



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE CALCIO
INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$ DE GONADOTROPOS EN
HIPÓFISIS DE RATÓN HEMBRA Balb-C EN PROESTRO
Y DIESTRO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Montserrat Midori Acevedo Yamamoto



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Tatiana Fiordeliso Coll

CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX., 2020



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias, por permitirme ampliar mis conocimientos y la formación académica que recibí durante los años de licenciatura.

Quiero agradecer el apoyo y financiamiento de los proyectos de PAPIIT IN222613, PAPIIT IN227416 y CONACyT-ANR 273513.

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por guiar y dirigir este proyecto, así como a los sinodales que formaron parte del comité de revisión de este trabajo. La Dra. Patricia Rivas Manzano, M. en C. Rosa Nuria Galindo Solano, Dra. Rosario Ortiz Hernández y el Dr. Luis Felipe Jiménez García agradezco sus valiosos comentarios y observaciones a este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A quien es la verdadera culpable de todos mis logros y trayectoria. Gracias por permitirme encontrar mi camino aunque algunas veces no te parezca el más convencional, sin tu apoyo y tu cariño nada de esto sería posible. Gracias, mamá.

A mis abuelas, al Viejito, mi tía Kinue y mi hermano, quienes han sido parte fundamental de mi vida. Gracias por estar siempre y hacer de esta vida un viaje mucho más ameno.

A Marco, por tu amor, paciencia y apoyo. Agradezco infinitamente este tiempo en el que me has enseñado que la vida es muy corta, que merecemos caminarla y contemplarla sin prisa y sin miedo. Soy muy afortunada por haberte encontrado y poder compartir todo lo bueno y lo malo de la vida contigo.

A la Dra. Tatiana Fiordelisis Coll por compartir sus conocimientos y permitirme crecer en el ámbito académico de maneras que a otros les parecerían poco tradicionales. Gracias a ti he gozado de la ciencia en todo su esplendor y eso siempre fue un sueño para mí, muchas gracias por eso, Tat.

A todos mis amigos, Tania, Lalo, Esther, Erick, Apac, Vane y Leslie. Los admiro muchísimo, con ustedes he tenido el privilegio de experimentar cosas que solo son posibles en una verdadera amistad, gracias por estos 10 años.

A todos mis amiguitos del laboratorio Ita, Ale, Coral, Ana, Yorgui, Alejandro, Juan, Pao, Josecito, Luca, Diana, Nuria, Daniel y especialmente a Vicente. Todos ustedes han compartido conmigo conocimientos y habilidades que han sido vitales para mi formación, pero encima de eso hemos creado lazos que van más allá de las puertas del laboratorio. Entre risas, pizzas, donas y pasteles quiero agradecerles todas las veces que la hemos pasado increíble siendo muy científicos y no tan científicos, los quiero mucho.

Por último, quiero agradecer a José Alfredo Jiménez y Vicente Elorriaga Benavides por su apoyo en los experimentos y análisis de datos realizados para esta tesis. ¡Al fin salió algo con todos estos experimentos!

Tabla de contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
Sistema Neuroendocrino	2
Hipófisis	2
Regulación en la adenohipófisis	6
Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.....	7
Regulación neuroendócrina del ciclo reproductivo	14
El ciclo estral	15
ANTECEDENTES	
Los cambios y la funcionalidad de los patrones de movilización de calcio intracelular ante la aplicación de GnRH.....	17
Contexto Tisular	19
Redes endócrinas y vasculatura.....	20
Organización funcional de gonadotropos	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
MÉTODO.....	25
RESULTADOS	
Proporción de gonadotropos.....	28
Actividad basal.....	30
Patrones de respuesta.....	31
Correlación de actividad.....	34
DISCUSIÓN	
Proporción de gonadotropos según la fase del ciclo estral.....	36

Actividad espontánea.....	37
Diferencias en los patrones de calcio intracelular	37
Correlación en la actividad celular	39
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

Resumen

El eje reproductor hipotálamo-hipófisis-ovario regula la reproducción y la capacidad reproductiva. Este eje, está controlado por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo que, al unirse a su receptor en la membrana plasmática de los gonadotropos hipofisarios, modula la concentración de Ca^{2+} intracelular y desencadena la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas juegan un papel importante en la esteroidogénesis y el mantenimiento de la capacidad reproductiva. En hembras, el pico de secreción de LH es un evento clave que tiene como consecuencia la ovulación y marca el final del proestro y la fase folicular. Sin embargo, a pesar de que a la fecha se conocen los mecanismos generales que regulan esta secreción, poco se sabe sobre los mecanismos de integración que permiten la formación de este pulso hormonal en la glándula.

En años recientes se ha descrito que la distribución de las células hipofisarias no es aleatoria y que forman redes homo y heterotípicas. Además, se ha demostrado que la glándula posee una notable plasticidad y las poblaciones celulares de la glándula cambian de acuerdo a la demanda fisiológica en diferentes etapas de la vida. Esto ha abierto la puerta a nuevas líneas de investigación que buscan, con ayuda de preparaciones tisulares, entender la organización de las redes celulares para la formación de pulsos hormonales.

En este trabajo, con ayuda de técnicas de imagenología de Ca^{2+} , se observó la actividad de los gonadotropos en respuesta a un estímulo de GnRH 10 nM durante las fases de proestro y el diestro en las regiones ventral y dorsal de la glándula. Se observó un mayor número de células responsivas en el proestro en la región ventral. Además se observó que había un mayor número de células con actividad espontánea durante el proestro para ambas regiones. Por último, se observó que los patrones de respuesta de Ca^{2+} se encuentran en proporciones distintas a las reportadas en la literatura para ratones macho; esto último podría indicar diferencias funcionales importantes entre machos y hembras.

INTRODUCCIÓN

Sistema Neuroendocrino

El sistema neuroendocrino se conforma por el sistema nervioso y el sistema endócrino, los cuales se encuentran en constante comunicación para actuar de manera coordinada a fin de mantener la homeostasis en el organismo.

En el sistema nervioso las neuronas hipotalámicas secretan hormonas activadoras o inhibitoras que regulan la actividad endócrina de la hipófisis. A nivel endócrino, la hipófisis es la glándula mediadora entre el cerebro y el resto del cuerpo al liberar distintas hormonas tróficas que permiten la regulación de sus respectivos órganos blanco. Dicha regulación jerárquica es conocida como los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco y regulan procesos como la lactancia, el crecimiento o la reproducción. ¹

Hipófisis

Localización y estructura

La hipófisis está localizada en la silla turca del hueso esfenoides por debajo del quiasma óptico, está protegida por la duramadre y unida al hipotálamo por medio del tallo infundibular. Se conforma de dos entidades embriológica, anatómica y funcionalmente distintas: la neurohipófisis y la adenohipófisis (**Fig 1**). ^{2,3}

Esta glándula se encuentra conectada al hipotálamo a través de la eminencia media, que sirve como puente de comunicación entre el plexo capilar que va a la adenohipófisis y las terminales axónicas de los núcleos supraóptico y paraventricular. En la neurohipófisis se encuentra la *pars nervosa*, que conecta directamente con la circulación general, aquí las neuronas magnocelulares de estos núcleos descargan sus hormonas (oxitocina y vasopresina)^{1,2}.

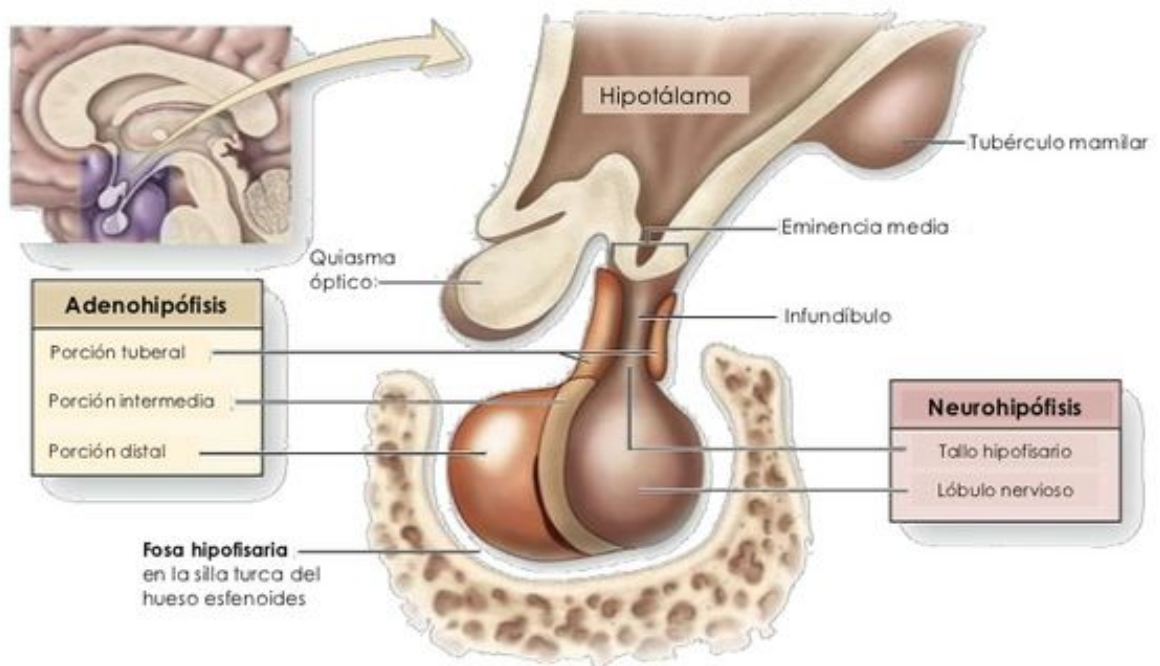


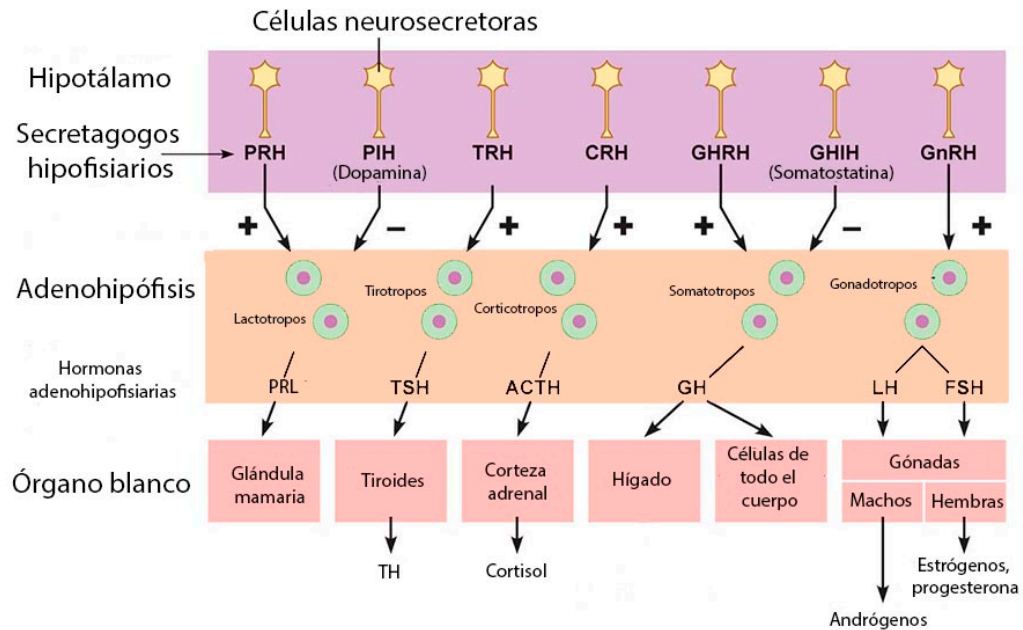
Figura 1. Glándula Hipófisis, localización y estructura. Tomada y modificada de Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th edition, MacGraw Hill companies.

La adenohipófisis está dividida en tres subregiones: la *pars distalis*, la *pars intermedia* y la *pars tuberalis*. La *pars tuberalis* se encuentra en contacto con el tallo infundibular y la eminencia media. La *pars distalis* (también llamada solamente adenohipófisis) conforma el 80% del lóbulo anterior de la glándula y en ella se encuentran 5 tipos celulares endócrinos: tiorotropos, somatotropos, lactotropos, corticotropos y gonadotropos, los cuales secretan 6 hormonas reconocibles estructural y funcionalmente, también se encuentran células no secretoras. Por último, la *pars intermedia* que es rudimentaria en los humanos y que está más desarrollada en otros vertebrados, presenta únicamente un tipo celular endócrino: los melanotropos. ¹⁻³

Tipos celulares de la adenohipófisis

Las 5 poblaciones de células endócrinas en la adenohipófisis (**Fig 2**) (*pars distalis*) están distribuidas en diferentes proporciones. Con el avance de la inmunotinción fue posible nombrarlas según la hormona que sintetizan y secretan: los somatotropos (50%) que producen hormona del crecimiento (GH), los lactotropos (25%) que producen prolactina (PRL), los corticotropos (10-15%) que producen hormona

adrenocorticotropa (ACTH), gonadotropos (10-15%) que producen hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y los tirotropos (5%) que producen hormona estimulante de la tiroides (TSH); además, la adenohipófisis también presenta grupos celulares no endócrinos como las células folículo estrelladas, pericitos, tanicitos, etc. ^{2,3}



© 2011 Pearson Education, Inc.

Figura 2 Tipos celulares adenohipofisarios, respectivos secretagogos, secreción hormonal y órganos blanco. Los secretagogos pueden inhibir o estimular la secreción a un grupo específico de células adenohipofisarias, a su vez, estas células secretan hormonas que actúan en órganos blanco de manera específica, controlando varios procesos fisiológicos. PRH, hormona liberadora de prolactina; PIH, dopamina; TRH, hormona liberadora de tirotropinas; CRH, hormona liberadora de corticotropinas; GHRH, hormona liberadora de hormona del crecimiento; GHIH, somatostatina; GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; PRL, prolactina; TSH, hormona estimulante de la tiroides; ACTH, hormona adrenocorticotropa, GH, hormona del crecimiento; LH, hormona luteinizante, FSH, hormona foliculoestimulante; TH, hormona tiroidea. Tomada y modificada de <http://droualb.faculty.mjc.edu/>.

