



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Efectos de la castración sobre los patrones de señalización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la estimulación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GNRH) en rebanadas de hipófisis de ratón macho

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. María Luisa Durán Pastén

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Arturo Hernández Cruz- Instituto de Fisiología Célular

COMITÉ TUTOR

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia-Instituto de Fisiología Celular

Dr. Andrés Quintanar Stephano- Universidad Autónoma de Aguascalientes

MÉXICO, D. F. Mayo de 2013



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.

Abstract	4
Resumen	5
Glosario	6
Introducción	
• Generalidade	8
• Hipotálamo	9
• Hipófisis. (Anatomía)	13
• Hipófisis (Hipófisis Anterior)	14
• Gonadotropos	14
• GnRH	16
• GnRH-R	17
• Acción de gonadotropinas en macho	20
• Asa de retroalimentación negativa	
• Activina-Inhibina	21
• Andrógenos	21
• Dinámica de Ca ²⁺ intracelular	23
• Rebanadas de adenohipófisis	29
Hipótesis	31
Objetivos	31
Materiales y Métodos	32
• Obtención de rebanadas de hipófisis.	33
• Obtención de los registros de Ca ²⁺ intracelular en células individuales de la rebanada de hipófisis	34
• Sustancias utilizadas	36
• Análisis de resultados	37
• Análisis de datos	39
Resultados	40
• Verificación del efecto de la castración	40
• Registros de patrones de señalización de Ca ²⁺ intracelular inducidas por GnRH de gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón macho.	40
• La castración afecta la proporción de células con respuestas de Ca ²⁺ a GnRH canónicas, no canónicas y atípicas.	43
• Número y tamaño de las células que responden a GnRH después de la castración.	45
• ¿Los gonadotropos hipertrofiados de ratones castrados generan diferentes señales de Ca ²⁺ en respuesta a GnRH?	50
• Área bajo la curva de las respuestas de Ca ²⁺ inducidos por GnRH en gonadotropos <u>in situ</u> .	53

• Reclutamiento de las células que responden al GnRH en función de la concentración de GnRH en rebanadas de ratón control y ratón castrado.	56
• Cuantificación de los componentes de las respuestas de Ca^{2+} inducidos por GnRH en gonadotropos <u>in situ</u> .	57
• Número de oscilaciones por unidad de tiempo de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por GnRH en gonadotropos <u>in situ</u> .	63
Discusión	66
• La gonadectomía induce proliferación en las células que responden al GnRH	67
• La castración induce un crecimiento en las células que responden a GnRH.	68
• Componentes de la respuesta inducida por GnRH en gonadotropos in situ.	70
• Componentes en la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en gonadotropos in situ	71
Conclusiones	76
Referencias	78
Artículo	84

ABSTRACT

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binds to pituitary gonadotroph receptors, and initiates $[Ca^{2+}]_i$ signals and gonadotropin secretion. Here, we recorded GnRH-induced Ca^{2+} signals in acute pituitary slices from both intact and castrated male mice 15 and 45 days after orchiectomy (GnX). Cells responding with “non-canonical” sequences of Ca^{2+} signaling to increasing GnRH concentrations [GnRH] (oscillatory responses at a given [GnRH] and transient responses at both lower and higher concentrations) augmented significantly in the castrated mice. Also, 15 days after orchiectomy the number and size of gonadotrophs augmented, confirming earlier anatomical studies. Hypertrophied gonadotrophs after 15 days post-GnX tend to display GnRH-induced Ca^{2+} responses of greater amplitude. Furthermore, ED50 for GnRH decreased from 0.17 nM (control) to ~0.07 nM after GnX, suggesting increased GnRH responsiveness of the gonadotroph population. The progression of Ca^{2+} response patterns reported in control male rat gonadotrophs (oscillations declining and peak-plateau responses dominating at increasing [GnRH]) is less conspicuous in mice gonadotrophs *in situ*. Also, GnX-induced alterations in rat gonadotrophs (persistence of Ca^{2+} oscillations even at [GnRH] >100 nM) are not mirrored by mice gonadotrophs *in situ*. Contrary to observations in intact and 15-day castrated mice, after 45 days of orchiectomy, the hump component diminished and oscillations augmented with increasing [GnRH], but Ca^{2+} response patterns of gonadotrophs *in situ* remained virtually unchanged in response to [GnRH]s >1 nM, suggesting dose discrimination failure at high [GnRH]s. This study underscores the notion that GnRH responsiveness and the effects of testosterone deficiency may not be equal in pituitary gonadotrophs across species.

RESUMEN

La Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH) se une a su receptor en la membrada de los gonadotropos, iniciando así la señalización de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de gonadotropinas. En este trabajo, se registran las señales de Ca^{2+} en rebanadas de hipófisis de ratón macho intacto, y de 15 y 45 días después de la castración. Las células que presentan respuestas no-canónicas progresión de respuestas no ordenada, respuestas oscilatorias sin importar el tipo de dosis al cual son expuestas y transitorias desde bajas hasta dosis altas) aumenta significativamente en gonadotropos de ratones castrados. Así mismo, 15 días después de la castración el número y el tamaño de los gonadotropos aumenta, confirmando así lo observado con estudios anatómicos. Los gonadotropos hipertrofiados 15 días después de la castración tienen a mostrar respuestas de Ca^{2+} inducidas por GnRH de mayor amplitud. Además la dosis efectiva 50 (ED50) de GnRH disminuye de 0.17 nM (control) a ~0.07 nM después de la castración. La progresión de los patrones de respuesta de Ca^{2+} reportados en control de gonadotropos de rata macho (oscilaciones que declinan cuando aumenta la respuesta de tipo transitoria en función de la concentración de GnRH), es menos visible en gonadotropos de ratón *in situ*. Contrario a las observaciones en ratón intacto y castrado después de 15 días, después de 45 días el componente joroba disminuye y las oscilaciones aumentan a dosis crecientes de GnRH, pero los patrones de respuesta de Ca^{2+} de gonadotropos in situ permanecen prácticamente sin cambios en respuesta a dosis >1nM de GnRH, sugiriendo que a altas dosis de GnRH, fallan en discriminar la concentración de GnRH a la que son expuestas. Este estudio destaca que la respuesta a GnRH y los efectos de la deficiencia de la testosterona podrían no ser iguales en gonadotropos de diferentes especies.

GLOSARIO

AH	Adenohipófisis
NH	Neurohipófisis
ADH	Hormona Antidiurética
VP	Vasopresina
GH	Hormona de Crecimiento
PRL	Prolactina
ACTH	Hormona Adenocorticotropina
FSH	Hormona Folículoestimulante
LH	Hormona Luteinizante
GHRH	Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento
TRH	Hormona Liberadora de la Tirotropina
GnRH	Hormona Liberadora de las Gonadotropinas
GnRH-R	Receptor a la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas
GRCP	Receptores Acoplados a Proteínas G
IP₃	Inositol Trifosfato
PLC	Fosfolipasa C
DA	Dopamina
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante
SIRF	Somatostatina
OX	Oxitocina
SHGB	Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales
AR	Receptor de Andrógenos
T	Testosterona
5α-DHT	5α-Dihidrotestosterona
ER	Receptor de Estrógenos
Ca²⁺	Calcio libre ionizado
[Ca²⁺]_i	Concentración de Calcio Intracelular
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína Cinasa C
VGCC	Canales de Calcio Activados por Voltaje
K⁺	Potasio
SK	Canal de Potasio de baja conductancia activado por Calcio

UA	Unidades Arbitrarias
GnX	Castrado

INTRODUCCIÓN.

Generalidades.

La glándula hipófisis o pituitaria es conocida como la glándula orquestadora en el sistema endocrino de vertebrados, juega un papel crucial en las funciones endocrinas y no endocrinas del organismo y forma un puente importante entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. Junto con el hipotálamo, forma el eje hipotálamo-hipófisis, el cual se encarga de la regulación de la reproducción, metabolismo, crecimiento, lactancia, entre otros.

La hipófisis se encuentra unida al hipotálamo a través de la eminencia media o *tuber cinerum*, de donde surge el tallo hipofisario. Está rodeado desde abajo por una extensión anterior de la adenohipófisis denominada *pars tuberalis*. Esta estructura es penetrada en toda su extensión por numerosas asas capilares del plexo portal hipofisario de la circulación portal hipofisaria (Fanjul, Hiriart et al. 1998, Melmed 2011).

La unidad hipotálamo-hipófisis es un transductor neuroendocrino que media el tráfico de entrada entre el cerebro y la secreción hormonal de las glándulas blanco. Los reguladores de la retroalimentación positiva y negativa, son mediadores críticos el control biológico.

En respuesta a diferentes estímulos las neuronas hipotalámicas secretan neurohormonas liberadoras o inhibitorias ya sea de forma local y/o a la circulación porta-hipofisaria, impactando a las células de la hipófisis, regulando así la síntesis y secreción de hormonas. Estas hormonas peptídicas provenientes de la hipófisis son secretadas a la circulación sistémica llegando hasta sus órganos blanco y regulando así la liberación hormonal periférica en glándulas específicas.

La secreción hormonal hipofisaria es regulada en tres niveles (ejemplo Fig.1), el primero a nivel del **hipotálamo** comprende la liberación de hormonas hipotalámicas estimuladoras o inhibitorias que incidirán sobre la hipófisis. El segundo a nivel de **hipófisis**, comprende la regulación autocrina y paracrina intra-hipofisaria, y finalmente el tercer nivel involucra las asas de retroalimentación negativa ejercidas por hormonas específicas secretadas por

las **glándulas u órganos blanco**, quienes liberan a la circulación factores que actuaran a nivel tanto de hipófisis como de hipotálamo. (Figura 1A)

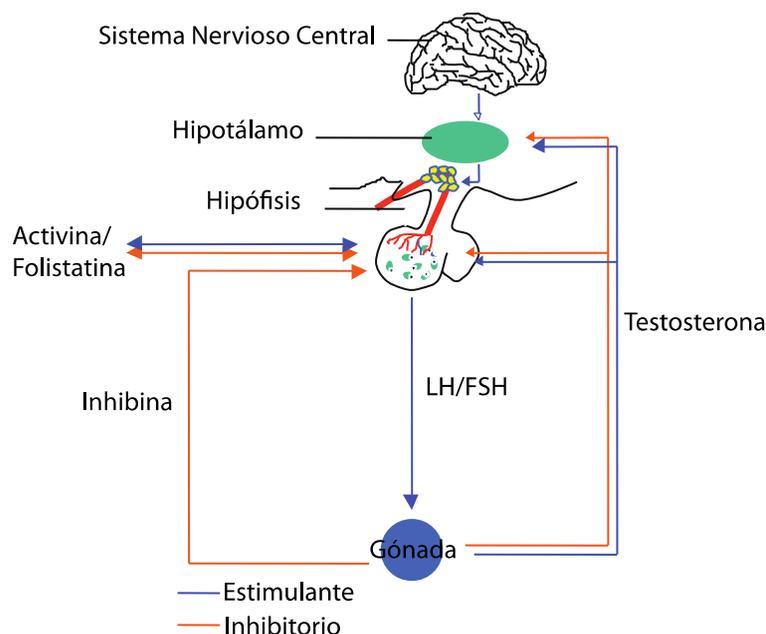


Fig.1 Esquema eje hipotálamo-hipófisis-órgano blanco. Las líneas azules representan las asas de retroalimentación positivas y las naranjas las asas de retroalimentación negativa. Modificada de (Melmed 2011,)

Hipotálamo

El hipotálamo (Figura 2A) constituye menos del 1% del volumen del cerebro y se encuentra en la base del diencefalo, debajo del tálamo y del tercer ventrículo. Los cuerpos neuronales hipotalámicos, producen diferentes factores que controlan la hipófisis; estos se encuentran agrupados en diferentes núcleos (Melmed 2011). Sin embargo, aquellos involucrados en la regulación de la hipófisis se encuentran localizados predominantemente en el hipotálamo basal y medial

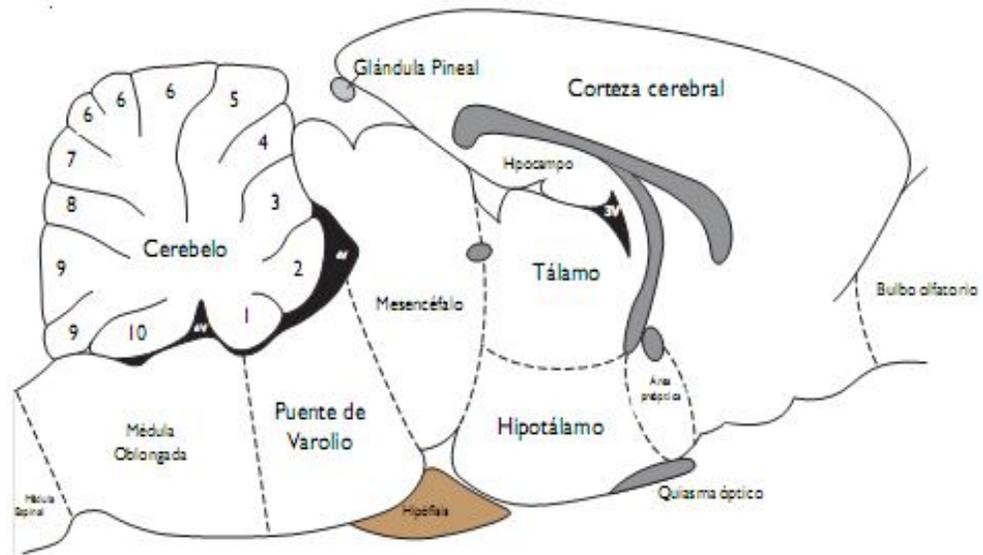
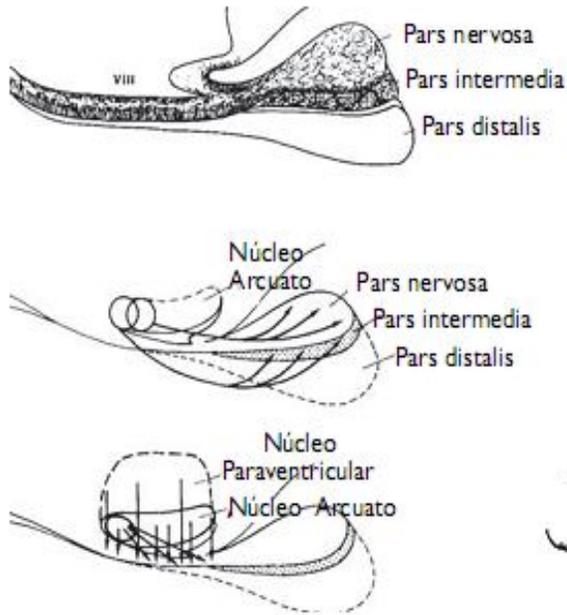
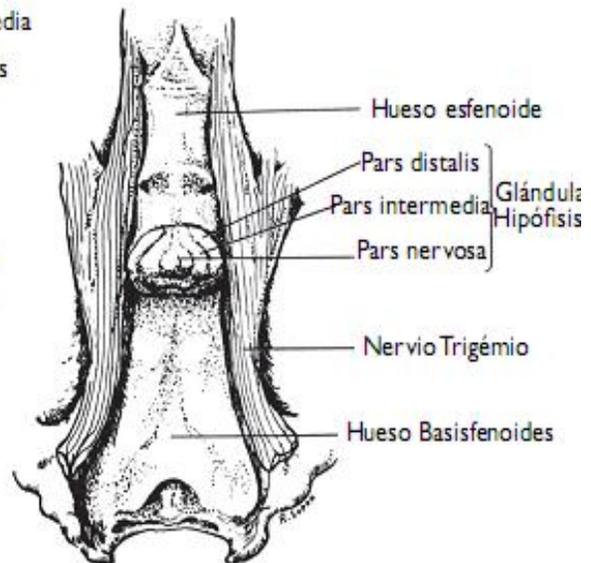
A**B****C**

Fig. 2 Ubicación y componentes de la glándula hipófisis de rata. A. Cerebro de rata, donde se observa el hipotálamo y la hipófisis (Green 1966). B) Vista transversal de la glándula hipófisis de rata, y sus divisiones. C. Vista coronal de la hipófisis (Björklund and Lindvall 2011)

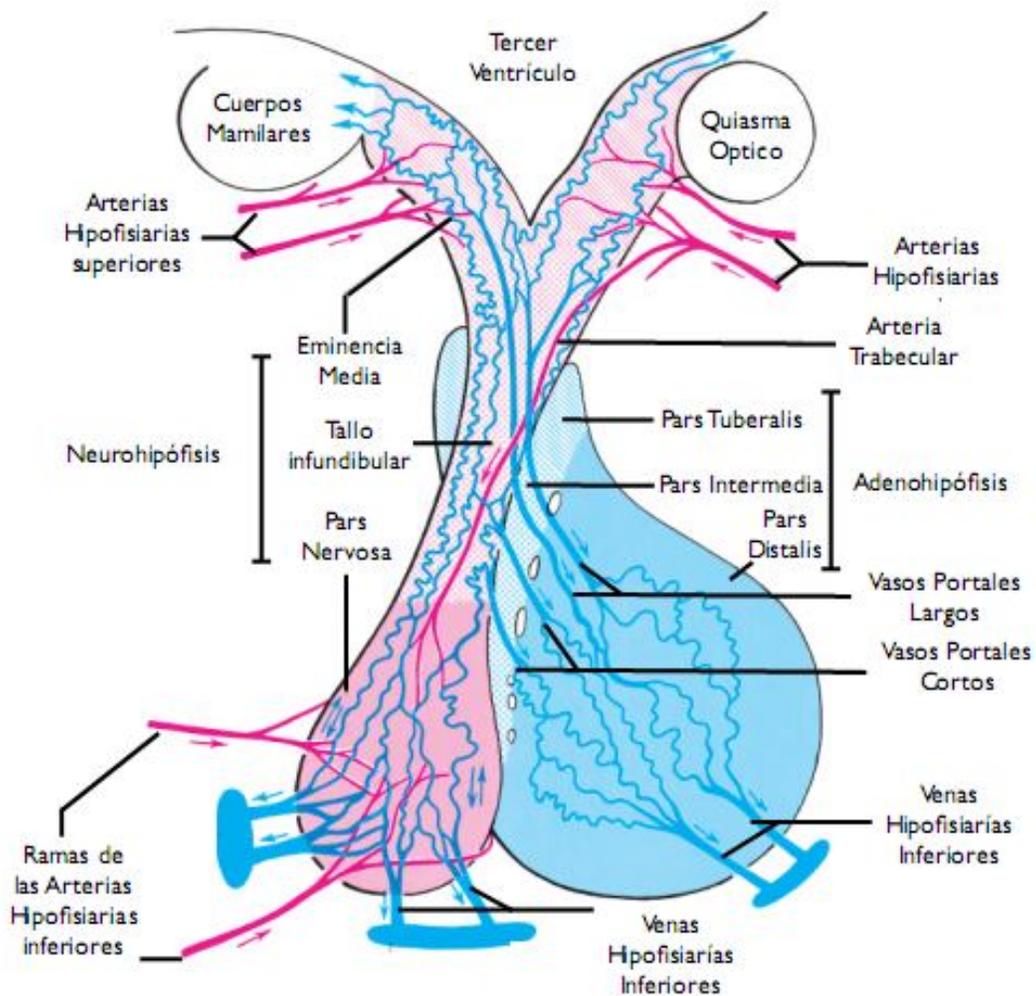


Fig. 3 Sistema portal hipotálamo-hipofisiario. Modificado de (Gray. H. 2005)

Debido a que la hipófisis no se encuentra directamente inervada, la irrigación sanguínea es el medio por el cual el hipotálamo ejerce su acción, y por lo tanto su función. Debido a esto, la hipófisis se encuentra irrigada por vasos porta que conectan entre sí dos lechos capilares, uno en la zona externa de la eminencia media y otro en la adenohipofisis, a lo que se denomina sistema **porta-hipofisiario** (Moguilevsky and Schiaffini 1972). Al estar los capilares porta primarios en íntimo contacto con las terminales axónicas que provienen del hipotálamo basal y medial (área hipofisiotrópica), estos axones pueden descargar a la luz de los capilares neurohormonas (estimuladoras o inhibitoras), que al viajar en forma descendente por el sistema porta-hipofisiario ejercerán su acción sobre la adenohipofisis (Moguilevsky and Schiaffini 1972). La eminencia media es el principal enlace entre el hipotálamo y la hipófisis, y se encuentra fuera de la barrera hemato-encefálica, recibiendo

el suministro de sangre por separado del resto del hipotálamo y compartida con la hipófisis (Yin and Gore 2010).

La irrigación comienza por medio de las arterias hipofisarias superiores, las cuales se anastomosan y se capilarizan a nivel de la eminencia media, especialmente en la zona externa y también en el extremo superior del tallo infundibular. Estos capilares constituyen el plexo capilar primario del sistema porta-hipofisario y son los que entran en contacto con las numerosos terminales axónicas neurosecretoras aminérgicas del sistema arcuato-eminencia media. Los capilares vuelven a unirse en vasos *porta* largos que corren principalmente por la cara anterior del tallo y se dirigen a la *pars distalis* donde vuelven a formar capilares, que contactan íntimamente con las células parenquimatosas de la *pars distalis* de la hipófisis constituyendo así el plexo capilar secundario del sistema porta-hipofisario (Fig 3) (Moguilevsky and Schiaffini 1972).

Por tanto, la neurohipófisis esta irrigada por las arterias hipofisarias inferiores originadas también de las arterias carótidas internas, las cuales se dirigen hacia el plano medial para formar un anillo que rodea la neurohipófisis. De este anillo salen pequeños vasos capilares donde terminan los axones del sistema supraóptico-paraventriculo-neurohipofisiario. En la neurohipófisis existen además pequeños vasos que se dirigen hacia la *pars distalis*, donde terminan anastomosándose con los capilares adenohipofisarios, constituyendo los vasos *porta* cortos (Moguilevsky and Schiaffini 1972, Melmed 2011).

La sangre arterial en esta red capilar recibe los factores liberadores o inhibidores secretados por despolarización por las neuronas hipotalámicas y transporta estos péptidos a una gran red de sinusoides que rodean el tallo hipofisario, suministrando a la hipófisis anterior entera. La gran área superficial de esta red vascular fenestrada facilita la difusión de factores de liberación hipotalámicos a las células de la hipófisis

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

- **TRH:** hormona liberadora de tirotropina. Estimula la síntesis y liberación de TSH y prolactina.

- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas. Estimula la síntesis y liberación de LH y FSH.
- **GHRH:** hormona liberadora de hormona del crecimiento (GH). Estimula la síntesis y liberación de hormona de crecimiento.
- **Somatostatina:** SRIF, inhibe la liberación de GH.
- **CRH:** hormona liberadora de corticotropina. Estimula la síntesis y liberación de ACTH.
- **Dopamina (DA):** inhibe la liberación de prolactina (Ooi, Tawadros et al. 2004).

Hipófisis. Anatomía

La complejidad anatómica de la glándula se debe a que posee un origen embrionario doble; el ectodermo que origina la adenohipófisis a partir de la formación de la bolsa de Rathke al invaginarse hacia atrás y hacia arriba de la cavidad oral del organismo y la neurohipófisis que se forma de la evaginación del neuroectodermo del piso del tercer ventrículo y llega a conectarse con la bolsa de Rathke (Moguilevsky and Schiaffini 1972).

La hipófisis se encuentra ubicada en la silla turca, en la base de la cavidad craneal, está unida al hipotálamo por medio del *tallo infundibular* y la eminencia media (Figura 2B y C). En roedores, la glándula tiene un peso húmedo de aproximadamente 1 a 2 mg y un peso en seco de aproximadamente 0,30 a 0,85 mg., sin embargo la hipófisis es sistemáticamente mayor en hembras que en machos, además de las diferencias de peso entre las diferentes cepas (Green 1966).

Tomando en cuenta las diferentes nomenclaturas utilizadas, la glándula hipofisiaria se divide en **Adenohipófisis** (AH) y **Neurohipófisis** (NH); la cual se subdivide en *Pars Nervosa* e *Infundíbulo*. (Figura 2B y C.). El tallo infundibular es la zona de paso de las fibras neurosecretoras peptidérgicas que terminan en los capilares de la *pars nervosa*. Esta última está compuesta en un 42% de los axones provenientes de las neuronas de los núcleos paraventricular y el supraóptico del hipotálamo que sintetizan entre otras, dos hormonas peptídicas, la oxitocina (OX) y la hormona antidiurética o vasopresina (ADH o VP) (Gutnick and Levkowitz 2012). Por otro lado, la **Adenohipófisis** (AH), se subdivide en

pars tuberalis, *pars distalis* (que constituye el 80% de la glándula) y *pars intermedia* (que recae sobre la *pars distalis* y la *pars tuberalis*) (Moguilevsky and Schiaffini 1972).

La *pars tuberalis* comprende una pequeña porción del lóbulo que se extiende hacia arriba para adosarse en forma de collar al piso del diencéfalo y *pars distalis*, en la cual se encuentra la mayor parte del tejido endocrino hipofisario. Las células de la *pars distalis* se pueden dividir en general en dos grandes categorías: las que secretan hormonas proteicas y aquellas cuya secreción hormonal es gluco-proteica. En el humano solo quedan vestigios de la *pars intermedia*, sus células están distribuidas en los otros dos lóbulos (Melmed 2011)

Adenohipófisis (Hipófisis Anterior)

La adenohipófisis está constituida principalmente por 5 tipos celulares secretores. Dichas células fueron originalmente clasificadas basándose en el tipo de tinción de hematoxilina-eosina que presentaban, esto es: cromóforas, acidófilas o basófilas. En la actualidad las células han sido clasificadas en somatotropos, lactotropos, corticotropos, tirotropos y gonadotropos, de acuerdo al tipo de hormona que secretan. Además de estos tipos celulares de carácter secretor, en la glándula se encuentran las células foliculo-estrelladas que tienen funciones de comunicación intercelular a lo largo de toda la glándula (Ooi, Tawadros et al. 2004).

Las células acidófilas son de tres tipos: somatotropos que secretan hormona de crecimiento (GH), lactotropos que secretan prolactina (PRL), lactosomatotropos (secretan GH y PRL) y corticotropos, que secretan adenocorticotropina ACTH. Las células basófilas agrupan a: los tirotropos (secretan hormona estimulante de tirotropinas, TSH) y gonadotropos (secretan hormona luteinizante, LH, y/o foliculo estimulante, FSH). La proporción de cada uno de estos tipos celulares puede variar en el adulto, sobre todo en hembras, donde puede variar hasta en un 10% dependiendo de la edad y la etapa del ciclo reproductivo (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos celulares adenohipofisiarios, porcentaje promedio total de la población celular en rata y principales funciones (Ooi, Tawadros et al. 2004).

TIPO CELULAR	PROMEDIO EN LA POBLACION (%)	HORMONA	FUNCION
Melanotropos		Hormona estimulante de los melanocitos (MSH)	Regula síntesis de melanina en melanocitos y melanóforos
Corticotropos	10	Hormona Adenocorticotropina (ACTH)	Regula el crecimiento y la secreción en la corteza adrenal.
Somatotropos	42	Hormona de crecimiento (GH)	Estimula el crecimiento y desarrollo somático postnatal. Regula metabolismo de proteína, carbohidratos y grasas.
Lactotropos	28	Prolactina (PRL)	Relacionada con actividad lactogénica, metabolismo lipídico y efectos sobre el sistema inmunológico.
Tirotropos	5	Tirotropina (TSH)	Regula crecimiento y metabolismo de la glándula tiroidea.
Gonadotropos	15	Luteinizante Foliculo estimulante. (LH y FSH)	Relacionadas con los procesos reproductivos y de secreción de hormonas sexuales esteroideas.

Gonadotropos

Como se mencionó anteriormente, el lóbulo anterior está compuesto principalmente por cinco tipos celulares secretores, entre los que se encuentran los **gonadotropos**, células basófilas que sintetizan las hormonas gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona foliculo estimulante) al ser estimuladas por el secretagogo hipotalámico liberador de las gonadotropinas (GnRH). El control fisiológico de la secreción de GnRH hacia la hipófisis es pulsátil y la frecuencia de los pulsos regula en los gonadotropos el almacenamiento y secreción de las gonadotropinas.

La síntesis y secreción de las gonadotropinas es regulada diferencialmente. Ambas hormonas son glicoproteínas diméricas y tienen una subunidad α común. Su respectiva subunidad β es codificada por genes diferentes. Se cree que la síntesis y la liberación de estas dos hormonas, es independiente una de la otra. La secreción de la FSH es mayormente de forma constitutiva, la mayor parte ocurre como resultado de la alteración de la velocidad de síntesis, por lo que su exocitosis es esencialmente controlada por la expresión de genes y la disponibilidad de mRNA para la transcripción. En cambio, la LH parece ser secretada predominantemente a través de la vía secretora regulada, ya que es pre-sintetizada y almacenada en gránulos y su liberación ocurre de manera pulsátil a través la vía regulada por la estimulación de la GnRH. Por lo tanto, su exocitosis está determinada por la frecuencia de los pulsos de GnRH (McNeilly, Crawford et al. 2003, Bernard, Fortin et al. 2010).

Los gonadotropos representan el 10-15% de la población de la adenohipófisis (Fellmann, Bresson et al. 1982), a su vez se pueden dividir en células mono-hormonales y bi-hormonales: los porcentajes de éstas pueden variar de acuerdo a la condición fisiológica, sin embargo se puede decir que de las células mono-hormonales el 16% son de LH y el 14% de FSH, por lo cual el 70% de la población de gonadotropos son bi-hormonales (LH+FSH). En estas últimas, las gonadotropinas se encuentran empaçadas en gránulos de secreción separados (Thomas and Clarke 1997) y su secreción se da a distintos tiempos y de forma codificada por la frecuencia de los pulsos de GnRH. Algunos estudios sugieren que la síntesis y secreción de LH se estimula cuando la frecuencia de pulsos de GnRH es alta, mientras que la síntesis y secreción de FSH está favorecida con frecuencias de pulsos de GnRH bajas (Dalkin, Haisenleder et al. 1989, Haisenleder, Dalkin et al. 1991).

El GnRH

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido hipotalámico procesado en neuronas especializadas del hipotálamo; a partir de un polipeptido precursor que pasa por un proceso enzimático antes de ser liberado. Estas neuronas se encuentran distribuidas en el área preóptica y sitios adyacentes a la región rostral en el hipotálamo, y no concentradas en un núcleo específico. En la mayoría de las especies de mamíferos, se cree que las neuronas de GnRH forman una red neural difusa

que funciona coordinadamente como un generador del pulso de GnRH. La generación de la liberación pulsátil de GnRH hacia la eminencia media depende de la actividad coordinada de alrededor de 1500 neuronas GnRHérgicas y se da cada 30 a 120 minutos, dependiendo la especie y las condiciones fisiológicas (Gore 2002, Krsmanovic, L et al. 2009, Naor 2009).

La mayoría de los vertebrados secretan al menos dos o usualmente tres formas de GnRH. La hormona es empacada en gránulos de almacenamiento que son transportados a través de los axones de las neuronas de GnRH hasta la zona de la eminencia media, liberándola en forma pulsátil, estimulando la biosíntesis y secreción de LH y FSH en los gonadotropos (Gore 2002, Millar 2005). La secreción pulsátil de GnRH característica de las neuronas GnRHérgicas es dependiente de una interacción entre la GnRH y sus receptores en las neuronas productoras de GnRH.

La secuencia primaria de la GnRH es altamente conservada y debido a las diferentes variantes de GnRH en los vertebrados se ha sugerido que los receptores también varían y que su distribución depende del tejido u organismo. En este sentido, se han identificado tres grupos de receptores de GnRH y se ha encontrado que difieren principalmente en la secuencia de aminoácidos de la tercer asa extracelular, en la cual reside la distinción de las diferentes formas de GnRH (McArdle, Franklin et al. 2002). La hormona GnRH I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH₂) se encuentra en peces pulmonados, anfibios y mamíferos y regula el eje hipotálamo-hipófisis así como la secreción de gonadotropinas. La GnRH II ([His⁵, Trp⁷, Tyr⁸] GnRH I) es ubicua en invertebrados, y se conserva desde peces óseos hasta el hombre, tiene un amplia distribución en el sistema nervioso central y periférico, en especial se ha relacionado con el comportamiento reproductivo. La GnRH III ([His⁵-Asp⁶-Trp⁷-Lys⁸] GnRH I), fue secuenciada por primera vez en el cerebro de la lamprea, y se encuentra en el hipotálamo de varias especies de mamíferos incluyendo ratas, vacas y ovejas, (Millar, Lu et al. 2004, Clarke and Pompolo 2005, Barnett, Bunnell et al. 2006, Naor 2009, Pappa, Zompra et al. 2012).

GnRH-R

Para poder mediar sus múltiples efectos (secreción y síntesis de gonadotropinas, etc), las tres formas de GnRH interactúan con su receptor cognado a través de un sitio de

unión. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs por sus iniciales en inglés; figura 4).

El receptor para la GnRH (GnRH-R) fue identificado por primera vez en gonadotropos de la hipófisis; sin embargo, también se han identificado receptores locales de GnRH en varios tejidos como ovario, placenta, próstata y células endoteliales (Kraus, Naor et al. 2001) y se sabe que están involucrados en una gran variedad de señales intracelulares.

