

**“ESTUDIO DE LOS PATRONES DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO
INTRACELULAR PROMOVIDOS POR EL GnRH EN REBANADAS DE
HIPÓFISIS DE RATÓN”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:**

BIOL. CLAUDIA SÁNCHEZ CÁRDENAS.

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

MEXICO DF, CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO 2010



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.

*Con todo cariño para mis Papás
quienes siempre me han apoyado e impulsado a seguir adelante persiguiendo mis sueños
sin su motivación esto no hubiera sido posible.*

Muchas Gracias!!

*A mi hermanita
por regalarme su apoyo incondicional,
y tanto cariño,
por ser mi gran amiga.*

Para Fredy,

mi compañero en la vida, por su infinita comprensión y paciencia,

por estar conmigo en los buenos y en los malos momentos,

por tantas vivencias inolvidables juntos.

Es maravilloso compartir esta historia contigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arturo Hernández-Cruz por haberme abierto las puertas de su laboratorio y por haberme formado en este proceso.

A los Doctores Horacio Merchant, León Islas, Agustín Guerrero, Gonzalo Martínez y Hernández-Cruz, por haberse tomado el tiempo para revisar esta tesis, por sus críticas constructivas y sus pertinentes observaciones.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso por toda la ayuda y discusión durante mi proyecto en el Doctorado.

A los Doctores Marcia Hiriart y Flavio Mena por haberme asesorado durante las reuniones de Comité Tutoral.

Al Dr. Alberto Darszon por haberme apoyado en el proceso de finalización de este proceso.

Al QFB Nicolás Jiménez por su apoyo y eficiente asistencia técnica.

A la Biól. Diana Millán por su siempre disposición de ayuda técnica.

Al Departamento de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por su oportuna ayuda durante las videoconferencias en los exámenes tutorales.

Al Posgrado de Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por darnos la oportunidad de prepararnos académicamente con programas de alto nivel académico.

A CONACyT y DGEP por la beca que me fue proporcionada durante todo el Doctorado.

AGRADECIMIENTOS.

Mil gracias a todos mis compañeros quienes hicieron y hacen tan agradable los cotidianos días de trabajo en el laboratorio durante todos estos años: Omar, Pedro, Luisa, Adán, Luis, Mildred, Diana, Vladimir, gracias por todos esos momentos compartidos. Al Chino quien me ha tenido toda la paciencia del mundo y con quien comparto y sigo compartiendo momentos llenos de buen humor y alegría. Y a toda la gente que pasó por el laboratorio en algún momento y con quienes tuve la oportunidad de compartir momentos de convivencia y aprendizaje.

A mis compañeros de Cuernavaca, a todos y a cada uno de ellos muchas gracias por su compañía y su calidez.

A mis amigos Enrique Balderas y Ruth y a Tatiana Luna por su amistad y compañía.

A la Dra. Claudia Treviño, por sus consejos y por su disposición siempre a escucharme y ayudarme.

Y a toda la gente que durante todos estos años ha pasado por mi vida y que de alguna u otra forma han hecho de mí la persona que soy ahora, mil gracias por enriquecer mi vida.

ÍNDICE

I. RESUMEN

I. SUMMARY

II. INTRODUCCIÓN

1. Hipófisis y sistema portal hipofisiario

- 1.1 Historia de la hipófisis
- 1.2 Localización y división anatómica de la hipófisis
- 1.3 Sistema portal adenohipofisiario
- 1.4 Tipos celulares presentes en la adenohipófisis

2. El eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo

- 2.1 La GnRH
- 2.2 El receptor a GnRH
- 2.3 Los gonadotropos y las hormonas LH y FSH
- 2.4 Las gonadotropinas en el testículo
- 2.5 Otros mecanismos de regulación del eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo

3. La GnRH y el calcio en los gonadotropos

- 3.1 Importancia del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la secreción del gonadotropo
- 3.2 La GnRH activa un mecanismo de señalización intracelular que promueve un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de los gonadotropos
- 3.3 La concentración de la GnRH determina el patrón de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos

4. Interacción de los gonadotropos con otras células en la adenohipófisis

- 4.1 Factores parácrinos presentes en la adenohipófisis que modifican la secreción de las gonadotropinas
- 4.2 Otros tipos de comunicación intercelulares presentes

en la adenohipófisis

III. HIPÓTESIS

IV. OBJETIVO GENERAL

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de rebanadas de hipófisis
2. Registros y análisis de las señales de calcio intracelular en las rebanadas de hipófisis

VI. RESULTADOS

1. Implementación de la técnica de obtención de rebanadas de hipófisis de ratón
2. Protocolo de registro análisis de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ en la rebanada de hipófisis
3. Distribución espacial de las células que responden a la GnRH en la rebanada
4. Reclutamiento de células según la $[GnRH]$
5. Curva dosis-respuesta de las células que responden a la GnRH en la rebanada
6. Patrones en la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos por las diferentes dosis de la GnRH.
7. Las células que responden a la GnRH poseen un patrón de Ca^{2+} específico que se mantiene constante por periodos largos de tiempo
8. La organización anatómica y funcional de las células que responden a la GnRH en la rebanada de hipófisis de ratón
9. Posibles mecanismos involucrados en la respuesta acoplada de la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la GnRH
10. Evaluación de las comunicaciones parácrinas como probable mecanismo responsable de las respuestas fuertemente acopladas

VII. DISCUSIÓN

VIII. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

IX. CONCLUSIONES

X. BIBLIOGRAFÍA

XI. ANEXO 1

1. GnRH-Induced $[Ca^{2+}]_i$ -signalling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices in vitro.

II. INTRODUCCIÓN

1. Hipófisis y sistema portal hipofisiario.

1.1 Historia de la hipófisis

El término “pituitaria” tiene su origen etimológico en la palabra griega “pituita” y en la palabra latina “ptuo” que significan “flema” o “moco”. Se le asignó este nombre debido a las observaciones de Galeno (130-200 d.C.) quien creyó que las impurezas del cerebro drenaban a la nasofaringe a través de la pituitaria también llamada hipófisis debido a su posición inferior con respecto al cerebro (Murray y Melmed, 2006). No fue sino hasta el siglo XVII que Schneider y Lower propusieron que la hipófisis producía sustancias que llegaban al sistema circulatorio y en 1905 Bayliss y Starling denominaron hormonas a estas sustancias producidas por la hipófisis. En la actualidad sabemos que la hipófisis es una glándula endócrina considerada por algunos autores como la “glándula maestra”, ya que regula la función y la secreción de otros órganos endócrinos.

1.2 Localización y división anatómica de la hipófisis.

Anatómicamente la hipófisis se localiza por debajo del cerebro, en la zona ventral del cráneo, donde ocupa una estructura que forma parte del hueso esfenoides, llamada silla turca. La figura 1 ilustra las principales divisiones anatómicas de la hipófisis: la neurohipófisis y la adenohipófisis. La neurohipófisis está constituida por el *infundíbulo* que está dividido a su vez en *eminencia media* y en el *tallo infundibular*, estructuras que mantiene a la hipófisis unida al piso del diencéfalo. Por su parte la *pars nervosa* ó *proceso infundibular* se origina del engrosamiento ventral del *tallo infundibular* y constituye la mayor parte de la neurohipófisis, ésta estructura está constituida principalmente por terminales nerviosas de neuronas que se localizan en el hipotálamo (Moguilevsky y Schiaffini, 1972). Como se muestra en la figura 1, la adenohipófisis tiene tres componentes principales, la *pars intermedia* que está adyacente a la *pars nervosa*, y que, en el

caso de los mamíferos se encuentra muy reducida, la *pars tuberalis* que es una pequeña porción del lóbulo la cual se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencéfalo y, finalmente, la *pars distalis* que está constituida por diferentes tipos de células secretoras

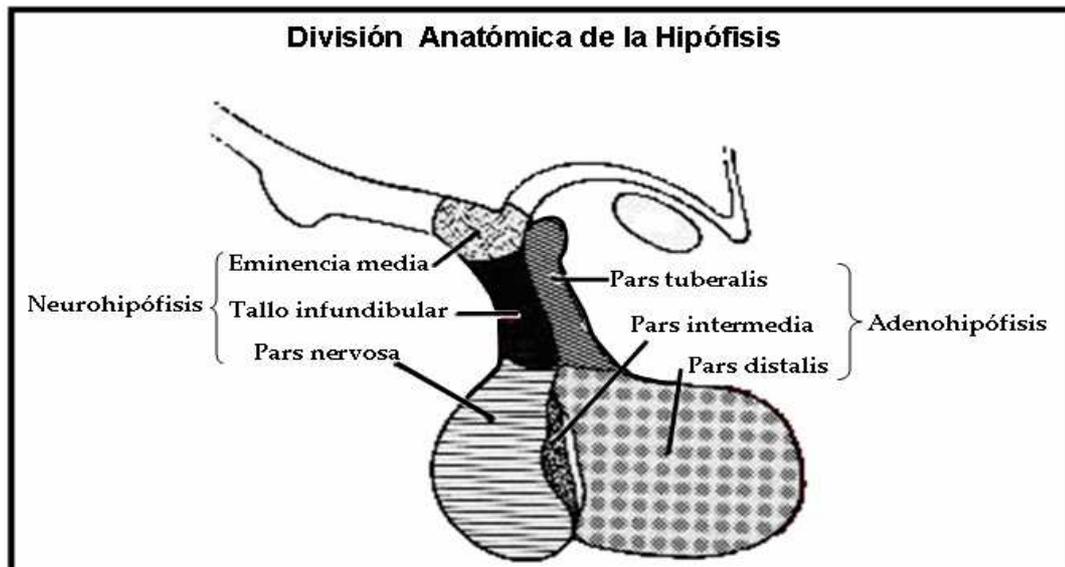


Figura 1. Esquema de las divisiones anatómicas de la neurohipófisis y la adenohipófisis según Moguelevsky y Schiaffini en 1972.

1.3 Sistema portal adenohipofisiario o sistema porta hipotálamo-adenohipófisis.

La secreción hormonal de las células de la adenohipófisis está regulada principalmente por el hipotálamo, el cual ejerce sus acciones sobre la hipófisis a través del sistema portal adenohipofisiario también llamado sistema portal hipotálamo-adenohipófisis. Este complejo sistema de circulación sanguínea, ilustrado en la figura 2, fue descrito por Popa y Fielding en 1930. El sistema portal hipofisiario comienza a nivel de las arterias hipofisiarias, las cuales se anastomosan y se hacen capilares a nivel de la eminencia media constituyendo el plexo capilar primario del sistema portal adenohipofisiario. En este plexo capilar primario los axones provenientes de las neuronas hipotalámicas hacen contacto y vierten sus neurohormonas. Los capilares vuelven a unirse en los vasos portales largos que corren a través de la *pars tuberalis* y se dirigen a la *pars distalis* donde

nuevamente forman capilares que pasan muy cerca o contactan directamente con las células secretoras de la *pars distalis*, constituyendo el plexo capilar secundario del sistema portal hipofisiario. Posteriormente, la sangre de los capilares de la adenohipófisis se drena en venas cortas que terminan en los senos venosos que rodean la *pars distalis* (Moguilevsky y Schiaffini, 1972). Este eficiente sistema de circulación permite la liberación pulsátil o episódica de factores sintetizados en el hipotálamo, los cuales regulan de forma positiva (factores ú hormonas liberadoras hipotalámicas) ó negativa (factores ú hormonas inhibidoras hipotalámicas) la secreción de una o más hormonas específicas, según el tipo celular de la adenohipófisis que posea receptores para dicho factor hipotalámico (revisado por Norman y Litwack, 1997).

Sistema portal hipotálamo- adenohipófisis

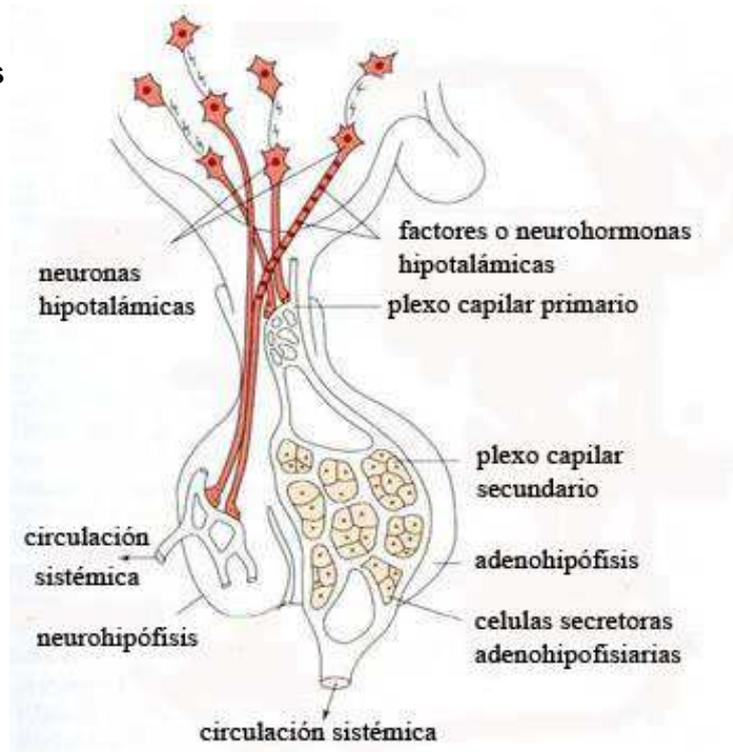


Figura 2. Esquema del sistema portal hipotálamo- adenohipófisis

Finalmente, la sangre que proviene de la circulación del sistema portal hipofisiario y que contiene las hormonas secretadas por las células adenohipofisarias es distribuida por la circulación sistémica a través de la cual dichas hormonas alcanzan su órgano blanco.

1.4 Tipos celulares presentes en la adenohipófisis.

La primera identificación de los distintos tipos de células en la adenohipófisis se basó en la tinción diferencial de hematoxilina-eosina, de tal forma que la primera clasificación de las células adenohipofisarias fueron: basófilas, acidófilas y cromóforas (Moguilevsky y Schiaffini, 1972). Posteriormente, el uso de la microscopía electrónica y la microscopía de fluorescencia, así como la aplicación de técnicas como la citoquímica y la inmunohistoquímica permitieron diferenciar los diferentes tipos de células secretoras presentes en la adenohipófisis según su ultraestructura celular y su contenido hormonal. La tabla 1 hace un resumen general de los diferentes tipos de células secretoras presentes en la adenohipófisis que incluye el porcentaje poblacional de cada tipo celular, la hormona u hormonas que secreta cada tipo de célula, el factor hipotalámico que regula su secreción, así como las principales funciones fisiológicas reguladas por cada hormona. Cabe mencionar que la tabla 1 es un resumen genérico en el cual se incluye información de animales que se encuentran en distinta edad, sexo y la condición fisiológica de cada animal. La aclaración anterior es de suma importancia ya que el porcentaje de cada tipo de célula presente en la adenohipófisis varía ampliamente según el estadio fisiológico del animal. En años recientes y con el avance de las técnicas de biología molecular, el uso de ratones transgénicos ha permitido la expresión de proteínas fluorescentes acopladas a las hormonas secretadas por algunos tipos celulares de la adenohipófisis. Tal es el caso del ratón GH-GFP en el cual la hormona del crecimiento GH está acoplada a la proteína GFP (Magoulas y cols., 2000) y del ratón modificado que expresa YFP acoplada a la hormona prolactina (PRL) (Castrique y cols., 2010). Recientemente se publicó un estudio en el que se modificó el receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al cual

se le incorporó la proteína fluorescente YFP (Wen y cols., 2008). Estos avances han permitido no solo la identificación de algunos tipos celulares presentes en la adenohipófisis sino además el estudio funcional enfocado a un tipo de célula específica. En general, se asume que la regulación de la secreción hormonal de cada tipo celular presente en la adenohipófisis está regulada por su factor hipotalámico específico, como se ilustra en la tabla 1. Sin embargo, tal aseveración no es del todo cierta ya que algunos estudios han demostrado que algunas células son capaces de responder fisiológicamente a más de un factor hipotalámico (Villalobos y cols., 1997). Sin embargo en términos generales, los factores ú hormonas hipotalámicas son considerados como el principal mecanismo regulatorio de la secreción hormonal de las células de la adenohipófisis.

Tabla comparativa de los diferentes tipos de células secretoras presentes en la adenohipófisis

Tipo de célula	Porcentaje	Hormona sintetizada	Factor Hipotalámico	Principal función fisiológica
Somatotropos	50%	GH Hormona del crecimiento	GHRH	Crecimiento somático
Lactotropos	10-25%	PRL Prolactina	TRH	Lactancia
Corticotropos	10-20	ACTH Hormona Adenocorticotrópica		Síntesis y secreción de glucocorticoides
Tirotropos	10-20%	TSH Hormona tirotrópica	TRH	Síntesis y secreción de hormona tiroideas
Gonadotropos	10-15%	LH Hormona luteinizante FSH Hormona foliculoestimulante	GnRH	Regulación de la función reproductiva
Melanotropos	Pars intermedia	MSH Hormona estimulante de melanocitos	MHRH	Pigmentación de la piel en anfibios y reptiles

Tabla 1. Cuadro comparativo general de los diferentes tipos de células presentes en la adenohipófisis. GHRH. (Factor liberador de la hormona del crecimiento), TRH (factor liberador de la hormona tirotrópica), GnRH (Factor liberador de las gonadotropinas, MHRH Factor liberador de la hormona melanotrópica) (Modificado de Yeung y cols., 2006).

2. El Eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo.

En la primera parte de la introducción describí de forma general la vía anatómica que permite la llegada de los factores hipotalámicos a las células adenohipofisiarias. El eje hipotálamo-adenohipófisis-gónadas regula, como se muestra en la tabla 1, la función reproductiva en el organismo, evento fisiológico indispensable para la perpetuación de las especies. Ya que la gran mayoría de nuestro estudio se llevó a cabo en animales machos a continuación haré una breve descripción de cada uno de los elementos que constituyen el eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo.

2.1 La GnRH

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es el regulador central del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónadas. Este polipéptido se sintetiza en una población discreta del hipotálamo basal (Lee y cols., 2008), en el núcleo arcuato en el ratón (Navarro y cols., 2009) y en el área preóptica media. La GnRH es un decapeptido ($\text{pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$) del cual han sido identificadas 24 variantes, las cuales se encuentran desde los animales protocordados hasta los vertebrados (Kraus y cols., 2001, Lee y cols., 2008). En los mamíferos existen principalmente dos isoformas de la GnRH, la isoforma GnRH I, aislada del mamífero y la isoforma GnRH II aislada del cerebro de pollo, estas dos isoformas tienen un 70% de similitud entre sí (King y Millar, 1995, Neill y cols., 2004), sin embargo, son codificadas por genes distintos. Por otro lado, a pesar de que la GnRH II es ubicua en el organismo y su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada, la GnRH I es expresada preferentemente en el cerebro (Jennes y cols., 1997, Lee y cols., 2008). La GnRH es liberada de forma pulsátil (Wheaton y Cann, 1976) cada 30-120 minutos aproximadamente (Millar y cols., 2004) y el mantenimiento de la frecuencia y la

amplitud de los pulsos de estimulación de la GnRH, es indispensable para mantener la regulación de la función reproductiva. La modificación del ritmo pulsátil de secreción de la GnRH altera el funcionamiento reproductivo y trae como consecuencia la infertilidad (Counis y cols., 2005). La expresión de la GnRH en las neuronas hipotalámicas incrementa de forma gradual durante el desarrollo posnatal y pubertad siendo crucial para el inicio de la pubertad (Wray y Hoffman, 1986, revisado por Lee y cols., 2008).

2.2 El receptor a la GnRH.

Existen varios tipos de receptores para la GnRH (GnRH-R), sin embargo los GnRH-R tipos I y II son los que se expresan principalmente en mamíferos. El GnRH-R I fue clonado y secuenciado por primera vez en mamífero (Tsutsumi y cols., 1992), mientras que el GnRH-R tipo II se clonó por primera vez en el pez bagre (Neill y cols., 2004). Los dos tipos de GnRH-R difieren en su patrón de distribución, mientras que el RNAm del GnRH-R II tiene una expresión ubicua en el organismo (Neill y cols., 2002, Millar y cols., 2004), el GnRH-R I se localiza mayoritariamente en los gonadotropos en la adenohipófisis (Naor y cols., 1988, Rispoli y Nett, 2005), por lo cual el GnRH-R I ha sido relacionado principalmente en el control de la función reproductiva. El GnRH-R I está constituido por una secuencia de 327 aminoácidos que cruza siete veces la membrana plasmática y pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés). El GnRH-R-I posee residuos de cisteínas conservadas que participan en la estabilización de la configuración tridimensional del receptor así como en el reconocimiento del ligando (Probst y cols., 1992, Anderson, 1996). Por otro lado se ha reportado que los dominios amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminal son importantes en la unión de la GnRH al GnRH-R así como para la activación de este último (Sealfon y Millar, 1995, Sealfon y cols., 1997).

En general, los receptores acoplados a proteínas G poseen desensibilización homóloga, este mecanismo le permite al receptor autoregular su tiempo de activación al disminuir su respuesta cuando es estimulado en repetidas

ocasiones por su ligando. En los GCPR este tipo de desensibilización es mediada por el extremo COOH el cual es el blanco de unión para las cinasas que fosforilan al receptor en residuos específicos de serina y treonina. Esta fosforilación desencadena una secuencia de eventos que culminan en la internalización del receptor (Counis y cols., 2005, Millar y cols., 2004). Sin embargo, no todos los GnRH-R poseen este mecanismo de desensibilización. De manera interesante, mientras el GnRH-R I del pez, la rana y el pollo poseen una secuencia dentro del COOH terminal en su estructura que participa en el proceso de desensibilización homóloga (Heding y cols., 2000), el GnRH-R I del mamífero incluyendo el del ratón carecen de ésta secuencia en su COOH terminal (Tsutsumi y cols., 1992), lo que implica que el GnRH-R del roedor carece de desensibilización. Estas observaciones fueron confirmadas experimentalmente en 1994 por Davidson y colaboradores quienes reportaron en la línea celular de gonadotropos de ratón α T3 en que la estimulación continua del GnRH-R I por GnRH 100 nM no produce una desensibilización rápida (10 minutos) (Davidson y cols., 1994).

2.3 Los gonadotropos y las hormonas LH y FSH.

Los gonadotropos son las células blanco de la GnRH en la adenohipófisis. El 80% de este tipo celular posee el receptor al secretagogo (Childs, 1997). Estudios estructurales utilizando principalmente técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica han mostrado que existen diferentes subpoblaciones de gonadotropos que se diferencian por su tamaño y forma, así como por el tamaño y número de sus gránulos de secreción. (Fellmann y cols., 1982, Inoue y Kurosumi, 1984, Inoue y Hagino, 1984, Childs, 1997). Se ha reportado que estas subpoblaciones de gonadotropos varían según el estado fisiológico del animal. Estas variaciones son evidentes por ejemplo, en el caso de la rata hembra durante el ciclo estral (Childs, 1997, Childs y cols., 1992, Dada y cols., 1983).

Los gonadotropos sintetizan y secretan las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) las cuales son denominadas en conjunto gonadotropinas y son de naturaleza glucoproteíca. Estas hormonas están

formadas por dos cadenas polipeptídicas denominadas α y β las cuales están unidas por enlaces no covalentes. Mientras que la subunidad α es común para las dos gonadotropinas (Rathnam y Saxena, 1971), la subunidad β es específica para cada hormona y es la responsable de la actividad biológica específica de cada gonadotropina (Pierce y cols., 1976, Kacsoh, 2000). Cabe mencionar que la mayoría de los gonadotropos contienen ambas gonadotropinas (Fellmann y cols., 1982, Inoue y Kurosumi, 1984, Dada y cols., 1983, Childs, 1997). La GnRH promueve la secreción de las hormonas LH y la FSH en los gonadotropos (Schally, 1970, Ishizaka y cols., 1992, Tilbrook y Clarke, 2001). Sin embargo, experimentos en roedor han mostrado que mientras un pulso de la GnRH promueve paralelamente la secreción de la hormona LH en los gonadotropos, la secreción de la hormona FSH no está estrictamente ligada temporalmente a la liberación de la GnRH y algunos trabajos han reportado que la mayor parte de la secreción hormonal de la hormona FSH podría llevarse a cabo de forma constitutiva (Farnworth, 1995, McNeilly y cols., 2003)

2.4 Las gonadotropinas en el testículo.

En el adulto la fertilidad del macho requiere de la espermatogénesis, el proceso por el cual las espermatogonias inmaduras se dividen y se diferencian en espermátidas maduras, las cuales sufren cambios que les permite llegar a ser espermatozoides motiles y capaces para la fertilización. Este proceso se lleva a cabo en el testículo. Los testículos están constituidos por tejido intersticial el cual contiene vasos sanguíneos y capilares que permiten el movimiento de hormonas y nutrientes dentro y fuera del testículo. Dentro del intersticio se encuentran las células de Leydig, las cuales poseen receptores para la hormona LH, y su principal función es la síntesis de andrógenos, principalmente la testosterona. La hormona LH regula la producción de la testosterona y la expresión de las enzimas relacionadas en la biosíntesis de esta hormona esteroidea, además de participar en la diferenciación y en el mantenimiento funcional de las células de Leydig (Moyle y Ramachandran, 1973, Sriraman y cols., 2005). La importancia fisiológica de la hormona LH ha sido corroborada en estudios de ratones macho transgénicos

carentes de la subunidad β de la hormona LH. Estos ratones transgénicos presentan deficiencias en la diferenciación de las células de Leydig y una reducción en los niveles de testosterona intratesticulares, además, estos animales presentan defectos en el crecimiento de los testículos que conllevan finalmente a la infertilidad (Xiaoping y cols., 2004, Rajendra, 2007). Por otro lado, la hormona FSH tiene su principal efecto en las células de Sertoli, las cuales se localizan dentro de los túbulos seminíferos del testículo y se extienden desde la lamina basal a través del lumen tubular formando una estructura que provee de anclaje y nutrición a las células germinales (Murphy, 1965, Sairam y Krishnamurthy, 2001). Las células de Sertoli poseen receptores tanto para la FSH como para la testosterona, hormonas que, en conjunto, promueven los mecanismos de señalización intracelular necesarios para regular y promover la espermatogénesis (Walker y Cheng, 2005). El ratón transgénico carente del receptor a FSH presenta pubertad atrasada y defectos en la producción de células espermatozoides, mientras que los ratones adultos muestran una reducción en los niveles de la testosterona y como consecuencia, una reducción en la producción y en la calidad del espermatozoides que trae como consecuencia una disminución del índice de fertilidad. (Sairam y Krishnamurthy, 2001). La testosterona no solo es indispensable para la espermatogénesis, sino que además es responsable de la libido, así como desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (Sairam y Krishnamurthy, 2001, Sriraman y cols., 2005).

2.5 Otros mecanismos de regulación del eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo.

Además de ser el producto final regulador de la función reproductiva, la testosterona ejerce una regulación negativa en la secreción de las hormonas gonadotropinas en la adenohipófisis (Darmassa, 1976, Nicol y cols., 2004) así como en la síntesis y/o secreción de la GnRH, ya que es capaz de alterar la frecuencia y la amplitud de sus pulsos de liberación (Tilbrook y Clarke, 2001) Además de la testosterona los testículos producen otros péptidos involucrados en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, tal es el caso de la activina e inhibina que son consideradas miembros de la superfamilia de los factores de

crecimiento transformante TGF- β . La activina está constituida por dos subunidades β , mientras que la inhibina es un heterodímero constituido por una subunidad α ligada a una o a dos subunidades β (Winters y Moore, 2004). A ambos péptidos se les ha conferido un papel regulatorio en la secreción de la hormona FSH en los gonadotropos (Bilezikjian y cols., 2004). La activina estimula la liberación de la FSH e incrementa la síntesis del GnRH-R y se ha reportado que puede incrementar el número de gonadotropos que responden a la GnRH (Winters y Moore, 2004). Además, la activina puede ejercer un efecto directo sobre el promotor de la subunidad β de la hormona FSH, alterando su sensibilidad a la GnRH (Bilezikjian y cols., 2004). Por su lado, la inhibina suprime la síntesis de FSH (Childs, 1997) antagonizando el efecto de las activinas uniéndose a su receptor con baja afinidad. Aunque las activinas e inhibinas fueron purificadas primero en las gónadas (Bilezikjian y cols., 2004), experimentos de doble inmunohistoquímica demostraron que las subunidades de activina e inhibina también están presentes en los gránulos que contienen las subunidades β de las hormonas LH ó FSH dentro de los gonadotropos. Aunado a esto, se ha reportado que además de los gonadotropos otros tipos de células adenohipofisarias pueden secretar activina, lo que sugiere que este péptido podría tener un efecto regulatorio local en la adenohipófisis (Kaiser y cols., 1993, Rispoli y Nett, 2005, Bilezikjian y cols., 2004). En cambio, la secreción de la inhibina por las células de la adenohipófisis no ha sido demostrada (Childs, 1997), lo cual hace suponer que el principal modo de acción de las inhibinas en los gonadotropos es la retroalimentación negativa proveniente de las gónadas.

3. La GnRH y el calcio en los gonadotropos.

3.1 Importancia del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en la secreción del gonadotropo.

El ión calcio (Ca^{2+}) es responsable del control de una serie de procesos celulares entre los que se encuentra la secreción hormonal. En condiciones basales, la concentración del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el citoplasma de una

célula es de aproximadamente 100 nM, pero en condiciones estimuladas los niveles en el citoplasma de la célula pueden alcanzar concentraciones del orden micromolar (Berridge y cols., 2000). En 1968 Douglas acuñó el concepto de “acople estímulo-secreción” para las células endócrinas y demostró que las elevaciones transitorias u oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ son indispensables para que se lleve a cabo la secreción hormonal (Scherubl y Hescheler, 1995). Estudios encaminados a entender cuáles son los mecanismos moleculares que son dependientes de la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ durante la exocitosis han demostrado que en las células endócrinas, como en otros tipos celulares, el Ca^{2+} regula la participación de una serie de proteínas que participan en el anclaje, preparación y fusión de las vesículas secretoras durante la exocitosis (Elferink y Scheller, 1993, Martin, 2003). Una de las técnicas más empleadas para estudiar la correlación temporal del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción hormonal es a través del uso de mediciones simultáneas de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ usando espectrofluorimetría y de la detección de los cambios en la capacitancia de la membrana plasmática de la célula. La detección de cambios de capacitancia permite la detección y cuantificación de la incorporación de nueva membrana que corresponde a los gránulos de secreción durante la exocitosis. Utilizando esta metodología se ha demostrado que la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ promueve un aumento en la capacitancia de la membrana de las células adenohipofisarias en cultivo primario (Zorec, 1996). Experimentos similares en gonadotropos en cultivo de rata hembra ovariectomizada (ver figura 3) mostraron que la cantidad de hormona secretada por los gonadotropos es dependiente del patrón de fluctuaciones de $[Ca^{2+}]_i$ promovido por la GnRH (Thomas y Waring, 1997). Otros experimentos en los cuales se hicieron registros simultáneos del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ y de la cuantificación de la secreción hormonal por perfusión en células de adenohipófisis de rata en cultivo primario, mostraron que la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ promueve la secreción las hormonas GH, PRL y LH, en somatotropos, lactotropos y gonadotropos respectivamente (Van Goor y cols., 2001). Estos trabajos confirman el requerimiento de las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en la secreción hormonal de las células adenohipofisarias.

Mediciones simultáneas de capacitancia y secreción hormonal en gonadotropos en cultivo

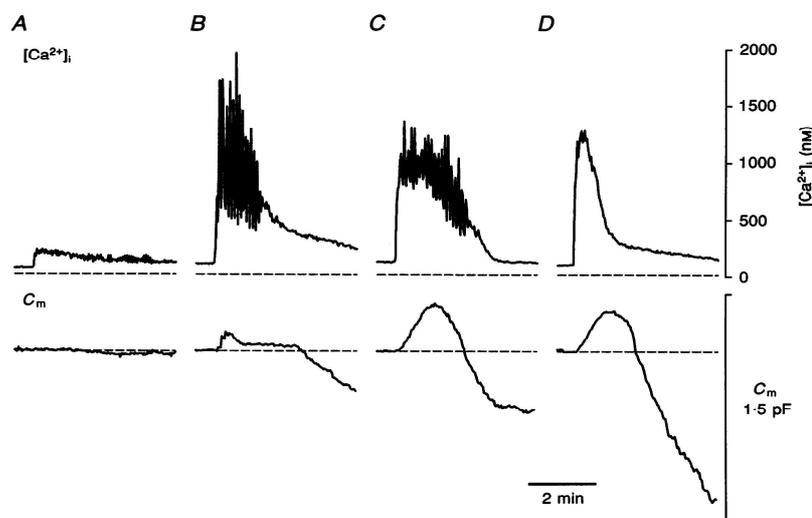


Figura 3. La aplicación de 1nM de GnRH promueve cambios en la capacitancia de la membrana simultáneos al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en gonadotropos en cultivo primario (Thomas y Wearing 1997).

3.2 La GnRH activa un mecanismo de señalización intracelular que promueve un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de los gonadotropos.

Las células adenohipofisarias incluyendo los gonadotropos son células excitables que poseen diferentes tipos de canales iónicos en su membrana plasmática (Van Goor y cols., 2001b). En condiciones basales el potencial de membrana de las células adenohipofisarias es inestable y fluctúa entre -40 y -60 mV (Bonfont y Mollard, 2003). Las oscilaciones espontáneas del voltaje en la membrana plasmática de las células de la adenohipófisis pueden promover una despolarización del potencial de la membrana plasmática y generar potenciales de

acción en condiciones no estimuladas. Estos potenciales de acción espontáneos promueven la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (Cav) (Stojilkovic y cols., 1988) lo que trae como consecuencia la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que, aunada a los mecanismos de homeostasis propios de las células (los cuales son descritos más adelante) producen oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el 50% de las células adenohipofisarias. Estas oscilaciones han sido denominadas oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ya que suceden en ausencia del estímulo de su secretagogo (Kwiecien y Hammond, 1998, Stojilkovick y Tómic, 1996). Se ha demostrado que algunos tipos celulares de la adenohipófisis dependen de este mecanismo espontáneo para secretar de manera basal su hormona. Sin embargo, observaciones previas sugieren que este mecanismo no participa de manera importante en la secreción hormonal en los gonadotropos como se ha demostrado para otros tipos celulares (Van Goor, 2001).

La vía de señalización que activa la GnRH en los gonadotropos se ilustra en la figura 4: La GnRH se une a su GnRH-R en la membrana plasmática de la célula activando a la enzima PLC (fosfolipasa C) (Millar, 2005) a través de la activación de la proteína $G\alpha$ ($G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$) (Pawson y McNeilly, 2005). La PLC entonces hidroliza a un fosfolípido de la membrana plasmática, el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂), a partir del cual se forman dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5,- trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DG). Mientras que el DG activa a la PKC (cinasa de proteínas C) cuya principal función es la fosforilación proteica que puede promover la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática del gonadotropo, el IP₃ se une a su receptor-canal en el retículo endoplásmico, promoviendo la salida de Ca^{2+} hacia el citoplasma de la célula (Anderson, 1996). Una vez liberados los iones Ca^{2+} que salen de la poza interna, aunado al que pueda entrar a través del canal de Ca^{2+} membranal, actúan sinérgicamente con el IP₃ liberando aún más Ca^{2+} hacia el citoplasma, una vez que se alcanza una mayor concentración de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por el contrario ahora el Ca^{2+} ejerce un efecto inhibitorio que frena la salida de este ión al citoplasma (Kwiecien y Hammond, 1998). Una vez terminada la estimulación de la GnRH, los mecanismos de homeóstasis de Ca^{2+} tales como la bomba ATPasa de Ca^{2+} , y el intercambiador

este tipo celular de la adenohipófisis. Estos estudios en gonadotropos en cultivo primario ó disociados mostraron que la concentración del secretagogo determina el patrón dinámico de la respuesta de Ca^{2+} . Los experimentos mostraron que la aplicación de dosis bajas de la GnRH (0.1-1nM) en gonadotropos de ratas ovariectomizadas promueve una serie de oscilaciones de Ca^{2+} , lo cual fue confirmado por trabajos posteriores. A este tipo de respuesta se le denominó respuesta oscilatoria (Iida y cols., 1991, Guérineau y cols., 1992, Stojilkovic y cols., 1993) la cual también fue observada en gonadotropos de rata macho (Tobin y Canny, 1996). Por otro lado, la aplicación de dosis altas de la GnRH (10-100nM) promueve una respuesta bifásica-oscilatoria de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que consiste en una primera parte transitoria y una segunda parte oscilatoria sostenida (Guérineau y cols., 1992). Experimentos adicionales reportaron que la aplicación de dosis altas de la GnRH genera además de la respuesta bifásica- oscilatoria un segundo tipo de respuesta, la cual está constituida por una primera fase transitoria y una segunda fase no oscilatoria que se mantiene en una meseta (bifásica no oscilatoria) (Iida y cols., 1991, Stojilkovic y cols., 1993). Este tipo de respuesta se presenta en aproximadamente el 60% de los gonadotropos de ratas ovariectomizadas (Stojilkovic y Catt, 1992) y en el 76% de los gonadotropos de rata macho (Tobin y Canny, 1996). Los patrones diferenciales según la dosis de la GnRH [GnRH] se ilustran en la figura 5. La manifestación de los diferentes patrones según la dosis del secretagogo ha sido explicada por la presencia de un modelo oscilador de las membranas plasmática y del retículo endoplásmico que actúan de manera coordinada en respuesta a la GnRH (ver Stojilkovick y Tómic, 1996).

