



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

**Cambios en la heterogeneidad de la respuesta de calcio a GnRH en  
gonadotropos de ratones macho bajo el efecto de cadmio**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Yorgui Santiago Andres**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:**

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

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Dr. Manuel Miranda Anaya, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación  
de Juriquilla, UNAM**

**CD. MX. , ENERO, 2021**



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/483/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de enero de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **SANTIAGO ANDRES YORGUI** con número de cuenta **413078751** con la tesis titulada "**Cambios en la heterogeneidad de la respuesta de calcio a GnRH en gonadotropos de ratones macho bajo el efecto de cadmio**", realizada bajo la dirección de la **DRA. TATIANA FIORELISIO COLL**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZÁLEZ GÓMEZ**  
Vocal: **DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO**  
Secretario: **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA**  
Suplente: **DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**  
Suplente: **DRA. ERIN CHRISTY MCKIERNAN**

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de diciembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>



### **Agradecimientos institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por hacer posible mi formación académica. También, a todas las personas que lo hacen posible.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido durante esta maestría (CVU 686018, número de beca 628683).

Agradezco al proyecto de investigación LANSBIODYT-UNICUA-UNAM (CONACYT) por brindar los recursos y equipos utilizados para llevar a cabo los objetivos de ésta tesis.

Fue muy grato el apoyo que recibí de parte de mi tutora principal, Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, y del comité tutor, Dr. Manuel Miranda Anaya y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, durante el desarrollo de éste proyecto, ellos fueron guiando y dando forma al mismo.

### **Agradecimientos a título personal**

Quiero agradecer a los sinodales, quienes hicieron importantes observaciones a éste proyecto.

Gracias a su ayuda pude finalizar éste escrito: Dra. Gertrudis Hortensia Gonzáles Gómez,  
Dra. Patricia Rivas Manzano, Dra. Erin Christy McKiernan, Dr. Luis Felipe Jiménez García y  
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

La Dra. Patricia Rivas Manzano, Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz y M. en C. Eva  
Mendoza Cruz me abrieron las puertas del laboratorio de Biología Tisular y Reproductiva en  
la Facultad de Ciencias y me brindaron el apoyo técnico e insumos para realizar las tinciones  
histológicas presentadas en éste trabajo. Estoy muy agradecido con ellas.

Gracias al Físico Edgar Adán Jiménez Díaz por su apoyo en la adquisición de imágenes de  
microscopía confocal en UNICUA.

**A mi padre**

Predecesor pulido de estos matorreros, ¿fui entonces el único a quién solo las cenizas quedaron en las manos? ¿Solamente mi voz dará testimonio del fracaso de la evasión? Como el indio del mito, fui tan lejos como la tierra lo permite, y cuando llegué al fin del mundo interrogué a los seres y a las cosas para encontrar su misma decepción: “Allí permaneció bañado en lágrimas, rogando y gimiendo.

Y sin embargo, no oyó ningún ruido misterioso; tampoco fue adormecido para ser transportado en sueños al templo de los animales mágicos. Ya no podía tener la menor duda: ningún poder, de nadie, le había sido concedido...”

C. L. S. (1965) *Tristes trópicos*

At present, of course, I am not the author of *The Irrational Knot*. Physiologists inform us that the substance of our bodies (and consequently of our souls) is shed and renewed at such a rate that no part of us lasts longer than eight years: I am therefore not now in any atom of me the person who wrote *The Irrational Knot* in 1880. The last of that author perished in 1888; and two of his successors have since joined the majority. Fourth of his line, I cannot be expected to take any very lively interest in the novels of my literary great-grandfather.

G. B. S. (1955). *The Irrational Knot*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS.....	15
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS.....	18
GÓNADAS .....	19
<i>Gametogénesis</i> .....	19
<i>Hormonas y retroalimentación al eje HHG</i> .....	19
NEURONAS DE GnRH.....	20
<i>Estructura y fisiología</i> .....	20
<i>GnRH</i> .....	21
GONADOTROPOS.....	21
<i>Receptor de GnRH</i> .....	22
<i>Señalización intracelular en los gonadotropos por GnRH</i> .....	23
<i>Calcio intracelular en los gonadotropos</i> .....	23
<i>Síntesis de LH y FSH</i> .....	28
<i>Secreción de LH y FSH</i> .....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
MODELO DE ESTUDIO .....	34
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS PARTICULARES .....	37
<b>MÉTODO</b> .....	<b>38</b>
ANIMALES.....	38
TRATAMIENTO CON CLORURO DE CADMIO .....	38
CALIBRACIÓN DEL SISTEMA DE PERFUSIÓN PARA LOS REGISTROS DE CALCIO INTRACELULAR .....	39
REGISTROS DE CALCIO INTRACELULAR .....	39
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LH Y FSH EN LA HIPÓFISIS .....	41
CONCENTRACIÓN DE LH Y FSH EN SANGRE .....	43
TINCIONES DE H&E EN TESTÍCULOS .....	45
ANÁLISIS DE DATOS .....	46
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
SISTEMA DE PERFUSIÓN Y OBTENCIÓN DE REGISTROS DE CALCIO INTRACELULAR.....	48
LA ACTIVIDAD BASAL DE CALCIO INTRACELULAR EN LOS GONADOTROPOS INCREMENTA DÍAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN CON CADMIO.....	51
CAMBIOS EN EL ABC E IM DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR ANTE EL EFECTO DE CADMIO .....	53
MODIFICACIONES EN EL PATRÓN DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO Y PORCENTAJE DE CÉLULAS ESTIMULADAS CON GnRH ANTE EL EFECTO DE CADMIO.....	66

LAS OSCILACIONES PROLONGADAS DE CALCIO NO SON UN MECANISMO DEL OSCILADOR DE MEMBRANA DE LOS GONADOTROPOS.....	73
LA SINCRONICIDAD DE LA RESPUESTA DE CALCIO CON GNRH EN LOS GONADOTROPOS DISMINUYE EN DÍAS POSTERIORES A LA INYECCIÓN DE CADMIO .....	76
CAMBIOS EN EL TAMAÑO DE LAS CÉLULAS Y LA CANTIDAD DE LH Y FSH QUE SINTETIZAN .....	80
MODIFICACIONES EN LA SECRECIÓN HORMONAL DE LA HIPÓFISIS POR EL TRATAMIENTO CON CADMIO .....	85
CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LOS TESTÍCULOS POR EL EFECTO DEL CADMIO .....	87
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>

## RESUMEN

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) son secretadas por los gonadotropos y regulan el sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas y por lo tanto la reproducción. La secreción de estas hormonas es estimulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sin embargo, la secreción de LH no sucede con el mismo ritmo que el de FSH y su concentración en sangre también son de diferente magnitud. El modelo de patrones de elevación de calcio como códigos, se propuso para explicar el mecanismo por el que los gonadotropos liberan la LH de forma regulada. En dicho modelo el patrón bifásico de elevación de calcio es el que permite la secreción, mientras que el oscilatorio la reduce. En este trabajo se probó dicho modelo utilizando la disrupción endocrina por cadmio, dado que se conoce que en estas condiciones la expresión del mRNA de LH aumenta, así como la del receptor de GnRH. Con esas características, se esperaba que el patrón de movilización de calcio fuera bifásico y los gonadotropos tendieran a aumentar su secreción de LH. A través del monitoreo de calcio intracelular en células vivas, así como de inmunotinciones, se caracterizó el patrón de movilización de calcio en los gonadotropos y su identificación morfológica. Además, se cuantificó la secreción de gonadotropinas en sangre y a nivel de testículos se realizaron tinciones para reconocer posibles cambios morfológicos en los mismos. Se encontró que el patrón de movilización de calcio es principalmente bifásico a los 21, 35 y 56 días después del tratamiento con cadmio. Sin embargo, la secreción de gonadotropinas no es mayor con respecto al control, por el contrario, parece disminuir. La heterogeneidad de respuesta de los gonadotropos cambia con el estado fisiológico de los organismos y no existe una dependencia lineal entre el patrón de movilización de calcio y la capacidad de secretar de éstas células.

## ABSTRACT

Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) are both secreted by gonadotrophs and they regulate the hypothalamic-pituitary-gonadal system and therefore reproduction. The secretion of these two hormones is stimulated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), however, the secretion of LH does not happen at the same rate as that of FSH and their concentrations in blood is highly different. The model of *patterns of calcium mobilization as codes* was proposed to explain how LH is released in a rhythmic manner by gonadotrophs. In this model, the biphasic pattern of intracellular calcium mobilization allows LH secretion, while the oscillatory pattern reduces its secretion. In this work, the *patterns of calcium mobilization as codes* model was tested using neuroendocrine disruption by cadmium. It has been characterized that under the effects of cadmium disruption, the expression of the LH mRNA increases, as well as that of the GnRH receptor. With these characteristics, the calcium mobilization pattern was expected to be biphasic and gonadotrophs tend to increase their LH secretion. Through the monitoring of intracellular calcium in living cells, as well as immunostaining, the pattern of calcium mobilization in gonadotrophs and its morphological state were evaluated. In addition, the secretion of gonadotropins in blood was quantified and at the testis level, histological stains were performed in order to recognize possible morphological changes and the amount of gonadotropin secretion. It was found that the calcium mobilization pattern is mainly biphasic on days 21, 35, and 56 after treatment with cadmium. However, the amount of gonadotropin secretion did not increase with respect to the control group, instead, LH secretion seems to decrease. The heterogeneity of the gonadotrophs response to GnRH changes with the physiological state of organisms and there is no linear dependence between the pattern of calcium mobilization and the ability of release LH.

## INTRODUCCIÓN

La señalización neuroendocrina es uno de los principales mecanismos mediante el que los diferentes órganos del cuerpo en los vertebrados se comunican. Los sistemas neuroendocrinos integran información interna y externa con respuestas homeostáticas en diferentes escalas temporales, desde segundos, días o por periodos más largos. Douglas y Robin (1961) propusieron un mecanismo para explicar el proceso por el que un estímulo desencadena, en última instancia, un producto secretado en el medio extracelular de la célula. A este proceso lo llamaron *acoplamiento estímulo-secreción* y fue tomado del modelo de acoplamiento excitación-contracción de Sandow sobre la fisiología del músculo (Douglas, 1968; Douglas & Rubin, 1961; Sandow, 1952). Al denominar a este proceso, no emplearon el término “excitación” y prefirieron el de “estímulo” para englobar todos los tipos de estímulos que pueden producir una respuesta secretora en las células (Douglas, 1968).

Ambos modelos, plantean que el evento de excitación desencadena siempre, en una relación uno a uno, una respuesta de contracción o secreción, según el caso. Sin embargo, un mismo estímulo, como es el caso de la acetilcolina, puede ser excitatorio o inhibitorio dependiendo del tipo celular con el que interactúe (Douglas, 1968). Además, en una gran variedad de células pueden ser liberados más de un factor con el mismo estímulo, pero con ritmos diferentes. De éste último caso, tenemos como ejemplo a los gonadotropos, que ante el estímulo de GnRH secretan tanto la hormona folículo estimulante (FSH) como la hormona luteinizante (LH), pero la frecuencia de secreción de LH es mayor que la de FSH (pulsos de LH cada 30 minutos y cada hora para FSH); mientras que la concentración de FSH secretada es mayor que la de LH (Tsutsumi & Webster, 2009).

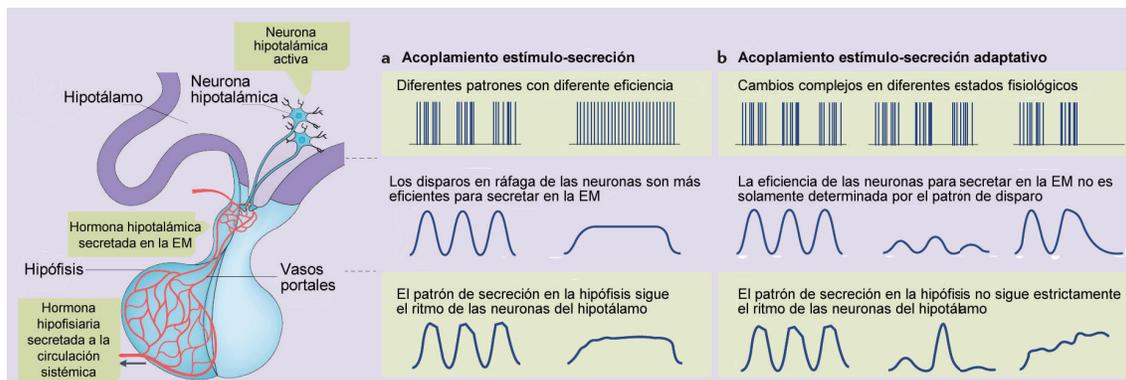
Debido a estas circunstancias se ha propuesto que el modelo de acoplamiento estímulo-secreción es adaptativo dado que puede cambiar según las condiciones fisiológicas del organismo. En el sistema hipotálamo-hipófisis se ha realizado un recuento de ésta capacidad adaptativa en las células (Le Tissier et al., 2017).

El modelo de *acoplamiento estímulo-secreción adaptativo* propone la manera en la que el sistema hipotálamo-hipófisis (HH) regula el balance en la secreción hormonal. Este modelo describe una secuencia de eventos, comenzando por el hipotálamo, en la que un grupo de neuronas liberan neuro-hormonas en la eminencia media. La despolarización a nivel del cuerpo o de las terminales nerviosas de las neuronas permite la secreción de estos factores en el plexo primario del sistema portal hipotálamo-hipofisiario (ver figura 1). Después de este primer evento de acoplamiento estímulo-secreción, las hormonas hipotalámicas llegan al plexo secundario en la hipófisis donde estimulan la secreción hormonal de los tipos celulares endócrinos hipofisarios, conformando el segundo evento de acoplamiento estímulo-secreción. El segundo evento libera las hormonas de la hipófisis a la circulación sistémica y se transportan a sus órganos o tejidos específicos formando ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (Le Tissier et al., 2017).

El acoplamiento estímulo-secreción es adaptativo debido a que existe una relación dinámica entre el hipotálamo, la vasculatura y la hipófisis. En la visión tradicional del modelo acoplamiento estímulo-secreción, la secreción en la hipófisis se encuentra estrictamente determinada por el patrón regulatorio de excitación del hipotálamo (figura 1.a). Sin embargo, no existe una relación lineal en el sistema HH dado que es plástico y la respuesta excitatoria de las neuronas, la liberación de hormonas hipotalámicas y la respuesta de la hipófisis para

secretar tienen la potencialidad de adaptarse ante diversas alteraciones en los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (figura 1.b) (Le Tissier et al., 2017).

Los gonadotropos son un ejemplo en el que el modelo de acoplamiento estímulo-secreción clásico no es suficiente para explicar la secreción de éstas células. En ratas adultas macho, alrededor de 70% de los gonadotropos son bihormonales, es decir, poseen y secretan tanto LH como FSH, 16% son monohormonales a LH y 14% son monohormonales a FSH (Childs et al., 1985; Ramaswamy & Weinbauer, 2014). En este sentido, existe en la hipófisis un mecanismo propio por el que un mismo código (GnRH) secreta preferencialmente LH y/o FSH. Se ha propuesto que el mecanismo por el que existe secreción desigual de las gonadotropinas está relacionado con el patrón de movilización de calcio intracelular que producen los gonadotropos ante el estímulo de GnRH. Este trabajo tiene por objetivo probar la existencia de ese mecanismo.



**Figura 1. Modelos de acoplamiento estímulo-secreción.** a) El modelo clásico de acoplamiento estímulo-secreción propone que la secreción de la hipófisis está determinada por el ritmo de secreción hormonal del hipotálamo. b) Mientras que el modelo de estímulo-secreción adaptativo propone que existen cambios que se dan a nivel de hipotálamo, la eminencia media y la hipófisis y que en conjunto permiten al sistema modificar de manera plástica la forma en que se secretan hormonas al resto del cuerpo. Imagen tomada y modificada de (Le Tissier et al., 2017).

## ANTECEDENTES

### **Sistema hipotálamo-hipófisis**

El hipotálamo es una región del encéfalo en el cerebro que se encuentra debajo del tálamo y se origina del diencéfalo rostral por la inducción de la placa precordal. El hipotálamo integra información somática, visceral y de comportamiento para coordinar la regulación de necesidades fisiológicas básicas en los vertebrados a través del control del sistema nervioso autónomo y de la secreción hormonal (Alvarez-Bolado et al., 2012; Burbridge et al., 2016).

Las neuronas del hipotálamo forman grupos especializados llamados núcleos que controlan la presión sanguínea, osmolaridad, temperatura del cuerpo, metabolismo, respuesta a estrés, reproducción, entre otros. En particular, las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico y las neuronas parvocelulares de los núcleos arqueado y paraventricular liberan su contenido hormonal a la hipófisis a través de la eminencia media. La hipófisis y el hipotálamo en conjunto forman un sistema neuroendocrino (Kandel, 2013).

La hipófisis es una glándula que se encuentra por debajo del hipotálamo y sobre la *silla turca* del hueso esfenoides. Ésta glándula se conforma por los lóbulos anterior y posterior que son de origen y anatomía distinta. El lóbulo posterior de la hipófisis, que tiene su origen en el infundíbulo del neuroectodermo, consta principalmente de terminales nerviosas del núcleo paraventricular y del núcleo supraóptico, donde se almacenan y secretan oxitocina y vasopresina (Patel & Tiwari, 2018). En el lóbulo anterior, derivado de la bolsa de Rathke del ectodermo oral, existen al menos cinco tipos celulares secretores: tirotropos, lactotropos, somatotropos, corticotropos y gonadotropos (Murray & Melmed, 2006). La secreción hormonal de estos cinco tipos celulares es mediada principalmente por el hipotálamo que se

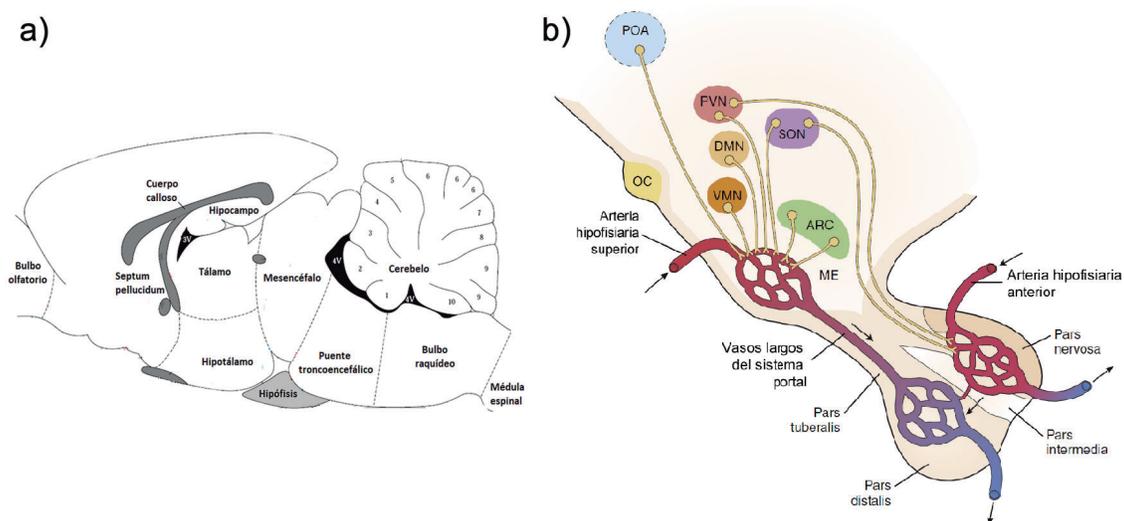
conecta a la hipófisis a través del *sistema portal hipotálamo-hipofisario* en la eminencia media (ver tabla 1).

**Tabla 1. Grupos celulares secretores de la adenohipófisis y su función.**

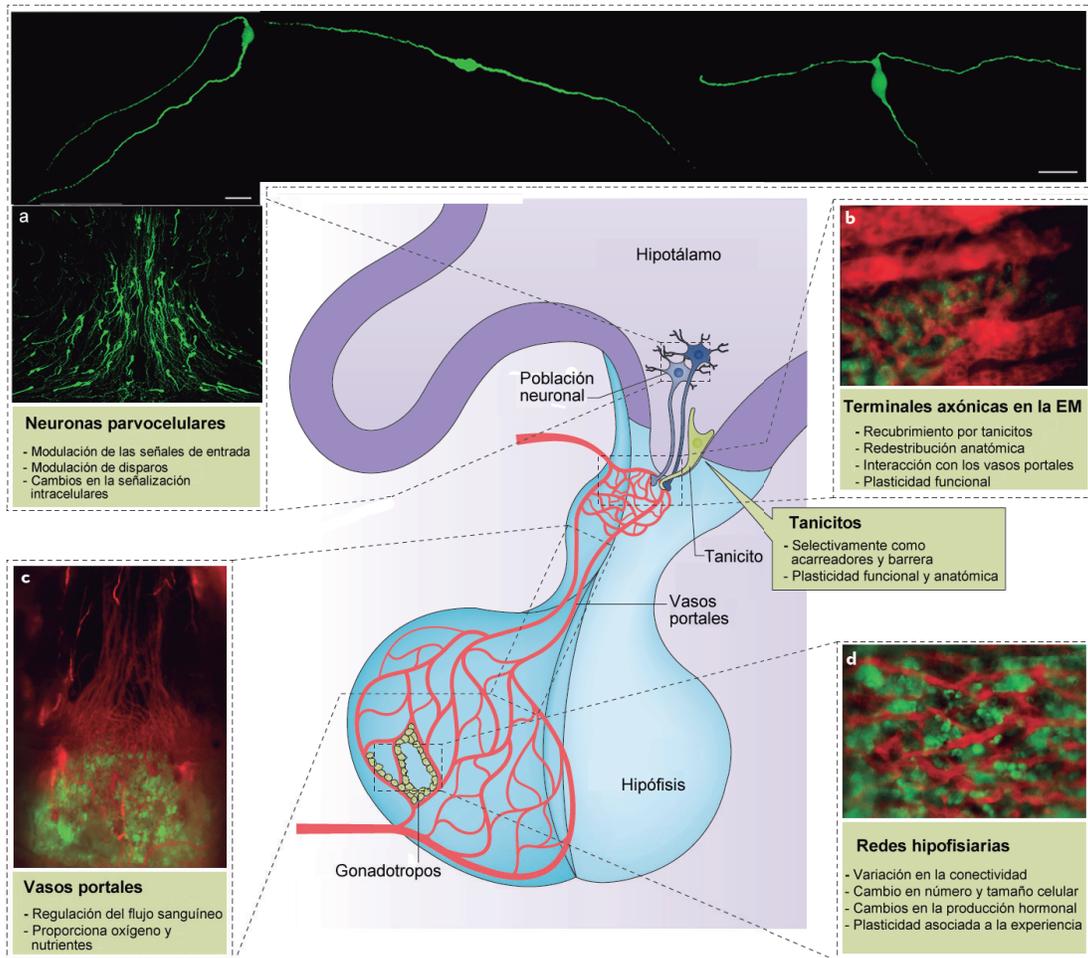
Tipo celular	Porcentaje celular en la hipófisis	Factor hipotalámico por el que es estimulado	Hormona que secreta	Órgano blanco o tejido blanco	Acción en el órgano blanco o tejido blanco
Lactotropo	15	TRH	PRL	Glándulas mamarias	Estimula la síntesis de leche.
Somatotropo	50	GHRH	GH	Músculo y huesos	Estimula la división celular, síntesis de proteínas y crecimiento de los huesos.
Corticotropo	15	CRH	ACTH	Corteza adrenal	Estimula la síntesis y secreción de corticoesteroides.
Tirotropo	5	TRH	TSH	Glándula tiroideas	Estimula la síntesis de hormonas tiroideas.
Gonadotropo	10	GnRH	FSH	Gónadas	Estimula el desarrollo de los folículos en hembras y la espermatogénesis en machos; secreción de estrógenos en hembras.
			LH	Gónadas	Estimula la síntesis de andrógenos y progesterona en hembras y la secreción de andrógenos en machos.

En el sistema portal hipotálamo-hipofisario (SPHH) las arterias hipofisarias forman por anastomosis una red de capilares fenestrados a la altura de la eminencia media y el infundíbulo conocido como plexo primario (Murray & Melmed, 2006). En el plexo primario las terminales axónicas de las neuronas del hipotálamo liberan su contenido y es conducido a la adenohipófisis (ver figura 2 y 3). Esta red de capilares converge y forma vasos largos que llegan a la adenohipófisis donde se forma una segunda red de capilares conocida como plexo secundario. El plexo secundario irriga a toda la adenohipófisis y colecta las hormonas que en ella se secretan y luego son llevadas al resto del cuerpo a través de la circulación sistémica (figura 2 y 3).

El sistema que comprende al hipotálamo y la hipófisis (SHH) es el principal mediador en la regulación de diversos procesos fisiológicos y de desarrollo en los organismos, como la reproducción, la lactancia o el crecimiento. El SHH es dinámico dado que integra información tanto del ambiente como de órganos y tejidos del organismo a través de un balance hormonal. Este balance hormonal en el sistema cambia adaptativamente dependiendo de las condiciones externas e internas del organismo (ver figura 3) y junto con los órganos o tejidos blanco forma los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (Le Tissier et al., 2017). El eje hipotálamo-hipófisis-testículos es un ejemplo de éstos ejes y regula la reproducción en los vertebrados (Le Tissier et al., 2017).



**Figura 2. Ubicación del sistema hipotálamo-hipófisis y el sistema portal hipotálamo hipofisario y su ubicación con respecto al cerebro. a)** Se muestra la disposición del hipotálamo con respecto al resto del cerebro en ratón y su relación con la hipófisis como se muestra en b). **b)** Se observan las dos arterias hipofisarias que compone el sistema portal encargado de la irrigación del hipotálamo, en la eminencia media y la hipófisis. Se ilustran las redes de capilares o plexos que forma el sistema portal en la eminencia media (plexo primario) y en la hipófisis (plexo secundario). Algunos núcleos hipotalámicos liberan sus hormonas directamente en la neurohipófisis, mientras que otros los secretan en la eminencia media y llegan a la adenohipófisis por medio del sistema portal. ARC, núcleo arcuato; DMN, núcleo dorsomedial; PVN, núcleo paraventricular; POA, área preóptica; SON, núcleo supraóptico; VMN, núcleo ventromedial; ME, eminencia media. Tomado y modificado de (Norris & Carr, 2013; Rutherford et al., 2011).



