan más estudios sobre las diferencias encontradas en este trabajo y explorar de forma más específica la composición de los nichos generados por la vasculatura. De particular interés sería determinar si los componentes presentes puedan modularse entre sí para darle robustez y poder así generar un pulso hormonal ante la demanda de una condición fisiológica.

Bibliografía

1. Tomic M, Cesnajak M, Catt KJ, Stojilkovic SS. Developmental and physiological aspects of Ca²⁺ signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology*. 1994;135(5):1762-71.
2. Marieb EN. The endocrine system. *Essential of Human and Physiology*. 7 ed: Pearson; 2003. p. 588.
3. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;228(1-2):1-21.
4. Hiller-Sturmhofel S, Bartke A. The endocrine system: an overview. *Alcohol health and research world*. 1998;22(3):153-64.
5. Neill JD. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. USA: Academic Press; 2005.
6. Hodson DJ, Molino F, Fontanaud P, Bonnefont X, Mollard P. Investigating and modelling pituitary endocrine network function. *Journal of neuroendocrinology*. 2010;22(12):1217-25.
7. Norman A, Litwack G. *Hormones*. USA: Academic Press; 1997.
8. Stojilkovic SS, Tabak J, Bertram R. Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev*. 2010;31(6):845-915.
9. Melmed S. *The pituitary*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press; 2011. xi, 731 p. p.
10. Holmes RL, Ball JN. *The Pituitary Gland: A comparative account*. USA: Cambridge University Press; 1974.
11. Mogulevsky JA SO. *Hipofisis control de la secreción: López libreros Editores*; 1972.
12. Herman IM, D'Amore PA. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *The Journal of cell biology*. 1985;101(1):43-52.
13. Durán Pastén L. Efectos de la castración sobre los patrones de calcio intracelular en respuesta a a estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en rebanadas de hipófisis de ratón macho. México, D.F: UNAM; 2013.
14. Bliss SP, Navratil AM, Xie JJ, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010;31(3):322-40.
15. Moriarty GC. Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1976;24(7):846-63.
16. Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *Journal of molecular endocrinology*. 2004;33(3):559-84.
17. Stojilkovic SS, Catt KJ. Novel aspects of GnRH-induced intracellular signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *Journal of neuroendocrinology*. 1995;7(10):739-57.
18. Counis R, Laverriere JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, et al. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reproduction, nutrition, development*. 2005;45(3):243-54.
19. Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science*. 2005;88(1-2):5-28.
20. Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM. Evolution of GnRH: Diving deeper. *General and Comparative Endocrinology*. 2011;171(1):1-16.
21. Chen C, Fernald D. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology*. 2008;73:1099-120.
22. Anderson L. Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Reviews of reproduction*. 1996;1(3):193-202.
23. Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010;31(3):322-40.
24. Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Animal reproduction science*. 2005;88(1-2):57-74.

25. Stojilkovic SS, Catt KJ. Calcium oscillations in anterior pituitary cells. *Endocr Rev.* 1992;13(2):256-80.
26. Duran-Pasten ML, Fiordelasio T. GnRH-Induced Ca Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. *Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:127.
27. Rendon L. Caracterización y regionalización de la respuesta de calcio intracelular de lactotrofos a TRH y DA en rebanadas de hipófisis de ratón macho [Licenciatura]. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
28. Del Rio D, Rendon L, Hernandez-Cruz A, Fiordelasio T, editors. Distribution and characterization of thyrotroph [Ca²⁺]_i response to TRH in pituitary slices from adult male mice. *The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo 2011 4-7 Junio; Boston, USA.*
29. Budry L, Lafont C, El Yandouzi T, Chauvet N, Conejero G, Drouin J, et al. Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(30):12515-20.
30. Sanchez-Cardenas C, Hernandez-Cruz A. GnRH-Induced [Ca²⁺]_i-signalling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices in vitro. *Neuroendocrinology.* 2010;91(3):239-55.
31. Duran-Pasten ML, Fiordelasio-Coll T, Hernandez-Cruz A. Castration-Induced Modifications of GnRH-Elicited [Ca²⁺]_i Signaling Patterns in Male Mouse Pituitary Gonadotrophs In Situ: Studies in the Acute Pituitary Slice Preparation. *Biol Reprod, Paper in press.* 2012.
32. Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2012;23(6):261-9.
33. Jaidar O, Carrillo-Reid L, Hernandez A, Drucker-Colin R, Bargas J, Hernandez-Cruz A. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2010;30(34):11326-36.
34. Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, et al. Neural networks of the mouse neocortex. *Cell.* 2014;156(5):1096-111.
35. Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in neuroendocrinology.* 2012;33(3):252-66.
36. Schaeffer M, Hodson DJ, Lafont C, Mollard P. Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *Journal of molecular endocrinology.* 2011;47(2):R59-66.
37. Lafont C, Desarmenien MG, Cassou M, Molino F, Lecoq J, Hodson D, et al. Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(9):4465-70.
38. Hodson DJ, Schaeffer M, Romano N, Fontanaud P, Lafont C, Birkenstock J, et al. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nature communications.* 2012;3:605.
39. Seuntjens E, Vankelecom H, Quaegebeur A, Vande Vijver V, Denef C. Targeted ablation of gonadotrophs in transgenic mice affects embryonic development of lactotrophs. *Molecular and cellular endocrinology.* 1999;150(1-2):129-39.
40. Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P. Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(15):8891-6.
41. Grandison L, Nolan GP, Pfaff DW. Activation of the transcription factor NF- κ B in GH3 pituitary cells. *Molecular and cellular endocrinology.* 1994;106(1-2):9-15.
42. Guerineau NC, Bonnefont X, Stoeckel L, Mollard P. Synchronized spontaneous Ca²⁺ transients in acute anterior pituitary slices. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(17):10389-95.
43. Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Clay C, Tobet S, et al. Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology.* 2012;153(10):4729-39.
44. Fauquier T, Lacampagne A, Travo P, Bauer K, Mollard P. Hidden face of the anterior pituitary. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2002;13(7):304-9.
45. Denef C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of neuroendocrinology.* 2008;20(1):1-70.

46. Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Horiuchi O, Yashiro T, Kikuchi M, et al. Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: X. Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;278(1):462-73.
47. Poole MC, Kornegay WD, 3rd. Cellular distribution within the rat adenohypophysis: a morphometric study. *Anat Rec*. 1982;204(1):45-53.
48. Deneff C, Andries M. Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology*. 1983;112(3):813-22.
49. Deneff C, Hautekeete E, Rubin L. A specific population of gonadotrophs purified from immature female rat pituitary. *Science*. 1976;194(4267):848-51.
50. Deneff C, Hautekeete E, De Wolf A, Vanderschueren B. Pituitary basophils from immature male and female rats: distribution of gonadotrophs and thyrotrophs as studied by unit gravity sedimentation. *Endocrinology*. 1978;103(3):724-35.