Patrones de Ca^{2+} promovidos por dosis crecientes de la GnRH en gonadotropos en cultivo primario

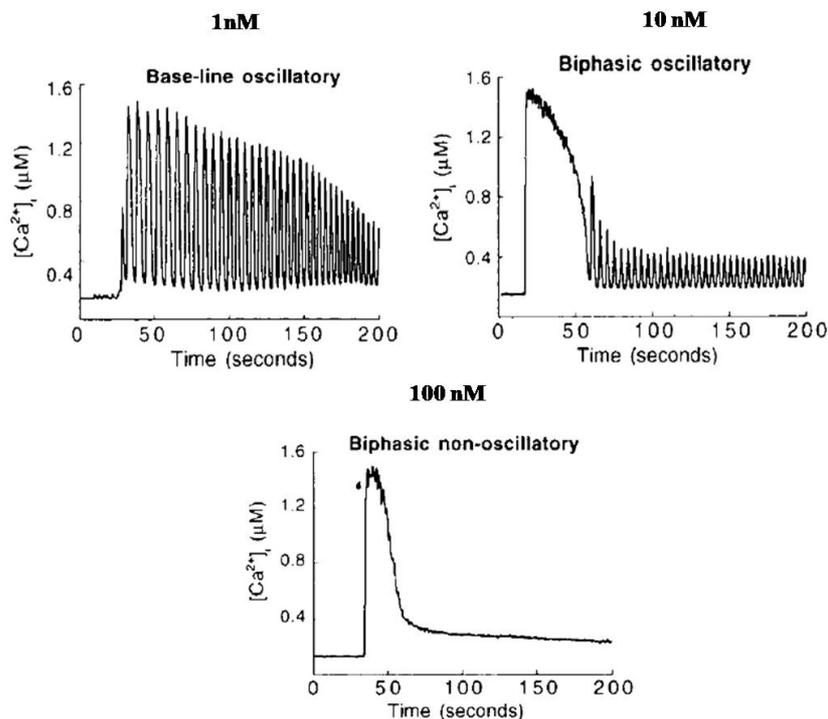


Figura 5. Tipos de patrones oscilatorios y bifásicos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que presentan los gonadotropos en cultivo primario en respuesta a la aplicación de diferentes dosis de la GnRH (Tomic y cols., 1996).

4. Interacción de los gonadotropos con otras células en la adenohipófisis.

4.1. Factores parácrinos presentes en la adenohipófisis que modifican la secreción de las gonadotropinas.

Se ha demostrado la presencia de varios factores parácrinos presentes en la adenohipófisis los cuales son capaces de modificar la secreción de las

hormonas gonadotropinas por los gonadotropos. Como se mencionó con anterioridad, la activina, péptido involucrado en la regulación del eje hipotálamo-adenohipófisis-testículo se sintetiza y se secreta además de en los gonadotropos en otros tipos celulares dentro de la adenohipófisis, lo cual lo convierte en un factor parácrino capaz de regular la secreción en los gonadotropos (Schwartz, 2000). Además de la activina se han descrito la presencia de otros factores parácrinos secretados en la adenohipófisis los cuales se sabe participan en la regulación de la secreción de las gonadotropinas. El ATP, por ejemplo, se co-secreta junto con algunas de las hormonas en distintos tipos celulares de la adenohipófisis, e incrementa la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular promoviendo la secreción de la hormona LH (Tomic y cols., 1996) en los gonadotropos. Otro factor parácrino descrito en la adenohipófisis es el neuropéptido Y (NPY), el cual puede modular los niveles de las gonadotropinas aumentando la secreción de la LH en respuesta a la GnRH; de igual manera, se ha reportado que la oxitocina que es sintetizada por los lactotrofos dentro de la adenohipófisis puede actuar sinérgicamente con el NPY para promover una mayor secreción de la hormona LH promovida por la GnRH (Evans y cols., 2001). Se han descrito además otros factores parácrinos secretados en la adenohipófisis que pueden regular la secreción de los gonadotropos, tal es el caso del péptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PACAP) (Winters y Moore, 2007), así como la galanina, prolactina β y endorfinas entre otros (Denef, 2008).

4.2 Otros tipos de comunicación intercelulares presentes en adenohipófisis.

Como se mencionó anteriormente, todos los estudios de la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en los gonadotropos hasta el momento se habían llevado a cabo en gonadotropos en cultivo primario ó en gonadotropos disociados, preparaciones que, al utilizar enzimas digestivas, destruyen la estructura tisular y por ende las diversas formas de comunicación intercelular propias de la glándula. Además de los factores parácrinos, la hipófisis posee conexiones intercelulares, como lo demuestran estudios anatómicos, los cuales utilizando microscopía

electrónica mostraron que las células folículoestrelladas (FS) (un tipo de células no secretoras presentes en la adenohipófisis) poseen prolongaciones citoplasmáticas las cuales se encuentran comunicadas a larga distancia a través de uniones comunicantes (Soji y Herbert, 1989, Mabuchi y cols., 2004, Shirasawa y cols., 2004), lo anterior fue confirmado recientemente en un estudio anatómico en el cual se mostró la distribución tridimensional de las células FS en la rata transgénica S100-GFP (Horiguchi y cols., 2008, Devnath e Inoue, 2008). De igual forma, registros electrofisiológicos de las células FS mostraron que estas células son capaces de generar y transmitir ondas de Ca^{2+} , así como de permitir la difusión de moléculas entre una célula y otra a lo largo de la glándula (Fauquier y cols., 2002). Además, algunos trabajos anatómicos han mostrado que las células FS pueden encontrarse en contacto con los gonadotropos. Por otro lado también se ha sugerido la presencia de uniones comunicantes entre gonadotropos (Fletcher y cols., 1975, Morand y cols., 1996, Yamamoto y cols., 1993), lo que sugiere que los gonadotropos podrían estar funcionalmente acoplados en la glándula.

Ya que todos los estudios de la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en los gonadotropos se hicieron en células aisladas y dadas las múltiples posibilidades de comunicación intercelular presentes en la adenohipófisis, es posible que la información desprendida de tales experimentos no refleje necesariamente lo que sucede cuando los gonadotropos se encuentran en su entorno nativo. La preparación de la rebanada, en la cual se mantienen muchas de las propiedades intrínsecas funcionales de la adenohipófisis (Guerineau y cols., 1998, Bonnefont y cols., 2000, Fauquier y cols., 2002) es un excelente modelo para abordar por primera vez el estudio de la respuesta de Ca^{2+} de las células adenohipofisiarias promovida por la GnRH, en un entorno más parecido al nativo fisiológico lo cual no se había explorado anteriormente.

I. RESUMEN

En este trabajo usamos la técnica de imagenología para monitorear las respuestas de Ca^{2+} intracelular inducidas por la GnRH en las células de la adenohipófisis en rebanadas de hipófisis del ratón macho. Aproximadamente el 20% de las células que responden a la GnRH *in situ* despliegan oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que incrementan su frecuencia conforme aumenta la dosis del secretagogo. Estas células cambian de un patrón oscilatorio a un patrón bifásico no oscilatorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este orden de progresión de las respuestas, previamente reportada en gonadotropos en cultivo primario, es diferente en el 55% de las células en la rebanada. Además, cerca del 30% de las células en nuestra preparación solo presentan un patrón transitorio a cualquiera de las dosis de la GnRH aplicadas, probablemente debido a una inmadurez de las células ó a que la respuesta corresponde a otro tipo celular. Cuando se aplica de forma repetitiva la misma dosis de la GnRH cada célula responde de forma prácticamente idéntica tanto en latencia, patrón de oscilación y duración; este fenómeno ha sido previamente denominado 'Ca²⁺ fingerprint'. Además, las células *in situ* forman arreglos de pequeños grupos de células dentro de los cuales, se observa con frecuencia, pares de células que responden a la aplicación de la GnRH con un patrón de Ca²⁺ con valores de correlación mayores a 0.75. Sin embargo, las respuestas sincrónicas no son afectadas por el uso de bloqueadores específicos de las uniones comunicantes, mientras que, la aplicación de alto potasio disminuye el acople de la respuesta de manera significativa, lo que sugiere la posible participación de un factor parácrino en la respuesta acoplada. Sin embargo, el uso de suramina, un bloqueador de los receptores purinérgicos P2X expresado en los gonadotropos no disminuyó significativamente la respuesta acoplada de Ca²⁺ promovida por la GnRH. Lo anterior sugiere que el ATP no es el responsable de las respuestas acopladas, por lo que sería necesario llevar a cabo experimentos adicionales en el futuro encaminados a conocer la identidad del factor parácrino involucrado. Por otro lado la hipótesis de una posible pseudo-sincronización también es discutida en

este trabajo. En resumen, las células *in situ* despliegan respuestas con características similares a lo reportado en los gonadotropos en cultivo primario, sin embargo, las respuestas *in situ* poseen también características particulares no reportadas hasta ahora, como la existencia de diferentes patrones de respuesta, así como nuevos aspectos en la organización funcional, lo cual amerita futuros estudios no solo en animales macho sino también en diferentes condiciones fisiológicas. La técnica y los hallazgos encontrados en este trabajo podrían ser potencialmente usados en el futuro para abordar el estudio de la respuesta de la GnRH en los gonadotropos de una manera más integral y fisiológica en ratones transgénicos en los cuales se modifique ya sea el receptor a la GnRH o las hormonas gonadotrópicas para ser identificados por marcadores fluorescentes, lo que permitiría el estudio de la respuesta en los gonadotropos plenamente identificados.

I. SUMMARY

In this study we used $[Ca^{2+}]_i$ imaging to monitor GnRH-induced intracellular Ca^{2+} signalling from dozens of gonadotrophs in mouse male pituitary slices. Responses of individual cells vary in magnitude, latency, duration and frequency of oscillation. Approximately 20% of gonadotrophs *in situ* display Ca^{2+} oscillations of increasing frequency at higher [GnRH] and biphasic (peak-plateau) responses at saturating [GnRH]. Nevertheless, this orderly progression, previously reported in cultured cells, is less well organized in 55% of cells. Furthermore, approximately 30% cells display non-oscillatory GnRH responses, reminiscent of immature gonadotrophs. When the same dose of GnRH is applied repeatedly, individual cell responses are almost identical both in latency, oscillatory pattern and duration resembling the 'Ca²⁺ fingerprint' phenomenon. In addition, gonadotrophs *in situ* are arranged in small clusters with similar GnRH-induced intracellular Ca^{2+} -signalling patterns. Neighbouring gonadotrophs within clusters often display synchronized GnRH-induced responses with high correlation indices (>0.75). Nevertheless, synchronized responses between pairs of gonadotrophs are unaffected by incubation with blockers of gap-junction channels or P2X receptor channels, suggesting that they are not mediated by gap junctions or ATP. Alternative explanations are discussed, including pseudo-synchronization. In summary, while gonadotrophs *in situ* display GnRH-induced responses similar to those observed in cultured cells, different patterns and novel aspects of functional organization were found which deserve further investigation. This study on GnRH-induced Ca^{2+} signalling in the acute mice pituitary gland might be of potential relevance for characterizing GnRH actions in gonadotrophs in transgenic and knockout animals.

III. HIPÓTESIS

La respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en la rebanada de hipófisis de ratón macho tendrá algunas características diferentes en los patrones de respuesta con respecto a lo reportado en los gonadotropos en cultivo primario o disociados.

Al estar preservadas las interacciones celulares en la rebanada es posible encontrar evidencias de un posible arreglo anatómico en las células que respondan a la GnRH, lo cual podría reflejarse en una organización funcional de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ promovida por el secretagogo.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de las rebanadas de adenohipófisis de ratón macho.

1. Objetivos Particulares

1) Implementación de la técnica de obtención de rebanadas de hipófisis de ratón macho así como del registro y análisis de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ tanto espontáneas como estimuladas por la aplicación de la GnRH en las células de la adenohipófisis en la rebanada.

2) Registrar a bajo aumento (5x) la respuesta poblacional de los gonadotropos promovida por la aplicación de cuatro dosis de la GnRH: 0.1, 1, 10, y 100 nM aplicadas en el mismo campo de registro para determinar la localización espacial de los gonadotropos en la rebanada, así como para determinar el número de gonadotropos estimulados a las distintas dosis del secretagogo.

3) Registrar con mayor aumento (20x) los patrones de respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos por la aplicación de hasta cinco dosis crecientes de la GnRH: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 nM en la misma rebanada de adenohipófisis de ratón macho para obtener una curva dosis-respuesta del número de células que responde a

cada dosis del secretagogo. Además, los patrones de respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ generados, serán analizados y finalmente comparados con los patrones de respuesta reportados en trabajos previos en los gonadotropos en cultivo primario.

4) Analizar la repuesta poblacional de los gonadotropos en la rebanada de adenohipófisis con el propósito de estudiar las características temporales y espaciales de la respuesta de Ca^{2+} generada por las distintas dosis de la GnRH con el propósito de identificar un posible arreglo anatómico-funcional en la respuesta.

5) Evaluar los posibles mecanismos responsables de la organización funcional de la respuesta de Ca^{2+} en respuesta a la GnRH en los gonadotropos en la rebanada de hipófisis de ratón macho.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de rebanadas de hipófisis.

Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo cumplieron los lineamientos establecidos por la Guía del Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio: USPHS. Así como de la Guía Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999). Para este trabajo se utilizaron Ratones Balb-c macho adultos de 8 semanas de edad y para los experimentos adicionales ratones Balb-c hembras adultas de 8 semanas de edad, ciclantes y ovariectomizadas. Los ratones se mantuvieron con alimentación y bebida ad libitum. Después de decapitar a los ratones con anestesia, el cráneo fue removido por manipulación quirúrgica y la hipófisis fue cuidadosamente extraída y embebida en agarosa 3.0% (Invitrogen Catlab, CA, USA) disuelta en una solución fisiológica que contiene: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃ y 12 mM de glucosa. La solución fisiológica se mantuvo burbujeada con 5% de CO₂ y 95% de O₂ durante todo el experimento para mantener el pH fisiológico 7.4. La agarosa con la hipófisis embebida es endurecida en solución fisiológica helada, y el bloque de agar fue pegado en la base del Vibratome 3000 (St. Louis, MO, USA). La cámara de vibrátomo se llenó con solución fisiológica la cual es mantenida a 3 °C con la unidad de enfriamiento (Vibratome VB900R). Posteriormente, se procedió a la obtención de rebanadas coronales de 150 µm de grosor, las cuales, inmediatamente al ser obtenidas se colocaron en una cámara de incubación con solución fisiológica a temperatura ambiente. Las rebanadas permanecieron viables hasta por 6 horas después de su obtención.

2. Registros y análisis de las señales de calcio intracelular en las rebanadas de hipófisis

Las rebanadas de hipófisis son pegadas en cubreobjetos previamente tratados con 0.1% de poly-L-lysina (Sigma, St. Louis, MO, USA), y una de las rebanadas es incubada con 500 µl de solución fisiológica que contiene 20 µM de Fluo-4 AM (TEF Labs, Austin, TX, USA) y 0.5% de ácido plurónico. El cargado del

colorante se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez cargada con el colorante, la rebanada se monta en una cámara de registro de Plexiglas que es colocada en la platina del microscopio donde es continuamente perfundida con la solución fisiológica burbujeada a temperatura ambiente. La rebanada es registrada en un microscopio vertical (Nikon Eclipse 80i, Melville, NY, USA) y se utilizaron objetivos de inmersión en agua de Nikon (20X 0.5 A.N, 10X 0.3 A.N). En algunos casos se usó un lente C reductor (Lente TV C-0.45X, Nikon), el cual se colocó en frente de la cámara digital para agrandar el campo de registro al reducir la magnificación. El Fluo-4 es excitado a 488 nm con un monocromador de luz (Polychrome V, Illumination System, TILL Photonics, Munich, Alemania), y la luz de emisión fue colectada con un set de filtros de banda Nikon aB-2E /C (ver figura 6). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con una cámara digital enfriada (Imago QE, TILL Photonics, Munich, Alemania) con protocolos escritos en el software de TILL visiON 4.0.

El protocolo de adquisición consistió en 3 imágenes por segundo donde cada imagen tuvo una exposición de 10 ms y se tomaron 600 imágenes por experimento. El campo de registro se escogió de forma aleatoria en uno de los hemilóbulos de la adenohipófisis correspondiente a un diámetro de 1.0 mm (Objetivo 10X con el lente reductor 0.45x = magnificación 0.45. y un diámetro de 0.2 mm (Objetivo 20X). Los registros se llevaron a cabo tomando 30 s de actividad basal, mientras la rebanada se perfundió con la solución fisiológica burbujeada.

Dispositivo de registro

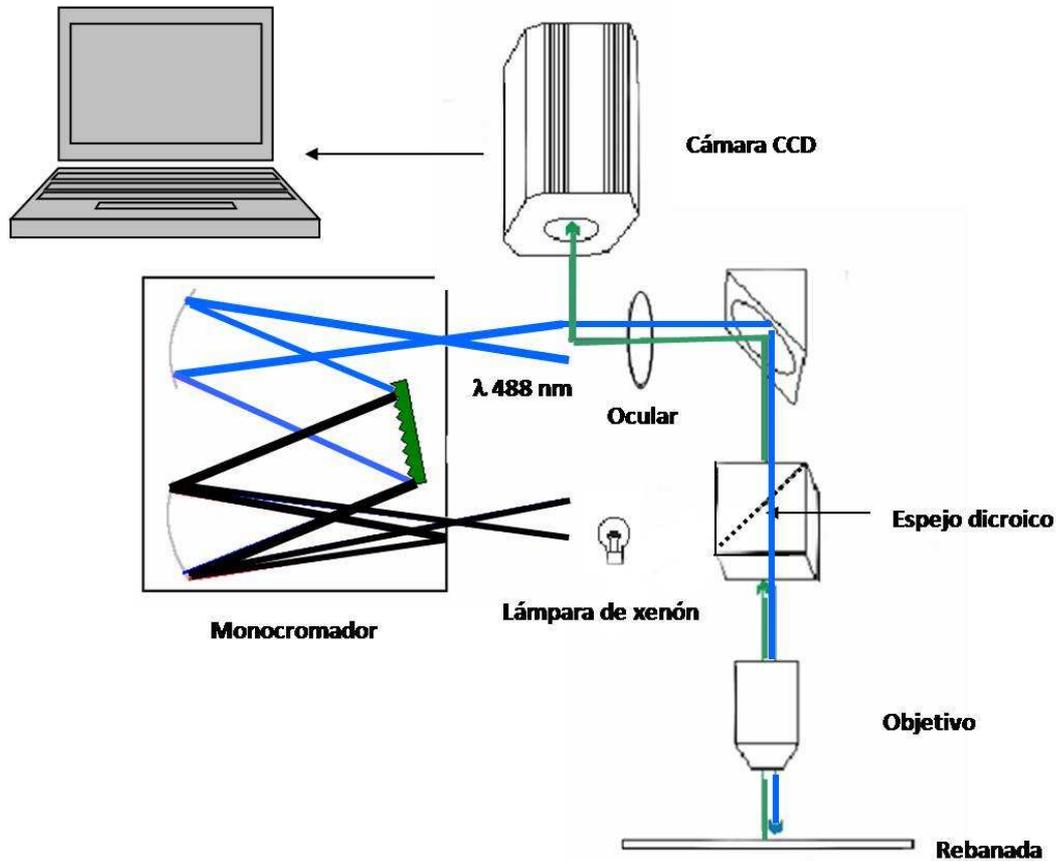


Figura 6. Esquema dispositivo empleado para el registro de oscilaciones de calcio intracelular en rebanadas de hipófisis de ratón.

La perfusión fue entonces cambiada a solución fisiológica conteniendo la concentración deseada de la GnRH. La [GnRH] se aplicó utilizando un sistema de perfusión de gravedad que consiste en 5 jeringas de 5ml y una 60 ml, cada una de ellas separada en una válvula de dos vías y conectada con el uso de Tygon a una entrada común dentro de la cámara de registro. Se llevaron a cabo experimentos control con una solución fluorescente (Alexa $1\mu\text{M}$) para determinar el momento de la llegada y del lavado de la GnRH durante los experimentos. La GnRH tiene un retraso en el sistema de perfusión de 12 s y alcanza la concentración deseada dentro de la cámara de registro y por lo tanto, en la rebanada de la hipófisis, en 10

segundos más. El estímulo de la GnRH duró 30 segundos aproximadamente. Se estableció un periodo de 30 minutos entre la aplicación de una dosis de la GnRH y la siguiente aplicación de la GnRH en la misma rebanada (ver figura 7). Cabe mencionar que a pesar de la larga duración de los experimentos la cuantificación de la fluorescencia en las células individuales no cambia de forma significativa al inicio con respecto del último registro obtenido, lo cual indica que la fuga del colorante no es un problema en nuestros experimentos.

Protocolo y análisis de registro.

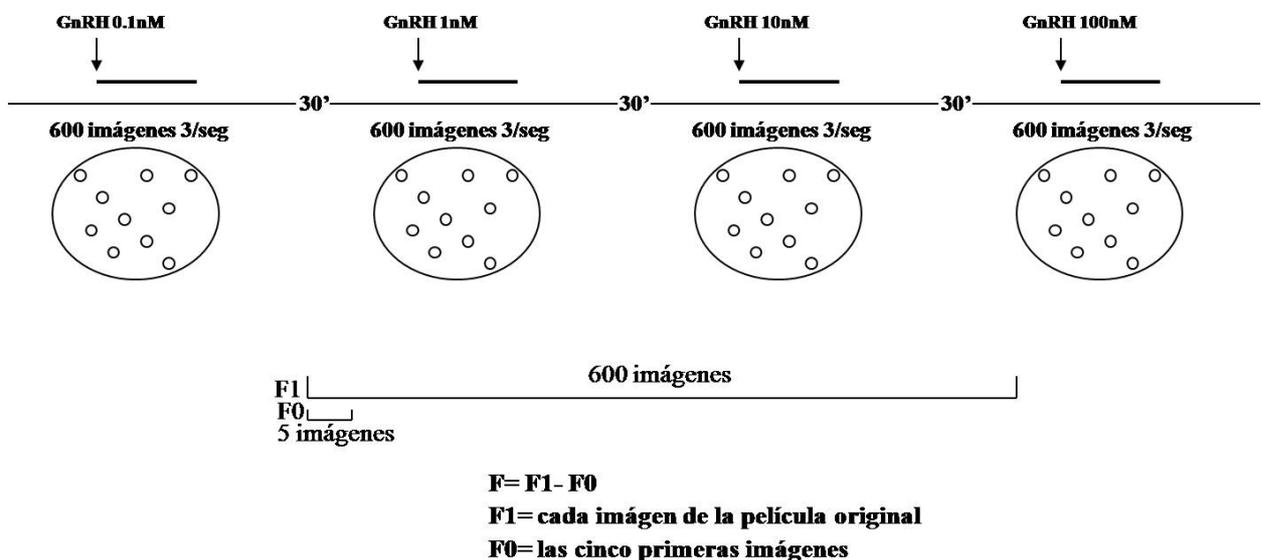


Figura 7. Esquema del protocolo de aplicación de la GnRH y del registro de las señales de Ca^{2+} intracelular en un mismo campo de la adenohipófisis en la rebanada de hipófisis de ratón macho.

El Fluo-4 no penetra más allá de 40-50 μm aproximadamente en el tejido, por lo que es posible observar de una a dos capas de células dentro de la rebanada las cuales han incorporado el indicador. Con la práctica, es posible enfocar una capa de células sanas debajo de la superficie de la rebanada, por lo que la contaminación de la fluorescencia fuera de foco de las células que se encuentran en otras capas de células no es un problema aún a relativa baja magnificación. Para facilitar la identificación de las células que respondieron a un aumento en la

fluorescencia a la aplicación de la GnRH, se obtuvieron imágenes de la desviación estándar (DS) de los segmentos de interés de las películas. En las imágenes DS, las áreas con valores altos de intensidad correspondieron a las células con grandes cambios de fluorescencia (F), mientras que las áreas con valores bajos de intensidad corresponden a células que tuvieron menor actividad o permanecieron silentes. La intensidad de los cambios de fluorescencia se marcaron con un código de color con propósitos ilustrativos. Las regiones de interés (ROIs) correspondientes a las células que se activaron en respuesta a la aplicación de la GnRH, fueron dibujadas en la imagen DS y transferidas a la película F (ver figura 10). De este modo se obtienen los cambios en la fluorescencia de cada célula durante el registro. Usando esta aproximación, es posible el registro de los cambios de las señales de fluorescencia con respecto al tiempo (F(t)) de hasta cientos de células individuales. Sin embargo, cabe mencionar que la selección de células se verificó además analizando de forma manual cada una de las células de la rebanada con el fin de no excluir ningún tipo de respuesta que no fuera detectada por el análisis DS. Una forma conveniente de representar la gran cantidad de información obtenida en una rebanada es una gráfica donde sea posible expresar los cambios de F(t) para muchas células, es a través de una gráfica multicelular. Este tipo de gráfica (multi-cell F(t) plot) fue generada con aplicaciones de Igor Pro 5.03 (Wavemetrics Inc., OR, USA, escritos por el Dr. León Islas, Profesor Asociado de tiempo completo en la Facultad de Medicina de la UNAM. Estas gráficas representan en la absisa el tiempo, mientras que los valores de F se encuentran en código de color. De estas graficas, los trazos individuales de la fluorescencia pueden ser extraídos para cada célula. Las líneas horizontales de las áreas sombreadas representan el tiempo aproximado de llegada y duración de la GnRH en la cámara (ver figura 12). Las curvas dosis respuestas del número de células activas en función de la concentración de la GnRH, fueron evaluadas utilizando la función:

$$F(x) = \frac{(A1 - A2)}{[1 + (x/ED_{50})^p] + A2}$$

donde (A1: valor inicial, A2: valor final, p= pendiente). Las células fueron cuantificadas cuando su incremento correspondió a dos veces o más la desviación estándar del ruido y de la fluorescencia basal. Los datos numéricos fueron graficados en Origin 3.8 (MicroCal Software, Northampton, MA, USA) o Igor Pro.

VI. RESULTADOS

1. Implementación de la técnica de obtención de rebanadas de hipófisis de ratón.

La primera parte de este trabajo consistió en la implementación de la técnica de la obtención de rebanadas de hipófisis de ratón en el laboratorio. Esta técnica fue implementada por primera vez en el grupo de Patrice Mollard del Institute de Genomique Fonctionelle en Montpellier, Francia, (Guérineau y cols., 1998, Fauquier y cols., 2002) y fue necesario realizar varias modificaciones a la técnica para obtener con éxito rebanadas de hipófisis de ratón en el laboratorio. Por tal motivo durante mi doctorado hice una estancia en el laboratorio del Dr. Mollard con el fin de optimizar la técnica, lo que me permitió mejorar la preparación hasta lograr la obtención de registros por largos periodos de tiempo, necesarios para alcanzar los objetivos de este trabajo. Uno de los parámetros útiles para la evaluación de la vitalidad de las células adenohipofisarias en la rebanada son las características del cargado del indicador fluorescente. El colorante debe incorporarse a las células de forma homogénea y moderada, lo que indica que los niveles basales de la $[Ca^{2+}]_i$ están siendo regulados de forma fisiológica por las células. Es común encontrar algunas células con niveles de fluorescencia muy alto en condiciones basales, sin embargo estas células deben ser pocas y la fluorescencia presenta una distribución normal en la rebanada. La figura 8 ilustra un ejemplo de un campo de la rebanada de hipófisis viable. Por otro lado, la presencia de oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, las cuales han sido previamente reportadas tanto en células adenohipofisarias en cultivo primario (Kwiecien y Hammond, 1998), como en la rebanada de hipófisis (Guérineau y

cols., 1998), son también un indicativo de la viabilidad fisiológica de las células en rebanada. Como se muestra en la figura 9 en nuestra preparación es posible registrar oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, las cuales se manifiestan con diferentes parámetros tanto en amplitud como en frecuencia.

Imagen DS de un campo de registro cargado con el indicador Fluo-4

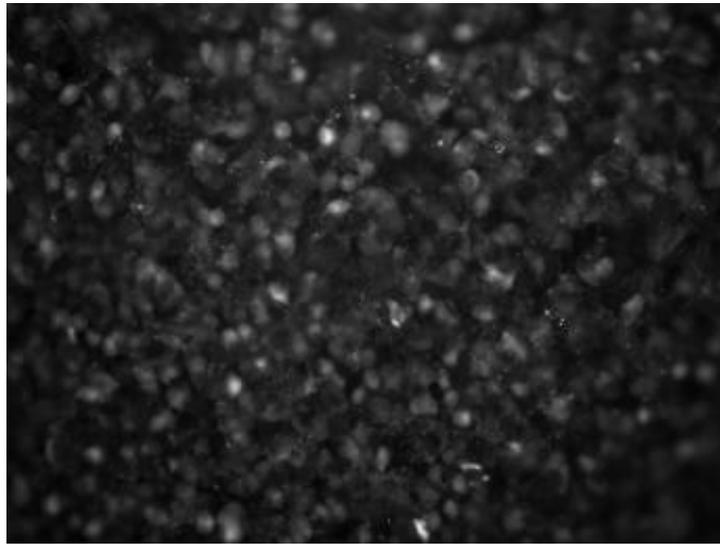


Figura 8. Imagen de un campo de la rebanada de hipófisis cargado con el indicador fluorescente Fluo 4 AM.

Ejemplo de oscilaciones espontáneas en las células adenohipofisarias en rebanada

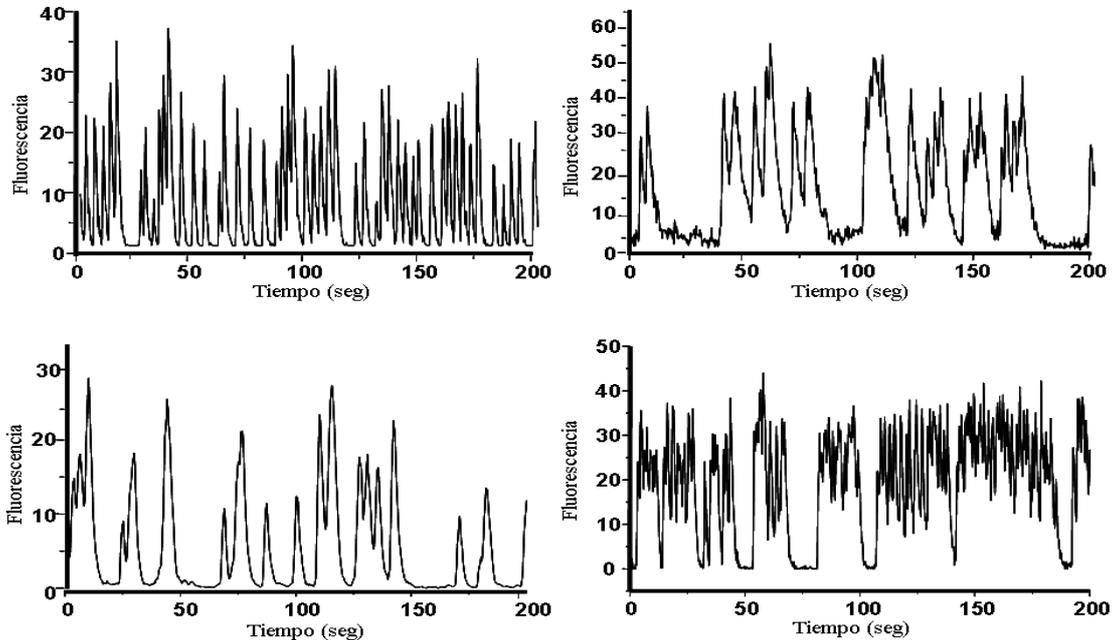


Figura 9. Ejemplos de algunas células de la adenohipófisis en la rebanada que muestran oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, las oscilaciones varían tanto en amplitud como en frecuencia.

2. Protocolo de registro y análisis de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ en la rebanada de hipófisis.

Una vez implementado con éxito la obtención de los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células de la adenohipófisis en las rebanadas de hipófisis de ratón el siguiente objetivo fue evaluar la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la aplicación de la hormona hipotalámica GnRH. Como se explica detalladamente en la sección de materiales y métodos, durante todos los registros la rebanada fue mantenida en perfusión constante de solución salina burbujeada, vía a través de la cual se aplicó la GnRH. Los registros consistieron en la obtención de una secuencia de imágenes (película), la cual incluye la actividad antes durante y después de la aplicación de la GnRH. La película es procesada como se indica en la sección de materiales y métodos e ilustrada en la figura 7, una vez obtenida la imagen desviación estándar (DS) (ilustrada en la figura 10), se identificaron las células en la rebanada de hipófisis que respondieron a la aplicación de la GnRH con un

cambio en la $[Ca^{2+}]_i$.

Figura DS antes y después de la aplicación de la GnRH

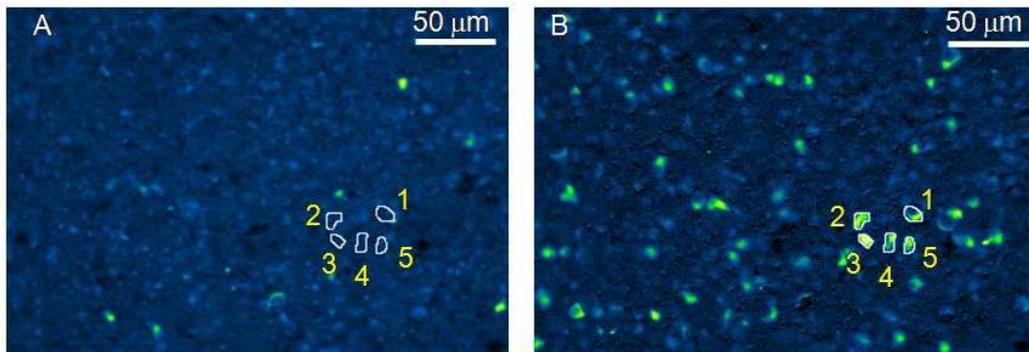


Figura 10. Imágenes DS pseudocolor del mismo campo de la rebanada en condiciones basales (A) y en respuesta a la aplicación de 100nM de GnRH (B).

Como ilustra la figura anterior, las imágenes DS permite la visualización de las células que responden a la aplicación de la GnRH. Este ejemplo ilustra 5 células que en ausencia de la estimulación con la GnRH no presentaron cambios en la fluorescencia (A), mientras que las mismas 5 células muestran un claro aumento de la fluorescencia reportada por la imagen DS (B). Del análisis obtenido de seleccionar las células en las imágenes DS, así como de la selección manual de todas las células en el campo registrado, se desprende la presencia de cuatro poblaciones de células en respuesta a la aplicación de la GnRH, las cuales son ejemplificadas en la figura 11. El panel 11A muestra un ejemplo de las células que carecen de oscilaciones de Ca^{2+} previas a la aplicación de la GnRH y permanecen silentes antes, durante y después de la aplicación del secretagogo. En la figura 11B se muestra un ejemplo de las células que manifiestan oscilaciones de Ca^{2+} en ausencia de estímulo alguno, y la aplicación de la GnRH no modifica el patrón de oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ previo a su aplicación. Por otro lado, el panel 11C ilustra la población de células que carece de oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en las cuales la aplicación del secretagogo promueve un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Finalmente, el panel 11D muestra un ejemplo de las células que tienen transitorios

espontáneos de la $[Ca^{2+}]_i$ y que además responden a la aplicación de la GnRH con un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$. Cabe mencionar que de estas cuatro poblaciones de células antes descritas, se eligieron para el estudio las poblaciones de células que responden con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ a cualquiera de las dosis de la GnRH aplicadas, ejemplificados en los paneles C y D de la figura 11.

Con el fin de evaluar las respuestas generadas por dosis crecientes de la GnRH (las mismas que había sido previamente utilizadas para el estudio de gonadotropos disociados o en cultivo primario), y tomando ventaja del hecho de que el receptor a la GnRH en el ratón (Davidson y cols., 1994) carece de desensibilización. Implementamos un protocolo que nos permitiría evaluar las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes [GnRH] en la misma rebanada. Este protocolo que está descrito con detalle en materiales y métodos consistió en la aplicación de hasta cinco dosis crecientes: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 nM de la GnRH, con intervalos de 30 minutos entre aplicaciones subsecuentes del secretagogo (ver figura 7), este tiempo fue considerado para evitar algún efecto acumulativo entre aplicaciones de la GnRH. Cabe mencionar que este protocolo es especialmente difícil, ya que requiere de que a pesar de la continua perfusión de la solución fisiológica burbujeada en la rebanada para mantenerla viva, sea posible evaluar a las mismas células, lo cual requiere que la rebanada no se mueva de posición por 3 hrs aproximadamente.

El análisis de células individuales en cinco registros por rebanada, significa analizar y trabajar con una gran cantidad de datos. Lo anterior creó la necesidad de contar con un método que nos permitiera la evaluación de varias respuestas de Ca^{2+} de la misma rebanada al mismo tiempo. Para tal fin el Dr. León Islas (Facultad de Medicina UNAM) creó una aplicación en el programa Igor 5.03, esta herramienta hizo posible la visualización de los cambios de intensidad de fluorescencia en función del tiempo durante cada uno de los experimentos realizados. Como se muestra en la figura 12, este método permite visualizar la respuesta de decenas de gonadotropos en una misma gráfica y al mismo tiempo visualizar el patrón de respuesta de cada célula de manera individual.