Vascularización de la adenohipófisis

La irrigación hipofisaria fluye de manera descendente del hipotálamo a la hipófisis y proviene de las arterias hipofisarias superior, media e inferior. En conjunto, estos vasos sanguíneos forman el sistema porta-hipofisario que es el nexo comunicante entre la eminencia media y la hipófisis ⁴

El sistema porta-hipofisario se conforma por el plexo primario y secundario, conectados entre sí por los vasos portales largos. El plexo primario es una red de capilares fenestrados a la altura de la eminencia media y el infundíbulo. En esta

última estructura, la arteria superior y las terminales axónicas suministran de sangre y liberan las hormonas hipotalámicas, respectivamente, en la neurohipófisis. Los capilares de este plexo confluyen hasta formar los vasos portales largos que llegan a la adenohipófisis y forman el plexo secundario.^{2,3,5}

El plexo secundario es también una red de capilares fenestrados que irriga a la adenohipófisis. Esto resulta de suma importancia puesto que al no estar directamente inervada, este medio es el que abastece de nutrientes, oxígeno y recibe los factores hipotalámicos. Además, en dicho plexo también se colectan las hormonas sintetizadas y secretadas por las células adenohipofisiarias para ser subsecuentemente dirigidas a la circulación sistémica (**Fig 3**).²⁻⁵

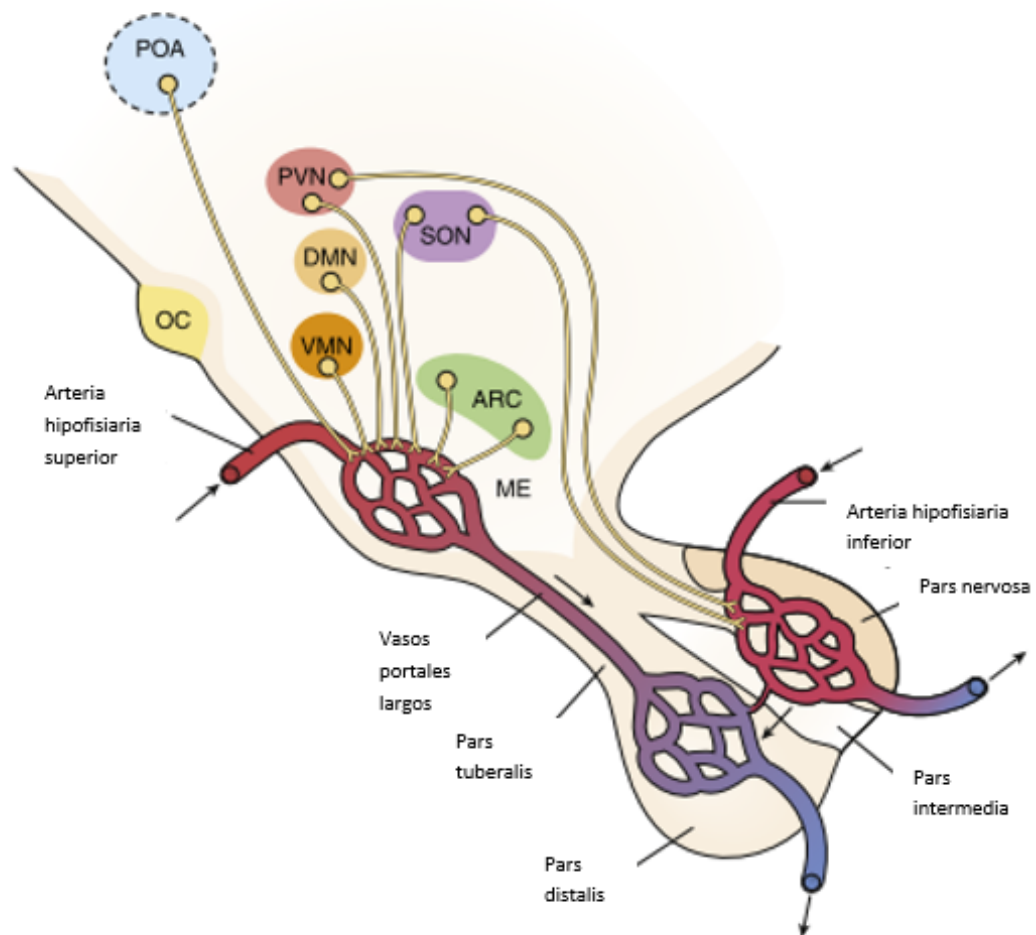


Figura 3 Vascularización e irrigación de la hipófisis. Las neuronas de los diferentes núcleos hipotalámicos liberan a los secretagogos al plexo primario que viajan por los vasos portales largos hasta el plexo secundario, donde estimulan la liberación hormonal de grupos celulares específicos. POA, área preóptica; OC, quiasma óptico; SON, núcleo supraóptico; PVN, núcleo paraventricular; ARC, núcleo arcuato; DMN, núcleo dorsomedial; VMN, núcleo ventromedial; ME, eminencia media; Tomado y modificado de Norris & Carr (2013).

Regulación en la adenohipófisis

La regulación neuroendocrina es compleja, pues está determinada por diferentes asas de retroalimentación tanto positivas como negativas provenientes de diferentes partes del organismo.

De manera particular, podemos identificar tres niveles de regulación (**Fig 4**): el primero, está dado por el hipotálamo que libera los secretagogos que estimulan o inhiben la secreción de las células endócrinas. Entre estos secretagogos están la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) y la hormona liberadora de tirotropinas (TRH) como factores estimulatorios; mientras que la somatostatina y dopamina actúan como principales factores inhibitorios^{2,316}.

El segundo nivel, está conformado por la acción parácrina y autócrina de la hipófisis. Las células se ven afectadas por la secreción de hormonas, factores de crecimiento y algunas citosinas⁷. Dado que la regulación hipofisiotrópica proveniente del hipotálamo no puede explicar por sí sola la regulación de la hipófisis, se han propuesto otros mecanismos internos de regulación como la red de células foliculo estrelladas que parecen cumplir una función similar a la de la astroglia en el cerebro^{7,8}

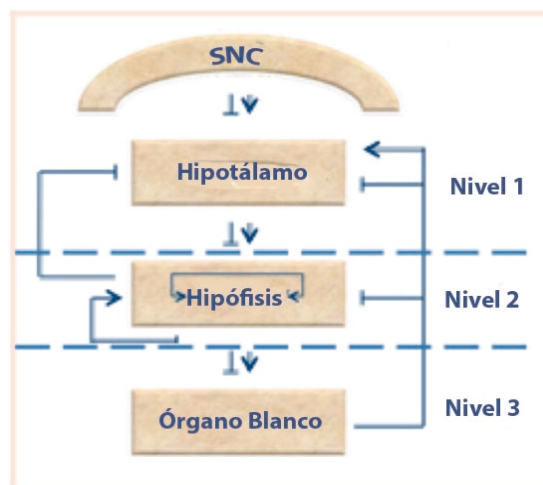


Figura 4 Niveles de regulación para la hipófisis. Podemos identificar tres niveles de regulación desde los cuales puede haber una acción estimuladora o inhibitoria según sea requerido. Tomada y modificada de Melmed S., 2011

Por último, en el tercer nivel, se consideran a los órganos blanco que secretan hormonas y metabolitos que forman asas de retroalimentación que mantienen la homeostásis.

Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

La reproducción y maduración sexual está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG)⁹ (**Fig. 5**). En este eje, neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo sintetizan y secretan de manera pulsátil GnRH hacia la eminencia media, que llega a los gonadotropos en la hipófisis. Los gonadotropos son estimulados por el GnRH, que es capaz de inducir la síntesis y secreción de las gonadotropinas (FSH y LH).
10-12

Las gonadotropinas son glicoproteínas heterodiméricas que comparten la subunidad α , mientras que la subunidad β es distinta y les confiere su función¹³. Son liberadas al torrente sanguíneo hasta llegar a sus órganos blancos, las gónadas. Estas hormonas son esenciales en el mantenimiento de la capacidad reproductiva.

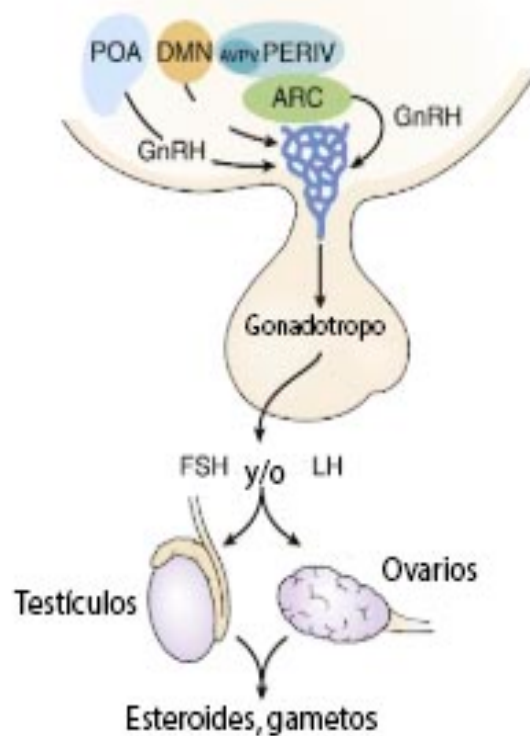


Figura 5 Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG). Se muestran los sitios de síntesis de GnRH (secretagogo de los gonadotropos), que induce la síntesis de LH y/o FSH en los gonadotropos, estas hormonas actúan sobre las gónadas y participan en los procesos de esteroidogénesis y gametogénesis. En hembras, son esenciales para la regulación del ciclo ovulatorio. POA, área preóptica; ARC, núcleo arcuato; DMN, núcleo dorsomedial; GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; FSH, hormona folículoestimulante; LH, hormona luteinizante. Modificada de Noriis & Carr (2013)

A continuación, se presenta la fisiología de cada componente del eje, prestando especial atención a su papel en el ciclo ovulatorio.

La GnRH

La GnRH es un decapeptido sintetizado y secretado por las neuronas de GnRH del núcleo arcuato y el área preóptica en el hipotálamo ^{12,14}. En mamíferos se presentan dos formas de GnRH, GnRH-I y GnRH-II. El primero se localiza, principalmente, en el hipotálamo y es el más importante estimulador de los gonadotropos, mientras que el segundo se localiza fuera del cerebro y actúa más como un neurotransmisor. Sin embargo, se ha demostrado que ambos son capaces de estimular la secreción de gonadotropinas por parte de los gonadotropos al unirse al receptor de GnRH-I (GnRHR) ^{3,12,14}.

Diversos estudios confirman que la naturaleza pulsátil de la GnRH es esencial para la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Sobre todo en hembras ya que los patrones de amplitud y frecuencia varían mucho a lo largo del ciclo reproductivo. La modificación de estos patrones altera el ciclo reproductivo y puede resultar en patologías como hipogonadismo, síndrome de ovario poliquístico, entre otras. ^{3,4,10,12,14}.

Receptor de GnRH

La GnRH se une a su receptor de membrana en los gonadotropos, estimulando la biosíntesis y secreción de las gonadotropinas. Este receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G de tipo rodopsina (GPCR), está caracterizado por tener 7 dominios transmembranales con el dominio amino terminal en la región extracelular y el carboxilo terminal en la región intracelular (**Fig. 6**)^{15,16}.

Las asas de la región extracelular y zonas superficiales de los dominios transmembranales son, generalmente, responsables de los eventos de unión, especialmente la tercera asa extracelular. Por su parte, las asas intracelulares regulan procesos de transducción de señales y el dominio carboxilo terminal está involucrado en la desensitización e internalización del receptor¹⁷.

Se identifican tres formas del receptor de GnRH en vertebrados, GnRHR-I, GnRHR-II y GnRHR-III. Esta clasificación se basa en diferencias del dominio carboxilo terminal (ausencia o presencia) y la secuencia de aminoácidos de la tercer asa

extracelular, la cual determina la selectividad del receptor por alguna forma específica de GnRH^{11,16,17}. Sin embargo, se considera que las formas de GnRHR que carezcan de dominio carboxilo terminal, de cualquier organismo, son clasificados como GnRHR-I, mientras que aquellas que sí lo presentan, de cualquier organismo, son clasificados como GnRHR-II. Esto se debe a que se ha observado que la especificidad por la forma de GnRH no es concluyente^{15,17}.

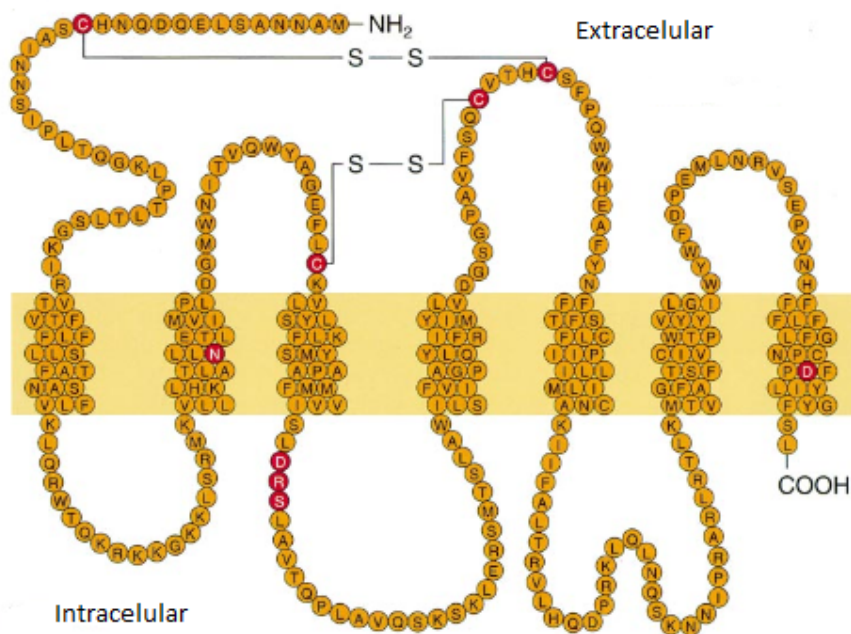


Figura 6 Representación gráfica del receptor de GnRH. Se presenta la secuencia de aminoácidos del receptor de GnRH. Tomado y modificado de Anderson, 1996

El GnRHR-I es la forma más común de este receptor. Se pensaba que solo se presenta en mamíferos pero se ha demostrado que está presente en otros vertebrados¹⁵. En humanos, específicamente, se expresa no solo en gonadotropos sino en otros tejidos como gónadas, próstata y útero¹¹. Como mencioné el GnRHR-I, carece del dominio carboxilo terminal intracelular, esta región está asociada con la activación del receptor y su desensitización, se ha sugerido que esta propiedad confiere una resistencia a la rápida desensitización e internalización del receptor^{11,18}

Los gonadotropos

Los gonadotropos son las células hipofisarias receptoras del GnRH y el objeto de estudio del presente trabajo. Se diferencian en el día 17.5 del desarrollo embrionario

en ratones, son de las últimas células endócrinas en diferenciarse¹⁹. En el adulto, conforman del 7-15% total de la población celular endócrina en la adenohipófisis²⁰.