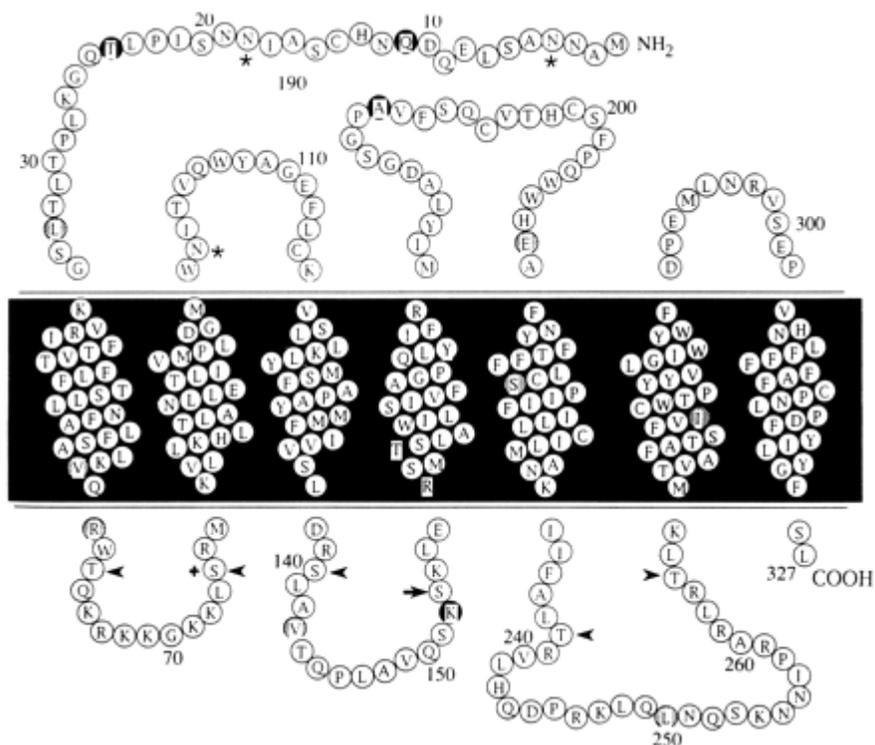


Fig. 4. Modelo estructural del GnRH-R. Los residuos de los aminoácidos en negro representan aminoácidos no conservados entre el GnRH-R de ratón y rata, I. Los asteriscos muestran los sitios potenciales de glicosilación. Sitios potenciales de fosforilación para la proteína cinasa C, están indicadas por las flechas, y para la proteína cinasa A están indicadas con una cruz. [Tomado de Kaiser et al.: Endocrine Reviews 19: 46-69 1997]

Un primer grupo (GnRH-R tipo I) comprende al conocido receptor a GnRH en mamíferos y se expresa principalmente en gonadotropos, el ligando natural para el receptor tipo I es la GnRH I, sin embargo la GnRH tipo II también se puede acoplar y activar al receptor tipo I. El segundo grupo (GnRH-R tipo II) se distribuye en la mayoría de los vertebrados, por lo que se sugiere que tiene un rol en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Pappa, Zompra et al. 2012). Sin embargo, también se ha localizado

en tejidos reproductivos como gónadas, próstata, endometrio/placenta y glándulas mamarias. Recientemente, se ha caracterizado un tercer tipo de receptor de GnRH en la rana toro (GnRH-R III) (Kraus, Naor et al. 2001, Bliss, Navaratil et al. 2010).

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

Los GPCR poseen una desensibilización homóloga, lo que les permite autorregular su tiempo de activación al disminuir su respuesta cuando es estimulado en repetidas ocasiones; se ha observado que el carboxilo terminal y la tercer asa en la estructura de los GPCRs son importantes para la internalización y desensibilización del receptor. El carboxilo terminal genera un sitio de anclaje para la familia de proteínas de anclaje de las β -arrestinas, las cuales después de unirse median la rápida desensibilización y la internalización dependiente de dinamina del receptor. Una característica del receptor a GnRH tipo I es la falta del carboxilo terminal y una tercer asa intracelular corta lo que le confiere una resistencia a la rápida desensibilización y posee una internalización lenta (Kraus, Naor et al. 2001, McArdle, Franklin et al. 2002, Rispoli and Nett 2005, Bliss, Navaratil et al. 2010).

La actividad de los GnRH-R se altera durante diferentes procesos fisiológicos, como la lactancia y el ciclo estral, en este último caso, diversos factores endocrinos juegan un papel directo en la regulación del número de receptores, así como de sus niveles de mRNA, por lo tanto factores como los esteroides gonadales, estradiol, progesterona, y la GnRH en sí misma, la inhibina y activina alteran la expresión génica de los GnRH-R. La castración y las lesiones hipotalámicas también cambian el número de receptores en la membrana de los gonadotropos, el incremento en la densidad de GnRH-R en la hipófisis va acompañada de una rápida elevación de gonadotropinas en suero (Rispoli and Nett 2005).

Acción de las gonadotropinas en el macho.

Una vez que las gonadotropinas son secretadas de los gonadotropos, sus órganos blanco son las gónadas. En el macho, el rol primario de la LH es estimular la biosíntesis de testosterona por las células de Leydig. La LH estimula la actividad de enzimas esteroideogénicas en las células de Leydig, las cuales son requeridas para la síntesis de la testosterona, así como para el mantenimiento de altos niveles intra-testiculares de testosterona, esenciales para espermatogénesis. La testosterona circulante también es esencial para el mantenimiento de la función sexual, los caracteres sexuales secundarios, y otros procesos fisiológicos dependientes de andrógenos.

La FSH es responsable de la iniciación de la espermatogénesis. La FSH se une a receptores específicos en las células de Sertoli y estimula la producción de proteínas como la inhibina, transferrina, proteína de unión a andrógenos, el receptor de andrógenos y la glutamil-transpeptidasa. El rol preciso de la FSH en la espermatogénesis permanece incierto. La teoría clásica propone que la LH actúa sobre las células de Leydig para estimular la generación de altos niveles intra-testiculares de la testosterona, la cual actúa sobre las espermatogonias y los espermatocitos primarios regulando a las células germinales durante la división meiótica.

En machos, la LH estimula la producción de testosterona en las células de Leydig y la proteína de unión a andrógenos en las células de Sertoli. La FSH es requerida para iniciar el proceso espermatogénico pero una vez que este ocurre, la testosterona en altas dosis es la que mantiene la espermatogénesis. Aunque la FSH y la testosterona tiene un rol independiente en la espermatogénesis cuantitativa, presumiblemente por modulación de los eventos post-receptor dentro de las células de Sertoli, ambas actúan de manera y en sitios independientes durante la espermatogénesis con la finalidad de optimizar el proceso, por tanto, la combinación de sus acciones es más efectiva que si solamente participara la testosterona. Se ha propuesto que la concentración de FSH circulante provee la señal que fija los niveles de la producción de espermatozoides sobre la tasa basal inducida por la testosterona intra-testicular. La acción de la FSH sobre las células germinales es indirecta y mediada por las señales paracrinas de las células de Sertoli que amplifica los niveles basales de espermatogénesis mantenidos por la testosterona (O'Donnell, Meachem et al. 2006, Melmed 2011).

Asa de retroalimentación

Activina-Inhibina

La inhibina y la activina se encuentran entre los miembros más ampliamente estudiados de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β). Ambas se aislaron en base a su capacidad para regular la homeostasis de la FSH. Las inhibinas son glicoproteínas heterodiméricas de una subunidad- α y una de las dos subunidades β , β_A (inhibina A) o β_B (inhibina B), las cuales son producidas principalmente en el testículo. La inhibina regula a la baja la producción de FSH a través de antagonizar las acciones de la activina que es producida localmente, además de suprimir la secreción de FSH, pero sin afectar la LH a nivel de la hipófisis.

Las activinas son dímeros formados por dos subunidades β de inhibina. Hay al menos cuatro formas de las subunidades β (β_A - β_D), aunque β_A y β_B son las más importantes en la regulación de la FSH. Las activinas fueron descubiertas por su habilidad para estimular la síntesis y liberación de FSH, pero ahora se sabe que se producen en una amplia variedad de tejidos y actúan principalmente de forma autocrina y paracrina para regular funciones que van desde el desarrollo hasta la homeostasis celular (Stutzmann and Mattson , Burger, Haisenleder et al. 2004).

Andrógenos

Del 90 al 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo, siendo los más importantes la testosterona (T), la dihidrotestosterona DHT y la androstenediona, siendo la testosterona el principal andrógeno secretado por el testículo, el cual produce el 95% de la testosterona circulante, misma que se encuentra unida a proteínas. Cerca del 45% se encuentra unida a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHGB por sus siglas en inglés) mientras que alrededor del 55% está unida a albúmina o a la globulina de unión a corticosteroides (CGB) y solamente una pequeña fracción (~2%) se encuentra circulando libremente (Boron and Boulpaep 2008).

A diferencia de otros esteroides, los andrógenos deben ser activados metabólicamente antes de unirse a su receptor. La testosterona puede actuar directamente a través de la unión al receptor de andrógenos (AR), o bien después de ser metabolizada reduciéndose a 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), la cual también puede unirse al receptor de andrógenos, incluso con afinidad 3 a 5 veces mayor que la testosterona. A su vez, la testosterona también puede ser convertida a estrógenos en el cerebro y funcionar a través del receptor de estrógenos (ER) (Arimura, Shino et al. 1976, Boron and Boulpaep 2008).

Los esteroides gonadales como la testosterona, ejercen una retroalimentación sobre el hipotálamo y la glándula pituitaria para regular la secreción de GnRH y de las gonadotropinas. Se ha demostrado que a nivel de hipotálamo reduce los niveles de RNAm de GnRH así como del receptor de GnRH {Toranzo, 1989 #2582; Selmanoff, 1991 #2583} y modula el procesamiento de la pre-hormona de GnRH {Roselli, 1990 #2584}. Los esteroides gonadales alteran las características del pulso de GnRH, inhibiendo directamente en el hipotálamo su expresión y secreción y consecuentemente, disminuyendo la frecuencia de la liberación pulsátil de LH (Nakayama, Matsuo et al. 1975, Sakai, Inoue et al. 1988, Console, Jurado et al. 2001).

A nivel de la hipófisis, se sabe que la testosterona inhibe la secreción de LH (Brown-Grant and Greig 1975). Los efectos de la testosterona en la síntesis y secreción de FSH son complejos a pesar de ello, se ha observado cambios en los niveles de RNAm de la subunidad α de FSH y LH, así como FSH β y LH β , cuando se suprimen las hormonas gonadales (Shiino 1979, Melmed 2011), así como un efecto directo de inhibición sobre la secreción de FSH (Arimura, Shino et al. 1976).

La acción de los andrógenos sobre los gonadotropos, se ha estudiado eliminando el asa de retroalimentación negativa sobre ellos por medio de la castración o gonadectomía (GnX). Después de la remoción de las gónadas, los gonadotropos sufren drásticos cambios morfológicos y funcionales, los cuales resultan de la acción directa e indirecta del efecto de la remoción de las gónadas a nivel de hipófisis e hipotálamo (Tobin and Canny 1996, Bliss, Navaratil et al. 2010), de entre los que se encuentran el aumento en la secreción de las gonadotropinas (Ramirez and McCann 1965, Brown-Grant and Greig 1975, Lindzey, Wetsel et al. 1998). Por ejemplo, en respuesta a un estímulo con GnRH aumentan los niveles de LH en plasma (Huang, Leu et al. 2001), además del bien conocido efecto sobre el tamaño de los gonadotropos; Amiura y colaboradores (Arimura, Shino et al. 1976, Shiino 1979) demostraron la aparición de gonadotropos hipertrofiados,

los cuales son característicos de dicha condición. No obstante, se ha observado que el efecto de los esteroides gonadales con respecto al receptor a GnRH es diferente entre rata y ratón. En ratón, los andrógenos ejercen un efecto inhibitorio en la expresión de GnRH-R (Inoue and Kurosumi 1981, Sakai, Inoue et al. 1988), a diferencia de lo que ocurre en ratas, donde el efecto es estimulante, regulando así la densidad y expresión de los receptores de GnRH (Clayton, Detta et al. 1985), además de que se han observados cambios directos sobre la señalización de $[Ca^{2+}]_i$; lo cual se discutirá más adelante.

Dinámica de la actividad de Ca^{2+} intracelular

Las señales intracelulares de Ca^{2+} son de importancia crítica para el control de una gran variedad de funciones celulares, incluyendo excitabilidad, exocitosis y contracción, así como crecimiento, diferenciación y división celular. Las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ ocurren espontáneamente o en respuesta a un estímulo dado por un agonista y se producen por la entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos en la membrana plasmática y/o a partir de la liberación de reservorios intracelulares (Stojilkovic and Catt 1992). La forma en que los cambios de la concentración de Ca^{2+} citosólica regula esta gran variedad de procesos depende de la velocidad, amplitud y patrones espacio-temporal con que suceden (Berridge, Lipp et al. 2000).

Todas las células de la hipófisis exhiben actividad eléctrica espontánea y la mayoría de los gonadotropos presentan potenciales de acción espontáneos que involucran canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, los cuales generan señales de Ca^{2+} en el interior de la células, y se ha visto observado que están íntimamente relacionados con la secreción basal de gonadotropinas.

Los gonadotropos operan a través de dos osciladores de Ca^{2+} ; el *oscilador de la membrana plasmática* que causa las oscilaciones de calcio de baja amplitud, las cuales son dependientes de calcio extracelular en células no estimuladas, y el *oscilador de citoplasmático* que es activado por Ca^{2+} movilizado por receptores (Tomic, Cesnajak et al. 1994). Por tanto, estas células, pueden presentar oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$, las cuales en general, son de baja amplitud y la frecuencia con la que se presentan es en periodos de 3-20 minutos (Stojilkovic, Zemkova et al. 2005). Sin embargo, la principal liberación de gonadotropinas se lleva a cabo por la acción del GnRH a través del aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) proveniente de las pozas intracelulares (i.e.

el oscilador citoplasmático). Este aumento en la concentración de Ca^{2+} es producida por la activación de los receptores transmembranales (GnRH-R) que activan la fosfolipasa C a través de la vía de proteínas G, el GTP junto con la proteína $\text{G}\alpha_{q/11}$ permite la activación de la fosfolipasa $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), resultando en la hidrólisis de 4,5-bifosfato (PIP_2) para generar inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 difunde a través del citoplasma y se une a sus receptores en la membrana en los reservorios intracelulares, identificados como parte del retículo endoplásmico liso, dando como resultado una substancial y rápida liberación de Ca^{2+} , lo que se refleja en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La activación de los receptores de IP_3 (IP_3R) requiere tanto del IP_3 como de Ca^{2+} ; la unión del IP_3 a su receptor aumenta su sensibilidad por el Ca^{2+} , y solamente después de la unión del Ca^{2+} al receptor es que éste puede ser liberado de los reservorios intracelulares al citoplasma, por lo que se puede decir que los iones de Ca^{2+} actúan como co-agonistas con el IP_3 {Kwiecien, 1998 #537; Clayton, 1982 #2556; Berridge, 1993 #2586; Taylor, 2009 #2587}

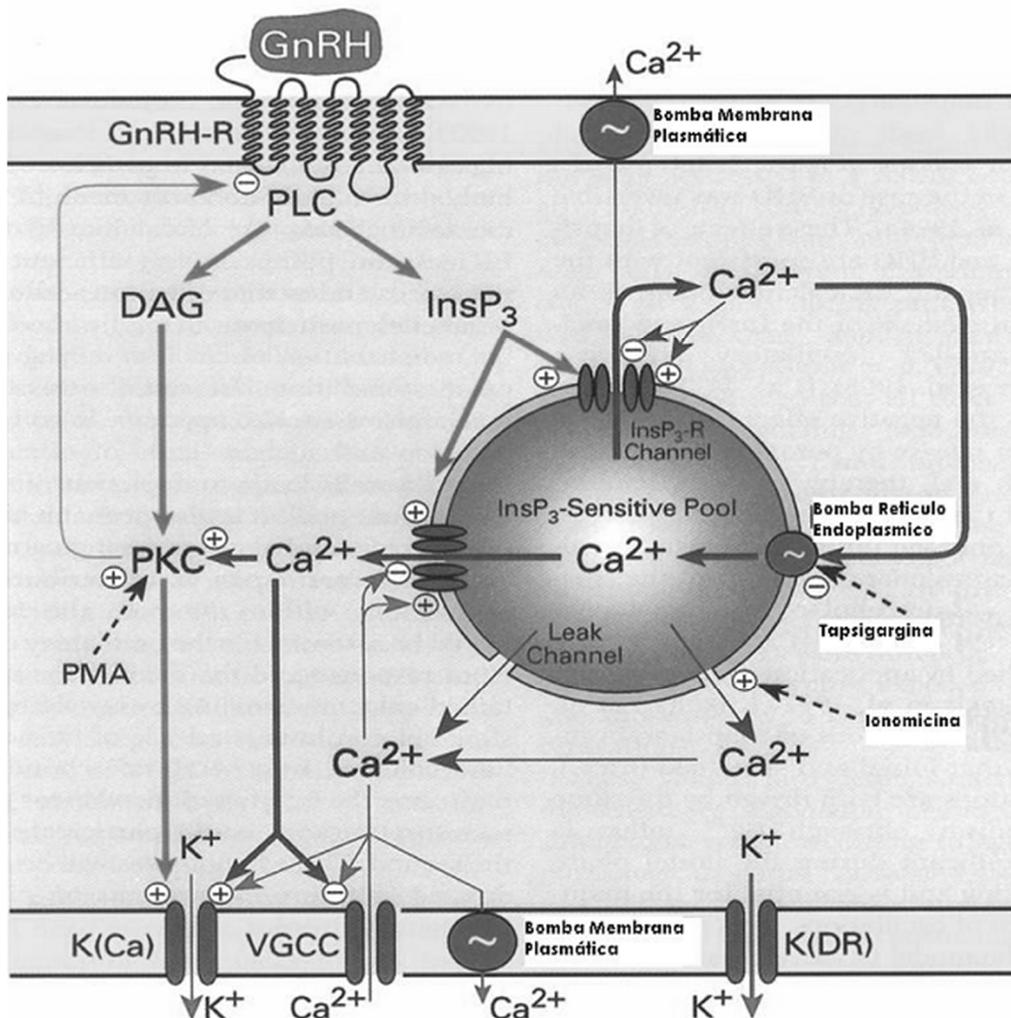


Figura 5. Representación esquemática de la señalización de Ca^{2+} en los gonadotropos de la $\text{P}_2\text{-R}$ receptor de Inositol

El Ca^{2+} tiene una acción bifásica, es decir puede actuar como regulador positivo o negativo del receptor de IP_3 , ya que a concentraciones bajas de Ca^{2+} , el Ca^{2+} intracelular ejerce un efecto estimulante para que el receptor se abra, pero una vez que la concentración de Ca^{2+} aumenta en el citoplasma, éste ion ejerce una retroalimentación negativa, promoviendo el cierre del receptor, lo cual limita la cantidad de Ca^{2+} liberado durante cada transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y establece su amplitud y duración.

La liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares al citoplasma de la célula, permite a su vez la estimulación de canales de la membrana que son activados por Ca^{2+} , especialmente los canales de K^+ activados por Ca^{2+} . El más estudiado en los gonadotropos es el canal de K^+ activado por Ca^{2+} de baja conductancia, conocido como SK (Stojilkovic, Zemkova et al. 2005, Waring and Turgeon 2009). La activación del canal

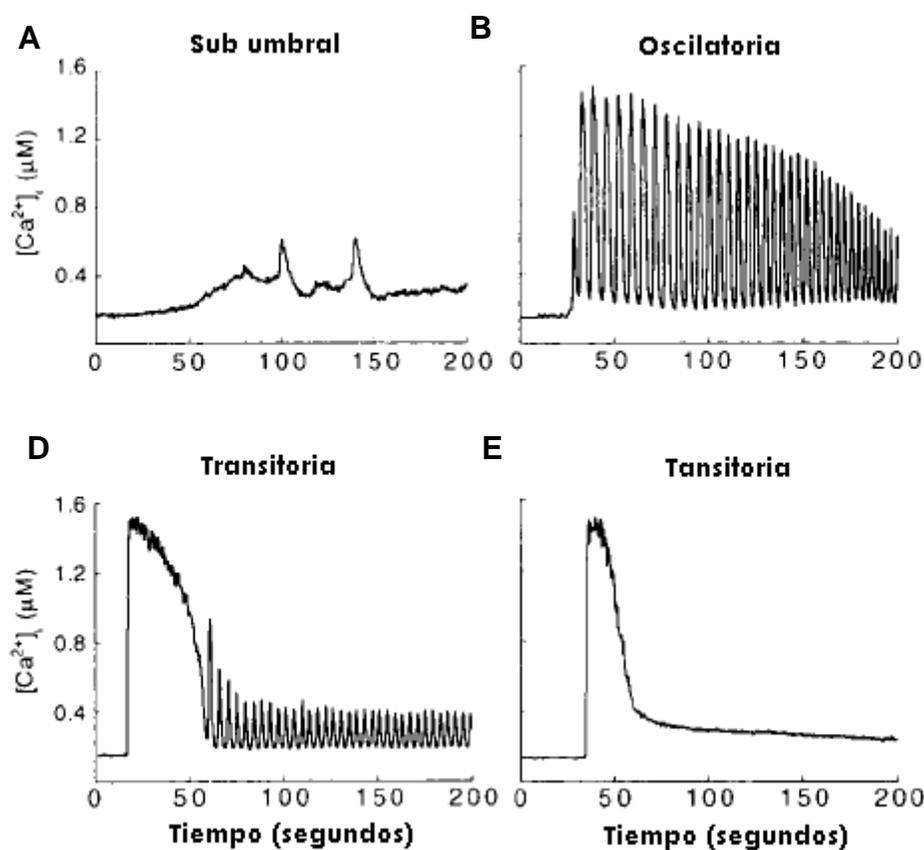


Figura 6. Patrones típicos de respuesta de señalización por Ca^{2+} al estímulo con GnRH. (A) respuesta subumbral (B), oscilatoria (C y D) dos tipos de respuesta transitoria. Modificado de Tomić et al. *Endocrinology* 135 (5):1762-1771. 1994

SK hiperpolariza la membrana, lo que remueve la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Cuando la hiperpolarización cesa (debido a la disminución de Ca^{2+} en el citoplasma), la membrana se despolariza nuevamente y permitiendo la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (predominantemente los tipo L, que se activan a potenciales más positivos que -40 mV), Esto permite la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo cual es necesario para que los reservorios de Ca^{2+} puedan ser rellenos y así mantener la homeostasis de Ca^{2+} intracelular; un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa nuevamente el canal SK, y en ese momento un nuevo ciclo se reinicia (Waring and Turgeon 2009).

La elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el citoplasma suele verse en forma de oscilaciones repetitivas y/o a través de propagación por ondas, las cuales en gonadotropos activan una variedad de eventos, incluyendo la actividad de los canales de la membrana, la síntesis y expresión de genes de gonadotropinas y su liberación (Li, Keizer et al. 1995). Dichas oscilaciones se pueden caracterizar por diferentes parámetros, entre los cuales se encuentra latencia, frecuencia, amplitud y el umbral de los transitorios de Ca^{2+} , e incluye un periodo de latencia entre el estímulo y la respuesta (Stojilkovic and Catt 1992). En resumen, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la unión del GnRH a su receptor se puede dividir en dos fases: la fase inicial, que consiste en una señal rápida “espiga”, la cual se debe principalmente a la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y una segunda fase, que consiste en una “meseta” sostenida, que gradualmente declina hasta llegar a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pre-estimuladora. Esta segunda fase se debe primordialmente a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje de la membrana (véase Figura 5) (Tobin and Canny 1996).

El patrón de frecuencia y amplitud del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presente en los gonadotropos depende de la concentración de GnRH aplicada. En experimentos realizados *in vitro*, se ha establecido que estos patrones se pueden clasificar en tres tipos (Figura 6): a) *respuestas de bajo umbral*, aquellas que se presentan en respuesta a concentraciones estimulantes <0.1 nM GnRH, en los cuales la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presenta una amplitud baja (≤ 0.4 μM); b) *respuestas oscilatorias*, que generalmente se presentan a concentraciones de 0.1 a 10 nM de GnRH, en donde se observan oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y c) *respuestas “transitorias”* definidas como *bifásicas*, que comprende dos variantes; bifásica oscilatoria y bifásica no-oscilatoria y se observan a concentraciones “altas” de

GnRH (>10 nM) (Tomic, Cesnajaj et al. 1994, Thomas and Waring 1997). La presencia de los diferentes patrones en función de la dosis de GnRH ha sido explicada por la acción coordinada en respuesta a GnRH de los osciladores de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico (Stojilkovic and Tomic 1996) Recientemente, a esta sucesión ordenada en la que se presentan las respuesta de Ca^{2+} en función de dosis crecientes de GnRH en gonadotropos *in situ*, se le denominó respuesta “canónica”; la cual, en gonadotropos en cultivo, se creía que era la secuencia que presentaban los gonadotropos en función de la dosis de GnRH a la que eran expuestos, sin embargo en gonadotropos *in situ* se encontró que solamente el ~20% muestran este tipo de respuestas; y que por el

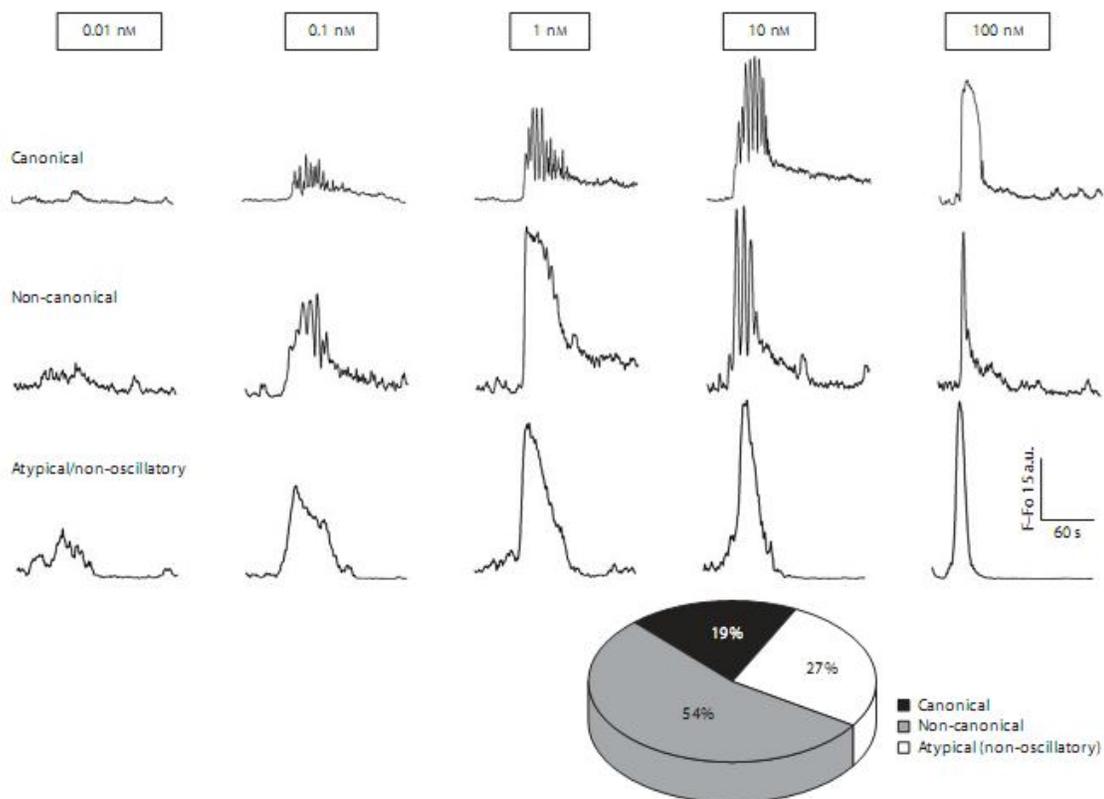


Fig 7. Patrones de respuesta de Ca^{2+} obtenida de la aplicación de 5 dosis crecientes de GnRH de gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón macho. Panel superior, respuesta canónica, panel del centro respuesta no-canónica, panel inferior respuesta atípica/ no-oscilatoria. La gráfica de la esquina inferior derecha muestra el porcentaje de células que muestran los tres diferentes patrones de respuestas(Sanchez-Cardenas and Hernandez-Cruz 2010).

contrario, la mayoría de las células (~55%) no muestran esta progresión ordenada, i.e.

algunas células muestran respuestas oscilatorias sin importar la dosis a la cual son expuestas, o bien pueden presentar respuestas bifásicas (transitorias) desde bajas dosis, a esta secuencia de respuestas no ordenadas se le denominó respuestas “no-canónicas”, dado que no siguen el orden observado en gonadotropos en cultivo. Finalmente, cerca del 30% de los gonadotropos no muestran la respuesta de tipo oscilatoria ante ninguna de las dosis de GnRH aplicadas, sino que presentan respuestas de tipo bifásicas, a las cuales les denominamos respuestas “atípicas, no-oscilatorias”, para este último caso, a pesar de que todas las respuestas son de tipo bifásico independientemente de la dosis de GnRH a la cual son expuestos, se observó una progresión dosis-respuesta dependiente en relación al tamaño, así como de la velocidad de subida y caída del transitorio de Ca^{2+} , i.e. una señal de Ca^{2+} más grande en función al aumento en la concentración de GnRH aplicada (Fig. 7) (Sanchez-Cardenas and Hernandez-Cruz 2010). Sin embargo, aún queda por determinarse cuales son las implicaciones fisiológicas y los mecanismos celulares responsables de esta heterogeneidad.

En un intento por esclarecer las implicaciones y la importancia de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ en gonadotropos se estableció una posible correlación entre los patrones de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ (oscilatorio, bifásico, transitorio) y la cantidad de LH secretada fue examinada desde principios de los años 90. Inicialmente las respuestas bifásicas fueron relacionadas con la secreción de LH, mientras que las respuestas oscilatorias fueron asociadas con la síntesis de la subunidad β de LH (Leong and Thorner 1991). Sin embargo, otros estudios establecieron que las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por GnRH pueden desencadenar exocitosis (Tse, Tse et al. 1993) o bien que ambas, tanto las respuestas oscilatorias como las bifásicas pueden iniciar la liberación de LH (Tomic, Cesnajaj et al. 1994), sugiriendo que la exocitosis puede producirse por cualquier tipo de elevación de Ca^{2+} intracelular y no específicamente por un tipo patrón de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, aún no se ha dilucidado que aspectos celulares determinan los diferentes patrones de Ca^{2+} intracelular en gonadotropos en respuesta a GnRH, y cuáles de estos afectan la síntesis y la secreción de gonadotropinas.

A pesar de esto, es bien sabido que además de su acción sobre la síntesis y secreción de GnRH, los esteroides gonadales pueden regular los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por GnRH. Se ha observado que el estradiol regula la movilización de Ca^{2+} inducida por GnRH tanto en gonadotropos de ratas como

de ovinos (Ortmann, Stojilkovic et al. 1992, Ortmann, Bakhit et al. 1995). También está reportado que la inhibina no altera las señales de Ca^{2+} , sino que más bien está involucrada en el aumento del número de células que responden a GnRH (Ghosh, Wu et al. 1996), sin embargo se ha postulado que en la regulación de las señales de Ca^{2+} a través del estradiol podrían estar implicadas la progesterona y la inhibina (Ortmann, Stojilkovic et al. 1992), además también se ha observado que este puede estar modulando el flujo extracelular de Ca^{2+} , a través de regular la vía dependiente de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Heyward and Clarke 1995).

Tobin y colaboradores demostraron con anterioridad en células en cultivo de ratas macho, que las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por GnRH en gonadotropos se modifican después de la gonadectomía. La relación entre la concentración de GnRH y el tipo de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ se altera después de la remoción de los andrógenos a través de la castración, ya que la mayoría de los gonadotropos (~70%) muestran respuestas de tipo oscilatorias independientemente de la concentración de GnRH a la cual son expuestas. También reportaron que este cambio en el número de gonadotropos que responden de forma oscilatoria se da de forma gradual durante los primeros días después de la castración, alcanzando un punto máximo a los 7 días post-castración y manteniéndose constante hasta por 50 días (Tobin and Canny 1996), es importante señalar que estas modificaciones en la señalización de Ca^{2+} pueden ser prevenidas a través de un tratamiento con testosterona, por lo que es a esta a quien se le atribuyen los cambios en las señales de Ca^{2+} observados después de la gonadectomía.

Rebanadas de adenohipófisis

Hasta años recientes, la mayoría de los estudios en gonadotropos se han llevado a cabo en células en cultivo, sin embargo se ha observado que el comportamiento de algunos tipos celulares endocrinos de la hipófisis se ve modificado cuando se les separa de su contexto tisular. Algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de examinar la función de los gonadotropos *in situ* (Bonfont, Lacampagne et al. 2005, Sanchez-Cardenas and Hernandez-Cruz 2010), por lo que en los últimos años se han desarrollado aproximaciones metodológicas que buscan estudiar de manera más integral la regulación y coordinación en los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, así como la secreción hormonal, utilizando para ello la técnica de registro en rebanadas frescas de hipófisis, que ofrece la ventaja de

estudiar a las células dentro de su ambiente tisular, conservando de esta manera las interacciones entre las células, así como su ubicación y distribución. Recientemente Sánchez-Cárdenas y Hernández-Cruz reportaron que del comportamiento de los gonadotropos en cultivo no podían preverse en su totalidad, ni extrapolarse a las condiciones *in situ*, ya que se encontraron marcadas diferencias en el comportamiento de estas células; por ejemplo, encontraron un mayor porcentaje de células que presentan la respuesta “no-canónica” en gonadotropos en rebanada, así como diferencias intracelulares en respuesta a la GnRH, entre otras cosas (Sánchez-Cardenas and Hernández-Cruz 2010).

HIPOTESIS

Cuando el ambiente tisular de los gonadotropos se mantiene (a través de la técnica de registro de rebanadas) las señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH muestran características similares a las reportadas en cultivo, pero con algunas diferencias importantes. Con la gonadectomía (GnX), las señales de Ca^{2+} intracelular inducidas por GnRH en gonadotropos *in vitro* se modifican. En este estudio esperamos que las señales de Ca^{2+} de los gonadotropos en rebanadas de hipófisis también se modifiquen con la castración de manera similar a la condición *in vitro*, sin embargo también esperamos un comportamiento diferente debido a la interacción intercelular y la organización funcional propias del tejido.