Ejemplos de los tipos de células en respuesta a la aplicación de la GnRH

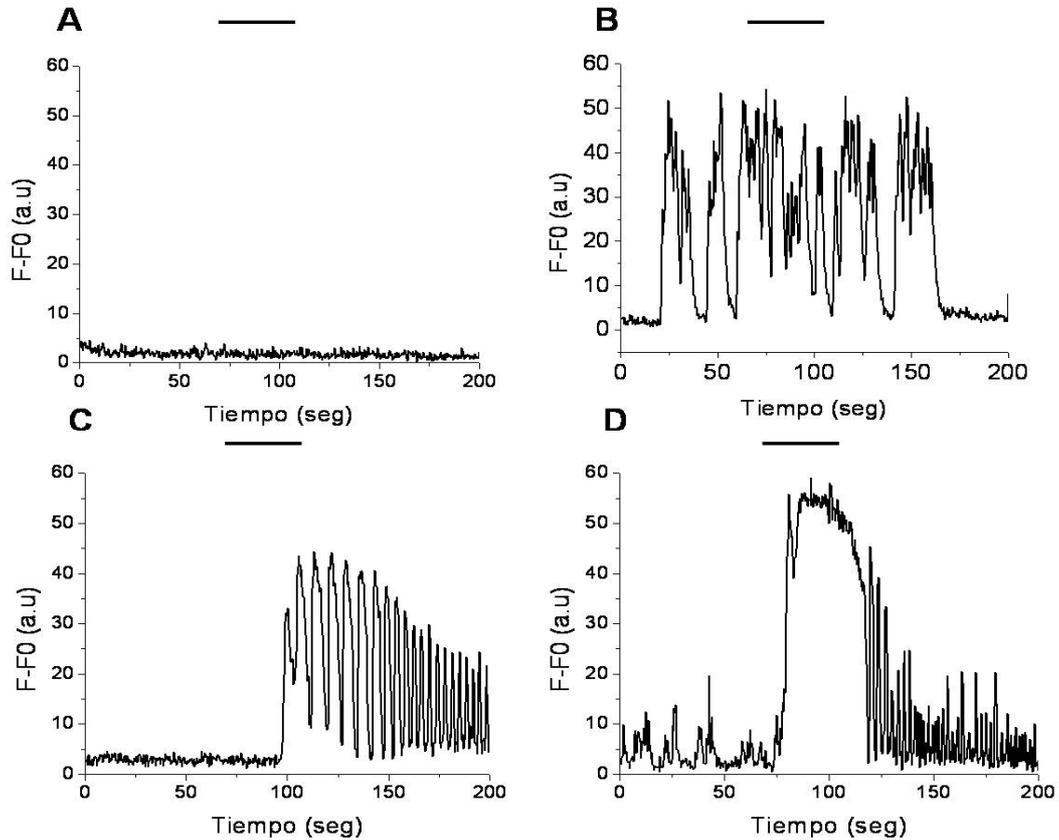


Figura 11. Ejemplo de los 4 tipos de patrones de Ca^{2+} presentes en la rebanada de hipófisis de ratón macho antes durante y después de la aplicación del GnRH. **A.** Ejemplo de una célula que permanece silente durante todo el registro. **B.** Ejemplo de una célula con oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que permanecen durante todo el registro. **C.** Registro de una célula silente en condiciones basales que responde a la aplicación de la GnRH con un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **D.** Ejemplo de una célula que presenta oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y responde a la aplicación de la GnRH 10nM con un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La barra negra indica la duración de la aplicación de la GnRH.

Ejemplo de una gráfica multicélula

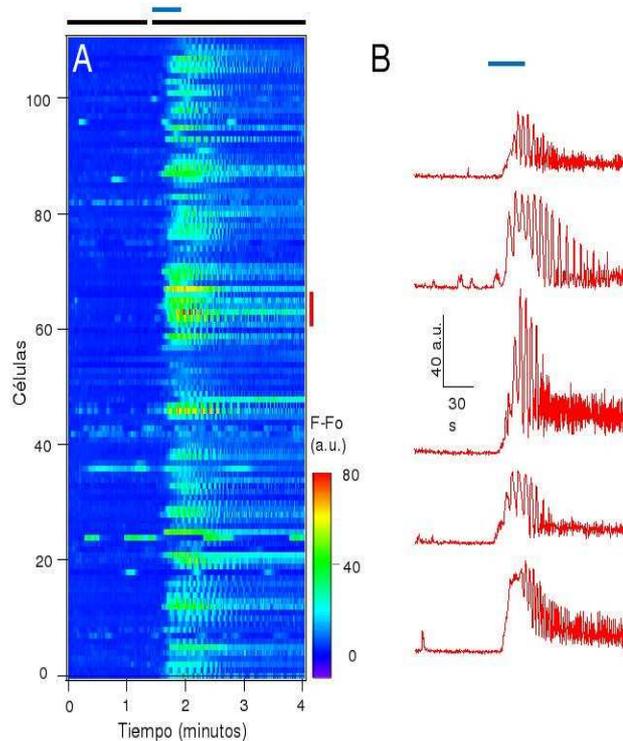


Figura 12. Ejemplo de una gráficas multi-célula (multi-cell plot). A. Método de análisis que permite la visualización de los cambios de las intensidades de fluorescencia durante un experimento en decenas de células. Las líneas horizontales ilustran los periodos basales y estimulados con la GnRH. La línea horizontal azul, denota el momento en que la GnRH está presente en la cámara de registro a la dosis deseada, en este caso 100nM. B. Este método permite al mismo tiempo la visualización de los trazos promovidos durante el experimento, ejemplo de 5 células que respondieron a la aplicación de la GnRH.

3. Distribución espacial de las células que responden a la GnRH en la rebanada

La rebanada es una preparación que permite la visualización de las células que responden a la GnRH en su posición anatómica nativa en la adenohipófisis, lo que permite la exploración de la distribución espacial de las células. Para cumplir ese objetivo hicimos experimentos utilizando una baja magnificación (5x), lo cual, como muestra el panel de la figura 13C, permite el registro de casi la totalidad del hemilóbulo de la adenohipófisis. Estos experimentos consistieron en la aplicación

de dosis crecientes de [GnRH]: 0.1, 1, 10 y 100 nM en el mismo campo de la rebanada.

Campo de registro de la adenohipófisis 5x

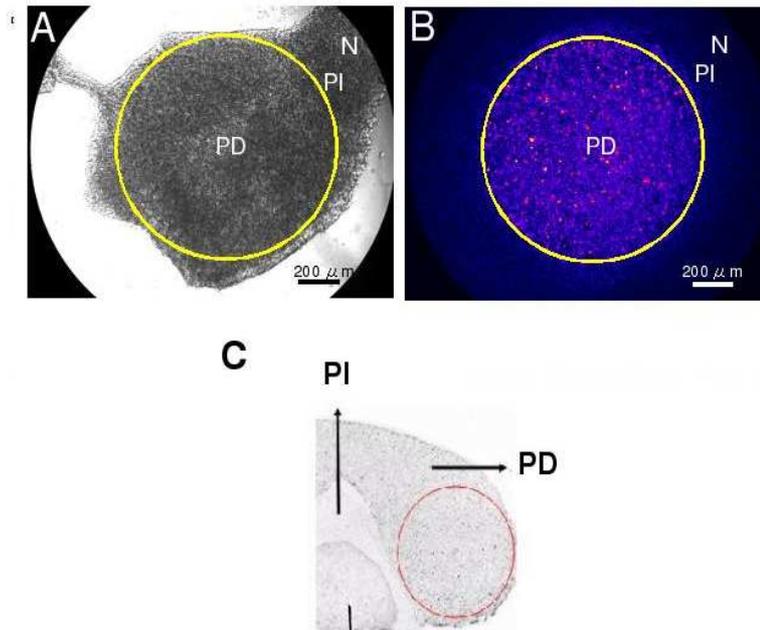


Figura 13. Ejemplo de un campo de la adenohipófisis registrado con bajo aumento (5x). **A.** Un campo de la hipófisis visto en contraste de fases, el círculo amarillo enmarca la zona del registro. **B** Imagen SD de la fluorescencia del mismo campo registrado después del análisis de la respuesta a la GnRH. **C.** Esquematización del área de la hipófisis que se registra con el aumento 5x. **N**= Neurohipófisis, **PI**= Pars intermedia, **PD**= Pars distalis.

Para el análisis de los datos se construyó un mapa con las coordenadas de la posición en x y y de cada célula que respondió a la dosis de la GnRH aplicada. Como se ilustra en la figura 14 se construyó un mapa por cada dosis del secretagogo aplicada. Como se observa, el número de células se incrementa conforme aumenta la [GnRH]. De esta forma el número de células que responde a la dosis de 1 nM de la GnRH se incrementa 0.6 veces con respecto a la GnRH 0.1 nM, el incremento es de 2.3 veces cuando el estímulo de la GnRH es de 10 nM y aumenta casi 4 veces (3.8 veces) cuando la concentración de la GnRH es 100 nM,

con respecto a la aplicación del GnRH 0.1 nM. Las diferencias en las respuestas promovidas por las dosis 1 nM, 10 nM y 100 nM son estadísticamente significativas con respecto a la menor dosis aplicada de la GnRH (0.1 nM) ($p < 0.001$). Por otro lado, los mapas de la figura 12 ilustran además que las células que responden a la GnRH no se localizan en un área específica del hemilóbulo, si no que, independientemente de la dosis de la GnRH aplicada, se localizan de forma heterogénea en la rebanada. Nuestros resultados difieren de trabajos previos hechos en cortes fijados de la adenohipófisis, en los que, utilizando técnicas de inmunohistoquímica se ha reportado que algunos gonadotropos se localizan en zonas específicas de la glándula (regionalización) (Dada y cols., 1984, Shirasawa y cols., 2004).

4. Reclutamiento de células según la [GnRH].

Para saber si el incremento en el número de células que responde a dosis altas de la GnRH se debe a un reclutamiento de células que se adicionan a las células que respondieron a dosis bajas del secretagogo, hicimos registros a mayor aumento (20x). Para el análisis de los datos construimos nuevamente mapas de la localización de cada célula que respondió a la aplicación de la GnRH con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Los mapas obtenidos a las diferentes dosis de la GnRH fueron sobrelapados, los cuales, al ser del mismo campo de registro, permiten la comparación de las mismas células a las distintas aplicaciones de la GnRH. La figura 14 muestra un ejemplo de cuatro mapas, cada uno obtenido de la aplicación de una dosis de la GnRH en el mismo campo de registro. Como muestra el ejemplo ilustrado en la gráfica 15, el 62% de las células que responden a 0.01nM de la GnRH responden a las subsiguientes dosis aplicadas de la GnRH y la mayoría de las células remanentes responden solamente a la dosis de 0.01nM de la GnRH. Por otro lado, cerca del 100% de las células que responden a la dosis de 1nM de la GnRH vuelven a responder a las siguientes dosis del secretagogo.

Mapas de la localización de las células individuales que respondieron a la GnRH.

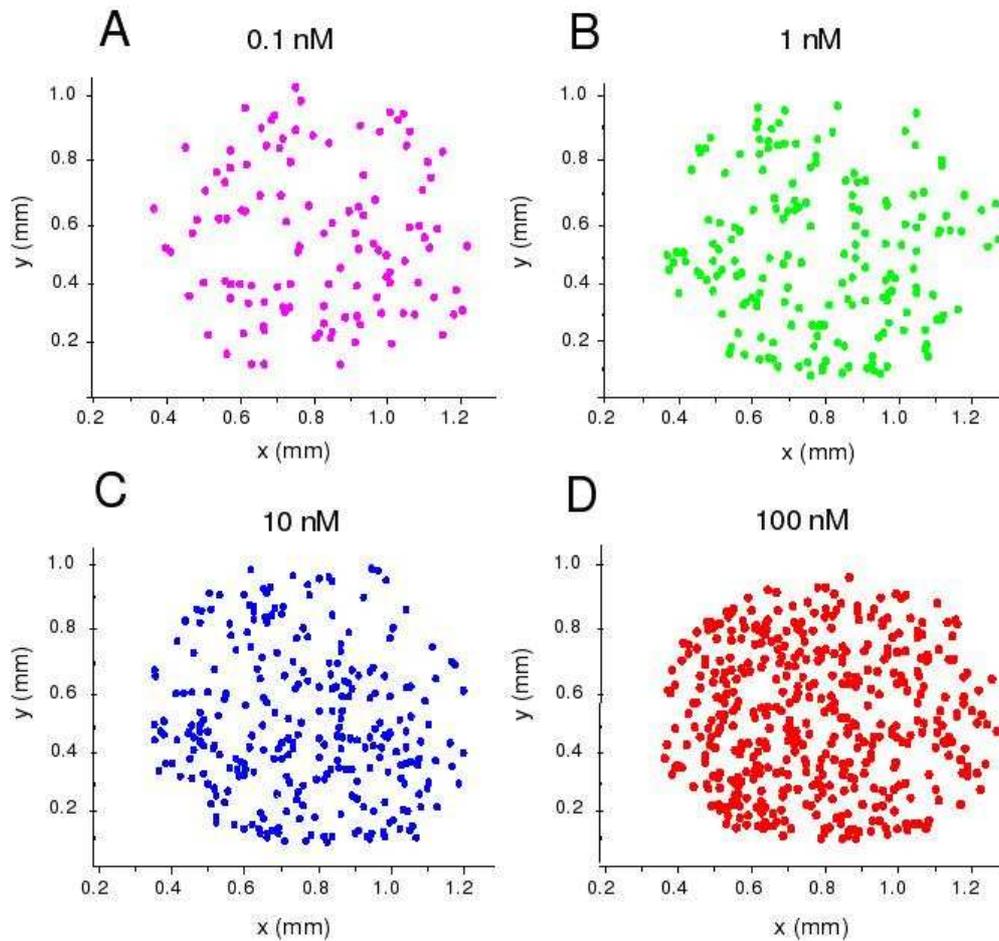


Figura 14. Mapas que ilustran la posición de los gonadotropos que responden a la aplicación de dosis crecientes de la GnRH en el mismo campo de adenohipófisis 5x.

Lo anterior indica que la mayoría de la población de células responde a la aplicación de la GnRH 1, 10 y 100 nM. Sin embargo, de manera interesante, algunas de las células que responden a 0.01nM no vuelven a responder a dosis mayores de la GnRH. El patrón de respuesta de estas células es oscilatorio o transitorio y la amplitud tamaño de la respuesta promovida por estas células no sugiere que se trate de una respuesta saturada. Lo anterior sugeriría la presencia de células que poseen umbrales diferentes de respuesta de Ca^{2+} según la dosis

del secretagogo y/o la presencia de algunas células que posean algún mecanismo de desensibilización en su respuesta.

Mapas sobrelapados de las células que responden a la aplicación de dosis crecientes de la GnRH

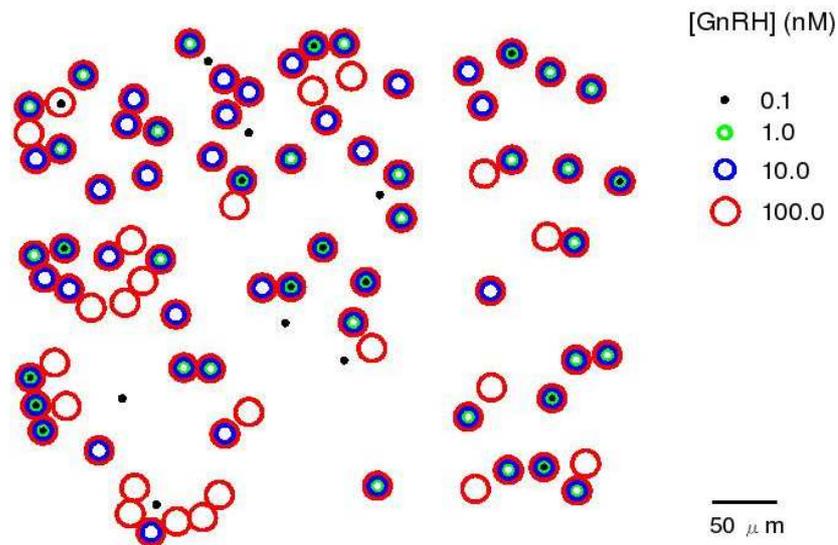


Figura 15. Mapas sobrelapados que ilustran la posición de las células que responden a la aplicación de dosis crecientes de la GnRH en el mismo campo de adenohipófisis (20x).

5. Curva dosis- respuesta de las células que responden a la GnRH en la rebanada

Los experimentos anteriores muestran que, como era de esperar, el número de células que responden a la aplicación de dosis crecientes de la GnRH aumentan con la dosis del secretagogo y posteriormente calculamos la curva dosis-respuesta de las células que respondieron a la aplicación de cinco dosis crecientes de la GnRH. La curva dosis respuesta de siete experimentos independientes se ilustran en la figura 16, los resultados muestran dos tipos de comportamientos, por un lado, cinco de siete casos rebanadas presentaron los siguientes valores de dosis efectiva 50 (DE_{50}): 0.24, 0.16, 0.10, 0.66 y 0.8nM, las dos restantes presentan una DE_{50} de: 2.48 y 2.22nM.

Curva dosis respuestas del número de células que responde a la GnRH

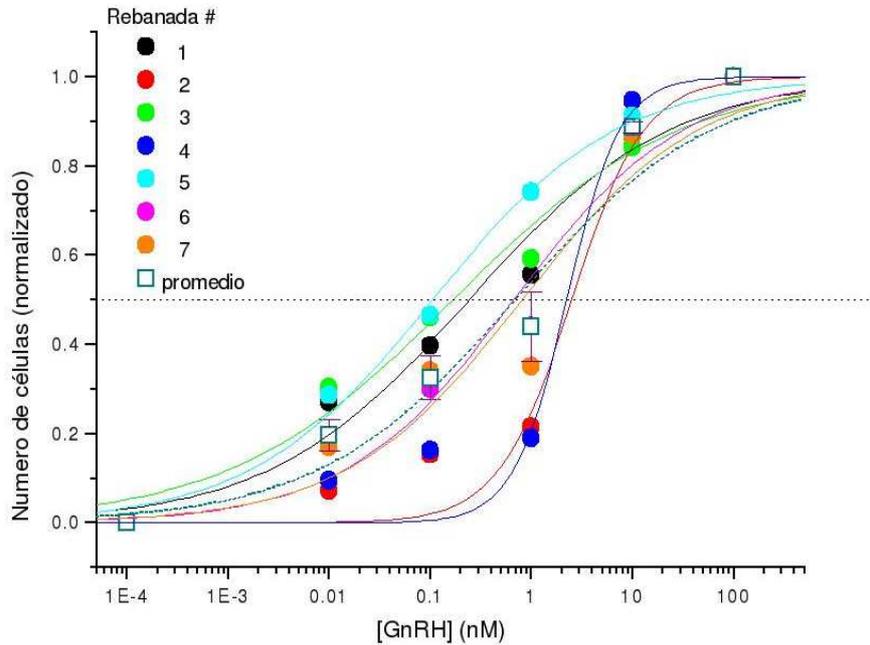


Figura 16. Curvas dosis-respuesta comparativas. Cada curva dosis-respuesta representa el número de células que responden a la aplicación de cada dosis de la GnRH aplicada. Cada curva está indicada por un color distinto y el promedio de las curvas dosis-respuesta está representado en cuadros vacíos azules.

Los resultados anteriores indican que, aunque la mayoría de las rebanadas presentan una sensibilidad relativamente alta a la aplicación del secretagogo, dos rebanadas presentan una menor sensibilidad al secretagogo con respecto al grupo anterior, las diferencias entre estas dos poblaciones es significativa ($p= 0.0005$ t de Student, muestra no pareada). Sin embargo la presencia de esta segunda población no fue observada en experimentos adicionales por lo que no es posible concluir si la existencia de esta población puede tener una explicación fisiológica. Por otro lado, la curva dosis-respuesta promedio de todos los experimentos presenta una $DE_{50}= 0.56$ nM.

6. Patrones en la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ promovidos por las diferentes dosis de la GnRH.

A continuación decidimos estudiar si los patrones de Ca^{2+} promovidos por la GnRH en la rebanada de hipófisis de ratón eran similares a los patrones observados previamente en los gonadotropos en cultivo primario. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, las respuesta de Ca^{2+} promovidas por la GnRH se han categorizado según su dinámica en: oscilatorias, bifásicas mixtas oscilatorias y bifásicas no oscilatorias. En la rebanada, como se muestra en la figura 17 es posible identificar los tres tipos de patrones de Ca^{2+} previamente reportados en respuesta a la GnRH en los gonadotropos en cultivo. Así mismo, los reportes previos suponen que los diferentes patrones de Ca^{2+} promovidos por la GnRH están determinados por la concentración del secretagogo. Sin embargo, como muestra la figura 17, en la rebanada de hipófisis es posible producir los tres tipos de patrones reportados en cultivo primario con la aplicación de una sola dosis de la GnRH. El resultado del análisis porcentual para determinar la proporción de células que responden con la secuencia "canónica" reportada en gonadotropos en cultivo o disociados en nuestra preparación se muestra en la figura 18. La figura ilustra el ejemplo de una célula que responde de forma canónica cambiando su patrón de respuesta de subumbral, oscilatoria, oscilatoria-bifásica a finalmente bifásica simple o bifásica no oscilatoria al aumentar la [GnRH], conforme se ha reportado. De manera interesante estas células corresponden solamente al 20% del total de las células que responden a la GnRH. A continuación, en la figura 18, se observa el ejemplo de una célula que respondió de manera "no canónica", la cual, aunque responde con los patrones de Ca^{2+} reportados previamente, carecen de los cambios canónicos que acompañan el incremento en la [GnRH] reportados en los gonadotropos aislados, esta población correspondió al 54% de la población de las células en nuestro trabajo. Finalmente, el 27% de la población responde de manera atípica con patrones transitorios que aumentan en amplitud conforme aumenta la [GnRH], pero que carecen de la fase oscilatoria a cualquiera de las dosis de la GnRH aplicadas.

Tipos de patrones de Ca^{2+} promovidos por la GnRH

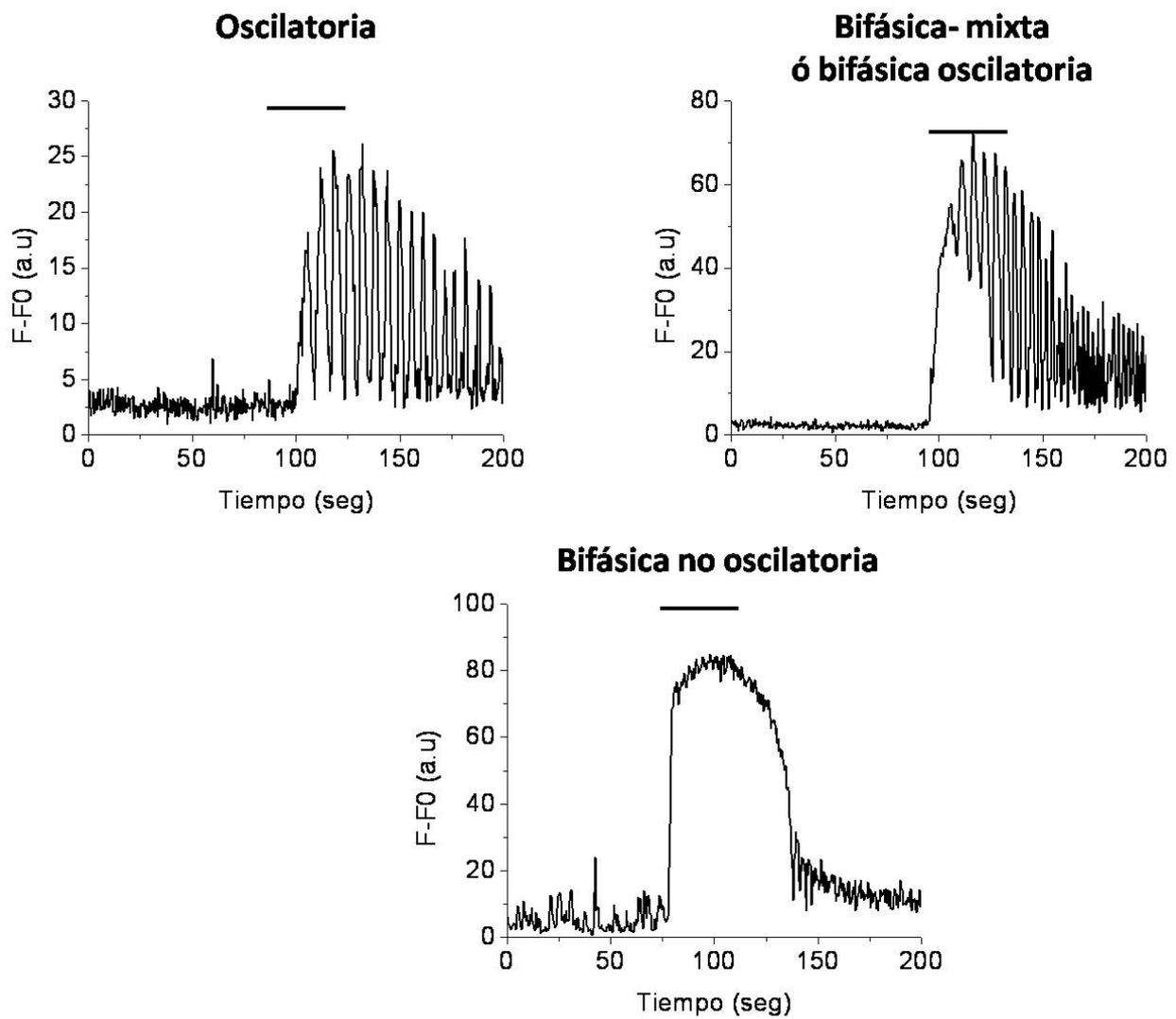


Figura 17. Tipos de patrones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovidos en este ejemplo por la aplicación de la GnRH 10nM, la barra negra indica los 30 segundos de la aplicación de la GnRH.

Tipos de secuencias de la respuestas de Ca^{2+} promovidas por la aplicación de dosis crecientes de la GnRH

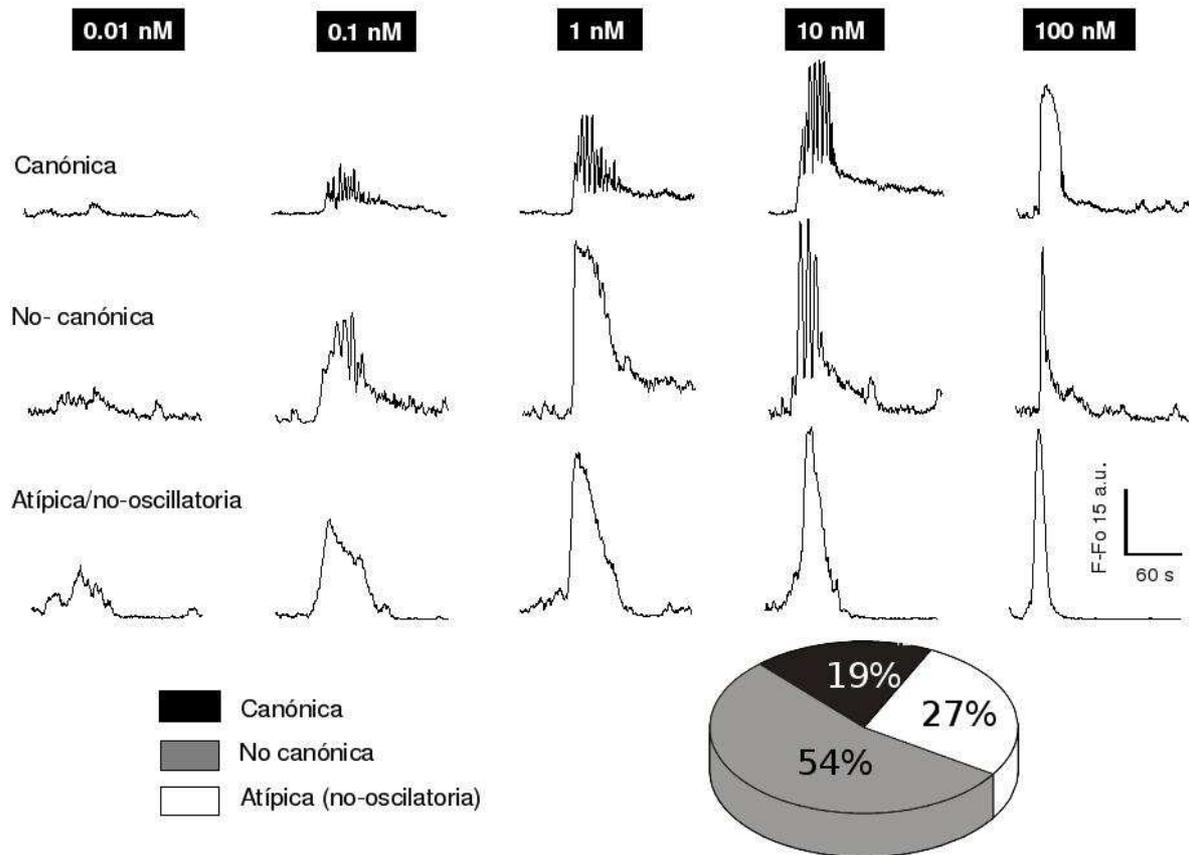


Figura 18. Tipos de secuencias de la respuesta de Ca^{2+} promovidas por la aplicación de diferentes dosis de la GnRH en la rebanada. La figura ilustra en la parte superior el ejemplo de una célula en la rebanada que tuvo una respuesta “canónica” según a lo reportado en los gonadotropos en cultivo primario, la figura de en medio ejemplifica una célula que, aunque responde con los patrones de Ca^{2+} reportados, la secuencia de los patrones no cambia con la dosis conforme a lo observado en los gonadotropos en cultivo primario, a esta secuencia la denominamos “no canónica”. Finalmente se ilustra el ejemplo de una célula que responde con un patrón de Ca^{2+} que carece de oscilaciones, ésta secuencia es llamada atípica. En la parte inferior de la figura la gráfica de pastel ilustra la proporción de células que responde con cada uno de los patrones en nuestros experimentos.

7. Las células que responden a la GnRH poseen un patrón de Ca^{2+} específico que se mantiene constante por periodos largos de tiempo.

Para estudiar si la aplicación repetida de una sola concentración de GnRH generaba un cambio en los patrones de la respuesta de Ca^{2+} , decidimos llevar a cabo experimentos en los cuales se aplicó hasta cuatro veces la misma concentración del secretagogo en las mismas células, de manera interesante los resultados mostraron, como se ilustra en la figura 19 que la aplicación de una misma dosis de la GnRH promueve patrones de Ca^{2+} sorprendentemente similares. Las respuestas promovidas por la aplicación repetida de la GnRH 10 nM, con un intervalo de 30 minutos entre los estímulos, muestra que, a pesar del tiempo transcurrido en el experimento (más de 2 horas), las células responden con un patrón de Ca^{2+} que se mantiene constante por periodos largos de tiempo. Esta información se visualiza fácilmente en los paneles A y B de de la figura 19, en la cual se observan los registros de las respuestas de Ca^{2+} a la GnRH en células individuales de la rebanada, los cuales se mantienen estables a lo largo de todo el registro. La cuantificación de estos resultados, resumido en el panel C de la misma figura muestra que la magnitud de la integral de la repuesta bajo la curva a cada aplicación de la GnRH se mantiene sin cambios estadísticamente significativos para cada célula (ANOVA $p=0.21$)

8. La organización anatómica y funcional de las células que responden a la GnRH en la rebanada de hipófisis de ratón.

Los resultados obtenidos hasta este momento indican que las células que responden a la aplicación de la GnRH presentan algunas características similares a lo observado en cultivo primario, por ejemplo los patrones de Ca^{2+} de la respuesta promovida por el secretagogo. Sin embargo, nuestra preparación deja ver también diferencias importantes. En este punto del trabajo nuestro propósito era explorar la posibilidad de encontrar algún tipo de arreglo multi-celular funcional en la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH in vitro. Nuestra primera aproximación consistió en el análisis de la localización de las células que responden con un determinado patrón de respuesta de Ca^{2+} a la GnRH en los

Respuestas de Ca^{2+} a la aplicación sucesiva de la misma dosis de la GnRH.

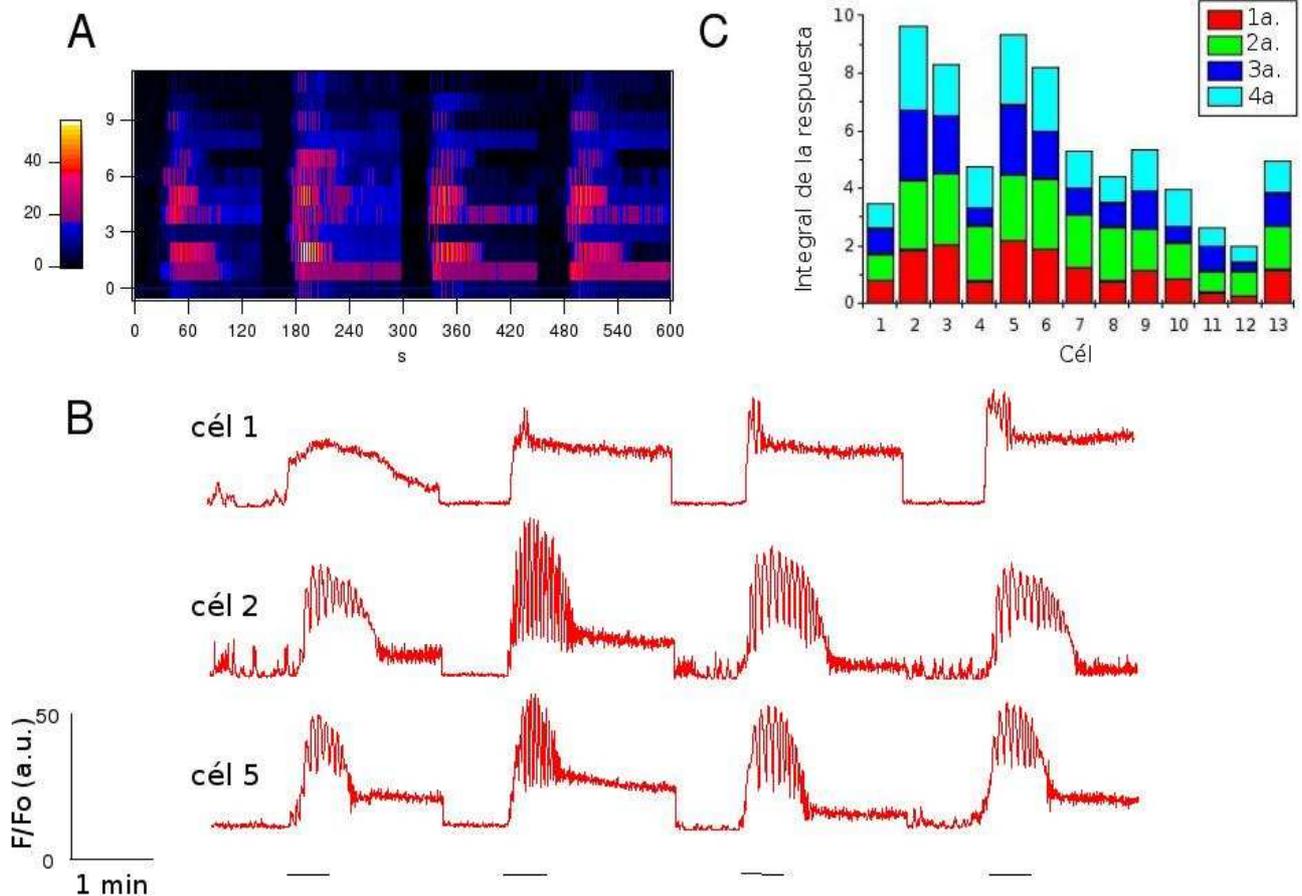


Figura 19. Las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la aplicación de la misma dosis de la GnRH presentan patrones de respuesta similares a largo plazo. El panel A muestra la gráfica multicélula, en la cual se ilustra con pseudocolor los patrones de 13 células en respuesta a las 4 veces repetida aplicación de la GnRH 10nM. El panel B, ilustra los patrones de respuestas de 3 células incluidos en el panel A. Los patrones de Ca^{2+} muestran una estabilidad notoria. El panel C muestra la cuantificación de la integral de la respuesta.

mapas de coordenadas en xy que ilustran la posición de las células individuales en la rebanada. Para tal efecto, marcamos cada célula con un color distintivo según el tipo de patrón de la Ca^{2+} con el cual respondió cada célula: La figura 20 muestra

un ejemplo de los mapas resultantes. Como se puede observar, los resultados muestran que, independientemente de la dosis de la GnRH aplicada, las células que responden con un mismo patrón de Ca^{2+} tienden a formar grupos (cúmulos o filas). Los mapas muestran que a dosis baja de la GnRH (panel A), las pocas células que responden a la aplicación de la GnRH parecen encontrarse cerca de otras células que responden con el mismo patrón. Este tipo de organización funcional según el tipo de patrón de respuesta parece volverse más evidente conforme se incrementa la dosis de la GnRH, de tal forma que la aplicación de dosis altas del secretagogo (GnRH 10 y 100nM) parecen promover respuestas de grupos robustos de células que responden con el mismo patrón de respuesta en la rebanada (figura 20, panel C y D). Como se observa en la figura 20 y la imagen DS de la figura 21 algunas de las células que responden a la GnRH en la rebanada se distribuyen en grupos de hasta 8 ó 9 células contiguas, sin embargo, en algunos casos la similitud de los patrones se circunscribe a pares o tripletes de células. El ejemplo de la figura 22 muestra que a pesar de pertenecer al mismo grupo, las células a1, a2 y a3 presentan un patrón bifásico de respuesta. Mientras que las células enmarcadas en rojo (b1, b2 y b3) presentan un patrón oscilatorio.