Son células de tamaño medio (10-20 μm) con una forma ovalada y un núcleo prominente. Observaciones con microscopio electrónico revelan que los gonadotropos presentan un aparato de Golgi prominente con varias vesículas conteniendo gránulos secretores. Estos gránulos secretores son electro-densos y varían en su tamaño, los más grandes miden entre 450-350 nm y lo más pequeños miden entre 250-150 nm; pueden contener una sola de las gonadotropinas (monohormonales) o ambas (bihormonales)³. Estudios inmunocitoquímicos revelan que, aproximadamente, el 70% de los gonadotropos son bihormonales, mientras que 15% es positivo solo a LH y el otro 15% a FSH; estos porcentajes varían según la condición fisiológica del organismo como el ciclo ovulatorio o la castración^{3,9,13,21}.

El estímulo de la GnRH en los gonadotropos culmina en la síntesis y secreción de 4 productos principales: la GnRH, la subunidad α y las subunidades β (FSH β y LH β). Si bien, se sabe que la secreción de FSH es constitutiva, mientras que la secreción de LH se lleva a cabo por una vía regulada; también hay estudios que demuestran que la tasa de transcripción de las subunidades β responde de manera diferencial a la pulsatilidad del GnRH^{9,10,21}. La producción de LH está favorecida por las frecuencias rápidas de GnRH (>1 pulso cada hora) mientras que la producción de FSH está favorecida por pulsos lentos (<1 pulso cada 2 o 3 horas)²².

Excitabilidad y dinámica de calcio de los gonadotropos

Las células endócrinas de la adenohipófisis son eléctricamente excitables, capaces de disparar potenciales de acción (PA). Las rutas de señalización eléctrica son posibles gracias a que estas células están equipadas con una membrana permeable y los canales iónicos dependientes de voltaje²³. En el caso de las células adenohipofisarias las señales eléctricas permiten eventos de señalización a través del ion de calcio (Ca^{2+}), estas señales pueden ser espontáneas o depender de la acción de un agonista. Cuando esto ocurre hay un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la concomitante apertura de canales iónicos^{23,24}. Esto es de suma importancia debido a que la secreción y transcripción hormonal son eventos dependientes de Ca^{2+} .

En los gonadotropos los PA que ocurren de manera espontánea producen elevaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero no evocan la secreción de gonadotropinas. Estos PA

dependen de la entrada de Ca^{2+} extracelular ya que se bloquean al remover calcio del medio extracelular o al aplicar bloqueadores de canales de calcio. Se ha observado que, en ausencia del estímulo de GnRH, los gonadotropos presentan fluctuaciones de baja amplitud en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, La literatura sugiere que la actividad espontánea mantiene a las células en un estado de respuesta cerca del umbral de secreción y además ayuda a reaprovisionar los reservorios intracelulares²³⁻²⁵.

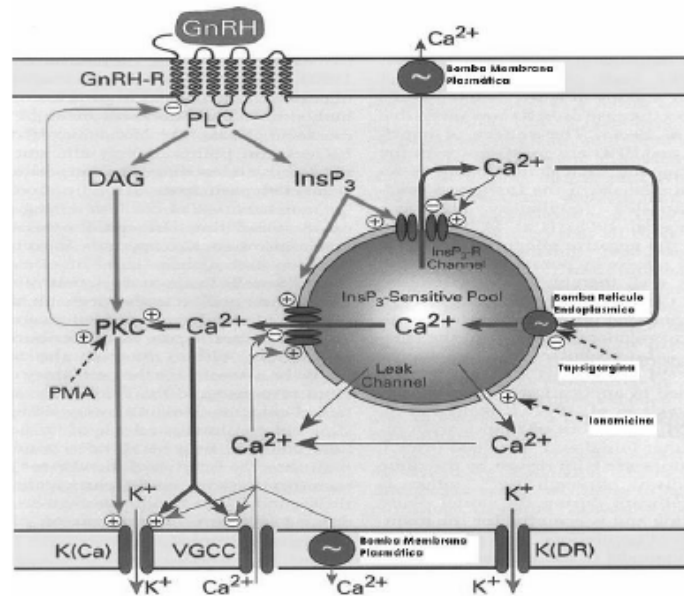


Figura 7 Representación esquemática de un gonadotropo ilustrando la dinámica de Ca^{2+} en respuesta a un estímulo de GnRH. PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; InsP_3 , inositol-1,4,5- trifosfato; PKC, proteína cinasa C; VGCC, canales de calcio dependientes de voltaje. Tomado de Jiménez Medina, 2015.

En el resto de las células endócrinas, la unión del secretagogo a su receptor de membrana produce un efecto de “potenciamiento” en la actividad espontánea, es decir, aumenta la entrada de calcio extracelular²⁴. Sin embargo, en los gonadotropos, la unión del GnRH a su receptor específico dispara un mecanismo distinto, en el que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es producto de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares^{23,24,26}

Tras la unión de la GnRH a su receptor GnRHR la subunidad α de la proteína $G_{q/11}$ se disocia y activa a la fosfolipasa C (PLC- β), lo que resulta en la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) y la producción de los segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5.trifosfato (InsP_3). Este último, se une a su receptor específico en el retículo endoplásmico (RE) y promueve la salida de Ca^{2+} de los reservorios, mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) que

reduce la despolarización mediada por la entrada de Ca^{2+} y aumenta la secreción de gonadotropinas (**Fig 7**).²⁰

Al momento del estímulo, el Ca^{2+} y el InsP_3 actúan como co-agonistas ya que cuando las señales extracelulares son lo suficientemente persistentes la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta lo suficiente como para activar receptores de InsP_3 (InsP_3R) que estén cercanos. Este mecanismo está regulado por un asa de retroalimentación negativa en la que los InsP_3R se inhiben cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, las bombas sarco-ER Ca^{2+} ATPasa (SERCA) remueven el Ca^{2+} citosólico y su concentración disminuye. En células endócrinas esta asa de retroalimentación es de efecto retardado y actúa en conjunto con el oscilador de membrana que permite la entrada de calcio del medio extracelular a través de los VGCC. Esto permite que los gonadotropos presenten respuestas de carácter oscilatorio de larga duración que mantiene la secreción de gonadotropinas (**Fig 8**)^{27,28}.

GONADOTROPO

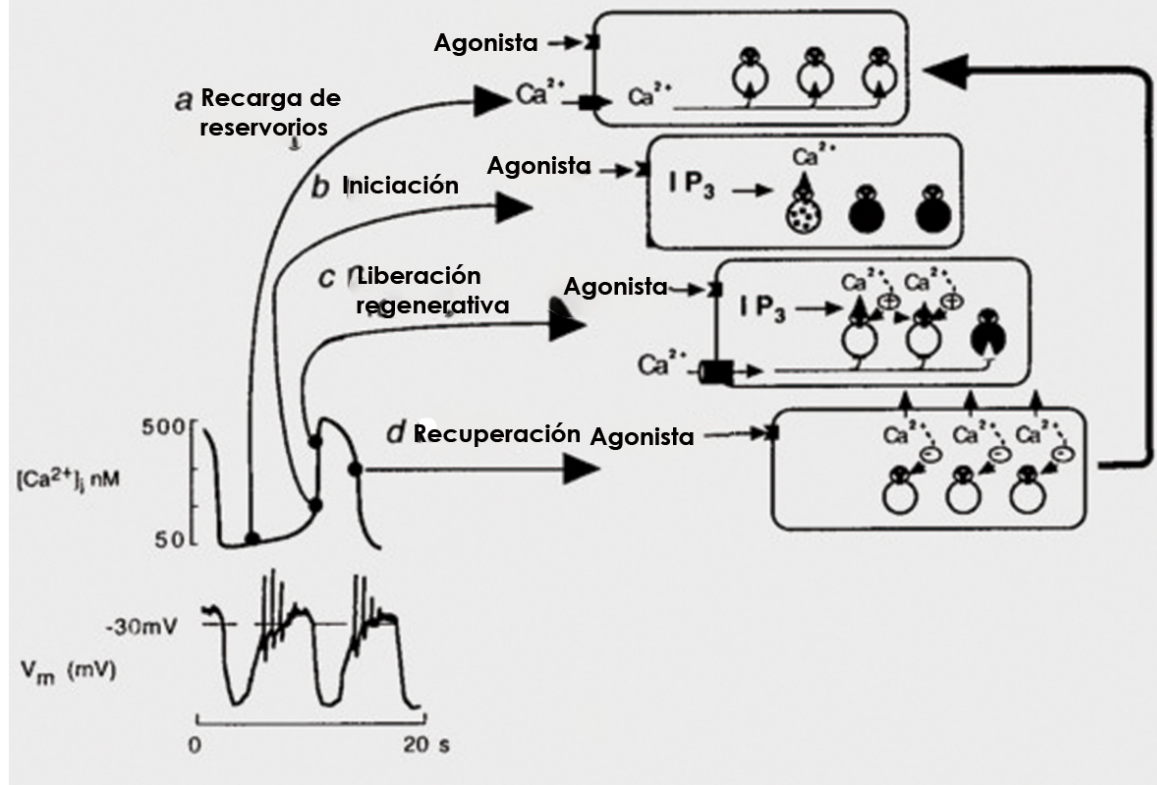


Figura 8 Mecanismo de liberación de Ca^{2+} en los gonadotropos. En los gonadotropos el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe a la liberación del mismo desde los reservorios intracelulares. El receptor de GnRH activa a la PLC, que en consecuencia activa la formación de IP_3 y DAG. El IP_3 se une a su receptor específico en el retículo endoplasmático y promueve la salida de Ca^{2+} de los reservorios. Como resultado tenemos la fase inicial de un transiente de Ca^{2+} (b). Los iones de Ca^{2+} actúan en sinergia con el IP_3 promoviendo una mayor salida de Ca^{2+} de los reservorios (c); cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es alta, se produce un asa de retroalimentación negativa, dejando de facilitar la salida del ion de los reservorios. Los canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático permanecen cerrados hasta que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye gracias a los mecanismos de despeje de Ca^{2+} (d). De esta manera, el ciclo puede comenzar de nuevo (a), lo que produce transientes de Ca^{2+} e hiperpolarizaciones de membrana repetitivas. Tomada y modificada de Kwicien & Hammond (1998)

Regulación neuroendócrina del ciclo reproductivo

El éxito reproductivo de los mamíferos depende del correcto funcionamiento del eje HHG. En hembras, el ciclo reproductivo está bajo una regulación dinámica con patrones cíclicos muy marcados en la secreción de gonadotropinas, hormonas esteroideas y la respuesta del endometrio y el tracto reproductivo a estos cambios³. Las asas de retroalimentación de este eje son complejas y presentan un patrón diferencial de secreción hormonal en las diferentes fases del ciclo¹¹.

Una vez que la GnRH es liberada del hipotálamo, estimula a los gonadotropos, los cuales secretan gonadotropinas al torrente sanguíneo, que finalmente tienen acción sobre las células de la teca y de la granulosa en los ovarios llevando a una serie de cambios fisiológicos que permiten el crecimiento de los folículos, la ovulación y la formación de cuerpos lúteos. De manera particular, la LH estimula la producción de andrógenos en las células de la teca que rodean los folículos en el ovario; en las últimas fases del crecimiento folicular la LH promueve la producción de progesterona en las células de la granulosa. Por su parte, la FSH se une a su receptor en las células de la granulosa, que estimulan la expresión de enzimas aromatasas que catalizan el paso de los andrógenos tecales a estradiol¹¹. El aumento en la concentración de estradiol ejerce una asa de retroalimentación negativa en el hipotálamo, que aumenta la amplitud y disminuye la frecuencia de los pulsos de GnRH, que como ya mencioné influye directamente en la producción de las gonadotropinas. Por ende, la producción de LH se ve favorecida, mientras que la de FSH decrece. Esto da como resultado el pico hormonal de LH observado al final de la fase folicular, el cual promueve la ovulación²⁹.

En especies de mamíferos con ovulación espontánea el ciclo ovulatorio se caracteriza por una secreción relativamente baja de LH y FSH la cual se ve interrumpida, cada 4-5 días en roedores y cada 28 días en humanos y primates, por una secreción masiva de gonadotropinas que permite la ovulación¹²

El ciclo estral

En los roedores el ciclo reproductor recibe el nombre de ciclo estral y tiene una duración de entre 4-5 días. Estos animales ovulan espontáneamente y son considerados poliéstricos²⁹.

El ciclo estral se conforma de 4 etapas características: proestro, estro metaestro y diestro. Cada una de estas etapas tiene correspondencia con determinados eventos hormonales durante el ciclo y son fácilmente identificables mediante un frotis vaginal (Fig 9)

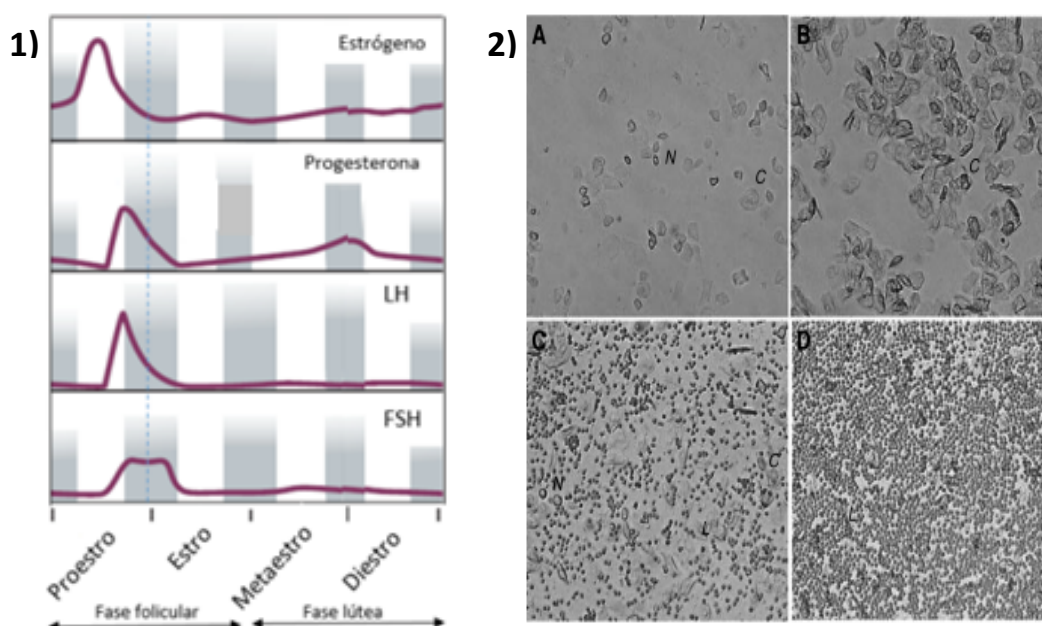


Figura 9 Niveles hormonales durante el ciclo estral y citologías vaginales. 1) En la fase folicular se observa un aumento de FSH que promueve el crecimiento de los folículos, al mismo tiempo se ve un aumento en la concentración de estrógenos. Este aumento de la concentración de estrógenos ejerce un asa de retroalimentación positiva sobre los gonadotropos al final de la fase folicular, lo que favorece el aumento en la concentración de LH que es preciso para la ovulación. En la fase lútea, se observa un aumento en la concentración de progesterona, que no es muy pronunciado debido a que, en roedores, la vida media de los cuerpos lúteos es mucho menor en comparación con los humanos. La línea punteada azul marca el momento de la ovulación. 2A) En el proestro se observan células epiteliales individuales o agrupadas, 2B) durante el estro se observan grupos de células epiteliales cornificadas y sin núcleo visible, 2C) el metaestro se caracteriza por la presencia de células epiteliales cornificadas y leucocitos, por último, 2D) el diestro se caracteriza por la presencia de leucocitos. Tomadas y modificadas de Romero Mota, 2019 y Caglioni 2009.