OBJETIVOS

Caracterizar las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por GnRH en gonadotropos de rebanadas de hipófisis de ratón macho antes y después de la castración.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- A. Implementar la técnica de rebanadas de hipófisis de ratón macho, así como el registro de fluorescencia y el análisis de las señales de Ca^{2+} , con la finalidad de registrar las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en gonadotropos *in situ* ante un estímulo con GnRH.
- B. Estandarizar protocolos que permitan cuantificar el número de células que responden ante diferentes concentraciones de GnRH (0.01-100 nM) obteniéndose curvas dosis-respuesta de cada rebanada estudiada.
- C. Analizar los efectos de la castración sobre las señales de Ca^{2+} observadas en función de la dosis GnRH aplicada (0.01-100 nM GnRH). Porcentaje de respuestas canónicas, no canónicas o atípicas en la población de gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón intacto. Determinar si esta progresión se modifica en rebanadas de hipófisis de ratones 15 y 45 días después de la castración.

- D. Examinar si los cambios producidos por la castración en la población de gonadotropos en rebanada de hipófisis se asemejan a los reportados en células en cultivo, por ejemplo, si también aumenta el número y el tamaño de los gonadotropos.
- E. Desarrollar un método mediante el cual podamos categorizar objetivamente y analizar cuantitativamente los patrones de señalización $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al GnRH.
- F. Investigar el efecto de la gonadectomía sobre los patrones de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por GnRH en la población de gonadotropos en rebanadas de hipófisis, analizando las características las señales de $[Ca^{2+}]_i$, como frecuencia de las oscilaciones, amplitud de la respuesta (i.e. pico máximo de fluorescencia) área bajo la curva y componentes de la respuesta de Ca^{2+}

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los estudios se realizaron bajo un protocolo aceptado en la institución, similar a la Guía de USPH para el uso y cuidado de animales de laboratorio, así como la Guía Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-199). Los animales se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*, a temperatura constante y un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Los ratones Balb-C adultos de 8 semanas de edad fueron gonadectomizados (GnX) bilateralmente bajo anestesia y condiciones quirúrgicas estériles. 15 y 45 días después de la gonadectomía los animales fueron sacrificados (n=6 animales por grupo), otro grupo de 6 ratones macho intactos de la misma cepa y edad fueron usados como condición control.

Obtención de rebanadas de hipófisis.

Previa anestesia general con pentobarbital (20 mg/kg intraperitoneal), los ratones fueron sacrificados por decapitación. El cráneo fue abierto, el cerebro removido rápidamente y la hipófisis fue inmediatamente extraída y embebida en agar al 3.0 % (Invitrogen; Carllab Cal, USA). Una vez enfriado, el cubo de agar solidificado con la hipófisis en su interior se colocó en la platina de un vibratomo (Leica VT1000S). El depósito del vibratomo se llenó con solución fisiológica enfriada por contacto con hielo y se obtuvieron rebanadas transversales de 130 μm de grosor. Durante todo este proceso, la glándula y las rebanadas se mantuvieron sumergidas en solución salina normal (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26nM de NaHCO_3 , y 10 mM glucosa), con burbujeo continuo con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2) para mantener el pH a 7.4. Una vez obtenidas, las rebanadas se mantuvieron por un máximo de 6 horas bajo estas condiciones.

Obtención de los registros de Ca^{2+} intracelular en células individuales de la rebanada de hipófisis.

Para los registros de Ca^{2+} intracelular las rebanadas fueron colocadas sobre cubre objetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina 0.3% y se incubaron con 22.2 μ M del indicador intensiométrico de calcio Fluo-4 AM (Teflabs; Austin, USA) con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA.) en solución salina durante 30 minutos a 37° C.

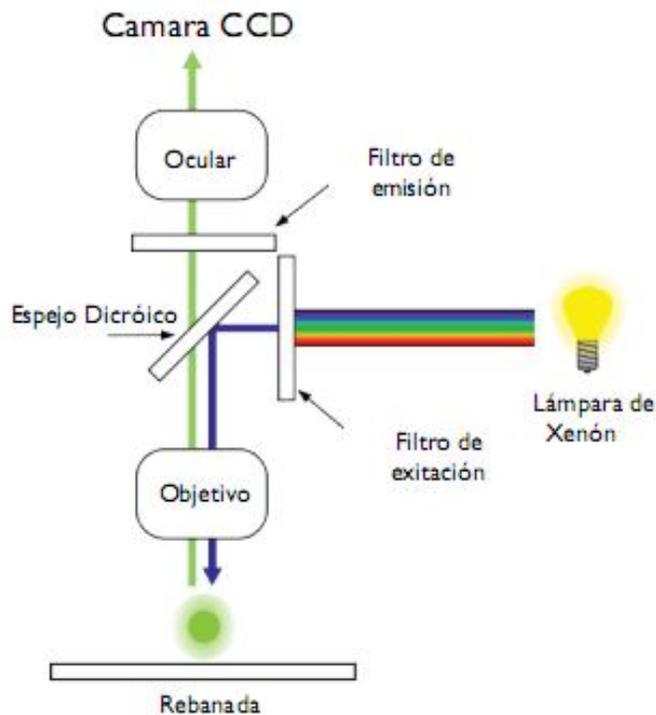


Fig.8 Esquema del sistema para registrar los cambios de intensidad de fluorescencia en las células teñidas con el indicador de Calcio.

Una vez incubadas con fluo-4, las rebanadas se lavaron con solución salina normal y fueron colocadas en una cámara de registro de plexiglás directamente sobre la platina de un microscopio vertical Nikon Eclipse 80i, en donde se mantuvieron con perfusión

constante de solución salina burbujeadada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) (1ml/min) y fueron observadas con objetivos Nikon de inmersión en agua de 40X, (0.55 NA) y 20X, (0.5 NA).

Para el registro de los cambios en la intensidad del indicador de Ca²⁺ Fluo-4, se empleó un sistema que consta de una lámpara de Xenón adaptada a un monocromador Policrome V (TillPhotonics) conectada al microscopio mediante fibra óptica. Para la

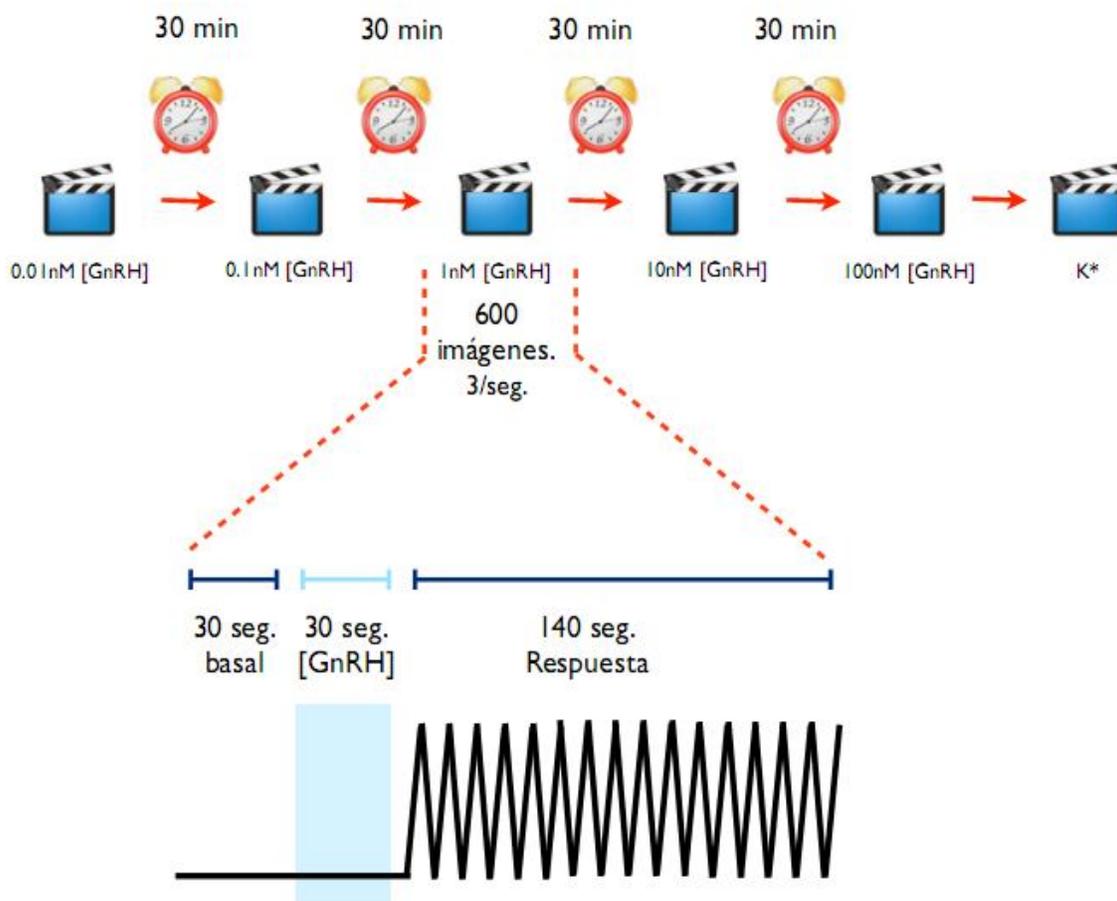


Fig.9 Protocolo de registro, se administraron 5 dosis crecientes de GnRH (0.01 nM-100 nM GnRH + KCL 140 mM), cada registro consiste en 600 imágenes (3 imágenes/seg) que se condensan formando una película. Cada registro de 600 imágenes consiste en 30 segundos de actividad basal, 30 segundos de exposición de la rebanada a una concentración dada de GnRH y 140 segundos de registro de la respuesta producida. En la parte inferior se observa un esquema de la respuesta de Ca²⁺ obtenida de una célula en el registro, donde se señalan los periodos correspondientes al protocolo.

excitación del colorante se utilizó una longitud de onda de 480 nm, un espejo dicróico de 500 nm y un filtro de barrera de 515 nm (Nikon). La adquisición se realizó con una cámara digital CCD enfriada (Imago QE; TillPhotonics) y el software Till Vision versión 4.0. Las secuencias de imágenes obtenidas constan de 600 imágenes, cada imagen fue tomada con un tiempo de exposición de 10 ms y un intervalo entre imágenes de 250 ms.

La actividad basal fue registrada por 30 segundos mientras que la rebanada se perfundía con solución fisiológica normal. Luego, la perfusión fue intercambiada por solución fisiológica conteniendo GnRH por 30 segundos: La concentración de GnRH se aplicó utilizando un sistema de perfusión por gravedad, que consiste de 5 jeringas de 5 ml y una de 60 ml, cada una de ellas conectada a una válvula de dos vías, a su vez cada una se conecto a tubo de polietileno que conduce una entrada común dentro de la cámara de registro. Se llevaron a cabo experimentos control con una solución fluorescente (Alexa 1 μ M) que fungió como sustituto fluorescente del GnRH, de manera que se pudiera determinar el momento de la llegada y salida de GnRH durante los experimentos. Mediante estas pruebas se determinó que el GnRH tiene un retraso de llegada en el sistema de perfusión de 12 s aproximadamente y luego sube hasta alcanzar la concentración deseada dentro de la cámara de registro durante 30 segundos. Por lo tanto, en la rebanada de hipófisis, el estímulo con GnRH duro 30 segundos aproximadamente. Se estableció un periodo de 30 minutos de intervalo entre la aplicación de una dosis de GnRH y la nueva dosis de GnRH en la misma rebanada. 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 entre el primer registro obtenido y último, lo cual indica que la fuga del colorante no es un problema en nuestros experimentos. Además, el fluo-4 no penetra en el tejido más de unas 45-50 μ m aproximadamente, por lo cual es posible observar una o dos capas de células vivas dentro de la rebanada que han incorporado el indicador.

Sustancias utilizadas

Para la estimulación de los gonadotropos se empleó GnRH II de pollo (Peninsula Laboratories, Inc. Belmont CA, USA) aplicado a través de la perfusión en concentraciones

crecientes de 0.1, 1, 10 y 100 nM, con un intervalo de tiempo de 30 minutos entre dosis sucesivas con el propósito de evitar efectos acumulativos del agonista.

Análisis de resultados

El análisis del aumento intracelular de Ca^{2+} se realizó procesando las secuencias de imágenes (películas) con el programa Image J (NIH, USA). Para obtener una serie de imágenes corregidas, a las que se aplicó la función matemática $\Delta F = F - F_0$ a partir de la substracción: $i_2 = (i_1 - i_2) * k_1 - k_2$ donde i_1 es la secuencia de imágenes de la secuencia

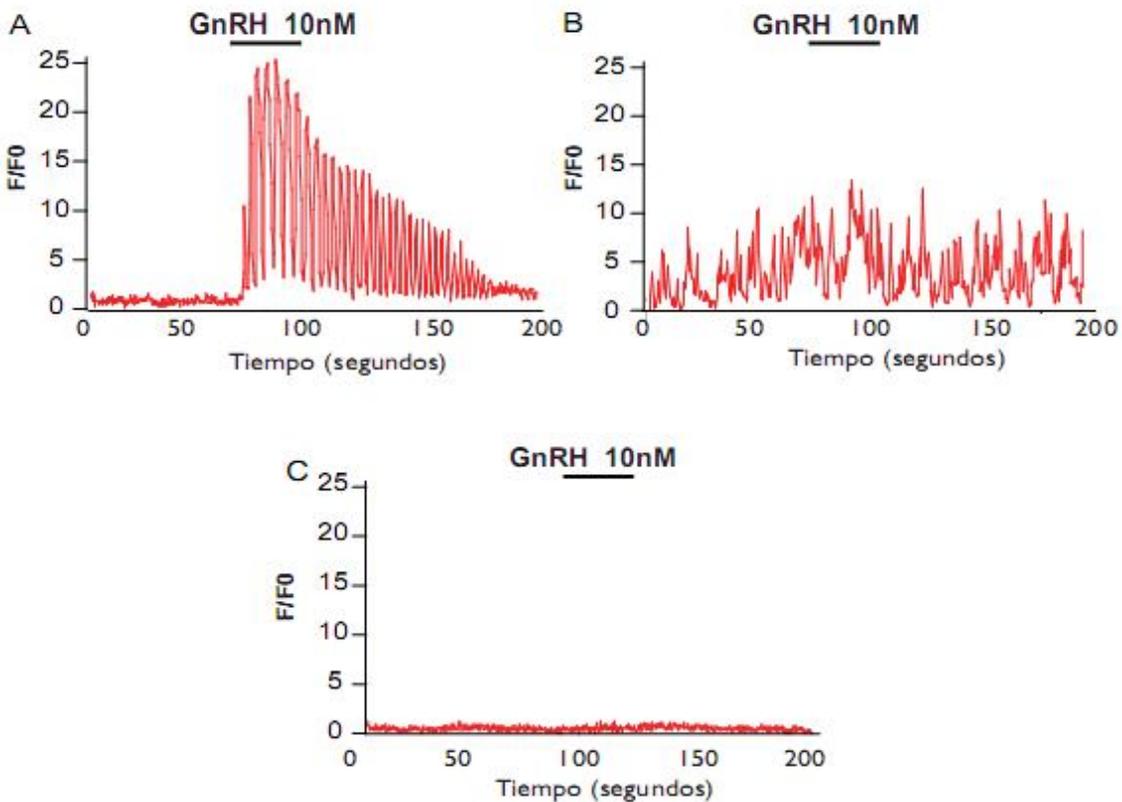


Fig.10 Ejemplo de registros de señales de $[Ca^{2+}]_i$ en células de rebanadas de hipófisis de ratón macho A) Se seleccionaron como gonadotropos a todas aquellas células que respondieron a cada una de las dosis de GnRH aplicadas, y por lo tanto que cambiaron su concentración de calcio intracelular. Se descartaron como gonadotropos a todas aquellas células que no presentaron ningún cambio ante el estímulo i.e. B) células con oscilaciones espontáneas, pero sin respuesta o C) células silentes

obtenida, i_2 la imagen promedio de las primeras 5 imágenes de la secuencia obtenida (condición basal), $k_1=1$ y $k_2=2$.

El análisis de las células individuales se realizó trabajando sobre la secuencia de imágenes (ΔF), resultantes del procesamiento anteriormente descrito. Se identificaron y marcaron las células que responden a cada una de las dosis, esto es, aquellas que cambian su concentración de calcio intracelular en respuesta a la estimulación de GnRH (Fig.10A), y se descartaron todas aquellas células que, aunque tenían actividad basal no cambiaban su concentración de Ca^{2+} en respuesta al GnRH (Fig. 10 B) o bien aquellas que permanecieron silentes, i.e. sin modificaciones (Fig. 10C). Para facilitar la identificación de las células que respondieron a un aumento en la fluorescencia a la aplicación de GnRH, se obtuvieron imágenes de la desviación estándar (DE) de los segmentos de interés de las películas. En las imágenes DE, las áreas con valores de intensidad correspondieron a las células con grandes cambios de fluorescencia, mientras que las áreas con valores bajos de intensidad corresponden a las células que tuvieron menos actividad o permanecieron sin cambios. La intensidad de los cambios de fluorescencia se desplegó con un código de color con fines ilustrativos. Las regiones de interés (ROI's) correspondientes a las células que se activaron en respuesta a la aplicación de GnRH, fueron dibujadas en la imagen DE y transferidas a las diferentes películas. De este modo se obtienen los cambios en la fluorescencia de cada célula durante el registro. La selección de las células se verificó analizando de forma manual cada una de las células de la rebanada con la finalidad de no excluir algún tipo de respuesta no detectada por la imagen DE. Una manera de representar la información obtenida es a través de una gráfica en la que se representen los cambios de fluorescencia con respecto al tiempo $F(t)$ para muchas células, es a través de una gráfica multicelular. Este tipo de grafica (multi-cell $F(t)$) fue generada con aplicaciones de Igor Pro 5.03 (Wavemetrics Inc., OR, USA, escritos por el Dr. León Islas). Estas graficas representan, en las abscisas: el tiempo, mientras que los valores de fluorescencia (F) se encuentran en un código de color (Figura 11C). De estas graficas pueden ser extraídos los trazos individuales de los cambios de fluorescencia para cada célula. Las líneas horizontales color azul en las gráficas representan el tiempo aproximado de la llegada y la duración de la exposición al GnRH en la cámara de registro. Las células fueron consideradas para el análisis cuando su incremento correspondió a dos o más veces la desviación estándar del ruido y de la fluorescencia basal.

Análisis de datos

El área bajo la curva y le número de oscilaciones en función del tiempo fueron obtenidas a través de una rutina escrita en MATLAB (The Math-Works, Inc., Natick, MA) escrito por el Ing. Manuel Álvarez. Los datos fueron analizados con la prueba de normalidad (Kolmogorov–Smirnov). Cuando los datos mostraron una distribución normal, se llevaron a cabo pruebas de estadística paramétrica, i.e. ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tuckey's o ANOVA de dos-vías, con una prueba *post hoc* de Bonferroni. El ajuste de las distribuciones Gaussianas fue hecho en base a la frecuencia de datos (la amplitud media y desviación estándar (DE) fueron obtenidos y comparados con una prueba de Pearson para establecer su significancia). Los datos de la figura 5 están expresados en porcentajes, por lo tanto fueron analizados usando la prueba de χ^2 . El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., California, USA). El límite de significancia se tomó con un valor $p \leq 0.05$. Las imágenes de las figuras se elaboraron con el programa Adobe Ilustrador (Adobe©, USA).

Verificación del tratamiento.

Para todos los ratones usados en este estudio, fueron removidas y pesadas las vesículas seminales y la próstata, para verificar el efecto de los tratamientos sobre los órganos dependientes de andrógenos (Tabla 2). El peso de estos órganos fue corregido respecto al peso de cada animal (PC), n= 6 animales por condición.

RESULTADOS

Verificación del efecto de la castración

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos respecto del peso de las vesículas seminales, y de la próstata de los ratones utilizados en este estudio (ver métodos). El peso de estos órganos dependientes de andrógenos, disminuye significativamente a los 15 y 45 días después de la castración cuando son comparados con el control (n= 6 ratones por grupo). A través de la medición del peso de los órganos dependientes de andrógenos podemos inferir que los niveles de testosterona disminuyeron significativamente después de la gonadectomía.

Tabla 2. Cambios en el peso de la próstata y las vesículas seminales después de la castración. El peso de los órganos dependientes de andrógenos (corregido por el peso total de cada animal) fue medido en los tres grupos (control y 15 y 45 días después de castrado) n=5 ratones por grupo. Todos los resultados se presentan como la media \pm EE. Los datos fueron comparados por medio de una ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tuckey's (P< 0.001). Todos los grupos fueron comparados contra el control

	Próstata	Vesículas seminales
	(g/100 g Peso)	(g/100 g BW)
Control	0.117 \pm 0.009	0.241 \pm 0.0175
Castrado 15 días	0.036 \pm 0.005*	0.130 \pm 0.0314*
Castrado 45 días	0.014 \pm 0.0008*	0.044 \pm 0.005*

Registros de patrones de señalización de Ca²⁺ intracelular inducidas por GnRH de gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón macho.

La preparación de rebanadas cuenta con muchas ventajas por sobre otras técnicas, ya que con ella se pueden observar las células conservando algunas de las características de su medio ambiente, además de poder observar decenas de células al mismo tiempo y hacer un seguimiento de su actividad de Ca²⁺ a lo largo de diferentes

estímulos. Por ejemplo, la Figura 11 presenta los registros de las señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH en varias células simultáneamente en una rebanada de hipófisis de ratón macho. La rebanada fue expuesta durante 30 segundos a 100 nM de GnRH y las células que se activaron (i.e. que presentaron un cambio de fluorescencia en respuesta al estímulo con GnRH) fueron identificadas en la imagen desviación estándar (Imagen DE, ver métodos), la cual fue obtenida al momento de la aplicación de GnRH en el baño. Las células que respondieron aparecen como las áreas con valores de mayor intensidad (ejemplo figura 11B células 1-4). Para poder observar el comportamiento de las células antes del estímulo con GnRH se adquirió una serie de imágenes antes del estímulo (90 imágenes en un periodo de 30 segundos), el resumen de estas imágenes se presenta en la imagen desviación estándar correspondiente al mismo campo antes de la aplicación de GnRH mostrado en la figura 11A. En la imagen desviación estándar se dibujaron los contornos de todas las células que respondieron a GnRH, a estos contornos se les denominó “Regiones de Interés” (ROIs, por sus siglas en inglés) En las figuras 11A y 11B estas ROIs fueron usadas para la cuantificación de la media del ΔF a lo largo del tiempo. A su vez, para poder observar en una misma gráfica, los cambios de fluorescencia de todas las células que responden a cada una de las dosis aplicadas de GnRH a lo largo del tiempo, se realizó un grafica multil-celular (multi-cell plot). Un ejemplo de este tipo de gráfico se muestra en la figura 11C y donde se puede observar la actividad de 81 células que respondieron a GnRH. Cada columna representa los cambio de fluorescencia en función del tiempo para la actividad basal (actividad antes de que las células sean estimuladas), así como para cada una de las dosis aplicadas de GnRH (0.01 nM GnRH-100 nM GnRH). Los cambios de fluorescencia (valores de ΔF) son representados por los cambios de color, que en este caso van de 0 a 70 UA (unidades arbitrarias). En la figura se puede observar claramente que cuando las células son expuestas a la GnRH hay un importante cambio en la fluorescencia. La mayoría de las células comienzan a responder desde la aplicación de la dosis de 0.1 nM de GnRH, mientras que las restantes son reclutadas con dosis mayores de GnRH. La respuesta de cada una de las células varía en latencia, magnitud, duración, así como en el patrón de la señal, dependiendo de la concentración de GnRH aplicada. La respuesta de GnRH de los ROIs 1-4 mostradas en la figura 11B se grafican en la Figura 11D. Aquí se pueden observar los diferentes patrones de Ca^{2+} intracelular que presentan, para las diferentes dosis aplicadas, el tiempo de aplicación de GnRH se representa con la barra azul. Los registros 2-4, muestran como algunas células no responden a dosis bajas y pero son reclutadas con las dosis más altas.

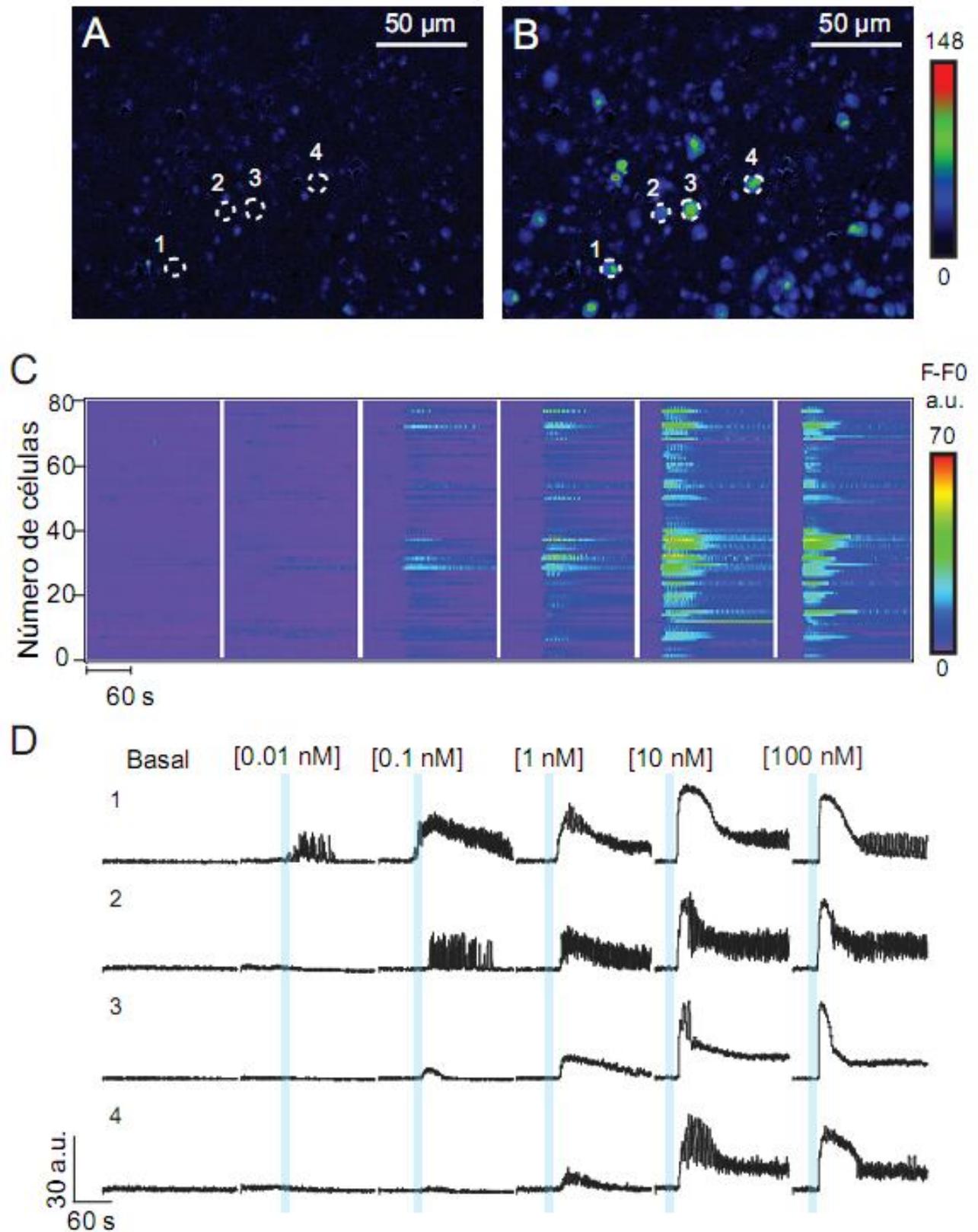


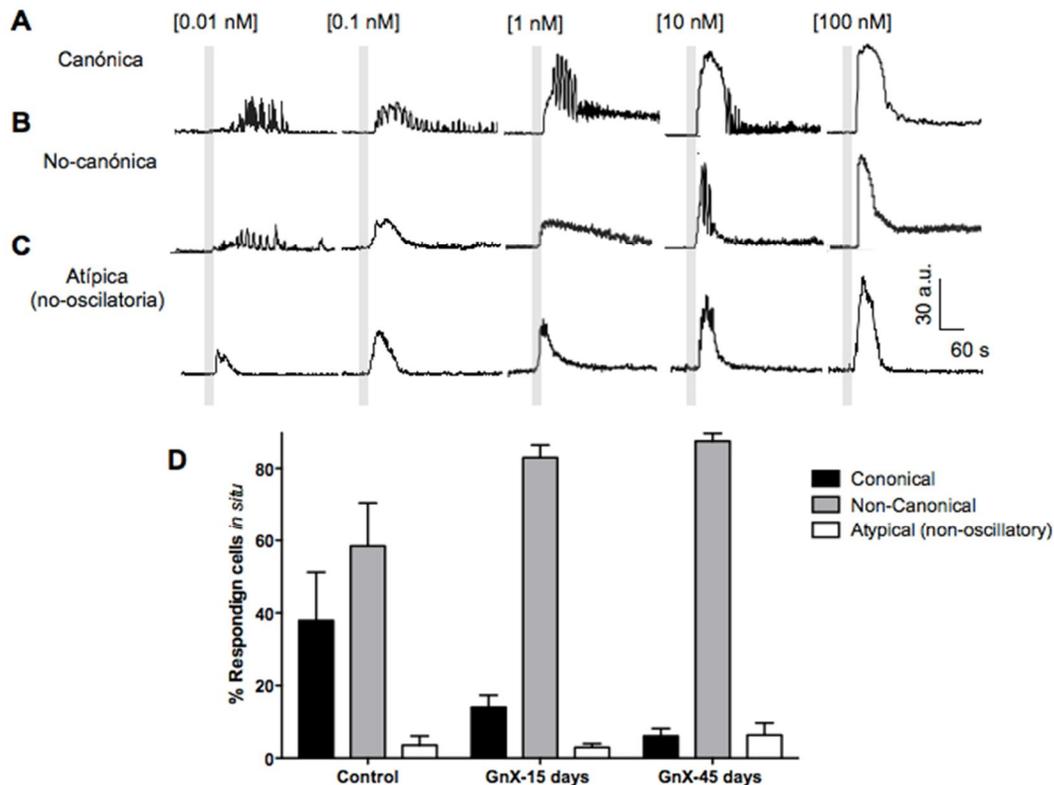
Figura 11. Imágenes desviación estándar del mismo campo antes (A) y después (B) de la aplicación de GnRH. En C se ilustran los cambios en la intensidad de fluorescencia, y por tanto los cambios de Ca^{2+} intracelular, de 81 células que respondieron a cinco diferentes concentraciones de GnRH, (la intensidad de fluorescencia se indica con el cambio de colores). La respuesta de GnRH de los ROIs (áreas de interés, i.e. células marcadas) 1-4 mostradas en B se grafican en D.

La castración afecta la proporción de células con respuestas de Ca^{2+} a GnRH canónicas, no canónicas y atípicas.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las células responden a [GnRH] desde 0.1 nM, como se muestra la figura 11D. Sin embargo, cuando los gonadotropos son expuestos a diferentes dosis de GnRH exhiben diferentes patrones de señalización de Ca^{2+} . En gonadotropos en cultivo primario se estableció que estos diferentes patrones de señalización de Ca^{2+} se presentaban en función de la dosis de GnRH a la que son expuestos i.e. oscilaciones a bajas dosis, que incrementan su frecuencia a dosis intermedias de GnRH y presentan un patrón de Ca^{2+} de tipo espiga-meseta a dosis de saturación de GnRH, como se ejemplifica en la figura 12A. De esa manera, se presenta una secuencia del tipo de respuesta de los gonadotropos en función de las dosis crecientes de GnRH a la cual son expuestos. Esta secuencia fue denominada respuesta “canónica” (Sánchez-Cárdenas & Hernández-Cruz, 2010). No obstante, a diferencia de lo observado en cultivo, en los gonadotropos registrados *in situ*, solamente el 20% de células aproximadamente la presentan, dado que la mayoría de las células (55%) no siguen la secuencia canónica sino que muestran un patrón de señalización de Ca^{2+} que fue denominado “no-canónico” (en el cual se pueden presentar respuestas oscilatorias o de tipo espiga-meseta a cualquier dosis aplicada de GnRH). Finalmente, las células restantes (~30%) muestran patrones de respuesta atípicos de [Ca^{2+}], i. e. respuestas simples transitorias, no oscilatorias (Figura 12C).

Dado que la castración estimula de manera intensa y específica a la población de gonadotropos de la hipófisis, nos preguntamos si esta condición altera el porcentaje de células que presentan la secuencia de respuestas de Ca^{2+} de tipo canónica, no-canónica y atípica. En la figura 12D se comparan las proporciones de las respuestas en la población de gonadotropos de ratones control (intactos) y ratones de 15 y 45 días post-castración. En el grupo control, el porcentaje de células que responden a dosis crecientes de GnRH con respuestas canónicas, no-canónicas y atípicas fue de 37.8%, 58% y 3.6%, respectivamente. Los porcentajes cambiaron significativamente después de la gonadectomía, mientras que la fracción de células con respuestas atípicas permaneció sin cambios, la no-canónica aumentó dramáticamente (de 58% a 82 y 87%, luego de 15 y 45

días después de la castración, respectivamente,). El aumento en estos porcentajes ocurre



a

Figura 12. Patrones de respuesta a Ca^{2+} obtenidos a dosis diferentes de GnRH de células individuales en rebanadas de hipófisis de ratón macho. Las células fueron expuestas a dosis crecientes de GnRH, mostrando diferentes tipos de respuesta A) canónica, B) no-canónica C) atípica (no oscilatoria). La grafica de barras resume el promedio del porcentaje de las células que muestran los diferentes tipos de respuestas tanto para la condición control, así como para los castrados a los 15 y a los 45 días

expensas de una reducción de la fracción de células que responden con el patrón de tipo canónico.