Nuestras anteriores observaciones, meramente descriptivas, nos llevaron a realizar un análisis más detallado de este fenómeno, para lo cual utilizamos un análisis de correlación. Este análisis aporta información cuantitativa de la similitud de las respuestas. El análisis de la correlación lineal se llevó a cabo en pares de células contiguas así como en pares de células que no se encontraban en contacto. Para la obtención de esta información graficamos el $\Delta F(t)$ de la célula A vs $\Delta F(t)$ B antes y después de la aplicación de la GnRH en un determinado par de células que respondió a la GnRH.

Un ejemplo de este análisis se muestra en la figura 23, en este ejemplo se puede observar que mientras el coeficiente de correlación (R), en condiciones basales es de $R=0.02$, la aplicación de la GnRH promueve una respuesta de Ca^{2+} con un valor de correlación que aumenta a $R= 0.87$. Lo anterior indica que el valor de correlación incrementa drásticamente con la aplicación de la GnRH. El análisis

Mapas de la posición de las células que ilustra la distribución de los patrones de respuesta de Ca^{2+} generadas por la GnRH.

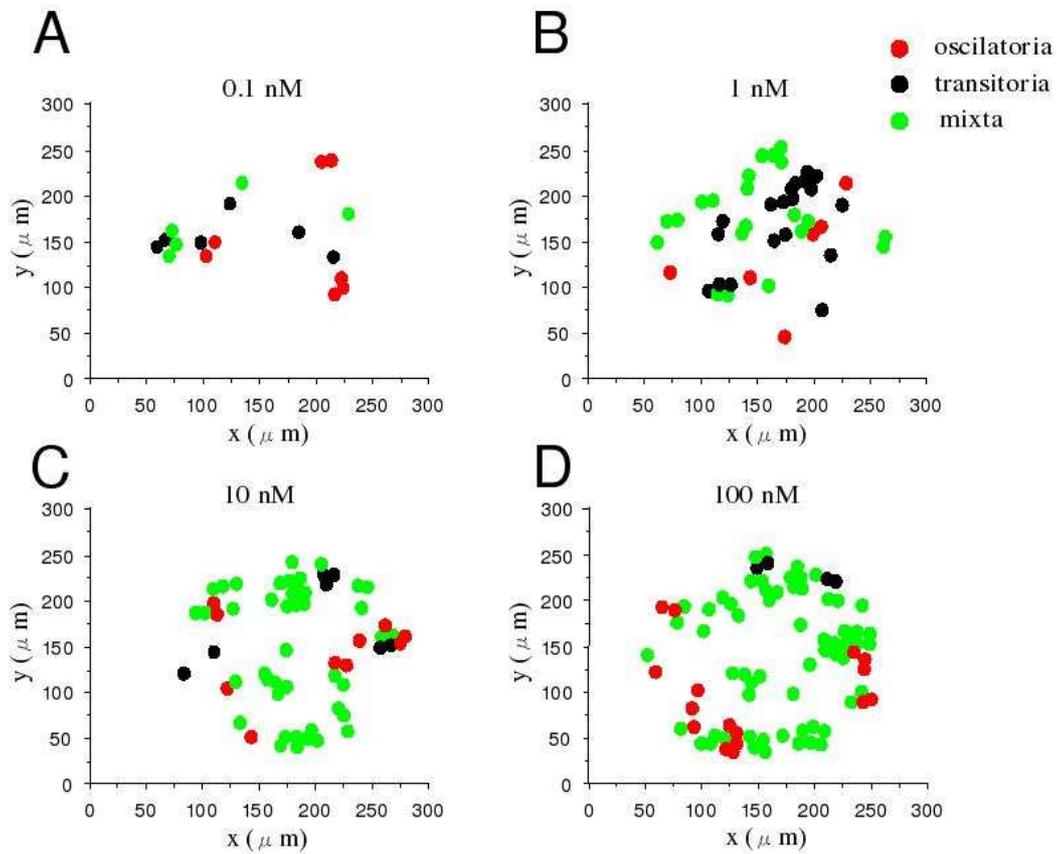


Figura 20. Distribución espacial de los tipos de respuestas acopladas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovidas por diferentes dosis de la GnRH. Ejemplo de los mapas de un experimento que muestra la posición de las células que responden a la aplicación de diferentes dosis de la GnRH en una rebanada de adenohipófisis de ratón. Cada célula está marcada con un color distintivo según el tipo de patrón de Ca^{2+} con el cual respondieron a la GnRH. La escala de los mapas está calibrada en micras.

de la correlación promedio de 51 pares de células analizadas dentro de un grupo en la rebanada fue de 0.75 ± 0.02 (promedio \pm ES). En contraste, cuando se analizaron pares de células aisladas, el coeficiente de correlación permaneció relativamente bajo (0.45 ± 0.09 ; promedio \pm ES; $n = 23$ pares de células).

Imagen DS de los grupos de células que responden a la GnRH

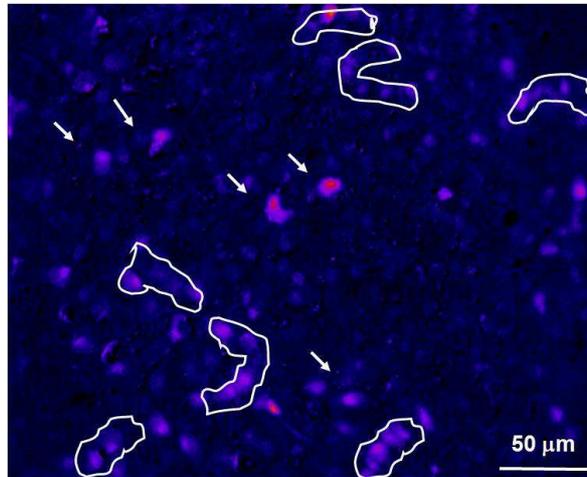


Figura 21. Imagen DS resultante de un experimento en el cual la rebanada de hipófisis fue estimulada por 10nM de la GnRH. Las flechas señalan ejemplos de células aisladas que fueron estimuladas por la GnRH, mientras que en formas asimétricas se enmarcan los grupos o cúmulos de células

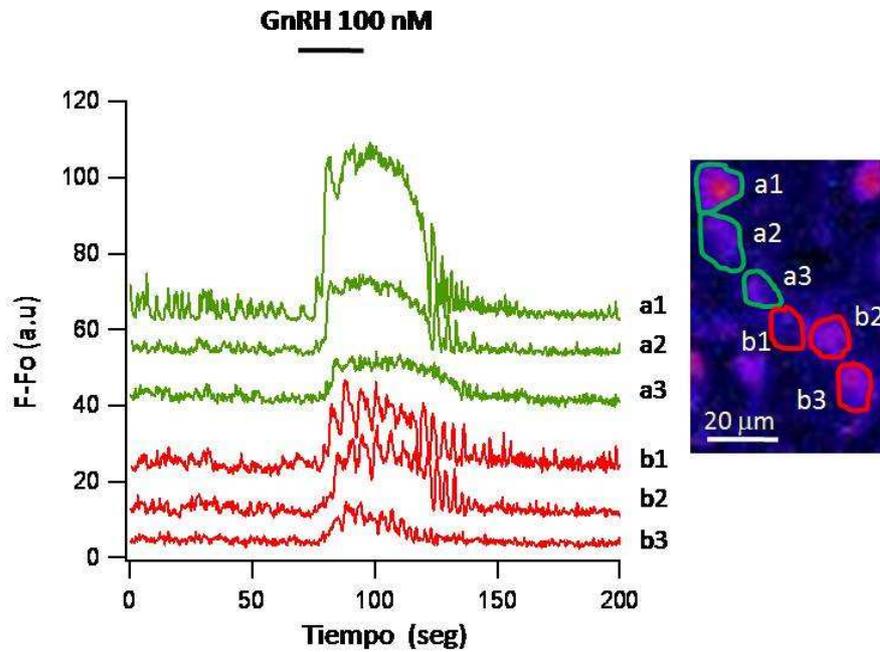


Figura 22. Ejemplo de un grupo de células estimuladas por la GnRH en la rebanada de hipófisis. El recuadro de la derecha muestra la localización de seis células contiguas, las cuales presentan una respuesta funcional en arreglos de tripletes. Marcados en rojo y verde.

La GnRH promueve respuestas de Ca^{2+} con un valor elevado de correlación lineal en células contiguas

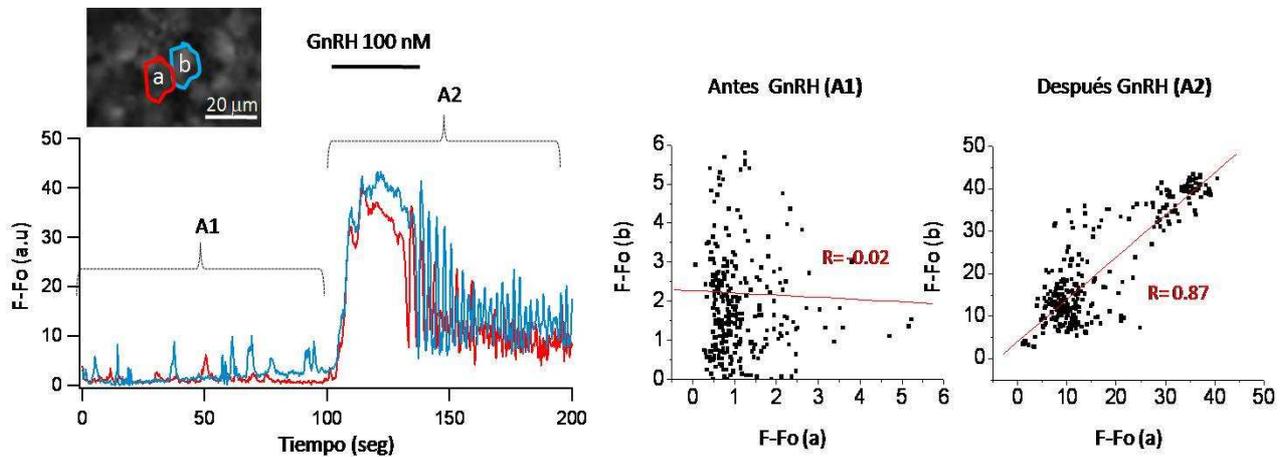


Figura 23. Ejemplo de un par de células que aumentan su correlación después de la aplicación de la GnRH estimuladas por la GnRH en la rebanada de hipófisis.

Por otro lado, cuando hicimos un análisis de la distribución del grado de acople de las respuestas, para lo cual categorizamos a las células como no acopladas cuando el valor de entre estas es de $R < 0.60$, acopladas débilmente cuando el coeficiente de correlación es $0.60 \leq R < 0.80$ y acopladas fuertemente cuando el valor de R entre pares de células es $R \geq 0.80$. El estudio de la distribución de los diferentes grados de acople en los mapas de coordenadas x y y de las células muestra, como ilustran los mapas de la figura 24, que la aplicación de dosis bajas de la GnRH promueve la respuesta de Ca^{2+} de pocas células las cuales, además, presentan un acople bajo o nulo y que, conforme aumenta la dosis de la GnRH, se incrementa el grado de acople entre ellas. De tal manera que las células que presentan un acople relativamente fuerte ($R \geq 0.80$) aumentan de 11.7% a la dosis de 0.1nM de la GnRH hasta un 62.9% a la dosis de 100nM de la GnRH. Lo anterior sugiere que la aplicación de dosis relativamente altas de la GnRH (10-100 nM) promueve la respuesta de grupos de células que parecieran formar **múltiples unidades locales acopladas funcionalmente**.

9. Posibles mecanismos involucrados en la respuesta acoplada de la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la GnRH.

Se ha reportado que en la rebanada de hipófisis las uniones comunicantes intercelulares se mantienen funcionales, y además, se ha demostrado, que las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ sincrónicas espontáneas entre algunas células de la adenohipófisis se debe al acople funcional de las uniones comunicantes (Guérineau y cols., 1998). Este mecanismo podría participar en la respuesta acoplada de $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de la rebanada. Aunque

Distribución espacial de los tipos de acople promovidos por la GnRH en la rebanada

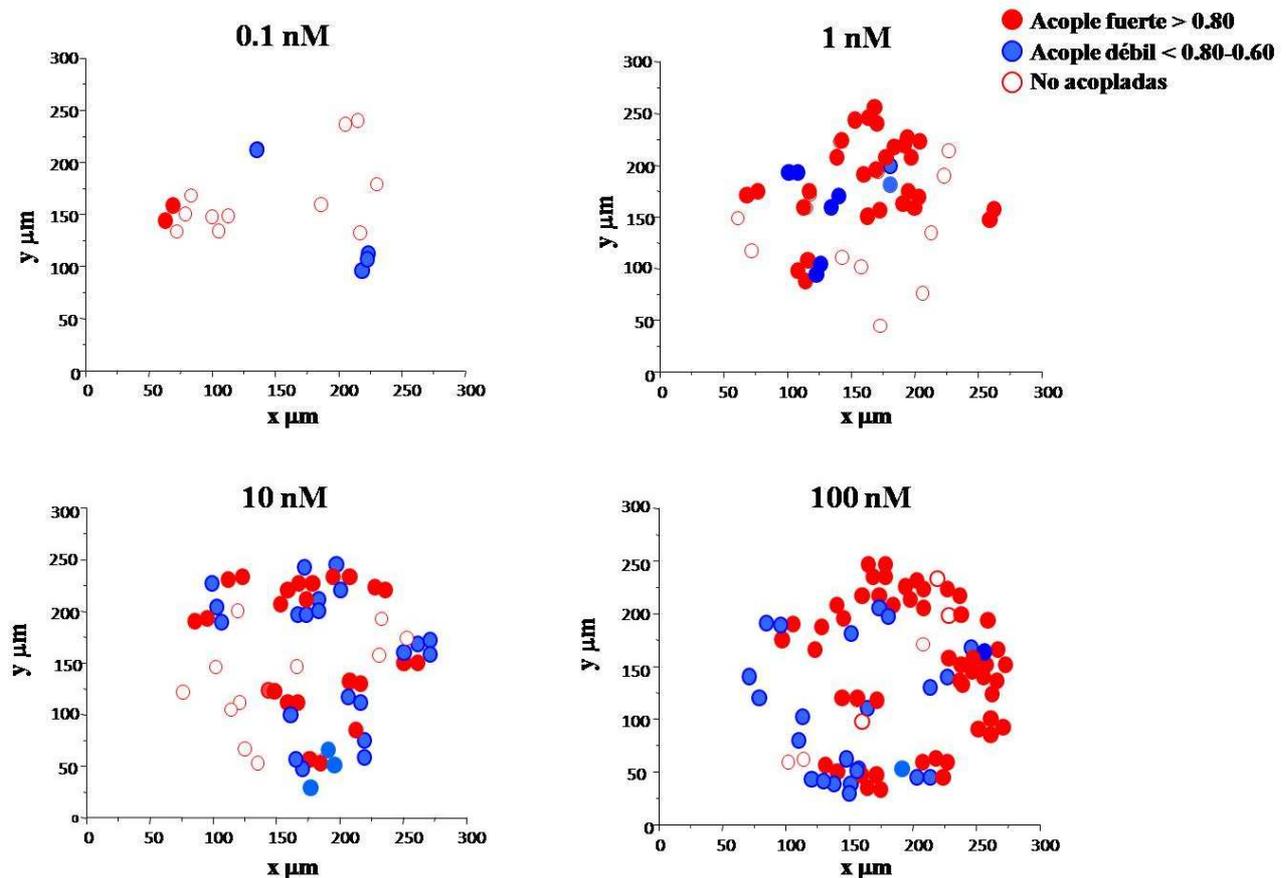


Figura 24. Distribución espacial de los tipos de respuestas acopladas de Ca^{2+} promovidas por dosis crecientes de la GnRH. Ejemplo de los mapas de un experimento que muestra la posición de las células que responden a dosis crecientes del secretagogo. Los círculos vacíos ilustran las células que responden con un patrón no acoplado, los círculos azules representan a las células que presentan un acople débil ($0.60 \leq R < 0.80$) y el rojo a las células con un acople fuerte ($R \geq 0.80$).

no se ha reportado el acople de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los gonadotropos, se sabe que estas células expresan uniones comunicantes (gap junctions) (Yamamoto y cols., 1996) las cuales son funcionales a decir de experimentos hechos con difusión de colorantes que permean a través de las uniones comunicantes (Morand y cols., 1996). Para saber si una proporción importante de las células que respondieron de forma acoplada a la GnRH lo estaban previamente de forma espontánea, de tal forma que el acople en respuesta a la GnRH fuese, al menos en algunos casos, una continuidad del acople de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} , hicimos un análisis del acople de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} de los pares de células que responden de forma acoplada a la GnRH. La figura 25 muestra un ejemplo de cada uno de los cuatro tipos de dinámicas espontáneas de Ca^{2+} encontradas en los pares de células analizados, los resultados obtenidos muestran que previamente al acople promovido por la GnRH las células pueden encontrarse: silentes, es decir carentes de actividad de Ca^{2+} de forma espontánea, una célula silente y otra célula activa de forma espontánea, ambas células con oscilaciones de Ca^{2+} no acopladas y finalmente ambas células activas y acopladas espontáneamente. Como muestra la gráfica de pastel al pie de la figura 25, el 62% de los pares analizados son silentes, el 14% de los pares de células presentan una célula con oscilaciones espontáneas de la Ca^{2+} , solamente el 2.7% de los pares de células tienen actividad espontánea de Ca^{2+} no acoplada, y, de manera interesante, un 22% de los pares de células muestran oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} con una dinámica acoplada previa a la aplicación de la GnRH. Por un lado estos resultados muestran que al menos una parte de las células que responde de manera acoplada a la GnRH lo estaba previamente y, por otro lado nuestro análisis previó mostró que las células que responden de forma acoplada a la GnRH se encuentran visualmente contiguas. Estos dos hechos aunados podrían sugerir que las uniones comunicantes pudieran estar involucradas en las respuestas acopladas de la $[Ca^{2+}]_i$ promovidas por la GnRH. El estudio de la participación de las uniones comunicantes en la respuesta acoplada ameritaba el uso de fármacos específicos que desacoplan funcionalmente a las uniones comunicantes.

Tipos de actividad espontánea en los pares de células acopladas por la GnRH

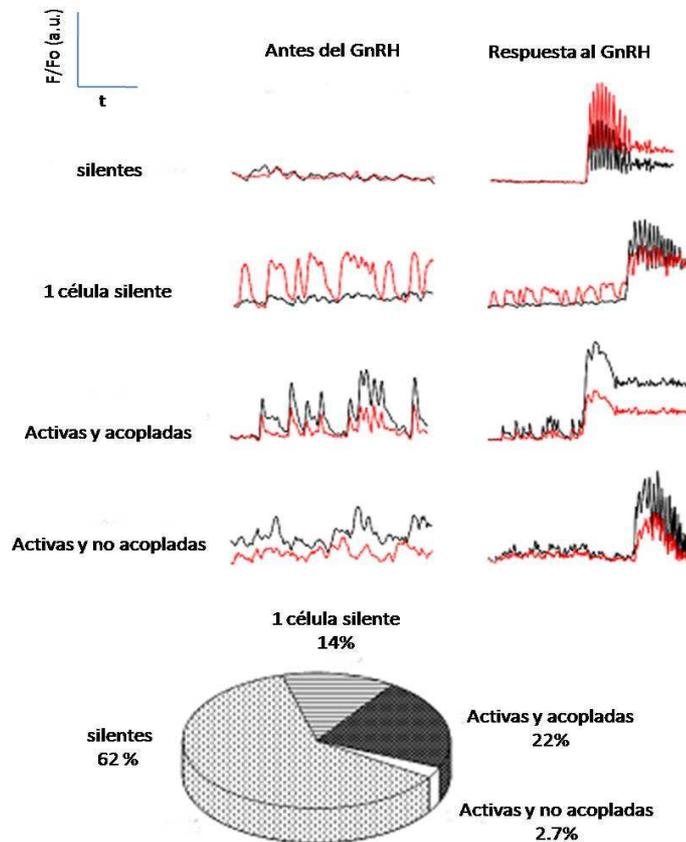


Figura 25. Tipos de oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} que presentan las células que responden de forma acoplada a la aplicación de dosis altas de la GnRH (10nM) y el porcentaje de cada tipo de patrón espontáneo.

Para realizar este estudio era indispensable primero llevar a cabo experimentos control que nos permitieran determinar si la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en un par de células se repetía con una segunda adición de la misma dosis del secretagogo. Tales experimentos nos permitirían evaluar el efecto de un determinado fármaco en la respuesta promovida por la GnRH en el mismo par de células.

Experimento control del acople de la respuestas de de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación de la misma dosis de la GnRH

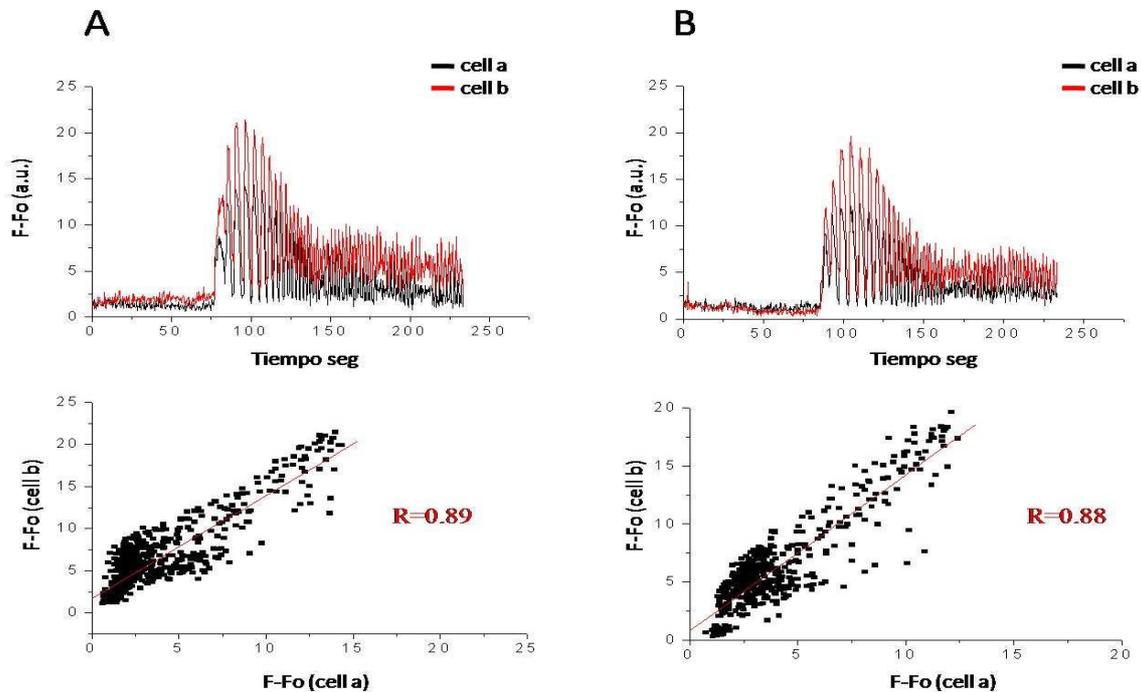


Figura 26. Ejemplo de un experimento control de la aplicación de dos veces la misma dosis de la GnRH en la rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH en el mismo par de células del panel A, mientras que la parte inferior del panel B ilustra el valor de R de esta segunda respuesta.

Los experimentos control consistieron en la aplicación repetida de la misma [GnRH] con un intervalo de 30 minutos entre dosis, la figura 26 ilustra un ejemplo de los resultados obtenidos en este tipo de experimentos. Como se muestra en la figura, a pesar de que hay una reducción en la amplitud de la segunda respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la GnRH con respecto a la primera a respuesta, la GnRH promueve respuestas con patrones de Ca^{2+} notablemente similares y con un valor de R prácticamente idéntico en ambos experimentos. Tales resultados permitieron la evaluación del efecto de fármacos específicos en la respuesta acoplada de Ca^{2+}

con el propósito de encontrar alguna evidencia del posible mecanismo responsable del acople en la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en pares de células.

Para evaluar la posible participación de las uniones comunicantes en la respuesta acoplada de Ca^{2+} generada por la GnRH en la rebanada de hipófisis utilizamos halotano un fármaco inespecífico desacoplante de las uniones comunicantes que ha sido utilizado previamente para modificar el acople de las oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células de la rebanada de hipófisis (Guérineau y cols., 1998). Los experimentos consistieron en la incubación de la rebanada de hipófisis con 1mM de halotano durante 5 minutos previamente a la segunda aplicación de 10 nM de la GnRH. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestran en la figura 27, en la cual se observa que la aplicación de halotano promueve una modificación drástica en la dinámica de la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH aunque no en el acople de la respuesta. La aplicación del halotano causó efectos secundarios en las señales de fluorescencia de algunos experimentos lo que nos llevó a pensar que este agente pudiera tener un efecto inespecífico a nivel de las membranas o de otras estructuras celulares. A continuación evaluamos el efecto del ácido 18- α glicirretínico (AGA), un fármaco que desacopla las conexinas de las uniones comunicantes. Este fármaco ha sido utilizado previamente para desacoplar uniones comunicantes presentes en hepatocitos de rata (Tordjmann y cols., 1997), células adrenales (Munari-Silem y cols., 1995), y recientemente en túbulos seminíferos in vitro (Gilleron y cols., 2009), entre otros tejidos. El protocolo experimental consistió en la incubación de 10-100 μM de AGA por periodos de 10-30 minutos después de la aplicación control de 10 nM de la GnRH. La figura 28 ilustra un ejemplo de los resultados obtenidos, en los cuales, se observa que, aunque el AGA promueve un cambio en la frecuencia de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, promovidas por la aplicación de la GnRH, este cambio en la dinámica no desacopla las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH.

Efecto de la aplicación de 1 mM de halotano en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

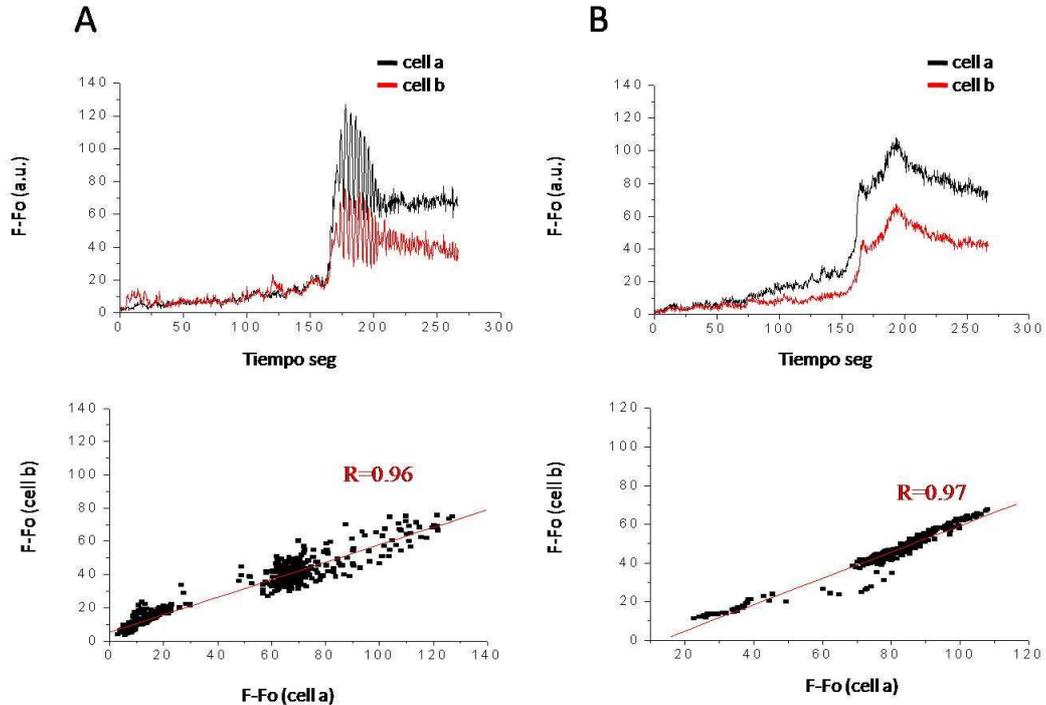


Figura 27. Análisis del efecto de 1mM de halotano en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de a rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH después de la incubación con halotano.

Los resultados obtenidos con los dos bloqueadores de uniones comunicantes se resumen en la figura 29 en la cual se muestra que el halotano promovió una disminución del valor promedio R de 0.91 ± 0.01 a 0.74 ± 0.08 ($n=14$). Para su evaluación se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney Rank Sum, debido a que la muestra no está distribuida normalmente, la prueba estadística mostró que la disminución no es estadísticamente significativa ($P = 0.077$). Por otro lado la aplicación del AGA ($n=16$) promovió una disminución del

valor de $R = 0.91 \pm 0.01$ (ES) en condiciones controles a $R = 0.88 \pm 0.02$ (ES) después del tratamiento con AGA. Sin embargo esta disminución del valor de R no es significativa ($p = 0.54$ t de Student).

Hasta este momento los resultados obtenidos sugieren que las uniones comunicantes no participan de manera importante en el mecanismo de acople de las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH. Estos resultados concuerdan con reportes anatómicos en los cuales se mostró que aunque los gonadotropos expresan algunas de las subunidades de las uniones comunicantes (Yamamoto y

Efecto del AGA en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

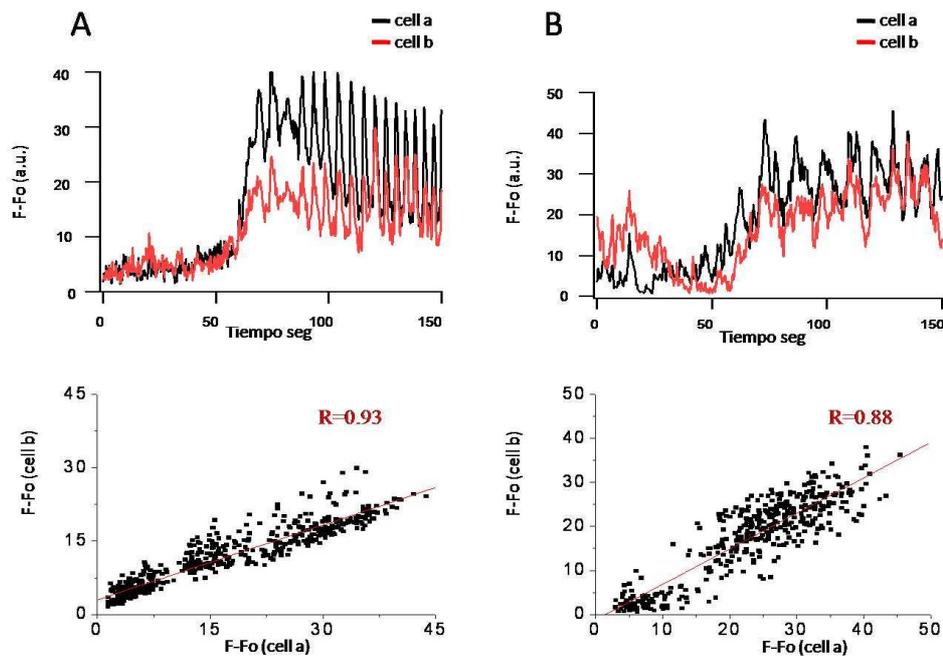


Figura 28. Análisis del efecto de $100 \mu\text{M}$ de AGA en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de a rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH después de la incubación con AGA.

Efecto de los bloqueadores de las uniones comunicantes en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

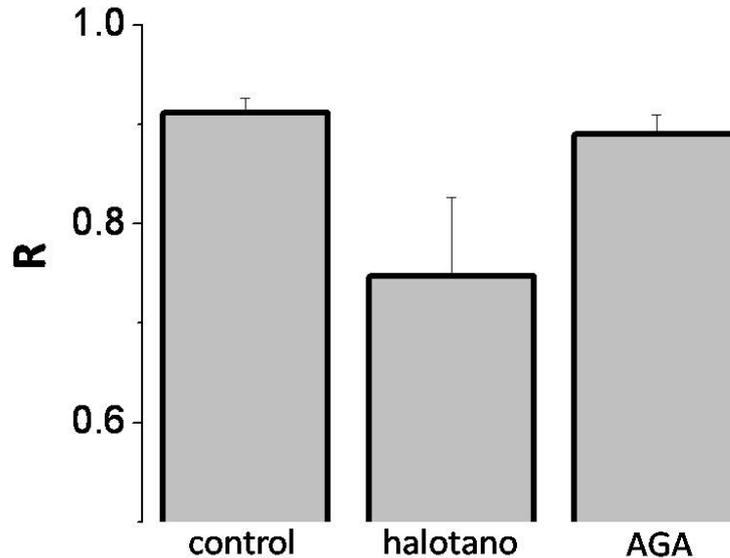


Figura 29. Resumen del efecto de los bloqueadores de uniones comunicantes en el coeficiente de correlación lineal de las respuestas acopladas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovidas por la GnRH en las células de la rebanada de hipófisis.

cols., 1993), estas no se encuentran extensivamente interconectadas (Soji y Herbert, 1989, Shirasawa y cols., 2004). Por lo tanto el papel que juegan las uniones comunicantes en las respuestas acopladas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deberá ser probado utilizando bloqueadores de las uniones comunicantes más específicos en trabajos futuros.

10. Evaluación de las comunicaciones parácrinas como probable mecanismo responsable de las respuestas fuertemente acopladas.

Además de las comunicación eléctrica o química a través de las uniones comunicantes, existe la posibilidad de que la liberación de alguno de los factores parácrinos presentes en la hipófisis pudieran estar participando en el acople de las las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH. Para evaluar esta posibilidad utilizamos dos protocolos, el primero consistió en la aplicación de colchicina, un fármaco que despolimeriza a los microtúbulos del citoesqueleto y el cual ha sido

empleado previamente para inhibir la secreción hormonal de los gonadotropos en cultivo primario (Khar y cols., 1979). El segundo protocolo consistió en la aplicación de 140 mM de KCl para despolarizar la membrana plasmática de las células y promover una secreción masiva de los gránulos de secreción hormonal. La aplicación la colchicina consistió en hasta 1 hora de incubación con el fármaco previamente a la segunda aplicación de la GnRH, un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 30. Como muestra el ejemplo de la figura 31 la incubación con la colchicina promueve un cambio en el patrón de $[Ca^{2+}]_i$ generado por la segunda aplicación de la GnRH con respecto a la primera aplicación. Sin embargo el acople promovido por la GnRH no parece verse afectado por este fármaco, el análisis estadístico generado en 14 pares de células muestra que la colchicina disminuyó el valor de R de 0.90 ± 0.01 (ES) en condiciones basales a 0.87 ± 0.02 (n= 14 pares de células) después de la aplicación de la colchicina, sin embargo el análisis estadístico muestra que esta diferencia no es significativa, (p= 0.29, t de Student).

Por otro lado, los experimentos con alto potasio consistieron en la aplicación de 140 mM de KCl durante 30 segundos, después de los cuales se lavó con medio Ringer la rebanada con el fin de permitir a las células retomar sus niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ y al mismo tiempo eliminando cualquier posible factor parácrino liberado durante la estimulación con el alto potasio. Un ejemplo de estos experimentos se muestra en la figura 31, los resultados promovidos con el alto potasio indican que el valor basal de R de 0.91 ± 0.01 (ES) disminuyó a $R=0.74 \pm 0.04$ (ES) (n= 19 pares de células). El análisis estadístico de estos datos muestra que la reducción del valor de correlación es significativa (p < 0.001, t de Student), lo cual sugiere la posible participación de un factor parácrino en las respuestas acopladas generadas por la GnRH en las células de la rebanada de hipófisis.