**Figura 3. El sistema hipotálamo hipófisis.** La relación entre en hipotálamo y la hipófisis es plástica y permite al sistema adaptarse a diversas condiciones fisiológicas cambiando su relación a diferentes niveles. **a)** Una gran variedad de estímulos a nivel del hipotálamo modifican el patrón de actividad en las neuronas parvocelulares (ejemplificado con las neuronas de GnRH, nótese la morfología de las neuronas con una o dos proyecciones axónicas). **b)** Los tanicitos cambian la forma en que las terminales axónicas de las neuronas interactúan con la vasculatura y, por lo tanto, la manera en que los factores hipotalámicos son secretados. **c)** Al nivel de la hipófisis, el sistema portal presenta variaciones en el flujo sanguíneo, de tal forma que cambia cuantitativamente la manera en que los factores hipotalámicos y los nutrientes llegan a la hipófisis. **d)** Las células secretoras de la hipófisis forman redes homotípicas y heterotípicas que tienen la capacidad de cambiar en su conectividad y con relación a la vasculatura de acuerdo con la demanda fisiológica. Imagen tomada y modificada de (Le Tissier et al., 2017).

### Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

La cascada hormonal que se presenta en el proceso reproductivo inicia, en primera instancia, con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH es un decapeptido

producido en el hipotálamo y liberado a la eminencia media y que a través de la circulación llega a los gonadotropos en la hipófisis donde se une al receptor de GnRH (GnRH-R). La unión de GnRH con su receptor desencadena una cascada de señalización que permite la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) así como la síntesis de nueva hormona y del propio GnRH-R. Las gonadotropinas LH y FSH estimulan la espermatogénesis, foliculogénesis y ovulación en las gónadas (Naor, 2009).

## **Gónadas**

### *Gametogénesis*

Las gonadotropinas están involucradas en diferentes procesos de la espermatogénesis que se llevan a cabo en los testículos a través de sus receptores de membrana, FSH-R y LH-R; el primero en las células de Sertoli y el segundo en las células de Leydig. En roedores la FSH es importante en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-testículos durante la pubertad al establecer la cohorte de células de Sertoli y en roedores adultos la FSH juega un papel importante en el mantenimiento del número de células germinales y su progresión por la meiosis y la formación de espermátidas. En cambio, la LH se ha asociado al progreso de las últimas etapas de la espermatogénesis dado que en ratones que no producen LH- $\beta$ , las células con mayor madurez que se observan son las espermátidas (Oduwole et al., 2018; O'Shaughnessy et al., 2010; Ramaswamy & Weinbauer, 2014).

### *Hormonas y retroalimentación al eje HHG*

La producción en los testículos de hormonas esteroideas como estrógenos, progesterona y testosterona, y hormonas peptídicas como la activina, inhibina y folistatina regulan la secreción de LH y FSH a través de asas de retroalimentación en el sistema hipotálamo-hipófisis (véase figura 4). El estradiol forma un asa de retroalimentación positiva en la hipófisis aumentando el número de receptores de GnRH en la membrana plasmática de los

gonadotropos y de ésta manera aumenta la responsividad de las células. La retroalimentación que se produce por progesterona es negativa al nivel del hipotálamo dado que disminuye la secreción de GnRH y la frecuencia en que se secreta. En la hipófisis, la progesterona aumenta la responsividad de los gonadotropos cuando se presenta por cortos periodos de tiempo, mientras que el estímulo prolongado del mismo disminuye la responsividad de los gonadotropos. Por otra parte, el efecto de la testosterona es de carácter inhibitorio en el hipotálamo porque reduce la síntesis de GnRH y su pulsatilidad de secreción. En la hipófisis la testosterona y la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona inhiben la síntesis y secreción de la LH, pero aumentan la secreción basal de la FSH. Las activinas promueven la transcripción de *Fsh- $\beta$*  y del receptor de GnRH. Por el contrario, las inhibinas disminuyen la expresión y secreción de FSH actuando como antagonistas de las activinas. Por último, la actividad de la folistatina sucede en conjunto con la de activina debido a que se une fuertemente a ella (Durán-Pastén & Fiordelisis, 2013).

## **Neuronas de GnRH**

### *Estructura y fisiología*

Las neuronas de GnRH se originan fuera del cerebro en la placoda nasal y migran hacia el hipotálamo durante el desarrollo. Una vez en el hipotálamo, las neuronas de GnRH se conectan a su red neuronal y mandan una o sus dos proyecciones dendríticas a la eminencia media donde se envuelven unas a otras (ver figura 3.a). La morfología de las neuronas GnRHergicas es peculiar debido a que sus proyecciones tienen propiedades dendro-axónicas, con características de dendrita porque reciben procesos sinápticos de otras neuronas y características de axones porque conducen potenciales de acción a las terminales nerviosas en la eminencia media (Herbison, 2016; 2018).

La red neural de GnRH, compuesta por las neuronas de GnRH más células neuronales (como las kisspeptina) y gliales que se conectan con ellas, son el principal componente a nivel cerebral en el control del inicio de la pubertad y la fertilidad en todos los mamíferos. A través de ésta interacción la liberación de GnRH a la eminencia media ocurre en modo de pulsos y no de manera continua. En ratones, cerca de 1000 neuronas GnRHergicas generan pulsos de secreción que duran alrededor de cinco minutos y suceden con una periodicidad de 30 a 120 minutos (Campos & Herbison, 2014).

### *GnRH*

La GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH<sub>2</sub>) altamente conservado en los vertebrados (Naor, 2009). Existen tres genes parálogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (*Gnrh1*, *Gnrh2* y *Gnrh3*) que se han originado evolutivamente por eventos de duplicación del genoma. El gen *Gnrh3* se ha perdido en una gran variedad de especies sin ningún patrón específico. La GnRH producida por el gen *Gnrh1* es la que tiene un papel preponderante en el control del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y en la fertilidad de los mamíferos (Naor, 2009).

### **Gonadotropos**

Los gonadotropos son células de la hipófisis que sintetizan y secretan las hormonas LH y FSH. La LH se encuentra en vesículas de alrededor de 200 nm de diámetro mientras que la FSH se almacena en vesículas de aproximadamente 500 nm. Los gonadotropos constituyen aproximadamente el 10-15% de las células de la adenohipófisis, se encuentran principalmente en la región ventral de la glándula y forman una red homotípica a través de uniones comunicantes. Además, éste tipo celular hipofisario expresa el receptor de GnRH por el que se da la regulación de la liberación de gonadotropinas (Stojilkovic et al., 2010).

### *Receptor de GnRH*

Existen dos tipos de receptor de GnRH, GnRH-R 1 y GnRH-R 2. El receptor tipo 1 es el que se expresa en los gonadotropos de los mamíferos y se caracteriza por la ausencia del carboxilo terminal en el citoplasma de las células. La ausencia del carboxilo terminal tiene como resultado que el receptor no se desensibiliza e internaliza por arrestinas. Por otro lado, el receptor de GnRH tipo 2, que se expresa por ejemplo en vertebrados pero sin ningún patrón específico, sí posee el carboxilo terminal y puede ser desensibilizado por la vía de arrestinas (Flanagan & Manilall, 2017).

Una vez que el receptor tipo 2 se une a  $\beta$ -arrestina, pierde su interacción con la proteína G y el receptor puede ser internalizado. Después, dependiendo del grado de desensibilización de los gonadotropos por GnRH, el receptor puede ser reciclado a la membrana plasmática y así la sensibilización se vuelve a reestablecer, o bien, puede ser degradado en los lisosomas. En la literatura actual se señala que el proceso de resensibilización del GnRH-R sucede en un tiempo medio de 30 minutos (McArdle et al., 1996; Naor, 2009). Se piensa que el mecanismo de secreción pulsátil de GnRH impide que se pierda la sensibilidad en los gonadotropos.

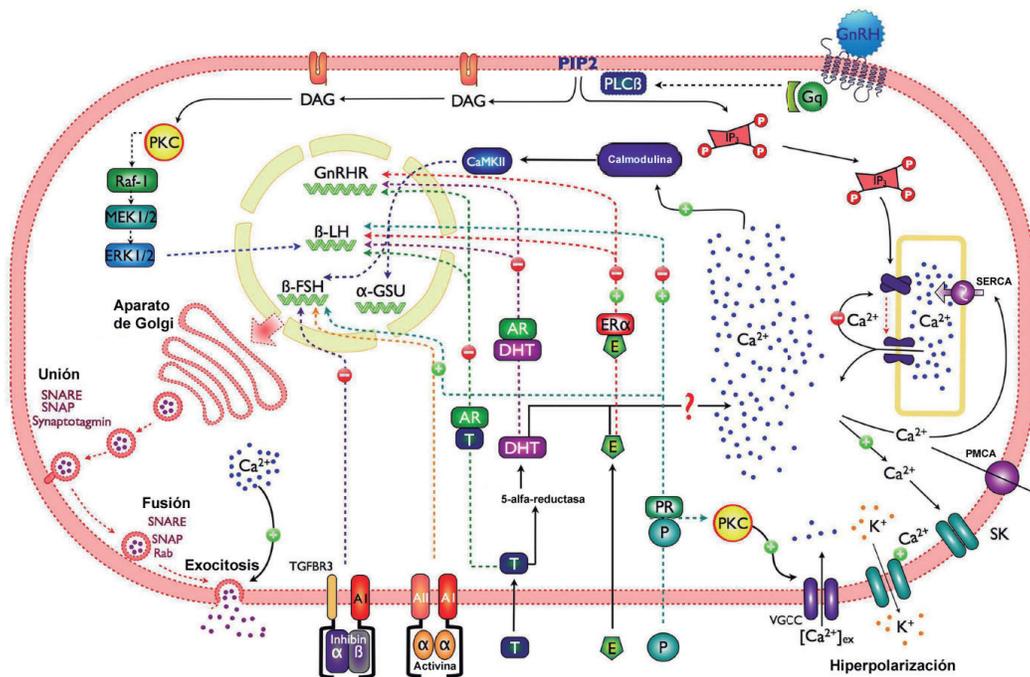
El receptor de GnRH es un miembro de la familia de receptores de membrana acoplados a proteína G. La transcripción del gen del GnRHR (*Gnrhr*) ocurre tanto en ausencia como en presencia de GnRH. La GnRH puede aumentar o disminuir la expresión de *Gnrhr* dependiendo del patrón de aplicación. Por ejemplo, la estimulación continua con GnRH aumenta la transcripción del *Gnrhr* alcanzando el pico máximo a las seis horas. Sin embargo, cuando se estimula por más tiempo la expresión de *Gnrhr* se reduce (Janjic et al., 2017).

### *Señalización intracelular en los gonadotropos por GnRH*

Una vez que la GnRH llega a los gonadotropos se une a un receptor de membrana y desencadena la liberación y la síntesis de gonadotropinas. La activación del receptor de GnRH activa a su vez la enzima fosfolipasa C-Beta (PLC- $\beta$ ) a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_{q/11}$  (ver figura 4). La PLC- $\beta$  hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y lo convierte en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>). El InsP<sub>3</sub>, libre en el citoplasma, se une a su receptor en el retículo endoplasmático, el receptor se abre y permite la salida de una gran cantidad de calcio al citoplasma. A diferencia del mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio, el incremento de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) despolariza la membrana de los gonadotropos, de tal forma que los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) se activan introduciendo calcio a las células y con ello la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta aún más (ver figura 4). El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , por una parte, permite que las vesículas secretoras que contienen FSH y LH se muevan y se fusionen a la membrana plasmática permitiendo su liberación. Por otro lado, el incremento de calcio activa la vía calcio-calmodulina con lo que se promueve la síntesis de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de FSH y LH, así como del GnRHR. El DAG, a través de la proteína cinasa C, potencia la entrada de calcio extracelular a la célula dado que regula directamente la actividad de los VGCC y, además, la síntesis de hormonas dado que activa la vía de las MAPK (ver figura 4) (Janjic et al., 2017; Stojilković et al., 1991).

### *Calcio intracelular en los gonadotropos*

En condición basal, es decir, cuando no hay agonista presente, existe una diferencia de concentración de calcio entre el citoplasma (50-250 nM) y el medio extracelular o el lumen de los organelos que almacenan calcio (10-250  $\mu$ M) (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013; Tse et al., 1997). Ésta diferencia de concentraciones es mantenida por la bomba de calcio dependiente de ATP en la membrana del retículo endoplasmático.



**Figura 4. Acción de la GnRH en los gonadotropos.** Vías de señalización en los gonadotropos dada por la acción de GnRH, así como los efectos de retroalimentación paracrina y de las gónadas. Tomado y modificado de (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013).

Los gonadotropos poseen dos tipos de actividad de calcio que son de orígenes distintos. El primer tipo es la actividad intrínseca o basal que sucede sin el estímulo de ningún agonista. Éste tipo de actividad se presenta como fluctuaciones en la concentración basal de calcio en el citoplasma y está asociada a pequeñas despolarizaciones de la membrana plasmática. La actividad intrínseca está dada por la entrada de calcio extracelular a través de canales iónicos dependientes de voltaje (y no por los reservorios de calcio) dado que cuando la entrada de calcio extracelular es bloqueada, principalmente a través de canales tipo L, la actividad se pierde (Iida et al., 1991; Stojilković et al., 1991).

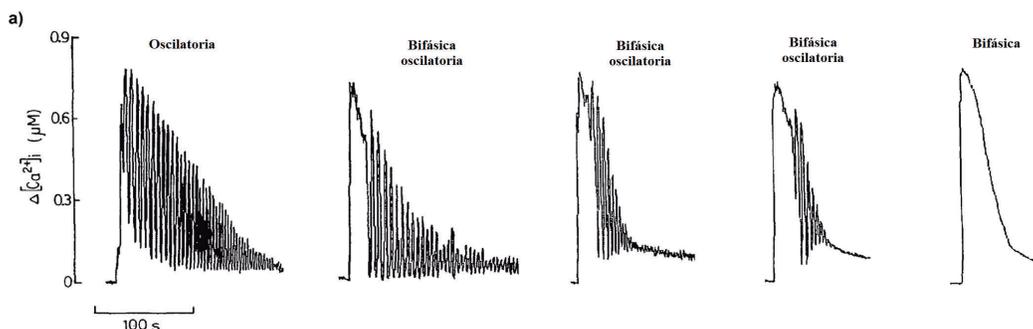
A diferencia de la actividad intrínseca o basal, la actividad inducida por agonista es principalmente dependiente de la salida de calcio de los reservorios intracelulares (Tse et al., 1993). La liberación de calcio, estimulada principalmente por la producción de  $\text{InsP}_3$ , al

retículo endoplasmático permite el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  que luego es seguida por un decremento en la concentración de la misma hasta llegar a la concentración basal antes del estímulo. En este segundo tipo de actividad, el aporte del calcio extracelular permite que la amplitud de la  $[Ca^{2+}]_i$  sea mayor y el decremento sea más lento (Iida et al., 1991; Stojilković et al., 1991).

Los patrones del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediados por agonista en gonadotropos fueron primero descritos en células en cultivo, donde se clasificaron tres tipos de respuestas dependiendo de la concentración de GnRH: subumbral, bifásica y oscilatoria (figura 5). Cuando las células fueron estimuladas con concentraciones de GnRH del orden de picomolar (100 pM) en lapsos de tiempo de 10-100 segundos, los gonadotropos respondieron con patrones subumbrales, mientras que en la estimulación por periodos mayores a 200 segundos (concentraciones de 1 pM a 1 nM), las células responden de forma oscilatoria. Por otro lado, a mayores concentraciones (10-100 nM) se observan, además de respuestas oscilatorias, patrones de respuesta bifásicos en los que hay un incremento rápido en la  $[Ca^{2+}]_i$  seguido por una meseta que puede o no tener oscilaciones (ver figura 5) (Tomić et al., 1994). Sin embargo, en condiciones experimentales que conservan la integridad de la comunicación de los gonadotropos con su ambiente celular, los patrones señalados no se presentan de la misma manera.

Experimentos hechos en rebanadas de hipófisis muestran que la transición del patrón oscilatorio al bifásico en los gonadotropos no sucede estrictamente en todas las células, en cambio, se observa que a una misma concentración de GnRH se producen diferentes tipos de respuesta de calcio (Durán-Pastén et al., 2013; Sánchez-Cárdenas & Hernández-Cruz, 2010). Estos experimentos muestran que sólo una porción de los gonadotropos responde con un

patrón canónico ante estímulos crecientes de GnRH (37.8%), mientras que otro porcentaje (58%) responde con un patrón no canónico, es decir, pueden presentarse respuestas bifásicas a bajas concentraciones de GnRH y respuestas oscilatorias a altas concentraciones de GnRH. Un tercer tipo de patrón, que representa el 3.6% de los gonadotropos, responden de forma atípica, donde solo se observan respuestas “transientes” y crecientes de calcio ante el incremento de GnRH sin observarse respuestas oscilatorias (Durán-Pastén et al., 2013).



**Figura 5. Patrones de incremento de calcio intracelular inducidos por GnRH en los gonadotropos.** Transformación del patrón oscilatorio a patrón bifásico con concentraciones crecientes de GnRH (1, 10, 10, 100 y 100 nM, de izquierda a derecha) de gonadotropos en cultivo celular. Tomado de (Iida et al., 1991).

Además, dichos experimentos *in situ* demuestran que existen diferencias, incluso contradicciones, con los resultados obtenidos de las células en cultivo. En los experimentos *in situ* las células no presentan patrones oscilatorios y bifásicos claramente distinguibles, sino que parece existir una combinación de tres componentes que determinan un patrón de respuesta final. Los componentes son el oscilatorio, meseta y “joroba”. La combinación de estos tres componentes dan como resultado patrones mayormente oscilatorios o bifásicos dependiendo de la proporción en la que contribuye cada componente (Durán-Pastén et al., 2013; Durán-Pastén & Fiordelasio, 2013).

Si los diversos patrones de incremento de calcio intracelular juegan o no un papel diferencial en la funcionalidad de los gonadotropos no es claro. Por ejemplo, experimentos *in vitro* muestran que animales gonadectomizados exhiben patrones oscilatorios de calcio con estímulos de 100 nM de GnRH y no bifásicos; mientras que en estudios *in situ*, los patrones son del tipo bifásico sobre los oscilatorios con la misma concentración de GnRH (Durán-Pastén et al., 2013; Tobin & Canny, 1996; Tobin et al., 1997). El mecanismo por el que los gonadotropos presentan patrones oscilatorios o bifásicos de calcio se ha explicado con un modelo que contiene dos osciladores.

En los gonadotropos existen dos osciladores, uno citoplasmático y otro en la membrana plasmática que permiten cierta dinámica de movilización de calcio dentro de las células. Los patrones de elevación de calcio intracelular en los gonadotropos se debe principalmente al oscilador citoplasmático y posee las siguientes características: a) el aporte intracelular de calcio es principalmente del retículo endoplasmático, b) el receptor de IP<sub>3</sub> es la principal vía por la que el calcio del retículo es liberado al citoplasma, c) la captura de calcio en el retículo se da a través de la bomba de calcio dependiente de ATP (SERCA), d) el calcio es tanto activador como inactivador del receptor de IP<sub>3</sub> y e) el flujo de calcio por el receptor de IP<sub>3</sub> es más eficiente cuando la concentración de calcio citoplasmático es baja (Li et al., 1994).

En este sentido, el patrón bifásico de movilización de calcio se puede explicar con un modelo en el que el IP<sub>3</sub>R es pasivo, es decir, que se abre al interactuar con calcio e IP<sub>3</sub> y se mantiene abierto mientras el agonista está presente. En el caso del patrón oscilatorio de movilización de calcio, el rol del IP<sub>3</sub>R es activo. La elevación de IP<sub>3</sub> en el citoplasma activa rápidamente los IP<sub>3</sub>Rs, lo que permite una rápida elevación de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Esta elevación de calcio inactiva lentamente los IP<sub>3</sub>Rs hasta que el flujo neto de calcio al citoplasma se vuelve negativo debido

a la acción de las SERCA. La reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  permite a los  $IP_3$ Rs recuperarse de la inactivación y cuando una cantidad importante de ellos se ha recuperado, se produce un nuevo pico de calcio intracelular y el ciclo se repite mientras el  $IP_3$  esté presente (Stojilkovic, 2012; Stojilković et al., 1993; Stojilkovic et al., 2010).

#### *Síntesis de LH y FSH*

Las gonadotropinas LH y FSH son hormonas glucoproteicas compuestas por dos subunidades: las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es idéntica en ambas gonadotropinas y también compone la hormona TSH. La subunidad  $\beta$  en cambio, es la que le da especificidad funcional a cada una de estas hormonas. Al igual que la secreción de GnRH en la eminencia media, la secreción de LH y FSH sucede en forma de pulsos (Stojilkovic et al., 2010).

La secreción pulsátil de gonadotropinas está fuertemente coordinada con los pulsos de GnRH. Cuando la pulsatilidad de la secreción de GnRH se altera, también se altera la pulsatilidad de secreción en los gonadotropos. Además, la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH cambian la forma en que se sintetiza y secreta LH y FSH (Haisenleder et al., 1991).

A nivel de síntesis, altas y bajas frecuencias en los pulsos de GnRH activan o inhiben distintos factores transcripcionales, mRNAs y proteínas que están involucrados en la inducción o reducción del promotor de la  $LH\beta$  o de la  $FSH\beta$  (Tsutsumi & Webster, 2009). Este modelo explica la forma en que posiblemente la GnRH diferencialmente estimula la expresión de las subunidades de las gonadotropinas, pero no así de su secreción diferencial.

#### *Secreción de LH y FSH*

Aunque la LH y FSH se sintetizan en las mismas células el patrón de secreción, medido por la cantidad de las hormonas en sangre, es muy diferente. En ratones macho, la concentración de FSH en sangre oscila en 30 ng/ml mientras que la de LH es de alrededor de 1 ng/ml

(Froment et al., 2002; Li et al., 2010; Lindzey et al., 1998; Chamindrani-Mendis et al., 1990). Los pulsos de GnRH en alta frecuencia (>1 pulso por hora) favorecen la secreción de LH, mientras que pulsos de baja frecuencia (<1 pulso por hora) favorecen la secreción de FSH (Haisenleder et al., 1991; Lewy et al., 1996).

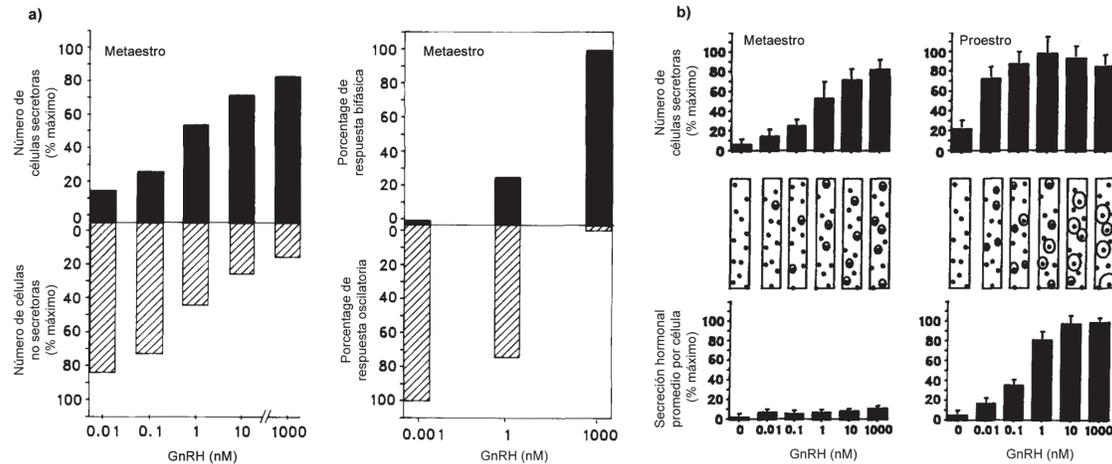
La secreción de gonadotropinas sigue el patrón general de secreción a través de SNARE y es dependiente de la elevación en la concentración de calcio intracelular (figura 4). La sinapsina es una proteína que mantiene a las vesículas secretoras juntas dado que las une de manera reversible y también a los filamentos de actina. La movilización de las vesículas a la membrana de las células sucede cuando la sinapsina se fosforila a través de proteínas cinasa, principalmente por proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII). La fosforilación de sinapsina permite que ésta proteína se disocie de las vesículas, entonces las vesículas pueden moverse y unirse a la membrana plasmática (Purves, 2012).

El proceso de fusión de las vesículas depende de proteínas llamadas SNARE (receptor de SNAP) que se encuentran en la membrana tanto de las vesículas (sinaptobrevina) como en la membrana plasmática (syntaxina y SNAP-25). El ensamble de las SNAREs se logra a través de un complejo de proteínas que incluye la ATPasa NSF y SNAPs. Además, otras proteínas como calmodulina, CAPS, munc-13 y sinaptotagmina permiten la fusión de las membranas dado que se unen a calcio. La sinaptotagmina, que se encuentra en la membrana de las vesículas, se caracteriza por unirse a calcio en condiciones en las que la concentración de éste último en el citoplasma es de la magnitud necesaria para la fusión de las membranas. De esta forma, la sinaptotagmina funciona como un sensor de calcio, cuando hay elevación importante de éste último, las vesículas se fusionan a la membrana y las hormonas son secretadas (Purves, 2012).

### **Planteamiento del problema**

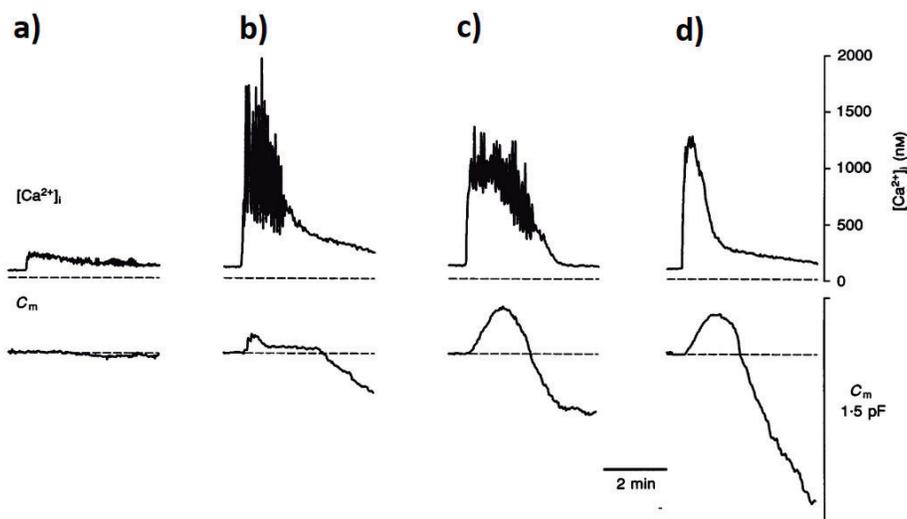
En los 90's Leong y Thorner propusieron que el patrón bifásico de movilización de calcio intracelular en gonadotropos está asociado a la secreción de LH mientras que el patrón oscilatorio está asociado a la síntesis de gonadotropinas y del GnRHR (Leong & Thorner, 1991). Estos autores, demostraron que el número de gonadotropos que secretan LH aumenta cuando aumenta la concentración de GnRH (0 a 1000 nM, figura 6. a) y que la cantidad de gonadotropinas que es secretada depende de la condición fisiológica del organismo (figura 6.b). En metaestro, a pesar de que existe un incremento progresivo en el número de gonadotropos que secretan LH a mayor concentración de GnRH, la concentración promedio de LH secretada no cambia significativamente (figura 6.b). Por otro lado, en proestro, a diferencia del metaestro, el número máximo de células que secretan LH se alcanza a concentraciones bajas del estímulo de GnRH. Además, conforme aumenta la concentración de GnRH en el medio, el promedio de secreción de LH aumenta y alcanza un punto máximo rápidamente. Esto quiere decir que el umbral de GnRH al que los gonadotropos secretan y responden cambia con la demanda fisiológica de los organismos y regula diferentes procesos en las células.