La respuesta de Ca^{2+} de tipo no-canónica se vuelve la respuesta de Ca^{2+} predominante de la población de gonadotropos en ratones castrados, reduciendo a menos del 10% las respuestas de tipo canónicas y atípicas, en gonadotropos de ratones 45 días después de la castración. Estos cambios podrían tener implicaciones funcionales en relación al aumento de secreción de gonadotropinas que caracteriza a esta condición.

Número y tamaño de las células que responden a GnRH después de la castración.

Se ha documentado que después de la castración el número de células inmunoreactivas a LH y FSH en la hipófisis aumenta (Sakai et al, 1988; Sakuma et al, 1984; Shiino, et al, 1979, 1982; Nakayama et al 1975 Cónsole et al, 2001). Este aumento en la población de gonadotropos después de la castración resulta de la estimulación de la actividad mitótica en respuesta a los altos niveles de GnRH en la hipófisis {Inoue, 1985 #2579; Sakai, 1988 #2539} Para corroborar si este aumento en la población de gonadotropos es similar a lo reportado previamente, en este trabajo utilizamos una dosis saturante de 100 nM de GnRH, a manera de poder identificar todas las células que responden a la hormona en el campo visual. Las figuras 13A, B muestran las imágenes desviación estándar obtenidas después de que el GnRH (100 nM) fue aplicado, tanto a la rebanada de hipófisis de ratón control (13A) como a una rebanada de ratón 15 días después de la castración (13B). Visualmente, el número de células que responden a GnRH es mayor en la figura 13B que en la 13A, sin embargo es en la figura 13C donde se compara el número de células que responden a cada dosis de GnRH en el campo de registro ($230 \times 173 \mu\text{m}^2$) de rebanadas de hipófisis de ratón control, así como en rebanadas de hipófisis de ratón a los 15 y 45 días después de la castración (n= 6 rebanadas obtenidas de 6 diferentes ratones por condición). Se puede observar que para las rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado después de 15 días, se presenta un aumento en el número de células que responden en todas las dosis aplicadas, aunque solamente se encontraron diferencias significativas para las dosis de 10 y 100 nM de GnRH. También podemos observar que el aumento no es persistente, ya que 45 días después de la castración el número de células que responden es menor que después de 15 días de castración. En la figura 13D se compara el número de células que responden a GnRH en el ratón control (56.33 ± 8.01 EE), con el número de células que responden a 100 nM GnRH en el ratón castrado a los 15 días (82.56 ± 11.15 EE), en el último caso se observa un aumento significativo ($P < 0.05$). Sin embargo, este efecto no se observa 45 días después de la castración (51.50 ± 4.8 EE). Para descartar una estimulación no selectiva de la proliferación celular en la hipófisis después de la castración, la misma rebanada fue bañada con una solución salina con alto K^+ (140 mM) para provocar una despolarización de la membrana en todas las células de la hipófisis y así identificar a

todas las células excitables (con canales de Ca^{2+} voltaje dependientes) en el campo. En la Figura 13E se grafica el número de células que responden bajo las mismas condiciones experimentales que se presentan en la figura 13D. El número total de células que respondieron al alto K^+ no aumentó después de la gonadectomía. Por lo tanto, podemos decir que el aumento en la proliferación celular después de la castración es específico de la población de gonadotropos, sin embargo si se observó una disminución en el número de células que responden 45 días después de la castración del cual no tenemos explicación de momento.

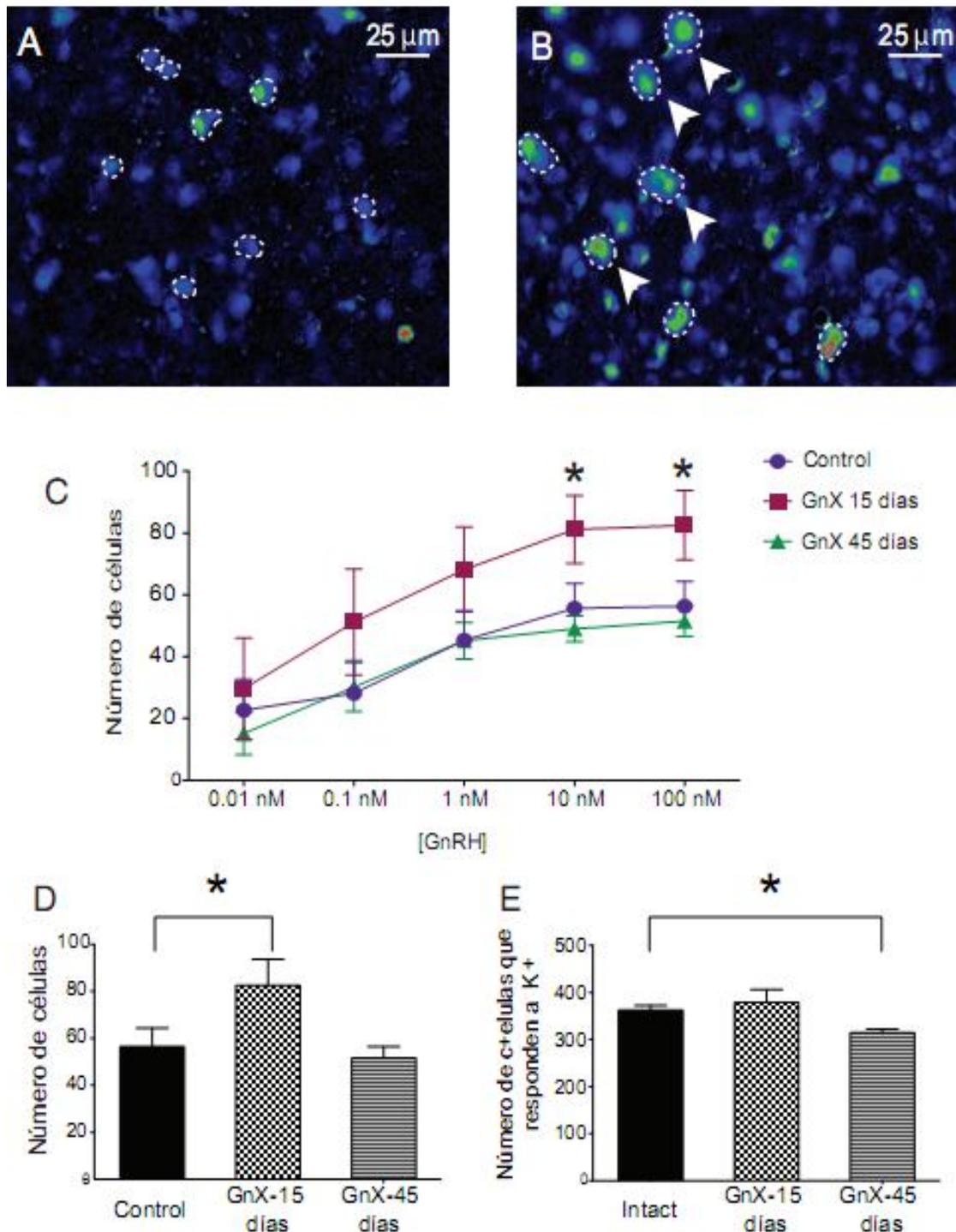


Figura 13. Imágenes desviación estándar obtenidas después de la aplicación de 100 nM de GnRH a la rebanada de hipófisis de ratón control (13A) y una rebanada de ratón castrado a los 15 días (13B). C muestra el aumento del número de células para cada una de las dosis de GnRH aplicadas. D) Muestra el número de células que respondieron a 100 nM de GnRH en las tres condiciones, se puede observar una aumento en el número de células que respondieron en los animales castrados a los 15 días (82.56 ± 11.15 EE) comparado con el control (56.33 ± 8.01 EE). Dicho aumento no se mantiene a los largo del tiempo (51.50 ± 4.8 EE). En E podemos observar la comparación del número de células que respondieron a alto-K (140 mM) en solución salina. Todos los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía $P < 0.05$

Se ha reportado que después de la castración no solo se presenta el aumento en el número de gonadotropos en la hipófisis, sino que algunos de esos gonadotropos también aumentan de tamaño (Sakai et al, 1988, Cónsole et al, 2001). De hecho, las células hipertróficas son características de esta condición y se les conoce como “células de la castración” (Shiino, M. 1979, Nakayama et al, 1975). Los cambios ultraestructurales observados en estas células incluyen la disminución de los gránulos de secreción, el agrandamiento del retículo endoplásmico, la expansión del aparato de Golgi y la presencia de mitocondrias anormales (Cónsole et al, 2001). En el ejemplo que se ilustra en la Figura 13B se observan varias células que responden a GnRH que son más grandes respecto de las observadas en la Figura 13A, que corresponde a la condición control. Varias de las células hipertrofiadas se indican con flechas. En este trabajo se decidió examinar si la hiperplasia de los gonadotropos también se manifiesta usando estudios funcionales *in situ*, por lo que se identificaron aquellas células que respondieron al GnRH en la rebanada y se dibujaron sus contornos, de tal forma que se delimito el área de cada gonadotropo, posteriormente el área correspondiente al cuerpo celular se midió usando una rutina de segmentación del programa Image J del NIH y se categorizaron de acuerdo al tamaño de área que presentaban, construyendo así los histogramas de frecuencias de distribución del tamaño (área) de las células que respondieron en cada una de las tres condiciones experimentales, Estos histogramas se muestran en la figura 14, en A se muestra el histograma de frecuencia para el control (ratón intacto), mientras que B y C se muestran los correspondientes a los ratones de 15 y 45 días después de la castración, respectivamente. El número en la parte superior derecha de cada histograma es el número de células de cada distribución. En primer lugar podemos mencionar que, como mostramos anteriormente, 15 días después de la castración el número de células que responden es más abundante, sin embargo lo importante a señalar aquí es que los rangos en que se encuentran distribuidas las células de ratón macho intacto van de las $10 \mu\text{m}^2$ a las $90 \mu\text{m}^2$ de área con una media de $31.3 \pm 0.6 \mu\text{m}^2$ (media + EE). 15 días después de la castración, además del ya señalado aumento en el número de células, es evidente que algunas presentan un mayor tamaño, ya que los rangos entre los que se distribuyen van desde las $10 \mu\text{m}^2$ a $180 \mu\text{m}^2$. Por lo tanto el ancho de la distribución se ensancha después de la castración, debido a la aparición de células grandes ($>60 \mu\text{m}^2$), las cuales están ausentes en las hipófisis de ratones intactos.

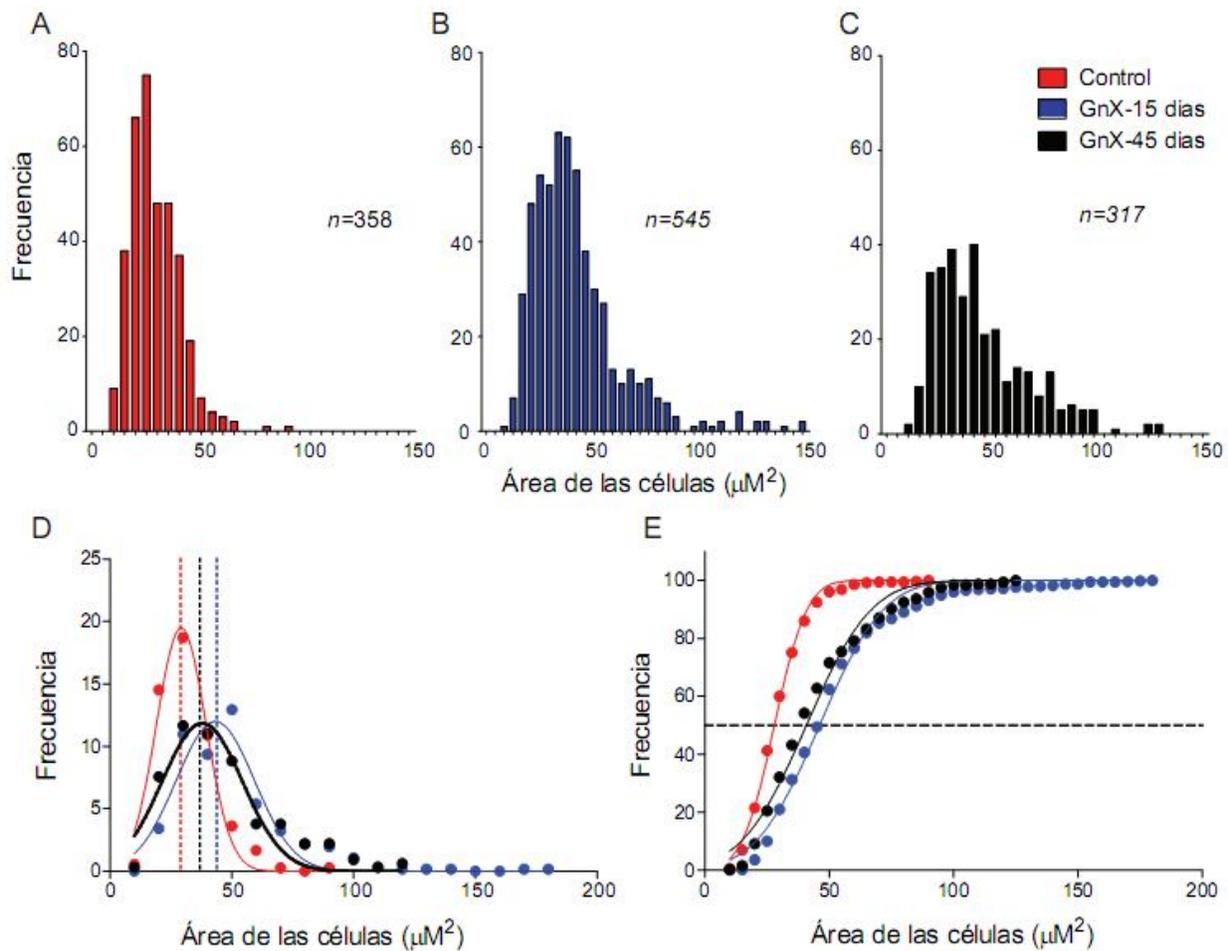


Fig.14 Crecimiento de los gonadotropos después de la castración A-C) Histogramas de distribución del tamaño del área de los gonadotropos para ratones intactos (histograma rojo A), ratones castrados después de 15 días (azul B) y después de 45 días (negro C). Las clases son en intervalos de 5 μM^2 . El número total de gonadotropos están indicados para cada gráfica. Una función Gaussiana sencilla fue ajustada a la histograma en A, y una distribución doble para B y C. D) Los mismos datos fueron graficados como frecuencia acumulada y ajustados a una función Gaussiana acumulativa. Estos datos claramente ilustran el corrimiento a la derecha de la distribución del tamaño de los gonadotropos de ratones castrados comparados con los de ratones intactos.

La media de la distribución se corre aproximadamente 20 μM^2 a la derecha, con respecto al control ubicándose en $54.4 \pm 1.20 \mu\text{M}^2$ (media \pm EE). Esto quiere decir que el área que se presenta con mayor frecuencia, ya no es $\sim 30 \mu\text{M}^2$ como sucede en el ratón control (Figura 14A), sino que el tamaño de área que se presenta con mayor frecuencia es alrededor de las 50 μM^2 (Figura 14B).

La figura 14 D muestra una gráfica de frecuencia relativa de los mismos datos. Se hizo un ajuste a una distribución Gaussiana que ilustra a las tres poblaciones y donde se puede observar que el pico de la distribución del área de los gonadotropos de ratones

después de 15 y 45 días de castración tiene un desplazamiento hacia la derecha con respecto al control. Esto es que la amplitud promedio en los experimentos de ratones control 19.78 ± 9.95 (amplitud \pm DE) cambió a 11.12 ± 16.73 (amplitud \pm DE) en castrados de 15 días y 11.48 ± 15.93 (amplitud \pm DE) en los ratones 45 días de castración, lo que significa que en los castrados además de modificarse el pico de la distribución (i.e. la media), también se modifica la amplitud y la desviación estándar, estos dos últimos parámetros nos indican que el rango de la distribución es más amplia en los ratones castrados que en los controles, lo cual puede resultar de un déficit de células pequeñas ($<30 \mu\text{m}^2$) y de un exceso de células de medianas $>30 \mu\text{m}^2$, así como de la presencia de células de gran tamaño ($>60 \mu\text{m}^2$). Estas células grandes, que representan apenas el 2.6% de la población de gonadotropos de los ratones control, se vuelven más numerosas en los ratones 15 y 45 días después de la castración (26 o 25% respectivamente). En estos últimos las células de mayor tamaño pueden alcanzar áreas $>100 \mu\text{m}^2$.

La figura 14 E muestra una gráfica de frecuencia acumulada (%) donde se aprecia que hay un cambio en el tamaño de las células después de la castración de forma más categórica, ya que en esta se puede observar el corrimiento a la derecha de la distribución de frecuencia de áreas 15 y 45 días después de la castración. La población de castrados tiene un comportamiento similares entre ellos (15 y 45 días) pero diferente al del control ($p>0.001$). Sería interesante investigar si el corrimiento de la media de la distribución en los animales castrados resulta de un crecimiento indiscriminado de todos los gonadotropos y si las células $> 60 \mu\text{m}^2$ son células que recién aparecieron (i.e. resultado de la proliferación de los gonadotropos) o bien, si derivan de una forma pre-existente de gonadotropos

¿Los gonadotropos hipertrofiados de ratones castrados generan diferentes señales de Ca^{2+} en respuesta a GnRH?

Además del cambio en el tamaño de los gonadotropos (células de la castración), también se ha descrito en estas células el crecimiento del retículo endoplásmico y una expansión del aparato de Golgi (Console, 2001; Nakayama, 1975; Inoue, 1981). Como el retículo endoplásmico es el principal responsable de la producción de las señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH, nos preguntamos si los gonadotropos hipertrofiados que han

desarrollado este aumento en el tamaño del retículo endoplásmico pueden generar señales de Ca^{2+} con características diferentes. La amplitud del pico máximo de fluorescencia, equivalente al pico máximo en la señal de Ca^{2+} producido por una concentración de 100 nM de GnRH, fue medido para cada gonadotropo en las tres condiciones. El valor del pico de ΔF (media \pm DE) obtenido fue: ratón intacto: 23.3 ± 0.8 UA (n=358 células); 15 días de la castración: 26.5 ± 0.6 UA (n=545 células) y 45 días después de la castración: 20.38 ± 0.44 (n=317 células). Las diferencias entre los grupos no fueron significativas.

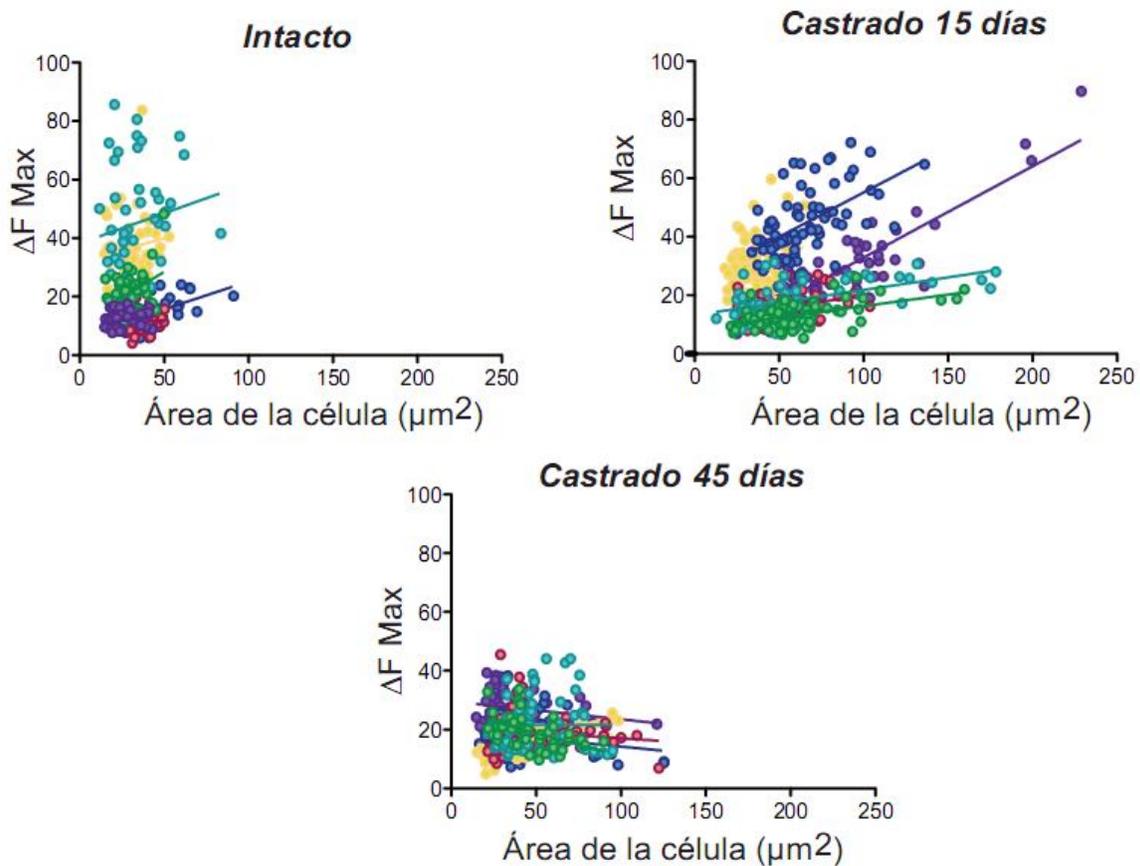


Fig.15 Gonadotropos de ratones a los 15 días de castración, tienden a generar señales de Ca^{2+} de gran amplitud. Graficas de amplitud de pico máxima versus el tamaño del área de los gonadotropos. Ordenadas: amplitud de pico máximo de las señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH (pico ΔF). Abscisas: tamaño del área de los gonadotropos (μm^2). N=6 de para cada una de las condiciones experimentales. Los datos se obtuvieron de 6 diferentes rebanadas, provenientes de 6 diferentes animales y cada una se graficó con diferente color. La regresión lineal fue ajustada a cada grupo de datos y la correspondiente línea, fue graficada con su respectivo color. El ajuste de la regresión lineal ajustada a la condición control sugiere que las señales de Ca^{2+} no están relacionadas con las células, lo contrario a lo que sucede a los 15 días de castrados, donde se sugiere que si hay una correlación, y que los gonadotropos hipertrofiados, al menos en algunos ratones, tienen a producir señales de Ca^{2+} más fuertes.

Para analizar si los gonadotropos hipertrofiados y que tienen un RE más desarrollado presentan características en las señales de Ca^{2+} diferentes (por ejemplo una mayor movilización de Ca^{2+}), examinamos el pico máximo de fluorescencia en función del tamaño de la célula (para todas las células de cada uno de los experimentos). Después se ajustó una regresión lineal a cada grupo de datos. La figura 15 muestra las gráficas de tamaño celular vs. amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} inducida por GnRH en cada grupo para las tres condiciones experimentales. En la figura 15A puede observarse que en los gonadotropos del ratón intacto, la mayoría tiene un área $<50 \mu\text{m}^2$ y la amplitud máxima de la señales de calcio son pequeñas (~ 40 UA). Sin embargo algunas células de dos rebanadas exceden el valor (símbolos amarillos y azules). La regresión lineal de todos estos datos da como resultado una pendiente positiva (media de la pendiente= 0.13) y coeficientes de regresión que van de 0.0723 a 0.567 (media $r=0.098$; $n=6$). Esto indica que para los ratones intactos el pico de la señal de Ca^{2+} no se encuentra relacionado con el tamaño de la célula. La figura 15B ilustra los resultados con gonadotropos de animales castrados de 15 días. Este grupo de datos comprende principalmente dos poblaciones, una de células medianas y otra de células grandes. Al relacionar el pico máximo de fluorescencia con el tamaño de las células, encontramos que el grupo de células de tres ratones presentan picos de baja intensidad de fluorescencia (aproximadamente 40UA), pero todas las células restantes, claramente exceden este valor (símbolos amarillos, azules y rosas). La regresión lineal de los datos da pendientes positivas (media de la pendiente= 0.125) y un coeficiente de regresión de 0.034 a 0.878 (media $r=0.256$; $n=6$). Además, cuando se graficó la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} versus el tamaño de la célula, encontramos una correlación lineal con pendiente positiva al cual sugiere que los gonadotropos hipertrofiados tienden a generar señales de Ca^{2+} de mayor amplitud. La figura 15C ilustra los resultados obtenidos de gonadotropos de ratón a los 45 días después de la castración. A estos se les ajusto una regresión lineal, dando principalmente pendientes negativas (media de la pendiente= -0.043) y coeficientes de regresión que van de -0.45 a 0.72 (media $r=-0.12$; $n=6$). Si bien, a los 45 días después de la castración, sigue presente un grupo de gonadotropos hipertrofiados, estos ya no generan señales de Ca^{2+} tan grandes. Estos resultados parecen indicar que en ratones de 15 días post-castración los gonadotropos de mayor tamaño pueden generar una señal de Ca^{2+} de mayor amplitud. Por otro lado, no encontramos una relación obvia entre el tamaño de la célula y otros aspectos de la señalización de Ca^{2+} , confirmando lo que previamente Tomic y colaboradores habían reportado, que no existen diferencias en la amplitud o frecuencia

de las señales de Ca^{2+} en gonadotropos de ratas después de la ovariectomía (Tomic, Koshimizu et al. 1999)

Área bajo la curva de las respuestas de Ca^{2+} inducidos por GnRH en gonadotropos in situ.

Además del pico máximo de fluorescencia, otro parámetro que nos informa sobre el cambio en el comportamiento de la respuesta de Ca^{2+} , es el área bajo la curva. Esta es una medida indirecta de la cantidad de Ca^{2+} que se está movilizando durante la señal de Ca^{2+} (Fig.16 A). El área bajo la curva es el área de una región acotada asociada a una función, esta función es evaluada entre los puntos que la limitan, es decir, en este caso esta región está acotada a la izquierda por el valor inicial del registro de la señal de Ca^{2+} (segundo 0) y a la derecha por el valor final del trazo de la señal de Ca^{2+} (segundo 200), el eje de las abscisas (tiempo) da cuenta de la base del área a medir, el eje de las ordenadas (i.e. intensidad de fluorescencia) la altura del área a medir, mientras que el trazo de la señal de Ca^{2+} es la función que delimita el área en la parte superior. La figura 16A se muestra un ejemplo del área medir la cual esta coloreada de azul.

El área bajo la curva fue obtenida para todas las respuestas de Ca^{2+} en cada una de las dosis aplicadas de GnRH. La figura 16B muestra la media \pm EE de la población de gonadotropos que respondieron para cada dosis. Aquí se puede observar que para los gonadotropos de ratones intactos los valores de área bajo la curva tienen un comportamiento ascendente para las primeras dosis de GnRH aplicadas, con un valor de 2397.167 ± 727 UA (media \pm EE) para la dosis más baja y $(6084.5 \pm 1650$ UA, media \pm EE) para la dosis de 10 nM. Sin embargo, para la dosis de 100 nM el valor de área bajo la curva disminuye $(5055.16 \pm 1169.5$ UA media \pm EE UA) sin embargo esta disminución no fue significativa. En gonadotropos de ratones 15 días después de la castración observamos una disminución del valor de área bajo la curva (con respecto al control) en dosis intermedias (0.1 nM-10 nM [GnRH]), además de un aumento del 12% para la dosis de 0.01 y del 18% en las dosis de 100 nM (no se encontraron diferencias significativas), sin embargo diferencia de lo que ocurre en la condición control, se puede observar comportamiento creciente; i.e. a medida que aumenta la concentración de GnRH aplicada el valor del área bajo la curva es progresivamente mayor y, como se mencionó

anteriormente, el valor del área bajo la curva para dosis más alta (100 nM) llega a ser incluso mayor que en los experimentos control. A los 45 días después de la castración, la tendencia ascendente en función de la concentración de GnRH se sigue conservando, sin embargo los valores son menores que los que presentan tanto el ratón control como el ratón castrado de 15 días, de tal forma que se presenta una disminución de ~50% para las dosis bajas, ~30% para dosis de 1 y 10 nM y 13% para la dosis de 100 nM GnRH con respecto al control. Anteriormente, se había mencionado que el pico máximo de

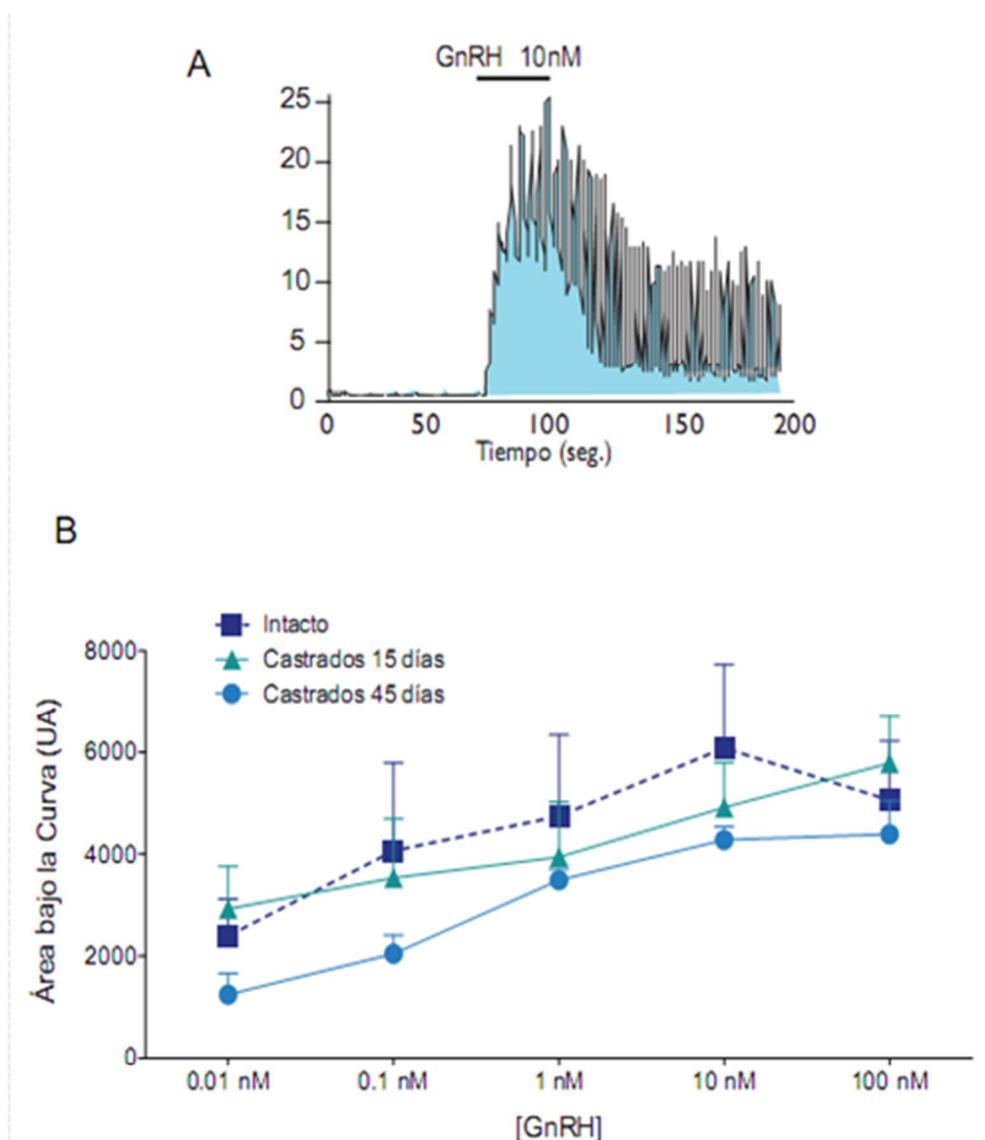


Fig 19 Área bajo la curva de la respuesta de Ca^{2+} de gonadotropos para cada dosis de GnRH aplicada en rebanadas de hipófisis de ratón macho., y después de 15 y 45 días después de la castración. A) ejemplo de un registro de señal de Ca^{2+} intracelular, en azul se ejemplifica el área bajo la curva que se midió para cada señal de Ca^{2+} . B) gráfica del valor del área bajo la curva (media + EE) para cada una de las dosis aplicadas de GnRH. (no se encontraron diferencias significativas)

fluorescencia en la señal de Ca^{2+} de células que responden a GnRH es menor después de 45 días post castración, y dado que tanto el valor del pico máximo de fluorescencia como el área bajo la curva nos dan una medida indirecta de la cantidad de Ca^{2+} que se moviliza, podríamos conjeturar indirectamente que en los gonadotropos de rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado de 45 días hay una menor movilización de Ca^{2+} y por tanto, ya no se están generando grandes señales de Ca^{2+} . Sin embargo para poder comprobar que efectivamente se está movilizando menos cantidad de Ca^{2+} , se necesitaría medir la $[\text{Ca}^{2+}]$ con mayor precisión, lo cual podríamos hacer a través de uso indicadores radiométricos de Ca^{2+} como el fura2.

Reclutamiento de las células que responden al GnRH en función de la concentración de GnRH en rebanadas de ratón control y ratón castrado.