Uno de los factores parácrinos más estudiados en la adenohipófisis es el ATP, este factor se libera junto con las gonadotropinas, así como con otras hormonas en las vesículas de secreción, además se ha reportado que el ATP incrementa la entrada de calcio del medio extracelular, a través del receptor

Efecto de la colchicina en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

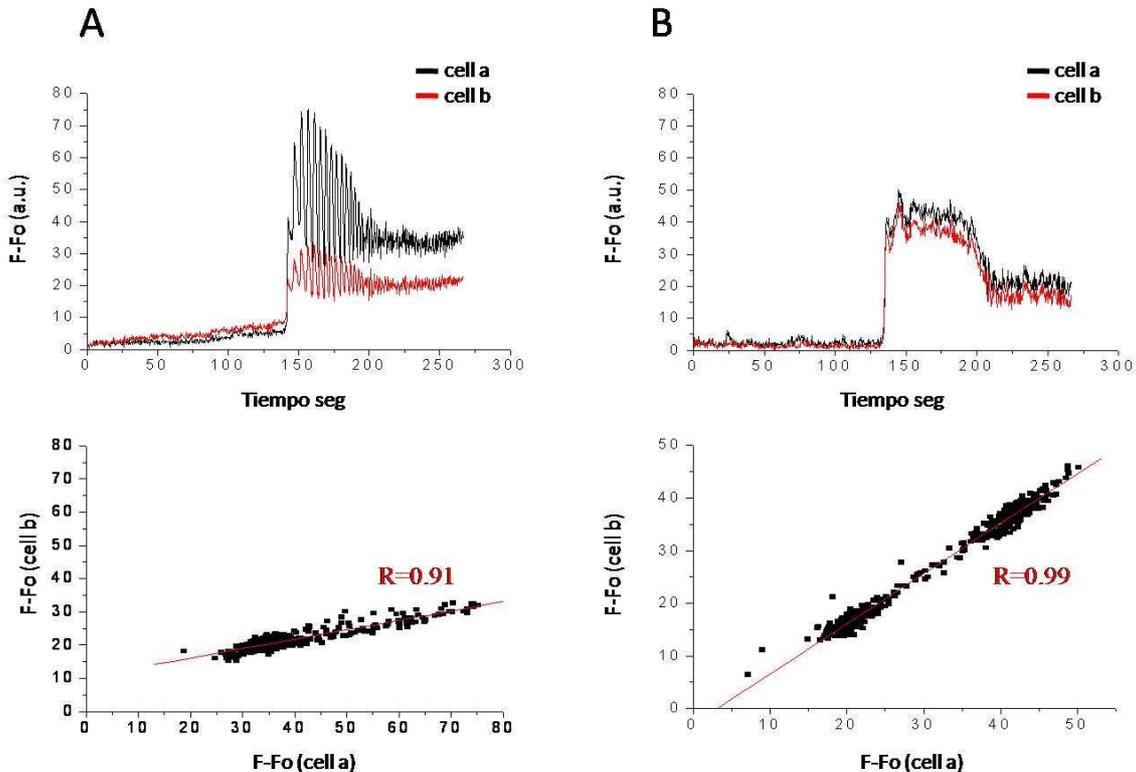


Figura 30. Análisis del efecto de colchicina en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por GnRH en las células de a rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH después de la incubación con colchicina.

ionotrópico purinérgico tipo P_2 , en los gonadotropos (Tómic y cols., 1996). Por otro lado se ha reportado la participación del ATP en las oscilaciones de Ca^{2+} acopladas entre las células β del páncreas (Hellman y cols., 2004). Dado lo anterior decidimos evaluar si la aplicación de un fármaco bloqueador de los canales purinérgicos podría disminuir el acople de Ca^{2+} generado por la GnRH, tales experimentos aunados al resultado del alto potasio podrían ayudarnos a explicar un posible mecanismo de acople generado por la GnRH.

Efecto del alto potasio en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

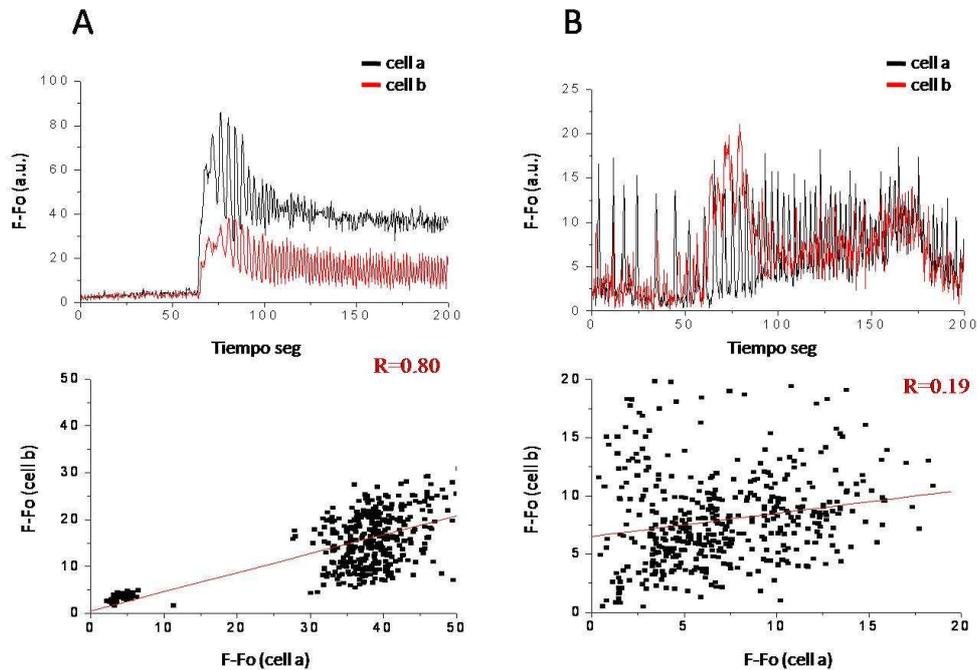


Figura 31. Análisis del efecto de la aplicación de 140 mM de KCl en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de a rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH después de la incubación con 140 mM de KCl.

Para explorar la posible participación del ATP como posible factor parácrino involucrado en las respuestas acopladas entre pares de células, utilizamos suramina, un antagonista del receptor tipo P2 sensible a ATP (Tomic y cols., 1996). Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 32. La aplicación de este fármaco disminuyó el valor del acople de $R= 0.91 \pm 0.01$ (ES) en condiciones control a $R= 0.86 \pm 0.01$ (ES) después del tratamiento con suramina, sin embargo, la reducción del acople no fue significativa ($P= 0.3385$). Los resultados anteriores sugieren que el ATP no participa en la respuesta acoplada de los gonadotropos promovida por su secretagogo.

La gráfica de barras de la figura 33 ilustra el resumen de los resultados

obtenidos de la aplicación de los diferentes fármacos en la respuesta acoplada de Ca^{2+} generada por la GnRH en las células en la rebanada.

Efecto de la suramina en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

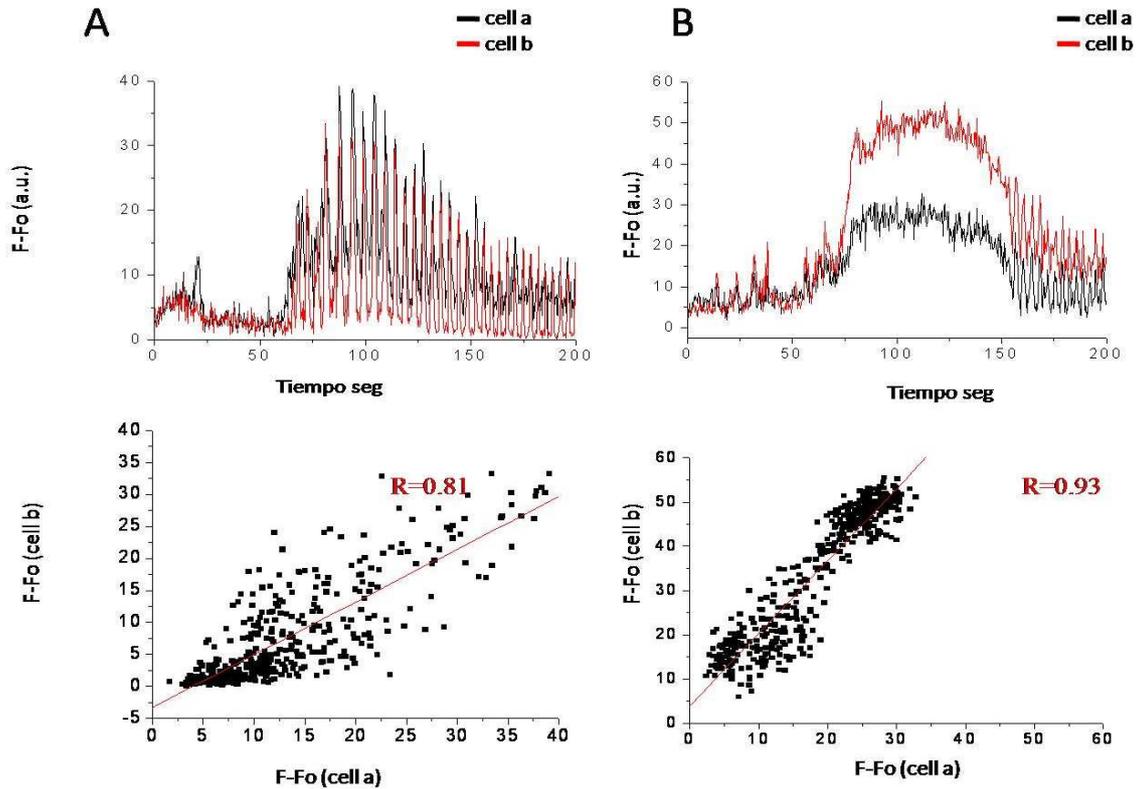


Figura 32. Análisis del efecto de la aplicación de suramina en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la GnRH en las células de a rebanada de hipófisis. El panel A muestra en la parte superior la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida en un par de células estimulada por la primera aplicación de la GnRH, la parte inferior del panel A muestra el valor de R obtenida durante la aplicación de la GnRH en estas células. El panel B en su parte superior muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovida por la segunda aplicación de la misma dosis de la GnRH después de la incubación con suramina.

Resumen de los fármacos aplicados en la respuesta acoplada de Ca^{2+} promovida por la GnRH

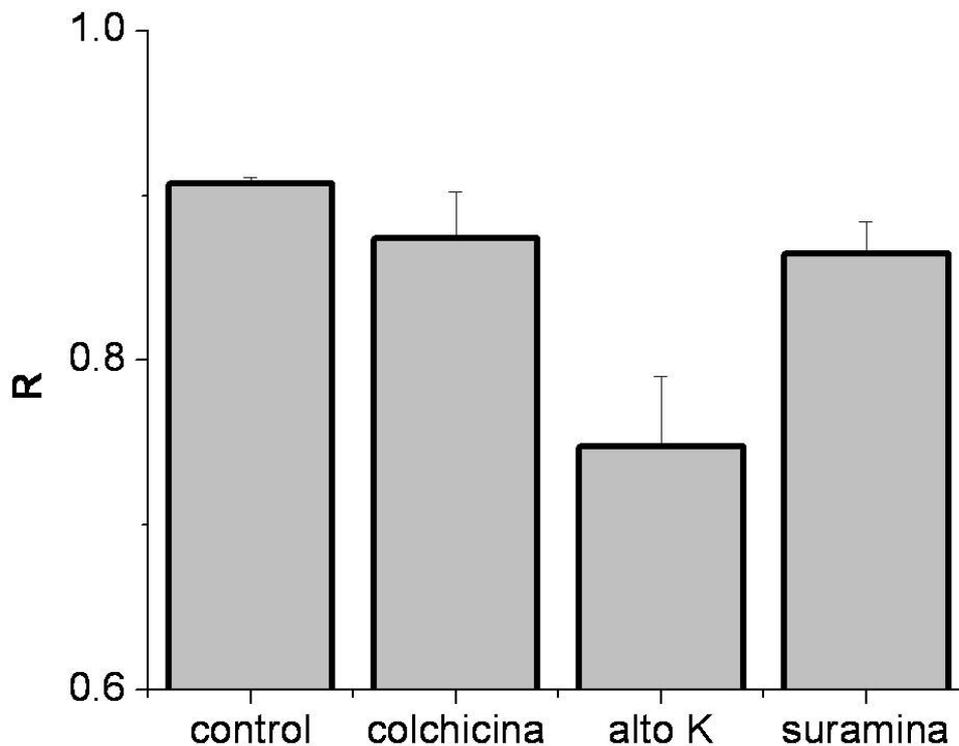


Figura 33. Resumen del efecto de fármacos en el coeficiente correlación lineal de las respuestas acopladas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovidas por la GnRH en las células de la rebanada de hipófisis.

VII. DISCUSIÓN

La GnRH induce respuestas de Ca^{2+} intracelular en las células de la rebanada de adenohipófisis.

Nuestros experimentos muestran que la aplicación de la hormona hipotalámica GnRH promueve respuestas de Ca^{2+} en las células adenohipofisiarias en la rebanada. Esta preparación hace posible el estudio de manera simultánea de la respuesta de decenas y hasta centenas de células, teniendo la ventaja además, de que la organización anatómica de las células en el

microambiente del tejido no ha sido perturbada. Las ventajas anteriormente mencionadas se pierden en las técnicas como el cultivo primario y las células disociadas, técnicas en las que hasta este momento se habían utilizado para el estudio y la caracterización de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ promovidas por la GnRH. Además nuestra preparación cuenta la resolución de señales adecuada para permitir el análisis de las respuestas a nivel de célula individual dentro de la rebanada.

El estudio de las respuestas de Ca^{2+} generadas por la GnRH en la rebanada es una opción que permitiría el abordaje del estudio de los gonadotropos en un preparación biológica más fisiológica para trabajos futuros en ratones transgénicos. De hecho, recientemente se reportó la expresión de un ratón transgénico en el cual acoplaron la proteína YFP con el receptor de la GnRH (Wen y cols., 2008). Nosotros creemos que nuestra preparación sería una excelente opción para abordar el estudio fisiológico en ese modelo.

En la rebanada la GnRH promueve cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ con diferentes dinámicas. Este estudio está hecho en macho, sin embargo, experimentos preliminares (ver perspectivas) mostraron que el estudio de las respuestas promovidas por la GnRH en animales en diferentes condiciones fisiológicas podrían aportar valiosa información con respecto a la diferente regulación de las respuestas evocadas por el secretagogo. Por ejemplo, se sabe que las ratas hembras (particularmente durante el proestro), presentan un aumento de hasta 4 veces en la secreción de la hormona LH con respecto al macho, (Loughlin y cols., 1984, Krieg y cols., 1990), por lo que este trabajo en macho podría servir como un parámetro de comparación de las posibles variaciones encontradas en animales en condiciones fisiológicas diferentes.

La distribución espacial de las células que responden con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la aplicación de diferentes dosis de la GnRH.

Otra ventaja de estudiar a la adenohipófisis en la rebanada es la posibilidad de estudiar a las células que responden a la aplicación de la GnRH en su posición original en la glándula y su localización con respecto a otras células estimuladas.

Nuestros experimentos permiten visualizar por primera vez la respuesta espacial de Ca^{2+} generada por la GnRH en un segmento de la adenohipófisis. La generación de mapas con la ubicación en las coordenadas x,y de cada célula en la rebanada nos permitió contar con una manera de expresar la distribución de las células que responden a la aplicación de dosis crecientes de la GnRH en la rebanada de hipófisis. Nuestros resultados indican que, independientemente de la dosis aplicada de la GnRH, las células que responden al secretagogo se distribuyen de manera homogénea en el campo de registro. Tales resultados difieren a lo reportado previamente por estudios en los cuales, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, se reportó que los gonadotropos en tejido fijado tienden a agruparse en una zona denominada “zona del sexo” la cual se encuentra cerca del ala posterolateral de la glándula (Dada y cols., 1984, Shirasawa y cols., 2004). Además, otros estudios de la distribución anatómica de los gonadotropos en la rata macho, también en tejido fijado reportan una distribución dorso-ventral de los gonadotropos en la glándula y mencionan que la distribución de los gonadotropos puede ser uniforme ó periférica en algunas zonas de la glándula. Las discrepancias encontradas en nuestros resultados con respecto a los reportes previos deben radicar principalmente en el hecho de que nuestros cortes de la glándula fueron aleatorios por lo que no tenemos una referencia para comparar con las zonas reportadas en el tejido fijado. Por otro lado es probable que las diferencias en el grosor de los cortes de ambas preparaciones (los cortes fijados de la glándula tienen un grosor de 7 μM , mientras que la rebanada es de 150 μM de grosor) altere de manera importante nuestra visualización de los gonadotropos. Además, trabajos previos en gonadotropos aislados mostraron que la respuesta de Ca^{2+} no está necesariamente ligada a la secreción hormonal (Leong, Thorner, 1991), de hecho aproximadamente el 50% de la población de los gonadotropos en los cuales se marcó el receptor de la GnRH con la proteína YFP (Wen cols., 2008) no secretan gonadotropinas en respuesta al secretagogo. Lo cual hace probable que las células que nosotros estamos identificando en este trabajo sea un porcentaje parcial de los gonadotropos identificados en trabajos previos con técnicas de inmunohistoquímica para las hormonas de secreción. Determinar el

porcentaje de células que responden con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ que a su vez contengan la hormona LH y/o la hormona FSH requerirá experimentos adicionales.

Reclutamiento de las células en la rebanada de hipófisis que responden con un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en función de la concentración de la GnRH.

Los mapas obtenidos utilizando objetivos de bajo (10x) y alto aumento (20x) coincidieron en mostrar que el número de células en la rebanada se incrementan conforme se adiciona una mayor concentración de la GnRH. El ajuste de la curva dosis-respuesta de siete experimentos independientes reporta una Dosis efectiva 50 (DE_{50}) de 0.56 nM. Este valor es similar al dato de DE_{50} obtenido en estudios de la medición de la producción de inositol trifosfato en la línea de células COS-7 que expresa el receptor de la GnRH de rata $DE_{50} = 1.5 \pm 0.48$ nM (Leaños-Miranda y cols., 2006), y es similar a la DE_{50} calculada en cultivos primarios de gonadotropos aislados de rata hembra ovariectomizada (Apfelbaum, 1992), así como del número de células que secretan la hormona LH en cultivo primario de gonadotropos de ratas en metaestro $DE_{50} \sim 0.8$ nM (Leong y Thorner, 1991). Por otro lado, la comparación de las DE_{50} obtenidas del ajuste de las curvas dosis-respuesta de hipófisis distintas, resulta en dos tipos de comportamientos: algunas rebanadas con alta afinidad a la GnRH (promedio de $DE_{50} = 0.39$ nM) y un grupo de baja afinidad (promedio $DE_{50} = 2.35$ nM). Sin embargo, aunque los datos anteriores muestran una diferencia de sensibilidad de seis veces entre ambos grupos, el hecho de que el segundo grupo se presentó únicamente en dos animales hace difícil concluir si esta diferencia pudiera deberse a variaciones inter-especie como la capacidad reproductiva de cada animal, o el tamaño del individuo.

La GnRH promueve secuencias canónicas y no canónicas de las respuestas de Ca^{2+} en las células adenohipofisarias en la rebanada a dosis crecientes del secretagogo.

Como observamos en los resultados de este trabajo es posible identificar, en respuesta a la aplicación de la GnRH, los patrones de Ca^{2+} oscilatorio, bifásico-oscilatorio (mixto) y bifásico no oscilatorio antes reportados en gonadotropos

aislados en cultivos primarios o disociados. Sin embargo, estos trabajos previos reportaron una secuencia dinámica de los patrones de respuesta, los cuales se modifican según el aumento en la dosis del secretagogo. Esta secuencia canónica es manifestada solamente por un 20% de las células de la rebanada que son estimuladas por dosis crecientes de la GnRH. Por otro lado, las células que responden con un patrón no canónico corresponden al 55% del total de las células que responden a la GnRH. El razonamiento que pudiese explicar estas discrepancias no es simple, sobre todo si tomamos en cuenta que se ha reportado que la transición de un patrón a otro patrón de respuesta de Ca^{2+} promovido por la GnRH es determinado por la cantidad de calcio liberado por las diferentes dosis del secretagogo y la manera en que las células regula estos cambios con sus mecanismos de homeóstasis. Una posibilidad es que los factores parácrinos (Schwartz y Cherny, 1992) secretados por las células del mismo o de otro tipo celular que se encuentran en la vecindad de las células en la rebanada pudieran tener un efecto directo en el patrón de respuesta de Ca^{2+} intracelular, modificando el patrón canónico. De igual manera se sabe de la existencia de ondas de Ca^{2+} que viajan a través de las células foliculoestrelladas (FS), lo que podría tener una participación en la respuestas de Ca^{2+} promovida por la GnRH. Además se sabe que las células FS liberan folistatina y activina, dos factores que podrían tener una participación local en la integración de la respuesta de Ca^{2+} intracelular promovida por la GnRH (Fauquier y cols., 2002, Winters y Moore, 2004, Mabuchi y cols., 2004). Finalmente, de manera interesante, el 30% de las células en la rebanada despliegan respuestas que carecen de oscilaciones (respuestas no oscilatorias) independientemente de la dosis aplicada. Este tipo de respuestas ha sido reportada en gonadotropos en cultivo de animales inmaduros (Zemkova y Vanecek, 2000) y en una línea celular de gonadotropos (Merelli y cols., 1992). Además, existe la posibilidad de que las células con respuesta atípicas no sean gonadotropos, sino que podrían corresponder a la población de células multifuncionales reportadas en otros trabajos, se trata de células que a pesar que expresan el receptor de la GnRH, no contienen las hormonas gonadotropinas en su interior, si no que contienen gránulos de secreción de otras hormonas. Por

ejemplo se han reportado los somato-gonadotropos, los cuales de manera interesante cambian de proporción según el estadio fisiológico del animal (Childs, 1997) y los cuales responden muy poco a la GnRH (Villalobos y cols., 2004).

La mayoría de las células vuelven a responder a dosis intermedias de la GnRH.

Tomando en cuenta reportes previos (Iida y cols., 1991, Leong y Thorner, 1991, Tomic y cols., 1994) sería razonable esperar que las células que responden a bajas dosis de la GnRH continúen respondiendo a la aplicación subsiguiente de dosis mayores del secretagogo. Sin embargo, como muestra la figura 15, no siempre sucede de esta manera. Aunque un 62% de las células que responden a la aplicación de 0.1nM de la GnRH también responden a 1, 10 y 100 nM de la GnRH, la mayoría de las células restantes responde exclusivamente a 0.1nM. Una posible explicación es que se trate de gonadotropos inmaduros o que sea un tipo de célula multifuncional con una sensibilidad completamente diferente al secretagogo. Por otro lado, tampoco podemos descartar la posibilidad de que exista una población de células con una menor capacidad de generar segundos mensajeros o Ca^{2+} intracelular, los podrían agotarse desde estímulos bajos de la GnRH. Otra posible explicación es que exista una subpoblación de células que no carezcan de desensibilización del receptor, lo cual explicaría porque algunas células no respondan a las dosis subsiguientes del secretagogo. El punto antes mencionado es muy interesante porque este sería el primer reporte de un mecanismo de desensibilización del receptor a GnRH en el ratón, por lo que no podemos descartar que en nuestra preparación, al preservar el tejido, se mantenga algún componente biológico de la célula que se pierde en el cultivo primario, preparación en la cual se ha estudiado la carencia de desensibilización en los gonadotropos. Lo anterior apuntaría entonces a que los estudios en rebanada podrían aportar información funcional a nivel celular que harían importante hacer una reevaluación de los mecanismos de transducción de señales promovidos por la GnRH para saber si estos son los mismos que los reportado previamente en células disociadas o en cultivo primario.

En contraste, prácticamente el 100% de las células que respondieron a 1nM de la GnRH también responden 10 y 100 nM de la GnRH. Esta información por otro lado se contrapone con la posibilidad de la presencia de un mecanismo de desensibilización del receptor a la GnRH en nuestros experimentos. Estos resultados coinciden con observaciones previas en las cuales se reporta que un intervalo de 30 minutos entre las aplicaciones de la GnRH es suficiente para abolir una posible desensibilización del receptor (Loughlin y cols., 1981). Aunque, como se mencionó en la introducción, el receptor para la GnRH del ratón carece de desensibilización rápida (Davidson y cols., 1994).

Las células responden con patrones de Ca^{2+} estables por largos periodos de tiempo.

Experimentos previos en células de adenohipófisis de rata macho han mostrado que la GnRH induce picos de secreción de la hormona LH pequeños y estables después de aplicaciones repetitivas del secretagogo entre intervalos de una hasta nueve horas (Loughlin y cols., 1984). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los trabajos hechos en gonadotropos en cultivo muestran que el patrón de respuesta de Ca^{2+} cambia con la dosis de la GnRH aplicada. De manera interesante, cuando aplicamos la misma dosis de la GnRH de forma repetida (con intervalos de 30 minutos entre aplicaciones) hasta por 4 veces, las células responden con un patrón característico y prácticamente idéntico. El fenómeno de que células individuales dentro de la rebanada puedan responder a la aplicación repetida de un agonista de forma tan similar tanto en latencia como en el patrón de oscilación y duración ha sido denominado “firma” y ha sido reportado en gonadotropos en cultivo. Este fenómeno llamado “huella digital de Ca^{2+} ” fue descrito por primera vez por Prentki y colaboradores (Prentki y cols., 1998, Thomas y cols., 1996) quienes lo observaron en células de insulinoma.

El análisis y comparación de las respuestas de células individuales se muestra en la figura 19, en la cual se observa el cálculo del valor de la integral de la señal de Ca^{2+} para fines de la cuantificación en la similitud de las respuestas. Cabe mencionar que la medición de la integral de la respuesta de Ca^{2+} ha sido

utilizada en trabajos previos como una correlación de la cantidad de hormona secretada más que con la amplitud u oscilaciones de la respuesta de Ca^{2+} en los gonadotropos (Tóth y cols., 2006). Nuestros resultados muestran que los incrementos promedio producidos por un estímulo de la GnRH se mantienen estables con subsiguientes estimulaciones del secretagogo a pesar del paso del tiempo (cerca de 2 horas) ($p= 0.21$, ANOVA de una vía). El hecho de que las respuestas de Ca^{2+} sean robustas y se mantengan estables por periodos de tiempo considerables contradice nuestro supuesto de que los patrones no canónicos pudieran deberse a posibles factores parácrinos que modifiquen las respuestas de los patrones canónicos. Sin embargo, aunque no tenemos una explicación para este fenómeno es posible que la regularidad de las respuestas a la GnRH a través de largos periodos de tiempo refleje un mecanismo de regulación fino a nivel de células individuales, que podría traducirse en el hecho de un mismo estímulo promueva una cantidad idéntica de secreción de las hormonas gonadotrópicas.

Respuestas coordinadas de Ca^{2+} en grupos de células en la rebanada.

El hecho de que nuestra preparación mantenga la distribución nativa de las células en el tejido nos permitió observar por primera vez la presencia de grupos de células dentro de la rebanada que responden de manera sincronizada a la aplicación de la GnRH. Nuestros resultados concuerdan con estudios histológicos en los cuales utilizando técnicas de microscopía se ha reportado que las células adenohipofisarias no se encuentran dispersas sino que forman estructuras en forma de racimos de uvas, las cuales se encuentran delineadas por prolongaciones citoplásmicas provenientes de células foliculoestrelladas, las cuales poseen uniones comunicantes entre sí y forman redes que comunican a las células secretoras (Mabuchi y cols., 2004, Shirasawa y cols., 2004). Específicamente algunos estudios han reportado que algunos gonadotropos forman grupos o cúmulos (Shirasawa y cols., 2004, D'Este y cols., 2005) especialmente cerca de zonas donde se encuentran capilares del sistema vascular portahipofisario (D'Este y cols., 2005). La presencia de arreglos de grupos o

cúmulos de gonadotropos coinciden con nuestras observaciones. Estos arreglos podrían estar relacionados con la distribución de la llegada de la GnRH y otros factores hipotalámicos a través de la microcirculación del sistema porta-hipofisiario. Aunque en este trabajo no nos fue posible ratificar la identidad de los gonadotropos para confirmar nuestras observaciones, es evidente que a relativa alta magnificación las células que responden a la GnRH forman grupos o cadenas. De forma interesante como lo muestra la figura 19 estos grupos se manifiestan organizados también funcionalmente según el tipo de patrón que despliegan en respuesta a la aplicación de la GnRH y es evidente que esta organización se hace mas evidente conforma aumenta la concentración del secretagogo. Asimismo, se ha reportado que las células pancreáticas dentro de los islotes de Langerhans también despliegan oscilaciones de Ca^{2+} de forma sincrónica (Nunemaker y cols., 2005, Jonas y cols., 1998, Ravier y cols., 2005) debido a un acople eléctrico.

Las uniones comunicantes como mecanismo de acople de las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH.

La aplicación de la GnRH promueve la sincronización de las respuesta de Ca^{2+} entre dos células que se encuentran aparentemente contiguas que se encontraban desacopladas de forma basal, este fenómeno no parece explicarse por la llegada del secretagogo al mismo tiempo ya que en nuestros experimentos las células de una misma rebanada tienen un rango de respuesta que difiere por 28 segundos con una latencia media de 53.3 segundos y con una desviación estándar de 4.5 segundos.

La cuantificación del grado de acople de las respuestas, medida como el valor del coeficiente de correlación lineal (ver figura 23), se da de forma preferente entre pares de células que se encuentran contiguas, y cuando se obtuvo el valor de R en respuesta a la aplicación de la GnRH entre pares de células alejadas, este valor permaneció bajo. Ya que los valores relativamente altos de R de la respuesta promovida por la GnRH se relaciona con la cercanía de las células en la rebanada, y dado que cerca del 25% de las células se encontraban acopladas de manera espontánea (figura 25), nuestra primera hipótesis fue que las respuestas

de Ca^{2+} pudieran acoplarse a través de uniones comunicantes, la cuales se ha visto acoplan las oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los somatotropos en la rebanada de adenohipófisis (Gúerineau y cols., 1998). Se sabe que las uniones comunicantes permiten el libre intercambio de moléculas citoplasmáticas de hasta 1,000 Daltones de tamaño y a través de ellos pueden pasar moléculas o iones incluyendo segundos mensajeros como el Ca^{2+} y el IP3, dando una continuidad citoplasmática entre las células que las comparten (Spray y Bennet, 1985). Además el uso de anticuerpos específicos para uniones comunicantes ha demostrado que los gonadotropos poseen uniones comunicantes del tipo Cx 43 (Morand y cols., 1996, Yamamoto y cols., 1993) este tipo de conexina también se ha reportado que participa en el acople de otras células secretoras como las células de Leydig en el testículo, las células corticales adrenales, las células de la tiroides, y las células pancreáticas, entre otras (Serre-Beinier y cols., 2002).

El halotano es un anestésico volátil que ha sido usado previamente para desacoplar uniones comunicantes de células cardíacas (Burt y Spray, 1989) y que hasta ahora es el único agente que se ha reportado como desacoplante eficaz de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células adenohipofisarias en la rebanada (Guerineau y cols., 1998). En nuestro trabajo, este anestésico promovió una reducción en el acople de las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH, sin embargo, el desacople no fue estadísticamente significativo. Además, cabe mencionar que algunas de las respuestas en la que se pudo visualizar el desacople estaban evidentemente deterioradas. Estas observaciones podrían ser el resultado de posibles efectos secundarios del halotano en las células, ya que sea reportado que el uso de anestésicos tales como el halotano y el isoflurano promueven efectos inhibitorios en canales de Ca_V y K_V dependientes en cardiomiocitos atriales de humano (Hüneke y cols., 2001) además, experimentos electrofisiológicos usando la técnica de patch clamp, mostraron que el uso de anestésicos volátiles inhibe la corriente de calcio tipo T en neuronas y en células neuroendocrinas. (McDowwel y cols., 1999). La inespecificidad del halotano nos llevó a utilizar AGA, un bloqueador específico desacoplante de las conexinas en las uniones comunicantes. Sin embargo, a pesar de que el AGA promueve una

reducción en el valor de R con respecto al control, esta reducción no fue estadísticamente significativa. Estos resultados coinciden con reportes anatómicos en el cual muestran que aunque los gonadotropos expresan las subunidades de las conexinas 43 (Yamamoto y cols., 1993), estas no se encuentran interconectadas ampliamente (Soji y Herbert, 1989, Shirasawa y cols., 2004). Además otros trabajos han reportando que las conexinas se encuentran alrededor de los gonadotropos pero no entre ellos (Shirasawa y cols., 2004). Por otro lado se ha observado que a la misma concentración usada en este trabajo el AGA no desacopla las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} entre pares de somatotropos en el ratón transgénico GH-GFP (Sánchez-Cárdenas y Mollard, observaciones no publicadas). El papel de las uniones comunicantes en las respuestas acopladas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH necesitará ser evaluada en un futuro con el uso de bloqueadores de uniones comunicantes más específicos. Sin embargo dado los resultados obtenidos en este trabajo las uniones comunicantes no parecen tener un papel protagónico como mecanismo de acople entre las células que responden a la GnRH.

La liberación de un factor parácrino como mecanismo de acople de las respuestas de Ca^{2+} promovidas por la GnRH.

Dado que nuestros resultados sugieren que las uniones comunicantes no participan en la respuesta de Ca^{2+} inducida por la GnRH entre pares de células adyacentes, una posibilidad que podría explicar el acople entre células contiguas podría ser la liberación local de un factor parácrino. El uso de fármacos los cuales se sabe modifican al citoesqueleto de las células inhibiendo su secreción hormonal como es el caso de la colchicina, la cual despolimeriza a los microtúbulos del citoesqueleto y ha sido previamente utilizada para inhibir la secreción hormonal de los gonadotropos en cultivo primario (Khar y cols., 1979), no disminuyó la respuesta acoplada generada por la GnRH en nuestro trabajo. De manera similar el uso de otros desacoplantes del citoesqueleto tales como vincristina y citocalasina los cuales también han sido utilizados para inhibir la secreción hormonal de las células de la adenohipófisis (Khar y cols., 1979) no disminuyeron

el acople de la respuesta de Ca^{2+} inducida por la GnRH. Estos compuestos además parecen tener un efecto tóxico en las células en algunos experimentos haciendo imposible la evaluación de algunos datos. Por tal razón decidimos utilizar otra estrategia que pudiera ser menos agresiva y con la cual fuera posible alterar la secreción de un posible factor parácrino. La aplicación de una concentración despolarizante del potencial de membrana de KCl 140 mM (alto K) promovería la secreción masiva de las vesículas listas para ser liberadas previamente a la segunda aplicación de la GnRH. De manera interesante si bien este protocolo modifica de manera importante la respuestas de Ca^{2+} evocada por la GnRH, también disminuye de forma significativa el acople de la respuesta entre pares células promovida por el secretagogo. Las observaciones anteriores podrían sugerir la presencia de algún factor parácrino co-liberado con las vesículas de secreción del mismo tipo celular o de algún otro tipo de célula. Sin embargo, cuando evaluamos la participación del ATP como un posible factor parácrino involucrado en las respuestas de Ca^{2+} acopladas por la GnRH utilizando suramina, un antagonista del receptor tipo P2 sensible a ATP (Tomic y cols., 1996) los resultados no muestra una disminución significativa del acople del las respuestas promovida por la GnRH. Los resultados anteriores sugieren la posible participación de un factor parácrino liberado en las respuestas acopladas por la GnRH, sin embargo, la evaluación de las decenas de factores parácrinos que han sido reportados por tener un efecto en la secreción de los gonadotropos (Denef, 2008) hace impráctico tal estudio.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el posible mecanismo responsable del acople de las respuestas este mediado probablemente por un factor parácrino más que a través de la participación de las uniones comunicantes. La identidad del posible factor parácrino involucrado en las respuestas acopladas requerirá de exhaustivos estudios que permitan su identificación plena.

Por otro lado tampoco podemos descartar la posibilidad de que las células contiguas no estén realmente en contacto sino que podría estar presente algún otro tipo celular que esté en contacto con las dos células acopladas. Un ejemplo

de esto podría ser las células FS, las cuales se sabe poseen prolongaciones citoplásmicas y son capaces de propagar señales de Ca^{2+} dentro de la adenohipófisis (Fauquier y cols., 2002), por lo que las células FS podrían estar involucradas en la respuesta de Ca^{2+} acoplada promovida por un par de células que se observen como contiguas.

Una hipótesis alternativa de la respuesta acoplada.

Dada la amplia complejidad de los tipos celulares y factores secretados, así como los mecanismos de comunicación intercelular presentes en la adenohipófisis es difícil imaginar que un sólo mecanismo sea el responsable de la respuesta acoplada de Ca^{2+} en las células de la adenohipófisis. Por tal razón en este trabajo quisimos proponer una explicación alternativa que permitiría que la actividad de dos células se sincronice en respuesta al secretagogo. Existe la posibilidad de que no se trate de una sincronización real, es decir podría solamente parecerlo (pseudo-sincronización), de tal forma que si ambas células vecinas dentro del mismo grupo derivan de la otra o tengan una célula precursor común, entonces estas células podrían contener información genética idéntica. De tal manera que su fenotipo podría ser muy similar, así como su respuesta a la GnRH en este caso.

VIII. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Finalmente se llevaron a cabo experimentos preliminares encaminados a estudiar la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en animales de diferente sexo y con alteraciones de la función reproductiva. Los resultados de la cuantificación del número de células que responden a las diferentes dosis de la GnRH en las diferentes condiciones fisiológicas se muestran en la gráfica de barras de la figura 34.

La gráfica ilustra el número de células que respondió a la aplicación de las dosis 0.1, 1, 10 y 100 nM de la GnRH en ratones hembra en los diferentes estadios del ciclo estral (diestro, estro y proestro), así como en ratones hembra ovariectomizadas, comparados con los resultados obtenidos en el ratón macho. Los resultados muestran diferencias importantes tanto en el número de células como en la sensibilidad a las diferentes dosis del secretagogo, parámetros que varían de manera importante aparentemente según el requerimiento fisiológico del animal. De manera interesante, mientras que en el macho el número de células aumenta con la dosis del secretagogo, en el caso de los ratones hembra en diestro y estro la saturación de la respuesta se alcanza a dosis menores, aunque el número de células que responde es mayor a dosis bajas y menor a dosis altas del secretagogo con respecto al macho. Por otro lado, en el caso del ratón hembra en el proestro (el cual es un estadio interesante ya que en esta etapa del ciclo estral se presenta el pico de secreción de la hormona LH en los gonadotropos), el número de células que responde aumenta significativamente desde dosis bajas de la GnRH con respecto al macho y alcanza una saturación de la respuesta a la dosis de 10 nM de la GnRH. Finalmente en el caso de las hembras ovariectomizadas y que por lo tanto carecen de los mecanismos de retroalimentación proveniente de los ovarios que regulan la secreción de la hormona LH, el número de células se dispara más que en otra condición fisiológica.