En ese trabajo también observaron que en metaestro, el patrón oscilatorio de movilización de calcio se presenta a concentraciones bajas de GnRH y un menor número de células secretan LH, mientras que el patrón bifásico se presenta a concentraciones más altas y un mayor número de células secreta LH. En este sentido, los autores proponen que existe una dependencia entre el patrón de movilización de calcio y la liberación de LH.



**Figura 6. Efecto de la concentración de GnRH en la respuesta de calcio y secreción de LH.** a) Asociación del número de células secretoras con el tipo de patrón de elevación de calcio presentado en metaestro. Las células que responden de forma bifásica están más asociadas a secreción de LH. b) Liberación de LH producida por estímulos crecientes de GnRH en ratas en metaestro y proestro. Se observa que el número de células responsivas a GnRH aumenta cuando aumenta la concentración de GnRH. En proestro el número máximo de células responsivas se alcanza a menores concentraciones de GnRH con respecto al metaestro. De igual forma, la secreción de LH es más grande en proestro. Tomado de (Leong & Thorner, 1991).

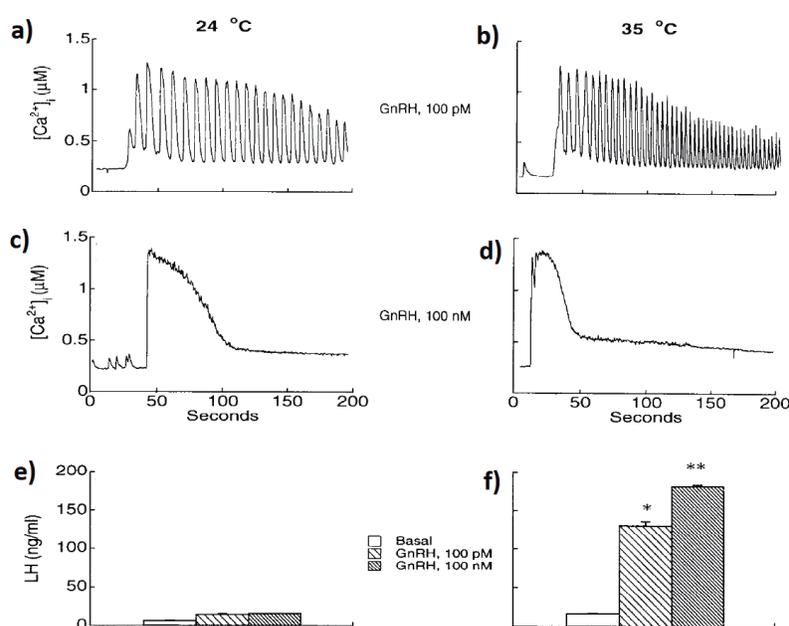
La medición paralela de calcio intracelular y capacitancia de la membrana plasmática en células aisladas, ha permitido reafirmar la dependencia que existe entre la secreción y el aumento de calcio intracelular. Se ha demostrado, que los patrones oscilatorio y bifásico de calcio, generan cambios en la capacitancia de la membrana, y por lo tanto de la exocitosis (figura 7) (Thomas & Waring, 1997; Tse et al., 1993). En este caso, se propuso que el patrón oscilatorio de movilización de calcio potencializa la secreción porque permite la misma sin que haya elevación de calcio por períodos de tiempo prolongados. Se planteó la idea de que la elevación de calcio en lapsos cortos, evita la sobre estimulación y no compromete otras vías de señalización en la que el calcio está involucrado (Hille et al., 1994; Tse et al., 1993).



**Figura 7. Medición paralela de la capacitancia y del incremento en la concentración de calcio intracelular en gonadotropos.** Se observa que tanto el patrón oscilatorio como el bifásico de calcio están asociados a secreción medida por el cambio en la capacitancia de la célula. Los gonadotropos fueron estimulados con GnRH 1 nM a partir del inicio de cada registro. El monitoreo de calcio se realizó con el sensor radiométrico Fura-2. Tomado de (Thomas & Waring, 1997).

Además, se demostró que la temperatura juega un papel importante en la secreción de gonadotropinas pero no de los patrones de calcio intracelular (Tomic, 1994; Tomić et al., 1994). La diferencia en la temperatura (24 o 35°C) sobre el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  cambia, para el caso del patrón oscilatorio, la frecuencia de oscilaciones, pero no la amplitud de respuesta, y para el patrón bifásico cambia el tiempo en el que la meseta alcanza el nivel basal de calcio intracelular en la célula (ver figura 8.a-d). Por otro lado, a 24°C la secreción que se produce a concentraciones que promueven patrones oscilatorios y bifásicos (100 pM y 100 nM, respectivamente) no difiere radicalmente de la que se produce en condición basal (ver figura 8.e). No así a 35°C, donde la liberación de LH aumenta significativamente tanto para concentraciones de 100 pM como de 100 nM, indicando que ambos patrones liberan LH, aunque en diferente medida (ver figura 8.f). Cabe señalar que en estos experimentos el tiempo de incubación con GnRH fue de tres horas, lo que podría explicar por qué la secreción generada por GnRH 100 pM es similar a la generada por 100 nM si tomamos en cuenta la desensibilización del receptor de GnRH a largo plazo.

Si bien, los experimentos que siguieron al trabajo de Leong y Thorner demostraron que los patrones oscilatorio y bifásico de calcio en los gonadotropos están igualmente asociados a la secreción de gonadotropinas, estos ensayos fallan al centrarse en experimentos en células aisladas. De hecho, los experimentos de Leong y Thorner muestran que los patrones bifásicos de calcio están más asociados a la secreción de LH y FSH, pero el patrón oscilatorio no se pierde completamente (véase figura 6.a).



**Figura 8. Efecto de la temperatura en la movilización de calcio intracelular y secreción de los gonadotropos de ratas ovariectomizadas.** Las células fueron estimuladas con GnRH por 3 horas antes de medir la concentración de LH liberada a 24 y 35 °C (izquierda y derecha, respectivamente). **a) y b)** Patrón oscilatorio de calcio con 100 pM de GnRH. **c) y d)** Patrón bifásico de calcio con 100 nM de GnRH. **e) y f)** Secreción obtenida con diferentes concentraciones de GnRH y en condición basal. El monitoreo de calcio se realizó con el sensor radiométrico Indo-1AM. Tomado de (Tomić et al., 1994).

En este trabajo se busca poner a prueba el modelo propuesto por Leong y Thorner en el que el tipo de patrón de liberación de calcio intracelular en los gonadotropos mediado por el estímulo de GnRH, regula la liberación de gonadotropinas. Se propone que ninguno de los

dos patrones es más importante en la secreción de las hormonas LH y FSH y que el patrón de respuesta de calcio no es un producto de la concentración de GnRH sino de la sensibilidad de los gonadotropos para responder a GnRH y secretar gonadotropinas. Para este propósito se utilizará un modelo de disrupción por cadmio en el que la secreción de la hormona LH disminuye radicalmente, pero la expresión del receptor de GnRH aumenta de manera considerable.

### **Modelo de estudio**

El conocimiento de disrupción neuroendocrina por cadmio en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas se conoce principalmente por estudios realizados en ratas y ratones. Está reportado que el tratamiento con cadmio altera la secreción hormonal de la hipófisis, aumentando la cantidad y secreción de los lactotropos y disminuyendo la secreción de los gonadotropos (Jiménez-Ortega et al., 2012; Lafuente, 2013).

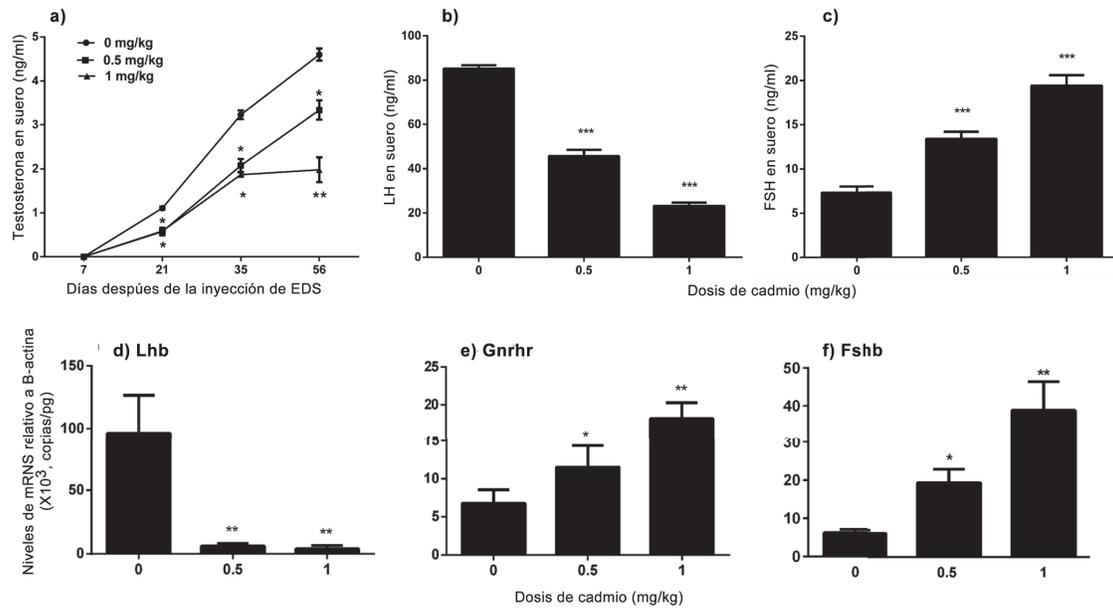
Dado que el ion cadmio comparte características electroquímicas similares con el calcio, el primero tiene un efecto directo sobre el metabolismo del último. Se conoce al cadmio por ser un potente bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática y también se ha propuesto que en el citoplasma podría mimetizar el papel del calcio en diversas rutas de señalización como la que involucra a la calmodulina (Choong et al., 2014; Thévenod, 2009).

De suma importancia para ésta tesis es el trabajo realizado por Wu y colaboradores donde muestran cómo cambia la secreción de gonadotropinas, así como la expresión de LH, FSH y el receptor de GnRH en los gonadotropos (Wu et al., 2017). Dicho trabajo se centra en la fisiología de los testículos y la capacidad regenerativa de las células de Leydig en ratas

inyectadas vía intraperitoneal con cadmio (0.5 y 1 mg/kg). Después del tratamiento con este ión, las ratas fueron inyectadas con dimetano sulfonato de etilo (ethane dimethane sulfonate, EDS) para eliminar por completo a las células de Leydig y observar el proceso de regeneración de las mismas hasta que alcanzaron las características normales de los testículos (56 días). Los resultados muestran que los niveles de testosterona son bajos debido a que el cadmio retrasa la regeneración de las células de Leydig (figura 9.a). De la misma forma, a los 56 días después de la inyección de EDS, la LH del suero sanguíneo muestra un decremento importante en su concentración, mientras que la FSH es elevada comparada con la condición control en la que no se inyectó cadmio (figura 9.b y c). Así mismo, la expresión de los genes de *Lhb*, *FSHb* y *Gnrhr* cambia debido al efecto del cadmio. La expresión de *Lhb* es baja, pero existe sobreexpresión de *FSHb* y *Gnrhr* (figura 9.d, e y f).

En este contexto, los cambios en la fisiología de los gonadotropos producidos por el cadmio permiten probar el modelo de Leong y Thorner dado que 1) la expresión y secreción de LH están disminuidas y por el contrario 2) la expresión del receptor de GnRH se encuentra aumentada. Así, en estas condiciones, de acuerdo con el modelo de Leong y Thorner, dado que la secreción de LH es mínima, se espera que en respuesta al estímulo de GnRH se observarán principalmente patrones oscilatorios de calcio de los gonadotropos.

Por otro lado, si como se propone en ésta tesis, la capacidad de los gonadotropos para responder a GnRH y secretar no depende tanto de la concentración de GnRH sino de la sensibilidad de los mismos, dado que la expresión del GnRHR es alta, se espera que, aunque la secreción de la LH en plasma es mínima, el patrón de calcio intracelular debe ser mayormente bifásico.



**Figura 9. Cambios producidos por dos concentraciones de cadmio (0.5 y 1 mg/kg) en los niveles de hormonas en suero y mRNA de gonadotropinas.** a) Niveles de testosterona en suero días después de la inyección de EDS. b) y c) Cambios en la concentración de LH y FSH producidos por cadmio 56 días después de la administración de EDS. d), e) y f) Diferencias en la cantidad de mRNA de Lhb, Fshb y Gnrhb 56 días después de la administración de cadmio y EDS. Tomado de (Wu et al., 2017).

## **HIPÓTESIS**

Los patrones del incremento de calcio intracelular en los gonadotropos ante un estímulo de GnRH dependen de la sensibilidad de los gonadotropos para movilizar calcio y no son un reflejo de la cantidad de secreción de éstas células.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Demostrar que el patrón bifásico de movilización de calcio intracelular en los gonadotropos no es la única condicionante asociada a la secreción de LH.

### **Objetivos particulares**

1. Conocer y describir los posibles cambios en la estructura y organización celular endocrina y vascular de la hipófisis ante la exposición subletal de cadmio.
2. Caracterizar los patrones de calcio intracelular de los gonadotropos en actividad basal y bajo el estímulo de GnRH expuestos a condiciones subletales de cadmio.
3. Evaluar si los cambios descritos anteriormente están asociados a cambios en la secreción hormonal y regulación en la espermatogénesis en los testículos.

## **MÉTODO**

### **Animales**

Para este estudio se utilizaron ratones machos Balb-C de dos meses de edad. Todos los procedimientos fueron evaluados y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias, UNAM y de acuerdo con los lineamientos establecidos por la norma oficial mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los ratones fueron alimentados con acceso libre a comida (Lab Chow, Purina) y agua. El ciclo de luz-oscuridad para los ratones fue 12:12 con la luz comenzando a las 7 de la mañana y hasta las siete de la tarde. El número de animales utilizados para obtener significancia estadística en los resultados fue calculado con una prueba de potencia para una diferencia de medias y por el trabajo de monitoreo de calcio realizado en el laboratorio previamente.

### **Tratamiento con cloruro de cadmio**

Para evaluar el efecto del cadmio en la fisiología de los gonadotropos los animales fueron divididos en los siguientes grupos: animales a los que se inyectó una sola dosis de cadmio y fueron evaluados a los 21, 35 y 56 días después de la inyección y animales en condición control (al menos seis animales por grupo).

La exposición a cadmio se hizo mediante la inyección intraperitoneal de 1 mg de cloruro de cadmio (Sigma-Aldrich) por kilogramo de peso de cada ratón. El cloruro de cadmio fue disuelto en solución normal salina (0.9% NaCl). Los animales del grupo control fueron inyectados solo con solución normal salina. La concentración de cadmio utilizada y los días a los que fue evaluado el efecto del mismo fueron elegidos de acuerdo a (Wu et al., 2017; Wong & Wong, 2004). En el primer trabajo se reportan cambios en los niveles en la

concentración de FSH y LH en sangre y los niveles de mRNAs de las subunidades beta de las mismas hormonas y del receptor de GnRH como consecuencia de la exposición a 0.5 y 1 mg de cadmio (mg/kg). Por otra parte, en el trabajo de Wong y colaboradores se muestra el efecto de 1 y 3 mg de cadmio (mg/kg) en testículos de ratones en las primeras 96 horas después del tratamiento. Ambos trabajos están centrados en los cambios producidos por cadmio a nivel de las gónadas, aunque se resalta su influencia en la hipófisis.

### **Calibración del sistema de perfusión para los registros de calcio intracelular**

Como se mencionó antes, se ha reportado que diferentes concentraciones de GnRH desencadenan diferentes patrones de respuesta en los gonadotropos. Por ésta razón, en este trabajo fue necesario realizar curvas de perfusión en el sistema de registro de calcio para asegurarnos de que el estímulo de 10 nM de GnRH entra al sistema de registro y alcanza la concentración máxima de forma rápida (en los primeros segundos), se mantiene estable durante el tiempo de estímulo y sale de la perfusión rápidamente.

Las pruebas para ajustar la velocidad de entrada y salida de la perfusión se realizaron con fluoresceína diluida en agua desionizada. Esta velocidad fue determinada para que la intensidad de fluorescencia se mantuviera en el punto máximo por 30 segundos, que corresponde a los 30 segundos de estímulo con GnRH como se describe en la siguiente sección. Se usaron concentraciones de fluoresceína mínimas que asemejan a la fluorescencia obtenida con Fluo 4-AM en la hipófisis teniendo cuidado de no saturar el sistema.

### **Registros de calcio intracelular**

Para evaluar la disrupción por cadmio en la movilización de calcio en los gonadotropos se usó el sensor de calcio intensiométrico Fluo-4 AM (Molecular Probes). Los animales fueron

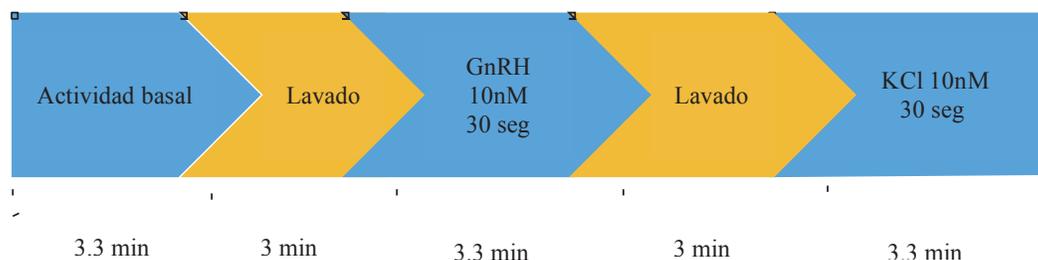
sedados profundamente con Tiopental sódico (PiSA Farmacéutica), sacrificados por dislocación y decapitados. El cerebro fue removido y la hipófisis extraída cuidadosamente y colocada en solución fisiológica Krebs-Ringer (a concentración (en mM): 130 NaCl, 3 KCl, 5 HEPES, 1 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 glucosa, 2 CaCl<sub>2</sub> y 2 MgCl<sub>2</sub>).

Los registros de calcio intracelular se realizaron en la glándula entera sobre la parte ventral de la misma, que es el lugar donde se encuentra la mayor cantidad de gonadotropos. La hipófisis fue incubada por 30 minutos con Fluo-4 AM (20  $\mu$ M) diluido con dimetilsulfóxido (DMSO, MERCK) y ácido plurónico (40%, Sigma Aldrich) en solución Krebs-Ringer y oxigenada continuamente con 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de la incubación, la glándula fue montada con una gota de agar (3%, Invitrogen) de bajo punto de fusión sobre un cámara Plexiglas para evitar su movimiento y perfundida constantemente con solución Krebs-Ringer (2 ml/minuto).

La movilización de calcio del citoplasma se midió con un microscopio estereoscópico (Leica, Alemania) con objetivo PlanAPO 2X (0.35 NA) equipado con una cámara CCD de enfriamiento interno y usando el software MicroManager (NIH, Maryland) para la adquisición de series de imágenes. Las imágenes fueron adquiridas con una exposición promedio de 200 milisegundos y usando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 510 nm de longitud de onda (figura 11.a).

Se realizaron tres registros de calcio intracelular para cada glándula con 1000 imágenes cada uno. El primer registro se realizó para medir la actividad basal de calcio de los gonadotropos, en el segundo registro se aplicó un estímulo de GnRH 10nM (en solución Krebs-Ringer) por 30 segundos y en el tercer registro se aplicó un estímulo de alto potasio (a concentración (en

mM): 140 KCl, 10 HEPES y 2 CaCl<sub>2</sub>) para evaluar la viabilidad de las células después de la manipulación y procedimientos experimental. Se realizó un lavado continuo con solución Krebs-Ringer de tres minutos entre cada registro de calcio intracelular como se muestra en la figura 10.



**Figura 10. Orden cronológico de obtención de registro de calcio.** Los recuadros azules indican los eventos de registro de calcio intracelular en la hipófisis. Los recuadros naranjas indican el tiempo de lavado (3 minutos) entre cada registro de calcio. Todos los lavados fueron realizados con solución Ringer-Krebs.

El tiempo entre los lavados que se hicieron en los ensayos con dos estímulos de GnRH para probar desensibilización y sensibilización del receptor de GnRH fueron más largos y se especifican en los resultados. También se realizó una prueba farmacológica con nifedipina (20  $\mu$ M) para dilucidar el aporte de la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L en la movilización de calcio de los gonadotropos en los grupos tratados con cadmio y control. Como se mencionó en la introducción, los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L son la vía principal de aporte de calcio extracelular al citoplasma de los gonadotropos.

### **Inmunohistoquímica de LH y FSH en la hipófisis**

Los ratones fueron sedados como se mencionó anteriormente y perfundidos vía intracardiaca, primero con PBS 1X y después con paraformaldehído (PFA) al 4% para la fijación tanto de la hipófisis como de los testículos. Se realizó disección del ratón para obtener la hipófisis y luego ésta fue inmersa en PFA (4%) por 24 horas a 5°C y posteriormente conservada en PBS

1X. Se obtuvieron secciones de la hipófisis de 35  $\mu\text{m}$  de grosor con un vibratomo (Leica VT1000 S, Leica Microsystems) en sentido anteroposterior. Las rebanadas obtenidas fueron bloqueadas con Tritón 1% (X-100) y BSA 2% en PBS 1X por 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron lavados de las rebanadas con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos primarios anti CD31 + FSH o LH + CD31 disueltos en PBS 1X con Tritón 0.3% y BSA 2% por tres noches, 5°C y en agitación constante. Las características de cada anticuerpo y diluciones usadas se detallan en la tabla 2.

Las rebanadas de hipófisis fueron lavadas con PBS 1X al término de la incubación con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios utilizados (véase tabla 2) fueron diluidos en PBS 1X con Tritón 0.3% y BSA 2%. La incubación con anticuerpos secundarios se realizó por dos horas, a temperatura ambiente y en agitación constante. Después, se hicieron lavados para remover el exceso de anticuerpo secundario de las muestras y se procedió a incubarlas con DAPI por cinco minutos más. Al final, las secciones de hipófisis fueron montadas sobre portaobjetos cargados con poli-lisina (ESCO, Thermo Fisher) en mowiol y cubiertas con cubreobjetos.

Las imágenes de las rebanadas de hipófisis se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems). Se realizaron reconstrucciones de las rebanadas de hipófisis de la región dorsal de la glándula en X, Y y Z usando un objetivo de aire 20X. Se tomaron fotografías para obtener acercamientos de los gonadotropos marcados en FSH y LH con el objetivo de aceite 60X. El conteo de las células se realizó sobre las reconstrucciones haciendo un colapso de la rebanada en el eje Z para obtener la máxima intensidad en el mismo plano. Las imágenes fueron ajustadas y analizadas usando el programa LAS X Life Science (Leica Microsystems) así como ImageJ (Image Analysis, NIH).

**Tabla 2. Anticuerpos usados en este trabajo.**

Anticuerpo	Primario o secundario	Vendedor	Número de catálogo	Dilución usada	Referencia en línea
Conejo anti rata FSH-B	Primario	A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program		1:500	<a href="http://www.humc.edu/hormones/material.html">http://www.humc.edu/hormones/material.html</a>
Conejo anti rata LH-B	Primario	A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program		1:500	<a href="http://www.humc.edu/hormones/material.html">http://www.humc.edu/hormones/material.html</a>
Rata anti CD31	Primario	BD Bioscience		1:200	<a href="http://www.humc.edu/hormones/material.html">http://www.humc.edu/hormones/material.html</a>
Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Secundario	Jackson ImmunoResearch Laboratories	711-546-152	1: 100	<a href="https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/711-546-152">https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/711-546-152</a>
Alexa Fluor® 594 AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Secundario	Jackson ImmunoResearch Laboratories	112-585-143	1: 100	<a href="https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/112-585-143/Goat-Rat-IgG-HL-Alexa-Fluor-594">https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/112-585-143/Goat-Rat-IgG-HL-Alexa-Fluor-594</a>
Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Secundario	Jackson ImmunoResearch Laboratories	711-606-152	1: 100	<a href="https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/711-605-152">https://www.jacksonimmuno.com/catalog/products/711-605-152</a>

### **Concentración de LH y FSH en sangre**

Los ratones fueron manipulados tres veces por semana al menos quince días previos a la inyección del cadmio con el objetivo de evitar que el estrés en los mismos afectara la secreción hormonal al momento de la recolección de las muestras de sangre. Se tomaron muestras de 4µl de sangre de la cola tanto de ratones tratados con cadmio como controles y se conservaron en PBS-Tween (PBS1X, 0.005 Tween20) a -20°C para su posterior análisis por

un método similar a ELISA. Las colectas de sangre se realizaron una vez cada semana a la par de que se registraba el peso de los ratones a partir de la inyección de cloruro de cadmio y hasta que los animales fueron usados en los experimentos de imagenología de calcio o inmunohistoquímica. Se tuvo cuidado de realizar la colecta de sangre entre las once de la mañana y la una de la tarde, y este fue también el tiempo en el que se hicieron los registros de calcio.

La medición de hormonas hipofisarias en sangre se hizo siguiendo un método ultrasensible de ELISA y conforme a las instrucciones del vendedor (Milliplex, Millipore Corporation). Éste método permite cuantificar los niveles de concentración de hormonas hipofisarias a través de volúmenes mínimos de sangre, lo que permite obtener y analizar diferentes muestras en el tiempo de un mismo individuo. La detección y cuantificación de hormonas se realiza midiendo la fluorescencia de microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos. Cuando la muestra ha sido incorporada a las microesferas se agrega un anticuerpo biotinilado de detección y finalmente se agrega estreptavidina conjugada con ficoeritrina para completar la reacción.