Previamente se demostró que el número de células que responden a GnRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho, aumenta gradualmente en función de la concentración de GnRH aplicada (Cárdenas & Hernández-Cruz). Nosotros también construimos curvas dosis respuesta midiendo el número de células que responden a cada concentración de GnRH, de lo cual obtuvimos una curva dosis respuesta de la población de gonadotropos en cada rebanada de hipófisis estudiada en cada una de las condiciones experimentales (animales control (intactos) y castrados 15 y 45 días post GnX)). Estas

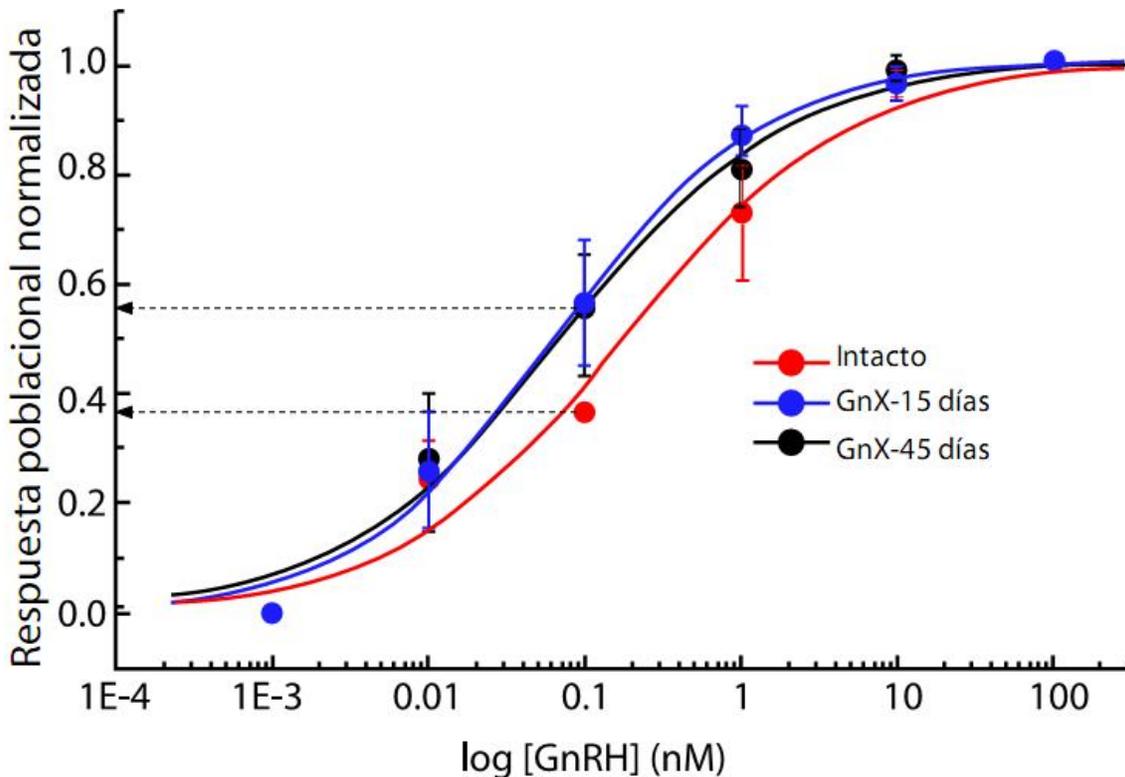


Figura 17 Curvas dosis-respuesta promedio (n=5 por condición) de células que responden a diferentes concentraciones de GnRH. Cada grupo de datos fue promediado y el número de células que responden a GnRH fue normalizado y ajustado a una función logarítmica [GnRH]. Los círculos rojos representan la condición control, los azules corresponden a los experimentos de animales 15 días después de la castración y los rojos 45 días después de la castración, las líneas continuas corresponden al ajuste de la función para cada grupo de datos. Los valores obtenidos fueron 0.174 nM (intacto), 0.069 nM (15 días post-castración) y 0.064 (45 días post-castración): Se puede observar un corrimiento hacia la izquierda lo que sugiere un cambio de sensibilidad en las células de ratones castrados, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (P=0.74; one way ANOVA)

rebanadas fueron sometidas a 5 diferentes concentraciones de GnRH en el rango de 0.01 a 100 nM. El número de células que respondieron en cada concentración de GnRH fue normalizado, y se ajustó una curva dosis respuesta a cada grupo de datos (n=6 por condición), obteniéndose una curva promedio para cada una de las condiciones (Figura 17). Para la población gonadotropos del ratón control se encontró una media ED50= 0.174 nM. Este valor es similar al previamente reportado también en ratones macho intactos (0.39 nM, Cardenas & Hernández-Cruz, 2010). Con respecto a los ratones castrados, las curvas dosis-respuesta promedio arrojaron un valor ED50 de 0.069 nM (15 días) y 0.064 (45 días) (n=6 por condición). La diferencia de ED50 entre los ratones control y los castrados es de ~2.6 veces, el cual puede observarse en la figura 17, donde se presenta como un ligero corrimiento hacia la izquierda de las curva dosis-respuesta en los gonadotropos de ratones castrados, lo que indica un ligero incremento en la sensibilidad al GnRH en la población de gonadotropos de los ratones castrados. No obstante, estas diferencias no resultaron significativas ($P= 0.74$; one-way ANOVA), lo cual puede deberse a la varianza tan grandes entre las rebanadas de una misma condición. Al igual que Sánchez-Cárdenas & Hernández-Cruz, encontramos mucha heterogeneidad entre las curvas dosis respuesta dentro de una misma condición, tanto en los experimentos control como en los experimentos de animales castrados

Cuantificación de los componentes de las respuestas de Ca^{2+} inducidos por GnRH en gonadotropos in situ.

Durante varios años se han hecho esfuerzos para comprender las características de la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en relación a la concentración de GnRH. En particular se ha investigado las posibles implicaciones de estas respuestas, cuáles de estos patrones de señalización de Ca^{2+} regulan la secreción de gonadotropinas o bien, cuales son las implicaciones de los diferentes patrones de señalización de Ca^{2+} al GnRH. En gonadotropos en cultivo se han descrito tres tipos de respuestas de Ca^{2+} : 1) subumbral 2) oscilatoria y 3) bifásica (Leong and Thorner, 1991; Tomic et al, 1994), esta última incluye dos variantes, bifásica oscilatoria y bifásica no-oscilatoria (espiga-meseta). Estos diferentes tipos de respuesta se pueden presentar en función de la concentración de GnRH a la que las células son expuestas y la frecuencia pero no la amplitud de la oscilación de Ca^{2+} aumenta con la concentración de GnRH aplicada (Tomic et al, 1994).

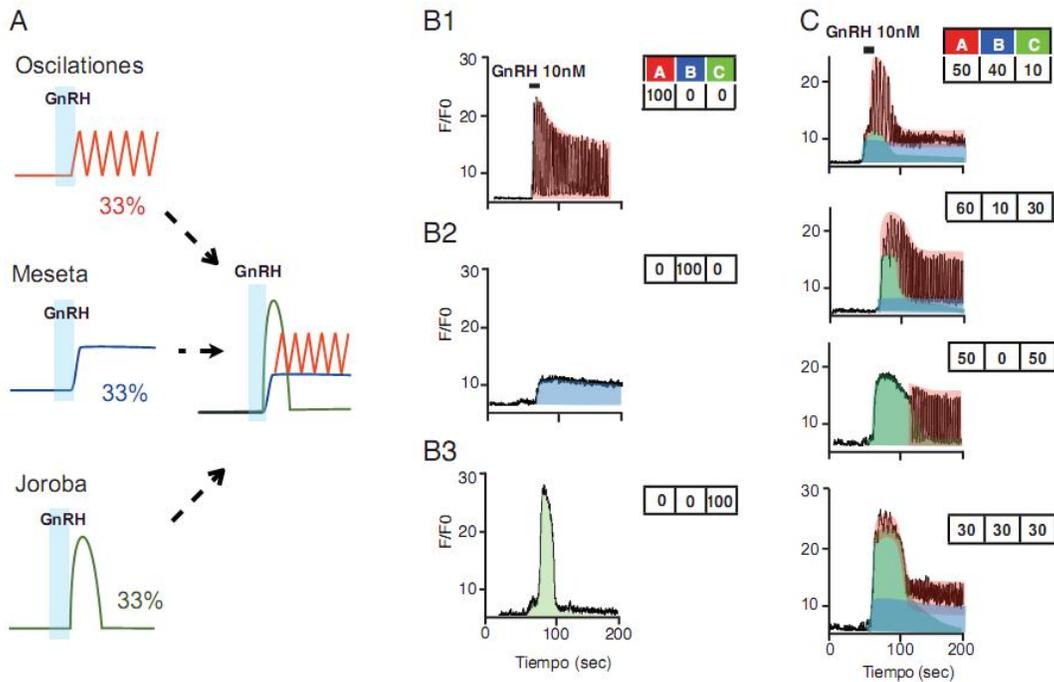


Figura 18. Componentes de la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en gonadotropos in situ. A) Muestra el componente de tipo oscilatorio, B) componente tipo meseta y C) componente tipo Joroba. La combinación de estos componentes da como resultado el patrón de respuesta de Ca^{2+} , del lado derecho se muestran ejemplos representativos de las diferentes respuestas de Ca^{2+} inducida por GnRH y la contribución de los diferentes componentes a cada una de estas respuestas.

El porcentaje de las células que presentan cualquiera de estos tres tipos de patrones de respuesta a una concentración dada de GnRH varía durante el desarrollo, a lo largo del ciclo estral y después de la ovariectomía (Tomic et al, 1994). En general se ha llegado al consenso de que la secreción de LH en gonadotropos puede ser disparada por cualquier elevación de Ca^{2+} intracelular, sin ningún patrón de señalización de Ca^{2+} específico (Leong and Thorner, 1991; Tomic et al, 1994). Sin embargo, todavía no se ha elucidado cuáles son los aspectos celulares que determinan el patrón de señalización de Ca^{2+} mostrado por cada gonadotropo en respuesta al GnRH.

En un intento por estandarizar cuantitativamente los parámetros de clasificación de la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH; y con la finalidad de comparar los efectos de las diferentes condiciones fisiológicas y no fisiológicas (en este caso los efectos de la gonadectomía), desarrollamos el método de cuantificación representado en la Figura 18. De acuerdo con este esquema, en lugar de visualizar una célula con un tipo determinado

de respuesta, como se ha descrito previamente, la respuesta de cada célula fue concebida en base a la aportación de tres componentes independientes (A: oscilaciones, B: meseta y C: joroba) los cuales coexisten en cualquier célula dada. Esta clasificación se basó en la observación de que cualquier respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en gonadotropos presentaba al menos uno o bien la combinación de estos tres componentes en diferentes proporciones. Así, cada señal de Ca^{2+} generada puede ser representada como la sumatoria de tres componentes, asignándole a cada uno un valor entre 0 y 100, dependiendo la magnitud con la que se presente cada componente en la respuesta. La suma de todos los componentes da siempre 100. El esquema que se muestra en la Figura 18A ejemplifica como la combinación de los tres componentes (en este caso, en igual proporción) da como resultado una determinada respuesta de Ca^{2+} al GnRH. En este ejemplo, cada componente contribuye con un 33%, por lo tanto el correspondiente código de la proporción de los componentes es: 33% oscilatoria (A), 33% meseta (B) y 33% joroba (C). Obviamente, como se muestra en la figura 16B1, algunas células presentan solo un tipo de respuesta, en este caso únicamente oscilatoria (por lo que el código sería: 100 (A=oscilatoria), 0 (B= meseta), 0 (C=joroba)) por consiguiente la respuesta de Ca^{2+} de la célula 18B2 es netamente meseta (código: 0, 100, 0) y la respuesta 18B3 es netamente joroba (código: 0, 0, 100). Generalmente la respuesta de Ca^{2+} resulta de la combinación de los tres tipos de componentes. La Figura 18C ejemplifica la respuesta de Ca^{2+} obtenida de cuatro diferentes gonadotropos *in situ*. Con fines ilustrativos, cada uno de los componentes están indicados en colores diferentes, y la asignación de valores resultante aparece a la derecha de cada trazo. Cabe mencionar que una desventaja de este método es que los valores son asignados subjetivamente. Sin embargo, el mismo individuo asigna valores similares a registros similares. Para verificar que esta asignación, a pesar de ser subjetiva, tuviera los mismos criterios, sin importar quien la llevara a cabo, dos individuos asignaron los valores a las mismas señales de Ca^{2+} y encontramos que las diferencias entre una asignación y la otra eran pequeñas y no alteraban la proporción en la que se encontraban los componentes en la población. Por otro lado, nuestro código de parámetros da una idea razonable de cómo está integrada la respuesta de Ca^{2+} , y es menos ambiguo que la clasificación alternativa (subumbral, oscilatoria y bifásica) la cual, a su vez también es subjetiva.

La figura 19 ilustra la proporción de los componentes de la respuestas de Ca^{2+} encontradas en la población de gonadotropos de 6 rebanadas de hipófisis de ratón

control, a diferentes concentraciones de GnRH (expresado como porcentaje). La altura de cada barra en la gráfica representa la fracción de los diferentes componentes, en rojo se representan las oscilaciones, en azul el componente meseta y en verde el componente joroba. En la concentración de 0.01 nM de GnRH la fracción del componente oscilatorio es de 48%, para el componente meseta 20% y para el componente joroba 30%. Estas proporciones permanecen prácticamente constantes a concentraciones de 0.1 y 1 nM de GnRH, sin embargo, a altas concentraciones de GnRH (10 y 100 nM), el componente oscilatorio disminuye (de 41% y 24% respectivamente) a expensas de un incremento en la contribución del componente joroba (más del 53% a 100 nM). Dicho comportamiento es muy parecido a la progresión de las respuestas de la señal de Ca^{2+} observada a dosis crecientes de GnRH reportado previamente en gonadotropos en cultivo, donde a medida que la dosis aumenta, las oscilaciones disminuyen y la respuesta bifásica aumenta (Iida et al, 1991; Tomic et al, 1994; Tobin and Canny, 1996). Cabe de señalar que a diferencia de lo que ocurre en cultivo, cuando las células son estimuladas con una dosis 100 nM de GnRH en la población de gonadotropos *in situ* una fracción del componente oscilatorio (24%) permanece, esto probablemente refleja la alta proporción (cerca del 55%) de los gonadotropos que muestran patrones de respuesta de tipo no-canónicos en la preparación de rebanadas de hipófisis (ver figura 12).

El patrón de respuesta de Ca^{2+} observado en gonadotropos a los 15 días de castración se representan en la figura 19B. Nótese que el componente oscilatorio a concentraciones de GnRH de 0.01 nM es mayor (61%), comparado con 48% en gonadotropos control. Esto ocurre a costa de disminuir el componente meseta. Pero a medida que la dosis de GnRH aumenta, el componente oscilatorio disminuye gradualmente hasta alcanzar 32% a una concentración de 100 nM de GnRH. Nuevamente eso se mantiene con un incremento de la participación del componente joroba (de 30% a 50%). De esa manera, la respuesta de Ca^{2+} en la población de gonadotropos a concentraciones de GnRH crecientes es similar entre ratones control y castrado de 15 días. Los resultados obtenidos para la condición de castrados *in situ* difiere de lo que ocurre en cultivo bajo esta misma condición, donde de acuerdo a varios reportes, después de la castración la mayoría de los gonadotropos

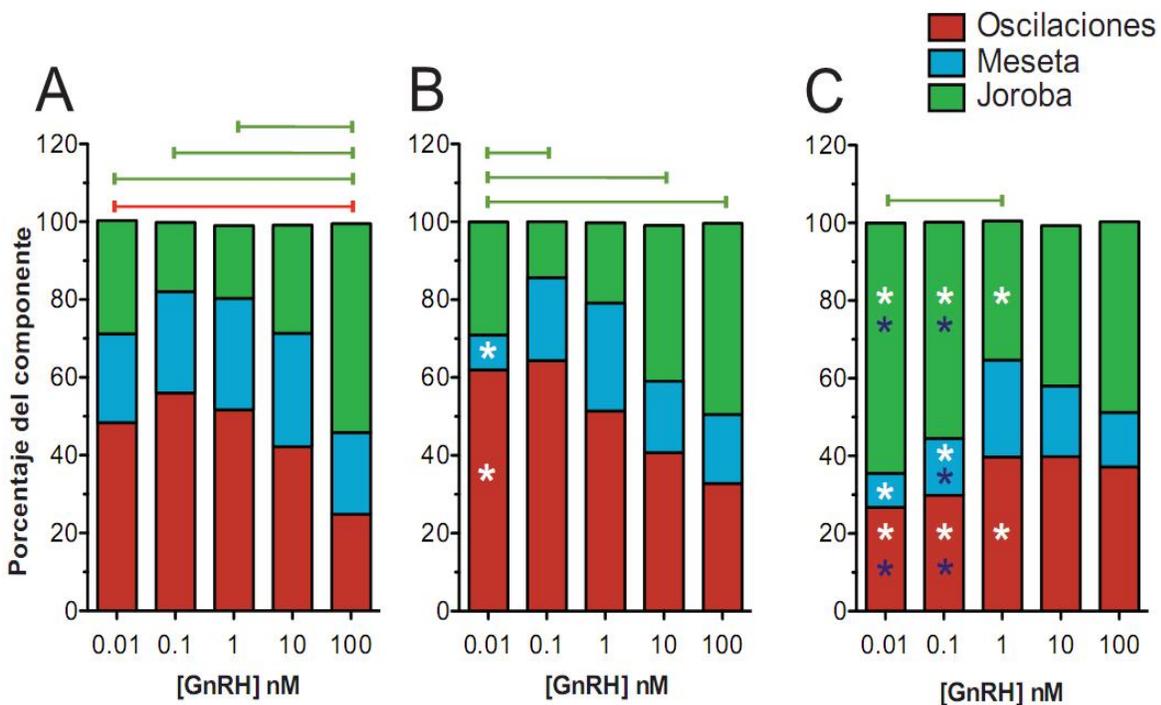


Figura 19. Distribución de los componentes en los patrones de respuesta de Ca^{2+} observados en ratones control, 15 y 45 días después de la castración. Los porcentajes de cada uno de los componentes (oscilatorio=rojo, meseta=azul, joroba=verde) fueron asignados a cada uno de los gonadotropos para Control (n=358, A) castrado de 15 días (n=545, B) y 45 días de castrado (n=317, C), los valores fueron promediados y graficados. La altura de cada barra representa el porcentaje del componente de oscilaciones (rojo), meseta (azul) y joroba (verde) que caracteriza a la respuesta de Ca^{2+} de las tres poblaciones para cada una de las concentraciones de GnRH, Las líneas horizontales representan las diferencias significativas entre las columnas del mismo color entre las mismas condiciones experimentales. Los asteriscos en blanco indican diferencias de ($P < 0.05$) para la correspondiente dosis cuando se compara los experimentos de ratones castrados a los 15 o 45 días con respecto al control.

(<60%) muestran una respuesta de calcio de tipo oscilatoria independientemente de la concentración de GnRH a la que son expuestos. No obstante es importante enfatizar que el cambio más notable en los gonadotropos en cultivo es el que se presenta cuando las células son expuestas a una dosis de 100 nM, ya que en lugar de respuestas bifásicas (espiga-meseta), más del 70% de los gonadotropos presentan respuestas oscilatorias (Tobin and Canny; 1996; Tobin, Millar and Canny, 1997).

En la Figura 19C se resume el patrón de respuesta de Ca^{2+} de gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratones con 45 días de castración. Aquí la respuesta de Ca^{2+} a GnRH difiere significativamente del control; a 0.01 nM de GnRH, el componente oscilatorio es pequeño (26%) y la contribución del componente joroba es sumamente grande (64%), con una muy pequeña contribución del componente meseta, ocurriendo lo mismo para la dosis de 0.1 nM cuando se compara tanto contra los ratones control, como con los castrados de 15 días ($P < 0.05$), además, a pesar de no encontrar diferencias significativas respecto al control y al castrado de 15 días, la proporción de oscilaciones es relativamente baja con respecto a lo descrito en células en cultivo, donde más del 70% de los gonadotropos responden con oscilaciones. La facción del componente oscilatorio observado a concentraciones de 100 nM en 45 días de castración es de 37%, componente joroba de 48%, similar al control y 15 días de castrado.

Notablemente, el patrón de Ca^{2+} de gonadotropos de ratones castrados a los 45 días permanece constante a concentraciones mayores de 1 nM de GnRH. Una probable explicación es que después de un periodo sin la retroalimentación negativa por andrógenos (en este caso 45 días) y de GnRH elevada en la hipófisis los gonadotropos de estos ratones pierden la capacidad de responder diferencialmente a las distintas concentraciones de GnRH, como si los componentes de las respuestas de Ca^{2+} se saturaran a concentraciones por encima de 1 nM de GnRH. Así, en las concentraciones mayores la proporción en la que se presentan los componentes, permanece constante.

Número de oscilaciones por unidad de tiempo de las respuestas de Ca²⁺ inducidas por GnRH en gonadotropos in situ.

Otra aproximación para poder entender las características de la respuesta de Ca²⁺ inducida por GnRH en relación a la concentración de GnRH, es medir el número de oscilaciones que se producen en dicha respuesta. Como se mencionó previamente Tobin y colaboradores, establecieron que la mayoría (~70%) de las respuestas de Ca²⁺ en gonadotropos inducidas por GnRH (1 µM) en cultivo de hipófisis de rata macho después de la castración presentaban oscilaciones como patrón de respuesta (Tobin, 1996). Sin embargo, en este trabajo observamos que este fenómeno no se presenta en gonadotropos *in situ*, ya que como se puede observar en la figura 19 B y C, al analizar los componentes de la respuesta de Ca²⁺, a diferencia de lo que ocurre en ratas, el componente oscilatorio disminuye, principalmente a los 45 días después de la castración. Para analizar el comportamiento de este componente oscilatorio, medimos el número de oscilaciones que presentaba la respuesta de Ca²⁺ en un periodo de 2 minutos, lo cual equivale aproximadamente al periodo de respuesta al GnRH. Se tomó como oscilación, todas aquellas espigas que tuvieran una amplitud mayor a dos desviaciones estándar (DE) a partir del valor de su actividad basal promedio (Fig 20 A).

La Figura 20B ilustra el número de oscilaciones que se presentaron (media ± EE) por periodo de tiempo para cada una de las dosis de GnRH para las tres condiciones (control, GnX-15 días y GnX-45 días). A diferencia de lo descrito en gonadotropos de rata, donde a medida que aumenta la concentración de GnRH hay una menor presencia de oscilaciones (respuesta canónica; Tomic, 1994; Thomas, 1997), en gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón intacto no se observa esta tendencia, ya que entre las dosis 0.01 a 1 nM de GnRH el número de oscilaciones se reduce de 29.1 ± 7.3 (media ± EE) oscilaciones por 2 min cuando se aplica la dosis de 0.01 nM de GnRH a 18.5 ± 2.8 (media ± EE) con la dosis de 1 nM de GnRH. Curiosamente cuando se aplicaron las dosis de 10 y 100 nM la frecuencia de oscilaciones aumentó, llegando incluso a tener más oscilaciones en 100 nM de GnRH (37 ± 4.8 (media ± EE)) que a las dosis bajas de GnRH (aunque no se encontraron diferencias significativas). Estos cambios podrían estar relacionados con el aumento en la proporción de respuestas no canónicas en gonadotropos de ratón macho *in situ* que se mencionó con anterioridad (Fig. 12).

Hemos descrito que en la condición control el componente joroba de las señales de Ca^{2+} aumenta y el oscilatorio disminuye a medida que aumenta la dosis de GnRH (Fig. 19 B). Sin embargo, cuando medimos la frecuencia de las oscilaciones encontramos que ésta aumenta conforme aumenta la dosis de GnRH. Ello no significa que ambos resultados se contrapongan; una explicación podría ser que aun cuando el componente oscilatorio es menos marcado, las oscilaciones que lo integran son de mayor frecuencia.

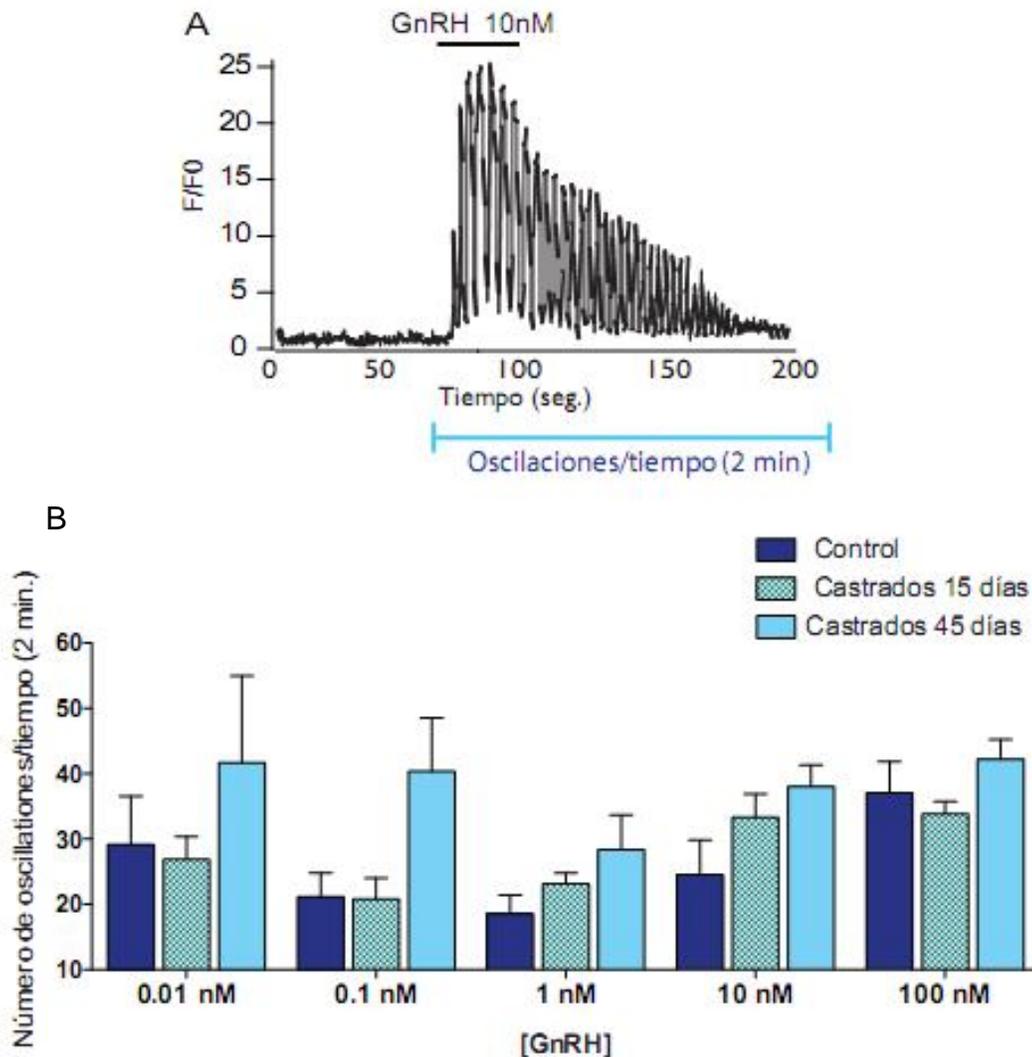


Fig. 20. Número de oscilaciones por unidad de tiempo de la respuesta al GnRH en gonadotropos *in situ*. A) Patrón de señalización de Ca^{2+} donde se muestra el periodo durante el cual se midió la frecuencia de oscilaciones (2 minutos) B) Grafica del número de oscilaciones por unidad de tiempo para cada dosis aplicada (media \pm EE). Se observa que en los gonadotropos de rebanadas de hipófisis de ratón macho a los 45 días después de la castración, la frecuencia de oscilaciones es mayor. No se encontraron diferencias significativas.

Cuando se examina el número de oscilaciones por tiempo en gonadotropos de ratones a los 15 días después de la castración, encontramos que a dosis bajas (0.01-1 nM GnRH) el número de oscilaciones que se presentan es de cerca de 26 oscilaciones en 2 minutos. Sin embargo, a dosis altas (10 y 100 nM) esta frecuencia aumenta a ~33 oscilaciones en el mismo periodo de tiempo. Si bien no se observan cambios notables con respecto al control si se puede notar una ligera disminución en la frecuencia de las oscilaciones en las señales de Ca^{2+} después de 15 días de castración (no significativo).

Respecto al componente oscilatorio descrito en la Fig.19B, es importante señalar que en gonadotropos de ratones después de 15 días de la castración, este componente tiene mayor contribución con respecto al control. No obstante, el número de oscilaciones es muy parecido al control, lo cual se traduciría en oscilaciones ligeramente más espaciadas por periodo de tiempo.

En cambio, en los experimentos con ratones a los 45 días después de la castración, se observa un aumento de alrededor del 30% en el número de oscilaciones por periodo de tiempo con la mayoría de las dosis, excepto con la dosis de 100 nM, donde el aumento es solo del 11%, (no se encontraron diferencias significativas entre dosis, ni con respecto al control), a pesar de que el componente oscilatorio no es el que predomina en el tipo de respuesta que presenta la población de gonadotropos (Fig.17C), este aumento en la frecuencia de las oscilaciones nos indica que aquellas células de la población que presentan oscilaciones, ~~sino~~ que lo hacen con mayor frecuencia durante el periodo de respuesta.

DISCUSIÓN

En un trabajo previo del laboratorio (Sánchez-Cárdenas, Hernández-Cruz, 2010) se demuestra que el registro de imágenes de Ca^{2+} en gonadotropos de rebanadas de hipófisis de ratón presentan un patrón único de respuesta *in situ*, por ejemplo, solo cerca de la tercera parte de los gonadotropos de ratón que responden a GnRH, lo hacen de forma canónica, i.e. presentan un comportamiento de respuesta ordenado en función al aumento en la concentración de GnRH, mientras que el resto de las células (58%) muestran una respuesta de tipo dosis-dependiente no ordenada (respuesta no-canónica) o bien atípica no-oscilatoria (3.6%). Si bien esperábamos que se diera un cambio en el tipo de respuestas canónica a no canónica, debido a que previamente Tobin y colaboradores describieron que después de la castración los gonadotropos pierden la capacidad de discriminar a qué tipo de concentración de GnRH, ya que ~70% de las células presentan oscilaciones de Ca^{2+} independientemente de la concentración de GnRH a la cual eran sometidas (Tobin; 1996), dejando así de responder ordenadamente en función de la concentración de GnRH; en este trabajo demostramos que efectivamente después de la castración la respuesta de tipo no-canónica se presenta en mayor proporción en la población de gonadotropos (80%), sin embargo este cambio de la respuesta canónica a no-canónica no se debe a un aumento en las respuestas oscilatorias, como se había reportado, ya que no encontramos un patrón de respuesta característico de la población de gonadotropos de ratones castrados, sino que se presentan los diferentes tipos de respuesta (ver figura 6) pero de forma “no ordenada”.

Dado que este tipo de respuesta no-canónica no se había descrito para células en cultivo, Sánchez-Cárdenas y Hernández-Cruz especularon que este cambio de la respuesta canónica a la no-canónica en gonadotropos *in situ*, puede deberse a las interacciones paracrinas dentro de la glándula. Sin embargo, sería importante comprender de forma más precisa cuáles son las consecuencias de la predominancia de un patrón de señalización de Ca^{2+} no-canónico en la población de gonadotropos. Otra cuestión importante es ¿cuál es la importancia de que se presente un patrón determinado a una dosis de GnRH dada? O bien, ¿cuáles son las implicaciones de que a dosis bajas predomine el patrón oscilatorio y a dosis altas el tipo transitorio? Hasta ahora se ha sugerido que las respuestas de tipo transitorio favorecen la secreción de gonadotropinas (Thomas, 1997; Leong, 1991). Si fuese así, el hecho de que los gonadotropos de

animales castrados tienden a generar respuestas transitorias a concentraciones de GnRH bajas o intermedias podría estar promoviendo la secreción de gonadotropinas, En gonadotropos en cultivo se ha especulado que el cambio a un solo tipo de patrón de respuesta de Ca^{2+} quizá contribuye a los cambios en los niveles de secreción observados en ratones castrados (Clayton, 1985)

La gonadectomía induce proliferación en las células que responden al GnRH

Estudios anatómicos han reportado que la gonadectomía promueve un aumento en el número de gonadotropos (Sakai, 1988; Sakai, 1988; Sakai, 1988; Inoue, 1981). Por ejemplo Inoue y colaboradores encontraron que después de la castración, el número de células positivas para LH β se duplica (Inoue, 1981). El origen del aumento de la población de gonadotropos después de la castración puede tener diferentes causas, sin embargo la más aceptada es la bien demostrada estimulación de la división mitótica de los gonadotropos (Sakuma, 1984; Inoue, 1981). Sin embargo, también se ha sugerido la diferenciación de células inmaduras a gonadotropos o bien, recientemente se ha postulado la hipótesis de la trans-diferenciación de células hipofisarias maduras de otro linaje a gonadotropos (Nuñez, 2003). Existen reportes de células multihormonales, i.e. células que presentan características fenotípicas compartidas entre miembros de las poblaciones por ejemplo somatotropos y gonadotropos, las cuales tienen antígenos para GH (hormona del crecimiento) y a la vez expresan mRNA para gonadotropinas (LH- β , LH β , o FSH- β) o para receptores a GnRH (Childs, Geda et al. 2000). Por otro lado, también se ha documentado que durante el hipertiroidismo primario prolongado o posteriormente a la tiroidectomía, los somatotropos pueden transdiferenciarse a tiro-somatotropos (Hovarth, 1990; Vidal, 2000). Basados en esta información podríamos especular que de manera análoga a como ocurre en la tiroidectomía, con la castración algunas células multihormonales se podrían estar diferenciando en gonadotropos, aumentando con ello el número de células que responden al GnRH.

Nuestro estudio, al igual que los de otros (Sakai, 1988; Sakai, 1988; Sakai, 1988; Inoue, 1981), reporta que el número de células que responden a GnRH aumenta 1.7 veces a los 15 días después de la castración comparado con el ratón intacto. Sin embargo a diferencia de estos estudios, donde se muestra que el número de células positivas a

LH β se mantiene elevado durante al menos los tres meses posteriores a la castración (Inoue, 1981), nosotros encontramos que este aumento no se mantiene a los 45 días post-castración. El número de células que responden a GnRH es similar al control. Para poder explicar esta diferencia, en principio sería relevante mencionar la diferencia que se ha encontrado entre especies (rata y ratón), ya que algunos de los mecanismos de regulación que son ciertos para las ratas, funcionan de forma contraria en el ratón. Por ejemplo se ha visto que en rata los esteroides parecen tener efecto estimulante en el receptor a GnRH, regulando su densidad y nivel de expresión (Clayton, 1985), en tanto que en el ratón, el mecanismo observado es el opuesto (Inoue, 1981; Sakai, 1988). También cabe mencionar que el método con el cual se midió el número de gonadotropos en los dos estudios es bastante diferente (inmunorreactividad a LH β vs. la respuesta a GnRH a través de imágenes de Ca $^{2+}$). En nuestro estudio, es importante tener en mente que la respuesta al GnRH requiere del funcionamiento óptimo de la maquinaria de señalización intracelular de Ca $^{2+}$, así como una densidad adecuada de receptores acoplados a proteínas G (GnRH-R), que como ya se mencionó anteriormente es diferente en rata y ratón, por lo que la disminución en la densidad del receptor a GnRH reportada para los ratones castrados (Naik, 1984 #2588), podría explicar la reducción del número de células que responden a GnRH a los 45 días. Por lo tanto esta disminución puede no querer decir que los gonadotropos hayan desaparecido, sino que dejaron de responder al GnRH, razón por la cual ya no podemos detectarlos viendo los cambios en la señal de Ca $^{2+}$ intracelular. No obstante dicha hipótesis debería poder comprobarse a través de estudios con inmunocitoquímicas de rebanadas de hipófisis de ratón, examinando y cuantificando el número de células que expresan tanto el receptor para GnRH y las gonadotropinas.