Si bien estos resultados son preliminares, son muy interesantes y abren la posibilidad de una serie de estudios futuros encaminados a evaluar no solamente el número de células que responden al secretagogo sino además conocer si los parámetros mostrados en animales macho, tales como los patrones de respuesta y los arreglos anatómicos y funcionales pudieran encontrarse modificados en las distintas condiciones fisiológicas del animal. Creemos que la preparación de la rebanada es un modelo ideal para este tipo de experimentos.

Gráfica que ilustra el número de células que responden a la aplicación de la GnRH evaluado en animales en distintas condiciones fisiológicas.

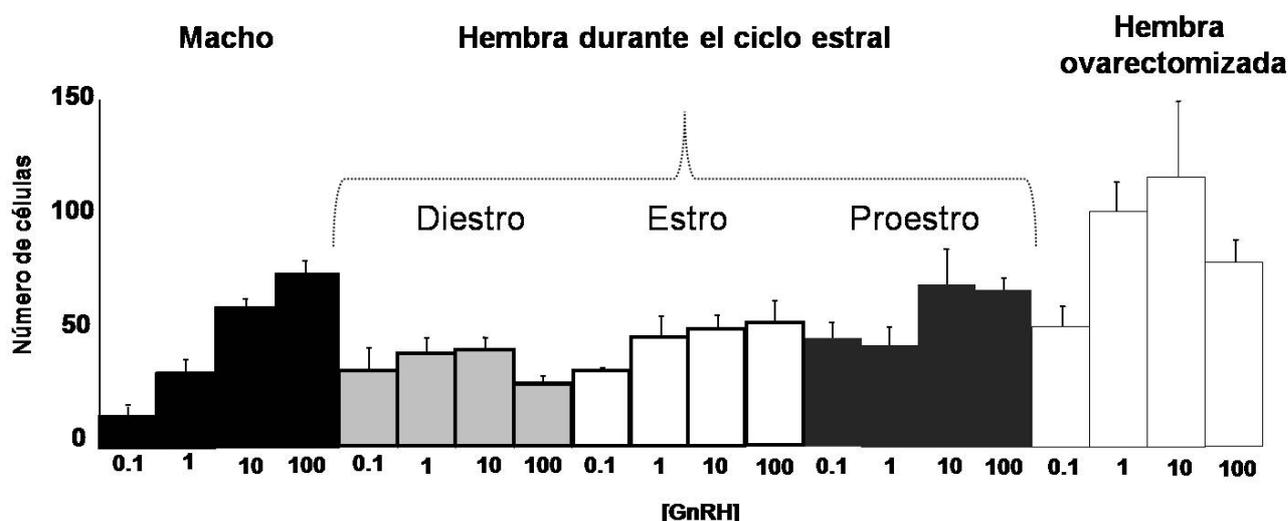


Figura 34. Resumen de la evaluación del número de células que responden a la aplicación del GnRH en distintas condiciones fisiológicas.

IX. CONCLUSIONES

Este trabajo muestra por primera vez la respuesta de Ca^{2+} promovida por la GnRH en las células de la rebanada de hipófisis. La DE_{50} de la respuesta se encuentra en un rango de concentración similar a lo reportado en trabajos anteriores en gonadotropos en cultivo primario. Solamente el 19% de las células en nuestro estudio responden a la aplicación de la GnRH con la secuencia canónica reportada para los gonadotropos en cultivo, mientras que el 54% de las células presentan una secuencia no-canónica y el 27% de las células presentan un patrón de respuesta atípico en respuesta a la GnRH. Nuestros resultados muestran que las células estimuladas por la GnRH no se encuentran restringidas a zonas específicas del tejido y estas células están arregladas anatómicamente en grupos organizados funcionalmente. La GnRH promueve respuestas de Ca^{2+} acopladas entre pares de células aparentemente contiguas y el mecanismo responsable parece estar relacionado con la liberación de un posible factor parácrino más que con un acople eléctrico mediado por uniones comunicantes, aunque la posibilidad de una pseudo-sincronización también se contempla en este trabajo. Experimentos preliminares abren una puerta a la exploración en animales en condiciones fisiológicas diferentes que podría aportar información relevante en la biología de la reproducción.

X. BIBLIOGRAFIA

Anderson L. 1996. Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod.* 1(3): 193-202.

Apfelbaum ME. 1992. Basal and gonadotrophin-releasing hormone-induced biosynthesis and release of luteinizing hormone: effect of calcium deprivation. *Mol Cell Endocrinol.* 89:111–120.

Berridge MJ. 1984. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 220(2):345-360.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman C. 2000 The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 1(1): 11-21.

Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW. 2004. Autocrine/ paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol.* 225 (1-2): 29-36.

Bonnefont X, Mollard P. 2003. Electrical activity in endocrine pituitary cells in situ: a support for a multiple-function coding. *FEBS Lett.* 548(1-3): 49-52.

Bonnefont X, Fiekers J, Creff A, Mollard P. 2000. Rhythmic bursts of calcium transients in acute anterior pituitary slices. *Endocrinology.* 141 (3): 868-875.

Burt JM, Spray DC. 1989. Volatil anesthetics block intercellular communication between neonatal rat myocardial cells. *Circ Res.* 65 (3): 829-835.

Castrique E, Fernandez-Fuente M, Le Tissier P, Herman A, Levy A. 2010. Use of prolactin-Cre/ROSA-YFP transgenic mouse provides no evidence for lactotroph transdifferentiation after weaning, or increase in lactotroph/somatotroph proportion in lactation. *J Endocrinol.* 205(1):49-60.

Childs GV. 1997. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Micros Res Tech.* 39(2): 114-130.

Childs GV, Unabia G, Lloyd J. 1992. Recruitment and maturation of small subsets of LH during estrous. *Endocrinology.* 130 (1) 335-344.

Counis R, Laverrière JN, Garrel G, Bleuxa C, Cohen–Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S. 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev.* 45(3): 243–254.

Dada MO, Campbell GT, Blake CA. 1983. A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohypophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle. *Endocrinology.* 113 (3): 970-984.

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

Damassa DA, Kobashigawa D, Smith ER, Davidson JM. 1976. Negative feedback control of LH by testosterone: a quantitative study in male rats. *Endocrinology*. 99(3):736-742.

Davidson JS, Wakefield IK, Millar RP. 1994. Absence of rapid desensitization of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Biochem J*. 300: 299-302.

D'Este L, Casini A, Cetin Y, Wenger T, Renda TG. 2005. Guanilyl-immunoreactive cells in the female and male rat adenohypophysis and their changes under various physiological and experimental conditions. *Histochem Cell Biol*. 123(3): 303-313.

Denef C. 2008. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol*. 20(1):1-70.

Devnath S, Inoue K. 2008. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol*. 20 (6): 687-691.

Evans JJ, Pragg FL, Mason DR. 2001. Release of Luteinizing Hormone from the anterior pituitary gland in vitro can be concurrently regulated by at least three peptides: gonadotrophin releasing hormone, oxytocin and neuropeptide Y. *Neuroendocrinology*. 73(6): 408-416.

Elferink LA, Scheller RH. 1993. Synaptic vesicle proteins and regulated exocytosis. *J Cell Sci. Suppl*. 17:75-79.

Fauquier T, Lacampagne A, Travo P, Bauer K, Mollard P. 2002. Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab*. 13 (7): 304-309.

Farnworth PG. 1995. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. *J Neuroendocrinol*. 145(3):387-395.

Fellmann D, Bresson JL, Clavequin MC, Bugnon C. 1982. Quantitative immunocytochemical studies on the gonadotrophs isolated from the pituitary of the male. *Cell Tissue Res*. 224(1): 137-144.

Fletcher WH, Anderson NC, Everett JW. 1975. Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. *J Cell Biol*. 67: 469-476.

Gilleron J, Carette D, Durand P, Pointis G, Segretain D. 2009. Connexin 43 a potential regulator of cell proliferation and apoptosis within the seminiferous epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*. 141(6): 1381-1390.

Guerineau NC, Bouali-Benazzouz, Corcuff JB, Audy MC, Bonnin M, Mollard P. 1992. Transient but not oscillating component of the calcium mobilizing response to gonadotropin-releasing hormone depends on calcium influx in pituitary gonadotrophs. *Cell Calcium*. 13(8):521-529.

Guerineau NC, Bonnefont X, Stoeckel L, Mollard P. 1998. Synchronized spontaneous Ca^{2+} transients in acute anterior pituitary slices. *J Biol Chem*. 273(17): 10389-10395.

- Heding A, Vrecl M, Hanyaloglu AC, Sellar R, Taylor PL, Eidne KA. 2000. The rat gonadotropin-releasing hormone receptor internalizes via a beta-arrestin-independent, but dynamin-dependent, pathway: Addition of a carboxyl-terminal tail confers beta-arrestin dependency. *Endocrinology*. 141 (1): 299-306.
- Horiguchi K, Fujiwara K, Kouki T, Kikuchi M, Yashiro T. 2008. Immunohistochemistry of connexin 43 throughout anterior pituitary gland in a transgenic rat with green fluorescent protein-expressing folliculostellate cells. *Anat Sci Int*. 83 (4): 256-260.
- Hüneke R, Jüngling E, Skasa M, Rossaint R, Lückhoff A. 2001. Effects of the anesthetic gases xenon, halothane and isoflurane on calcium and potassium currents in human atrial cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 95(4): 999-1006.
- Iida T, Stojilkovic SS, Izumi S, Catt KJ. 1991. Spontaneous and agonist-induced calcium oscillations in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol*. 5 (7): 949-958.
- Inoue K, Hagino N. 1984. Comparative immunocytochemical demonstration of ACTH-, LH-FSH-containing cells in the pituitary of neonatal, immature and adult rats. *Cell Tissue Res*. 235(1): 71-75.
- Inoue K, Kurosumi K. 1984. Ultrastructural of immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat. *Cell Tissue Res*. 235(1):77-83.
- Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM. 1997. Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res*. 52:475-90.
- Jonas JC, Gilon P, Henquin JC. 1998. Temporal and quantitative correlations between insulin secretion and stably elevated or oscillatory cytoplasmic Ca^{2+} in mouse pancreatic beta cells. *Diabetes*. 47(8):1266–1273.
- Kacsoh B. Endocrine Physiology. 2000. McGraw-Hill. Estados Unidos de América. 799pp.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. 1993. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 133 (2): 931-934.
- Karsch FJ, Bowen JM, Caracty A, Evans NP, Moenter SM. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod*. 56 (2): 303-309.
- Khar A, Kunert-Radek J, Jutisz M. 1979. Involvement of microtubule and microfilament system in the GnRH-induced release of gonadotropins by rat anterior pituitary cells in culture. *FEBS Lett*. 104 (2): 410-414.
- King JA, Millar RP. 1995. Evolutionary aspects of gonadotrophin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol*. 15(1): 5-23.
- Kraus S, Naor Z, Seger R. 2001. Intracellular signalling pathways mediated by the gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*. 32(6): 499–509.

Krieg RJ, Batson MJ, Martha MP, Matt DW, Salisbury R, Evans WS. 1990. Gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion by perfused pituitary cells from normal, gonadectomized and testicular feminized rats. *Endocrinology*. 126 (6):3022-3027.

Kumar TR. 2007. Functional analysis of LH beta knockout mice. *Mol Hum Reprod*. 269(1-2): 81–84.

Kwiecien R, Hammond C. 1998. Differential management of Ca²⁺ oscillations by anterior pituitary cells: a comparative overview. *Neuroendocrinology*. 68(3):135-151.

Leaños Miranda A, Ulloa-Aguirre A, Cervini LA, Janovick JA, Rivier J, Conn PM. 2006. Identification of new gonadotrophin-releasing hormone partial agonists. *J Endocrinol*. 189(3):509–517.

Lee YVH, Lee TOL, Chow BKC. 2008. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *FEBS J*. 275(22): 5458-5478.

Leong DA; Thorner MO. 1991. A potential code of Luteinizing hormone-releasing hormone-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem*. 266 (14): 9016-9022.

Loughlin JS, Badger TM, Crowley WF Jr. 1981. Perfused pituitary cultures: a model for LHRH regulation of LH secretion. *Am J Physiol*. 240(6): E591-596.

Loughlin JS, Naddaff PG, Badger TM. 1984. LH responses to LHRH in perfused pituitary cell culture: sex differences in the rat. *Am J Physiol*. 246(2Pt1):E145-E152.

Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone β subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(49):17294-17299.

Magoulas C, McGuinness, Balthasar N, Carmignac DF, Sesay AK, Mathers KE, Christian H, Candeil L, Bonnefont X, Mollard P, Robinson IC. 2000. A secreted fluorescent reporter targeted to pituitary growth hormone cells in transgenic mice. *Endocrinology*. 141(12): 4681-4689.

Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Hashimoto Y, Kuno M, Coombs RJ, Herbert DC, Soji T. 2004. Intercellular communication within the rat anterior pituitary: relationship between LH-RH neurons and folliculo-stellate cells in the pars tuberalis. *Cell Tissue Res*. 317(1): 79-90.

McDowell TS, Pancrazio JJ, Barret PQ, Lynch C 3rd. 1999. Volatile anesthetic sensitivity of T-type calcium currents in various cell types. *Anesth Analg*. 88(1): 168-173.

Martin TF. 2003. Turning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochim Biophys Acta*. 1641(2-3): 157-165.

McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNeilly JR. 2003. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl.* 61: 463-476.

Merelli F, Stojilkovic SS, Iida T, Krsmanovic LZ, Zheng L, Mellon PL, Catt KJ. 1992. Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. *Endocrinology.* 131(2):925-932.

Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. 2004. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Endocr Rev.* 25(2):235-275.

Millar RP. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci.* 88(1-2): 5-28.

Moguilevsky JA, Schiaffini O. 1972. Hipófisis control de su secreción. Lopez Liberos Editores. Buenos Aires Argentina: 260 pags.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. 1996. Cell to cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology.* 137 (8): 3356-3367.

Moyle WR, Ramachandran J. 1973. Effect of LH on steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in rat Leydig preparations and mouse tumor Leydig cells. *Endocrinology.* 93(1):127-134.

Munari-Silem Y, Lebrethon MC, Moran I, Rousset B, Saenz JM. 1995. Gap junction mediated cell-to-cell communication in bovine and human adrenal cells. A process whereby cells increase their responsiveness to physiological corticotropin concentrations. *J Clin Invest.* 95(4): 1429-1439.

Muñoz Martínez J, García X. 1997. Fisiología. Células, Órganos y Sistemas. Tomo IV. Fondo de Cultura Económica. México. 326Ppp.

Murray R, Melmed S. 2006. The Pituitary. *Encyclopedia of Life Sciences* :1-8 pp.

Murphy HD. 1965. Sertoli cell stimulation following intrasticular injections of FSH in the hypophysectomized rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 118:1202-1205.

Naor Z, Capponi AM, Rossier MF, Ayalon D, Limor R. 1988. Gonadotropin-releasing hormone-induced rise in cytosolic free Ca²⁺ levels: mobilization of cellular and extracellular Ca²⁺ pools and relationship to gonadotropin secretion *Mol Endocrinol.* 2(6):512-520.

Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/ dynorphin/ neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci.* 29(38): 11859-11866.

Neill JD. 2002. Mammalian gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor subtypes. *Arch Physiol Biochem.* 110(1-2): 129-136.

Neill JD, Musgrove LC, Duck W. 2004. Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab.* 15 (8): 383-392.

Nicol L, McNeilly JR, Stridsberg M, McNeilly AS. 2004. Differential secretion of gonadotrophins: investigation of the role of secretogranin II and chromogranin A in the release of LH and FSH in LbetaT2 cells. *J Mol Endocrinol.* 32: 467-480.

Nunemaker CS, Zhang M, Wasserman DH, McGuinness OP, Powers AC, Bertram R, Sherman A, Satin LS. 2005. Individual mice can be distinguished by the period of their islet calcium oscillations: is there an intrinsic islet period that is imprinted in vivo?. *Diabetes.* 54(12):3517-3522.

Norman AW, Litwack G. 1997. Hormones. Academic Press. Estados Unidos de América: 558 pp.

Padmanabhan V, Sharma TP. 2001. Neuroendocrine vs. paracrine control of follicle-stimulating hormone. *Arch Med Res.* 32(6): 533-543.

Pawson AJ, McNeilly AS. 2005. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci.* 88(1-2):75-94.

Pierce JG, Faith MR, Giudice LC, Reeve JR. Structure and structure-function relationships in glycoproteins hormones. 1976. *Ciba Found Symp.* 41: 225-250.

Prentki M, Glennon MC, Thomas AP, Morris RL, Matschinsky FM, Corkey BE. 1988. Cell-specific patterns of oscillating free Ca^{2+} in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J Biol Chem.* 263(23): 11044-11047.

Probst W, Synder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. 1992. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 11:1-20.

Ravier MA, Güldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Söhl G, Wolheim CB, Willecke K, Henquin JC, Meda P. 2005. Loss of connexin36 alters β -cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca^{2+} and insulin oscillations and basal insulin release. *Diabetes.* 54(6):1798-1797.

Rathnam P, Saxena BB. 1971. Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands. *J Biol Chem.* 246 (23): 7087-7094.

Rispoli LA, Nett TM. 2005. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* 88: 57-74.

Sealfon SC, Millar RP. 1995. Functional domains of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Cell Mol. Neurobiol.* 15(1) :25-42.

Sairam MR, Krishnamurthy H. 2001. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animals models. *Arch Med Res.* 32: 601-608.

Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev.* 18(2):180-205.

Schally AV. 1970. Hypothalamic regulation of FSH and LH secretion. *Res Reprod.* 2(4) : 2-3.

Scherubl H, Hescheler J. 1995. The electrophysiology of neuroendocrine cells. Classification of Neuroendocrine Cells. Chapter 2. 11-12 CRC press 373 pp.

Schwartz J. 2000. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev.* 21(5): 488-513.

Schwartz J, Cherny R. 1992. Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endoc Rev.* 13:453-475.

Serre-Beinier V, Mas C, Calabrese A, Caton D, Bauquis J, Caille D, Charollais A, Cirulli V, Meda P. 2002. Connexins and secretion. *Biol Cell.* 94:477-492.

Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Horiuchi O, Yashiro T, Kikuchi M, Hashimoto Y, Tsuruo Y, Herbert DC, Soji T. 2004. 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. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 278:462-473.

Soji T, Herbert DC. 1989. Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec.* 224:523-533.

Spray DC, Bennet MV. 1985. Physiology and pharmacology of gap junctions. *Ann Rev Physiol.* 47:281-303.

Sriraman V, Anbalagan M, Rao AJ. 2005. Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: a dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors. *Reprod Biomed Online.* 11(4): 507-518.

Stojilkovic SS, Izumi S, Catt KJ. 1988. Participation of voltage-sensitive calcium channels in pituitary hormone release. *J Biol Chem.* 263(26):13054-13061.

Stojilkovic SS, Catt KJ. 1992. Calcium oscillations in anterior pituitary cells. *Endocr Rev.* 13(2):256-280.

Stojilkovic SS, Kukuljan M, Tomic M, Rojas E, Catt KJ. 1993. Mechanisms of agonist-induced $[Ca^{2+}]$ oscillations in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem.* 268(11):7713-7720.

Stojilkovic SS, Tomic M. 1996. GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs. *Trends Endocrinol Metab.* 7(10):379-384.

Thomas AP, Bird GS, Hajnóczy G, Robb-Gaspers LD, Putney JW Jr. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* 10:1505–1517.

Thomas P, Waring DW. 1997. Modulation of stimulus-secretion coupling in single rat gonadotrophs. *J Physiol.* 504(3):705-719.

Tóth S, Huneau D, Banrezes B, Ozil JP. 2006. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction.* 131:27–34.

Tilbrook AJ, Clarke IJ. 2001. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod.* 64:735-742.

Tobin VA, Canny BJ. 1996. Testosterone regulates gonadotropin-releasing hormone-induced-calcium signals in male rat gonadotrophs. *Endocrinology.* 137(4):1299-1305.

Tomic M, Cesnajak M, Catt KJ, Stojilkovic SS. 1994. Developmental and physiological aspects of Ca^{2+} signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology.* 135(5):1762-1771.

Tomic M, Jobin RM, Vergara LA, Stojilkovic SS. 1996. Expression of purinergic receptor channels and their role in calcium signalling and hormone release in pituitary gonadotrophs. Integration of P2 channels in plasma membrane-and endoplasmic reticulum-derived calcium oscillations. *J Biol Chem.* 271:21200-21208.

Tordjmann T, Berthon B, Claret M, Combettes L. 1997. Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: dual control by gap junction permeability and agonist. *EMBO Journal.* 16(17):5398-5407.

Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealfon SC. 1992. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 6(7):1163-1169.

Van Goor F, Zivadinovic D, Martinez-Fuentes AJ, Stojilkovic SS. 2001a. Dependence of pituitary hormone secretion on the pattern of spontaneous voltage-gated calcium influx. Cell type-specific action potential secretion coupling. *J Biol Chem.* 276(36):33840–33846.

Van Goor F, Zivadinovic D, Stojilkovic SS. 2001b. Differential expression of ionic channels in rat anterior pituitary cells. *Mol Endocrinol.* 15(7): 1222–1236.

Villalobos C, Nuñez L, Frawley S, García-Sancho J, Sánchez A. 1997. Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):14132-14137.

- Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. 2004. Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 449:257-264.
- Walker WH, Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.* 130:15-28.
- Weaton JE, Mc Cann SM. 1976. Luteinizing hormone-releasing hormone in peripheral plasma and hypothalamus of normal and ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 20(4) :296-310.
- Wen S, Schwarz JR, Niculescu D, Dinu C, Bauer CK, Hirdes W, Boehm U. 2008. Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology.* 149:2701–2711.
- Winters SJ, Moore JP. 2004. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction.* 128:13-23.
- Wray S, Hoffman G. 1986. Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology.* 43(2) :93-97.
- Yamamoto T, Hossain MZ, Hertzberg EL, Uemura H, Murphy LJ, Nagy JI. 1993. Connexin43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry.* 100:53-64.
- Yeung CM, Chan CB, Leung P, Cheng CH. 2006. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1441-1449.
- Zemkova H, Vanecek J. 2000. Differences in gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling between melatonin-sensitive and melatonin-insensitive neonatal rat gonadotrophs. *Endocrinology.* 141:1017–1026.
- Zorec R. 1996. Signaling and secretion in pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab.* 7(10): 384-387.

XI. ANEXO

GnRH-Induced $[Ca^{2+}]_i$ -Signalling Patterns in Mouse Gonadotrophs Recorded from Acute Pituitary Slices *in vitro*

Claudia Sánchez-Cárdenas Arturo Hernández-Cruz

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Biofísica, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México City, México

Key Words

Gonadotrophs • Pituitary slices • Calcium imaging • GnRH actions

Abstract

In this study we used $[Ca^{2+}]_i$ imaging to monitor GnRH-induced intracellular Ca^{2+} signalling from dozens of gonadotrophs in mouse male pituitary slices. Responses of individual cells vary in magnitude, latency, duration and frequency of oscillation. Approximately 20% of gonadotrophs *in situ* display Ca^{2+} oscillations of increasing frequency at higher [GnRH] and biphasic (peak-plateau) responses at saturating [GnRH]. Nevertheless, this orderly progression, reported in cultured cells, is less well organized in 55% of cells. Furthermore, approximately 30% cells display non-oscillatory GnRH responses, reminiscent of immature gonadotrophs. Dose-response curves of slices from different animals suggest inter-individual differences in GnRH sensitivity. When the same dose of GnRH is applied repeatedly, individual cell responses are almost identical both in latency, oscillatory pattern and duration resembling the 'Ca²⁺ fingerprint' phenomenon. In addition, gonadotrophs *in situ* are arranged in small clusters with similar GnRH-induced intracellular Ca^{2+} -signalling patterns. Neighbouring gonadotrophs within clusters often display synchronized GnRH-induced responses with high correlation indices (>0.75). Nevertheless, synchronized

responses between pairs of gonadotrophs are unaffected by incubation with blockers of gap-junction channels or P2X receptor channels, suggesting that they are not mediated by gap junctions or ATP. Alternative explanations are discussed, including pseudo-synchronization. In summary, while gonadotrophs *in situ* display GnRH-induced responses similar to those observed in cultured cells, different patterns and novel aspects of functional organization were found which deserve further investigation. This study on GnRH-induced Ca^{2+} signalling in the acute mice pituitary gland might be of potential relevance for characterizing GnRH actions in gonadotrophs in transgenic and knockout animals.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Gonadotrophs from the anterior lobe of the pituitary synthesize and secrete LH and FSH (luteinising and follicle-stimulating hormones, respectively). These hormones are essential for folliculogenesis, ovulation and steroidogenesis in females, and for testicular growth, spermatogenesis and steroidogenesis in males. LH and FSH are synthesized and secreted in response to stimulating concentrations of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), a decapeptide that is synthesized in the soma of neurons from the arcuate nucleus of the hypo-

thalamus, stored in axon terminals of the median eminence and released into the hypophyseal portal circulation.

As shown by numerous studies, isolated gonadotrophs in culture can display both spontaneous intracellular Ca^{2+} transients and robust and stereotyped dose-dependent intracellular Ca^{2+} signals in response to supra-threshold GnRH concentrations [1–3]. Although fundamental information regarding gonadotroph physiology has been obtained from cells in tissue culture, it is difficult to predict to what extent this information can be extrapolated to cells in their native milieu. For instance, it is not known if gonadotrophs in situ display the same secretagogue sensitivity as those under tissue culture conditions [2]. Moreover, Ca^{2+} -signalling patterns from gonadotrophs in situ could vary from those recorded from their cultured counterparts. For one part, synchronous activity of somatotrophs mediated by gap junctions has been demonstrated in anterior pituitary slices [4, 5] and rat pituitary gonadotrophs express connexin 43, a gap-junction-forming subunit [6]. Propagation of electrical or chemical signals between gonadotrophs or between gonadotrophs and other cell types via gap junctions could affect responses to agonists in various ways. Another potential source of deviation from tissue culture conditions is the network of folliculo-stellate (FS) cells, which provide pathways for electrical and Ca^{2+} signalling throughout the gland [7], and secrete activin and follistatin which can influence the responses of gonadotrophs to secretagogues [8]. Finally, it is likely that close cell packing in the pituitary parenchyma augments paracrine and autocrine interactions in comparison with tissue culture conditions [9–11].

The acute slice preparation is amenable for physiological studies because cells are accessible in their native environment, in which cell-cell interactions are maintained. Here we combine acute pituitary slices with fast intracellular Ca^{2+} imaging techniques to visualize in real time the responses to GnRH of dozens of intact gonadotrophs simultaneously [4, 12]. Since the architecture of the glandular parenchyma is largely preserved, this preparation is ideally suited to reveal details of the anatomic and functional organization of the gonadotroph population following their activation by their natural secretagogues. For the most part, gonadotrophs in situ show the same type of responses to GnRH observed in cultured cells. Nevertheless, the progression of responses can differ from the ‘canonical’ behaviour. Interestingly, many cells display atypical (non-oscillatory) responses, regardless of the GnRH concentration. GnRH-induced responses of

individual cells vary considerably, reflecting a range of dose-response properties in the population of gonadotrophs. Conversely, when the same dose of GnRH is applied repeatedly, cells respond in an almost identical manner, both in latency, oscillatory pattern and duration (Ca^{2+} fingerprint). Gonadotrophs in situ are organized in small cell clusters with similar GnRH-induced Ca^{2+} -signalling patterns. In summary, the slice preparation revealed aspects of functional organization within the population of gonadotrophs which deserve further investigation.

Materials and Methods

Preparation of Acute Pituitary Slices

Animal studies were performed under an institutional protocol similar to the USPHS: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the Official Mexican Guide from the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999). Young adult Balb-c mice (8 weeks old, sexually immature), were used for these studies. Mice were maintained in the institute’s animal facility and fed ad libitum. To rule out possible variations associated to fluctuating levels of oestrogen and progesterone during the progression of the oestrous cycle, our study was restricted to pituitary gonadotrophs from adult males. After decapitation under ether anaesthesia, the skull was opened and the brain was rapidly removed. The pituitary gland was then carefully dissected and embedded in 3.0% low-melting point agarose (Invitrogen Catlab, Calif., USA) dissolved in physiological solution at 37°C (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , and 12 mM glucose, gassed with 5% CO_2 –95% O_2 to pH ~7.4). The agarose with embedded pituitary gland was hardened by immersion in ice-cold physiological solution, and the agar block was glued with cyanoacrylate onto the plate of a Vibratome® (St. Louis, Mo., USA). Then, the slicing chamber was filled with physiological solution kept at 3°C with a bath refrigeration unit (VB900R Vibratome® and coronal slices 150 μm in thickness were prepared using a vibrating blade microtome (Vibratome® Series 3000 plus). Freshly cut slices were immediately transferred to an incubation beaker containing physiological solution at room temperature and continuously gassed (5% CO_2 –95% O_2) to maintain pH near 7.4. Slices remained viable for up to 6 h after preparation.

Intracellular Ca^{2+} Imaging of Living Pituitary Slices

Pituitary slices were allowed to adhere to small glass coverslips pretreated with 0.1% poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, Mo., USA), and one of them was placed in a small plastic well filled with 0.5 ml of physiological solution saturated with 5% CO_2 –95% O_2 and containing the cell-permeable fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM (TEF Labs, Austin, Tex., USA; 2 mM stock solution in DMSO with 0.5% pluronic acid; final concentration 20 μM). Dye loading proceeded at room temperature for 30 min. Then the slice was placed in the bottom of a Plexiglas chamber attached to the stage of microscope and continuously perfused (2 ml/min) with gassed physiological solution at room temperature. The slice was viewed

with an upright microscope (Nikon Eclipse 80i, Melville, N.Y., USA) and water-immersion fluorescence Nikon objectives (20 \times , 0.5 NA or 10 \times , 0.3 NA). In some cases, a reducing C-lens (TV lens C-0.45 X, Nikon) was placed in front of the digital camera to enlarge the field of view at the expense of reducing magnification. Fluo-4 was excited at 488 nm with monochromatic light (Polychrome V, Illumination System, TILL Photonics), and emitted fluorescence was band-passed with a Nikon a B-2E/C filter set. Fluorescence images were acquired with a cooled digital CCD camera (Imago QE, TILL Photonics, Munich, Germany) under protocols written in TILL visION software 4.0. Fluo-4 fluorescence images (10 ms exposure, 300 ms interval) were acquired from a field of view centred on one of the hemi-lobes of the anterior pituitary gland, corresponding to a diameter of approximately 1.0 mm (10 \times objective with 0.45 \times lens = 4.5 \times magnification; see fig. 1a) or 0.2 mm (20 \times objective). For simplicity, the region corresponding to the intermediate lobe of the slice was excluded from the analysis. Baseline activity was recorded for 30 s while the slice was perfused with normal physiological solution. The perfusion was then switched to GnRH-containing physiological solution for 30 s and then switched back to normal physiological solution. GnRH was directly applied to the recording chamber by a gravity-fed perfusion system consisting of five 5-ml syringes and a 60-ml one, each with a separate two-way valve and connected by Tygon[®] tubing to a common entry port near the chamber. Control experiments showed that slice exposure to GnRH was delayed by \sim 12 s, reached its maximal concentration within 10 s, lasted 30 ± 2 s at its peak and decayed completely within 30–35 s. This was determined by perfusing a fluorescent test solution through the imaging chamber (1 μ M Alexa 488, Molecular Probes) and measuring with the same imaging system the increase and decrease in fluorescence as the test solution washed in and out of the chamber. A resting period of 30 min was allowed before a new GnRH concentration was applied. The relatively long interval between GnRH applications was selected in order to prevent desensitization or other cumulative effects of GnRH. Previous studies have shown that dispersed rat male pituitary cells can consistently secrete LH to repetitive administration of GnRH for up to 9 h [13].

Image Recording and Analysis

Image sequences (movies) were obtained from a given field of view before, during and after GnRH exposure (Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, Calif., USA) and saved in TIFF format. Movies were processed and analyzed with macros written in Image J (Version 1.38, National Institutes of Health). In a typical experiment, a pituitary slice was exposed up to five GnRH concentrations (in the range between 0.01 and 100 nM) over a period of nearly 4 h. Movies \sim 4 min in duration were obtained before, during and after bath application of GnRH. Occasionally, movies were also acquired during the resting (non-stimulation) periods. Since Fluo-4 is a single wavelength dye, its fluorescence emission is a function of dye concentration, illumination pathway and intracellular [Ca²⁺]. Our experimental conditions were designed so that only fluorescence changes related to fluctuations of intracellular [Ca²⁺] were significant. Raw movies were converted to ΔF movies: $\Delta F = F(i) - F_0$, where F_0 is the fluorescence image formed by averaging the first 5 frames of the sequence, and $F(i)$ represents each (i) fluorescence images of the set. No attempts were made to calculate absolute intracellular Ca²⁺ concentrations from these

data. Fluo-4 does not appear to penetrate deeper than 40–50 μ m into the tissue. Underneath the layer of damaged cells at the surface of the slice, it is possible to recognize one or two layers of healthy cells which have taken up the indicator. With practice, we can routinely image the layer of healthy cells by focusing 25–30 μ m below the surface. Thus, contamination with out-of-focus fluorescence from superimposing cell layers is not a serious problem even at relatively low magnification.

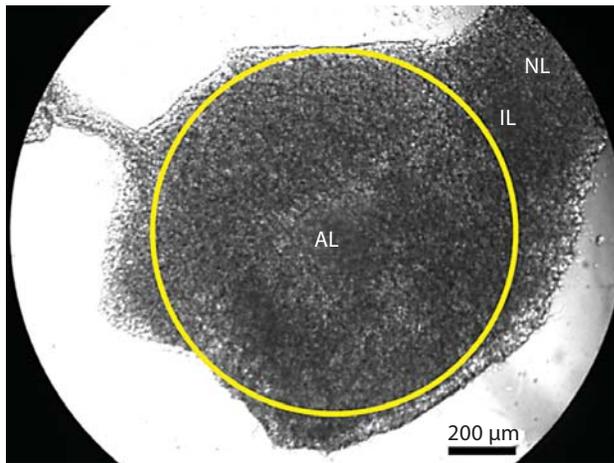
As an aid to identify cells that activate following GnRH application, 'standard deviation images' (SD) were obtained from movie segments of interest (stack projection function; standard deviation algorithm of Image J). In SD images, areas of high pixel values correspond to cells with large ΔF changes, and areas with low pixel values correspond to cells that were less active or remained silent (see fig. 2a, b). Pixel intensity values were colour-coded for illustration purposes. Regions of interest (ROIs), corresponding to cells that activated after GnRH application ($SD > 5 \pm 0.5$), were drawn on the SD image, and then transferred to the ΔF movie stack for quantification (mean ΔF over each ROI over time). Using this approach, $\Delta F(t)$ records from tens to hundreds of individual cells can be readily obtained. A convenient way to represent this large amount of data is the multi-cell $\Delta F(t)$ plot. These plots were generated with Igor Pro 5.03 macros (Wavemetrics, Inc., Oreg., USA) written by Leon Islas, PhD. Here, ordinates represent cell number (one cell per row), the time is represented in the abscissa, and ΔF values are colour-coded. From these plots, traces from individual cells can be extracted for analysis. GnRH application is indicated excluding the 12 s delay caused by dead space in the perfusion system. Therefore, the horizontal lines or shaded areas intend to represent roughly the time of arrival of GnRH into the chamber.

Dose-response curves of the number of active cells as a function of [GnRH] were evaluated with the power logistic function ($F(x) = (A1 - A2) / \{1 + (x/ED_{50})^p\} + A2$); (A1: initial value, A2: final value, p = slope). Cells were counted as responding when their fluorescence signal increased by more than twice the standard deviation of the noise at rest and between 50 and 85 s after switching on GnRH perfusion. Numerical data were plotted with Origin 3.8 (MicroCal Software, Northampton, Mass., USA) or Igor Pro and final image composition was made with Microsoft[®] PowerPoint.