La precisión de los ensayos proporcionados por el proveedor, la sensibilidad del protocolo para cada hormona, la precisión (el pico de recuperación), así como la construcción de las curvas estándar de referencia de las hormonas se muestran en la tabla 3. Se agregaron 10  $\mu$ l de las muestras de sangre en los pozos correspondientes con 25  $\mu$ l de las microesferas junto con el *buffer* incluido en el *kit*. La placa fue cubierta con aluminio y puesta en incubación a 4°C y agitación constante (500 rpm) por una noche. Después se hicieron dos lavados de la placa con el *buffer* de lavado (también incluido en el *kit*). Se agregaron 50  $\mu$ l de los anticuerpos de detección para cada pozo y se realizó una segunda incubación por una hora a

temperatura ambiente y agitación constante. Inmediatamente se agregaron 50 µl de la extravidina y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. En seguida se removió el contenido de la placa y se realizaron dos lavados con el *buffer* de lavado. Los datos de fluorescencia de las microesferas y análisis de los mismos se obtuvieron usando el equipo Magpix (Luminex Corporation).

**Tabla 3. Características del ensayo de detección y cuantificación de hormonas.**

Hormona	Curva estándar (pg/mL)	Sensitividad (pg/mL)	Precisión interensayo (% CV)	Precisión intraensayo (% CV)	Porcentaje de recuperación
ACTH	2.4-10,000	1.7	<20	<15	96.7
FSH	24.4-100,000	9.5	<20	<15	96.4
GH	4.9-20,000	1.7	<20	<15	99.5
Prolactina	122-500,000	46.2	<20	<15	97.8
TSH	12.2-50,000	1.9	<20	<15	100
LH	4.9-20,000	1.9	<20	<15	97.1

### **Tinciones de H&E en testículos**

Los testículos fueron disectados y puestos en solución Bouin por 24 horas después de la fijación con PFA. Después se hicieron lavados con PBS 1X para colocar los testículos en formol al 10% hasta el momento de hacer las tinciones histológicas. Para los cortes de tejido se seleccionó uno de los dos testículos fijados por cada ratón. Se realizaron cortes transversales incluidos en parafina de 7 µm de grosor con micrótopo rotatorio y se colocaron sobre portaobjetos para el proceso de tinción. Las tinciones histológicas de los testículos se realizaron con hematoxilina y eosina como se describe en el siguiente párrafo.

Los testículos fueron extraídos del formol (10%) y deshidratados de la siguiente manera (20 minutos por cada etapa): agua corriente, alcohol al 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100%, alcohol (100%)-xilol, xilol I, xilol II, xilol-parafina, parafina I y parafina II. Después de

parafina II los testículos fueron embebidos en parafina para realizar cortes en micrótopo (Leica). Se realizaron cortes transversales de los testículos de 7  $\mu\text{m}$  de grosor, se colocaron sobre cubreobjetos y se hidrataron y tiñeron en el siguiente orden (durante cinco minutos en cada etapa): xilol I 10 minutos, xilol II 10 minutos, alcohol (100%)-xilol, alcohol 100%, 96%, 90%, 70%, 50%, agua destilada, hematoxilina Ehrlich, enjuague con agua corriente por 10 segundos, agua destilada con carbonato de litio 30 segundos, agua corriente, alcohol 50%, 70%, eosina 30 segundos, alcohol 96%, 96%, 100%, alcohol (100%)-xilol, xilol I, xilol II. Al finalizar los preparados histológicos fueron cubiertos con Entellan (Sigma Aldrich).

Se adquirieron imágenes de los cortes de testículo en campo claro con un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems). Se obtuvieron al menos dos imágenes de cortes transversales no seriados a nivel medio de cada testículo. De estas imágenes obtenidas fue seleccionada una para el análisis posterior del número de túbulos, área de los mismos, diámetro máximo y redondez.

### **Análisis de datos**

Para los registros de calcio intracelular obtenidos se marcaron las regiones de interés correspondientes a las células que respondieron al estímulo de alto potasio usando el programa Fiji (ImageJ). Se obtuvieron la intensidad media de fluorescencia para cada región de interés y de estos datos se realizó un ajuste para corregir el fotoblanqueo y después el procesamiento de normalización de los datos para cada lapso de tiempo usando Igor Pro 6 (WaveMetrics, Portland) con la fórmula:

$$\Delta F/F = F_t / F_{\text{min}}$$

donde  $F_t$  es la fluorescencia de la célula en cada momento del registro de calcio y  $F_{\text{min}}$  es el punto en el tiempo con la fluorescencia mínima de la célula. Los análisis de área bajo la curva

(ABC) e intensidad máxima (IM) se realizaron usando códigos propios escritos en el programa R (*The R Project for Statistical Computing*).

Los patrones de sincronidad de respuesta de los gonadotropos a GnRH se realizaron con el paquete “synchrony” en R. El valor de sincronidad entre los gonadotropos de un mismo registro ( $\varphi$ ) se cuantificó usando:

$$\varphi = \frac{\sigma_{x_T}^2}{(\sum \sigma_{x_i})^2}$$

donde  $\sigma_{x_T}^2$  es la varianza temporal de las series de tiempo  $x_T(t) = \sum x_i(t)$  de la población de gonadotropos y  $(\sum \sigma_{x_i})^2$  la suma de la desviación en el tiempo para cada célula (Loreau & de Mazancourt, 2008). Después, la significancia del valor de sincronía obtenido fue calculado mediante la aleatorización de los datos por el método de Monte Carlo (Rash et al., 2016). La aleatorización reordena los datos de las series de tiempo (en este caso, cada gonadotropo) de tal forma que se elimina la autocorrelación y la correlación cruzada entre células. El valor  $p$  de significancia se obtuvo de 1000 aleatorizaciones de los datos para cada registro de calcio. Para cuantificar la correlación en el tiempo de la actividad de calcio de los gonadotropos ante el estímulo de GnRH, se calculó el coeficiente de correlación de Kendall para cada par de células.

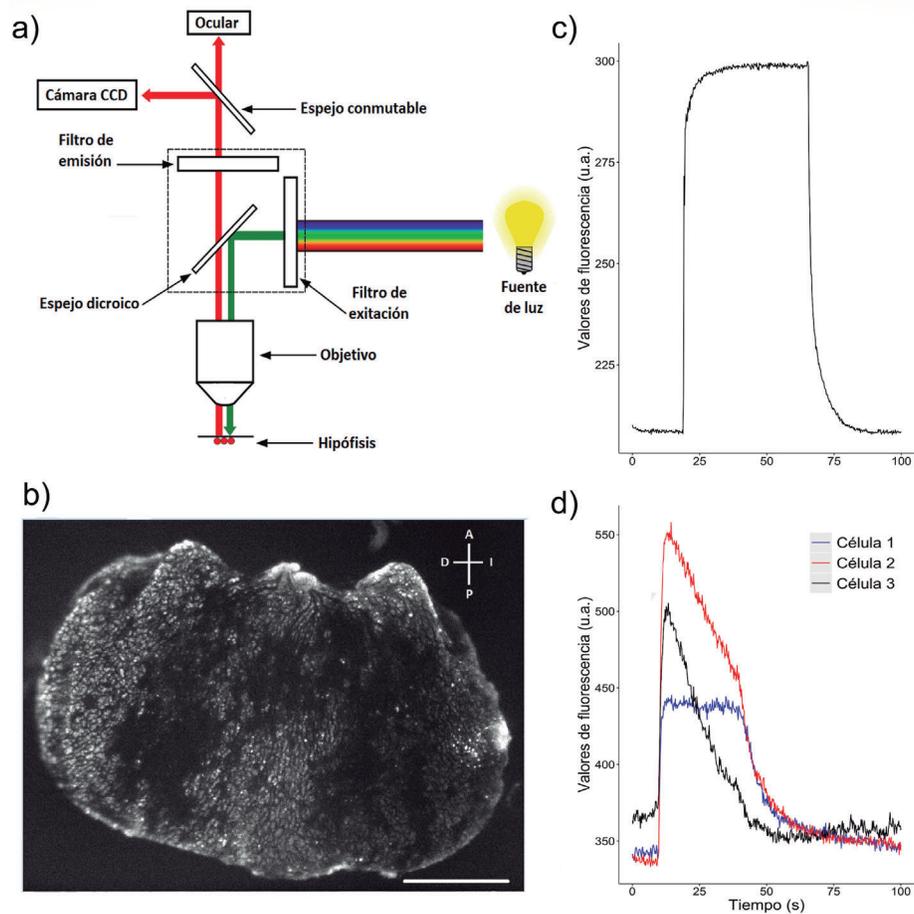
El análisis estadístico de los resultados de los registros de calcio intracelular, concentración de hormona en sangre y tinciones de hematoxilina-eosina también fueron realizados en el programa R. Se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas, según el caso, y son especificadas para cada prueba en los resultados. Valores de  $p$  menores a 0.05 son considerados estadísticamente significativos. Por último, los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de los datos.

## RESULTADOS

### **Sistema de perfusión y obtención de registros de calcio intracelular**

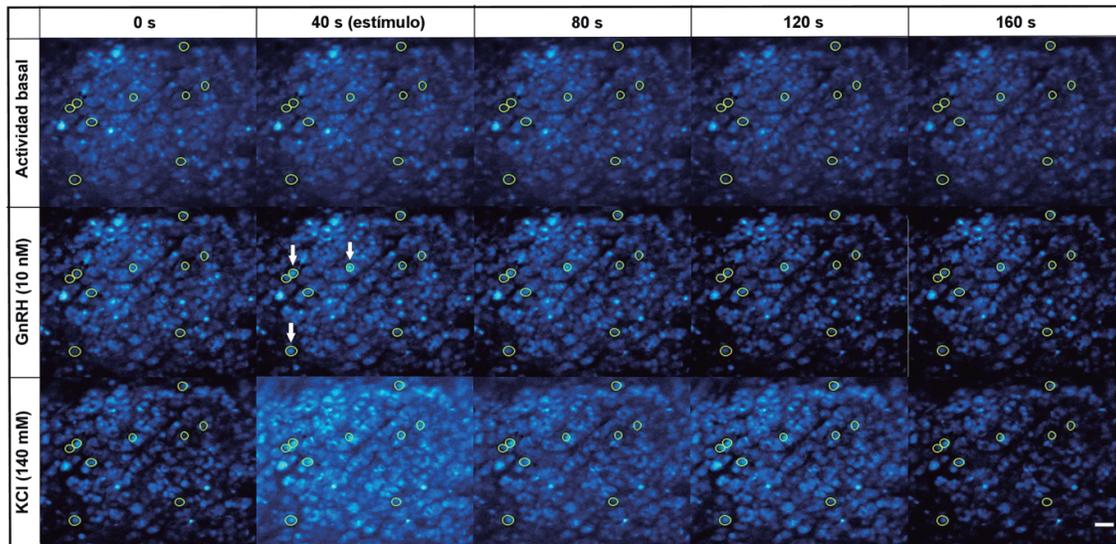
El sistema de perfusión fue calibrado de tal forma que el pico de concentración mayor en la fluorescencia se alcanzó en los primeros segundos de estímulo. De la misma forma, el regreso al nivel basal de fluorescencia después de retirar el estímulo sucede en pocos segundos (figura 11.c). La calibración de la perfusión permitió asegurarnos de que la concentración de estímulos que reportamos llegó a las células desde los primeros segundos. Esto es importante por dos razones: a) la caracterización del patrón de movilización de calcio antes, durante y después del estímulo (figura 11.d) y b) dado que se ha reportado que diferentes concentraciones de GnRH desencadenan diferentes patrones de movilización de calcio en los gonadotropos, nos aseguramos que los patrones que en éste trabajo son reportados, no son consecuencia de la variación en la concentración del estímulo.

La incubación con el fluoróforo intensiométrico Fluo 4-AM permite monitorear los cambios en la concentración de calcio libre en el citoplasma en células vivas. Los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  son medidos como cambios en la fluorescencia del campo de registro y es específico dado que el fluoróforo se excita a 480 nm y la longitud de onda de emisión es captada con una cámara en milisegundos a 510 nm (figura 11.a y b). En éste trabajo el calcio intracelular fue monitoreado en las células ubicadas en la región ventral de la glándula hipófisis debido a que ésta región es más plana con respecto a la dorsal, lo que permite enfocar una mayor cantidad de células, además de que es donde se ubica la mayor cantidad de gonadotropos (véase figura 11.b).



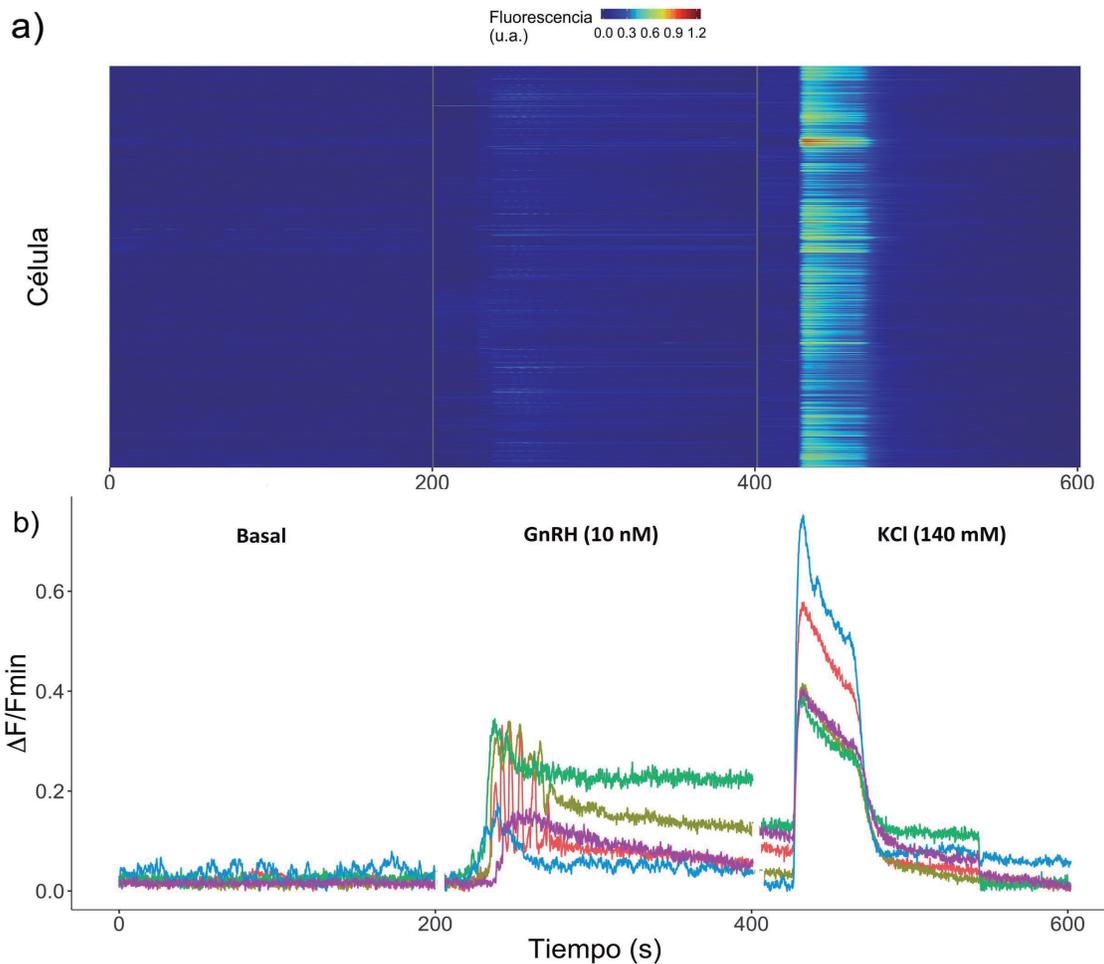
**Figura 11. Fluorescencia de la preparación de hipófisis con Fluo 4 AM.** a) Esquema del equipo de epifluorescencia usado en los registros de calcio intracelular. b) Fotografía de la región ventral de hipófisis después de la incubación con Fluo 4-AM. c) Curva de fluorescencia que muestra la forma en que, en este caso, la fluoresceína, entra y sale del sistema de perfusión que se usó para realizar los registros de calcio en la hipófisis. d) Trazos de fluorescencia representativos de células en una hipófisis que fue estimulada con alto potasio (140 mM) durante 30 segundos. Barra de escala 1 mm. Imagen 11.a modificada de (Gregersen, 2014).

Los registros de actividad basal y bajo estímulos fueron realizados en uno de los dos lóbulos de la hipófisis. El estímulo de alto potasio nos permitió corroborar la viabilidad de las células que fueron monitoreadas durante los registros porque despolariza la membrana de las células y permite la entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje. La despolarización solo se produce en células vivas y por ésta razón si la preparación de la muestra es buena, una despolarización global es esperada (véase la figura 12 y 13.a).



**Figura 12. Cambios en la intensidad de fluorescencia en los registros de calcio.** La actividad basal de fluorescencia no cambia significativamente durante el tiempo de registro. En cambio, cuando se aplica GnRH o KCl al medio, las células cambian la intensidad de fluorescencia, lo que indica que existe aumento en la concentración de calcio en el citoplasma de las células. Los círculos muestran nueve ejemplos de la selección manual de células que responden a potasio y que luego fueron trasladadas a los otros dos registros. Nótese el cambio global de fluorescencia ante la aplicación de alto potasio (a los 40 segundos del inicio del registro de calcio) y que demuestra la viabilidad de la glándula durante el experimento. En cambio, el estímulo con GnRH aumenta la intensidad de fluorescencia solo en aquellas células que poseen el receptor de GnRH (la población de gonadotropos, las flechas ejemplifican tres casos). Barra de escala de 30 micrómetros.

Los registros de calcio obtenidos fueron primero analizados usando el estímulo de potasio para hacer la selección manual de las células que respondieron a éste. Las regiones de interés marcadas en potasio fueron luego trasladadas a los registros en actividad basal y con el estímulo de GnRH (figura 12). De ésta forma se obtuvieron los porcentajes de células con actividad basal y que respondieron a GnRH, siendo el cien por ciento las células responsivas a potasio (figura 13.a). Además, se obtuvo la fluorescencia media de las regiones de interés en el tiempo para cuantificar los valores de intensidad máxima de fluorescencia (IMF) y área bajo la curva (ABC), así como para reconocer el tipo de patrón de movilización de calcio ante GnRH (en la figura 13.b se muestran algunos trazos).



**Figura 13. Análisis de la fluorescencia en el tiempo de los registros de calcio en la hipófisis.** a) Raster donde se muestran los cambios de fluorescencia de mil células en condición basal, con el estímulo de GnRH y con alto potasio. Nótese que la intensidad de fluorescencia cambia poblacionalmente en el estímulo de potasio, mientras que no todas las células responden a GnRH. b) Trazos de la fluorescencia normalizada en cuatro células (cada color) identificadas como gonadotropos por presentar respuesta a GnRH. Las discontinuidades que se muestran en ambas imágenes en el eje horizontal representan los tiempos de lavado de tres minutos y en los que no se adquirieron imágenes. La escala de tiempo es la misma para a) y b).

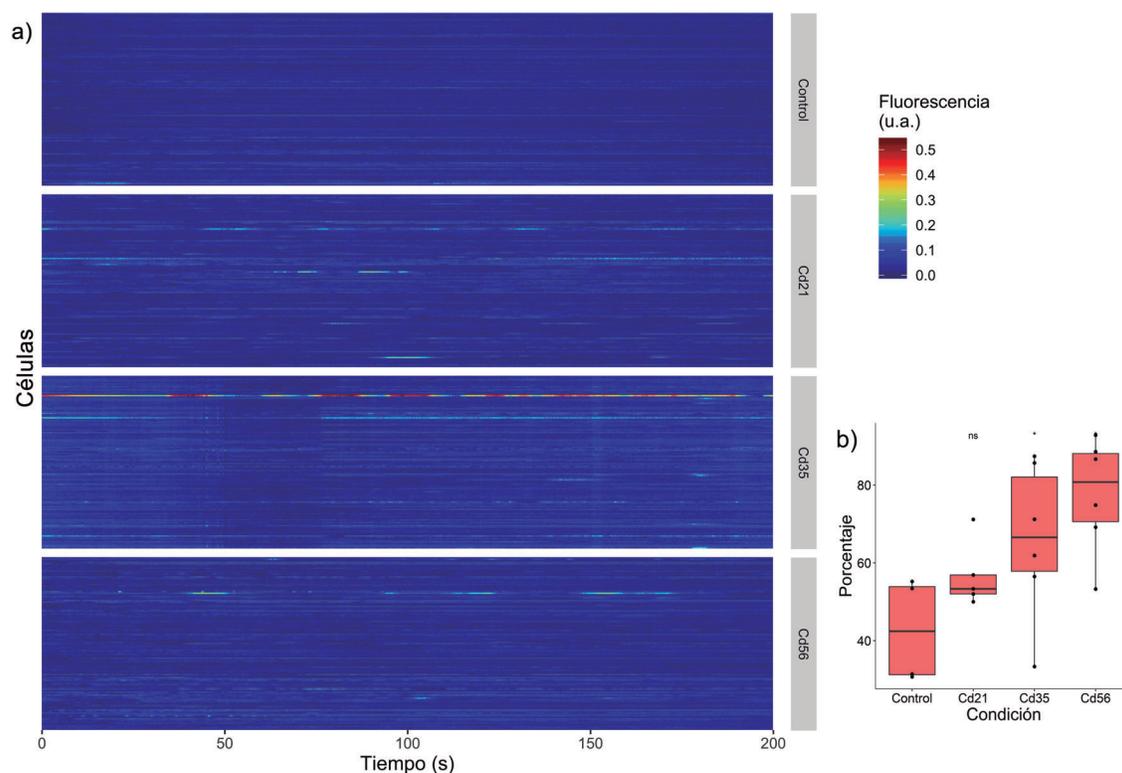
### **La actividad basal de calcio intracelular en los gonadotropos incrementa días después de la inyección con cadmio**

Después de identificar a todas las células que respondieron a potasio, se identificaron a las células que respondieron a GnRH y estas células son consideradas gonadotropos (figura 13).

A continuación, se evaluó si los gonadotropos poseían actividad basal de calcio antes del estímulo de GnRH. Se consideró que existía actividad basal para cada célula si se observó al

menos una transiente de calcio en el tiempo de registro. De éste análisis se encontró que la actividad basal de los gonadotropos aumenta con el tratamiento de cadmio (ver figura 14).

En los ratones del grupo control, alrededor de la mitad de las células que responden a GnRH poseen actividad basal de calcio. Mientras que en los grupos Cd21, 35 y 56 el número de células con actividad basal es mayor con respecto a las que no lo tienen, al menos durante el tiempo de registro de la actividad basal de tres minutos (ver figura 14). Algunos ejemplos de trazos individuales de actividad basal de calcio se muestran en las figuras 15, 16, 17 y 18, para el grupo control, así como los animales tratados con cadmio.



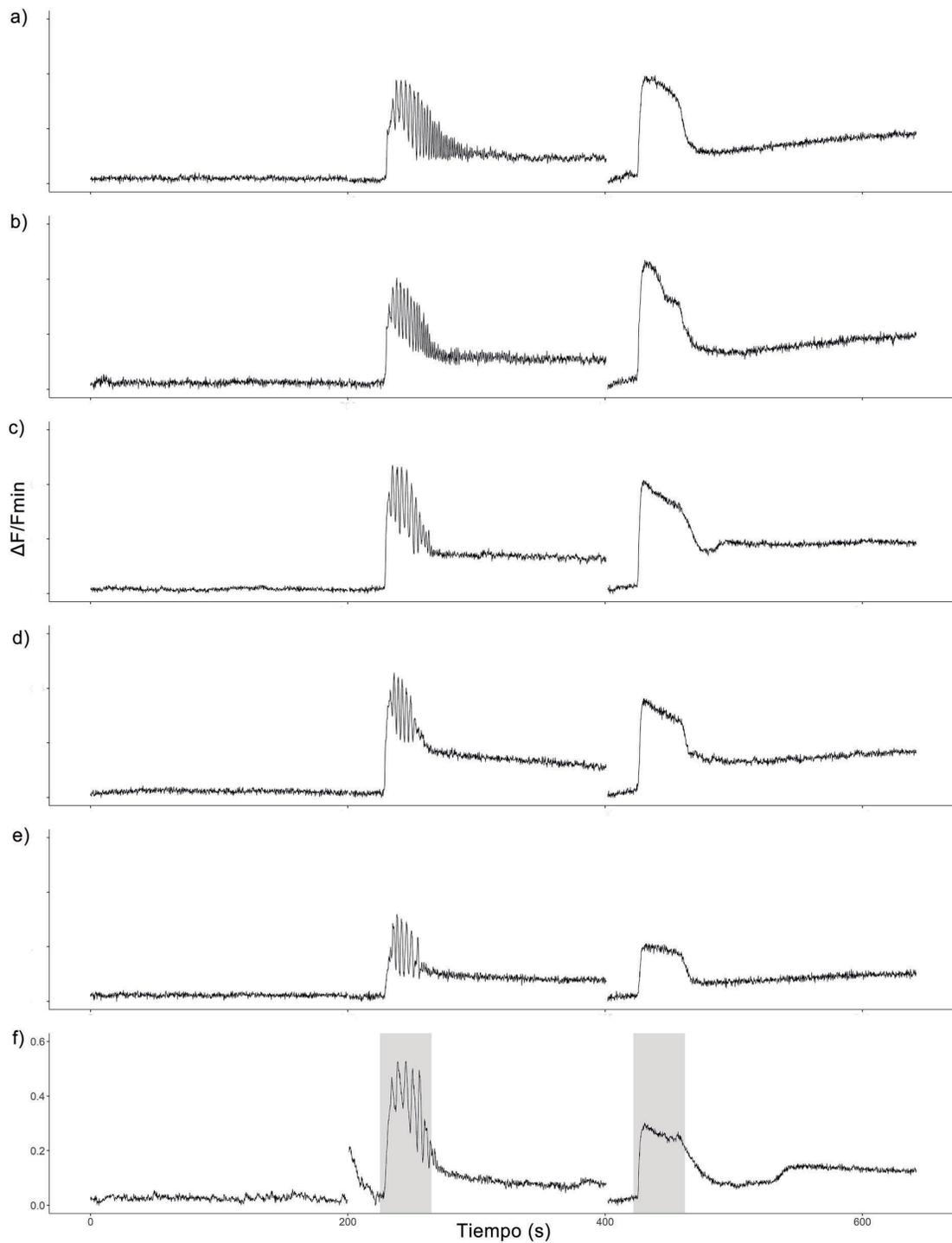
**Figura 14. Actividad basal de calcio en gonadotropos con tratamiento de cadmio. a)** Se muestra la actividad basal de movilización de calcio de 120 gonadotropos del grupo control y de los animales tratados con cadmio y registrados 21, 35 y 56 días posteriores a la inyección. **b)** Cambio en el porcentaje de gonadotropos que poseen actividad basal. Los porcentajes se obtuvieron tomando al total de células que responden a GnRH (10 nM) como el cien por ciento. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comparación de grupos; \* $p = 0.038$  con respecto al grupo control; ns, valor de  $p$  no significativo.