La castración induce un crecimiento en las células que responden a GnRH.

Varios reportes anatómicos indican que después de la castración la talla de los gonadotropos aumenta (Sakai, 1988; Nakayama, 1975; Console, 2001; Inoue, 1981). En uno de estos reportes, Inoue y colaboradores describen que el volumen de los gonadotropos aumenta seis veces en un tiempo de 3 meses después de la castración

(Inoue, 1981). Esta observación se confirmó en nuestro estudio, ya que si observamos con detalle la distribución de frecuencia de los tamaños de los gonadotropos de ratones castrados, podemos ver que hay un desplazamiento de ésta hacia la derecha, lo cual concuerda con los reportes previos, que muestran que el número de células pequeñas disminuye mucho y que algunas células se hipertrofian (Inoue, 1981), apareciendo así las células llamadas “células de la castración”. Sería interesante determinar si éstas células “grades” ($>60 \mu\text{m}^2$) que son características de la castración son células nuevas, esto es, si son el resultado de la mitosis de los gonadotropos o bien si corresponden células pre-existentes i.e. gonadotropos que aumentaron su tamaño ante la pérdida de la retroalimentación negativa de andrógenos producida por la gonadectomía. También se ha observado que la hipertrofia de los gonadotropos después de la castración puede evitarse por la inyección de un anticuerpo anti-GnRH (Arimura, 1976), lo cual sugiere que este cambio también puede ser resultado de los niveles elevados de GnRH en la hipófisis.

Una de las características de los gonadotropos hipertrofiados es el aumento en el tamaño del retículo endoplásmico (ER) el cual muestra signos de hiperactividad (Nakayama, 1975; Console, 2001; Inoue, 1981), y como se sabe que el retículo puede servir como fuente de Ca^{2+} intracelular (Stutzmann, 2011), es posible que el aumento de tamaño del retículo endoplásmico esté relacionado con la mayor la síntesis y secreción de gonadotropinas que se ha observado en esta condición (Ramirez, 1965; Brown-Grant, 1975; Lindzey, 1998; Clayton, 1985) a través de un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. No obstante, las causas y consecuencias del aumento de tamaño del retículo endoplásmico en estas células aún se desconocen. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que algunos gonadotropos hipertrofiados *in situ* pueden generar señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH de gran amplitud (lo cual podría contribuir a explicar la mayor secreción de gonadotropinas después de la castración). Sin embargo, es importante mencionar que el aumento en la secreción de gonadotropinas puede explicarse de varias maneras; además de por un mayor contenido de Ca^{2+} en un retículo endoplásmico de mayor tamaño, se puede explicar por una mayor densidad de GnRH-R en la membrana permitiría una mayor producción de IP_3 y/o una mayor movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, además de que también podría existir una mayor densidad de IP_3R .

No hay que olvidar que la retroalimentación negativa también tiene un efecto a nivel del hipotálamo, por lo que es importante denotar el papel que pudiera tener la GnRH en los cambios observados después de la castración. Se ha reportado que después de la castración se produce un aumento en la expresión y liberación de GnRH (Kalra and Kalra 1982, Meredith and Levine 1992, Grattan, Park et al. 1995). Varios grupos se han enfocado en investigar la importancia de este aumento así como las repercusiones que podría tener a nivel de hipófisis; intervenciones farmacológicas o inmunológicas para inhibir la acción o secreción de GnRH (Simpkins, Kalra et al. 1980, Rodin, Lalloz et al. 1989, Tobin and Canny 1998) han demostrado el control de los esteroides a través del hipotálamo regulando el tamaño de los gonadotropos y el número de receptores de GnRH (Farnworth, Robertson et al. 1988), así como la secreción de LH (Tobin and Canny 1998). Si bien no podemos descartar el papel de la GnRH en los cambios observados después de la castración, tampoco podemos vincularlos directamente al aumento en la síntesis y secreción de GnRH, ya que algunos de estos cambios producidos por la gonadectomía pueden ser revertidos si los gonadotropos son tratados con testosterona (Drouin and Labrie 1976), por lo cual pareciera que estos cambios son una combinación de la acción de los esteroides gonadales tanto a nivel del hipotálamo, como a nivel de la hipófisis. Es importante señalar que, a pesar de que algunos de los cambios observados después de la castración están relacionados con el aumento en la síntesis y secreción de GnRH, este parece no tener acción sobre las señales de Ca^{2+} , ya que aparentemente éstas parecen estar reguladas por la acción directa de los andrógenos sobre los gonadotropos (Tobin and Canny 1998).

Componentes de la respuesta inducida por GnRH en gonadotropos in situ.

Si bien, después de la castración aumenta el tamaño y el número de gonadotropos es importante analizar qué sucede con los patrones de señalización de Ca^{2+} intracelular. En un intento por entender las relación entre las respuestas de Ca^{2+} inducidas por GnRH y la concentración del GnRH, emerge la pregunta de cómo estos patrones de señalización de Ca^{2+} regulan la secreción de gonadotropinas. El consenso ha sido que la secreción de gonadotropinas puede ser disparada por un aumento de Ca^{2+} de suficiente magnitud, sin un tipo de patrón preferente. Las respuestas de Ca^{2+} a concentraciones crecientes de GnRH en gonadotropos en cultivo se han clasificado en 1) subumbrales 2) oscilatorias 3)

bifásicas (transitorias) (Leong, 1991; Tomic, 1994), esta última comprende dos variantes; bifásica oscilatoria y bifásica no-oscilatoria (Thomas, 1997) y se ha reportado que el porcentaje de las células que responden a una dosis de GnRH dada, varía durante el desarrollo, a lo largo del ciclo estral y después de la ovariectomía (Tomic, 1994). Previamente Tobin y colaboradores observaron que después de la castración los gonadotropos presentan principalmente respuestas de tipo oscilatorias, indistintamente de la dosis de GnRH a la cual eran sometidos, dándole un papel importante a la testosterona en la regulación de la secreción de LH, no así en la regulación de las señales de Ca^{2+} , ya que también encontraron que la T convertida a DHT tiene un papel más importante modulando las señales de Ca^{2+} inducidas por GnRH en gonadotropos en cultivo (Tobin, 1998) Sin embargo, aún falta por aclarar cuáles son los aspectos celulares y fisiológicos que determinan el patrón de señalización de Ca^{2+} intracelular desplegado por los gonadotropos en respuesta al GnRH. Anteriormente Sánchez-Cárdenas y Hernández Cruz mostraron que la respuesta de gonadotropos *in situ* son robustas, que responden consistentemente, tanto en latencia, patrón oscilatorio y duración cada vez que se aplica la misma dosis de GnRH (Sanchez-Cardenas y Hernández Cruz, 2010). Por otro lado, la categorización de la respuesta de Ca^{2+} como subumbral, oscilatoria o bifásica ha sido criticada por ser demasiado simplista o por un tener un cierto solapamiento, razón por la cual se ha planteado la necesidad de contar con criterios para distinguir entre las diferentes respuestas. Nuestro acercamiento semi-cuantitativo permite una mejor comparación de las señales de Ca^{2+} en gonadotropos. Sin embargo, un inconveniente en nuestro método (figura 18) es que los valores son asignados subjetivamente. Sin embargo para examinar que tan ambiguo podría ser nuestra metodología, dos personas asignaron los valores a una serie de respuestas de Ca^{2+} y pudimos observar que se asignan prácticamente los mismos valores. Además, nuestro código da una idea bastante razonable del tipo de patrón de Ca^{2+} que se presenta, y es menos ambiguo que la clasificación en uso (subumbral, oscilatoria, bifásica).

Componentes en la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en gonadotropos in situ

Al cuantificar la contribución de cada componente de la respuesta de Ca^{2+} inducida por GnRH en los gonadotropos en rebanadas de hipófisis de ratón macho intacto,

podemos observar que el componente oscilatorio representa el 48% de la respuesta a una baja concentración de GnRH (0.01nM), en tanto que el componente joroba mide 29%. A medida que la rebanada se expone a dosis más altas de GnRH, el componente oscilatorio disminuye al 24% y el de joroba aumenta, pero lo hace de forma menos marcada (53%). Esta progresión se asemeja aunque sin ser tan prominente, a la secuencia de respuestas de Ca^{2+} reportadas en gonadotropos de rata macho en cultivo, donde el componente joroba (respuesta bifásica) se vuelve predominante a dosis de 100 nM de GnRH (Tomic, 1994; Thomas, 1997). Estas diferencias puede ser explicadas como producto de la preservación de las interacciones intercelulares en la rebanada, ya que en estas se mantiene el microambiente celular (Sanchez-Cardenas, 2010). También, como ya se había mencionado anteriormente, podrían intervenir las diferencias entre especies. En experimentos en rebanadas de hipófisis de rata macho, hemos observado que los patrones de Ca^{2+} intracelular no se comportan de la misma manera que lo que sucede en rebanadas de ratones macho, ya que las señales de Ca^{2+} intracelular de ratas después de la castración, presentan un comportamiento parecido al reportado en cultivo (aunque no son iguales), donde prevalece la presencia de oscilaciones a dosis altas de GnRH (datos no presentados).

Como ya se ha mencionado varias veces anteriormente, tanto en este estudio como en otros se encontró que la que la castración modifica las señales de Ca^{2+} . Sin embargo, un hallazgo inesperado en nuestro trabajo fue que la contribución relativa de los componentes de la respuesta de Ca^{2+} en función de la concentración de GnRH no se modifica considerablemente después de la castración. En particular, cuando se comparan los experimentos control contra los experimentos después de 15 días de castración, podemos mencionar que aunque si hubo un ligero aumento en la contribución del componente oscilatorio y por lo tanto una disminución el componente joroba para las dosis de 0.01 y 0.1 nM GnRH, las diferencias no fueron significativas, por lo cual no podemos afirmar que en estas dosis hay un comportamiento parecido al ya descrito en gonadotropos en cultivo de ratas castradas. Es importante señalar lo que ocurre cuando se aplica una dosis de GnRH de 100 nM, ya que el componente joroba representa cerca del 50% de la respuesta de Ca^{2+} tanto en gonadotropos del ratón castrado como en el intacto, lo cual difiere de lo observado en gonadotropos de rata macho *in vitro*, donde de acuerdo con varios reportes, después de la castración la mayoría de los gonadotropos muestran respuestas de tipo oscilatorias en lugar de bifásicas (joroba). Por lo tanto, en la

población de gonadotropos de ratón *in situ*, el principal cambio en el patrón de señal de Ca^{2+} generado por la castración reportado en gonadotropos en cultivo (Tobin, 1996; Tobin, 1997) no se reprodujo.

En contraste con las observaciones encontradas en gonadotropos de animales control y 15 días post castración, a los 45 días después de la castración pudimos observar que el componente oscilatorio a 0.01 nM de GnRH es más pequeño (26%) y el de joroba comparativamente más grande (64%). También, en el rango de los 0.1 nM a 1 nM de GnRH el componente joroba disminuye, mientras que el oscilatorio aumenta. Sin embargo a 100 nM de GnRH, estos componentes se vuelven similares a los observados en rebanadas de animales control y de animales después de 15 días de castración. Nuevamente, los cambios reportados en los patrones de Ca^{2+} intracelular de gonadotropos en cultivo de ratas castradas (Tobin, 1997; Tobin, 1996) no fueron observados en ratones, sino que por el contrario, en lugar de aumentar la presencia del componente oscilatorio a todas las dosis, el componente joroba (bifásico) aumentó a dosis de 0.01 y 0.1 nM o bien, el porcentaje de los componentes de la respuesta de Ca^{2+} lo largo de las concentraciones de GnRH aplicadas restantes (1-100 nM) se mantiene constantes y muy parecidos a los presentados por el control y el castrado de 15 días. Una interpretación de esto podría ser que los gonadotropos de los ratones castrados de 45 días, a pesar de que responden a GnRH, podrían estar fallando en discriminar el tipo de concentración de GnRH (1, 10 y 100nM) a la cual son expuestos, presentando una respuesta parecida a todas estas dosis, como si el patrón de respuesta alcanzaría su saturación aproximadamente a la concentración de 1 nM de GnRH. Sin embargo, aún no tenemos una explicación para las diferencias en los patrones de respuesta de gonadotropos después de 15 y 45 días de castración.

Otra medida indirecta de las características de la señal de Ca^{2+} intracelular es el cálculo del área bajo la curva y el número de oscilaciones por unidad de tiempo. A pesar de que en nuestro estudio encontramos una disminución del componente oscilatorio, contrario a lo previamente se había observado en gonadotropos de rata macho donde el patrón oscilatorio es el predominante (Tobin and Canny 1996), notamos que aun cuando el componente oscilatorio no es el más prominente en la respuesta de Ca^{2+} después de la castración el comportamiento de estas oscilaciones si es diferente. Para determinar si este cambio aparente es significativo, medimos le número de oscilaciones por periodo de

tiempo (2 minutos) a todas las dosis de GnRH aplicadas y en las 3 diferentes condiciones. Se tomó este período de tiempo (2 minutos) debido a que si solo medimos el número de oscilaciones durante el primer minuto, perderíamos información ya que en la mayoría de las respuestas de Ca^{2+} durante el primer minuto se genera el componente joroba, el cual puede ir o no acompañado de oscilaciones y durante el segundo minuto generalmente se presenta la fase de oscilatoria, por lo que si solo medimos las oscilaciones durante el primer minuto de respuesta estaríamos sesgando la información y evaluando sólo una parte de las oscilaciones de la respuesta.

En gonadotropos *in situ*, de ratón macho intacto encontramos que en las señales de Ca^{2+} intracelular el número de oscilaciones por periodo de tiempo aumenta en función de la dosis de GnRH a la cual son sometidos. Entre las dosis de 0.01 nM a 1 nM el número de oscilaciones disminuye y aumentan nuevamente la frecuencia de oscilaciones en la dosis más alta (100 nM); a diferencia de lo descrito anteriormente, en gonadotropos en cultivo, donde las oscilaciones prácticamente no se presentan a dosis altas (Tomic, Cesnajak et al. 1994, Thomas and Waring 1997), Es importante señalar que pese a lo descrito en cultivo, en gonadotropos *in situ* previamente se demostró que no necesariamente todas las respuestas a dosis altas (100 nM) presentarán respuestas de tipo bifásicas (componente joroba) ya que esta secuencia ordenada de patrones de señalización (respuesta canónica) no es la que predomina (Sanchez-Cardenas and Hernandez-Cruz 2010).

Si bien sabemos que el componente oscilatorio no es el más prominente después de la castración en gonadotropos *in situ*, basados en los reportes previos, esperábamos que la frecuencia de las oscilaciones aumentara. Sin embargo a diferencia de lo que esperábamos, después de la castración (15 días), a pesar de que hay un ligero aumento en la contribución del componente oscilatorio comparado con el control en esta condición el número de oscilaciones por periodo de tiempo es muy parecido al de la condición control, por lo que podemos deducir que las oscilaciones son más espaciadas o menos frecuentes. No obstante, para los experimentos en ratones de 45 días después de la castración se observa un aumento en el número de oscilaciones por periodo de tiempo a todas las dosis (con respecto al control y al castrado de 15 días). Vale la pena señalar que a pesar de que el componente oscilatorio tiene menor presencia en los experimentos de castrados de 45 días, aquellas células de la población que presentan oscilaciones en su respuesta de Ca^{2+} lo hacen con mayor frecuencia, lo cual se puede observar en la figura

20B, donde se ve como para todas las dosis aplicadas de GnRH hay un mayor número de oscilaciones tanto en control como en el ratón castrado de 15 días. Las implicaciones de la presencia de oscilaciones en la respuesta de Ca^{2+} , aún se desconocen, aunque se han hecho varios intentos para establecer su importancia. Se les ha relacionado con la síntesis de la subunidad β de LH (Leong and Thorner 1991), aunque en otros estudios se establece que las oscilaciones pueden desencadenar la exocitosis (Tse, Tse et al. 1993) o bien, también se ha señalado que las oscilaciones no tiene un papel específico, sino que tanto las respuestas oscilatorias como las bifásicas pueden iniciar la liberación de LH (Tomic, Cesnajak et al. 1994), lo que sugiere que la exocitosis puede producirse por cualquier tipo de elevación de Ca^{2+} . Sin embargo, todavía no se han establecido cuáles son los aspectos celulares que determinan el patrón de señalización de Ca^{2+} específico mostrado por cada gonadotropo en respuesta al GnRH o la correlación entre los patrones de señalización de $[Ca^{2+}]_i$ y sus posibles implicaciones en la secreción de las gonadotropinas.

Es importante señalar que las alteraciones de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por GnRH, en los gonadotropos de animales castrados pueden ser prevenidas por medio del tratamiento sustitutivo con testosterona, pero no con un antagonista de GnRH, lo cual sugiere que la naturaleza de estas señales son el resultado de la deficiencia de testosterona a nivel de la hipófisis y no del aumento en la secreción de GnRH (Tobin, Millar et al. 1997). Como se mencionó anteriormente, la señales de Ca^{2+} en rata y en ratón no tiene las mismas características. Una explicación podría ser que la deficiencia de testosterona no afecta de forma similar los gonadotropos de rata y en ratón, además de que el cambio en la transducción de la señal puede deberse a diferentes factores, como el cambio en el número de receptores a GnRH, que se produce en forma opuesta en estas dos especies.

CONCLUSIONES.

Nuestros estudios confirman lo reportado previamente por estudios histológicos, donde después de la castración hay un aumento en el número de gonadotropos. Sin embargo a diferencia de estos estudios, en este trabajo encontramos que el número células que responden a GnRH después de 45 días de castración es menor que las que responden 15 días después de la castración. Una posible explicación a dicho fenómeno es que aunque los gonadotropos siguen presentes estos dejan de generar señales de Ca^{2+} o bien son incapaces de responder a GnRH, por lo cual no pueden ser identificados con nuestra técnica, que se basa en la presencia de dichas respuestas. Sin embargo dicha hipótesis aún debe ser comprobada. De igual forma corroboramos que algunos gonadotropos aumentan de tamaño después de la castración. Con nuestros datos no pudimos establecer una correlación precisa entre el aumento en el tamaño de las células y el aumento en el pico máximo de fluorescencia y por lo consiguiente una mayor cantidad de Ca^{2+} , aunque sí observamos que 15 días después de la castración existe una tendencia a correlacionarse de ambos parámetros. A los 45 días después de la castración, a pesar de que seguimos encontrando células de gran tamaño, las señales de Ca^{2+} que presentan tiene una magnitud menor comparadas con las observadas en los gonadotropos del ratón castrado de 15 días e incluso comparadas con el ratón intacto.

A su vez, confirmamos el rol de los factores gonadales sobre las señales de Ca^{2+} intracelular inducidas por GnRH en gonadotropos y como estos factores pueden afectar la proporción de los tres componentes (oscilaciones, meseta y joroba) de una respuesta de Ca^{2+} , así como el orden en el que se presentan dichas respuestas en función de la dosis de GnRH, las cuales se muestran principalmente de forma desordenada i.e. que no presentan un patrón específico de acuerdo a la dosis aplicada (respuesta de tipo no-canónica). Estos cambios podrían tener diferentes consecuencias fisiológicas. Sin embargo la importancia o las implicaciones funcionales tanto de la respuesta desordenada (no-canónica), así como de los componentes que la integran aún están por estudiarse.

Algo muy importante que conviene señalar es que el patrón de señalización de Ca^{2+} *in situ* no es el igual al descrito previamente en gonadotropos en cultivo, además, nuestro estudio mostró que estas señales no solamente son diferentes a las descritas en

cultivo; sino que también son distintas entre especies (rata y ratón), por lo que es importante recalcar la importancia de no asumir que la testosterona afecta de igual manera las propiedades funcionales de gonadotropos de diferentes especies.

REFERENCIAS

- Arimura, A., M. Shino, K. G. de la Cruz, E. G. Rennels and A. V. Schally (1976). "Effect of active and passive immunization with luteinizing hormone-releasing hormone on serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels and the ultrastructure of the pituitary gonadotrophs in castrated male rats." Endocrinology **99**(1): 291-303.
- Barnett, D., T. Bunnell, R. Millar and D. Abbott (2006). "Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys." Endocrinology **147**(1): 615-623.
- Bernard, D. J., J. Fortin, Y. Wang and P. Lamba (2010). "Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care." Fertil Steril **93**(8): 2465-2485.
- Berridge, M. J. (1993). "Cell signalling. A tale of two messengers." Nature **365**(6445): 388-389.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Björklund, A. and O. Lindvall (2011). Catecholaminergic Brain Stem Regulatory Systems. Comprehensive Physiology, John Wiley & Sons, Inc.
- Bliss, S. P., A. M. Navaratil, J. Xie and M. S. Roberson (2010). "GnRH Signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility." Frontiers in Neuroendocrinology **31**: 322-340.
- Bonnefont, X., A. Lacampagne, A. Sanchez-Hormigo, E. Fino, A. Creff, M. N. Mathieu, S. Smallwood, D. Carmignac, P. Fontanaud, P. Travo, G. Alonso, N. Courtois-Coutry, S. M. Pincus, I. C. Robinson and P. Mollard (2005). "Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16880-16885.
- Boron, W. F. and E. L. Boulpaep (2008). "Medical Physiology." Elsevier Health Sciences: 1352.
- Brown-Grant, K. and F. Greig (1975). "A comparison of changes in the peripheral plasma concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the rat." J Endocrinol **65**(3): 389-397.
- Burger, L. L., D. J. Haisenleder, A. C. Dalkin and J. C. Marshall (2004). "Regulation of gonadotropin subunit gene transcription." J Mol Endocrinol **33**(3): 559-584.
- Clarke, I. J. and S. Pompolo (2005). "Synthesis and secretion of GnRH." Anim Reprod Sci **88**(1-2): 29-55.
- Clayton, R. N., K. Channabasavaiah, J. M. Stewart and K. J. Catt (1982). "Hypothalamic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors: effects of hypothalamic

lesions and a gonadotropin-releasing hormone antagonist." Endocrinology **110**(4): 1108-1115.

Clayton, R. N., A. Detta, S. I. Naik, L. S. Young and H. M. Charlton (1985). "Gonadotrophin releasing hormone receptor regulation in relationship to gonadotrophin secretion." J Steroid Biochem **23**(5B): 691-702.

Console, G. M., S. B. Jurado, S. B. Rulli, R. S. Calandra and C. L. Gomez Dumm (2001). "Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by nonsteroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepubertal male rats." Cells Tissues Organs **169**(1): 64-72.

Childs, G. V., U. Geda and P. Wu (2000). "Differential Expression of Growth Hormone messenger Ribonucleic Acid by somatotropes and gonadotropes in male and cycling female rats." Endocrinology **141**(4): 1560-1570.

Dalkin, A. C., D. J. Haisenleder, G. A. Ortolano, T. R. Ellis and J. C. Marshall (1989). "The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression." Endocrinology **125**(2): 917-924.

Drouin, J. and F. Labrie (1976). "Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture." Endocrinology **98**(6): 1528-1534.

Fanjul, M. L., M. Hiriart and F. Fernandez de Miguel (1998). "Biología Funcional de los Animales " Siglo veintiuno editores.: 581.

Farnworth, P. G., D. M. Robertson, D. M. de Kretser and H. G. Burger (1988). "Effects of 31 kDa bovine inhibin on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: antagonism of gonadotrophin-releasing hormone agonists." J Endocrinol **119**(2): 233-241.

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

Ghosh, B. R., J. C. Wu, B. D. Strahl, G. V. Childs and W. L. Miller (1996). "Inhibin and estradiol alter gonadotropes differentially in ovine pituitary cultures: changing gonadotrope numbers and calcium responses to gonadotropin-releasing hormone." Endocrinology **137**(11): 5144-5154.

Gore, A. C. (2002). "GnRH: The master Molecule of Reproduction." Kluwer Academic Publishers: 324.

Grattan, D. R., S. K. Park and M. Selmánoff (1995). "Orchidectomy and NMDA increase GnRH secretion as measured by push-pull perfusion of rat anterior pituitary." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): E685-692.

Gray. H., S. S., Ellis. H., Berkovitz. B K B (2005). Gray's Anatomy 39th ed.: The Anatomical Basis of Clinical Practice, Elsevier Churchill Livingstone.

Green, E. L., (Editor) (1966). "Biology of the Laboratory Mouse." DOVER PUBLICATIONS, INC.

Gutnick, A. and G. Levkowitz (2012). "The neurohypophysis: fishing for new insights." J Neuroendocrinol **24**(6): 973-974.

Haisenleder, D. J., A. C. Dalkin, G. A. Ortolano, J. C. Marshall and M. A. Shupnik (1991). "A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo." Endocrinology **128**(1): 509-517.

Heyward, P. M. and I. J. Clarke (1995). "A transient effect of estrogen on calcium currents and electrophysiological responses to gonadotropin-releasing hormone in ovine gonadotropes." Neuroendocrinology **62**(6): 543-552.

Huang, B. M., S. F. Leu, H. Y. Yang and R. L. Norman (2001). "Testosterone effects on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone responses to gonadotropin-releasing hormone in the mouse." J Androl **22**(3): 507-513.

Inoue, K. and K. Kurosumi (1981). "Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration--immunocytochemical and autoradiographic studies." Arch Histol Jpn **44**(1): 71-85.

Inoue, K., S. Tanaka and K. Kurosumi (1985). "Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of the castrated male rat." Cell Tissue Res **240**(2): 271-276.

Kalra, P. S. and S. P. Kalra (1982). "Discriminative effects of testosterone on hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone levels and luteinizing hormone secretion in castrated male rats: analyses of dose and duration characteristics." Endocrinology **111**(1): 24-29.

Kraus, S., Z. Naor and R. Seger (2001). "Intracellular signaling pathways mediated by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor." Archives of Medical Research **32**: 499-509.

Kraus, S., Z. Naor and R. Seger (2001). "Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor." Arch Med Res **32**(6): 499-509.

Krsmanovic, L. Z., H. L. K. Leung, P. F. H and J. Catt. K (2009). "The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms." Trends Endocrinol Metab. **20**(8): 402-408.

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

Leong, D. A. and M. O. Thorner (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.

Li, Y.-X., J. Keizer, S. Stojilkovic and J. Rinzel (1995). "Ca²⁺ excitability of the ER membrane; an explanation for IP₃-induced Ca²⁺ oscillation." Am J Physiol. **269**(5 Pt 1): 1079-1092.

- Lindzey, J., W. C. Wetsel, J. F. Couse, T. Stoker, R. Cooper and K. Korach (1998). "Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor- α knockout mice." Endocrinology **139**(10): 4092-4101.
- McArdle, C. A., J. Franklin, L. Green and J. N. Hislop (2002). "The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation." Arch Physiol Biochem **110**(1-2): 113-122.
- McArdle, C. A., J. Franklin, L. Green and J. N. Hislop (2002). "Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors." J Endocrinol **173**(1): 1-11.
- McNeilly, A. S., J. L. Crawford, C. Taragnat, L. Nicol and J. R. McNeilly (2003). "The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging." Reprod Suppl **61**: 463-476.
- Melmed, S. (2011). "The Pituitary." Elsevier: 731.
- Meredith, J. M. and J. E. Levine (1992). "Effects of castration on LH-RH patterns in intrahypophysial microdialysates." Brain Res **571**(2): 181-188.
- Millar, R. P. (2005). "GnRHs and GnRH receptors." Anim Reprod Sci **88**(1-2): 5-28.
- Millar, R. P., Z.-L. Lu, A. J. Pawson, C. Flanagan, K. Morgan and S. Maudsley (2004). "Gonadotropin-releasing hormone receptors." Endocr Rev. **25**(2): 235-275.
- Moguilevsky, J. and O. Schiaffini (1972). "Hipófisis. Control de su secreción." Obreros Editores: 260.
- Naik, S. I., L. S. Young, H. M. Charlton and R. N. Clayton (1984). "Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor regulation in mice. I: Males." Endocrinology **115**(1): 106-113.
- Nakayama, I., T. Matsuo, Y. Oyakawa, O. Takahara and K. Tsuji (1975). "Fine structural studies on the fate of "castration" cells in the rat adenohypophysis after bilateral oophorectomy." Acta Pathol Jpn **25**(4): 439-450.
- Naor, Z. (2009). "Signaling by G-proteine-coupled (GPCR): studies on the GnRH receptor." Frontiers in Neuroendocrinology **30**: 10-29.
- O'Donnell, L., S. J. Meachem, P. G. Stanton and M. R. I. (2006). "Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In Eds. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction." Elsevier Inc. **3erd ed.**: 1017–1069.
- Ooi, G. T., N. Tawadros and R. M. Escalona (2004). "Pituitary cell lines and their endocrine applications." Mol Cell Endocrinol **228**(1-2): 1-21.
- Ortmann, O., M. Bakhit, P. Bloh, K. D. Schulz and G. Emons (1995). "Ovarian steroids modulate gonadotropin-releasing hormone-induced biphasic luteinizing hormone secretory responses and inositol phosphate accumulation in rat anterior pituitary cells and alpha T3-1 gonadotrophs." J Steroid Biochem Mol Biol **54**(3-4): 101-109.

- Ortmann, O., S. S. Stojilkovic, M. Cesnjaj, G. Emons and K. J. Catt (1992). "Modulation of cytoplasmic calcium signaling in rat pituitary gonadotrophs by estradiol and progesterone." Endocrinology **131**(3): 1565-1567.
- Pappa, E. V., A. A. Zompra, Z. Diamantopoulou, Z. Spyranti, G. Pairas, F. N. Lamari, P. Katsoris, G. A. Spyroulias and P. Cordopatis (2012). "Structure-activity studies of IGnRH-III through rational amino acid substitution and NMR conformational studies." Biopolymers **98**(6): 525-534.
- Ramirez, V. D. and S. M. McCann (1965). "Inhibitory Effect of Testosterone on Luteinizing Hormone Secretion in Immature and Adult Rats." Endocrinology **76**: 412-417.
- Rispoli, L. A. and T. M. Nett (2005). "Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression." Anim Reprod Sci **88**(1-2): 57-74.
- Rodin, D. A., M. R. Lalloz and R. N. Clayton (1989). "Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression in the male rat." Endocrinology **125**(3): 1282-1289.
- Roselli, C. E., M. J. Kelly and O. K. Ronnekleiv (1990). "Testosterone regulates progonadotropin-releasing hormone levels in the preoptic area and basal hypothalamus of the male rat." Endocrinology **126**(2): 1080-1086.
- Sakai, T., K. Inoue, Y. Hasegawa and K. Kurosumi (1988). "Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats." Endocrinology **122**(6): 2803-2808.
- Sanchez-Cardenas, C. and A. Hernandez-Cruz (2010). "GnRH-Induced [Ca²⁺]_i-signalling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices in vitro." Neuroendocrinology **91**(3): 239-255.
- Selmanoff, M., C. Shu, S. L. Petersen, C. A. Barraclough and R. T. Zoeller (1991). "Single cell levels of hypothalamic messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone-releasing hormone in intact, castrated, and hyperprolactinemic male rats." Endocrinology **128**(1): 459-466.
- Shiino, M. (1979). "Morphological changes of pituitary gonadotrophs and thyrotrophs following treatment with LH-RH or TRH in vitro." Cell Tissue Res **202**(3): 399-406.
- Simpkins, J. W., P. S. Kalra and S. P. Kalra (1980). "Inhibitory effects of androgens on preoptic area dopaminergic neurons in castrate rats." Neuroendocrinology **31**(3): 177-181.
- Spady, T. J., R. Shayya, V. G. Thackray, L. Ehrensberger, J. S. Bailey and P. L. Mellon (2003). "Androgen regulates Follicle-Stimulating Hormone β gene expression in an Activin-dependent manner in immortalized gonadotropes." Molecular Endocrinology **18**(4): 925-940.
- Stojilkovic, S. S. and K. J. Catt (1992). "Calcium oscillations in anterior pituitary cells." Endocr Rev **13**(2): 256-280.