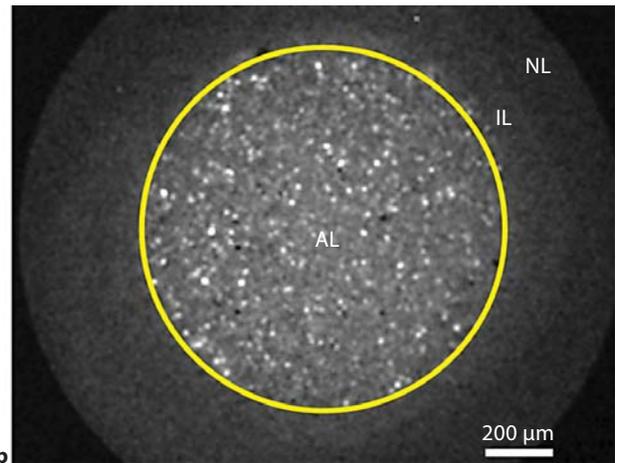
Results

Spatial Distribution of GnRH-Responding Cells in the Anterior Pituitary Slice

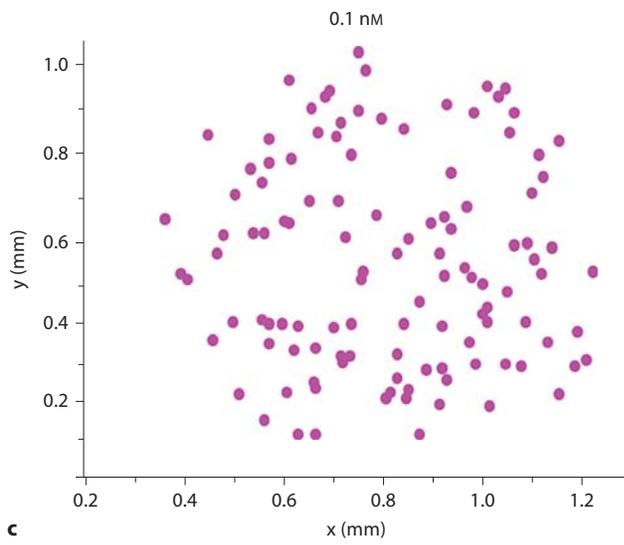
Figure 1 illustrates the procedure used to record simultaneously Ca²⁺ signals from dozens of cells in a rodent pituitary slice. Using low magnification imaging (see Methods), visualization of a complete hemi-lobe of the mouse pituitary is possible. A bright-field illumination picture of the preparation is shown in figure 1a. The yellow circle indicates the area illuminated by the monochromator fibre optics. Figure 1b shows a fluorescence image obtained from the same field of view. Movies 3–4 min in duration were obtained before, during and after



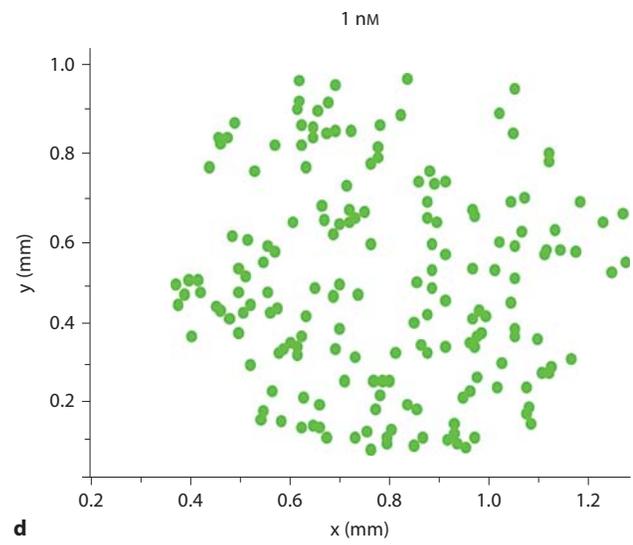
a



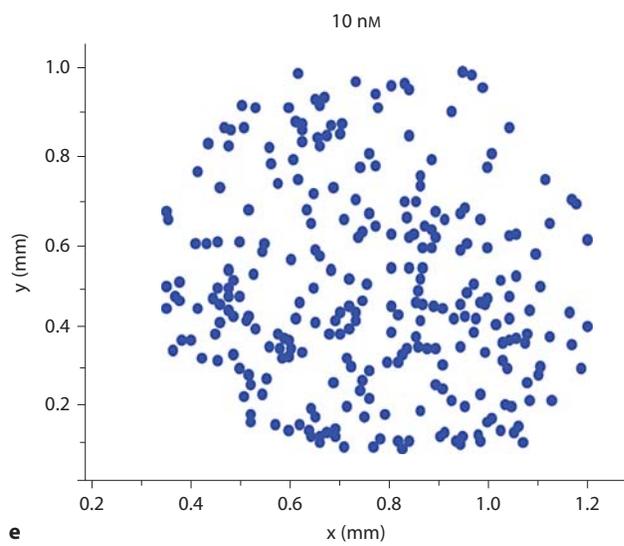
b



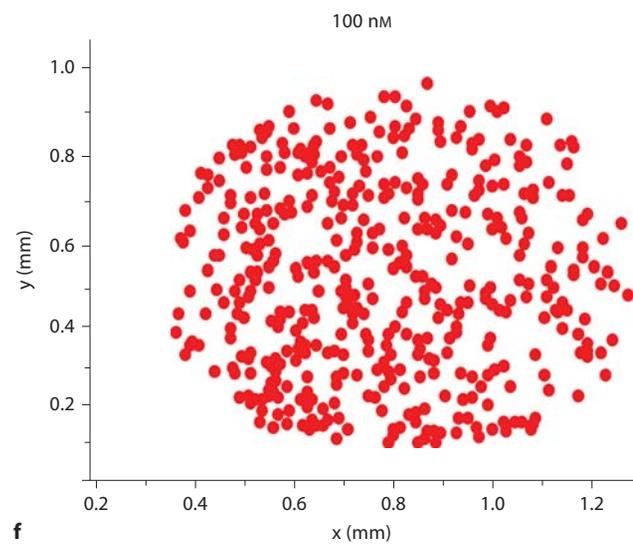
c



d



e



f

bath application of the different doses of GnRH. By analysing movie segments obtained before and during GnRH application (see below), it is possible to identify all cells responding to a given GnRH concentration ([GnRH]). Figure 1c–f shows the position of cells in the pituitary slice which responded to the indicated [GnRH]. As expected, the number of responsive cells increases with increasing [GnRH]. The distribution maps of GnRH-responding cells shown in figure 1c–f demonstrate that cells recruited by increasing [GnRH] are distributed indiscriminately throughout the anterior pituitary hemi-lobe.

GnRH-Induced Oscillatory Patterns of Intracellular Ca^{2+} Recorded Simultaneously from Individual Gonadotrophs in situ

Cells that became active after GnRH application were identified by comparing standard deviation (SD) images (see Methods) from the movie segment before GnRH was applied to the bath (fig. 2a) and during its presence (fig. 2b). SD images are useful because active cells appear as areas of approximately 12–18 μm in diameter with high pixel intensity values representing large ΔF changes. ROIs corresponding to active cells were drawn on the SD image (for examples, see fig. 2a, b), and then copied to the complete ΔF movie stack for quantification of the mean ΔF from each ROI over time. With this approach, ΔF records from tens to hundreds of individual cells can be readily obtained. Multi-cell ΔF (t) plots were then used to represent these data (see Methods). A multi-cell ΔF (t) plot representing GnRH responses of 110 gonadotrophs from the same field of view is shown in figure 2c. In these plots, the ordinate represents cell number (one cell per

Fig. 1. Distribution of cells responding to increasing GnRH concentrations in the mouse pituitary slice preparation in vitro. **a** Bright-field illumination photograph of an adult male pituitary slice. AL = Anterior lobe, IL = intermediate lobe, NL = neural lobe. The yellow circle indicates the area illuminated by the monochromator fibreoptics. **b** Fluorescence image obtained from the same field of view as in **a**. Images were obtained with a 10 \times objective and a 0.45 \times magnification lens. **c–f** Spatial distribution maps of GnRH-responding cells to the indicated concentrations of GnRH in the mouse anterior pituitary. Cells were counted as responding when their fluorescence signal increased by more than twice the standard deviation of the noise at rest and between 50 and 85 s after switching on the GnRH perfusion. The positions of all cells responding at each GnRH dose are indicated. **c** 0.1 nM, **d** 1 nM, **e** 10 nM and **f** 100 nM. The number of responding cells increases with [GnRH]: 114, 177, 266 and 434, respectively. Cells recruited by increasing doses of GnRH appear to be randomly distributed throughout the anterior pituitary hemi-lobe.

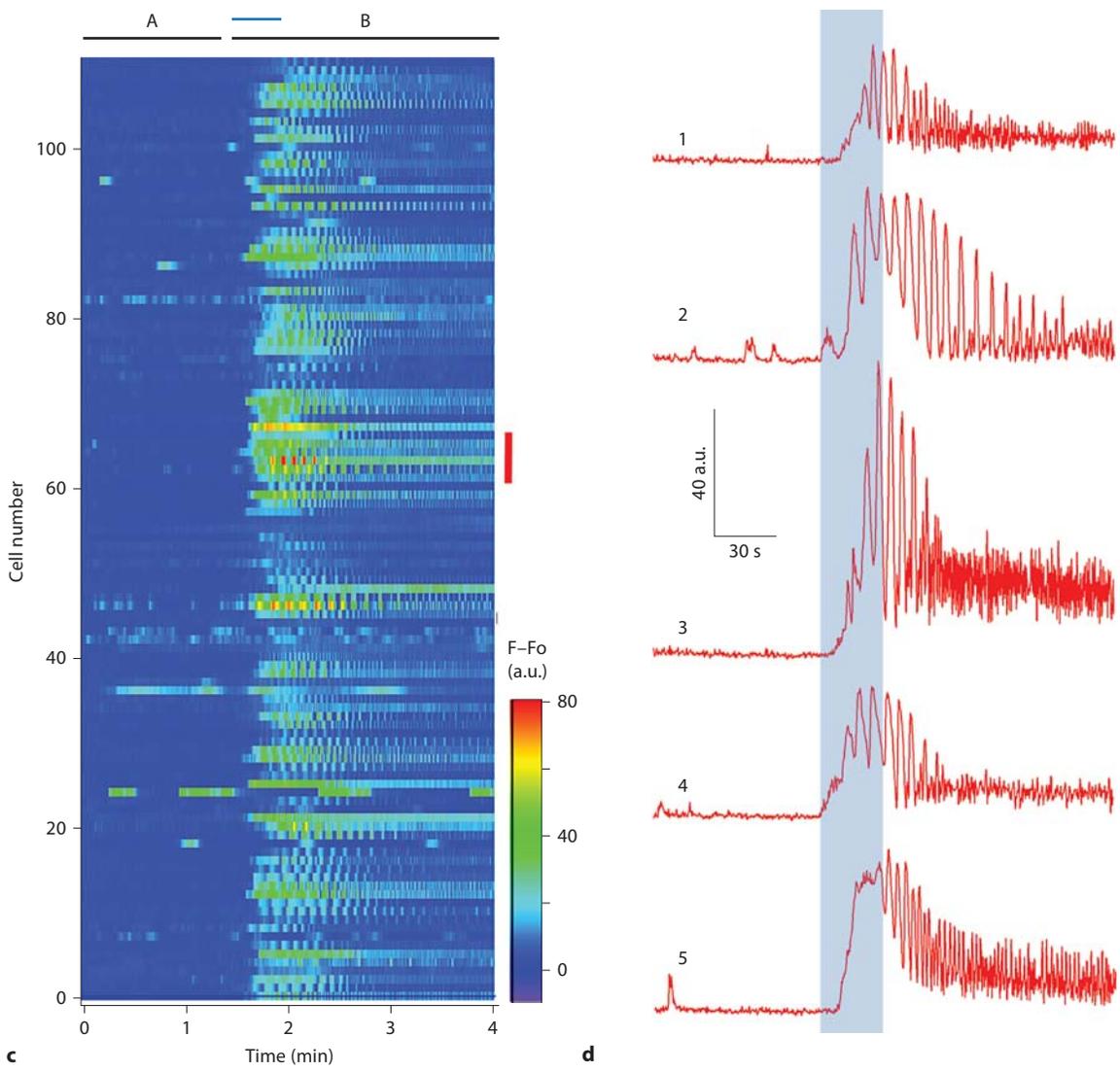
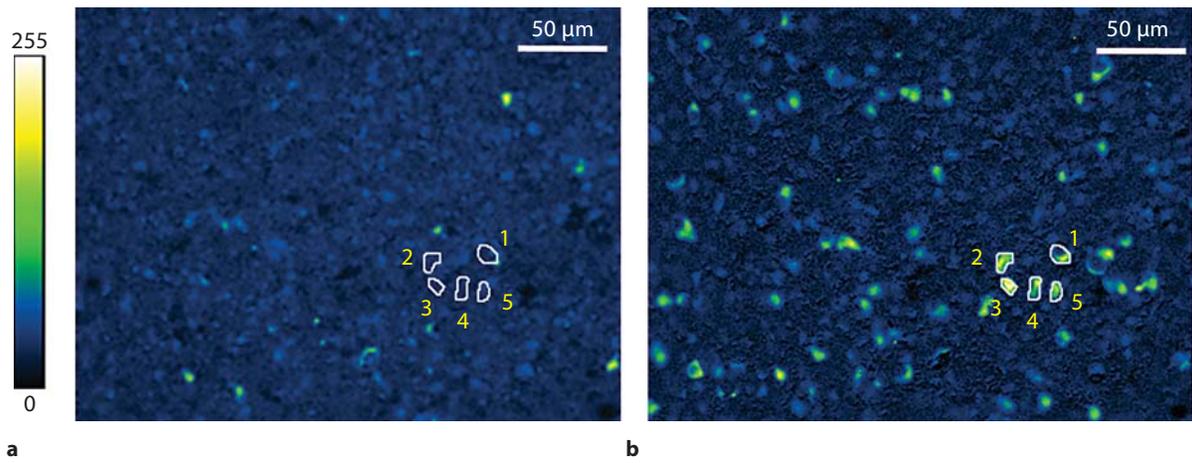
row), the time is represented in the abscissa, and ΔF values are colour-coded. GnRH responses of gonadotrophs labelled 1–5 in figure 2b are shown in figure 2d (traces 1–5). GnRH-responsive cells display oscillatory patterns of $[Ca^{2+}]_i$ very similar to those recorded from gonadotrophs in vitro. Nonetheless, as demonstrated in figure 2c, d, individual cell responses vary in latency, magnitude, duration and frequency of oscillation (see below). Spontaneous Ca^{2+} transients observed in some gonadotrophs in situ (fig. 2) were completely and reversibly abolished after perfusion with extracellular physiological solution containing no added $CaCl_2$ (data not shown).

Recruitment of GnRH-Responding Cells as a Function of [GnRH]: Dose-Response Curves

As illustrated in figure 1c–f, the number of GnRH-responding cells increases gradually in a dose-dependent manner. Experiments were conducted to determine, using the number of responding cells, the dose-response curve to GnRH in the population of gonadotrophs of the pituitary slice. In a typical experiment, a slice was challenged with up to five GnRH concentrations in the range between 0.01 and 100 nM. It should be mentioned that these experiments are difficult to complete because the field of view and the focal plane must remain stable over a period of nearly 4 h. Figure 3 summarizes results obtained from 7 different pituitary slices, each from a different animal. The number of responding cells was normalized, and dose-response curves were fitted to each data set (coloured circles and continuous lines). A dose-response curve was also fitted to the mean values of the 7 experiments (blue open squares and dotted line). The dose-response curves from slices 1, 3, 5, 6 and 7, respectively, were similar, with $ED_{50} = 0.24, 0.16, 0.10, 0.66$ and 0.8 nM, respectively, while the dose-response curves from slices 2 and 4 are quite different (red and blue circles and continuous lines), with $ED_{50} = 2.48$ and 2.22 nM, respectively. When these dose-response curves were separated in high and low affinity groups, with mean ED_{50} values of 0.39 nM ($n = 5$) and 2.35 nM ($n = 2$), the difference between them is significant ($p = 0.0005$; Student's non-paired t test). A dose-response curve fitted to the mean data set (dotted blue line) gives an $ED_{50} = 0.56$ nM.

Canonical and Non-Canonical Patterns of Intracellular Ca^{2+} Signalling in Response to Increasing Doses of GnRH

Many studies have shown that when adult cultured rat gonadotrophs are exposed to supra-threshold concentrations of GnRH, they display high amplitude oscillations



in $[Ca^{2+}]_i$ of increasing frequency at higher GnRH concentrations. At saturating [GnRH], these oscillations merge into a high-level plateau, producing the so-called biphasic (peak-plateau) response [1, 14, 15]. Here, we termed this progression a 'canonical' dose-response pattern. Gonadotrophs in situ also display high amplitude Ca^{2+} oscillations and 'canonical' dose-response patterns at increasing GnRH concentrations. An example is illustrated in the upper row of figure 4. Approximately 20% of gonadotrophs in situ display canonical responses. Nevertheless, most cells failed to show this orderly progression. For example, some cells produce oscillatory responses at a given [GnRH] but then non-oscillatory responses at both lower and higher concentrations. Also, biphasic responses can be seen at intermediate, sub-maximal doses (see fig. 4, middle record). We designate these response patterns 'non-canonical'. About 55% of GnRH-responding cells exhibit non-canonical response patterns. Finally, about a third of the responsive cells in the pituitary slice show increases in $[Ca^{2+}]_i$ associated with GnRH application which were not oscillatory, but transient. These atypical, non-oscillatory responses, nonetheless, often showed a dose-response progression: they became larger and the rate of rise and fall increased at increasing [GnRH] (see fig. 4, bottom record). It remains

to be determined if cell-specific individual differences or intercellular interactions or both are responsible for this heterogeneity.

Most Cells Responding to a Low Concentration of GnRH Also Respond to Higher GnRH Concentrations

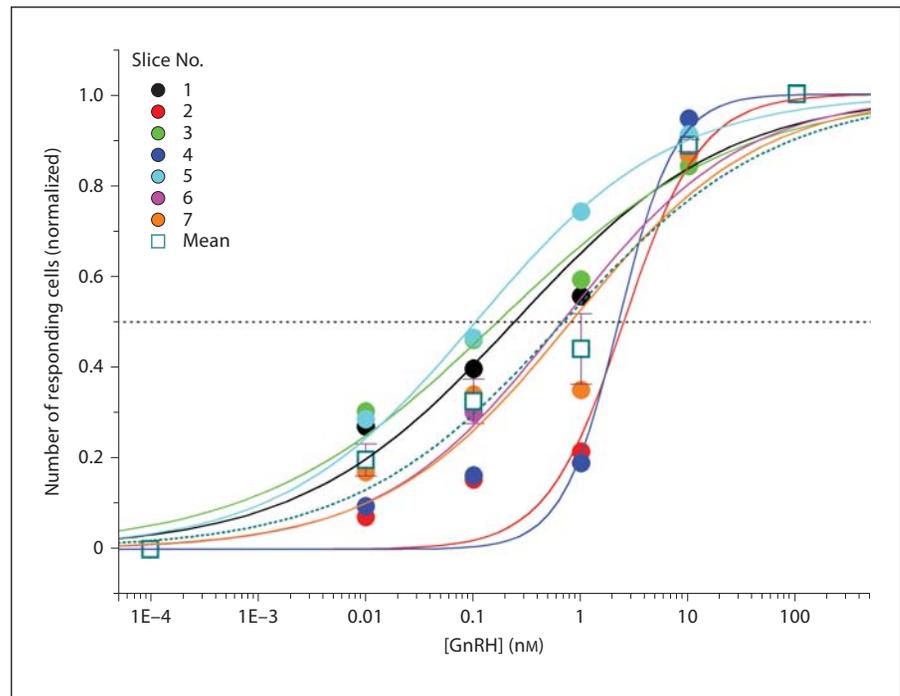
As shown before (fig. 1c–f), an increasing number of GnRH-responding cells are recruited when higher concentrations of the secretagogue are applied indicating that the population of GnRH-responding cells display a range of threshold [GnRH]. From previous reports [1–3], it is reasonable to assume that cells with high sensitivity to GnRH will continue to respond at higher [GnRH]s (see fig. 4). In the example shown in figure 5, the position of all cells responding to the four different [GnRH]s in a given field of view are plotted with different symbols. This experiment was chosen for analysis because individual cells could be clearly distinguished and the slice position and plane of focus remained unusually constant throughout nearly 3 h of recording. Of 21 cells that responded to the lowest [GnRH] (0.1 nM; black circles), 13 (62%) also responded when challenged with 1, 10 and 100 nM [GnRH]. Seven of the remaining 8 cells, only responded to 0.1 nM. Nevertheless, when the 37 cells that responded to 1.0 nM GnRH were identified, all of them responded again when challenged with 10 and 100 nM.

GnRH-Induced Ca^{2+} -Signalling Patterns Are Invariant over Long Periods of Observation

In the experiment shown in figure 6a, the same dose of GnRH (10 nM) was applied four times at 30-min intervals, and Ca^{2+} responses from 13 cells were recorded from the same field of view. It is clear that subsequent responses remained comparable, illustrating the lack of desensitization during repetitive secretagogue application, although a minor facilitation of the second response can be observed in some cells. These cells were chosen because they generated signalling patterns characteristic of gonadotrophs. Besides the stability of the responses, it is notable that each cell responds to GnRH in a distinctive and almost identical manner, both in latency, oscillatory pattern and duration. This is further illustrated in figure 6b, where representative responses from three cells to successive GnRH applications are shown. In figure 6c, the time integral corresponding to the four GnRH responses from 13 cells recorded simultaneously in the slice are plotted as stacked bars. The magnitude of the time integral of GnRH-induced Ca^{2+} signals over time vary considerably among cells ($p > 0.005$, one-way ANOVA). Nevertheless, the time integral of the Ca^{2+} signal for each

Fig. 2. Method used to record Ca^{2+} signals from dozens of GnRH-responding cells in a mouse pituitary slice in vitro. **a** Standard deviation (SD) image corresponding to the movie segment obtained before GnRH application. **b** SD image corresponding to the movie segment obtained when GnRH was present and responsive cells were producing Ca^{2+} signals. SD values in **b** were normalized to 255 gray levels, and values in **a** were multiplied by the same factor for comparison. Images were colour-coded as in the scale shown on the left. Areas with high SD values in **b** were drawn and their contours were copied as ROIs to the corresponding ΔF movie stack for quantification. **c** Multi-cell $\Delta F(t)$ plot summarizing variations in $[Ca^{2+}]_i$ over time of 110 GnRH-responding cells in the field of view shown in **a** and **b**. Ordinate represents cell number (one cell per row), time is represented in the abscissa, and ΔF values are colour-coded according to the colour scale shown on the bottom. The horizontal black lines labelled A and B indicate the length of the movie segments from which SD images shown in **a** and **b** were obtained. **d** Representative $\Delta F(t)$ recordings from cells labelled 1–5 in **b** and indicated with a red bar in **c**. The duration of GnRH (10 nM) application is indicated by horizontal blue lines in **c** and **d** excluding the 12 s delay caused by dead space in the perfusion system. Notice that GnRH responses have different latencies, amplitudes and signalling patterns. Cells labelled 2 and 5 displayed small spontaneous Ca^{2+} fluctuations before GnRH application (images shown in **a** and **b** were acquired with a 20 \times objective).

Fig. 3. Comparison of GnRH dose-response curves from independent slices. Experiments were conducted in seven pituitary slices, each obtained from a different adult male mouse, and the number of responding cells as a function of five [GnRH]s were normalized and plotted (coloured symbols labelled 1–7). Data from all datasets were averaged and plotted in the same graph (turquoise open squares). Dose-response curves were fitted to these data sets (continuous lines of corresponding colours) and ED_{50} values obtained were 0.24, 0.16, 0.10, 0.66 and 0.8 nM for slices 1, 3, 5, 6 and 7, respectively, and 2.48 and 2.22 nM for slices 2 and 4, respectively. When dose-response curves were separated into high and low affinity groups (see above), with mean ED_{50} values of 0.39 nM ($n = 5$) and 2.35 nM ($n = 2$) and compared, the difference between them was significant ($p = 0.0005$; Student's non-paired test). A dose-response curve fitted to the mean data (dotted turquoise line) gave an $ED_{50} = 0.56$ nM.



cell increased in similar-sized increments with each GnRH application (except for the second step in some cells which, as mentioned earlier, shows some facilitation). When the time integral increments produced by each GnRH application were averaged over all cells, it resulted that the four means were not statistically different ($p = 0.21$; one-way ANOVA). These data support the observation that each cell possesses a distinguishing type of response, which is initiated consistently every time the same dose of GnRH is applied.

Gonadotrophs in situ Form Cell Clusters Which Display Similar Ca^{2+} -Signalling Patterns in Response to GnRH

As mentioned earlier, GnRH-responsive cells showed no obvious preference regarding their distribution throughout the anterior pituitary, and new cells recruited by increasing concentrations of GnRH also appeared randomly distributed. Nevertheless, when responding cells in situ were imaged at higher magnification (20 \times objective), distinct forms of anatomical organization began to appear. Figure 7a–d illustrates the distribution maps of GnRH-responding cells at different [GnRH], plotted as in figure 1c–f. Here, cells were categorized according to their Ca^{2+} -signalling patterns as (a) oscillatory, (b) transitory or biphasic, and (c) mixed (i.e. oscillatory + transitory), and circles of different colour were assigned to each pattern. By inspection of these maps it is apparent that cells with a given response pattern tend to lie adjacent to one another. This predisposition of similarly responding cells to spatially co-localize can be observed most clearly when cells were challenged with 10 and 100 nM [GnRH] (fig. 7c, d). Figure 8a is the SD image representing the Ca^{2+} oscillatory activity initiated during bath application of 100 nM GnRH. It is clear that some gonadotrophs appear isolated (arrowheads), while others form clusters or chains of 2–7 cells. Examples of some of these clusters or chains are indicated by orange outlines in figure 8a. Green and red outlines in figure 8b (inset) indicate the contours of six gonadotrophs forming a cell chain (a1–b3). When $\Delta F(t)$ records obtained from these cells are examined in detail (fig. 8b), they display similar Ca^{2+} -signalling patterns in response to GnRH. Nonetheless, three neighbouring gonadotrophs (a1, a2, a3; green outlines) display mixed (plateau-oscillatory) Ca^{2+} responses while the three other cells (b1, b2, b3; red outlines) display oscillatory Ca^{2+} responses. These functional and anatomical associations are regularly observed throughout the mouse anterior pituitary in situ. On average, 9.4 ± 1.25 (SE) clusters were identified per slice/experiment ($n = 5$). Of these, 53% were formed by pairs and 46% were formed by more than two cells.

cell increased in similar-sized increments with each GnRH application (except for the second step in some cells which, as mentioned earlier, shows some facilitation). When the time integral increments produced by each GnRH application were averaged over all cells, it resulted that the four means were not statistically different ($p = 0.21$; one-way ANOVA). These data support the observation that each cell possesses a distinguishing type of response, which is initiated consistently every time the same dose of GnRH is applied.

Gonadotrophs in situ Form Cell Clusters Which Display Similar Ca^{2+} -Signalling Patterns in Response to GnRH

As mentioned earlier, GnRH-responsive cells showed no obvious preference regarding their distribution throughout the anterior pituitary, and new cells recruited by increasing concentrations of GnRH also appeared randomly distributed. Nevertheless, when responding cells in situ were imaged at higher magnification (20 \times objective), distinct forms of anatomical organization began to appear. Figure 7a–d illustrates the distribution maps of GnRH-responding cells at different [GnRH], plotted as in figure 1c–f. Here, cells were categorized according to their Ca^{2+} -signalling patterns as (a) oscillatory, (b) transitory or biphasic, and (c) mixed (i.e. oscillatory + transitory), and circles of different colour were assigned to each pattern. By inspection of these maps it is apparent that cells with a given response pattern tend to lie adjacent to one another. This predisposition of similarly responding cells to spatially co-localize can be observed most clearly when cells were challenged with 10 and 100 nM [GnRH] (fig. 7c, d). Figure 8a is the SD image representing the Ca^{2+} oscillatory activity initiated during bath application of 100 nM GnRH. It is clear that some gonadotrophs appear isolated (arrowheads), while others form clusters or chains of 2–7 cells. Examples of some of these clusters or chains are indicated by orange outlines in figure 8a. Green and red outlines in figure 8b (inset) indicate the contours of six gonadotrophs forming a cell chain (a1–b3). When $\Delta F(t)$ records obtained from these cells are examined in detail (fig. 8b), they display similar Ca^{2+} -signalling patterns in response to GnRH. Nonetheless, three neighbouring gonadotrophs (a1, a2, a3; green outlines) display mixed (plateau-oscillatory) Ca^{2+} responses while the three other cells (b1, b2, b3; red outlines) display oscillatory Ca^{2+} responses. These functional and anatomical associations are regularly observed throughout the mouse anterior pituitary in situ. On average, 9.4 ± 1.25 (SE) clusters were identified per slice/experiment ($n = 5$). Of these, 53% were formed by pairs and 46% were formed by more than two cells.

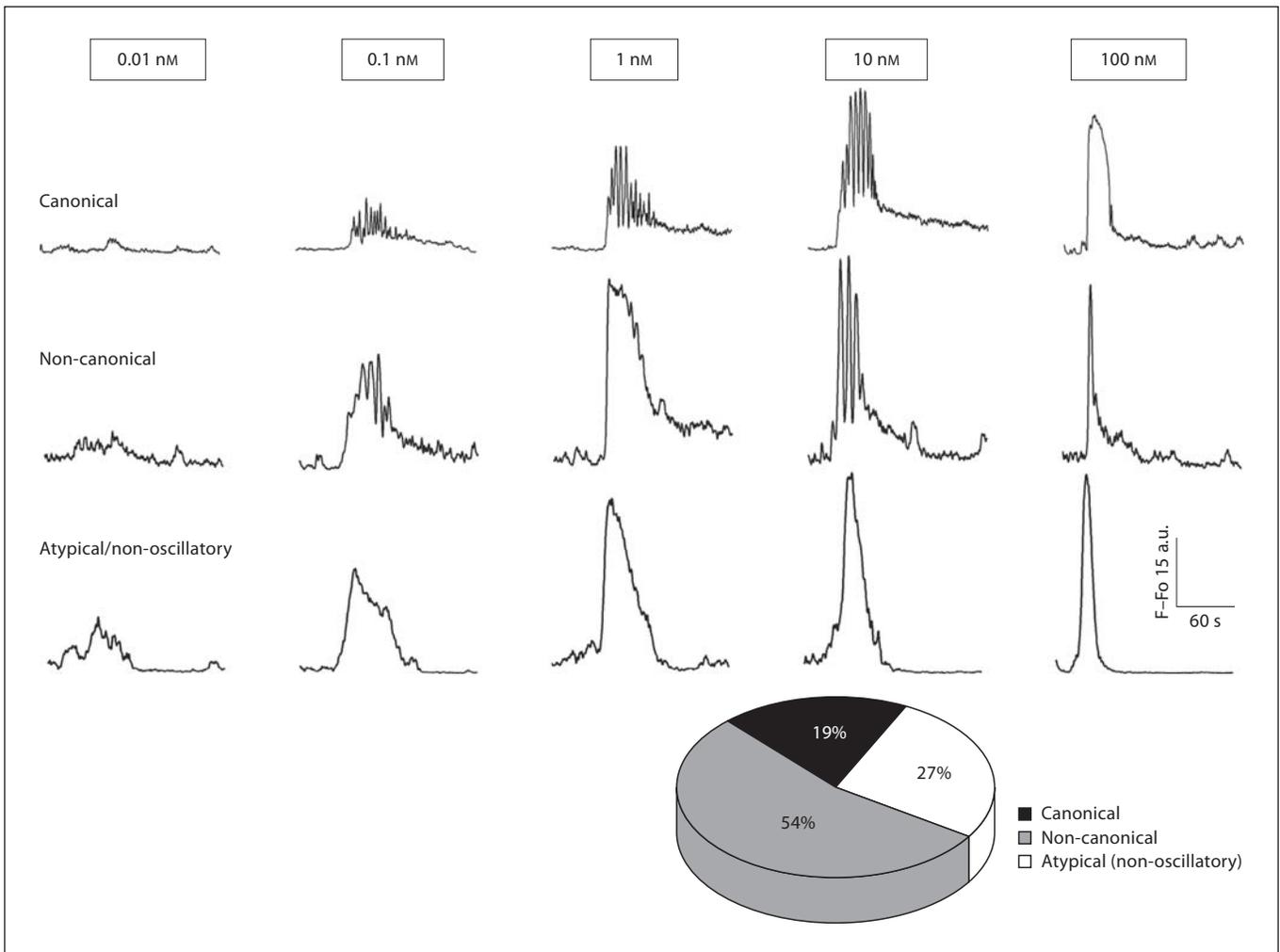


Fig. 4. Ca^{2+} response patterns elicited by increasing doses of GnRH in individual cells of mouse pituitary slices. When cells in the pituitary slice are exposed to increasing [GnRH]s, with a 30-min interval between GnRH applications, they display different types of response. Upper row: example of a cell which exhibited a canonical response pattern: Ca^{2+} oscillations of increasing frequency at higher [GnRH] concentrations which merge into a bi-phasic, peak-plateau response at saturating [GnRH]. Middle row:

example of a cell which displayed a non-canonical response pattern: an oscillatory Ca^{2+} response at 0.1 nM GnRH, non-oscillatory responses at 0.01 and 1 nM, and again an oscillatory response at 10 nM. Bottom row: example of a cell which showed an atypical response pattern: non-oscillatory responses at all [GnRH], although with a dose-response progression. The pie graph at the bottom summarizes the percentage of cells displaying the different response patterns.

Correlated Activity of Pairs of Gonadotrophs from the Same Cluster Increases during the Application of GnRH

It has been demonstrated that anterior pituitary somatotrophs in situ are electrically coupled throughout the gland. In addition, they display synchronous oscillations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [4], both at rest and after stimulation [5]. Gonadotrophs express gap-junction subunits [6], but they do not appear to be extensively interconnected [16, 17]. Figure 8c illustrates simultaneous $\Delta F(t)$ recordings from two neighbouring cells (a, b; see inset in fig. 8c). These cells

were chosen for analysis because they also showed spontaneous fluctuations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence of GnRH (see below). Before GnRH application (time segment labelled A1 in fig. 8c) cells displayed non-correlated spontaneous activity. When the $\Delta F(t)$ of one cell was plotted versus the $\Delta F(t)$ of the other cell (fig. 8d), the correlation coefficient calculated over this time interval is low ($R = 0.02$). In contrast, during the time when GnRH was applied (see fig. 8c; time segment A2), both cells display almost identical Ca^{2+} -signalling responses, including an

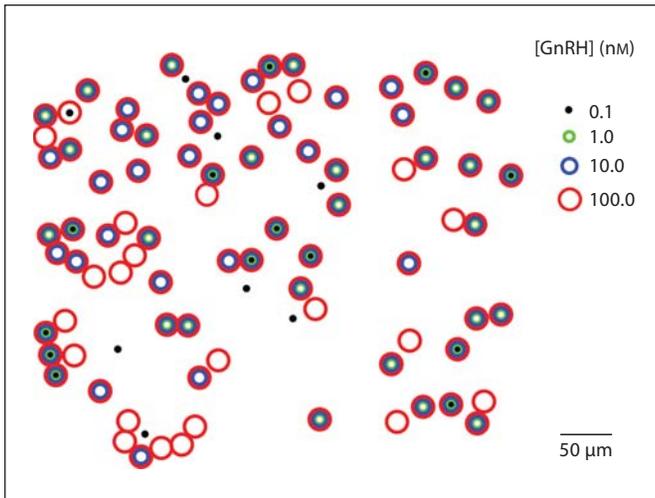


Fig. 5. Most cells responding to a low concentration of GnRH also respond to a higher GnRH concentration. A pituitary slice was exposed to four concentrations of GnRH (0.1, 1, 10 and 100 nM), and the position of all cells responding to each [GnRH] within the same field of view were plotted with different symbols. This experiment was chosen for analysis because individual cells could be clearly distinguished and the slice position and plane of focus remained constant throughout nearly 3 h of recording. From 21 cells that responded to the lowest [GnRH] (0.1 nM; black circles), 62% also responded when challenged with 1, 10 and 100 nM GnRH (green, blue and red circles, respectively). Most of the remaining cells only responded to 0.1 nM. Nonetheless, 100% of cells that responded to 1.0 nM GnRH also responded when challenged with 10 and 100 nM GnRH.

early peak, a plateau-like phase and gradually decaying Ca^{2+} oscillations. The correlation coefficient between these cells increased drastically during the application of GnRH ($R = 0.87$, see fig. 8e). The correlation coefficient of 51 cell pairs from the same cluster during the response to GnRH was 0.75 ± 0.02 (mean \pm SE). In contrast, when pairs of gonadotrophs were not members of the same cluster, the correlation coefficient remained relatively low (0.45 ± 0.09 ; mean \pm SE; $n = 23$ pairs).

Effects of 18 α -Glycyrrhetic Acid, a Specific Gap-Junction Channel Blocker on the Synchronized Responses of Neighbouring Cells during GnRH-Induced Ca^{2+} Oscillations

One possible explanation for synchronous activity and high correlation coefficient of Ca^{2+} signals between neighbouring cells is the presence of gap junctions which could transmit electrical and/or chemical signals between them. To assess this possibility, we tested the effects of 18 α -glycyrrhetic acid (AGA), a specific gap-junction channel

blocker on synchronized responses of neighbouring cells during GnRH-induced Ca^{2+} oscillations. Figure 9a illustrates Ca^{2+} recordings from two neighbouring cells with synchronous Ca^{2+} responses to 10 nM GnRH (correlation coefficient $R = 0.93$ (see fig. 8b)). Cells were then exposed for 10 min to 100 μ M AGA, and the responses to GnRH were tested again. Although resting Ca^{2+} levels were unstable and GnRH-induced Ca^{2+} oscillations became noisier and of lower frequency after AGA exposure (see fig. 9c), the correlation coefficient remained relatively high ($R = 0.88$; fig. 9d). When 16 cell pairs with high correlation coefficient were examined before and after the incubation with AGA, the mean correlation coefficient obtained was 0.91 ± 0.01 (SE) for the control condition and 0.88 ± 0.02 (SE) after AGA treatment. Values obtained before and after AGA treatment were not statistically significant ($p = 0.54$; paired Student's test). When halothane, another gap-junction blocker, was used (1 mM, 5 min exposure), cells deteriorated rather quickly, and responses to GnRH almost disappeared, making the comparison impractical (data not shown). The conclusion from these experiments is that synchronization of responses to GnRH in neighbouring gonadotrophs from the same cluster does not appear to be mediated by gap-junction channels. Another possible explanation could be a chemical signal released to the medium which could promote synchronization of GnRH responses between neighbouring cells. An obvious candidate for such paracrine actions is ATP, which is co-released with LH [18, 19]. To examine this possibility, cells were exposed to Suramine (100 μ M, 5 min incubation) an antagonist of the purinergic P2 receptors present in gonadotrophs [18]. The correlation coefficient between cell pairs showing synchronous GnRH-induced Ca^{2+} oscillations did not diminish significantly after incubation with Suramine ($n = 5$, data not shown).