El proestro corresponde a la etapa preovulatoria, durante esta fase se observan folículos grandes en el ovario y una alta concentración de estradiol. Como ya mencioné el estradiol ejerce un asa de retroalimentación negativa en el hipotálamo que resulta en el pico de LH, característico de esta fase³⁰.

El estro se caracteriza por una caída rápida en la concentración de estradiol y de gonadotropinas. El pico de LH que se produjo durante el proestro promueve la ruptura folicular y con ello la ovulación²⁹. En el ovario se observa la formación de cuerpos lúteos que secretan progesterona³⁰.

En el metaestro la concentración de estrógenos permanece baja con respecto a la concentración observada en proestro. Esta etapa corresponde a la activación de cuerpos lúteos por lo que la hormona que destaca es la progesterona, secretada por las células luteales. Sin embargo, el periodo de vida de los cuerpos lúteos, en caso de no haber gestación, es muy corto en roedores^{11,29,30}.

Por último, en el diestro la concentración de progesterona, en caso de no haber gestación, comienza a disminuir y la concentración de estrógenos comienza a aumentar nuevamente, dando pauta al inicio de un nuevo ciclo^{29,30}.

ANTECEDENTES

Los cambios y la funcionalidad de los patrones de movilización de calcio intracelular ante la aplicación de GnRH

La caracterización de los patrones de movilización de Ca^{2+} ante la aplicación de dosis crecientes de GnRH ha sido estudiada en gonadotropos *in vitro*. Diversos estudios demuestran que existe una progresión estereotipada en las respuestas de calcio a concentraciones crecientes de GnRH (respuesta canónica)^{28,31}. En modelos *in vitro*, a concentraciones subfisiológicas [<0.1 nM] se presentan respuestas subumbrales, en concentraciones fisiológicas [0.1-10 nM] se presentan respuestas oscilatorias y en concentraciones elevadas [50-100 nM] se presentan respuestas bifásicas, se reporta que de los gonadotropos que responden a estas concentraciones el 50% tiene una respuesta bifásica de carácter oscilatorio y el otro 50% una respuesta bifásica no oscilatoria y de baja amplitud²⁸ (**Fig 10**).

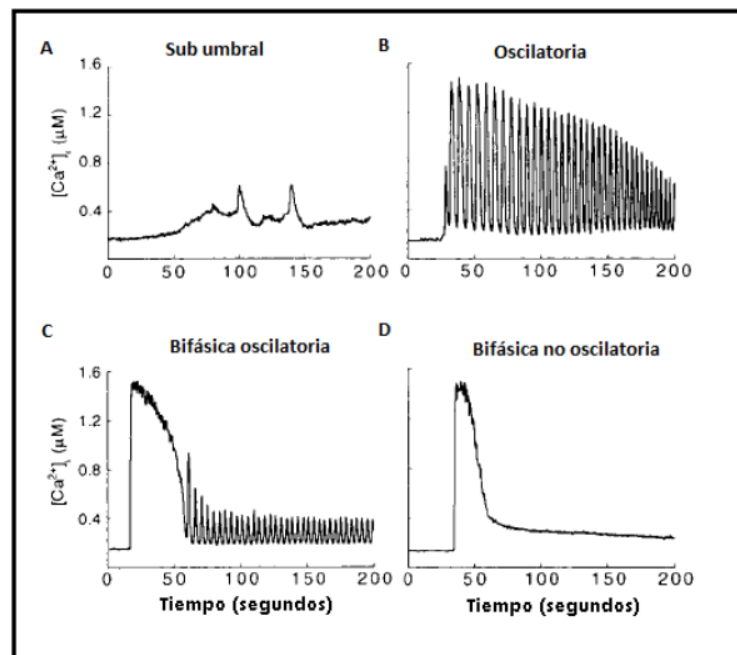


Figura 10 Patrones de Ca^{2+} observado en gonadotropos *in vitro*. Estudios en cultivo celular muestran una respuesta progresiva estereotipada en respuesta a diferentes concentraciones de GnRH. (A) la respuesta subumbral se observa a concentraciones <0.1 nM, (B) la respuesta oscilatoria se observa a concentraciones entre 0.1 – 10 nM. A concentraciones entre (50 -100 nM) se observa respuesta de tipo bifásico, se ha observado que los gonadotropos que presentan este tipo de respuesta el 50% presenta respuesta bifásica oscilatoria (C) y el otro 50% presenta bifásica no oscilatoria (D). Tomada de Jiménez Medina, 2015.

Debido a estos antecedentes, la pregunta sobre la funcionalidad de estos patrones sigue vigente. Por ello, los autores Leong y Thorner (1991) llevaron a cabo un estudio en el que se compararon los patrones de respuestas y la secreción entre gonadotropos *in vitro* de ratas en proestro y metatestro. En este estudio se propone que las respuestas constituyen un código de señalización para la exocitosis de LH^{18,32}.

En este estudio se demostró también que con un incremento de la concentración de GnRH aumentaba también el porcentaje de gonadotropos responsivos y que en el metaestro este aumento se daba de forma gradual. Por otra parte, se observó que en el proestro este incremento era mucho más rápido debido a la sensibilidad de las células. Sin embargo, a pesar del aumento en el número de células responsivas en el metaestro no había aumentos en la secreción de LH, pero en el proestro sí ³²(Fig. 11).

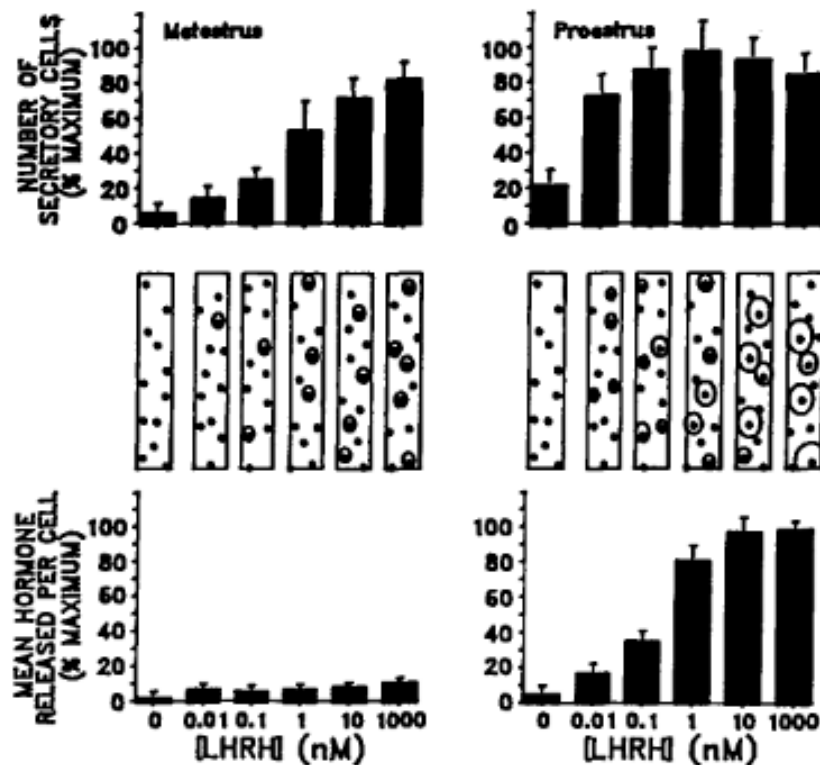


Figura 12 Efecto de la concentración de GnRH sobre el porcentaje de gonadotropos responsivos y secreción de LH. A) Para ambas condiciones se demostró que el porcentaje de gonadotropos responsivos aumentaba con el incremento en la concentración de GnRH. B) En contraste, la secreción de LH no mostró este aumento progresivo en ambas condiciones. Tomado de Leong y Thorner, 1991

También se documentó que con este aumento de concentración en el GnRH las células con respuesta bifásica aumentaban y las que tenían una respuesta oscilatoria disminuían. Además, se percataron de que aquellas con una respuesta bifásica eran las que presentaban secreción de LH, por lo que asociaron este patrón de respuesta con la secreción de LH y al oscilatorio con la síntesis de subunidades β y del GnRHR³². Sin embargo, se ha demostrado que las respuestas oscilatorias disparan la exocitosis y que cualquiera de estos patrones puede desencadenar la secreción de LH^{9,28}.

Por lo tanto, es razonable asumir que los diferentes patrones de Ca^{2+} observados con el incremento de concentración de GnRH tienen como consecuencia final un incremento dosis-dependiente en la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, este estudio no explica por completo la respuesta de los gonadotropos debido a que la mayoría presenta una respuesta canónica. Además, cuando se aplica la misma dosis de GnRH en repetidas ocasiones los gonadotropos responden con latencia y patrones similares consistentemente⁹.

Contexto Tisular

La mayoría de los estudios en torno a la caracterización de la respuesta de células endócrinas a estímulos fisiológicos se han realizado en cultivo (*in vitro*). Sin embargo, se ha descrito que estas células tienen un arreglo tridimensional formando redes homo y heterotípicas. Esto facilita la coordinación de miles de células para lograr fenómenos como el pico hormonal de LH necesario para la ovulación^{9,19}. A pesar de que los estudios *in vitro* son valiosos para entender ciertos aspectos del comportamiento de estas células, no permiten el estudio integral de las mismas ya que conllevan una disrupción en las interacciones biofísicas y bioquímicas que son esenciales para la organización *in vivo* en el tejido. Debido a dificultades metodológicas, no fue hasta a los recientes que distintos grupos de trabajo han tomado acción para estudiar la actividad endócrina en el contexto tisular⁹.

En el caso de los gonadotropos, se han realizado estudios con preparaciones organotípicas que confirman la plasticidad poblacional de acuerdo a la demanda fisiológica^{33,34}. En diferentes estadios fisiológicos los gonadotropos muestran cambios de distribución en la glándula y cambios en respuesta a estímulos con GnRH, esto podría representar una adaptación para responder eficientemente a distintas condiciones^{9,33}. Otros estudios han utilizado rebanadas de tejido de ratón

macho y la imagenología de Ca^{2+} para demostrar que bajo este contexto los gonadotropos no presentan la misma respuesta progresiva ante dosis crecientes de GnRH^{9,34}.

Dichos estudios demuestran que alrededor del 55% de los gonadotropos presentan una respuesta a la que se le denomina no canónica, en donde la progresión típica observada *in vitro* no se aprecia; mientras que el 3.6% de los gonadotropos presenta una respuesta transitoria a la que se le denomina atípica^{34,35}. Además, también indican que no hay un número constante de gonadotropos que responda a GnRH, pero hay un número creciente de células responsivas conforme la concentración de GnRH aumenta; también, la respuesta ante el GnRH varía considerablemente de una célula a otra. Por otra parte, este porcentaje varía en preparaciones tisulares de ratones machos a los 15 y 45 días de castración, lo que sugiere que estos patrones de respuesta están modulados por factores parácrinos y sistémicos; lo que demuestra nuevamente la plasticidad de esta población celular a los requerimientos fisiológicos.^{9,31,34,35}

Redes endócrinas y vasculatura

Las células endócrinas forman redes tridimensionales que pueden ser homotípicas, conformadas por células del mismo grupo endócrino, o heterotípicas, conformadas por distintos grupos endócrinos y células no endócrinas. Estas redes facilitan y promueven la coordinación de miles de células que responden a diferentes factores y permiten una adecuada secreción hormonal.

La generación de un pulso hormonal no solo representa una fuerte demanda energética para miles de células, sino que también implica la entrada coordinada y precisa de una gran cantidad de hormona al torrente sanguíneo. Por este motivo, no es difícil suponer que la vasculatura también esté implicada en la organización de la glándula y que su relación con las redes celulares sea indispensable para la hipófisis. Se ha demostrado que existe una relación espacio-temporal entre la actividad endócrina y cambios en el flujo sanguíneo, que permite el reaprovisionamiento energético y el coordinado paso de la hormona al torrente sanguíneo^{36,37}.

Diversos estudios demuestran que existe una estrecha relación entre la vasculatura y las células endócrinas hipofisarias. Más interesante aún, la relación de cada eje neuroendocrino con la vasculatura es diferente³⁸. De manera particular, en el adulto,

los somatotropos se encuentran próximos a la vasculatura en cúmulos o bien en hileras de células. En contraste, los lactotropos se encuentran dispuestos en una posición que asemeja un panal. Los corticotropos presentan citonemas que los mantiene en contacto con el espacio perivascular. Mientras que los gonadotropos se encuentran íntimamente ligados a la vasculatura, forman cúmulos, y también se ha demostrado que presentan protrusiones similares a la de los corticotropos para mantenerse en contacto con la vasculatura durante fases claves del ciclo reproductivo como el diestro y el proestro (**Fig 12**). El hecho de que cada grupo celular endócrino tenga un arreglo específico en relación a la vasculatura, probablemente tenga una consecuencia directa en los niveles y la temporalidad en la que las hormonas son secretadas^{33,36,39}.