- Stojilkovic, S. S. and M. Tomic (1996). "GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs." Trends in Endocrinology & Metabolism **7**(10): 379-384.
- Stojilkovic, S. S., H. Zemkova and F. Van Goor (2005). "Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling." Trends Endocrinol Metab **16**(4): 152-159.
- Stutzmann, G. E. and M. P. Mattson "Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease." Pharmacol Rev **63**(3): 700-727.
- Taylor, C. W., R. Taufiq Ur and E. Pantazaka (2009). "Targeting and clustering of IP3 receptors: key determinants of spatially organized Ca²⁺ signals." Chaos **19**(3): 037102.
- Thomas, P. and D. W. Waring (1997). "Modulation of stimulus-secretion coupling in single rat gonadotrophs." J Physiol **504 (Pt 3)**: 705-719.
- Thomas, S. G. and I. J. Clarke (1997). "The positive feedback action of estrogen mobilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory granules in ovine gonadotropes." Endocrinology **138**(3): 1347-1350.
- Tobin, V. A. and B. J. Canny (1996). "Testosterone regulates gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs." Endocrinology **137**(4): 1299-1305.
- Tobin, V. A. and B. J. Canny (1998). "The regulation of gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone." Endocrinology **139**(3): 1038-1045.
- Tobin, V. A., R. P. Millar and B. J. Canny (1997). "Testosterone acts directly at the pituitary to regulate gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotropes." Endocrinology **138**(8): 3314-3319.
- Tomic, M., M. Cesnajaj, K. J. Catt and S. S. Stojilkovic (1994). "Developmental and physiological aspects of Ca²⁺ signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs." Endocrinology **135**(5): 1762-1771.
- Tomic, M., T. Koshimizu, D. Yuan, S. A. Andric, D. Zivadinovic and S. S. Stojilkovic (1999). "Characterization of a plasma membrane calcium oscillator in rat pituitary somatotrophs." J Biol Chem **274**(50): 35693-35702.
- Toranzo, D., E. Dupont, J. Simard, C. Labrie, J. Couet, F. Labrie and G. Pelletier (1989). "Regulation of pro-gonadotropin-releasing hormone gene expression by sex steroids in the brain of male and female rats." Mol Endocrinol **3**(11): 1748-1756.
- Tse, A., F. W. Tse, W. Almers and B. Hille (1993). "Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes." Science **260**(5104): 82-84.
- Waring, D. W. and J. L. Turgeon (2009). "Ca²⁺-activated K⁺ channels in Gonadotropin-Releasing Hormone-stimulated mouse gonadotrophs." Endocrinology **150**(5): 2264-2272.
- Yin, W. and A. C. Gore (2010). "The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging." Ann N Y Acad Sci **1204**: 113-122

Castration-Induced Modifications of GnRH-Elicited $[Ca^{2+}]_i$ Signaling Patterns in Male Mouse Pituitary Gonadotrophs In Situ: Studies in the Acute Pituitary Slice Preparation¹

María Luisa Durán-Pastén,³ Tatiana Fiordelisio-Coll,⁴ and Arturo Hernández-Cruz^{2,3}

³Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

⁴Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

ABSTRACT

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binds to pituitary gonadotroph receptors and initiates $[Ca^{2+}]_i$ signals and gonadotropin secretion. Here, we recorded GnRH-induced Ca^{2+} signals in acute pituitary slices from both intact and castrated male mice 15 and 45 days after orchietomy (GnX). Cells responding with “noncanonical” sequences of Ca^{2+} signaling to increasing GnRH concentrations ([GnRH]; oscillatory responses at a given [GnRH] and transient responses at both lower and higher concentrations) were augmented significantly in the castrated mice. Also, 15 days after GnX the number and size of gonadotrophs were augmented, confirming earlier anatomical studies. Hypertrophied gonadotrophs after 15 days after GnX tended to display GnRH-induced Ca^{2+} responses of greater amplitude. Furthermore, median effective dose (ED50) for GnRH decreased from 0.17 nM (control) to ~0.07 nM after GnX, suggesting increased GnRH responsiveness of the gonadotroph population. The progression of Ca^{2+} response patterns reported in control male rat gonadotrophs (oscillations declining and spike-plateau responses dominating at increasing [GnRH]) was less conspicuous in mouse gonadotrophs in situ. Also, GnX-induced alterations in rat gonadotrophs (persistence of Ca^{2+} oscillations even at [GnRH] >100 nM) were not mirrored by mouse gonadotrophs in situ. Contrary to observations in intact and 15-day castrated mice, after 45 days of GnX the hump component diminished and oscillations were augmented with increasing [GnRH], but Ca^{2+} response patterns of gonadotrophs in situ remained virtually unchanged in response to [GnRH]s >1 nM, suggesting dose discrimination failure at high [GnRH]s. This study underscores the notion that GnRH

responsiveness and the effects of testosterone deficiency may not be equal in pituitary gonadotrophs across species.

calcium, castration, gonadotrophs, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary slice

INTRODUCTION

Pituitary gonadotrophs synthesize and secrete two gonadotropins, luteinizing and follicle-stimulating hormones (LH and FSH), in response to gonadotropin-releasing hormone (GnRH), a decapeptide that is synthesized in the hypothalamus, stored in axon terminals in the median eminence, and released into the hypophyseal portal circulation. Pituitary gonadotroph function is also regulated by gonadal factors [1]. Normal gametogenesis and steroidogenesis depend on the release of hypothalamic GnRH. In male testicular growth, spermatogenesis and steroidogenesis cease in the absence of 1) pulsatile hypothalamic GnRH release and 2) adequate synthesis and secretion of LH and FSH [2]. GnRH binding to high-affinity G protein-coupled receptors (GnRH-Rs) in the gonadotroph membrane initiates several intracellular signaling events that, among other things, stimulate the release of LH and FSH [3]. Upon GnRH binding to its receptor, phospholipase C β is activated via subunit Gq/11 α , resulting in the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate to inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) and diacylglycerol, leading to the mobilization of intracellular Ca^{2+} pools and activation of protein kinase C, respectively [3–7].

Gonadotrophs in vitro display two basic intracellular Ca^{2+} signaling patterns in response to suprathreshold GnRH concentrations (i.e., those capable of generating global, intracellular Ca^{2+} signals) [5, 8, 9]. At low concentrations (0.1–10 nM), GnRH produces $[Ca^{2+}]_i$ oscillations whose frequencies increase in a dose-dependent manner (oscillatory response). At higher concentrations (~50–100 nM), GnRH produces a rapid, transient $[Ca^{2+}]_i$ rise followed by a plateau phase (spike-plateau response) [8, 10, 11]. Both types of response occur via the same G protein-linked pathway. A possible correlation between Ca^{2+} signaling patterns and the amount of LH released was explored in the early 1990s. Initially, spike-plateau Ca^{2+} responses were related to LH secretion, whereas oscillatory Ca^{2+} responses were associated with the synthesis of LH β subunits [8]. Nonetheless, other studies established that GnRH-induced Ca^{2+} oscillations can trigger exocytosis [12], and that both oscillatory and spike-plateau Ca^{2+} signals can initiate LH release [9], suggesting that exocytosis can be produced by intracellular Ca^{2+} rises of any kind and not only by a specific Ca^{2+} signaling pattern. It is yet to be elucidated which cellular aspects determine the precise Ca^{2+} signaling patterns displayed by individual gonadotrophs in

¹Supported by grants IN227910 (Dirección General Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]), 79763 (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACyT]), and PICSA10-116 (Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal). M.L.D.-P. received a Ph.D. fellowship from CONACyT and additional financial support from the Ph.D. Program in Biomedical Sciences (UNAM).

²Correspondence: Arturo Hernández-Cruz, Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencia Cognitiva, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, México City, D.F. CP 04520.
E-mail: ahernan@ifc.unam.mx

Received: 7 August 2012.

First decision: 9 October 2012.

Accepted: 13 December 2012.

© 2013 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

response to GnRH, and how these different patterns affect gonadotropin synthesis and secretion (see *Discussion*).

Most functional studies have been conducted in dissociated rat gonadotrophs in primary culture [5, 8, 9]. To what extent can these observations be extrapolated to cells from other species and in their native environment? We recently addressed this question using Ca^{2+} imaging in male mouse acute pituitary slices [13]. Cells in this preparation are amenable to functional studies in their native environment [14–16], and hundreds of cells can be concomitantly examined, allowing population sampling with single-cell resolution. We recently showed that the number of responding cells grew with increasing GnRH concentration ([GnRH]), and that in general, Ca^{2+} signaling of gonadotrophs in situ resembled that recorded in primary cultures [13]. Nevertheless, many gonadotrophs under stimulation with increasing doses of GnRH exhibited a progression of Ca^{2+} signaling patterns termed “noncanonical” (i.e., oscillatory responses at a given [GnRH] and transient responses at both lower and higher concentrations), and some of them even showed atypical (nonoscillatory) responses, regardless of the [GnRH] used. Furthermore, responses to a given dose of GnRH varied considerably from one cell to another, reflecting a range of dose-response properties in the gonadotroph population [8, 9]. On the other hand, we also found that individual gonadotroph responses to repeated applications of the same GnRH concentration were robust and invariant [13].

Following the removal of the gonads, the population of pituitary gonadotrophs undergoes drastic functional and morphological modifications concomitantly with the large (5- to 6-fold) increase in gonadotropin secretion that characterizes this condition [17–20]. These alterations result directly or indirectly from the removal of the negative feedback exerted by gonadal hormones both at the hypothalamus and at the pituitary [2, 21]. After orchiectomy (GnX), both the number and size of gonadotrophs increase [22–28]. Furthermore, the expression levels of GnRH-R messenger RNA rise [29], as do the density of GnRH-R at the plasma membrane [20] and the peak LH plasma levels detected in response to a GnRH infusion [30]. In addition, the properties of GnRH-induced Ca^{2+} signaling change (Tobin and Canny [21]; see below). Some of these effects result from the increased hypothalamic GnRH secretion. Arimura et al. [31] demonstrated that the appearance of hypertrophic gonadotrophs can be prevented after the injection of anti-GnRH antibody, and Shiino [25] showed that the addition of GnRH into the culture medium resulted in hypertrophic gonadotrophs similar to those observed following the ablation of the gonads. Conversely, alterations of GnRH-induced Ca^{2+} responses in cultured gonadotrophs from castrated male rats can be prevented by testosterone treatment but not by treatment with a GnRH antagonist [21], suggesting that they result directly from pituitary testosterone deficiency [32].

Tomic et al. [9] reported no significant differences in the amplitude or frequency of GnRH-induced Ca^{2+} signals in gonadotrophs from ovariectomized rats. They argued that the increased number of responding cells in castrated rats suffices to explain the enhanced gonadotropin release observed [20]. Nonetheless, in such a report it was mentioned for the first time that the number of gonadotrophs showing oscillatory responses to 0.5 nM GnRH became rather high (89%) in ovariectomized rats, whereas subthreshold and biphasic responses represented only 7% and 4%, respectively. In cultured gonadotrophs, Tobin and Canny [21] first showed that the relationship between GnRH concentration and Ca^{2+} signaling patterns was altered in castrated rats: most gonadotrophs from castrated rats displayed

oscillatory Ca^{2+} responses to a high GnRH concentration (100 nM), instead of the spike-plateau responses typically observed in intact rat cells. These alterations developed with time after castration: the number of gonadotrophs with oscillatory Ca^{2+} responses to a high GnRH concentration peaked 7 days after gonadectomy [21]. These modifications of GnRH-induced Ca^{2+} responses in gonadotrophs from castrated male rats were prevented by testosterone treatment [32].

The purpose of our study was to examine how gonadectomy affects GnRH-induced Ca^{2+} signaling patterns of the gonadotroph population in acute pituitary slices from male mice. Besides the obvious question: If mouse gonadotrophs in intact tissue undergo alterations similar to those reported in cultured rat gonadotrophs, we wondered how could castration, which strongly and specifically stimulates the population of gonadotrophs, affect the functional properties described for pituitary slices from intact male mice [13]?

MATERIALS AND METHODS

Animals

Studies were performed under an institutional protocol similar to the United States Public Health Service Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and according to the Official Mexican Guide from the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999). Animals were fed ad libitum and maintained in the institute’s animal facility under constant temperature and 12L:12D cycle. Young adult BALB/c male mice (8 wk old) were bilaterally orchiectomized under anesthesia and sterile conditions, and they were killed after either 15 or 45 days after GnX (six mice per group). A group of six intact male mice of the same strain and age were used as control.

Preparation of Acute Pituitary Slices

Mice were killed by decapitation under ether anesthesia, the skull was opened, and the brain was rapidly removed. The pituitary gland was carefully dissected, cleaned under a dissecting stereomicroscope, and embedded in 3% low-melting point agarose (Invitrogen Catlab) 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 NHCO_3 , and 12 mM glucose, gassed with 5% CO_2 :95% O_2 , overall pH ~7.4). The agarose was hardened by immersion in ice-cold physiological solution, and the agar block with an embedded pituitary gland was glued with cyanoacrylate onto the plate of a vibrating blade microtome (Leica Microsystems CMS GmbH). Then, the slicing chamber was filled with physiological solution kept at 3°C, and transverse slices 130 μm in thickness were cut using a vibrating blade microtome (Leica VT1000S). Freshly cut slices were immediately transferred to an incubation beaker containing physiological solution at room temperature and were continuously gassed (5% CO_2 :95% O_2) to maintain a 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 (10 × 10 mm) glass coverslips pretreated with 0.3% poly-L-lysine (Sigma), 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 (Molecular Probes/Invitrogen) at a final concentration of 10 μM (prepared from a 2 mM stock solution in dimethyl sulfoxide with 0.5% Pluronic F-127; Sigma-Aldrich). Dye loading proceeded at room temperature for 30 min. Then, the slice was placed in the bottom of a Plexiglass 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) and a water-immersion fluorescence Nikon objective (20×, 0.5 N.A.). 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 B-2E/C filter set. Fluorescent images were acquired with a cooled digital charge-coupled device camera (Imago QE; TILL Photonics) 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 centered on one of the hemilobes of the anterior pituitary gland, corresponding to a rectangle of 36 800 μm^2 (214 × 172 μm). Baseline activity was recorded for 30 sec while the slice was perfused with normal physiological solution. The perfusion was then

switched to GnRH-containing (Peninsula Laboratories Inc.) physiological solution for 30 sec 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 separated two-way valve and connected by Tygon tubing to a common entry port of the recording chamber. Control experiments showed that slice exposure to GnRH was delayed by ~12 sec, reached maximal concentration within 10 sec, lasted 30 ± 2 sec at its peak, and decayed completely within 30–35 sec. This was determined by perfusing a fluorescent test solution through the image chamber ($1 \mu\text{M}$ 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 with control saline perfusion was allowed before a new GnRH concentration was applied. The relatively long interval between GnRH applications was selected to prevent desensitization or other cumulative effects of GnRH [13]. Previous studies showed that dispersed rat male pituitary cells can consistently secrete LH to repetitive administration of GnRH for up to 9 h.

Image Recording

Image sequences (10-ms exposure, 300-ms interval), here termed “movies,” were obtained from a given field of view before, during, and after GnRH application and were saved in TIFF format. Movies were processed and analyzed with ImageJ macros (version 1.38; National Institutes of Health). In a typical experiment, a pituitary slice was exposed to up to five GnRH concentrations ranging between 0.01 and 100 nM, during a period of nearly 4 h. Movies of approximately 4 min in duration were obtained before, during, and after bath application of GnRH. Because Fluo-4 is a single-wavelength dye, its fluorescence emission is a function of dye concentration, illumination pathway, and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Our experimental conditions were designed so that only fluorescence changes related to fluctuations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were significant. Raw images were converted to ΔF images, $\Delta F = F_i - F_0$, where F_0 is the fluorescent image formed by averaging the first frame of the sequence and F_i represents each i th fluorescence image of the set. No attempts were made to calculate absolute intracellular Ca^{2+} concentrations from these data. Fluo-4 does not appear to penetrate deeper than 40–50 μm into the tissue. Also, underneath the slice surface it is possible to recognize one or two layers of healthy cells that have taken up the dye. This layer of healthy cells can routinely be imaged by focusing 25–30 μm below the surface. Therefore, contamination with out-of-focus fluorescence is not a significant problem in our imaging experiments [13].

As an aid to identify cells that activate following GnRH application, “standard deviation images” (SD images) were obtained from movie segments of interest (SD algorithm of ImageJ; stack projection functions). 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. Pixel intensity values were color coded for illustration purposes. Regions of interest (ROIs) corresponding to cells that activated after GnRH application ($\text{SD} > 5 \pm 0.5$) 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 multicell $\Delta F(t)$ plot. These plots were generated with Igor Pro 5.03 macros (Wavemetrics Inc.) written by Leon Islas, Ph.D. (available at <http://canales.faced.unam.mx/projects.html>). Here, ordinates represent cell number (one cell per row), the time is represented in the abscissa, and ΔF values are color coded. From these plots, traces from individual cells can be extracted for analysis. Dose-response curves of the number of active cells as a function of GnRH concentration were evaluated with the power logistic function $F(x) = (A_1 - A_2) / \{1 + (x / \text{ED}_{50})^p\} + A_2$, with A_1 = initial value, A_2 = final value, p = slope; and ED_{50} , minimum effective dose. Cells were counted as responding when their fluorescence signal increased by more than twice the SD of the noise at rest and between 50 and 85 sec after initiating GnRH perfusion.

Verification of Castration Effects

In all mice used in this study, seminal vesicles and ventral prostate were removed and weighed to assess the effect of the treatments on androgen-dependent organs (Table 1). The weights of these androgen-dependent organs (corrected for body weight [BW] of each animal) were measured in control, 15-day castrated, and 45-day castrated mice (six mice per group).

Data Analysis

Area under the curve and number of oscillations as a function of time were obtained with custom-made MATLAB routines (MathWorks Inc.), written by

TABLE 1. Weight changes in ventral prostate and seminal vesicles 15 and 45 days after castration.^a

Castration status	Ventral prostate weight (g/100 g BW)	Seminal vesicle weight (g/100 g BW)
Intact	0.117 ± 0.009	0.241 ± 0.0175
15 days after GnX	$0.036 \pm 0.005^{***}$	$0.130 \pm 0.0314^{***}$
45 days after GnX	$0.014 \pm 0.0008^{***}$	$0.044 \pm 0.005^{***}$

^a Weights were corrected for BW of each animal (means \pm SEM).

*** $P < 0.001$. Groups were compared versus their respective control groups.

engineer Manuel Alvarez (available upon request). Numerical data were plotted with Origin 6.0 (Microcal Software) and Igor Pro (WaveMetrics Inc.). Data sets were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov normality test), an assumption for application of ANOVA. When the data fitted a normal distribution, we performed parametric tests (i.e., one-way ANOVA with a Tukey post hoc test or two-way ANOVA with Bonferroni vs. control group post hoc test). In Figure 4B, a Gaussian distribution function was fitted to the frequency data (amplitude, mean, and SD values obtained were compared with a Pearson test to establish significance). In Figure 4C, the same data were plotted as cumulative frequency. Because this cumulative distribution has a sigmoidal shape, our data approximate a Gaussian distribution. Data in Figure 7 are expressed in percentages. Therefore, they were analyzed using chi-square tests. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). A P value ≤ 0.05 was taken as the limit of significance. Final image composition was made with Adobe Illustrator (Adobe Inc.).

RESULTS

Confirmation of Castration Effects

Table 1 summarizes the results of weighting seminal vesicles and ventral prostate, corrected for the BW of the animals used in this study (see *Materials and Methods*). The weights of these androgen-dependent organs diminished significantly 15 and 45 days after castration ($P < 0.001$) compared with controls ($n = 6$ mice per group). Results were compared by one-way ANOVA followed by Tukey multiple-comparison tests. These findings confirm that testosterone levels drop considerably after GnX [21, 33].

GnRH-Induced Intracellular Ca^{2+} Signaling Recorded from Individual Gonadotrophs in the Anterior Pituitary Slice

Figure 1 illustrates GnRH-induced Ca^{2+} signals recorded simultaneously from cells in a male mouse pituitary slice. Figure 1A corresponds to the SD image (see *Materials and Methods*) before GnRH application. Cells that became active when 100 nM GnRH was applied to the bath were identified in the corresponding SD image (Fig. 1B). The ROIs in the shape of each responsive cell were drawn in the SD image (Fig. 1, A and B) and used for fluorescence quantification. With this approach, dozens of individual cells can be recorded simultaneously. Most cells in Figure 1C began responding at 0.1 nM, and the remaining ones were recruited at higher GnRH concentrations. Responses of gonadotrophs designated with ROIs 1–4 in Figure 1B are plotted in Figure 1D. Notice that depending on the GnRH concentration applied, cell responses varied in latency, magnitude, duration, and signaling pattern.

Castration Affects the Proportion of Cells with Canonical, Noncanonical, and Atypical Ca^{2+} Responses to GnRH

In our previous study [13], we established that ~20% of responding cells in situ display “canonical” sequences of Ca^{2+} signaling patterns (oscillations of increasing frequency at low to medium GnRH concentration, and spike-plateau at saturat-

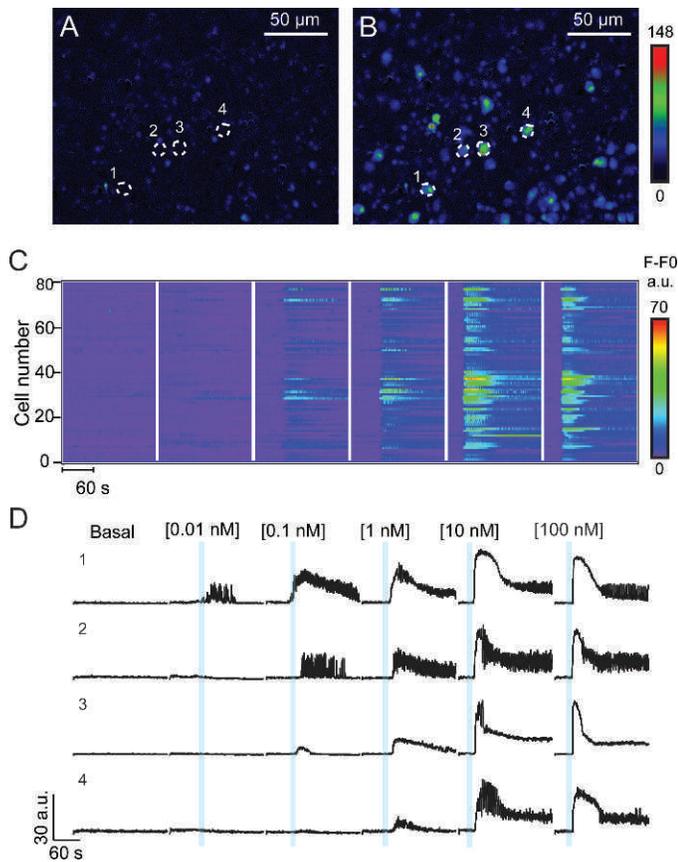


FIG. 1. GnRH-induced Ca^{2+} signals recorded simultaneously from gonadotrophs in situ. **A** and **B**) SD images corresponding to movie segments obtained before GnRH application (basal recording; **A**) and when GnRH was present in the bath and gonadotrophs were producing Ca^{2+} signals (active response; **B**). Movies were acquired with a 20 \times objective from the same field of view in a male mouse pituitary slice. Images were color coded according to the scale shown to the right. In SD images, responsive cells display high pixel intensity values. Such brighter areas in **B** were drawn (see examples labeled 1–4) and their contours were copied as ROIs to the corresponding ΔF movie stack for quantification of mean ΔF over time. **C**) Multicell $\Delta F(t)$ plot summarizing variations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ over time of 81 cells from the same field of view, in response to five different GnRH concentrations. Ordinate represents cell number (one cell per row), time is represented in the abscissa, and ΔF values are color coded according to the scale shown on the right. An interval of 30 min (washing period) was allowed between successive GnRH applications. a.u., fluorescence arbitrary units. **D**) $\Delta F(t)$ recordings of gonadotrophs labeled 1–4 in **B**. Vertical blue lines indicate the time of GnRH application. Notice that individual cells respond with different latencies, amplitudes, and signaling patterns depending on $[\text{GnRH}]$.

ing GnRH concentration: see traces 1, 2, and 4 in Fig. 1D). Another group of responding cells (55%) displayed “non-canonical” sequences of Ca^{2+} signaling patterns (i.e., a disordered sequence of oscillatory and spike-plateau Ca^{2+} signals in response to increasing GnRH concentrations). Finally, the remaining cells (~30%) showed “atypical” sequences of Ca^{2+} signaling responses (i.e., nonoscillatory, transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises in response to increasing GnRH [see trace 3 in Fig. 1D]). Because GnX strongly and specifically stimulates the population of pituitary gonadotrophs, we wondered whether this condition would alter the percentage of cells with canonical, noncanonical, and atypical Ca^{2+} responses. Figure 2 compares these proportions in the gonadotroph population of intact and castrated mice at 15 and 45 days after GnX. In the intact group, the percentages of cells responding to increasing GnRH concentration with

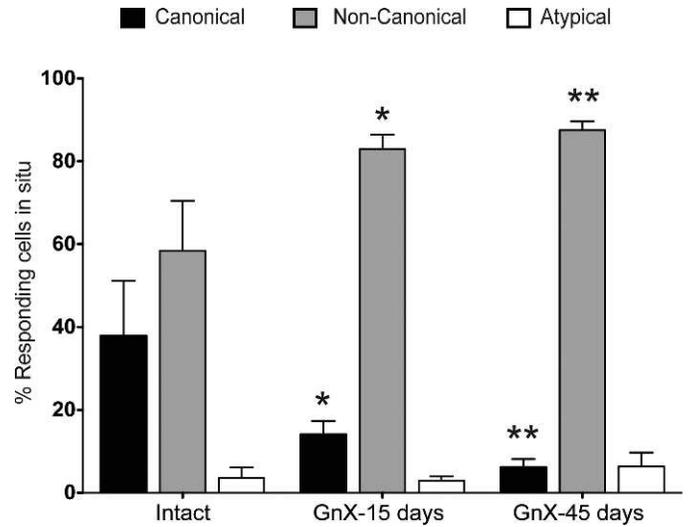


FIG. 2. Percentage of canonical, noncanonical, and atypical gonadotroph responses before and after GnX. Percentage of gonadotrophs that display canonical, noncanonical, and atypical dose-response Ca^{2+} signaling patterns when exposed to increasing $[\text{GnRH}]$. Bars represent data from intact mice and castrated mice after 15 and 45 days after GnX. After GnX, noncanonical responses increased, whereas the fraction of cells with canonical responses declined. Atypical responses remained unchanged regardless of the condition. Differences between intact and after GnX for both canonical and noncanonical responses are significant. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus their respective controls (two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test).

canonical, noncanonical, and atypical patterns were 37.8%, 58%, and 3.6%, respectively. These values are slightly different from those previously reported [13], but the fraction of noncanonical responses continues to be the dominant one. These percentages changed significantly after castration: the fraction of cells with noncanonical responses increased considerably, from $58.4\% \pm 12.0\%$ (intact mice) to $83\% \pm 3.4\%$ and $87.5\% \pm 2.1\%$ after 15 and 45 days after GnX, respectively. This increase occurred at the expense of reducing the fraction of cells responding with the canonical pattern, from $7.8\% \pm 13.3\%$ (intact mice) to $14.0\% \pm 3.3\%$ and $6.1\% \pm 2.0\%$ after 15 and 45 days after GnX, respectively. The percentage of cells with atypical responses remained similar: $3.6\% \pm 2.5\%$ (intact mice), and $2.9\% \pm 1.0\%$ and $6.4\% \pm 3.3\%$ after 15 and 45 days after GnX, respectively. The differences are significant between control mice and mice after 15 and 45 days after GnX, for both canonical and noncanonical responses ($P < 0.05$; two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test).

The Number and Size of GnRH-Responding Cells Increase after GnX

It has been well documented that the number of LH and FSH immunoreactive cells in the pituitary increases after castration [22, 23, 25–28]. This expansion of the gonadotroph population results from the stimulation of the mitotic activity in response to elevated pituitary GnRH levels [22]. Here, we wondered whether the gonadotroph hyperplasia would also become apparent using functional studies in situ. For simplicity, a saturating dose of GnRH (100 nM) was used to identify all responding cells in the field. Figure 3, A and B, shows SD images obtained from control and castrated mice at the peak of the response, when 100 nM GnRH was bath applied to a pituitary slice. Clearly, the number of responding

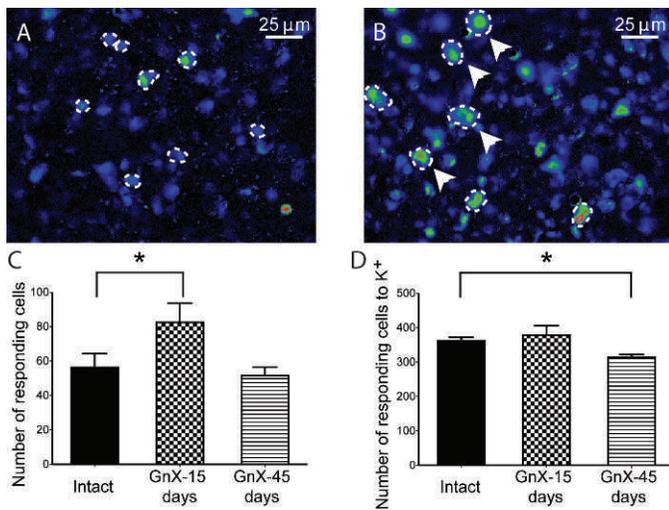


FIG. 3. The number and size of gonadotrophs increase after castration. **A** and **B**) SD images obtained at the time when GnRH was present in the bath and gonadotrophs were producing Ca^{2+} signals. **A**) Intact mouse. **B**) Castrated mouse at 15 days after GnX (see also Supplemental Movies S1 and S2). The contours of some cells are shown for illustration purposes. GnRH-responding cells indicated by arrowheads in **B** are hypertrophied. **C**) Comparison of the number of gonadotrophs responding to 100 nM GnRH in pituitary slices from intact male mice and castrated mice after 15 and 45 days after GnX ($n = 6$ slices; six different animals per condition). The number of responding cells increased significantly after 15 days after GnX ($P < 0.05$), but the population expansion did not persist after 45 days ($P > 0.05$). **D**) Cells responding to depolarization with high K^+ in the same field of view as **C** (notice ordinate scale differences). The number of cells responding to high K^+ in slices from intact and 15 days after GnX mice is not statistically different (one-way ANOVA with Tukey multiple-comparison test).

cells was greater after GnX. Supplemental Movies S1 and S2 (all Supplemental Data are available online at www.biolreprod.org) exemplify movies acquired from Fluo-4-loaded pituitary slices from an intact mouse (Movie S1) and from a mouse 15 days after GnX (Movie S2). These movies were used to construct Figure 3, A and B. Figure 3C compares the number of GnRH-responding cells per field of view in pituitary slices from intact and castrated male mice 15 and 45 days after GnX ($n = 6$ slices from six different mice per condition). Compared with intact mouse slices (56.3 ± 8.1), the number of GnRH-responding cells increased significantly 15 days after castration (82.5 ± 11.5). This effect did not persist after 45 days (51 ± 4.8 ; mean \pm SEM). The total cell counts of this experiment were 268 (intact), 474 (15 days), and 280 (45 days). To rule out an indiscriminate cell proliferation in the pituitary after GnX, the same slices were bath perfused with high- K^+ (140 mM KCl) saline to elicit a strong depolarization and to identify all excitable cells in the field by their voltage-dependent Ca^{2+} influx. Figure 3D illustrates the number of responding cells. Notice the scale change in the ordinate of Figure 3D with respect to Figure 3C, with the number of cells responding to high K^+ being >6 -fold higher. The total number of cells responding to high K^+ did not increase significantly after GnX. Therefore, the increased proliferation appears to be specific for the gonadotroph population. It is yet to be established why the total number of responding cells declines 45 days after GnX.

Growth of GnRH-Responding Cells after Castration

From anatomical studies, it is well known that gonadotroph volume also increases after GnX [22, 27, 28]. In fact, hypertrophic cells, characteristic of this condition, are often called “castration cells” [26]. In Figure 3, A and B, several GnRH-responding cells are indicated with dotted outlines. Arrowheads in Figure 3B point to hypertrophied cells. To better assess the size increase of the gonadotroph population,

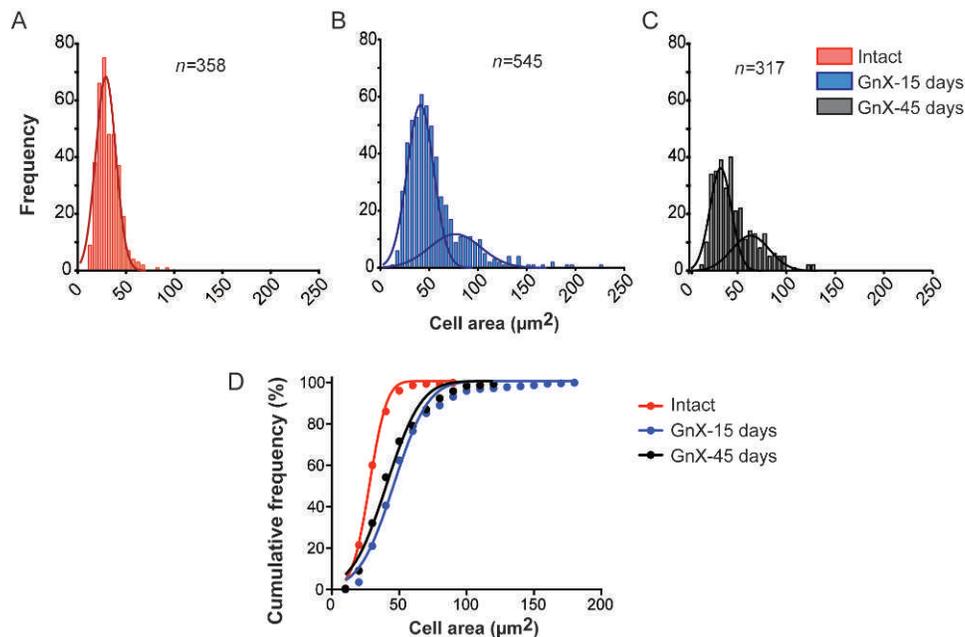


FIG. 4. Gonadotrophs grow after castration. **A–C**) Distribution histograms of gonadotroph area size for intact mice (red histogram; **A**), and mice after 15 (blue; **B**) and 45 (black; **C**) days after GnX. Classes are in $5\text{-}\mu\text{m}^2$ intervals. The total number of gonadotrophs counted is indicated. A simple Gaussian function was fitted to the histogram in **C**, and two Gaussians fitted best both castrated distributions in **B** and **C**. **D**) The same data were plotted as cumulative frequency and fitted to a cumulative Gaussian distribution function. These plots clearly illustrate the rightward shift of the castrated mice gonadotroph size distributions compared with the intact mice gonadotroph size distribution.