Discussion

GnRH-Induced Patterns of Intracellular Ca^{2+} Signalling Recorded from GnRH-Responding Cells in situ

Digital imaging of $[Ca^{2+}]_i$ in the mouse pituitary slice allows the concomitant study of tens to hundreds of GnRH-responding cells and the analysis of their responses with single cell resolution. This permits collection of highly parallel data sets that can be used to assess the behaviour of a significant fraction of the population of gonadotrophs in situ, unlike most other techniques that limit measurements to few cells per experiment in iso-

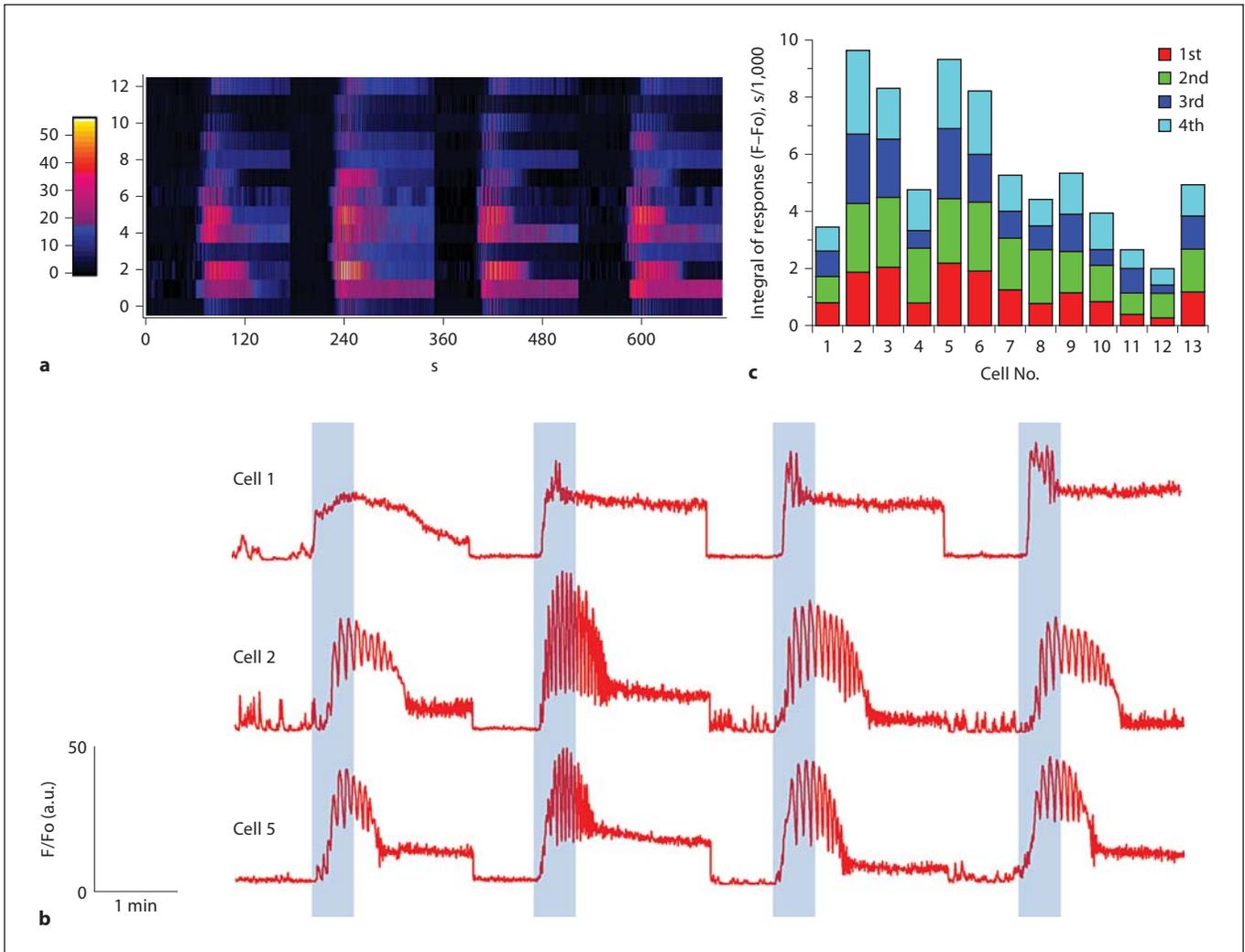


Fig. 6. GnRH-induced Ca^{2+} -signalling patterns of individual cells are characteristic and remain invariant over long periods of observation. **a** Multi-cell $\Delta F(t)$ plot illustrating fluctuations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 13 individual GnRH-responding cells from the same field of view to four applications of 10 nM GnRH. While 30 min were allowed between consecutive GnRH applications (see Methods), records were plotted next to each other for comparison. Notice that each cell appears to respond repeatedly to GnRH in a distinct and almost identical manner, both in latency, oscillatory pattern and

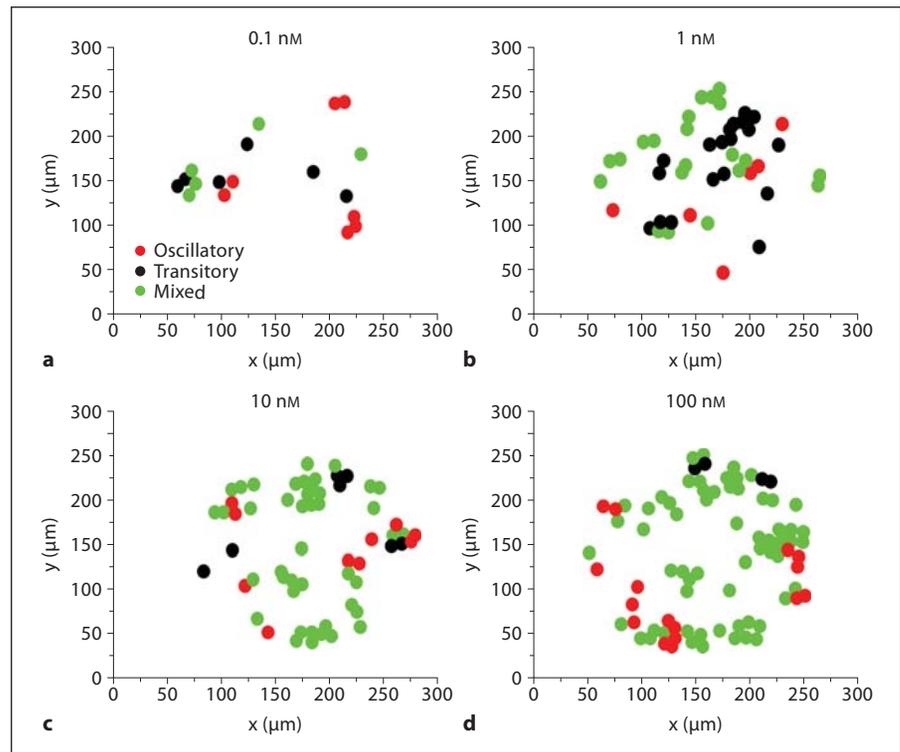
duration. **b** Examples of GnRH-induced responses from cells 1, 2 and 5 in graph **a**. GnRH applications are indicated with blue bars. Repetitive responses from the same cell are very similar, despite the long interval between them. **c** Bar plot of the time integrals of GnRH-induced responses from each of the 13 cells. For every individual cell (abscissa), the magnitude of the time integral of each response to GnRH is plotted as stacked bars (ordinate). Mean increments of time integral of successive GnRH applications are not statistically different ($p = 0.21$; one-way ANOVA).

lated cells in tissue culture. To our knowledge, this approach has not been attempted before. The study of GnRH-induced Ca^{2+} signalling in the acute mice pituitary gland might be of potential relevance for characterizing GnRH actions in gonadotrophs in transgenic and knockout animals.

Responses of individual cells to the same dose of the agonist vary significantly in magnitude, latency, duration

and frequency of oscillations. For simplicity, here we chose to study responses from adult male mice. Nevertheless, it is well established that GnRH induces LH secretion in female rats (particularly during proestrus) at levels fourfold greater than those of male rats [13, 20]. Therefore, it is possible that some of the conclusions derived from this study must be modified when recordings obtained from female pituitary gonadotrophs are analyzed.

Fig. 7. GnRH-responding cells are organized in cell clusters exhibiting similar Ca^{2+} -signalling patterns. **a–d** Spatial distribution maps of GnRH-responding cells from the same field of view in a mouse anterior pituitary slice as a function of [GnRH] (original images were obtained with a 20 \times objective). GnRH concentrations used were 0.1 nM (**a**), 1 nM (**b**), 10 nM (**c**) and 100 nM (**d**). Cells were classified in three categories according to their Ca^{2+} -signalling patterns: (a) oscillatory, (b) transitory and (c) mixed (i.e. oscillatory and transitory), and their positions indicated with circles of different colour (red, black and green, respectively). Notice that cells with a given response pattern (colour) tend to appear next to each other. The tendency of similarly-responding cells to appear together is seen most clearly in **c** and **d**.



Spatial Distribution of GnRH-Responding Cells in the Anterior Pituitary of the Adult Male Mouse

When maps of GnRH-responding cells at increasing GnRH concentrations are compared, it is clear that they are distributed indiscriminately throughout the anterior pituitary. These results are in disagreement with early anatomical studies in male rat pituitary showing that gonadotrophs are significantly more abundant in the anterior portion of the gland, particularly near the border between pars distalis and pars intermedia (the so-called sex zones [21]). However, the existence of an antero-posterior gradient of gonadotrophs requires confirmation in male mouse pituitary and the distribution of GnRH-responding cells in our experiments does not necessarily represent the distribution of the total population of gonadotrophs. It has been shown that individual gonadotrophs can show Ca^{2+} responses at GnRH concentrations that were insufficient to produce hormone secretion [2]. Moreover, approximately 50% of the population of gonadotrophs genetically identified by the expression of the GnRH receptor do not secrete gonadotrophins in response to the secretagogue [22]. Thus, GnRH-responding cells probably represent a subset of the entire gonadotroph population. Further investigation will be required to determine which percentage of GnRH-responding

cells contain LH and/or FSH (and therefore, can be unambiguously identified as gonadotrophs).

Recruitment of GnRH-Responding Cells as a Function of [GnRH]

The effects of GnRH on the gonadotroph population in male mouse pituitary were evaluated simply by counting the number of responding cells at each [GnRH]. The dose-response curve fitted to the mean data from seven different slices (one slice per animal) gave an $\text{ED}_{50} = 0.56$ nM. This value is similar to that obtained by measuring GnRH-stimulated inositol phosphate production in cultured COS-7 cells expressing the rat GnRH receptor ($\text{ED}_{50} = 1.5 \pm 0.48$ nM [23]), and LH release from cultured pituitary cells from ovariectomized adult female rats ($\text{ED}_{50} \sim 0.7$ nM [24]), and the number of LH-secreting cells in pituitary cultures from metestrous rats ($\text{ED}_{50} \sim 0.8$ nM [2]). When dose-response curves from different pituitaries are compared, they can be divided in two groups: a high affinity group (mean $\text{ED}_{50} = 0.39$ nM) and a low affinity group (mean $\text{ED}_{50} = 2.35$ nM). The mean ED_{50} of all these ED_{50} values is 0.95 ± 0.99 nM (mean \pm SE). We could not find an explanation for the sixfold discrepancy in GnRH sensitivity between the high affinity group of pituitary slices and the two instances with low

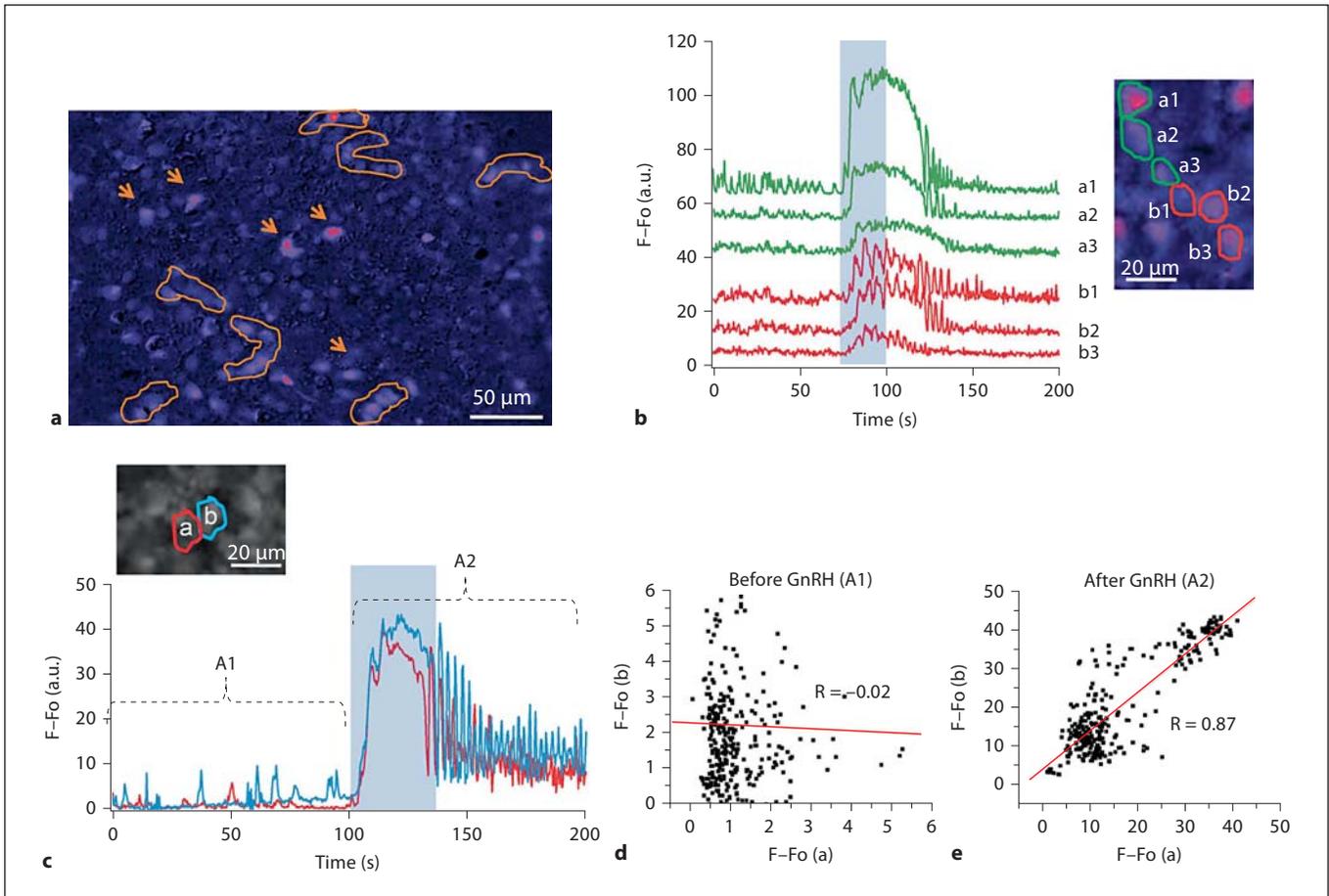


Fig. 8. Similarity of GnRH-induced Ca^{2+} -signalling patterns of neighbouring cells within clusters. Correlation index increases during GnRH exposure. **a** SD image summarizing the effects of the application of 100 nM GnRH in the anterior pituitary region of a mouse pituitary slice. This image was obtained from the movie segment comprising the 100 s that followed the beginning of GnRH application. Isolated (arrows) and clusters or chains (orange outlines) of GnRH-responding cells are indicated. **b** Examples of Ca^{2+} -signalling patterns of six gonadotrophs from the cell chain shown in the inset. Overall, the responses are quite similar, but three neighbouring cells (a1, a2, a3; green outlines) display mixed Ca^{2+} responses and the three other cells (b1, b2, b3; red

outlines) display mostly oscillatory responses. **c** $\Delta F(t)$ recordings from two neighbouring gonadotrophs (red and blue outlines; see inset). During the first time segment (A1), spontaneous non-correlated Ca^{2+} fluctuations were recorded in both cells. During the second time segment (A2) nearly identical Ca^{2+} responses were recorded from both cells after application of 100 nM GnRH. **d, e** ΔF values recorded from the two cells were plotted one against the other to evaluate their degree of correlation. Before GnRH application (time segment A1), the correlation coefficient is low ($R = 0.02$), but this parameter increases notably during GnRH application ($R = 0.87$; time segment A2). GnRH applications (100 nM) are indicated with blue bars.

affinity. Differences in age or reproductive status of the mice can be excluded (see Methods). It would be interesting to confirm the existence of inter-individual differences in a larger sample of specimens. A recent report has shown that pancreatic islet cells from individual mice display Ca^{2+} oscillations with a period which is unique to each mouse, and that all islets from an individual mouse demonstrate similar rhythms to one another [25].

Canonical and Non-Canonical Patterns of Intracellular Ca^{2+} in Response to Increasing Doses of GnRH

The finding that only a minor fraction ($\sim 20\%$) of gonadotrophs in situ display high amplitude Ca^{2+} oscillations and 'canonical' progression in the dose-response pattern at increasing GnRH concentrations was somewhat surprising. In contrast, non-canonical dose-response patterns (oscillatory responses at a given [GnRH])

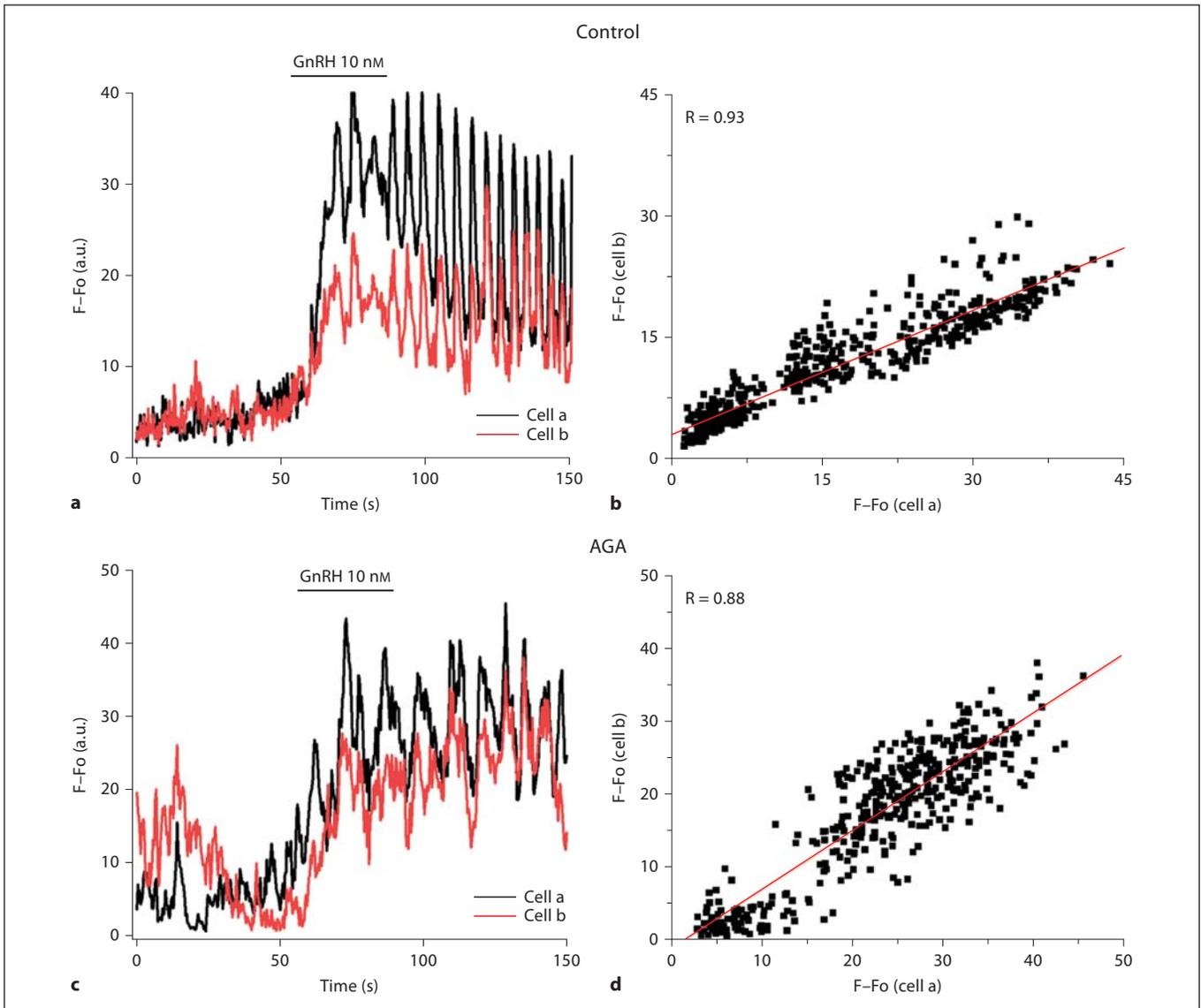


Fig. 9. The high correlation index between pairs of gonadotrophs during GnRH-induced Ca^{2+} responses is not affected after incubation with the gap-junction channel blocker AGA. **a** GnRH responses from two neighbouring cells under control conditions. GnRH (10 nM) application is indicated by the horizontal bar. **b** ΔF values of both cells during the 100 s that followed the beginning of GnRH application were plotted one against the other. The correlation coefficient

efficient fitted to these data was high ($R = 0.93$). **c** GnRH responses from the same cell pair were examined after incubation with AGA (100 μ M, 10 min). The responses of the two cells continue to be similar. **d** ΔF values of the two cells were plotted one against the other during the 100 s that followed the beginning of GnRH application. The correlation coefficient fitted to these data still gives a relatively high value ($R = 0.88$) after incubation with AGA.

and non-oscillatory transient responses at both lower and higher concentrations), were significantly more recurrent ($\sim 55\%$ of cells). It remains to be seen if the deviation from the 'canonical' behaviour in gonadotrophs in situ results from time-dependent fluctuations of GnRH threshold [2], possibly due to paracrine cell interactions in the gland [26]. In this regard, it has been speculated

that Ca^{2+} waves travelling across the network of FS cells in the intact gland could affect (for example by releasing follistatin or activin) the signalling pattern and hormone release of gonadotrophs [7, 8, 27]. A notable subset of GnRH-responding cells (30%) which display dose-dependent non-oscillatory increases in $[Ca^{2+}]_i$. These responses, which have not been described in adult gonado-

trophs before, are reminiscent of amplitude-modulated, non-oscillatory GnRH responses recorded from immature [28] and cloned pituitary gonadotrophs [29]. Alternatively they could correspond to multi-functional cells, like somato-gonadotrophs, which respond poorly to GnRH [30]. It also remains to be determined if the variation of responses to GnRH within the gonadotroph population is due to intrinsic properties (including the stage of cell maturation or cell cycle).

Most Cells with Low GnRH Threshold Also Respond to Higher GnRH Concentrations

From previous reports [1–3], it is reasonable to assume that cells with high sensitivity to GnRH will continue responding at higher [GnRH]s. As shown in figure 5, this is not always the case. The majority (62%) of cells responding to 0.1 nM GnRH also responded to 1, 10 and 100 nM GnRH. Interestingly, most of the remaining cells responded exclusively to 0.1 nM GnRH. It is conceivable that these cells were in fact immature gonadotrophs or even non-gonadotrophs, and that upon exposure to GnRH they exhausted a limited pool of second messengers (or even stored intracellular Ca^{2+}) needed for repeated GnRH responses. In contrast, 100% of cells that responded to 1.0 nM GnRH also responded both to 10 and 100 nM GnRH. These results rule out a possible residual effect of GnRH, in agreement with previous reports on perfused pituitary cultures, showing that a 30-min interval between GnRH applications is sufficient to avoid subsequent priming or desensitization of LH secretion [15].

Regularity of Single-Cell GnRH-Induced Ca^{2+} Signalling over Long Periods of Observation

In our experiments, an interval of 30 min was employed before a new concentration of GnRH was applied to minimize desensitization or other cumulative effects of GnRH. In rat male pituitary it has been shown that GnRH-induced peaks of LH secretion are small and their amplitude remains stable after repetitive GnRH applications with inter-stimulus intervals of 1 h for up to 9 h recording [13]. As explained above, responses of individual cells to GnRH vary considerably, reflecting a range of concentration-response properties in the population of gonadotrophs at the single cell level [2]. Conversely, when the same dose of GnRH is applied repeatedly, cells respond in a characteristic and near-identical manner both in latency, oscillatory pattern and duration. The observation that individual cells can react to repeated agonist applications with an individual and reproducible ‘signature’ has been reported before in cultured gonadotrophs [28, 31]. This

intriguing phenomenon (termed ‘ Ca^{2+} fingerprint’) was first described by Prentki and co-workers [32, 33] from experiments in which Ca^{2+} responses to muscarinic agonists were elicited in individual insulinoma cells.

To compare repeated GnRH responses of individual cells quantitatively, the time integral under the Ca^{2+} -dependent fluorescence changes corresponding to each GnRH application was calculated (see fig. 6c). We chose this measurement as Ca^{2+} -dependent effects (including hormone secretion) result from Ca^{2+} signal integration, which are best represented by the time integral of the Ca^{2+} signal, rather than by the amplitude or frequency of Ca^{2+} oscillations [34]. When time integrals of the Ca^{2+} signals from all cells were averaged, we found that the mean increments produced by each GnRH application were not statistically different from each other ($p = 0.21$; one-way ANOVA). These data corroborate our observation that individual cells display a characteristic response to GnRH, which is initiated on a regular basis every time the same dose of the agonist is applied. The fact that Ca^{2+} -signalling patterns in response to GnRH in situ are robust, predetermined and stable over long periods of observation, contradicts our suggestion that the non-canonical pattern of response could be due to fluctuations of GnRH sensitivity due to autocrine/paracrine interactions. It remains to be determined if the invariant response to repeated applications of GnRH is a property of cells showing canonical response patterns, or if it is also present in cells with non-canonical response patterns.

Coordinated Ca^{2+} Signals in Clusters of Gonadotrophs in situ

Our experiments have shown that gonadotrophs in situ are organized in cell clusters with similar GnRH-induced Ca^{2+} -signalling patterns. It has been reported that gonadotrophs accumulate near the anterior margins of the anterior pituitary and form clusters near and around blood vessels [21]. These arrangements could have functional implications regarding the distribution of GnRH and other hypothalamic factors by the microcirculation of the intact gland. We could not confirm such arrangement in the distribution of GnRH-responding cells in the mouse pituitary (see above). Nevertheless, at relatively high magnification it became obvious that gonadotrophs form small clusters or chains of cells. When they were classified according to their Ca^{2+} -signalling pattern in response to GnRH, it became clear that cells with similar responses are spatially grouped together. This predisposition of neighbouring cells to display similar responses is present in other cell types from the pituitary, where

synchronous fluctuations in $[Ca^{2+}]_i$ have been recorded [4, 5]. Pancreatic β cells within islets of Langerhans also display synchronous oscillatory electrical activity and Ca^{2+} fluctuations [25, 35, 36].

Mechanism of Synchronization between Pairs of Gonadotrophs

An obvious mechanism for the observed synchronization of Ca^{2+} signals between gonadotrophs would be the sudden exposure to GnRH. Nevertheless, while GnRH application is relatively fast (maximal concentration reached within 10 s), the latency of the initial GnRH response vary significantly between cells [2]. For example, in a given experiment (100 nM [GnRH]) the earliest and latest latencies differed by 28 s, the mean latency was 53.3 s and the standard deviation of the mean was 4.5 s (data not shown). It is unlikely that synchronization between cells results from rapid GnRH application.

GnRH increases the correlation coefficient between pairs of gonadotrophs from the same cluster. To quantify the extent to which GnRH-induced patterns among cell pairs from the same cluster were similar, their $\Delta F(t)$ traces were plotted one against the other, and the correlation index between them was computed (see fig. 8d). An interesting observation is that the correlation coefficient between $\Delta F(t)$ recordings from cell pairs within clusters increases during the application of GnRH. In contrast, the correlation coefficient between pairs of gonadotrophs from different clusters remained low during GnRH exposure. Since high values of correlation index were related to cell closeness, we hypothesized that the mechanism for synchronization could be diffusion of second messengers or even Ca^{2+} itself through gap junctions. Nevertheless, when cell pairs with highly correlated GnRH oscillatory activity were exposed to AGA, a specific gap-junction channel blocker, the correlation index between their recordings $\Delta F(t)$ recordings did not diminish significantly (fig. 9c, d). These results are in agreement with anatomical reports showing that although gonadotrophs from the pituitary express gap-junction subunits [6], they are not extensively interconnected [16, 17]. In an unrelated study, it was observed that AGA at the same concentration used here, does not affect synchronous Ca^{2+} fluctuations between pairs of somatotrophs in the pituitary GH-GFP transgenic mice [C. Sánchez-Cárdenas and P. Mollard, unpubl. observations]. Therefore the involvement of pituitary gap junctions in synchronous Ca^{2+} fluctuations awaits confirmation with more specific blockers.

If gap-junction channels were not involved in correlated GnRH-induced Ca^{2+} signalling between pairs of

gonadotrophs from the same cluster, then another explanation could be that a chemical signal released to the medium could promote synchronization of GnRH responses between neighbouring cells. One candidate for such paracrine actions is ATP which is co-released with LH to the medium [18, 19]. However, when we tested the effects of Suramine, an antagonist of the purinergic P2 receptors present in gonadotrophs [18], the correlation coefficient did not change significantly (data not shown).

Although we cannot discard the role of direct cell-cell interaction, we would like to propose an alternative explanation for the synchronization of GnRH-induced Ca^{2+} signalling in pituitary gonadotrophs. Perhaps there is no synchronization of GnRH responses after all, but merely the appearance of synchronized activity (pseudo-synchronization). If two neighbouring gonadotrophs from the same cluster derive from one another or from a common precursor, they should contain identical genetic (and similar epigenetic) information. Their phenotype could thus be highly similar, as well as their ' Ca^{2+} fingerprint', namely the predisposition to respond to GnRH with a characteristic and identical Ca^{2+} signal both in latency, oscillatory pattern and duration. If two such cells exist, we predict that their responses would be virtually identical when challenged by the same dose of secretagogue, thus producing a high correlation coefficient when their $\Delta F(t)$ traces are plotted one against the other. They could easily be mistaken for cells synchronized by direct contact or diffusible factors. Naturally, under these conditions a 'mechanism' for synchronization would not be found. It remains to be established if this proposal accounts for the apparent synchronous activity of clusters of mouse pituitary gonadotrophs.

Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. Tatiana Fiordelisio, who established the line of pituitary research in our laboratory and provided invaluable insights and encouragement throughout this work. We also are grateful to Dr. Christopher Wood for many useful suggestions and for reviewing the text to conform standard English usage, to Nicolas Jiménez and Diana Millán for technical support, Claudia V. Rivera-Cerecedo, Head of the Institute's Animal Facility for continuous advice, and to Dr. Leon Islas for writing Igor software algorithms. CS-C received a PhD Fellowship from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, and additional support from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM). Financial support for this project was provided by grants from DGAPA-UNAM IN227307, IMPULSA, CTIC (UNAM) and CONACyT grants 42662 and 79763. This work was performed by CS-C as partial fulfillment of the requirements to obtain the PhD in Biomedical Sciences.

References

- Iida T, Stojilković SS, Izumi S, Catt KJ: Spontaneous and agonist-induced calcium oscillations in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol* 1991;5:949–958.
- Leong DA, Thorner MO: A potential code of luteinizing hormone-releasing hormone-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem* 1991; 266:9016–9022.
- Tomic M, Cesnajak M, Catt KJ, Stojilković SS, Izumi S, Catt KJ: Developmental and physiological aspects of Ca^{2+} signalling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 1994;135:1762–1771.
- Guérineau NC, Bonnefont X, Stoeckel L, Mollard P: Synchronized spontaneous Ca^{2+} transients in acute anterior pituitary slices. *J Biol Chem* 1998;273:10389–10395.
- Bonnefont X, Lacampagne A, Sanchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, Smallwood S, Carmignac D, Fontanaud P, Travo P, Alonso G, Courtois-Coutry N, Pincus SM, Robinson IC, Mollard P: Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16880–16885.
- Yamamoto T, Hossain MZ, Hertzberg EL, Uemura H, Murphy LJ, Nagy JI: Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Histochemistry* 1993;100:53–64.
- Fauquier T, Guérineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P: Folliculo-stellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8891–8896.
- Winters SJ, Moore JP: Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction* 2004;128:13–23.
- Schwartz J, Cherny R: Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocr Rev* 1992;13:453–475.
- Evans JJ: Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 1999;20:46–67.
- Denef C: Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 2008;20:1–70.
- Bonnefont X, Fiekers J, Creff A, Mollard P: Rhythmic bursts of calcium transients in acute anterior pituitary slices. *Endocrinology* 2000;141:868–875.
- Loughlin JS, Naddaff PG, Badger TM: LH responses to LHRH in perfused pituitary cell culture: sex differences in the rat. *Am J Physiol* 1984;246:E145–E152.
- Tobin VA, Canny BJ: Testosterone regulates gonadotropin-releasing hormone-inducing calcium signals in male rat gonadotrophs. *Endocrinology* 1996;137:1299–1305.
- Loughlin JS, Badger TM, Crowley WF Jr: Perfused pituitary cultures: a model for LHRH regulation of LH secretion. *Am J Physiol* 1981;240:E591–E596.
- Soji T, Herbert DC: Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 1989;224:523–533.
- Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Horiuchi O, Yashiro T, Kikuchi M, Hashimoto Y, Tsuroo Y, Herbert DC, Soji T: 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. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;278:462–473.
- Tomic M, Jobin RM, Vergara LA, Stojilkovic SS: Expression of purinergic receptor channels and their role in calcium signaling and hormone release in pituitary gonadotrophs. Integration of P2 channels in plasma membrane- and endoplasmic reticulum-derived calcium oscillations. *J Biol Chem* 1996;271: 21200–21208.
- Stojilkovic SS, Koshimizu T: Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:218–225.
- Krieg RJ Jr, Batson JM, Martha PM Jr, Matt DW, Salisbury RL, Evans WS: Gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion by perfused pituitary cells from normal, gonadectomized, and testicular feminized rats. *Endocrinology* 1990;126:3022–3027.
- Dada MO, Campbell GT, Blake CA: The localization of gonadotrophs in normal adult male and female rats. *Endocrinology* 1984; 114:397–406.
- Wen S, Schwarz JR, Niculescu D, Dinu C, Bauer CK, Hirdes W, Boehm U: Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology* 2008;149:2701–2711.
- Leaños-Miranda A, Ulloa-Aguirre A, Cervini LA, Janovick JA, Rivier J, Conn PM: Identification of new gonadotrophin-releasing hormone partial agonists. *J Endocrinol* 2006;189:509–517.
- Apfelbaum ME: Basal and gonadotrophin-releasing hormone-induced biosynthesis and release of luteinizing hormone: effect of calcium deprivation. *Mol Cell Endocrinol* 1992;89:111–120.
- Nunemaker CS, Zhang M, Wasserman DH, McGuinness OP, Powers AC, Bertram R, Sherman A, Satin LS: Individual mice can be distinguished by the period of their islet calcium oscillations: is there an intrinsic islet period that is imprinted in vivo? *Diabetes* 2005;54:3517–3522.
- Schwartz J, Van de Pavert S, Clarke I, Rao A, Ray D, Vrana K: Paracrine interactions within the pituitary gland. *Ann NY Acad Sci* 1998;839:239–243.
- Mabuchi Y, Shirasawa N, Sakuma E, Hashimoto Y, Kuno M, Coombs RJ, Herbert DC, Soji T: Intercellular communication within the rat anterior pituitary: relationship between LH-RH neurons and folliculo-stellate cells in the pars tuberalis. *Cell Tissue Res* 2004;317:79–90.
- Zemkova H, Vanecek J: Differences in gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling between melatonin-sensitive and melatonin-insensitive neonatal rat gonadotrophs. *Endocrinology* 2000;141:1017–1026.
- Merelli F, Stojilkovic SS, Iida T, Krsmanovic LZ, Zheng L, Mellon PL, Catt KJ: Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 1992;131:925–932.
- Villalobos C, Nuñez L, García-Sancho J: Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch* 2004;449:257–264.
- Zemkova H, Balik A, Kretschmannova K, Mazna P, Stojilkovic SS: Recovery of $Ins(1,4,5)$ -trisphosphate-dependent calcium signaling in neonatal gonadotrophs. *Cell Calcium* 2004;36:89–97.
- Prentki M, Glennon MC, Thomas AP, Morris RL, Matschinsky FM, Corkey BE: Cell-specific patterns of oscillating free Ca^{2+} in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J Biol Chem* 1998;263:11044–11047.
- Thomas AP, Bird GS, Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW Jr: Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 1996;10:1505–1517.
- Tóth S, Huneau D, Banrezes B, Ozil JP: Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 2006;131:27–34.
- Jonas JC, Gilon P, Henquin JC: Temporal and quantitative correlations between insulin secretion and stably elevated or oscillatory cytoplasmic Ca^{2+} in mouse pancreatic β cells. *Diabetes* 1998;47:1266–1273.
- Ravier MA, Güldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Söhl G, Wolheim CB, Willecke K, Henquin JC, Meda P: Loss of connexin 36 alters β -cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca^{2+} and insulin oscillations and basal insulin release. *Diabetes* 2005;54:1798–1807.