Las redes homotípicas son de relevancia funcional ya que integran, amplifican y propagan las señales que provienen del hipotálamo³⁸. Por ejemplo, estudios realizados con imagenología de calcio en rebanadas de tejido hipofisiario de ratón demuestran que los somatotropos responden a los estímulos de GHRH con un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de carácter oscilatorio y una coordinación temporal, lo cual permite secretar en grandes cantidades de manera precisa^{37,38}. Por su parte, en la red de lactotropos, durante la lactancia, se presenta una proliferación e hipertrofia celular que permite responder al incremento en la demanda de secreción de PRL. Además, una vez que cesa el estímulo de la lactancia, los cambios en la red se mantienen y mejora en términos de conectividad de manera experiencia-dependiente^{38,40}

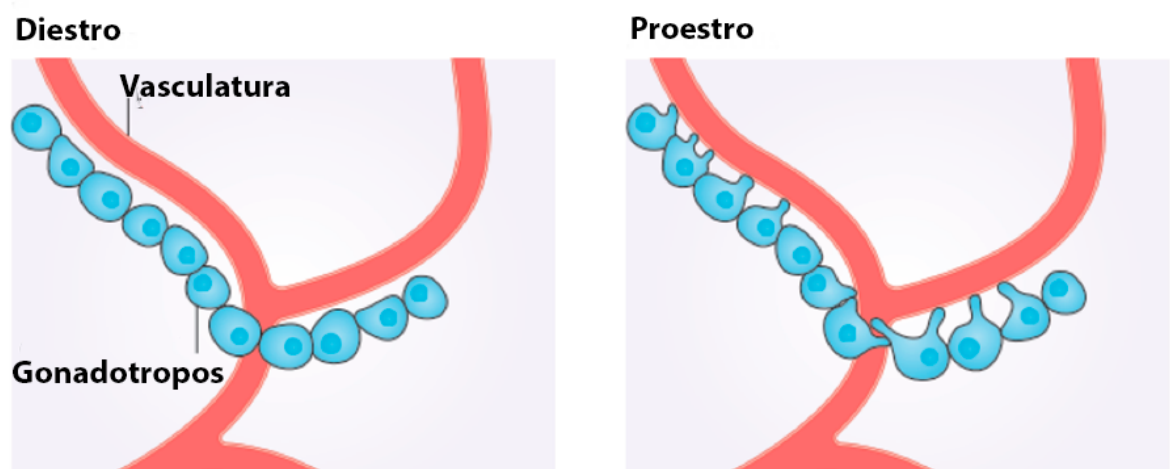


Figura 12 Cambios en la relación de los gonadotropos con la vasculatura de acuerdo al ciclo estral. Las células endócrinas forman redes con un arreglo tridimensional y se relacionan de manera distintiva con la vasculatura. Esta relación se altera según el estatus fisiológico. En el caso de lo gonadotropos se observa que forman hileras que se alinean con los capilares y hacen contacto directo con ellos a través de protrusiones en el proestro. Tomado de Le Tissier, et. al., 2017

Por otro lado, también se sabe que las redes homotípicas pueden interactuar entre ellas. La comunicación entre las células endócrinas de diferentes tipos, así como su interacción con células no-endócrinas como las células folículo estrelladas, puede modificar la producción hormonal y facilitar la comunicación entre células endócrinas³⁸. Aunado a lo anterior, estudios recientes afirman que la pérdida de un tipo específico de célula endocrina tiene influencia en la organización de las demás redes. Por ejemplo, se ha observado que la población de gonadotropos presenta hiperproliferación e hipotrofia tras la alteración de la diferenciación de corticotropos en ratones transgénicos^{38,41}. También se ha discutido la importancia de la relación entre gonadotropos y lactotropos debido a que el desarrollo y organización espacial de los lactotropos se afecta tras la ablación de la población de gonadotropos³⁹.

Tanto las redes homotípicas y heterotípicas, así como la interacción entre ellas, y su relación con la vasculatura podría proporcionarle robustez y conectividad a la glándula que permitiese una correcta comunicación y coordinación espacio-temporal de la actividad de todos sus componentes para asegurar la generación de pulsos hormonales y la correcta respuesta ante cambios en la demanda fisiológica^{38,39,42}.

Organización funcional de gonadotropos

La mayoría de estudios sobre el comportamiento de células endócrinas para la formación de pulsos hormonales dentro del contexto tisular se ha realizado en somatotropos y lactotropos^{37-40,42}. No obstante, de manera reciente, un estudio exploró la regionalización de los patrones de Ca^{2+} en preparaciones tisulares de ratón macho. De esta manera, se confirmó que existe una regionalización funcional en los gonadotropos y así como la respuesta con patrones de Ca^{2+} similares tienden a formar grupos anatómicamente cercanos delimitados por la vasculatura. También, se observó que todos los patrones de Ca^{2+} se presentan con una sola dosis de GnRH ([10 nM]). Además, este mismo estudio exploró la organización de las células en un arreglo tridimensional utilizando rebanadas tisulares y encontró diferencias principalmente entre la región ventral y la dorsal. El hecho de que se puedan generar distintos patrones a una sola dosis de GnRH aunado a la organización y sincronización de las células, podría otorgarle a la glándula cierta robustez y plasticidad, que resulte ventajosa para satisfacer las necesidades del organismo al generar un pulso de LH y FSH, mientras se produce más hormona para el siguiente pulso^{34,35}.

En hembras, la ovulación es un evento cíclico que representa una demanda fisiológica y que es dependiente de un pico hormonal de LH. Dados los antecedentes observados en otras redes endócrinas y el hecho de que probablemente los diferentes patrones de calcio codifiquen para diferentes acciones en la célula es razonable asumir que, durante las diferentes fases del ciclo reproductivo, se observen diferentes patrones de organización en la red de gonadotropos. Así pues, es posible pensar que durante el proestro, la fase donde se presenta el pulso de LH, la red de gonadotropos presente una mayor sincronización temporal y de patrones de respuesta de Ca^{2+} para lograr dicho fenómeno; mientras que durante condiciones hormonalmente estables y sin picos, como el diestro la sincronía se encuentre disminuida.

HIPÓTESIS

Dada la demanda fisiológica que el proestro representa, tanto en la región ventral como dorsal de la hipófisis, se observarán un mayor número de gonadotropos con actividad espontánea y que responden a un estímulo de GnRH (10 nM). Se espera que haya un índice de correlación mayor de la actividad de calcio intracelular en éstas células en el proestro en comparación con el diestro.

OBJETIVO

Caracterizar las diferencias en la dinámica de Ca^{2+} intracelular en las regiones ventral y dorsal de la hipófisis de ratón hembra durante el proestro y el diestro.

Objetivos particulares

- Registrar *ex vivo* la actividad intracelular de Ca^{2+} de los gonadotropos, de la región ventral y dorsal de la hipófisis ante la exposición a GnRH, de ratones hembra Balb/C durante el proestro y diestro.
- Determinar la proporción de gonadotropos, que responden a GnRH, de ratones hembra Balb/C durante el proestro y diestro.
- Determinar la proporción de patrones de respuesta de Ca^{2+} (transitoria, bifásica y oscilatoria) de los gonadotropos, en la región ventral y dorsal de la hipófisis en ratones hembra Balb/C durante el proestro y diestro.
- Evaluar la similitud en la respuesta de Ca^{2+} intracelular por medio de la obtención de un coeficiente de correlación.
- Comparar los resultados obtenidos entre el proestro y diestro para ambas regiones.

MÉTODO

Animales

Se emplearon 12 ratones hembra de la cepa Balb/C de dos meses de edad. Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM, con un ciclo de luz/obscuridad 12:12, a temperatura constante (22°C) y con acceso a agua y alimento *ad libitum*. El cuidado y manejo de la reproducción de los animales se realizó en conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el protocolo aprobado por la Comisión de ética y responsabilidad científica de la Facultad de Ciencias (número PI_2019_02_17).

Determinación de la fase del ciclo estral

La fase del ciclo se determinó de acuerdo a lo propuesto por Caligioni³⁰. Se realizaron citologías vaginales diariamente durante una semana para constatar la regularidad del ciclo estral en los animales. Pasado este periodo de tiempo, se descartaron aquellos animales que no tuvieran un ciclo regular. En este caso, se trabajó con 6 animales en diestro y 6 en proestro.

Imagenología de calcio

Aquellos animales que se encontraron en proestro o diestro se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (120 mg/kg) y sacrificados por decapitación. La hipófisis fue inmediatamente extraída y embebida cuidadosamente en agar al 3% (Invitrogen; Eugene Or, USA) preparado en solución fluido cefalorraquídeo artificial (ACSF; NaCl 118 mM, KCl 3.01 mM, HEPES 1.09 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, D-(+)-glucosa 11 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 4.8 mM, pH 7.3-7.4). Una vez solidificado el cubo de agar, se colocó en una platina de vibratomo (Leica VT1000S). El recipiente del vibratomo se llenó con ACSF fría ($\cong 4^{\circ}\text{C}$). Se obtuvieron rebanadas de 130 μm de grosor y se registraron únicamente la región ventral y dorsal.

Las rebanadas correspondientes a la región ventral (RV) y dorsal (RD) se incubaron durante 30 minutos en ACSF con el sensor intensiométrico de Ca²⁺ Fluo 4-AM (Invitrogen, Eugene, OR, EUA), 22 μM , 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, EUA) y 0.2% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), en condiciones de completa obscuridad a 37°C y una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂.

Posteriormente, para el marcado de capilares, la hipófisis se incubó durante 5 minutos en ACSF y lectina *Riccinus communis* acoplada a rodamina. Esta

incubación, también se llevó a cabo en completa oscuridad a 37°C y una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂. Una vez terminada la incubación la glándula se lavó con ACSF y montada en una cámara de plexiglás previamente tratada con poly-L-lisina al 30% (Sigma, St. Louis, MO, USA) donde fueron perfundidas constantemente con ACSF, para proceder con el registro de respuesta a GnRH.

El registro de imagenología de calcio se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Leica M25 FA) equipado con un objetivo de 20x y una lámpara de mercurio como fuente de iluminación. Se empleó un filtro de excitación de 488nm y uno de emisión de 510 nm para observar la fluorescencia emitida por el Fluo 4-AM. Se obtuvieron secuencias de 600 imágenes, tomadas a 200 ms de exposición, con ayuda de una cámara CCD enfriada (CoolSnap HQ2).

Se obtuvieron tres registros: la actividad basal de las células durante un minuto al recibir perfusión constante de ACSF; la actividad de las células en respuesta a un estímulo de GnRH (10 nM) aplicado durante 30 s y por último, la actividad de las células en respuesta a un estímulo de solución de alto potasio (KCl, 140 mM) aplicado durante 30 s. Este último con el fin de verificar la viabilidad de las células al finalizar el experimento (**Fig 14**).

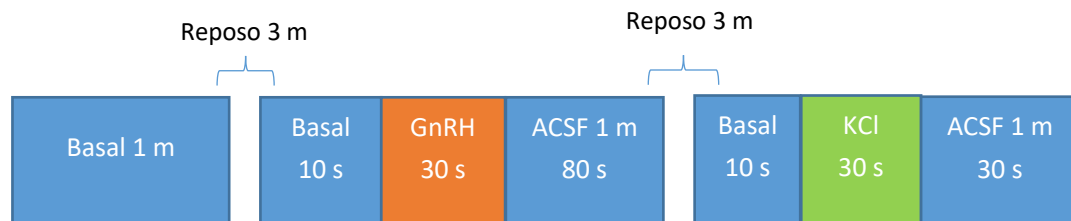


Figura 14. Protocolo de registro de la actividad de calcio intracelular. Se muestra el orden y tiempos con los que se tomaron las películas para actividad basal, estímulo con GnRH 10 nM y alto potasio (KCl).

Análisis de datos

Se utilizó el paquete de Fiji *software* de procesamiento de imágenes de ImageJ para hacer la selección de células que respondan a GnRH. A través de este programa se obtuvieron valores relativos de la intensidad de Ca²⁺ intracelular de cada célula a partir de las secuencias de imágenes capturadas en el microscopio. El cien por ciento de las células fue determinado con base en el número de células que respondieron al tratamiento con solución de alto potasio al final del experimento.

Posteriormente, con ayuda del *software* de análisis de datos Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EUA) se procesaron los datos obtenidos para graficar los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular y compensar el fotoblanqueamiento del fluoróforo. Se utilizaron rutinas generadas por el Dr. Pierre Fontanaud (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, Francia) y por el Dr.

León Islas (Facultad de Medicina, UNAM). Con las gráficas obtenidas se identificaron y contabilizaron los patrones de respuesta de los gonadotropos.

Con ayuda del software Origin Pro9 (Microcal software), se obtuvo el coeficiente de correlación entre gonadotropos de una misma agrupación y todos los gonadotropos. Los datos obtenidos serán sometidos a una ANOVA y una prueba post hoc para evaluar las diferencias entre las condiciones experimentales. Este análisis se llevó a cabo con ayuda del software Prisma 8.

RESULTADOS

Proporción de gonadotropos

Debido a que la secreción hormonal es un proceso dependiente de Ca^{2+} , la técnica de imagenología de calcio resulta útil pues nos permite observar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de cientos de células a través del tiempo, conservando el contexto tisular. Utilizando el indicador sensible a Ca^{2+} Fluo 4-AM es posible observar la respuesta de las células al estímulo hormonal al igual que la actividad basal; además, con la tinción de lectina es posible observar y estudiar el acomodo de los gonadotropos en relación con la vasculatura. En la **fig 14** observamos un ejemplo de la glándula tras haber sido incubada con Fluo 4-AM y con lectina.

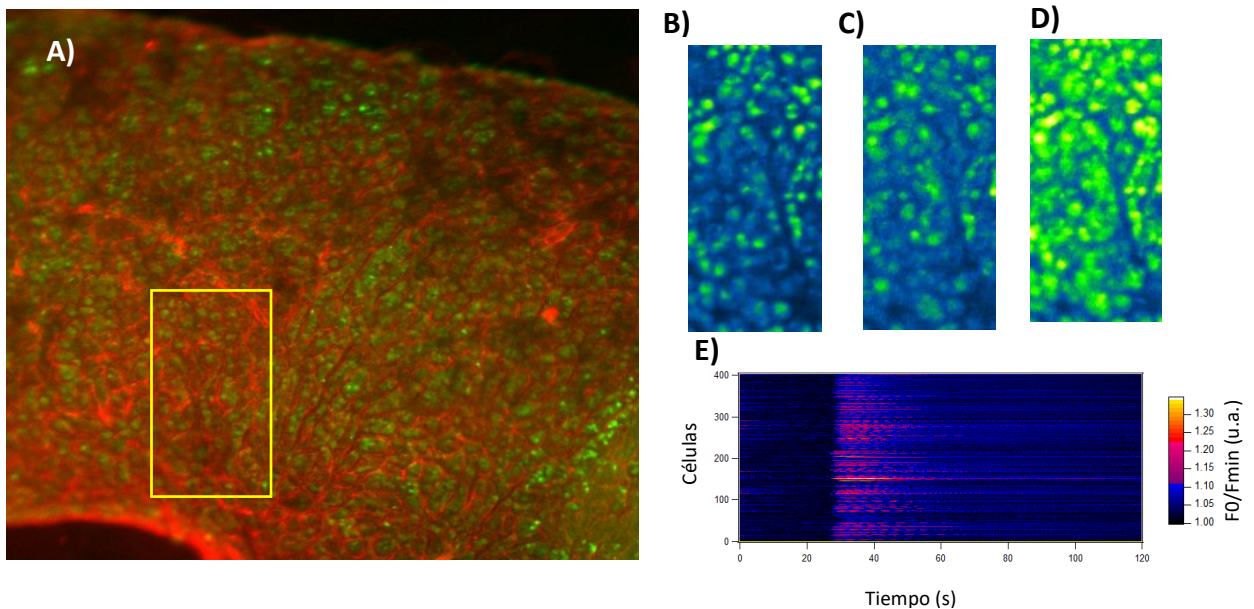


Figura 14 Imagenología de Ca^{2+} Gracias a esta técnica podemos estudiar el comportamiento de cientos de células conservando el contexto tisular y la topología. A) Se presenta la imagen de una glándula tras el protocolo de incubación con Fluo 4-AM (verde) y lectina (rojo). B) Actividad basal de los gonadotropos. C) Respuesta de los gonadotropos ante estímulo con GnRH. D) Respuesta de las células ante estímulo con alto potasio. E) Cambios en la intensidad de fluorescencia de 400 gonadotropos en respuesta a GnRH. En el segundo 30 podemos ver un aumento en la intensidad de fluorescencia; estos cambios corresponden a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Se observó que en la RV había gonadotropos agrupados cercanos a la entrada de la vasculatura, donde se encuentran los capilares de mayor calibre. Además los gonadotropos de esta región se notaban de mayor tamaño que aquellos de la RD.