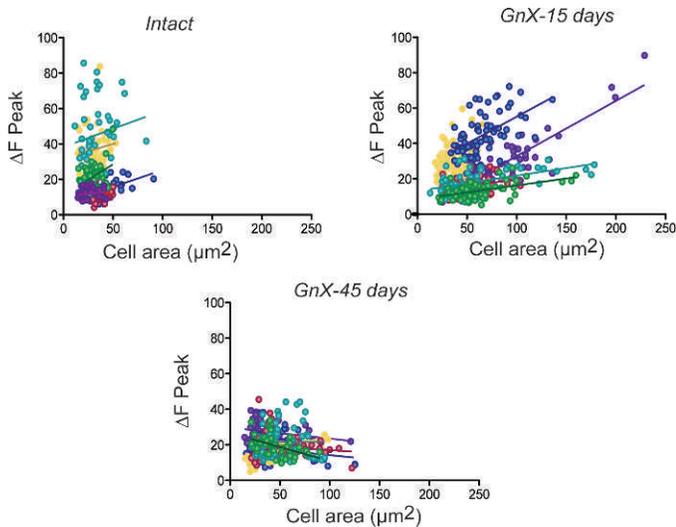


FIG. 5. Gonadotrophs from castrated mice after 15 days after GnX tend to generate GnRH-induced Ca^{2+} signals of greater amplitude. Plots of peak amplitude of GnRH-induced Ca^{2+} transients versus gonadotroph area size. Ordinates: peak amplitude of the GnRH-induced Ca^{2+} signals (ΔF peak). Abscissae: gonadotroph area size (μm^2). Gonadotroph data from six intact mice and from six castrated mice at 15 and 45 days after GnX are represented. Data obtained from each individual/slice are plotted with a different color. Linear regression was fitted to each data set and the corresponding line was plotted in the same color. Linear correlation fit to the pooled intact mouse data suggests that Ca^{2+} signals are not correlated with gonadotroph size. Conversely, the linear fit to pooled data from castrated mice after 15 days after GnX suggests that gonadotroph size correlates with Ca^{2+} signal amplitude, and that hypertrophied gonadotrophs, at least from some mice, tend to produce stronger GnRH-induced Ca^{2+} signals. See further explanation in the text.

GnRH-responding cells were identified, their contours were drawn, and cell areas were measured using National Institutes of Health ImageJ routines (“set scale”: for conversion of pixels to microns; “set measure” and “area”). Figure 4 shows the distribution histograms of cell areas obtained for the three experimental conditions (data pooled from six slices per condition, each from a different mouse). Notice that the control distribution (Fig. 3A) differs from that of castrated mice 15 and 45 days after GnX (Fig. 3, B and C; $P > 0.001$). In contrast, both castrated mouse distributions are similar. The corresponding cell areas given (mean \pm SEM): intact mice, $31.3 \pm 0.6 \mu\text{m}^2$ ($n = 358$); castrated mice 15 days after GnX, $54.4 \pm 1.24 \mu\text{m}^2$ ($n = 545$); and castrated mice 45 days after GnX, $45.8 \pm 1.23 \mu\text{m}^2$ ($n = 317$). In comparison with the intact distribution, gonadotrophs were more abundant 15 days after GnX (358 intact vs. 545 castrated). Also, the castrated distribution broadened because of the appearance of large cells ($>60 \mu\text{m}^2$), which were virtually absent in the intact mice. As shown in Figure 4, the intact gonadotroph size distribution can be fitted with one Gaussian (Fig. 4A), whereas the sum of two Gaussians best fits both castrated distributions (Fig. 4, B and C). After 15 and 45 days after GnX, the distribution main peak shifted to the right, from $30 \mu\text{m}^2$ (intact) to $40 \mu\text{m}^2$ (15 days after GnX) and $35 \mu\text{m}^2$ (45 days after GnX). The peaks of the second Gaussian after 15 and 45 days after GnX were at 80 and $70 \mu\text{m}^2$, respectively.

Figure 4D shows plots of cumulative frequency for the distributions shown in Figure 4, A–C. This figure further demonstrates the rightward shift of the gonadotroph size distribution at 15 and 45 days after GnX, which resulted from the excess of medium-sized cells ($>30 \mu\text{m}^2$) and the presence of very large cells ($>60 \mu\text{m}^2$), which represented 2.6% of the

population in intact mice but became 26% and 25% of the population after 15 and 45 days after GnX, respectively. Some of the very large cells can reach areas $>100 \mu\text{m}^2$. The preponderance of small cells in the intact mouse pituitary saturated the cumulative frequency at about $40 \mu\text{m}^2$, whereas the occurrence of larger cells in castrated mice pituitary caused the cumulative frequency to saturate at around $80 \mu\text{m}^2$. The total areas (mean \pm SEM) occupied by gonadotrophs per each $1000 \mu\text{m}^2$ of anterior pituitary were: control, $50.5 \pm 6.7 \mu\text{m}^2$; 15 days after GnX, $138.0 \pm 20.5 \mu\text{m}^2$; and 45 days after GnX, $74.5 \pm 7.22 \mu\text{m}^2$. The increased gonadotroph area in pituitary slices of castrated mice resulted from the combination of increased cell number and larger individual cells.

Do Hypertrophic Gonadotrophs from Castrated Mouse Pituitary Generate Different Ca^{2+} Signals in Response to GnRH?

Ultrastructural changes observed in hypertrophied gonadotrophs are characterized by enlarged endoplasmic reticulum (ER) cisternae and expanded Golgi complex [26–28]. Because the ER is largely responsible for the production of GnRH-induced intracellular Ca^{2+} signals, we wondered whether hypertrophied gonadotrophs would generate Ca^{2+} signals with different characteristics. The peak amplitude of the Ca^{2+} transients produced by 100 nM GnRH was measured for each gonadotroph from the three conditions. Peak ΔF values (mean \pm SEM) obtained were: intact, $23.3 \pm 0.8 \text{ AU}$ ($n = 358$); 15 days after GnX, $26.5 \pm 0.6 \text{ AU}$ ($n = 545$); and 45 days after GnX, 20.38 ± 0.44 ($n = 317$). Differences between groups were not significant. Tomic et al. [9] also reported no significant differences in the amplitude or frequency of GnRH-induced Ca^{2+} signals in gonadotrophs from ovariectomized rats.

To find out whether maximum ΔF could be related to gonadotroph size, this parameter was plotted against the corresponding area size, and a linear regression was fitted to the data. Figure 5 shows superimposed plots of gonadotroph size versus peak amplitude of GnRH-induced Ca^{2+} transients for the three experimental conditions. As shown in Figure 5 (upper left), most gonadotrophs from intact mice were $<50 \mu\text{m}^2$ in area and generated Ca^{2+} signals smaller than 40 AU , but in two mice some of these responses exceeded this value (see yellow and light blue symbols). Linear regression for all of the data sets gave small positive slopes (mean slope = 0.13) and regression coefficients ranging from 0.0723 to 0.567 (mean $r = 0.098$; $n = 6$). This indicates that peak Ca^{2+} amplitude was poorly correlated with cell size in intact mouse gonadotrophs ($P = 0.06$). Figure 5 (upper right) illustrates that gonadotrophs from 15-day castrated mice comprised at least two populations: medium and large cells (see Figure 4, C and D). In three such mice, peak Ca^{2+} signals smaller than $\sim 40 \text{ AU}$ were detected, but in the remaining three mice some peak responses clearly exceeded this value (yellow, dark blue, and pink symbols). A large interindividual variation (in this case, peak responses to GnRH) was a characteristic of male mouse pituitary (see subsection below on recruitment of GnRH-responding cells). Linear regressions for the data sets gave positive slopes (mean slope = 0.125) and regression coefficients ranging from 0.034 to 0.878 (mean $r = 0.256$; $n = 6$). These results suggest that 15 days after GnX, mouse gonadotrophs are similar to intact mouse gonadotrophs in that they can generate both large and small Ca^{2+} signals. In addition, peak Ca^{2+} amplitude computed for the pooled data was significantly correlated with cell size ($P = 1.1 \times 10^{-9}$) (i.e., hypertrophied gonadotrophs tended to generate Ca^{2+} signals of greater amplitude). Figure 5

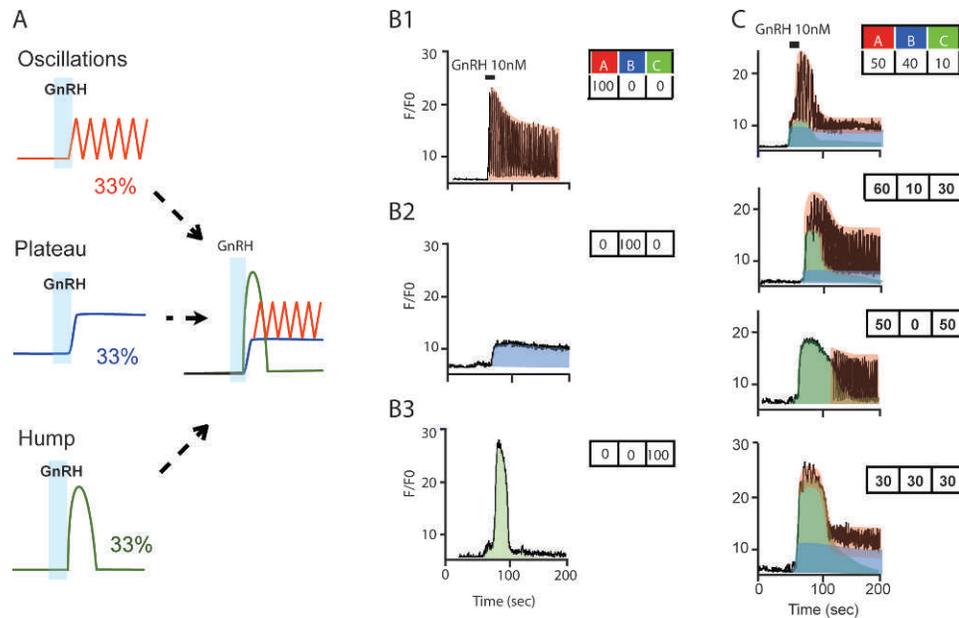


FIG. 6. Semiquantitative assessment of the contribution of oscillation, plateau, and hump components to GnRH-induced Ca^{2+} responses in mice gonadotrophs in situ. **A**) Schematic representation of a cell whose GnRH-induced Ca^{2+} response results from the combination of oscillations, plateau, and hump components in equal proportions. Each component contributes to the response with $\sim 33\%$. The drawing to the right illustrates the summation of these components. **B**) Examples of cells displaying “pure” GnRH-induced Ca^{2+} responses (pure oscillations, **B1**; pure plateau, **B2**; and pure hump, **B3**). Time of GnRH application is indicated on top. The percentage assigned to each component appears above each record. **C**) Examples of typical GnRH-induced Ca^{2+} signals obtained from four different gonadotrophs. Colored areas represent the probable contribution of each component to the Ca^{2+} response. The percentages assigned to each component are indicated above each record. See further explanation in the text.

(lower center) illustrates data from 15-day castrated mouse gonadotrophs. Linear regressions for these data sets gave mostly negative slopes (mean slope = -0.043) and regression coefficients ranging from -0.45 to 0.72 (mean $r = -0.12$; $n = 6$). Thus, it appears that 45 days after castration, mice gonadotrophs no longer generated large Ca^{2+} signals, and peak Ca^{2+} signal amplitude was not significantly correlated with cell size ($P = 0.035$). These results suggest that in castrated mice after 15 days after GnX, peak amplitude of Ca^{2+} signals correlated with cell size, and that hypertrophied gonadotrophs tended to produce stronger GnRH-induced Ca^{2+} signals. No obvious relationship was found between gonadotroph size and other aspects of Ca^{2+} signaling, such as canonical versus noncanonical Ca^{2+} response patterns, frequency of oscillations, Ca^{2+} response components, order of recruitment, etc.

Recruitment of GnRH-Responding Cells as a Function of GnRH Concentration in Control and Castrated Mice

As previously demonstrated, the number of GnRH-responding cells increases gradually at increasing GnRH concentrations [13]. By measuring for each pituitary slice the number of responding cells as a function of $\log [\text{GnRH}]$, a dose-response curve of the gonadotroph population can be obtained. Slices from control intact and castrated mice 15 and 45 days after GnX were challenged with five GnRH concentrations in the range of 0.01 to 100 nM. The number of responding cells at each GnRH concentration was normalized, and a dose-response curve was fitted to each data set (data not shown). Fitting dose-response curves to the data from six control slices gave a mean $\text{ED}_{50} = 0.174$ nM. This value is similar to that previously reported [13] for intact mice (0.39 nM). Dose-response curves obtained from castrated mouse slices gave mean ED_{50} values of 0.069 and 0.064 nM (15 and 45 days,

respectively; $n = 6$). The ~ 2.6 -fold difference of ED_{50} between control and castrated mice suggests a slight increase in responsiveness to GnRH in the gonadotroph population. These differences are not statistically significant ($P = 0.74$; one-way ANOVA, post hoc Tukey multiple-comparison test), probably because of the large interindividual variance previously reported in the male mouse pituitary [13].

An Attempt to Quantify Components of the GnRH-Induced Ca^{2+} Responses of Pituitary Gonadotrophs In Situ

To compare GnRH-induced Ca^{2+} responses and to evaluate the effects of different physiological and nonphysiological conditions, we developed the semiquantitative method represented in Figure 6. Instead of visualizing a cell as exhibiting a certain response, we imagined three possible response components coexisting in any cell: oscillation, plateau, and hump (given the values of A, B, and C, respectively). Each component could take a value from 0 to 100, but the sum of all values must have been equal to 100. The scheme shown in Figure 6A represents a cell whose GnRH-induced Ca^{2+} response was the combination of the three components in equal proportions. The corresponding A, B, and C values were 33, 33, and 33. As exemplified in Figure 6B, some cells displayed “pure” responses. For instance, the Ca^{2+} response of cell 6B1 was “pure oscillatory” (i.e., A, B, and C values were 100, 0, and 0, respectively), the response of cell 6B2 was “pure plateau” (A, B, and C values were 0, 100, and 0, respectively), and the response of cell 6B3 was “pure hump” (A, B, and C values were 0, 0, and 100, respectively). More typically, Ca^{2+} responses contained a given amount of each component. Figure 6C exemplifies GnRH-induced Ca^{2+} responses obtained from four different gonadotrophs in situ. Hypothetical individual components are indicated as areas of different color, and the assessed A, B, and C values appear above each trace.

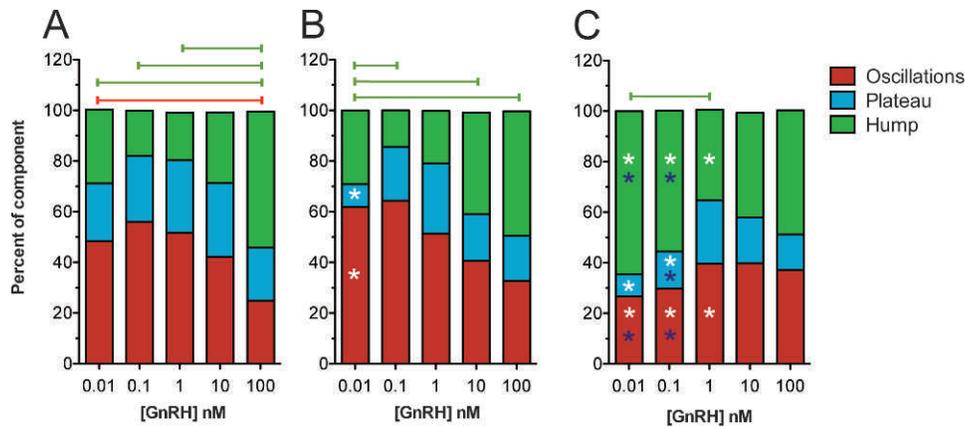


FIG. 7. Components of GnRH-induced Ca^{2+} response in gonadotrophs from intact and castrated mice exposed to different GnRH concentrations. The percentages assigned to oscillations, plateau, and hump components for each gonadotroph were counted. Intact mouse gonadotrophs ($n = 358$; **A**), castrated mouse gonadotrophs after 15 days ($n = 545$; **B**), and castrated mouse gonadotrophs after 45 days ($n = 317$; **C**) were averaged and plotted. The height of each bar represents the percentage of oscillation (red), plateau (blue), and hump (green) components that characterizes the Ca^{2+} responses of the gonadotroph population at each [GnRH]. Horizontal lines indicate significant differences between columns of the same color within a given experimental condition. White asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) for the indicated component (15 or 45 days after GnX) with respect to intact mice at the same [GnRH]. Blue asterisks indicate significant differences of the indicated component between gonadectomized conditions at the same [GnRH]. Significances obtained by chi-square tests. See further explanation in the text.

Figure 7A illustrates the fraction of each component present in intact mice gonadotrophs at five different GnRH concentrations. The height of each bar represents the percentage of oscillation (red), plateau (blue), and hump (green) components that characterized Ca^{2+} responses of the gonadotroph population at each [GnRH]. At 0.01 nM GnRH the percentage of oscillatory component was 48%, with plateau and hump components contributing 22% and 29%, respectively. These percentages remained fairly constant at 0.1 and 1 nM, but at higher [GnRH] the oscillatory component diminished and the contribution of the hump component increased. At 100 nM, oscillations fell to 24%, whereas the hump component grew to 53% ($P < 0.05$ compared with 0.01 nM). This behavior of intact mice gonadotrophs in situ resembles the progression of Ca^{2+} responses to increasing [GnRH] observed in cultured normal rat gonadotrophs [5, 9, 21].

Ca^{2+} response patterns recorded 15 days after GnX are presented in Figure 7B. Remarkably, the oscillatory component at 0.01 GnRH was relatively high in GnX gonadotrophs (61%) compared with control gonadotrophs (48%; $P < 0.05$). As GnRH concentration increased, the oscillatory component diminished gradually, reaching 32% at 100 nM GnRH. Concomitantly, the hump component increased from 29% at 0.01 nM to 49% at 100 nM GnRH ($P < 0.05$). Notably, the progression of Ca^{2+} component contribution at increasing [GnRH] was similar between control and 15-day castrated mouse gonadotrophs. In particular, the hump component represented $\sim 50\%$ of the response at high [GnRH] both in control and 15-day castrated mice.

Figure 7C summarizes Ca^{2+} response patterns of gonadotrophs at 45 days after GnX. Here, Ca^{2+} response patterns differed in several aspects from that observed in intact and 15 days after GnX gonadotrophs: 1) The oscillatory component at 0.01 nM GnRH was quite small (26%) and the hump component was significantly larger (64%) compared with intact mice and 15-day castrated mouse gonadotrophs ($P < 0.05$). 2) In the range between 0.01 and 1 nM GnRH, the hump component diminished ($P < 0.05$), whereas the oscillatory component increased slightly. This behavior is the opposite of that observed in gonadotrophs from control and 15-day

castrated mice. 3) Nonetheless, at 100 nM GnRH the fractions of oscillatory and hump components (37% and 48%, respectively) were similar to those of control and 15-day castrated mice. 4) Interestingly, the percentages of Ca^{2+} response components of 45-day castrated mouse gonadotrophs did not change appreciably at [GnRH] in the range between 1 and 100 nM.

DISCUSSION

GnRH-Induced Ca^{2+} Signaling in Mouse Pituitary Gonadotrophs

Ca^{2+} imaging in acute mouse pituitary slices revealed Ca^{2+} signaling patterns unique to gonadotrophs in situ [13]: for example, only about a third of the mouse gonadotrophs responded to increasing GnRH concentrations with “canonical,” orderly behavior, and the remaining cells exhibited “noncanonical” dose-response patterns (oscillatory responses at a given GnRH concentration and nonoscillatory, transient responses at both lower and higher concentrations) and “atypical” (nonoscillatory) responses (58% and 3.6%, respectively). Interestingly, noncanonical response patterns increased to 80% after GnX. We have speculated [13] that the deviation from the “canonical” behavior in gonadotrophs in situ could originate from variations in GnRH responsiveness, possibly due to paracrine interactions within the gland. The relevant question here is: What are the expected consequences of noncanonical Ca^{2+} signaling patterns becoming dominant among the gonadotroph population? It has been suggested the spike-plateau pattern favors gonadotropin secretion [1, 8]; therefore, the fact that gonadotrophs tend to generate spike-plateau Ca^{2+} signals at low or intermediate GnRH concentrations and not only at high concentrations could promote gonadotropin secretion, perhaps contributing to the increased levels observed in castrated mice [20].

Castration-Induced Proliferation of GnRH-Responding Cells

Anatomical studies have reported that GnX increases the number of pituitary gonadotrophs [22, 28]. In one example,

LH β -reactive cells doubled after castration [28]. As our study shows, the number of GnRH-responding cells increased 1.7-fold at 15 days after GnX compared with intact mice. This expansion was not significant 45 days after GnX. The latter observation differs from anatomical reports showing that the number of LH β -reactive cells remains elevated 3 mo after castration [28]. This disparity, however, may not be relevant. First, species difference (rat vs. mouse) could be significant. Also, measuring methods (LH β immunoreactivity vs. GnRH responsiveness using Ca²⁺ imaging) were quite different. In addition, LH β immunoreactivity and GnRH-induced Ca²⁺ responsiveness could not be correlated. Moreover, one must keep in mind that GnRH responsiveness requires an adequate density of GnRH-Rs and functioning Ca²⁺ signaling machinery. Contrary to rat pituitary, where GnRH-R density increases after GnX, in mouse pituitary the density of GnRH-Rs decreases by about 50% after GnX [20]. The diminished number of GnRH-Rs in mouse gonadotrophs could explain the reduced number of GnRH-responding cells 45 days after GnX. The expansion of the gonadotroph population after GnX could be due to 1) mitotic division of mature gonadotrophs, 2) differentiation of immature cells into gonadotrophs, and 3) transdifferentiation of mature pituitary cells from another lineage into gonadotrophs [34]. Previous anatomical studies suggest that the first possibility is more likely [28].

Castration-Induced Growth of GnRH-Responding Cells

Anatomical reports also indicate that gonadotroph size increases after GnX [22, 26–28]. According to one report, gonadotroph volume increases by more than 6-fold 3 mo after castration [28]. As revealed by our Ca²⁺ imaging study, the size distribution of gonadotrophs shifts to the right after GnX. This agrees with earlier reports showing that small cells almost disappear, and nearly all medium-size gonadotrophs undergo hypertrophy [28]. Does the rightward shift of the size distribution result from indiscriminate gonadotroph growth? This does not appear to be the case: Increasing the cell area of all control cells by 20 μm^2 (roughly the mean size increase of gonadotrophs in castrated mice) did not reproduce the castrated cell size distribution (data not shown). It would be interesting to determine whether large cells (>60 μm^2) are newly born (i.e., resulting from gonadotroph mitosis) or whether they correspond to preexisting, enlarged gonadotrophs. Gonadotroph hypertrophy after castration can be prevented by injection of anti-GnRH antibody [31], suggesting that it results from the elevated levels of pituitary GnRH.

The ER of hypertrophied gonadotrophs shows signs of hyperactivity [26–28], possibly related to the increased synthesis of gonadotropins [17–20]. The consequences of ER enlargement are unclear, because the ER can serve both as a sink and a source for intracellular Ca²⁺ [35]. Nonetheless, our study demonstrates that at least in some mice, hypertrophied gonadotrophs in situ can generate GnRH-induced Ca²⁺ signals of greater peak amplitude. This remarkable finding (possibly one of the reasons why gonadotropin secretion increases after castration) could have several interpretations: 1) a higher density of membrane GnRH-Rs, leading to a greater InsP₃ production; 2) a stronger Ca²⁺ mobilization from intracellular pools, resulting from a higher IP₃R density; or 3) a greater Ca²⁺ content in the enlarged ER. It has been reported that addition of GnRH into the culture medium results in gonadotroph hypertrophy [25]. Thus, it should be possible to expose cultured pituitary cells to GnRH and

characterize GnRH-induced Ca²⁺ responses from hypertrophied gonadotrophs. Under these conditions it would be relatively easy to test at least some of the above-mentioned possibilities.

Components of the GnRH-Induced Ca²⁺ Response in Pituitary Gonadotrophs In Situ

Attempting to understand GnRH-induced Ca²⁺ responses in relationship with GnRH concentration, the question of how Ca²⁺ signaling patterns regulate gonadotropin secretion has emerged repeatedly. The consensus is that gonadotropin secretion in gonadotrophs can be triggered by intracellular Ca²⁺ rises of sufficient magnitude, without a “privileged” Ca²⁺ signaling pattern. Ca²⁺ responses to increasing GnRH concentrations recognized in cultured gonadotrophs include: 1) subthreshold, 2) baseline spiking (oscillatory), and 3) biphasic [8, 9]. The latter comprises two variants: biphasic oscillatory and biphasic nonoscillatory (spike-plateau) [1]. The percentage of cells showing these responses at a given GnRH concentration differs during development, along the estrous cycle, and after ovariectomy [9]. It is yet to be clarified which cellular aspects determine the Ca²⁺ signaling patterns displayed by individual gonadotrophs in response to GnRH. Our preceding study showed that Ca²⁺ responses of gonadotrophs in situ are robust: individual cells respond consistently in latency, oscillatory pattern, and duration every time the same dose of GnRH is applied [13]. The Ca²⁺ response categorization as subthreshold, oscillatory, and spike-plateau (biphasic) has been criticized as too simplistic and as having significant overlap. Also, the need for further criteria to distinguish between oscillatory and biphasic has been raised [1]. Our semiquantitative approach allows a straightforward comparison of Ca²⁺ recordings within individual gonadotrophs. One drawback of this method is that score values are assigned subjectively. Nonetheless, the same individual usually assigns similar score values to the same Ca²⁺ records. Furthermore, our percentage code gives a reasonably good idea of what the Ca²⁺ response looks like, and it is less ambiguous than the alternate classification (subthreshold, baseline-spiking, and biphasic).

Components of the GnRH-Induced Ca²⁺ Responses in Intact Mice Pituitary

When gonadotrophs in situ from intact mice are exposed to the lowest GnRH concentration (0.01 nM), the oscillatory component represents 48% of the Ca²⁺ response, with the hump component contributing 29%. When the highest dose of GnRH is applied, the oscillatory component diminishes (24%) and the hump component grows, but only to a modest 53%. This sequence of Ca²⁺ signaling patterns resembles, but is considerably less conspicuous than that reported in cultured gonadotrophs from intact rats, where hump (spike-plateau) responses become dominant above 100 nM GnRH. The discrepancy could be due to species differences, or perhaps to the preservation of cell-to-cell interactions in the pituitary slice preparation [13]. It should be possible to conduct similar Ca²⁺ imaging experiments in pituitary slices from male rats to decide between these possible explanations.

Modifications of Ca²⁺ Response Components in Castrated Mice

An unexpected finding of our study is that the relative contribution of Ca²⁺ response components as a function of GnRH concentration does not change considerably between

intact and 15-day castrated mice. In particular, at 100 nM GnRH the hump component represented ~50% of the Ca^{2+} response in both conditions. These results differ from castrated rat gonadotrophs *in vitro*, where, according to several reports, the majority of gonadotrophs display oscillatory rather than spike-plateau (hump) Ca^{2+} responses upon exposure to 100 nM GnRH. In other words, the main changes in Ca^{2+} signaling pattern reported in cultured gonadotrophs from castrated rat [21, 32] were not confirmed in castrated mice gonadotrophs *in situ*.

In contrast with our observations in control gonadotrophs and gonadotrophs 15 days after GnX, at 45 days after GnX the oscillatory component at 0.01 nM GnRH was rather small (26%), and the hump component was comparatively large (64%). Also, in the range from 0.01 to 1 nM the hump component diminished while the oscillatory component increased, but at 100 nM GnRH these components became similar to those of control and 15-day castrated mice. Again, the reported changes in Ca^{2+} signaling patterns in cultured gonadotrophs from castrated rat [21, 32] were not observed in castrated mouse gonadotrophs after 45 days after GnX. Finally, the percentages of Ca^{2+} response components of 45-day castrated mouse gonadotrophs did not change for [GnRH] in the range between 1 and 100 nM. An interpretation of the latter finding is that gonadotrophs from 45-day castrated mice respond to GnRH but fail to discriminate between 1, 10, and 100 nM [GnRH], as if the Ca^{2+} response pattern reached saturation at [GnRH] ~1 nM. We do not yet have an explanation for the differences in Ca^{2+} response patterns of gonadotrophs at 15 and 45 days after GnX.

Alterations of GnRH-induced Ca^{2+} responses in gonadotrophs of castrated rat males can be prevented by testosterone treatment but not by treatment with a GnRH antagonist [21], suggesting that they result from testosterone deficiency at the pituitary level [32]. These alterations reported in castrated rat gonadotrophs were not mirrored in castrated mouse gonadotrophs *in situ*. One possible explanation for this discrepancy is that testosterone deficiency does not similarly affect rat and mouse pituitary gonadotrophs. Our study underscores the importance of not assuming that testosterone deficiency equally affects the functional properties of pituitary gonadotrophs across species.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are indebted to Drs. Marcia Hiriart and Andrés Quintanar, who provided invaluable insights throughout this work. We also are grateful to QFB Nicolas Jiménez and Biol. Diana Millán for expert technical assistance, to Claudia V. Rivera for continuous advice, to Dr. Leon Islas for writing Igor software algorithms, and to Manuel Alvarez for writing MATLAB algorithms. This study was performed by M.L.D.-P. as partial fulfillment of the requirements to obtain the Ph.D. in Biomedical Sciences (UNAM).

REFERENCES

- Thomas P, Waring DW. Modulation of stimulus-secretion coupling in single rat gonadotrophs. *J Physiol* 1997; 504(pt 3):705–719.
- Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31:322–340.
- Stojilkovic SS, Zemkova H, Van Goor F. Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca^{2+} signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:152–159.
- Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca^{2+} and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:1–19.
- Iida T, Stojilkovic SS, Izumi S, Catt KJ. Spontaneous and agonist-induced calcium oscillations in pituitary gonadotrophs. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 949–958.
- Tse A, Hille B. GnRH-induced Ca^{2+} oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotrophs. *Science* 1992; 255:462–464.
- Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przeddecki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R, Naor Z. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm* 2001; 63:63–90.
- 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 gonadotrophs. *J Biol Chem* 1991; 266:9016–9022.
- Tomic M, Cesnajak M, Catt KJ, Stojilkovic SS. Developmental and physiological aspects of Ca^{2+} signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 1994; 135:1762–1771.
- Stojilkovic SS, Tomic M. GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:379–384.
- Guerineau NC, Bouali-Benazzouz R, Corcuff JB, Audy MC, Bonnin M, Mollard P. Transient but not oscillating component of the calcium mobilizing response to gonadotropin-releasing hormone depends on calcium influx in pituitary gonadotrophs. *Cell Calcium* 1992; 13:521–529.
- Tse A, Tse FW, Almers W, Hille B. Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotrophs. *Science* 1993; 260:82–84.
- Sanchez-Cardenas C, Hernandez-Cruz A. GnRH-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -signaling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices *in vitro*. *Neuroendocrinology* 2010; 91:239–255.
- 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.
- Hodson DJ, Romano N, Schaeffer M, Fontanaud P, Lafont C, Fiordelisio T, Mollard P. Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells *in situ*. *Cell Calcium* 2012; 51:222–230.
- Ramirez VD, McCann SM. Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. *Endocrinology* 1965; 76: 412–417.
- Brown-Grant K, Greig F. A comparison of changes in the peripheral plasma concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the rat. *J Endocrinol* 1975; 65:389–397.
- Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS. Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotrophs in male wild-type and estrogen receptor- α knockout mice. *Endocrinology* 1998; 139:4092–4101.
- Clayton RN, Detta A, Naik SI, Young LS, Charlton HM. Gonadotrophin releasing hormone receptor regulation in relationship to gonadotrophin secretion. *J Steroid Biochem* 1985; 23:691–702.
- Tobin VA, Canny BJ. Testosterone regulates gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs. *Endocrinology* 1996; 137:1299–1305.
- Sakai T, Inoue K, Hasegawa Y, Kurosumi K. Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1988; 122:2803–2808.
- Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F. A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adeno-hypophysial cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol* 1984; 100:323–328.
- Shiino M. Ultrastructural evidence of gonadotrophin release from castration cells following injection of LHRH in the rat. *Cell Tissue Res* 1982; 222:213–222.
- Shiino M. Morphological changes of pituitary gonadotrophs and thyrotrophs following treatment with LH-RH or TRH *in vitro*. *Cell Tissue Res* 1979; 202:399–406.
- Nakayama I, Matsuo T, Oyakawa Y, Takahara O, Tsuji K. Fine structural studies on the fate of “castration” cells in the rat adeno-hypophysis after bilateral oophorectomy. *Acta Pathol Jpn* 1975; 25:439–450.
- Console GM, Jurado SB, Rulli SB, Calandra RS, Gomez Dumm CL. Ultrastructural and quantitative immunohistochemical changes induced by nonsteroid antiandrogens on pituitary gonadotroph population of prepubertal male rats. *Cells Tissues Organs* 2001; 169:64–72.
- Inoue K, Kurosumi K. Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration-immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch Histol Jpn* 1981; 44:71–85.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 1993; 133:931–934.
- Huang BM, Leu SF, Yang HY, Norman RL. Testosterone effects on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone responses to

- gonadotropin-releasing hormone in the mouse. *J Androl* 2001; 22: 507–513.
31. Arimura A, Shino M, de la Cruz KG, Rennels EG, Schally AV. Effect of active and passive immunization with luteinizing hormone-releasing hormone on serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels and the ultrastructure of the pituitary gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1976; 99:291–303.
 32. Tobin VA, Millar RP, Canny BJ. Testosterone acts directly at the pituitary to regulate gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotropes. *Endocrinology* 1997; 138:3314–3319.
 33. Justulin LA Jr, Ureshino RP, Zanoni M, Felisbino SL. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biol Int* 2006; 30:354–364.
 34. Nunez L, Villalobos C, Senovilla L, Garcia-Sancho J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 549:835–843.
 35. Stutzmann GE, Mattson MP. Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 700–727.