### **Cambios en el ABC e IM de movilización de calcio intracelular ante el efecto de cadmio**

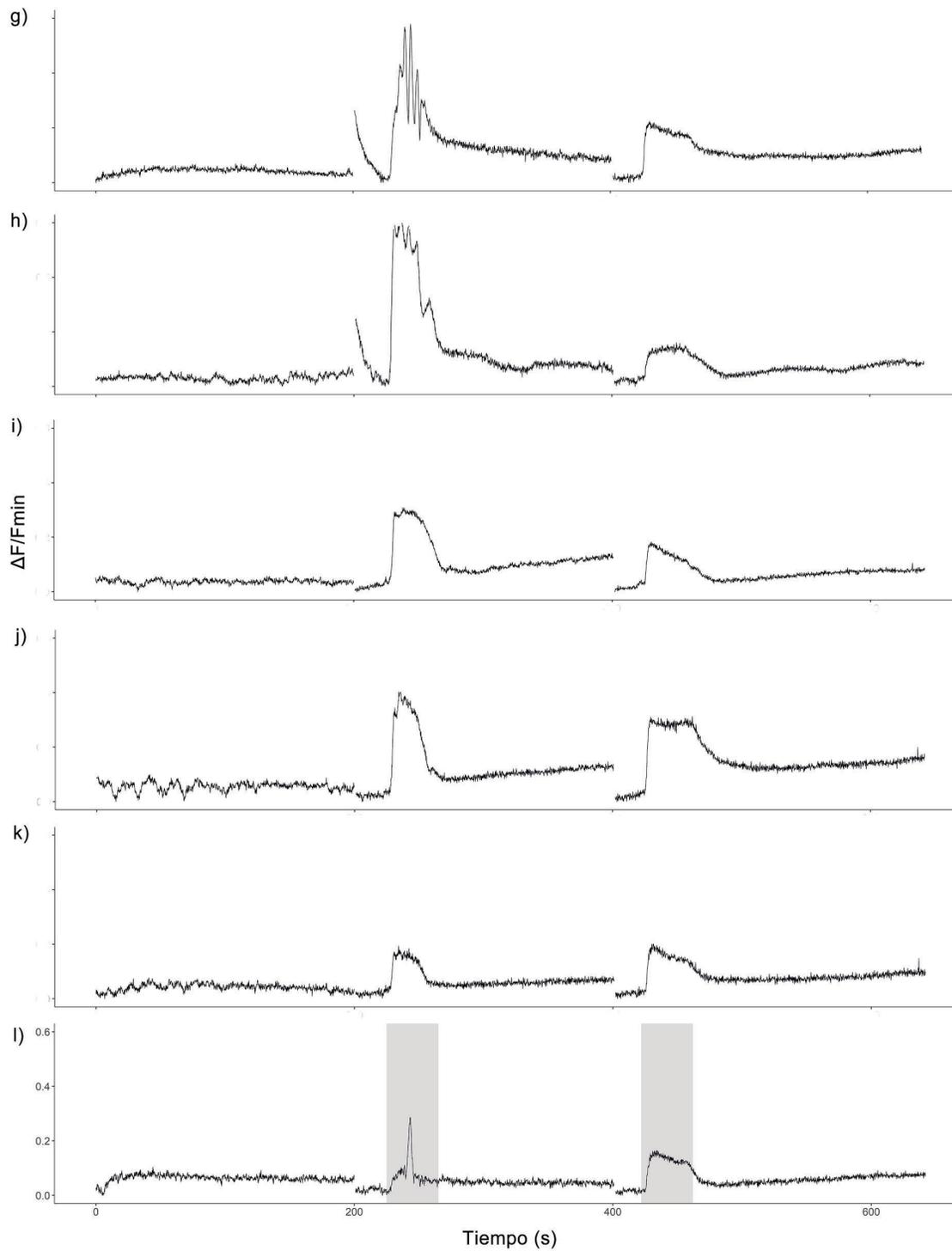
La movilización de calcio por GnRH en los gonadotropos, medido en éste trabajo como el área bajo la curva y la intensidad máxima de fluorescencia, disminuye significativamente a medida que aumentan los días después de la inyección de cadmio. El promedio de la intensidad máxima de fluorescencia alcanza sus valores más bajos a los 21 días después de la inyección de cadmio ( $0.123 \pm 0.056$  u.a.). La IMF aumenta durante los siguientes días a la inyección de cadmio (Cd35 es  $0.227 \pm 0.162$  y Cd56 es  $0.207 \pm 0.130$  u.a.), pero siguen siendo significativamente menores con respecto al control ( $0.343 \pm 0.139$  u.a.) (véase figura 19.a).

Los valores de ABC siguen el mismo patrón que la IMF (figura 19.b). En Cd21 se muestran los valores más bajos y aumentan en los siguientes días del tratamiento (Control,  $68.031 \pm 30.252$ ; Cd21,  $23.854 \pm 9.777$ ; Cd35,  $51.544 \pm 34.352$ ; Cd56,  $44.525 \pm 26.020$  u.a.).

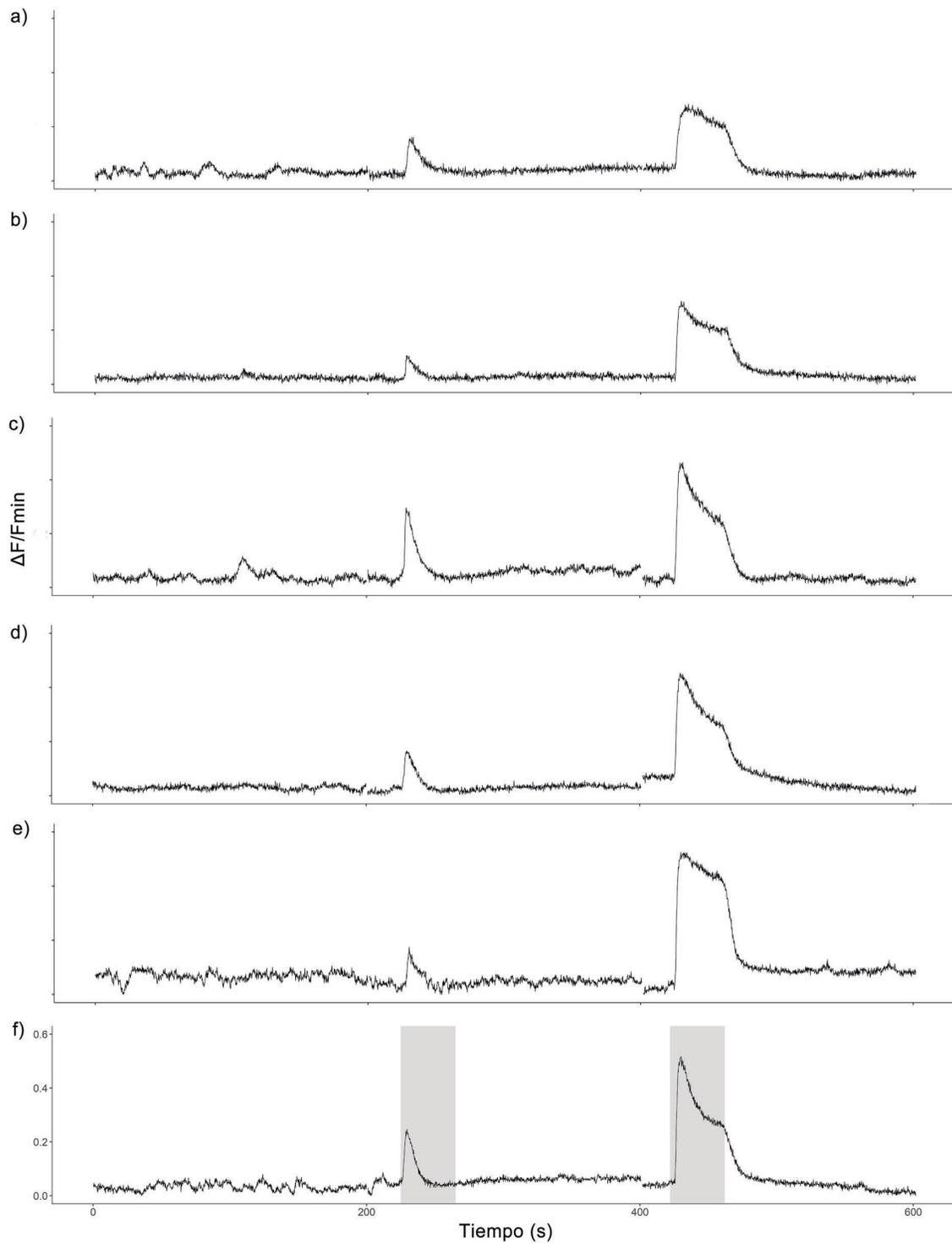
Es importante mencionar que existe una estrecha relación entre la IMF y el ABC de cada célula responsiva a GnRH. Las células que muestran mayor IMF, también muestran mayor ABC. Por el contrario, las células con valores bajos de IMF, también tienden a tener valores bajos de ABC.



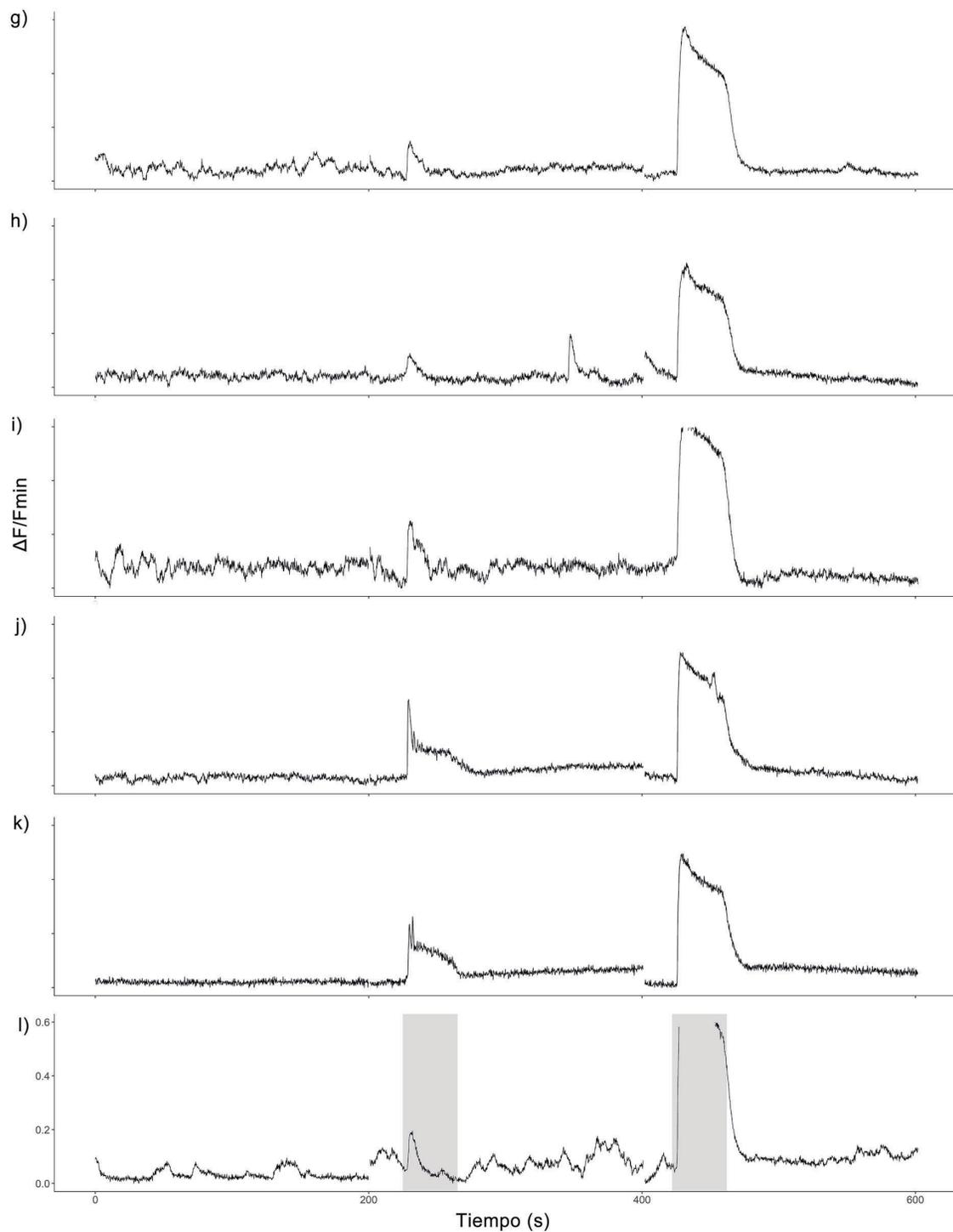
**Figura 15. Patrones de movilización de calcio del grupo control. a) - f)** Células que muestran el patrón oscilatorio de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. La respuesta a KCl 140 mM es bifásica. Las discontinuidades en el eje horizontal representan lavados de tres minutos. Ninguno de estos trazos muestra actividad basal. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



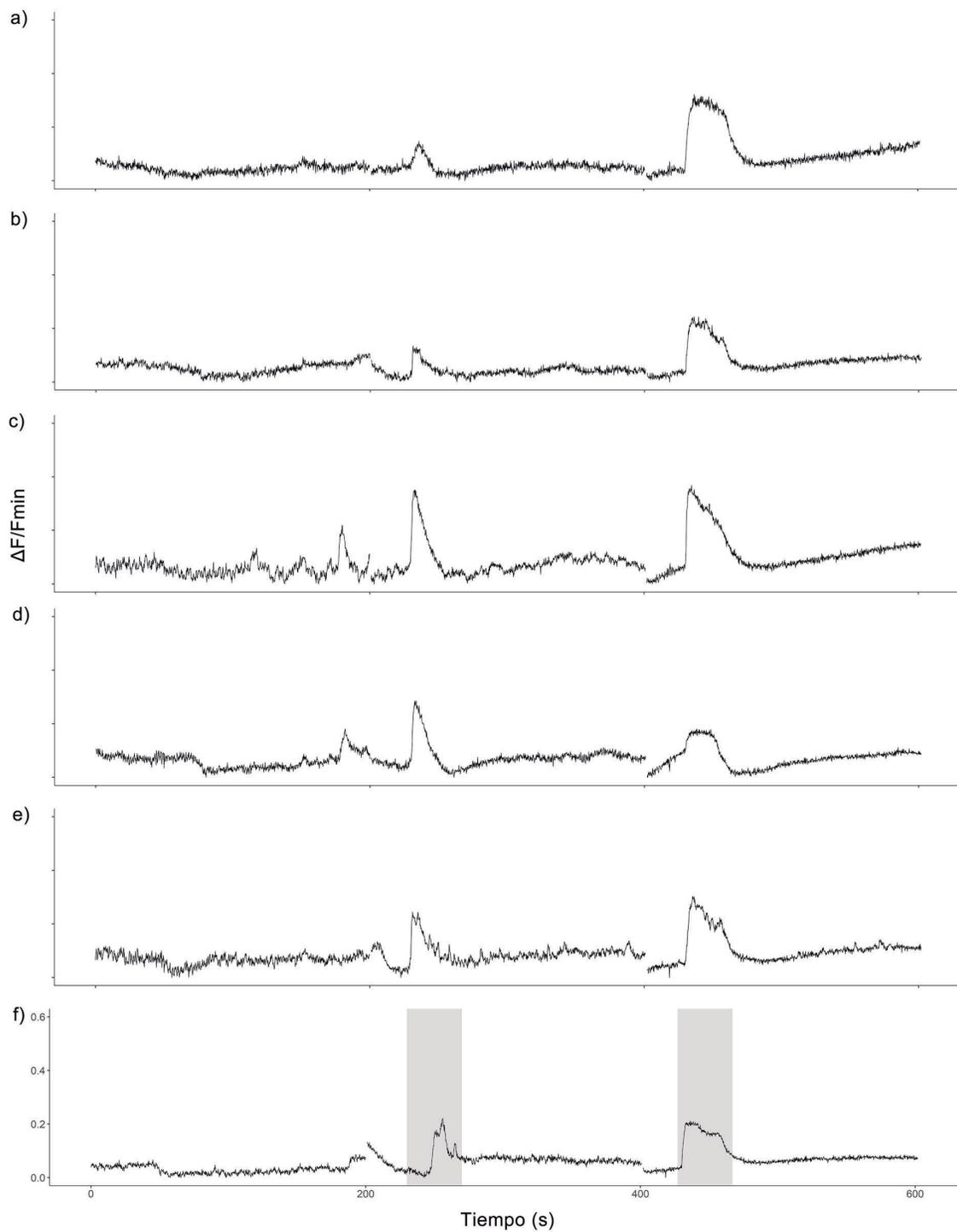
**Figura 15. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo control. g)** Célula con patrón oscilatorio de elevación de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. **h) - l)** Células que muestran el patrón bifásico. En **j)** se muestra una célula con actividad basal. **l)** Trazo representativo del patrón transitorio. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



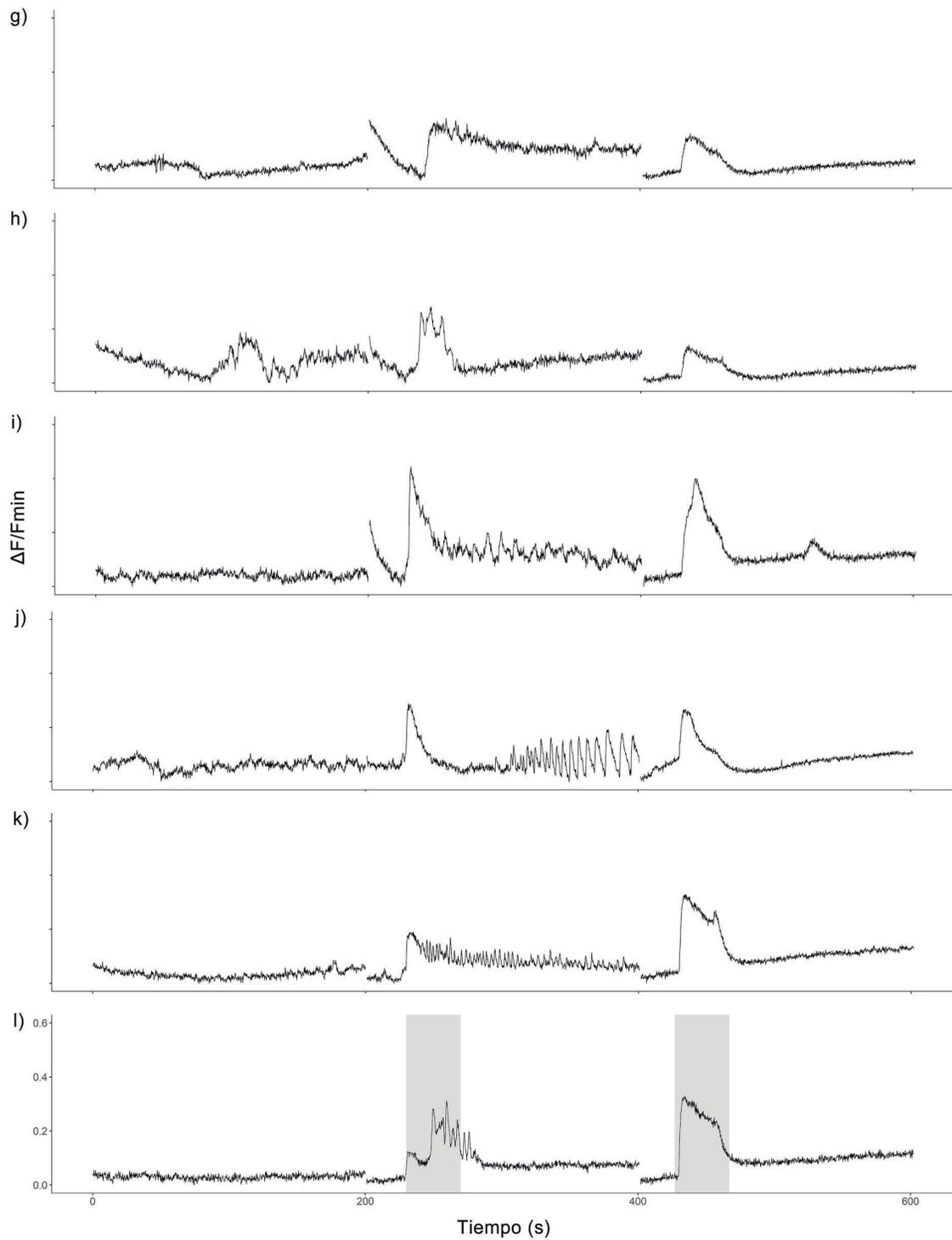
**Figura 16. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd21. a) - f)** Células que muestran el patrón bifásico de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. En todos los casos la respuesta a KCl 140 mM es bifásica. Las discontinuidades en el eje horizontal representan lavados de tres minutos y las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



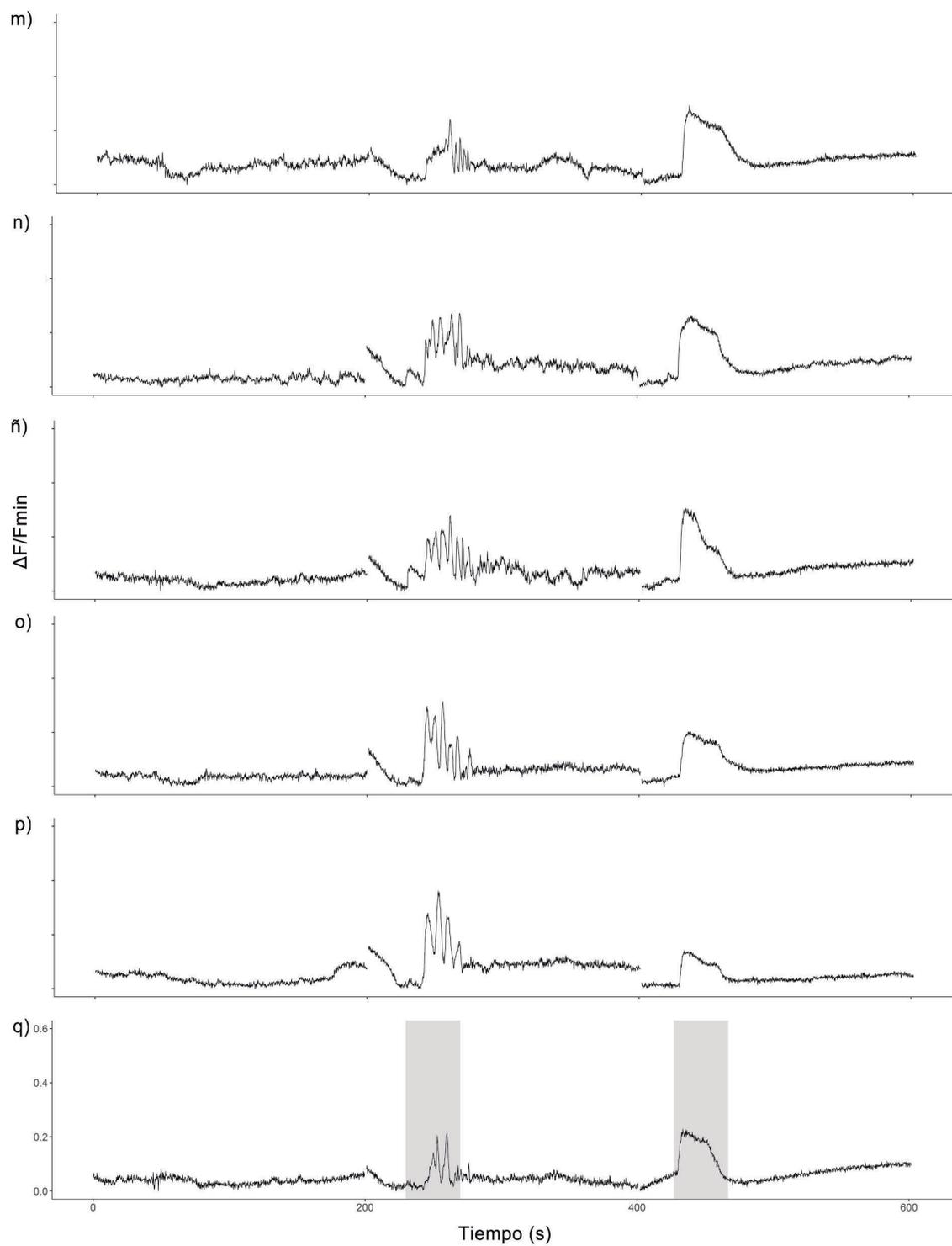
**Figura 16. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd21. g) - l)** Células con patrón bifásico de elevación de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. En **g), i)** y **l)** se muestran células con actividad basal. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