Para conocer la proporción de gonadotropos responsivos se seleccionaron manualmente aquellas células que tuvieran cambios en la intensidad de fluorescencia (ΔF) en respuesta a GnRH 10 nM y fueron identificadas como gonadotropos; ya que el Fluo 4-AM es un indicador de calcio, estos cambios indican un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. La viabilidad celular fue evaluada con el estímulo de alto potasio al finalizar el experimento, para el análisis únicamente se tomaron en cuenta las células que también respondieran a este estímulo.

El porcentaje de gonadotropos responsivos se calculó tomando a las células con respuesta al estímulo de alto potasio como 100%. En términos de región se observaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) para ambas condiciones siendo que en el proestro en RV se hallaban el 57.35 ± 9.8 por ciento del total de células y en la RD el $23.46\% \pm 9.1$ por ciento del total de las células (**Fig 15A**). En el diestro también la mayoría de las células se encontraban en la RV con el 41.12 ± 9.25 por ciento del total de células mientras que en la RD tan sólo había el 15.21 ± 6.6 por ciento del total de células (**Fig 15B**). Al comparar entre proestro y diestro solo se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0028$) entre las células de la RV (**Fig 15C**).

Proporción de gonadotropos

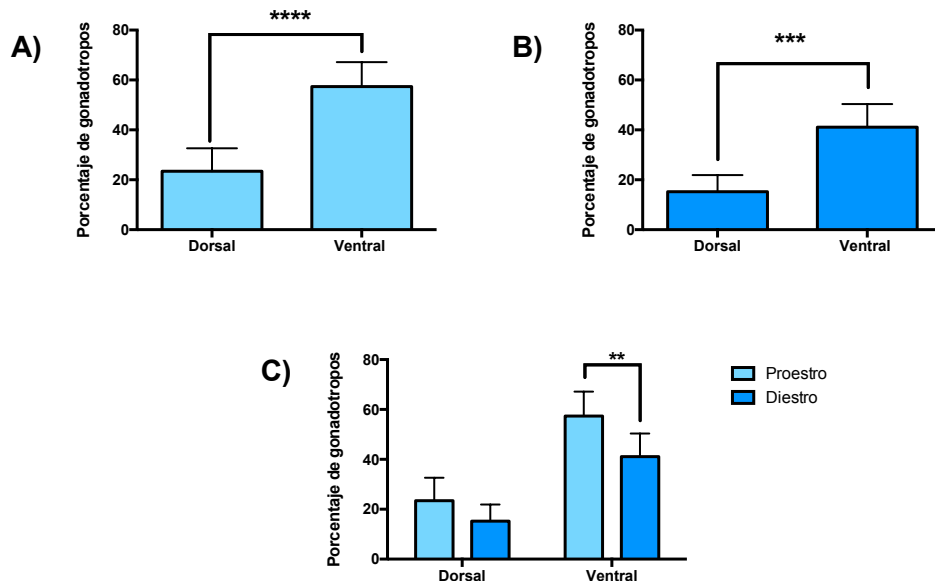


Figura 15 Proporción de gonadotropos con respecto a la condición fisiológica en las regiones dorsal y ventral. (A) Diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre la proporción de gonadotropos con respuesta a GnRH entre la región ventral y dorsal en el proestro. (B) Diferencias entre la proporción de gonadotropos con respuesta a GnRH entre la región ventral y dorsal en el diestro ($P < 0.0001$). (C) Por último, diferencias significativas en la proporción de gonadotropos observada en la región ventral entre proestro y diestro ($P = 0.0028$). Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías y pruebas post-hoc de Sidak. $n = 6$ porcentajes (\pm SD)

Actividad basal

Como mencioné en la introducción, la literatura sugiere que la actividad espontánea mantiene a las células en un estado cercano al umbral de secreción. Dado que se están evaluando dos estadios fisiológicos en el que la demanda de secreción es distinta, resulta importante evaluar si existen diferencias en cuanto a la proporción de células con actividad espontánea. Para esto, se obtuvieron registros de 300 imágenes en los que la glándula fue perfundida únicamente con ACSF; se obtuvieron gráficas como las de la **figura 16A** se utilizaron aquellas células que ya habían sido identificadas como gonadotropos en los registros de GnRH. En esta gráfica, cada línea representa una célula y nos permite ver el comportamiento poblacional en los ΔF a través del tiempo. Al mismo tiempo, de esta gráfica se pueden extraer gráficas, como la de la **figura 16B**, para observar los ΔF de manera individual. Todas aquellas células que presentaron cambios en la intensidad de fluorescencia se consideraron como células con actividad espontánea.

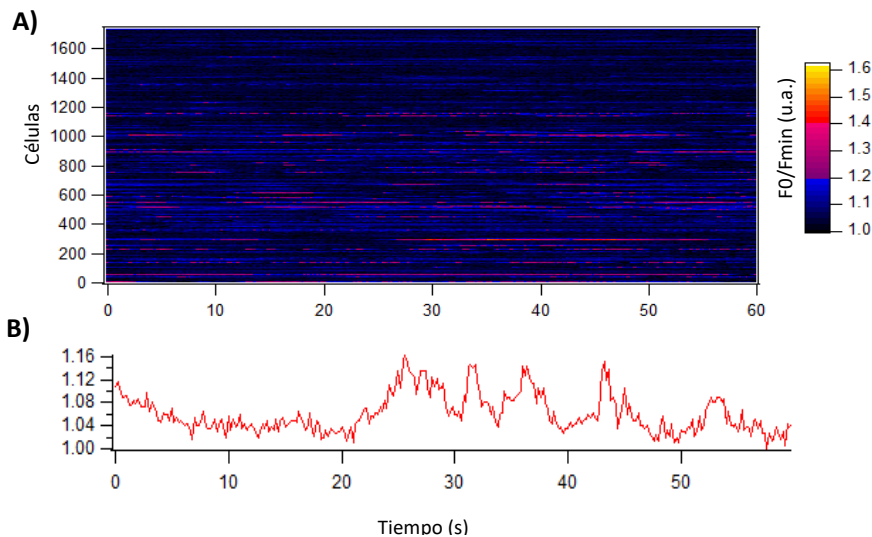


Figura 16 Gráfica multicelular y unicelular de registro de actividad espontánea. A) Gráfica multicelular en donde se representan los cambios en la intensidad de gonadotropos durante un registro de actividad espontánea. B) Gráfica representativa de la actividad espontánea de un gonadotropo.

Gonadotropos con actividad basal

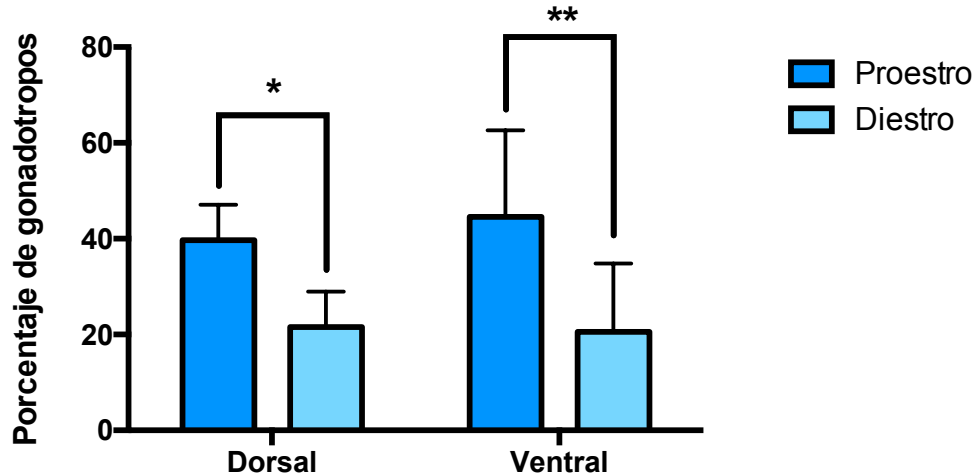


Figura 17 Porcentaje de gonadotropos con actividad espontánea. No se presentaron diferencias significativas en el número de células con actividad espontánea (AE) entre regiones. Sin embargo, sí se observan diferencias entre ambas condiciones para la dorsal ($P=0.0434$) y para la ventral ($P=0.0073$). Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías y una prueba post-hoc Sidak ($p<0.05$). $n=6$, Porcentajes (\pm SD)

En términos de región no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en términos de condición sí se observaron diferencias significativas en ambas regiones, siendo que en el proestro siempre se observó un mayor número de células con actividad espontánea. Para la RD en el proestro había un mayor número de células con AE (39.70 ± 7.3 por ciento del total de gonadotropos) a comparación del diestro (2.59 ± 7.4 por ciento del total de gonadotropos) ($P=0.0434$). Lo mismo sucede en la RV, donde el proestro hay un mayor número de células con AE (44.58 ± 18.05 por ciento del total de los gonadotropos) en comparación con el diestro (20.57 ± 14.2 por ciento del total de gonadotropos en el diestro) ($P=0.0073$) (**Fig 17**).

Patrones de respuesta

Como mencioné anteriormente, aquellas células que presentaran cambios en la ΔF en respuesta a GnRH 10 nM fueron identificadas como gonadotropos (**Fig 18**). Además, también cada célula fue graficada de manera individual haciendo posible su clasificación según sus características de latencia y frecuencia en oscilatorias, bifásicas o transitorias.

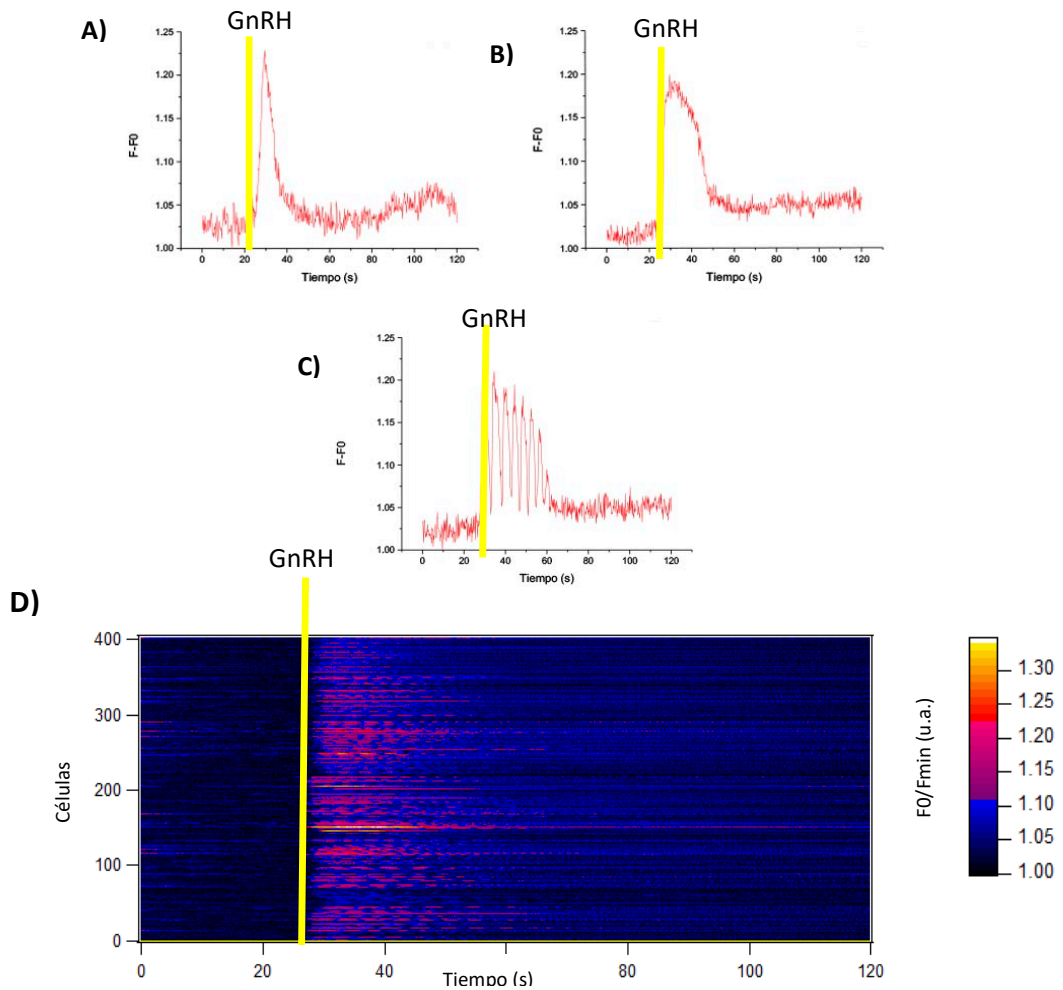


Figura 18 Patrones de respuesta de calcio intracelular de gonadotropos en respuesta a estímulo con GnRH. A) Respuesta transitoria B)Bifásica o mixta, C) Oscilatorias y D) Gráfica que muestra los cambios en la intensidad de fluorescencia de 400 gonadotropos en respuesta a GnRH. La marca amarilla muestra el tiempo de entrada de GnRH.

Para ambas condiciones y regiones se observaron los tres tipos de patrones. Los resultados se analizaron de tal forma que dentro de una misma condición se compararon las diferencias entre regiones y entre patrones. En el proestro se observaron diferencias significativas entre regiones, puesto que había un mayor porcentaje de células en la RV. Sin embargo, es interesante hacer notar que dentro de la RD no había diferencias significativas entre patrones bifásicos ($47.7\% \pm 12.6$ del total de gonadotropos) y oscilatorios ($51.1\% \pm 13.4$ del total de gonadotropos). Mientras que, en la RV había una predominancia

marcada de patrones bifásicos ($75.3\% \pm 14.4$ del total de gonadotropos) y muchas menos con patrón oscilatorio ($24.98\% \pm 14.5$ del total de gonadotropos) (**Fig 19A**). Por otro lado, en el diestro no se observaron diferencias significativas entre regiones, ni dentro de la misma región. Se mantenían porcentajes bastante similares oscilatorias ($44.2\% \pm 30.8$ en la RD; $50.08\% \pm 23.6$ en la RV) y bifásicas ($54.5\% \pm 31.6$ en la RD; $48.6\% \pm 23.6$ en la RV) (**Fig 19B**).

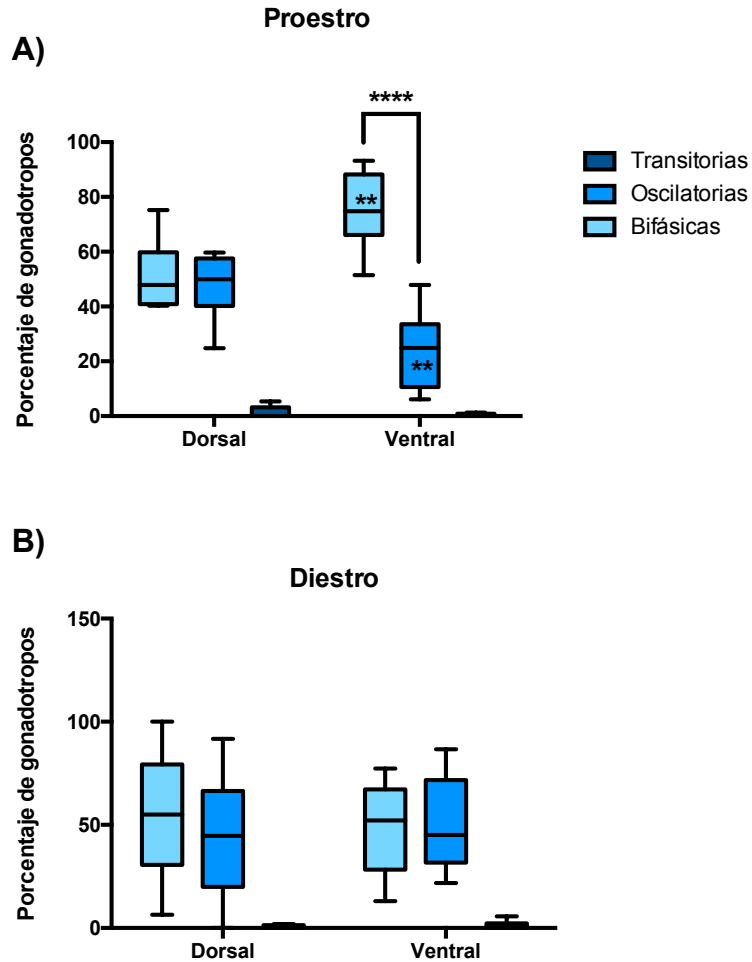


Figura 19 Diferencias en el porcentaje de patrones de respuesta de Ca^{2+} entre la región dorsal y ventral. **A)** Diferencias en la proporción para el proestro. No se observan diferencias significativas dentro de la región dorsal para los patrones bifásicos y oscilatorios. Las células con respuesta transitoria presentan un porcentaje muy bajo ($1.2\% \pm 2.3$); En la región ventral, en comparación con la dorsal, hay un mayor número de células ($p < 0.0001$). Dentro de la región ventral, se observó un mayor número de células con patrón bifásico ($p < 0.0001$), también había un bajo porcentaje de células con respuesta transitoria ($0.5\% \pm 0.4$). **B)** Diferencias en la proporción para el diestro. En diestro no se observaron diferencias significativas entre regiones, ni dentro de la misma región. Había un porcentaje muy bajo de células con respuesta transitoria tanto en la dorsal ($0.6\% \pm 0.7$) y en la ventral ($1.3\% \pm 2.09$). Los datos fueron analizados con un ANOVA de 2 vías y prueba post-hoc de Tuckey ($p < 0.05$)

Por otro lado, también se comparó entre condiciones para la misma región. En la RD no se obtuvieron diferencias significativas entre el diestro y el proestro, pero para la RV sí (**Fig 20**).

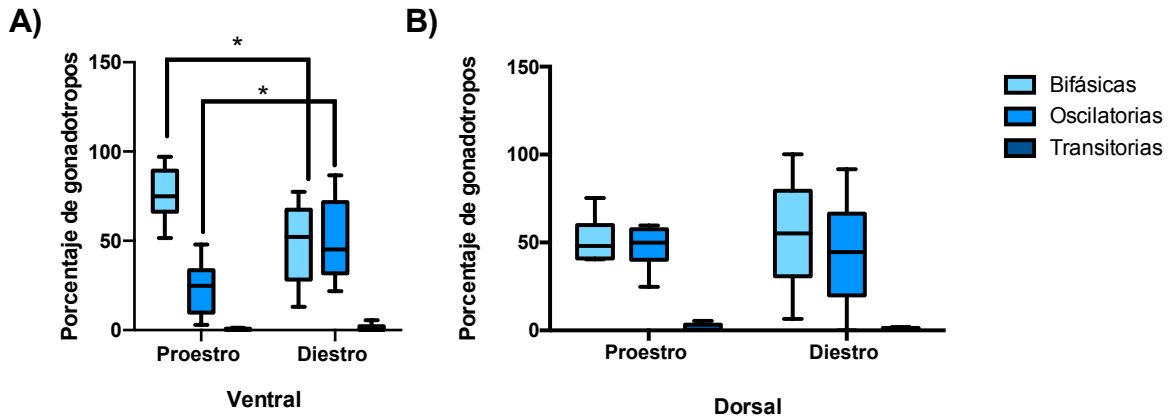


Figura 20 Porcentaje de respuesta entre condiciones por región. A) En la región ventral se observaron diferencias significativas ($p=0.001$) para los patrones bifásicos y oscilatorios. B) En la región dorsal no se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones. Los datos fueron analizados con un ANOVA de 2 vías y prueba post-hoc Tuckey ($p<0.05$)

Correlación de actividad

Para determinar si los gonadotropos presentan una mayor sincronización temporal se realizó un análisis en el que se evaluó la similitud entre los patrones de respuesta. Se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson correspondientes a los cambios en la intensidad de fluorescencia de los gonadotropos. Para ello se comparó la respuesta de cada gonadotropo en cada muestra contra el resto de gonadotropos y se obtuvo un promedio, de esta forma se obtuvo un valor de coeficiente de correlación promedio por cada muestra. Con el fin de obtener datos más precisos, únicamente se tomaron en cuenta aquellos valores que correspondieran a la respuesta a GnRH, en la **figura 21** se muestra el ejemplo de una gráfica representativa de la respuesta oscilatoria de un gonadotropo, y en amarillo se ilustra la parte de la gráfica que fue tomada en cuenta para el análisis de correlación.

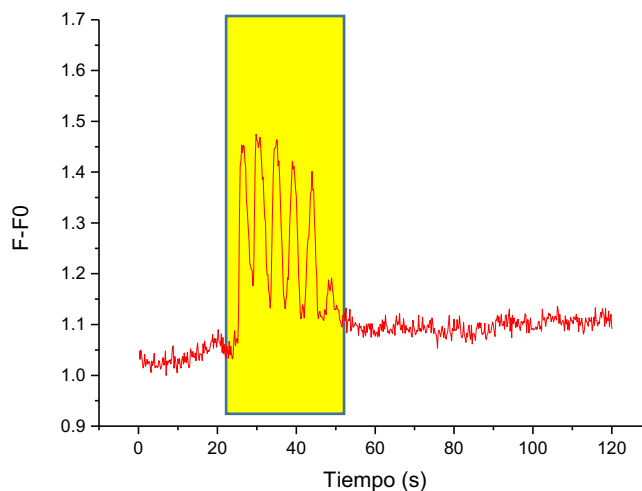


Figura 21 Sección seleccionada para el análisis de correlación. En esta gráfica de un gonadotropo con respuesta de carácter oscilatorio en amarillo se encuentra seleccionada la parte de la gráfica que fue tomada en cuenta para el análisis de correlación. Los valores correspondientes a esta selección, de todos los gonadotropos, fueron sometidos a un análisis de correlación en donde se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson.

Al comparar entre regiones para una misma condición no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, para la RV sí se observaron diferencias significativas entre el diestro y proestro ($P=0.0457$). En el proestro el índice de correlación promedio es mayor (0.64 ± 0.1) que en el diestro (0.39 ± 0.2). (**Fig 22**).

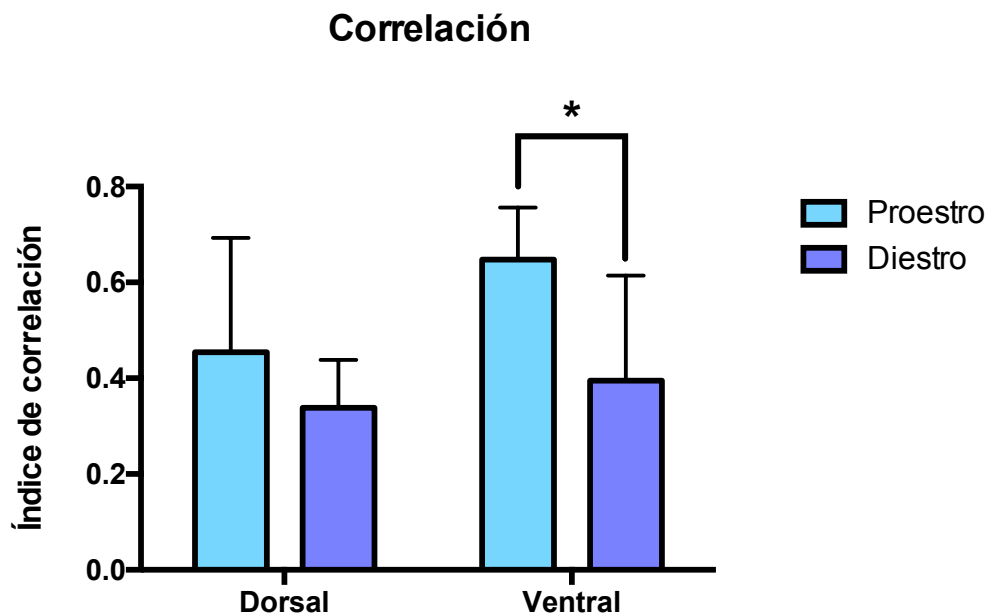


Figura 22 Índice de correlación de respuesta de Ca^{2+} Se obtuvieron índices de correlación promedio para ambas condiciones en la región dorsal y ventral. En la región dorsal no se observaron diferencias significativas (0.454 ± 0.2 en proestro y 0.33 ± 0.1 en diestro). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en la región ventral siendo que el índice de correlación es más alto durante el proestro. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías y prueba post-hoc Sidak ($P=0.0457$). Coeficiente promedio de correlación (\pm SD)

DISCUSIÓN

Proporción de gonadotropos según la fase del ciclo estral

El presente trabajo permitió caracterizar el comportamiento de los gonadotropos durante dos fases clave de la reproducción. La primera pregunta a tratar era si, en efecto, se presentaban un mayor número de gonadotropos con respuesta a GnRH durante el proestro. Los resultados de este trabajo indican un porcentaje mucho mayor de gonadotropos con respecto a lo que reporta la literatura (10 – 15%), sobre todo para la RV. No obstante, se debe tomar en cuenta que se consideraron únicamente dos regiones de la glándula, por lo que el número total considerado como el 100% de células es mucho menor que el reportado para la glándula entera. Por otra parte, en la RV se ha visto que existe una mayor concentración de gonadotropos por medio de inmunohistoquímicas^{33,41}. Así pues, es posible inferir que el porcentaje indicado es significativamente más alto al hacer la comparación entre regiones.

Por otro lado, resulta interesante que en la RV el porcentaje de gonadotropos es significativamente más alto durante el proestro. Una posible explicación es que, esta fase es precedida por altas concentraciones de estrógenos, sobre todo de E₂. Durante esta fase del ciclo el E₂ ejerce un asa de retroalimentación positiva en el hipotálamo y favorece la producción de LH^{29,43}. Algunos estudios han realizado pruebas en las que los gonadotropos son expuestos a un tratamiento de larga duración con E₂ y se observa un incremento en el número de gonadotropos que responden a GnRH^{33,44}. Por otro lado, algunos estudios correlacionan los niveles del mRNA del GnRHR con las fases del ciclo estral y se ha encontrado que los mayores niveles se observan en el diestro tardío y el proestro temprano³³. El E₂ ejerce una acción directa sobre la hipófisis aumentando la responsividad de los gonadotropos a su secretagogo al incrementar la síntesis del GnRHR y por tanto, disminuye la concentración necesaria de GnRH para producir una respuesta de Ca²⁺ que evoque la secreción²⁰.

La mayoría de estos estudios han sido realizados en cultivo, lo cual remueve por completo el contexto tisular. Con este trabajo demostramos que aún en el contexto tisular esta relación entre la sensibilidad de las células y la fase del ciclo estral se mantiene. Además, aunque harían falta inmunotinciones y un análisis más fino para comprobarlo, fue notable que las células se hallaban más próximas a la vasculatura durante el proestro.

Actividad espontánea

Para este trabajo se emplearon técnicas que nos permitieron registrar la actividad de miles de células simultáneamente manteniendo el contexto tisular. Bajo estas condiciones de trabajo, nuestros experimentos demuestran que existe un mayor número de gonadotropos con AE durante el proestro, en ambas regiones, ya que representan casi la mitad de la población de gonadotropos.

Se sabe que la AE en gonadotropos genera señales de entre 20-70 nM⁴⁵ en la $[Ca^{2+}]_i$ y que a partir de una concentración de 300 nM se observa exocitosis, sin embargo, se requiere de una concentración de 16 μ M para la secreción significativa de hormonas²⁰. Por lo tanto, este tipo de actividad no produce secreción en estas células^{24,46}. A pesar de que diversos autores han estudiado la AE y la han comparado con la actividad en respuesta a un agonista en los gonadotropos, aún no se tiene muy clara la función que cumple en estas células.