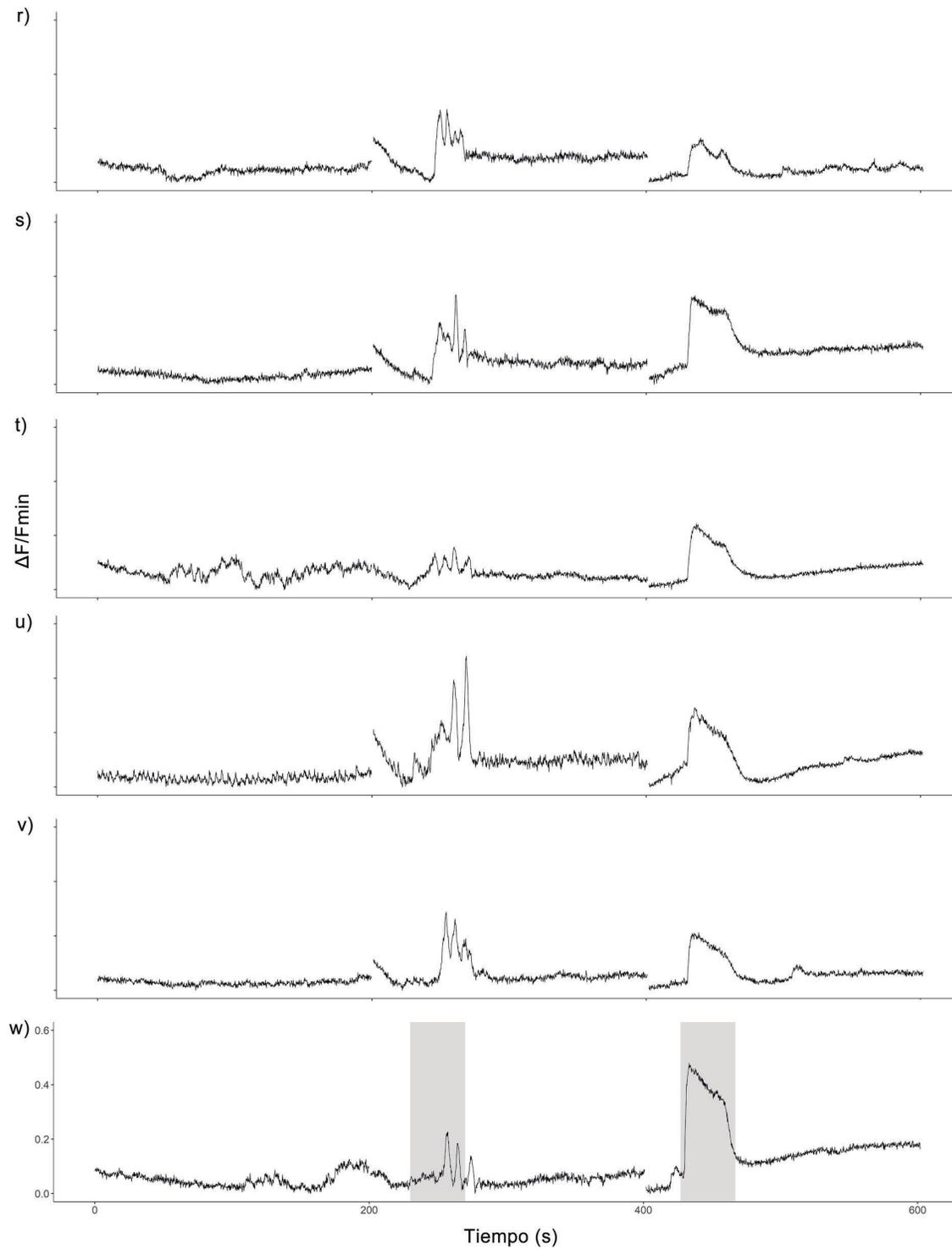
**Figura 17. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd35. a) - f) Células que muestran el patrón bifásico de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. En todos los casos la respuesta a KCl 140 mM es bifásica. En c), d) y e) se muestran células con actividad basal. Las discontinuidades en el eje horizontal representan lavados de tres minutos y las barras grises indican el tiempo de los estímulos.**



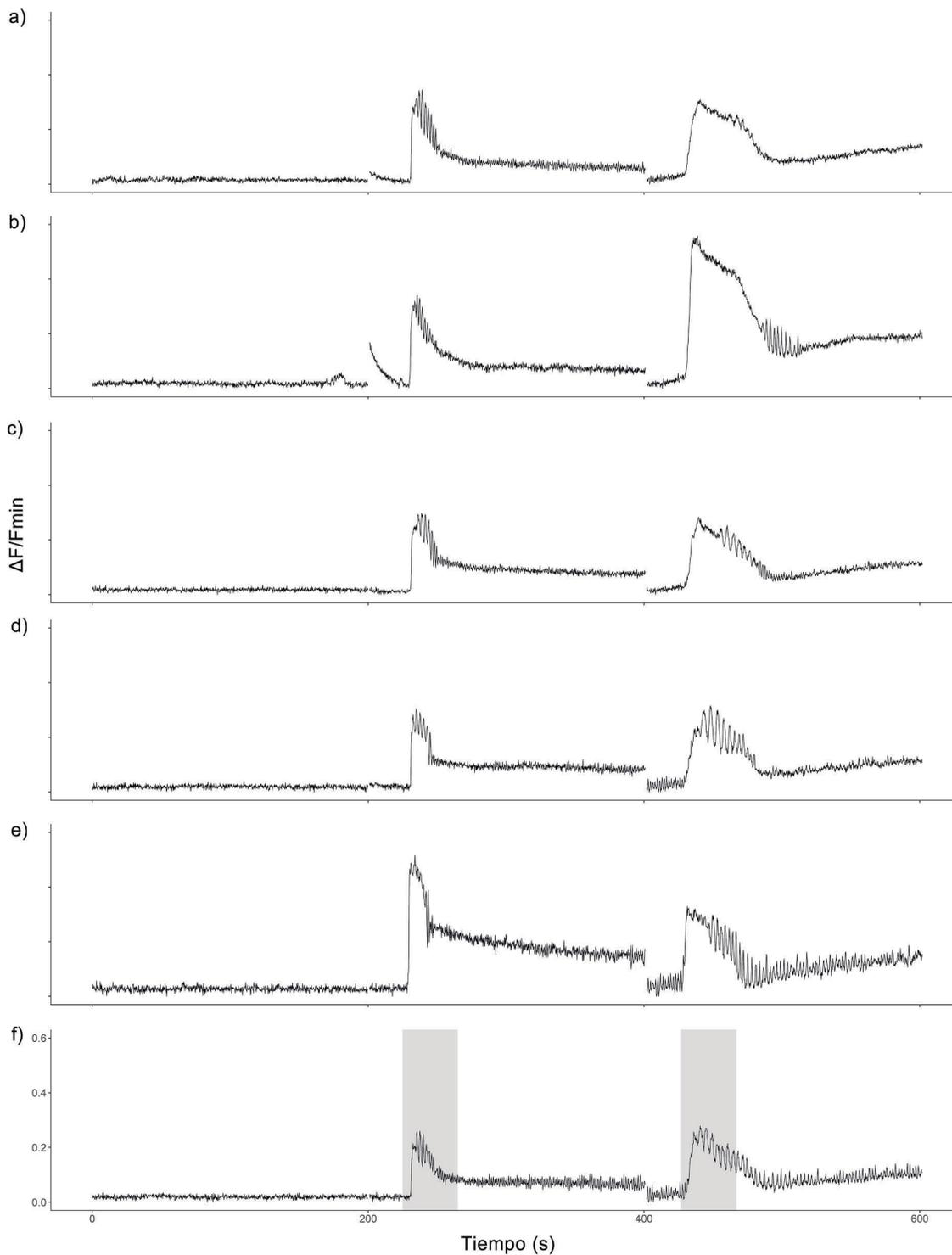
**Figura 17. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd35. g)** Célula con patrón bifásico de elevación de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. **h)** Célula con patrón oscilatorio. En **j)** y **k)** se muestran células con el patrón bifásico oscilatorio prolongado. **l)** Célula con patrón oscilatorio irregular. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



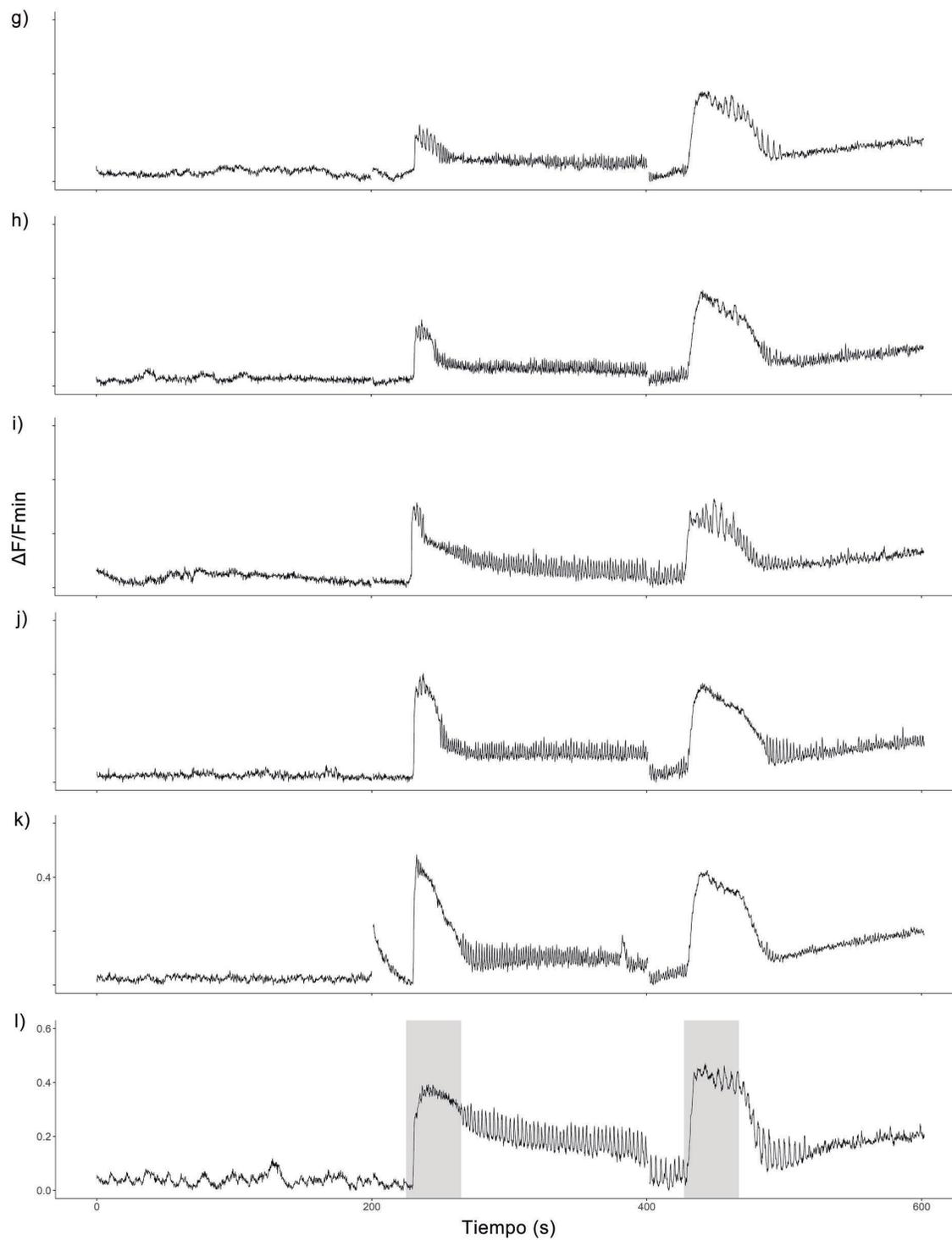
**Figura 17. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd35. m) - o)** Células con patrón oscilatorio irregular de elevación de calcio intracelular. En **p)** se muestran células con el patrón bifásico oscilatorio con pocas oscilaciones. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



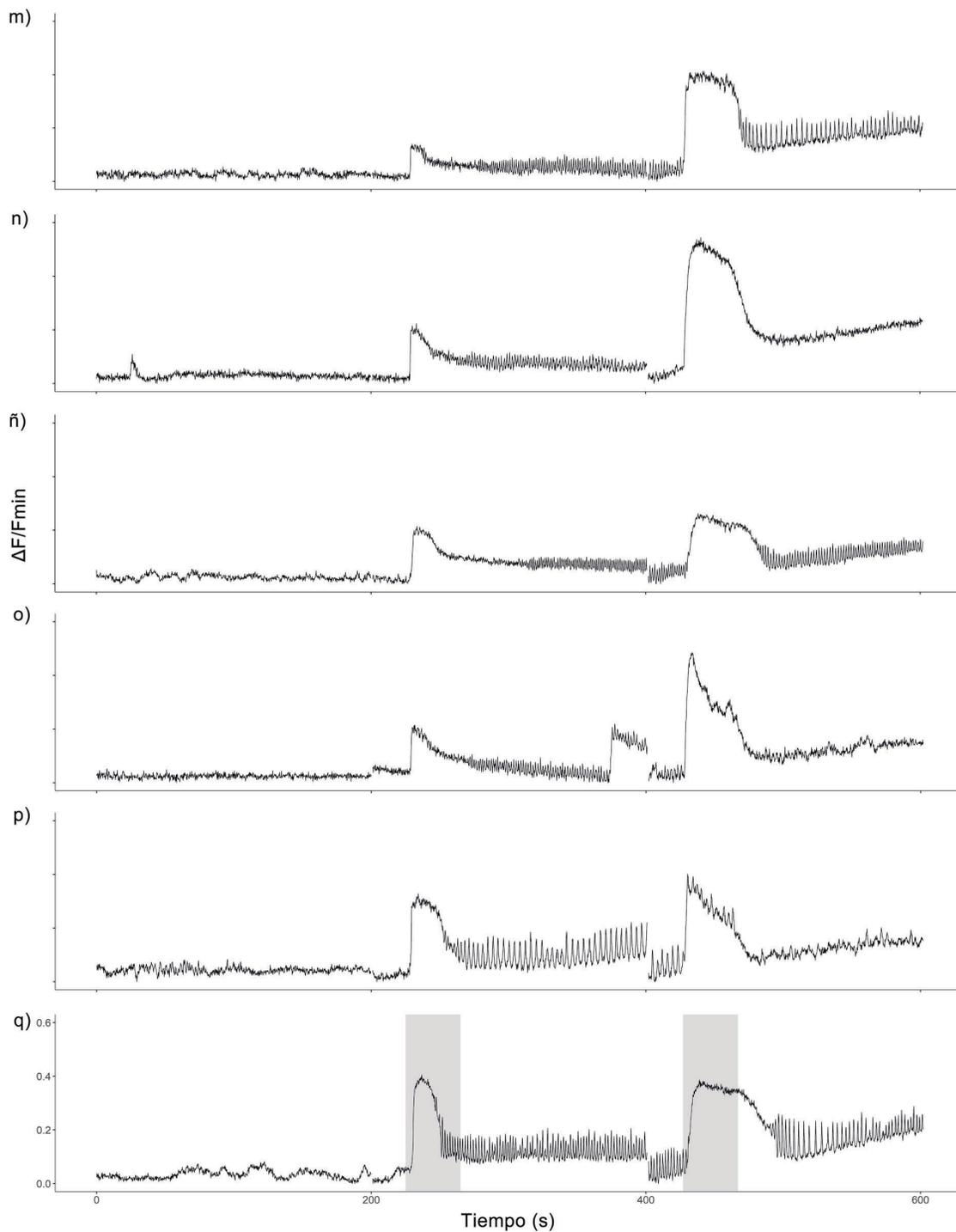
**Figura 17. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd35. r) - w) Células con patrón oscilatorio irregular de calcio ante GnRH. En u) se muestra una célula con actividad basal de transientes de calcio de poca amplitud, pero abundantes. La elevación de calcio ante el estímulo de potasio es bifásica en todos los trazos. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.**



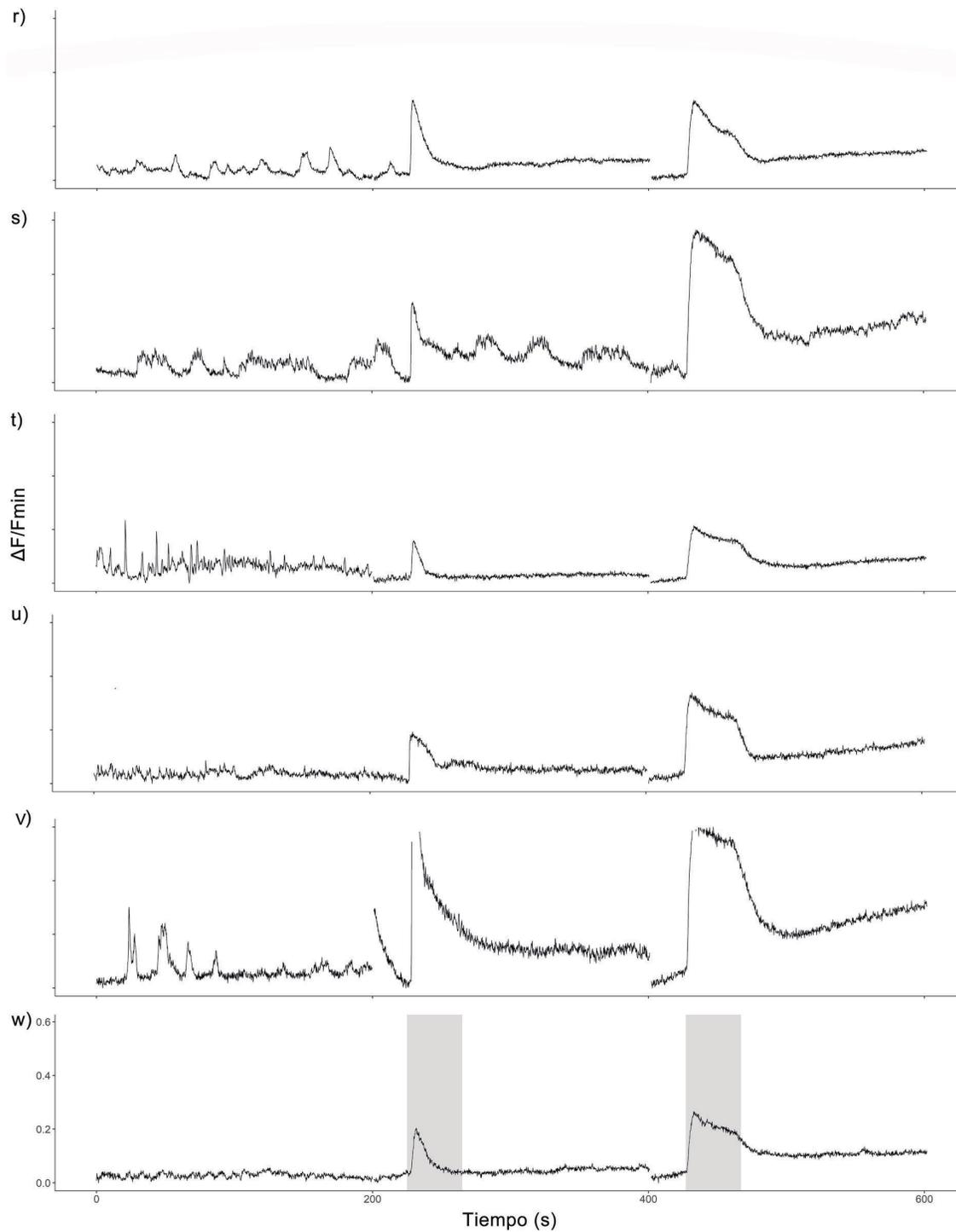
**Figura 18. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd56. a) - f)** Células que muestran el patrón oscilatorio de calcio ante el estímulo de GnRH 10 nM. La respuesta a KCl 140 mM puede ser bifásica como en **a)** o tener oscilaciones antes, durante o después del estímulo como en **b) - f)**. No se observa actividad basal en ningún trazo. Las barras grises indican el tiempo de los estímulos.



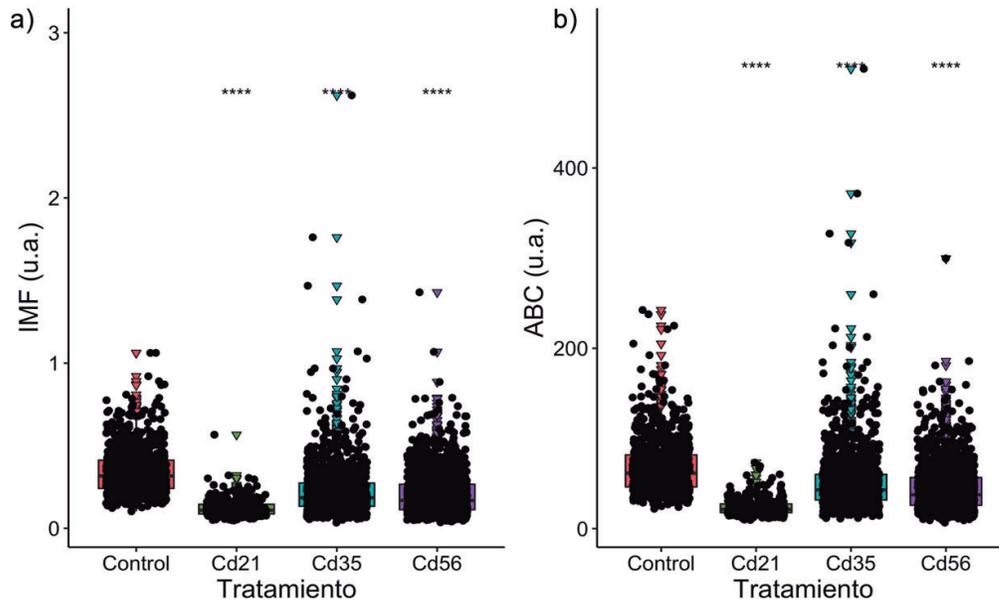
**Figura 18. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd56. g) - l)** Células con patrón oscilatorio prolongado de elevación de calcio ante GnRH. La respuesta a KCl 140 mM puede bifásica como en **k)** o tener oscilaciones antes, durante o después del estímulo como en **g) - j)** y **l)**. **l)** Actividad basal de calcio intracelular.



**Figura 18. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd56. m) - q)** Células con patrón oscilatorio prolongado de elevación de calcio ante GnRH. La respuesta a KCl 140 mM puede bifásica como en **n)** y **o)** o tener oscilaciones antes o después del estímulo como en **m)**, **ñ)**, **p)** y **q)**. En **n)**, **ñ)**, **p)** y **q)** se observa actividad basal de calcio intracelular.



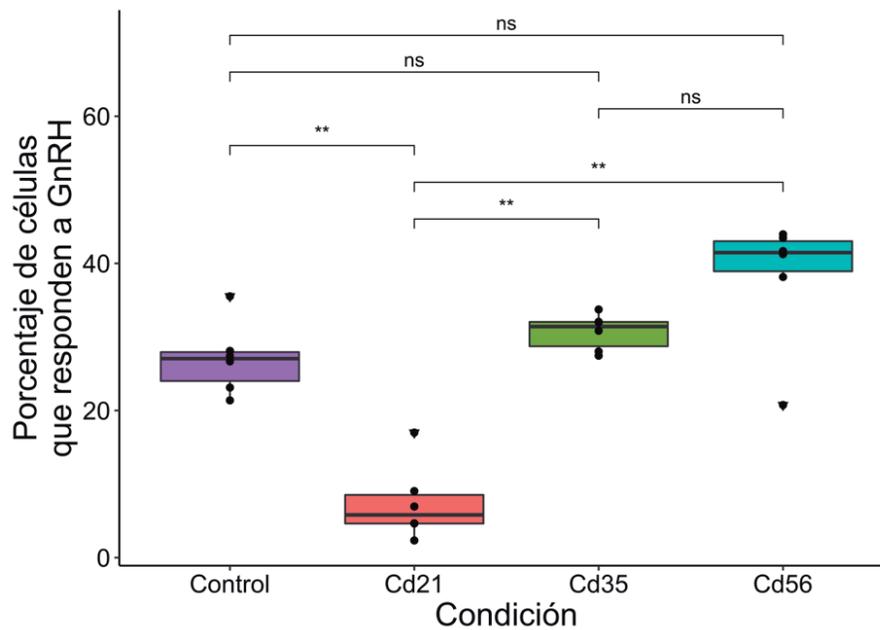
**Figura 18. Continuación. Patrones de movilización de calcio del grupo Cd56. r) - w)** Células con patrón bifásico de elevación de calcio ante GnRH. La respuesta a KCl 140 mM es bifásica sin oscilaciones en todos los casos. En r) - v) se observa actividad basal de calcio intracelular.



**Figura 19. IMF y ABC de los gonadotropos antes el estímulo de GnRH. a)** Comparación de la intensidad máxima de fluorescencia (IMF) entre el grupo control y los grupos inyectados con cadmio. **b)** Cambios en los valores de área bajo la curva de los gonadotropos en los grupos inyectados con cadmio comparados con el grupo control. Los datos presentados son los resultados de todos los animales registrados en calcio para cada condición. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comparación de grupos; \*\*\*\* $p < 2.2 \times 10^{-16}$ . Los triángulos representan posibles puntos fuera de rango.

### **Modificaciones en el patrón de movilización de calcio y porcentaje de células estimuladas con GnRH ante el efecto de cadmio**

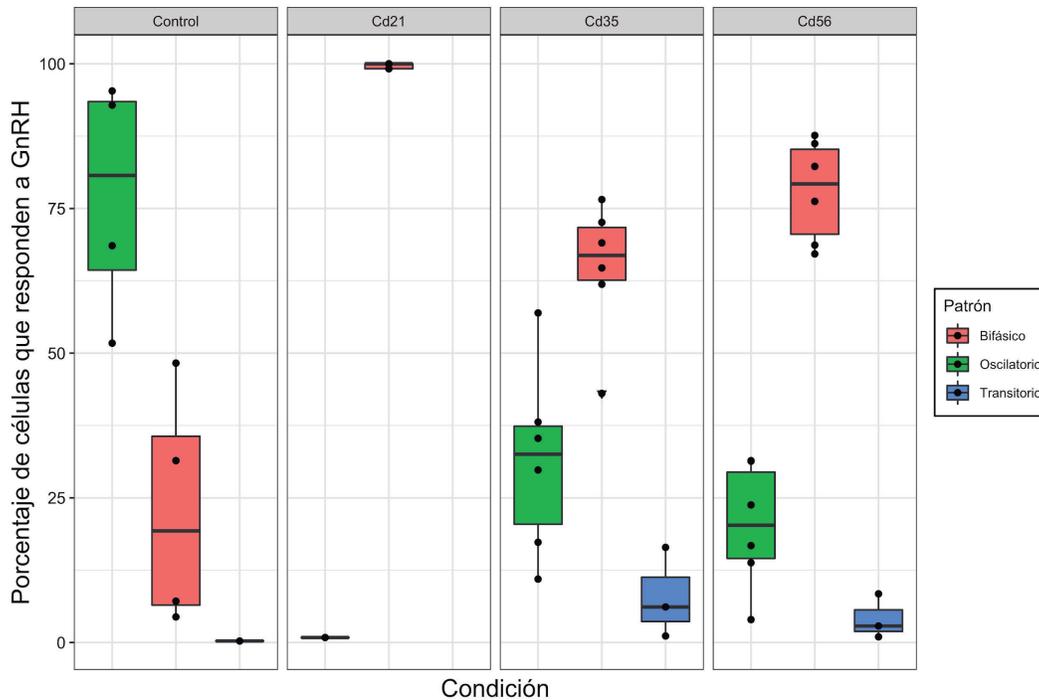
El número de células responsivas a GnRH aumenta en los siguientes días después de la administración de cadmio en los ratones. El porcentaje de células responsivas en la región ventral de la hipófisis en ratones en condiciones control es de  $27 \pm 4.91$ . Mientras que el porcentaje de células responsivas en ratones de 21 días después de la inyección de cadmio disminuye significativamente ( $7.44 \pm 5.21$ ) con respecto al control. Además, 35 y 56 días después de la inyección de cadmio, existe una tendencia al aumento de células responsivas,  $30.7 \pm 2.47$  y  $38.2 \pm 8.79$ , respectivamente (ver figura 20).