La literatura propone que la AE mantiene a los reservorios con la carga necesaria de Ca^{2+} , de tal forma que cuando se tiene un estímulo la secreción se lleve a cabo adecuadamente^{23,24,46,47}. Por lo tanto, tiene sentido que durante el proestro haya un mayor número de gonadotropos con AE, puesto que de esta forma mantienen los reservorios listos para que llegado el momento de producir el pulso preovulatorio de LH no existan deficiencias en la cascada de señalización y sea posible secretar la cantidad de hormona requerida.

Diferencias en los patrones de calcio intracelular

Se ha demostrado que con GnRH 10 nM en preparaciones tisulares de ratón macho es posible observar los tres tipos de patrones de respuesta de calcio intracelular^{34,35}. Con este trabajo observamos también los tres tipos de patrones, sin embargo, los patrones bifásicos y oscilatorios se presentaron en mayor proporción para ambas regiones y condiciones.

En el proestro se observó una mayor proporción de células con patrón bifásico en la RV. Sin embargo, en RD no se observó la predominancia de ningún patrón siendo que la proporción era casi del 50/50 entre bifásicos y oscilatorios. Al ser comparados estos resultados con los obtenidos para el diestro es muy notable que la proporción de respuestas para esta condición parece que siempre está en 50/50 para ambas regiones. Esto resulta interesante sobre todo porque en resultados obtenidos en ratones macho³⁵ se observa un cambio progresivo en el que de la RV a la RD se invierte el porcentaje de células con patrón bifásico a oscilatorio.

El significado funcional de los patrones de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ sigue siendo desconocido. Según los experimentos de Leong y Thorner, la respuesta bifásica está asociada a la secreción de LH y la oscilatoria está asociada a la producción de LH β ^{18,32}. Sin embargo, estos experimentos se realizaron en cultivo y tenían sentido ante dosis crecientes de GnRH, mientras que nuestros resultados demuestran que, en efecto, hay un mayor número de células con respuesta bifásica durante el proestro, pero no para ambas regiones. Aunado a lo anterior, durante el diestro no se encontró una mayor proporción de respuesta oscilatoria. Asimismo, también está reportado en la literatura que ambos patrones pueden provocar la secreción hormonal y que un mismo gonadotropo puede responder con patrones distintos en lapsos cortos de tiempo⁹.

Por lo tanto, basados en estos resultados, parece más bien que los patrones que exhiben las células tienen más que ver con características que les confiere el contexto tisular en determinados momentos de exigencia fisiológica, como el ciclo estral. Por ejemplo, podrían existir cambios en los mecanismos internos, como el oscilador citoplasmático, que faciliten la presencia de respuestas de tipo bifásico u oscilatorios, lo cual dependerá del contexto fisiológico (como las altas concentraciones de E₂ durante el proestro). Otro factor que podría contribuir es la vasculatura. Al respecto, se ha observado que en la hipófisis las células forman grupos cercanos delimitados por la vasculatura y que ésta también juega un papel importante durante el pulso de LH^{48,49}. Entonces, puede ser que este aumento en el porcentaje del patrón bifásico este dado por una combinación de diversos factores que se presentan en el proestro y que facilitan la coordinación y organización de los gonadotropos.

El hecho de que la predominancia de un patrón se observe únicamente en la RV podría deberse a que en esta región hay un mayor número de gonadotropos que,

además, están más cercanos a la entrada de la vasculatura. Puede ser que los factores parácrinos y autócrinos que regulan a los gonadotropos se dan diferencialmente dependiendo de la región⁷. Además, también es posible pensar que los gonadotropos de la RV y la RD contribuyen a aspectos diferentes de la secreción y producción hormonal. Lo anterior debido a que provienen de ondas de migración celular distintas, de las cuales aún no se sabe el significado funcional. Durante el desarrollo del organismo los primeros en establecerse son aquellos de la RV, los cuales forman grupos celulares que migran y forman cadenas que se extienden hacia la región central de la glándula, mientras que las células de la RD se establecen en una etapa postnatal y no se extienden a la región central.¹⁹

Por otro lado, que en hembras (ni en proestro o diestro) se presente esta inversión en la proporción de patrones bifásico a oscilatorio, como en machos, indica que la organización funcional de estas células en machos y hembra es totalmente distinta. Esto puede ser clave en el estudio de enfermedades relacionadas con hiperandrogenismo como los desórdenes ovulatorios y/o el síndrome de ovario poliquístico⁵⁰.

Correlación en la actividad celular

Se ha observado que los gonadotropos forman grupos delimitados por vasculatura y que dichos grupos presentan actividad similar y coordinada³⁵. También que los grupos celulares endócrinos tienden a formar grupos para dar respuestas coordinadas ante una demanda fisiológica^{37,49}. En este trabajo no se realizó un análisis por grupos, pero es posible pensar que dentro del contexto del proestro, en donde se presenta una demanda fisiológica mayor las células presenten una sincronización mayor que en el diestro.

En nuestros resultados confirmamos que existe un índice de correlación promedio significativamente mayor en la RV durante el proestro. En RD no se observan diferencias significativas con respecto al diestro, esto podría explicarse dado que en esta región hay un menor número de células y por lo tanto se forman menos grupos y hay mayor número de células individuales.

CONCLUSIONES

En este trabajo se muestra por primera vez la caracterización de la actividad de Ca^{2+} intracelular en gonadotropos en hembras durante proestro y diestro. Obtuvimos resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura como la proporción de gonadotropos en las diferentes fases del ciclo y la presencia de los tres tipos de patrones ante una sola dosis de GnRH.

Sin embargo, observamos que durante el proestro había un mayor número de células con AE tanto en la región ventral como en la dorsal. Lo cual podría indicar que las células se mantienen cerca del umbral de secreción y mantienen los reservorios de Ca^{2+} intracelular listos para la llegada del agonista y poder secretar adecuadamente. También observamos que en el proestro existe un mayor número de gonadotropos con respuesta bifásica en la región ventral, mientras que en la región dorsal y durante el diestro (ambas regiones) se mantiene una proporción equilibrada entre las respuesta bifásica y la oscilatoria. Adicionalmente, demostramos que estas características de regionalización y proporción de los distintos patrones está completamente diferenciada que la reportada en machos, lo que abre la puerta a nuevas investigaciones sobre enfermedades asociadas a hiperandrogenización. Por último, de acuerdo a nuestra hipótesis, hubo un mayor índice de correlación en proestro que en diestro, esto indica un mayor grado de sincronización y organización de las células. Todos estos resultados son muestra de una organización interna en la glándula que contribuye a la generación del pulso hormonal de LH y que, por lo tanto, este pulso no puede ser consecuencia únicamente de la concentración de GnRH.

Todos los resultados obtenidos con este trabajo son interesantes y abren la puerta a nuevas líneas de investigación que exploren de forma más específica la funcionalidad de los patrones de respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, los índices de correlación a nivel de nicho vascular. Además, también sería interesante realizar inmunohistoquímicas que nos permitan conocer la relación de las células con la vasculatura y su tamaño en las diferentes condiciones. Finalmente, también sería interesante medir la secreción en las diferentes regiones de la glándula para poner

a prueba la hipótesis de que las diferentes regiones contribuyen de manera diferencial a la secreción hormonal y producción de LH β .

BIBLIOGRAFÍA

1. Campbell N, Reece J, Urry L, et al. *Hormones and the Endocrine System*. Vol 450.; 2008. doi:10.1080/13602365.2014.968856
2. Norris, D. O.; Carr JA. *Vertebrate Endocrinology, 5th Edition.*; 2013.
3. S. M. *Pituitary.*; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-380926-1.10003-3
4. Zarate Treviño A, Morán Villota CE. No Title. In: *Fundamentos de Neuroendocrinología*. 1st ed. Mexico: Fondo de Cultura Económica; 1993:109-122.
5. Fink G. MEMOIR: Harris' neuroendocrine revolution: Of portal vessels and self-priming. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T13-T24. doi:10.1530/JOE-15-0130
6. Veldhuis JD, Keenan DM, Pincus SM. *Regulation of Complex Pulsatile and Rhythmic Neuroendocrine Systems: The Male Gonadal Axis as a Prototype*. Vol 181. First edit. Elsevier; 2010. doi:10.1016/S0079-6123(08)81006-0
7. Deneff C. Paracrinicity: The story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(1):1-70. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01616.x
8. Devnath S, Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):687-691. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01716.x
9. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(SEP). doi:10.3389/fendo.2013.00127
10. Thompson IR, Kaiser UB. GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;385(1-2):28-35. doi:10.1016/j.mce.2013.09.012
11. Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signalling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*. 2011;31(3):322-340. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.002.GnRH
12. Plant TM. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T41-T54. doi:10.1530/JOE-15-0113
13. Moriarty GC. Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones. *J Histochem Cytochem*. 1976;24(7):846-863. doi:10.1177/24.7.60435

14. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2018.
15. Flanagan CA, Manilall A. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor structure and GnRH binding. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8(OCT):1-14. doi:10.3389/fendo.2017.00274
16. Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol*. 2009;30(1):10-29. doi:10.1016/j.yfrne.2008.07.001
17. Chen CC, Fernald RD. GnRH and GnRH receptors: Distribution, function and evolution. *J Fish Biol*. 2008;73(5):1099-1120. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01936.x
18. Anderson L. Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod*. 1996;1(3):193-202. doi:10.1530/ror.0.0010193
19. Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(6):261-269. doi:10.1016/j.tem.2012.02.004
20. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(SEP). doi:10.3389/fendo.2013.00127
21. Edwards BS, Clay CM, Ellsworth BS, Navratil AM. Functional role of gonadotrope plasticity and network organization. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017. doi:10.3389/fendo.2017.00223
22. TSUTSUMI R, WEBSTER NJG. GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocr J*. 2009;56(6):729-737. doi:10.1507/endocrj.K09E-185
23. Stojilkovic SS, Tabak J, Bertram R. Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev*. 2010;31(6):845-915. doi:10.1210/er.2010-0005
24. Kwecien R, Hammond C. Differential management of Ca²⁺ oscillations by anterior pituitary cells: a comparative overview. *Neuroendocrinology*. 1998;68(3):135-151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733998>.
25. Li YX, Rinzel J, Vergara L, Stojilković SS. Spontaneous electrical and calcium oscillations in unstimulated pituitary gonadotrophs. *Biophys J*. 1995;69(3):785-795. doi:10.1016/S0006-3495(95)79952-0
26. Stojilković SS, Torsello A, Iida T, Rojas E, Catt KJ. Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992. doi:10.1016/0960-0760(92)90371-O

27. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.*; 2002. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
28. Tomic M, Cesnjaj M, Catt KJ, Stojilković SS. Developmental and Physiological Aspects of Ca²⁺ Signaling in Agonist-Stimulated Pituitary Gonadotrophs. *Endocrinology.* 1994;135(5):1762-1771.
29. Levine JE. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set.* Vol 2. Fourth Edi. Elsevier; 2014:1199-1257. doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0
30. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2009;(SUPPL. 48):1-8. doi:10.1002/0471142301.nsa04is48
31. Durán-Pastén ML, Fiordeliso-Coll T, Hernández-Cruz A. Castration-Induced Modifications of GnRH-Elicited [Ca²⁺]_i Signaling Patterns in Male Mouse Pituitary Gonadotrophs In Situ: Studies in the Acute Pituitary Slice Preparation1. *Biol Reprod.* 2013;88(2):1-11. doi:10.1095/biolreprod.112.103812
32. Leong DA, Thorner MO. A potential code of luteinizing hormone-releasing hormone-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem.* 1991;266(14):9016-9022.
33. Alim Z, Hartshorn C, Mai O, et al. Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology.* 2012;153(10):4729-4739. doi:10.1210/en.2012-1360
34. Sánchez-Cárdenas C, Hernández-Cruz A. GnRH-Induced [Ca]_i-signalling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices in vitro. *Neuroendocrinology.* 2010;91(3):239-255. doi:10.1159/000274493
35. Jiménez Medina JA. Organización funcional de gonadotropos de ratón macho. 2015.
36. Schaeffer M, Hodson DJ, Lafont C, Mollard P. Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *J Mol Endocrinol.* 2011;47(2). doi:10.1530/JME-11-0035
37. Lafont C, Desarmenien MG, Cassou M, et al. Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(9):4465-4470. doi:10.1073/pnas.0902599107
38. Le Tissier P, Campos P, Lafont C, Romanò N, Hodson DJ, Mollard P. An updated view of hypothalamic-vascular-pituitary unit function and plasticity. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(5):257-267. doi:10.1038/nrendo.2016.193
39. Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P.

- Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33(3):252-266. doi:10.1016/j.yfrne.2012.08.002
40. Hodson DJ, Schaeffer M, Romanò N, et al. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun.* 2012;3(May 2011). doi:10.1038/ncomms1612
 41. Budry L, Lafont C, El Yandouzi T, et al. Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(30):12515-12520. doi:10.1073/pnas.1105929108
 42. Tissier P Le, Coll TF, Mollard P. The Processes Of Anterior Pituitary Hormone Pulse Generation. *Endocrinology.* 2018;(July). doi:10.1210/en.2018-00508
 43. MESSINIS IE. Ovarian Regulators of Gonadotropin Secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;900(1):10-15. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06211.x
 44. Lloyd JM, Childs G V. Changes in the number of gnRH-receptive cells during the rat estrous cycle: Biphase effects of estradiol. *Neuroendocrinology.* 1988;48(2):138-146. doi:10.1159/000125001
 45. Van Goor F, Zivadinovic D, Martinez-Fuentes AJ, Stojilkovic SS. Dependence of pituitary hormone secretion on the pattern of spontaneous voltage-gated calcium influx. Cell type-specific action potential secretion coupling. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33840-33846. doi:10.1074/jbc.M105386200
 46. Lida T, Stojilkovic SS, Izumi S-I, Catt KJ. *Spontaneous and Agonist-Induced Calcium Oscillations in Pituitary Gonadotrophs Mechanism for Differential Activation of Ca²⁺-dependent Enzymes and Their Dependent Cellular Processes, Including Hormone Secretion. The Membrane Oscillator Is Probably Responsible for Refilling of Agonist-Sensitive Pools during and after Agonist Stimulation. (Molecular Endocrinology 5: 949-958, 1991).;* 1991.
 47. Stojilković SS, Torsello A, Lida T, Rojas E, Catt KJ. Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41(3-8):453-467. doi:10.1016/0960-0760(92)90371-O
 48. Schaeffer M, Hodson DJ, Lafont C, Mollard P. Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *J Mol Endocrinol.* 2011. doi:10.1530/JME-11-0035
 49. Hodson DJ, Romanò N, Schaeffer M, et al. Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ. *Cell Calcium.* 2012;51(3-4):222-230. doi:10.1016/j.ceca.2011.11.007
 50. Moore AM, Campbell RE. The neuroendocrine genesis of polycystic ovary syndrome: A role for arcuate nucleus GABA neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;160:106-117. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.10.002