**Figura 20. Aumento en la cantidad de células que responden a GnRH después del tratamiento con cloruro de cadmio.** En el grupo Cd21, existe disminución en el número de células que responde a GnRH. Por el contrario, en los grupos Cd35 y Cd56, el número de células que responde a GnRH tiende a aumentar. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon,  $**p < 0.0022$  indican diferencias significativas; ns, diferencias no significativas.

Además del cambio en el total de células responsivas a GnRH por cadmio, también existen cambios en el tipo de patrón de movilización de calcio intracelular en los gonadotropos (ver figuras 15-18). En condición control, con GnRH a concentración de 10 nM, se observaron los patrones oscilatorio y bifásico como se ha reportado en la literatura para diferentes concentraciones de GnRH (ver figura 15 y 21).

Por otro lado, se observó un tercer patrón en el que la concentración de calcio aumenta rápidamente y disminuye rápidamente hasta regresar a niveles basales de calcio intracelular y al que aquí referimos como patrón transitorio (véase figura 21 y 15.1). En los ratones tratados con cadmio también se observaron estos tres patrones, aunque en distinta proporción.



**Figura 21. Cambios en la proporción de patrones de calcio por el tratamiento con cadmio.** Los patrones descritos como oscilatorio, bifásico y transitorio fueron identificados y presentados aquí como porcentajes, tomando como cien por ciento a todas las células que responden a GnRH.

Después del tratamiento con cadmio, la proporción de gonadotropos que presentan alguno de los tres patrones de movilización de cadmio cambia significativamente. En el grupo control, el patrón más frecuente fue el oscilatorio seguido por el patrón bifásico y muy pocas células presentan el transitorio. Después del tratamiento con cadmio en los ratones del grupo Cd21, la población de gonadotropos que presentan el patrón bifásico aumenta con respecto al control y se vuelve el patrón de respuesta más observado, pero no se observa en ningún caso el patrón transitorio (véase la figura 21). Para el caso del grupo Cd35, el patrón más recurrente fue el bifásico, pero es menor con respecto al grupo Cd21, y contrario a Cd21, se observa el patrón oscilatorio y también el transitorio en mayor proporción. En Cd56 el patrón de respuesta de tipo bifásica sigue siendo el más frecuente, seguido por el oscilatorio y después el transitorio (la figura 21 muestran cuantitativamente las proporciones descritas en ésta sección).

Un análisis sistemático del cambio en la proporción de patrones de movilización de calcio en los gonadotropos muestra que existe una transición de patrones con el tratamiento de cadmio. El patrón bifásico de movilización de calcio aumenta en animales tratados con cadmio, mientras que el oscilatorio disminuye significativamente y el patrón transitorio se mantiene en la misma proporción. En cada caso la comparación está hecha con respecto a la condición control y se resume en la tabla 4.

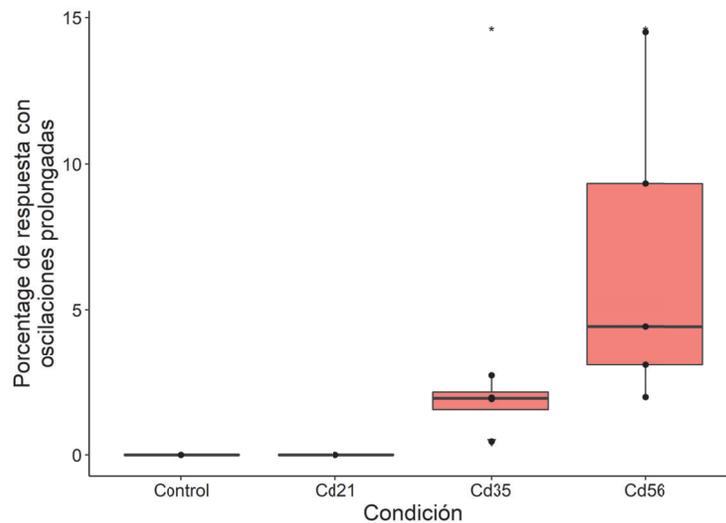
**Tabla 4. Cambio en la proporción de patrones de respuesta a GnRH con el tratamiento de cadmio**

Condición	Patrón de respuesta	Porcentaje de células	<i>p</i> de significancia con respecto al control (Mann-Whitney-Wilcoxon)
Control	Bifásico	22.81	
Cd21	Bifásico	99.65	0.0175
Cd35	Bifásico	64.65	0.019
Cd56	Bifásico	78.02	0.0095
Control	Oscilatorio	77.12	
Cd21	Oscilatorio	0.86	0.0175
Cd35	Oscilatorio	31.40	0.019
Cd56	Oscilatorio	20.17	0.00952
Control	Transitorio	0.26	
Cd21	Transitorio	0	0.371
Cd35	Transitorio	7.90	0.337
Cd56	Transitorio	4.08	0.337

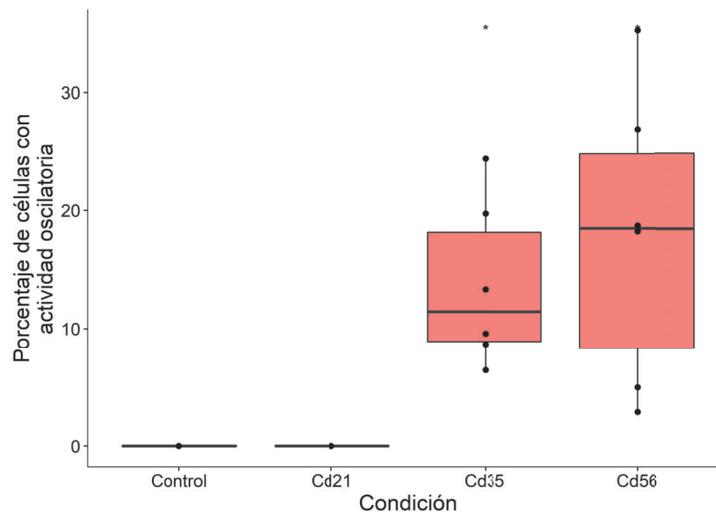
Por otro lado, en los grupos tratados con cadmio, en algunas células, las oscilaciones del patrón oscilatorio y del bifásico oscilatorio se prolongan por mayor tiempo, incluso pueden observarse hasta el final del registro de calcio (ver figuras 17.j y k, y 18.f-q). Cabe resaltar que estas oscilaciones prolongadas se presentan cuando el GnRH ya no está presente en la cámara de perfusión. Estos patrones de oscilaciones prolongadas se observan en los grupos Cd35 y Cd56, pero no en los grupos control y Cd21. En el grupo Cd35 las oscilaciones

prolongadas representan el  $1.754 \pm 0.946$  por ciento del total de células que responden a GnRH y en Cd56 el  $6.661 \pm 5.2$  por ciento (ver figura 22).

También se observó que en los grupos a los que les fue inyectado cadmio, los gonadotropos muestran oscilaciones durante los registros en los que se da el estímulo de alto potasio (figura 17 y 18). Las oscilaciones de calcio en el registro de alto potasio pueden observarse en tres momentos distintos del estímulo. a) antes de que comience, b) durante o c) después de retirarlo. Éstas oscilaciones en algunas células se observan sólo durante el estímulo, mientras que, en otras, las oscilaciones pueden prolongarse durante todo el registro de calcio. Las oscilaciones fueron observadas en los grupos Cd35 y Cd56, pero no en control y Cd21 (figura 23).



**Figura 22. Proporción de células con oscilaciones prolongadas con el estímulo de GnRH.** Se muestra el porcentaje de células en las que el incremento de calcio intracelular es oscilatorio y sostenido, incluso cuando el estímulo de GnRH ya no está presente. Los porcentajes se obtuvieron tomando al total de células que responden a GnRH (10 nM) como el cien por ciento. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comparación de grupos;  $*p < 0.021$  con respecto al grupo control.



**Figura 23. Oscilaciones de calcio intracelular durante los registros con estímulo de alto potasio.** La movilización de calcio de los gonadotropos de los animales expuestos a cadmio muestra un patrón diferente al ser estimulados con alto potasio. En los grupos Cd35 y Cd56 se observan oscilaciones de calcio antes, durante y/o después del estímulo con potasio (140 mM). Los porcentajes se obtuvieron tomando al total de células que responden a GnRH (10 nM) como el cien por ciento. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comparación de grupos; \* $p = 0.011$  con respecto al grupo control.

Cabe resaltar que la proporción de células que tienen actividad oscilatoria en el estímulo de potasio es mayor que la proporción de células que tienen la actividad oscilatoria prolongada en GnRH (compárese la figura 22 con la 23). En el grupo Cd35, el porcentaje de células que presentan actividad oscilatoria en el registro de alto potasio (tomando como cien por ciento a las células que respondieron a GnRH) es de  $13.596 \pm 7.02$  y en Cd56 es  $17.81 \pm 12.46$ . Esto quiere decir que no solo las células que muestran el patrón oscilatorio prolongado durante el estímulo de GnRH son las células que muestran oscilaciones en potasio.

Además, algunas células con oscilación en potasio muestran este patrón desde el inicio del registro (véase, por ejemplo, figura 18.1, m y q), por lo que parecería indicar que las oscilaciones son producto del estímulo con GnRH y cuando llega el estímulo de alto potasio se suma a éste último. Además, no se observan oscilaciones en potasio en células que no

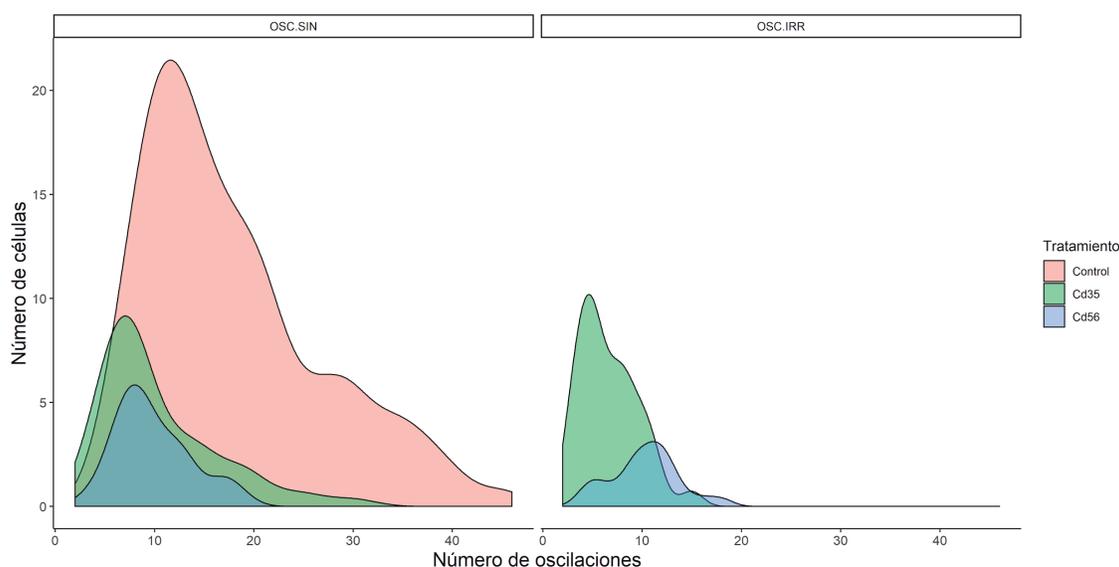
responden a GnRH. Por otro lado, hay células que oscilan solo cuando el estímulo de potasio está presente y no antes.

Sin tomar en cuenta las células que muestran oscilaciones prolongadas de calcio, en las células con respuesta del tipo oscilatoria el número de oscilaciones también cambia. El número de oscilaciones se midió en una ventana de tiempo de 50 segundos a partir del estímulo con GnRH, dado que en general, es en éste tiempo que la mayoría de los gonadotropos dejan de oscilar. Estas oscilaciones comienzan con una subida rápida del calcio intracelular seguida por subidas y bajadas de la concentración de calcio de forma sinusoidal. Las oscilaciones sinusoidales observadas en este trabajo son diferentes a las observadas en células en cultivo dado que no regresan al nivel basal de calcio, en cambio, se observa que los picos van teniendo una amplitud menor y una bajada más cercana al nivel basal de calcio a medida que pasa el tiempo, con una tendencia de exponencial negativa (compárese la figura 5 con los trazos de la figura 15.a-f).

Otro tipo de oscilaciones observadas en este trabajo son las referidas como oscilaciones irregulares debido a que no siguen la tendencia de exponencial negativa. Es decir, pueden presentarse primero oscilaciones de poca amplitud seguidas por unas de mayor amplitud en algunas células, o de poca y mayor amplitud de forma intercalada en otras. Las oscilaciones irregulares fueron observadas en las condiciones Cd35 y Cd56, pero no en Cd21 o en el grupo control (ver figuras 17 y 18). El número de oscilaciones que muestran estos gonadotropos es menor con respecto a las oscilaciones sinusoidales (figura 24).

En condiciones control, el número de oscilaciones sinusoidales va de tres a más de 45, siendo las más comunes entre 10 y 15. En la mayoría de los casos, el segundo pico oscilatorio es el

de mayor intensidad. En cambio, en los grupos tratados con cadmio la gama de oscilaciones sinusoidales en los gonadotropos es menor con respecto al control. En Cd35 pueden llegar hasta 35, mientras que en Cd56 son hasta 25. El número de oscilaciones sinusoidales más frecuentes en los tratamientos no es mayor a 10 (ver figura 24).



**Figura 24. Número de oscilaciones en los gonadotropos.** La diversidad en el número de oscilaciones presentadas por las células ante GnRH disminuye en los animales tratados con cadmio. También puede observarse que el número de células del patrón oscilatorio es menor en condiciones de cadmio. OSC.SIN, oscilaciones sinusoidales; OSC.IRR, oscilaciones irregulares, ver explicación en el texto.

### **Las oscilaciones prolongadas de calcio no son un mecanismo del oscilador de membrana de los gonadotropos**

Para probar si las oscilaciones prolongadas de calcio provienen de los reservorios internos de los gonadotropos o debido a la entrada del medio extracelular a través de canales de calcio, se realizaron pruebas farmacológicas para bloquear la entrada de calcio del medio extracelular.

En este experimento se realizaron dos estímulos con GnRH a la glándula hipófisis: el primero de GnRH 10 nM y el segundo con nifedipina 20  $\mu$ M (bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje) seguido por de la combinación de GnRH (10 nM) y nifedipina (20  $\mu$ M). Sin embargo, para estar seguros de que el efecto del segundo estímulo en las células es

propriadamente de la nifedipina y no del efecto de la desensibilización del primer estímulo de GnRH, o del efecto sinérgico de la desensibilización y la nifedipina, primero se realizaron pruebas para conocer el tiempo de recuperación de la sensibilidad de los gonadotropos.

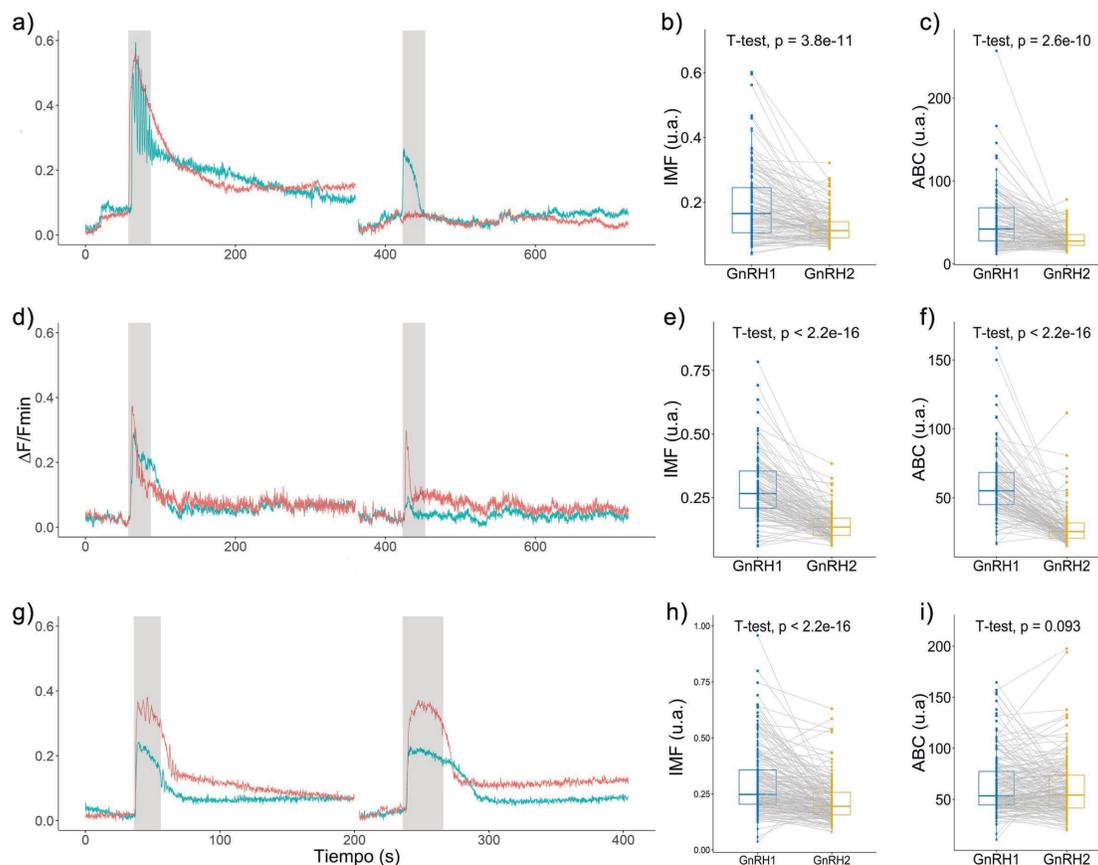
El proceso de resensibilización de los gonadotropos a GnRH se probó mediante dos estímulos de GnRH separados por un periodo de lavado con solución Ringer. Los estímulos de GnRH se realizaron durante el mismo tiempo (30 segundos) y con la misma concentración (10 nM). Se consideró que la sensibilidad de las células se había recuperado cuando el área bajo la curva (ABC) y la intensidad máxima de fluorescencia (IMF) era la misma (estadísticamente) en los dos estímulos de GnRH.

De los experimentos de desensibilización y resensibilización se observó que el tiempo óptimo de recuperación de los gonadotropos es de 50 minutos. Se realizaron experimentos en los que el tiempo de recuperación (lavados con Ringer) se fijó en 15 y 30 minutos, sin embargo, los valores de ABC y la IMF fueron menores en el segundo estímulo ( $p < 0.05$ , ver figura 25.a-f). Por otro lado, en los ensayos donde el reposo previo al segundo estímulo de GnRH fue de 50 minutos, los parámetros de ABC y IMF son significativamente similares ( $p > 0.05$ , véase figura 25.g-i). De esta forma, para las pruebas con nifedipina, se realizaron lavados de 50 minutos entre el estímulo de GnRH y el de la combinación de GnRH y nifedipina.

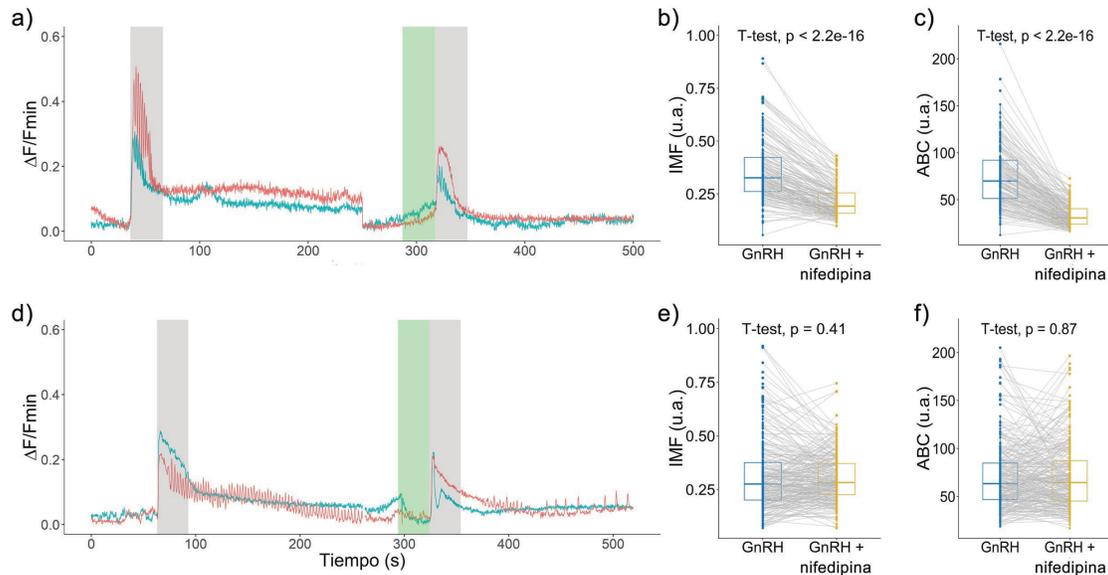
Se realizaron registros de calcio en los que se aplicó 20  $\mu$ M de nifedipina en el baño por 30 segundos, seguidos por una combinación de GnRH (10 nM) más nifedipina (20  $\mu$ M) como se muestra en la figura 26. La nifedipina es un potente bloqueador de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. De estos resultados, se observa (figura 26.a-c) que en el grupo control, se produce una disminución significativa en la respuesta de GnRH al aplicarse la

nifedipina. En el caso de los animales tratados con cadmio, a pesar de existir una reducción, esta no es significativa y lo que se observa es que las oscilaciones disminuyen su frecuencia, pero continúan cuando los CCV tipo L son bloqueados a través de nifedipina (figura 26.a-c).

Otros ejemplos de trazos de movilización de calcio se muestran en la figura 27.



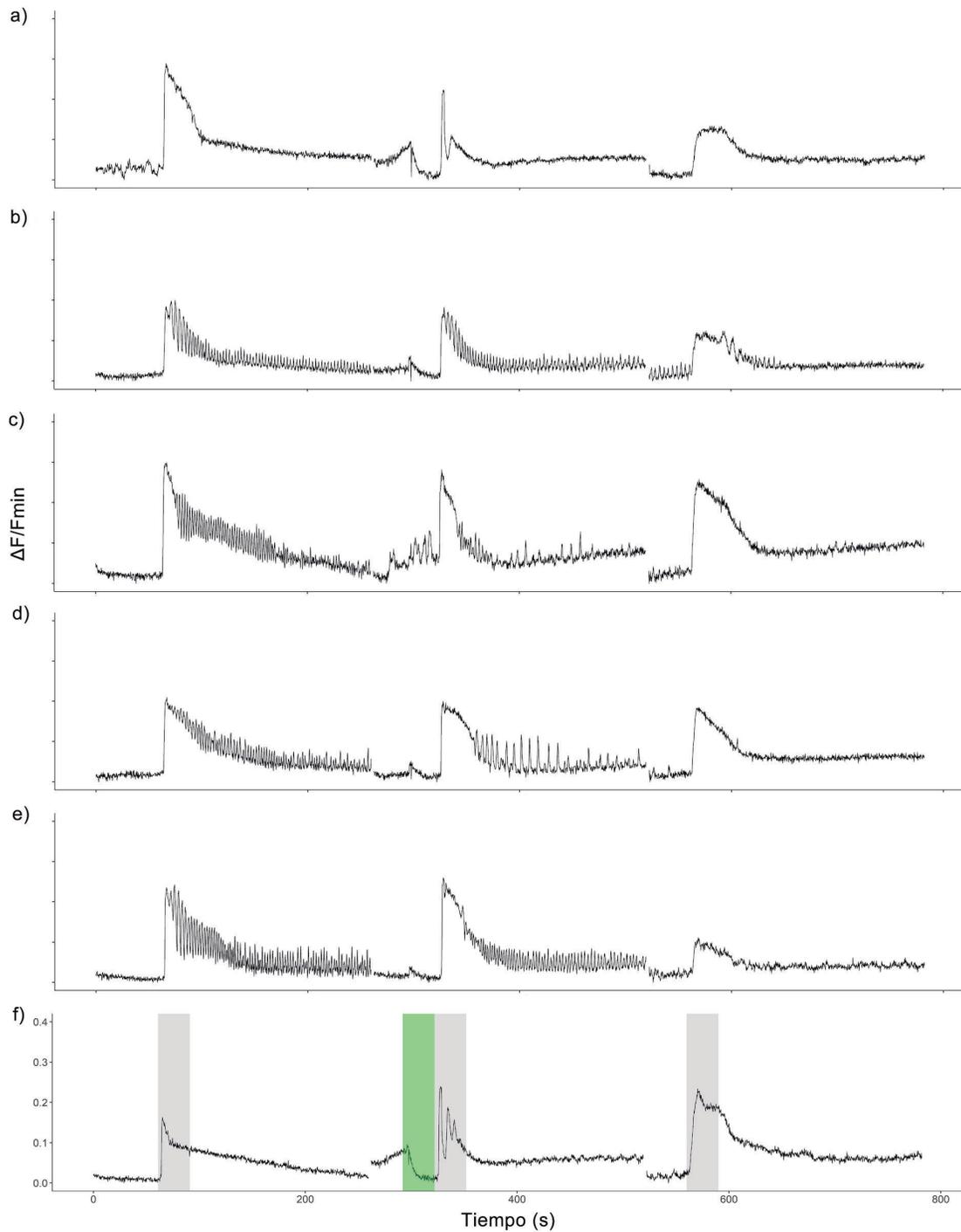
**Figura 25. Desensibilización y resensibilización de los gonadotropos a GnRH.** a) - c) Trazos individuales de calcio ante GnRH, IMF y ABC con 15 minutos de lavado entre estímulos, respectivamente. d) - f) Lavado de 30 minutos de lavado. g) - i) Lavado de 50 minutos. Prueba t de Student pareada, los valores de  $p$  se muestran para cada imagen. Las barras de color gris en los trazos individuales corresponden a los estímulos de GnRH de 30 segundos.



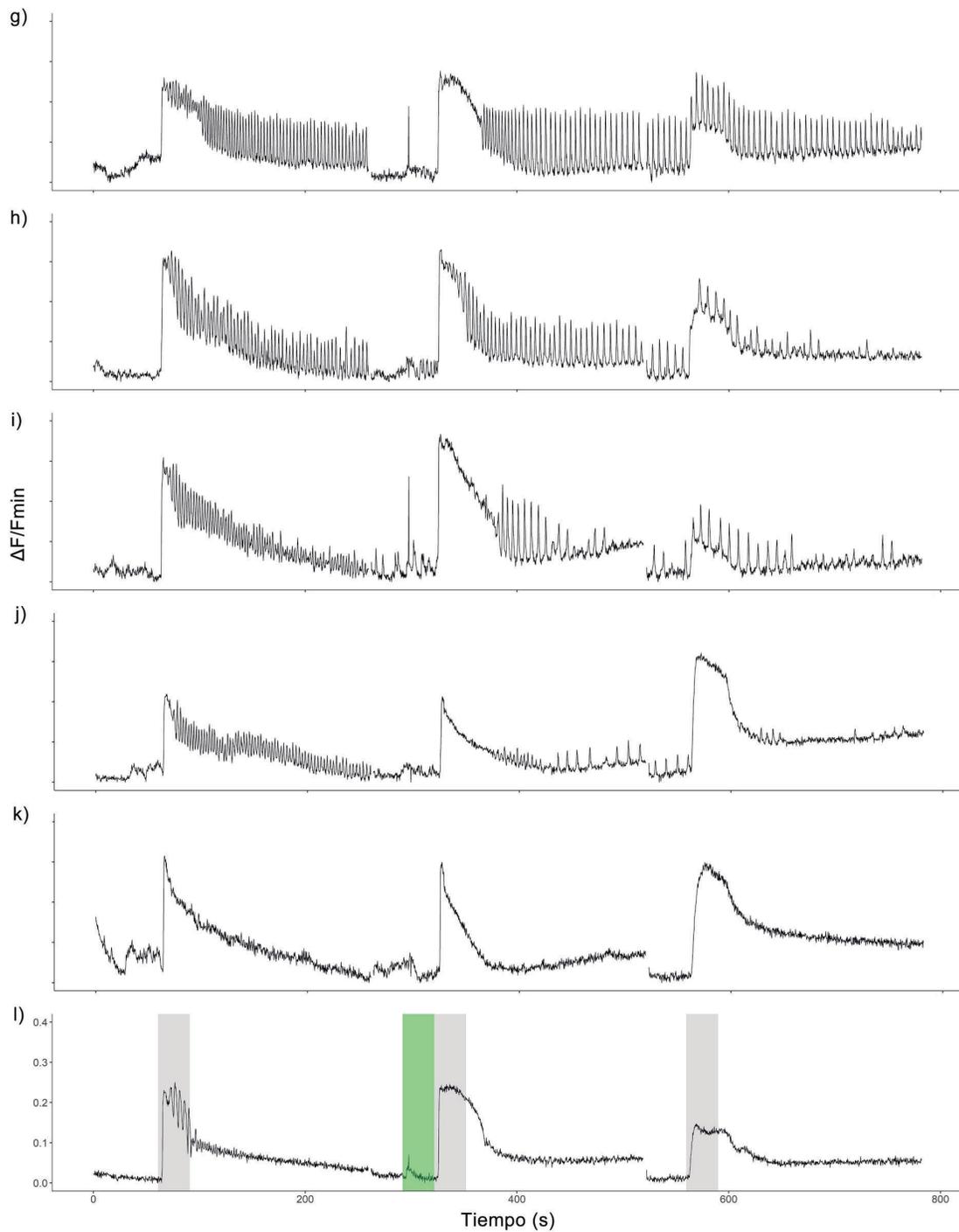
**Figura 26. Efecto de la nifedipina en la movilización de calcio.** La nifedipina bloquea la entrada de calcio extracelular a través de los canales de calcio tipo L. En condición control, la interrupción del aporte extracelular de calcio, reduce la movilización de calcio intracelular en los gonadotropos como de muestra en **a)** y se ve reflejado en la IMF y el ABC, **b)** y **c)**. En el grupo Cd56, estos parámetros no se ven afectados significativamente **d) - f)**. Los ejemplos corresponden a los gonadotropos de un ratón del grupo control y uno de CD56. Lavados entre estímulos de GnRH fueron de 50 minutos. Primera barra gris corresponde al estímulo de GnRH; segunda barra gris corresponde a la combinación de GnRH y nifedipina; barra verde corresponde al estímulo de nifedipina. Prueba t de student pareada, los valores de  $p$  se muestran para cada imagen.

### La sincronización de la respuesta de calcio con GnRH en los gonadotropos disminuye en días posteriores a la inyección de cadmio

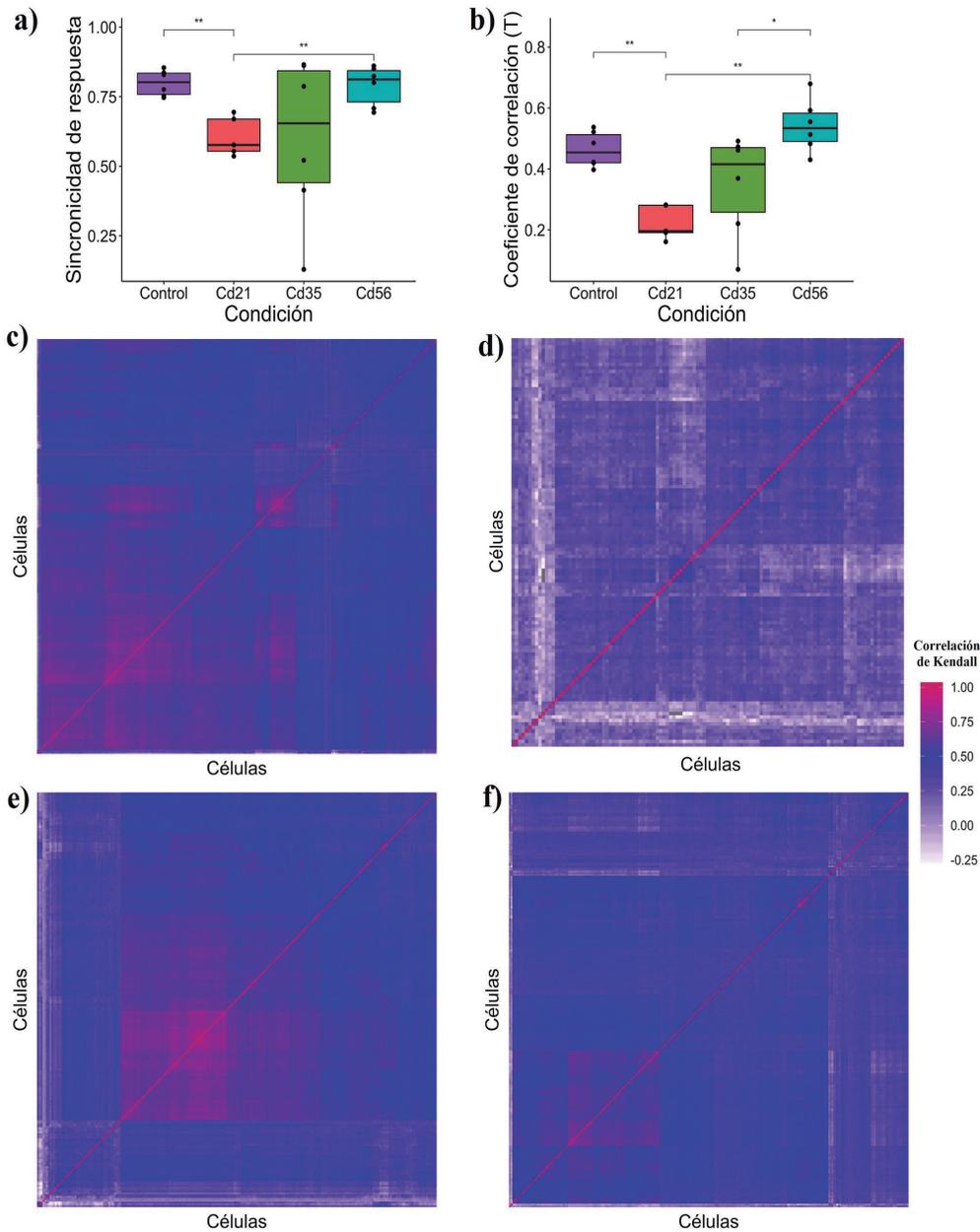
Dado que la coordinación de respuesta a GnRH en los gonadotropos es fundamental para la secreción de gonadotropinas, se cuantificó la coordinación de las señales de calcio en células que respondieron a GnRH usando el programa “synchrony”. La sincronización de la respuesta a GnRH en los gonadotropos fue medida dividiendo la varianza de las señales de calcio de la población de gonadotropos entre la suma de las varianzas cuadradas de cada gonadotropo. De tal forma que el valor de sincronización en los gonadotropos va de 0 (si la respuesta a GnRH no está sincronizada) a 1 (la respuesta está perfectamente sincronizada) (figura 28.a).



**Figura 27. Efecto de la nifedipina en las oscilaciones prolongadas de calcio en el grupo Cd56. a) - f)** Ejemplos de células con patrón oscilatorio prolongado y bifásicos de elevación de calcio ante GnRH. La respuesta a KCl 140 mM con oscilaciones tampoco se pierde con la nifedipina. Lavados entre estímulos de GnRH fueron de 50 minutos. Primera barra gris corresponde al estímulo de GnRH; segunda barra gris corresponde a la combinación de GnRH y nifedipina; barra verde corresponde al estímulo de nifedipina.



**Figura 27. Continuación. Efecto de la nifedipina en las oscilaciones prolongadas de calcio en el grupo Cd56. g) - l)** Ejemplos de células con patrón oscilatorio, oscilatorio prolongado y bifásicos de elevación de calcio ante GnRH. La respuesta a KCl 140 mM con oscilaciones tampoco se pierde con la nifedipina.



**Figura 28. Actividad coordinada de movilización de calcio ante el estímulo de GnRH.** **a)** Valor de sincronía promedio entre la actividad de calcio intracelular de las células que responden a GnRH (\*\* $p < 0.0087$ ; Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon). Nótese la alta variabilidad en el grupo Cd35. La sincronicidad de la respuesta a GnRH en los gonadotropos es medida dividiendo la varianza de las señales de calcio de la población de gonadotropos entre la suma de las varianzas cuadradas de cada gonadotropo. **b)** Promedio del coeficiente de correlación de Tau (Correlación de Kendall) para las células que responden a GnRH en el grupo control y los tratados con cadmio (\* $p = 0.026$ , \*\* $p = 0.0043$ ; Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon). Nótese la alta variabilidad en el grupo Cd35. Cada punto representa el valor promedio de correlación de una hipótesis. **c) - f)** Matriz de correlación (Kendall) de un registro de calcio por condición de las células responsivas a GnRH, con alrededor de 200 células por condición.

En condición control, se observa que la actividad de calcio de las células que responden a GnRH está sincronizada, aunque nunca se obtiene el valor de 1. En cambio, 21 días después de la inyección de cadmio, además de que el número de células que responde a GnRH disminuye, la actividad de calcio en las células no parece ser sincronizada (figura 28). Pero en los días siguientes, Cd35 y Cd56, la respuesta coordinada de calcio a GnRH se recupera. Cabe resaltar que en Cd35, aunque el valor promedio de sincronización incrementa con respecto a Cd21, se observa gran variabilidad entre individuos.

Para corroborar los resultados obtenidos con el modelo de sincronización, se evaluó la asociación y la consistencia temporal de la respuesta de calcio de los gonadotropos a través de la correlación de rangos de Kendall. Consistente con el primer método, la media de correlación (tau) del grupo control y de los grupos con el tratamiento de cadmio, el coeficiente de correlación de la actividad de calcio disminuye en el grupo Cd21, pero no es significativamente diferente en Cd35 y Cd56 con respecto al grupo control (figura 28).

### **Cambios en el tamaño de las células y la cantidad de LH y FSH que sintetizan**

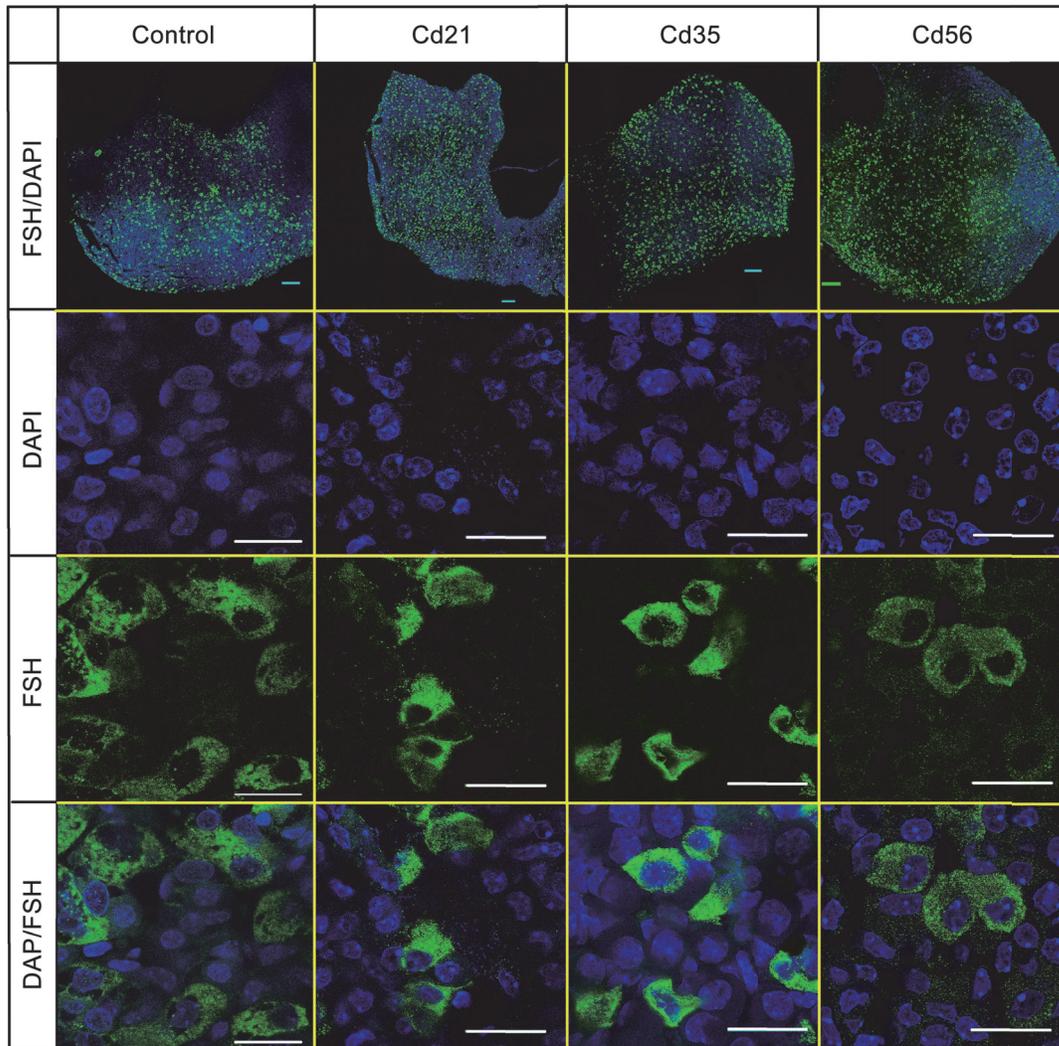
Con el propósito de caracterizar los posibles cambios morfológicos, de secreción y proliferación celular con las modificaciones fisiológicas descritas en los párrafos anteriores, se realizaron inmunotinciones de las hormonas FSH y LH, que son sintetizadas y secretadas por los gonadotropos. Como se mencionó en los antecedentes, éstas dos gonadotropinas están formadas por dos subunidades, siendo la subunidad  $\beta$  la que les da especificidad, por lo tanto los anticuerpos utilizados en éste trabajo son específicos para ésta subunidad.

La distribución de los gonadotropos que sintetizan LH y FSH ocupan toda la región ventral de la hipófisis como se muestra en las figuras 29 y 30. Sin embargo, parecen existir regiones

que están más densamente pobladas. Un acercamiento a las células revela que existen diferencias en la distribución de las hormonas FSH y LH, dando lugar a una aparente diferencia en la forma de las células. La marca de FSH presenta una distribución irregular con proyecciones del citoplasma en varias direcciones, incluyendo otras células con FSH (figura 29). Además, éstos gonadotropos generalmente se encuentran adyacentes a otros gonadotropos formando pequeños grupos de 4 a 6 células y que rodean a un capilar (no mostrado en la imagen). Por otro lado, los gonadotropos que sintetizan LH tienen una forma más bien ovalada y en la que no se observan protrusiones citoplasmáticas como en FSH (figura 30). Las células de LH también se distribuyen por toda la región ventral de la hipófisis, con algunas regiones en las que la presencia de éstos gonadotropos es más densa. La relación entre células LH se forma a través del contacto físico entre ellas, formando una red que se extiende por toda la región ventral (ver figura 30).

Dado que en los registros de calcio realizados en la región ventral de la glándula mostró un aumento en el número de células que respondió a GnRH con la administración de cadmio, se consideró importante cuantificar si existía un aumento en el número de células que sintetizan FH y LH. Como primera aproximación, puesto que el número de células por rebanada es muy grande (alrededor de 4000 células por rebanada), se realizó una cuantificación automática a través de diferentes algoritmos como CellProfiler, StarDist, DRAQ5, entre otros. Sin embargo, la segmentación de las imágenes contenía muchos errores principalmente por la forma de las células y la proximidad entre ellas; esto impidió segmentar efectivamente las marca de LH, FSH y DAPI, éste último para crear los porcentajes de células positivas a LH y FSH con respecto al total de núcleos. De manera alternativa, se realizó una selección manual de las imágenes usando ImageJ y en las que la normalización del número de células se realizó con respecto al área total de la rebanada de hipófisis que se estaba cuantificando. Además,

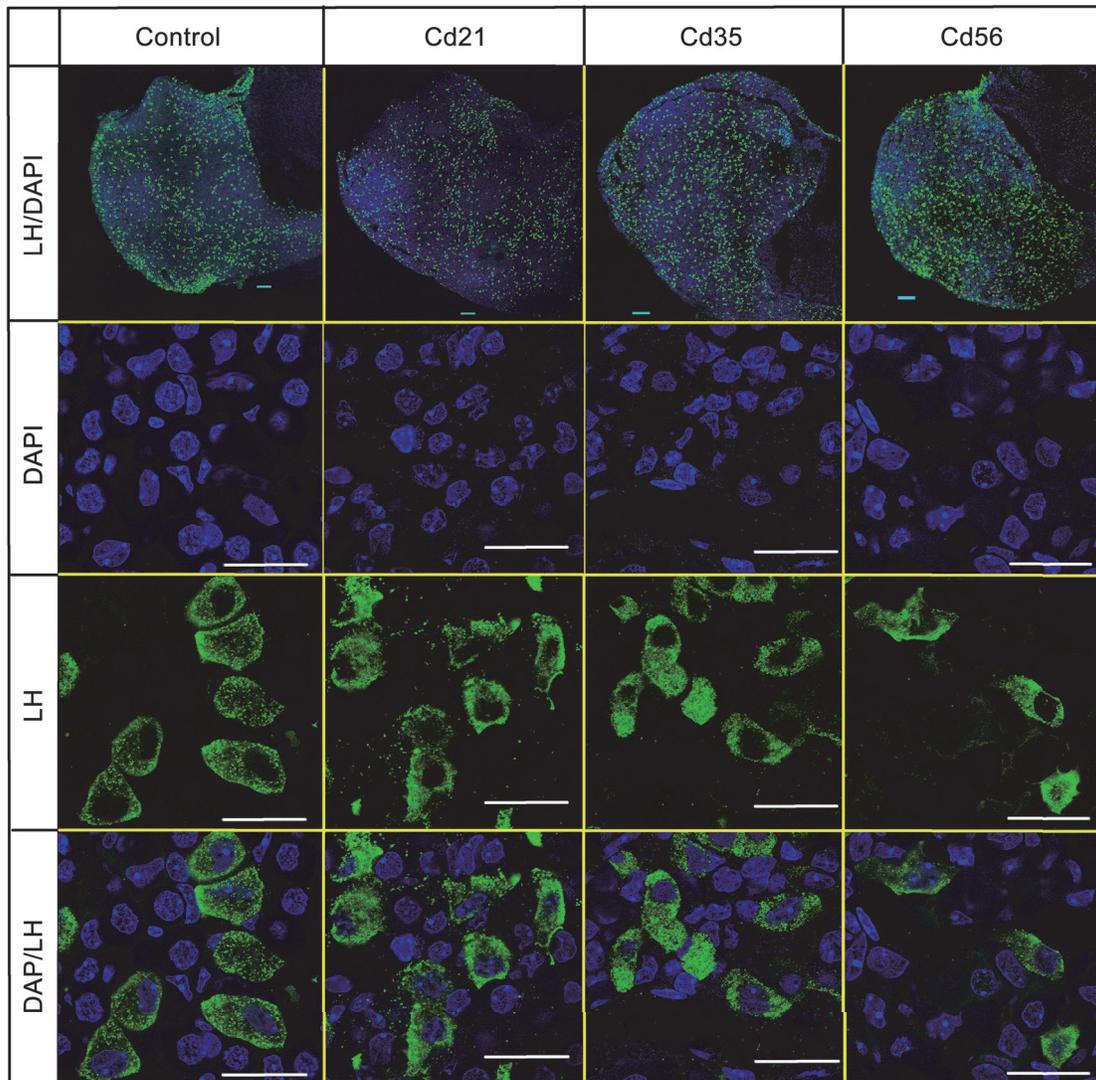
por la cantidad de células que se encuentran por sección, la cuantificación se restringió a los grupos control y Cd56.



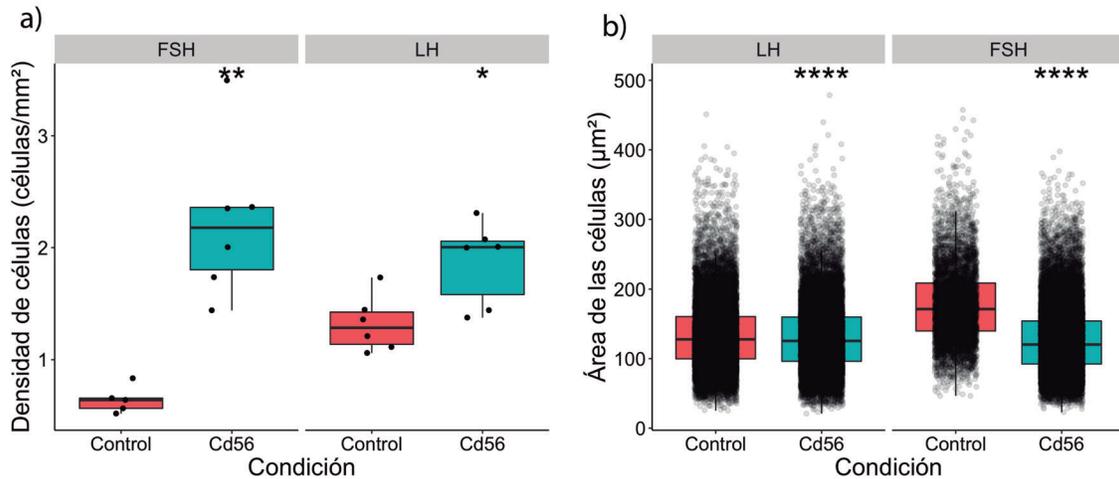
**Figura 29. Morfología y distribución de los gonadotropos que sintetizan FSH.** La región ventral de la hipófisis revela que las células de FSH- $\beta$  (en verde) presentan una distribución amplia, pero no homogénea en el tejido. La distribución de la hormona FSH en el citoplasma muestra un patrón de estrella en la célula, con proyecciones citoplasmáticas hacia otras células. DAPI mostrado en color azul. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$  en la primera fila y 20  $\mu\text{m}$  en las siguientes.

El número de gonadotropos contabilizados por individuo que contienen FSH fue de  $1269 \pm 227$  en ratones control y de  $4384 \pm 1522$  en Cd56, con un área de tejido de  $2059148 \pm 689139 \mu\text{m}^2$  y  $1988617 \pm 516691 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. Si tomamos el promedio de células observadas en el grupo control y lo consideramos como el 100% de las células, podemos

decir que en Cd56, las células de FSH aumentan hasta 2.5 veces en número. Cuando consideramos el área total del tejido como una medida para normalizar el aumento en el número de células, se confirma que la densidad de células (número de células por  $\text{mm}^2$ ) aumenta en Cd56. En éste caso, en condiciones control se encuentran  $0.642 \pm 0.121$  células/ $\text{mm}^2$ , mientras que en Cd56 aumenta a  $2.23 \pm 0.714$  células/ $\text{mm}^2$  que contienen FSH (ver figura 31.a).



**Figura 30. Morfología y distribución de los gonadotropos que sintetizan LH.** Al igual que en FSH, la región ventral de la hipófisis revela que las células de LH- $\beta$  (en verde) presentan una distribución amplia, pero que no es homogénea en el tejido, existen regiones donde las células están preferentemente distribuidas. La distribución de la hormona LH en el citoplasma de los gonadotropos, a diferencia de FSH, presenta pocas extensiones del citoplasma y las células se encuentran adyacentes unas a otras. DAPI, azul. Barra de escala 100  $\mu\text{m}$  en la primera fila y 20  $\mu\text{m}$  en las siguientes.



**Figura 31. Efecto del cadmio en el tamaño y número de gonadotropos que contienen FSH y LH.**

Comparación entre el grupo control y animales del grupo Cd56. **a).** Existe un incremento de casi tres veces en el número de gonadotropos con FSH y de aproximadamente el doble en células LH en condiciones de cadmio comparado con el grupo control (Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon,  $**p = 0.004$ ,  $*p = 0.026$ ). **b).** Disminución en el área de los gonadotropos que contienen LH y FSH como resultado de la administración de cadmio y analizado 56 días después (Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon,  $****p < 0.0001$ ).

En el caso de los gonadotropos que contienen la hormona LH, el número de células positivas en condición control fue de  $3430 \pm 1551$  y un área de tejido en promedio de  $2518242 \pm 827855 \mu\text{m}^2$ . En el grupo Cd56, el número de gonadotropos con LH que se contabilizaron fue de  $3434 \pm 352$ , con un área de tejido analizada por individuo de  $1906312 \pm 447779 \mu\text{m}^2$ . Como en el caso de FSH, los gonadotropos que presentan LH aumentan significativamente pero en menor grado. La densidad de células LH en el grupo control fue de  $1.32 \pm 0.250$  células/mm<sup>2</sup>, mientras que en Cd56 ésta densidad aumenta a  $1.87 \pm 0.373$  (véase figura 31.a). Contrario a la tendencia a un aumento en la densidad de células en la región ventral de la hipófisis que se observó que después de la administración de cadmio, el área de las células que contiene tanto FSH como LH disminuye significativamente (figura 31.b). En ratones control el área de los gonadotropos de FSH es de  $177 \pm 54.5 \mu\text{m}^2$  y de  $127 \pm 47.2 \mu\text{m}^2$  en Cd56. Las células de LH en condición control tienen un área de  $134 \pm 47.9 \mu\text{m}^2$ , mientras que en el grupo Cd56 el área de estos gonadotropos es de  $132 \pm 49.4 \mu\text{m}^2$ . De éstos resultados, se puede resaltar que la disminución del área de células con FSH es más marcado que en LH,

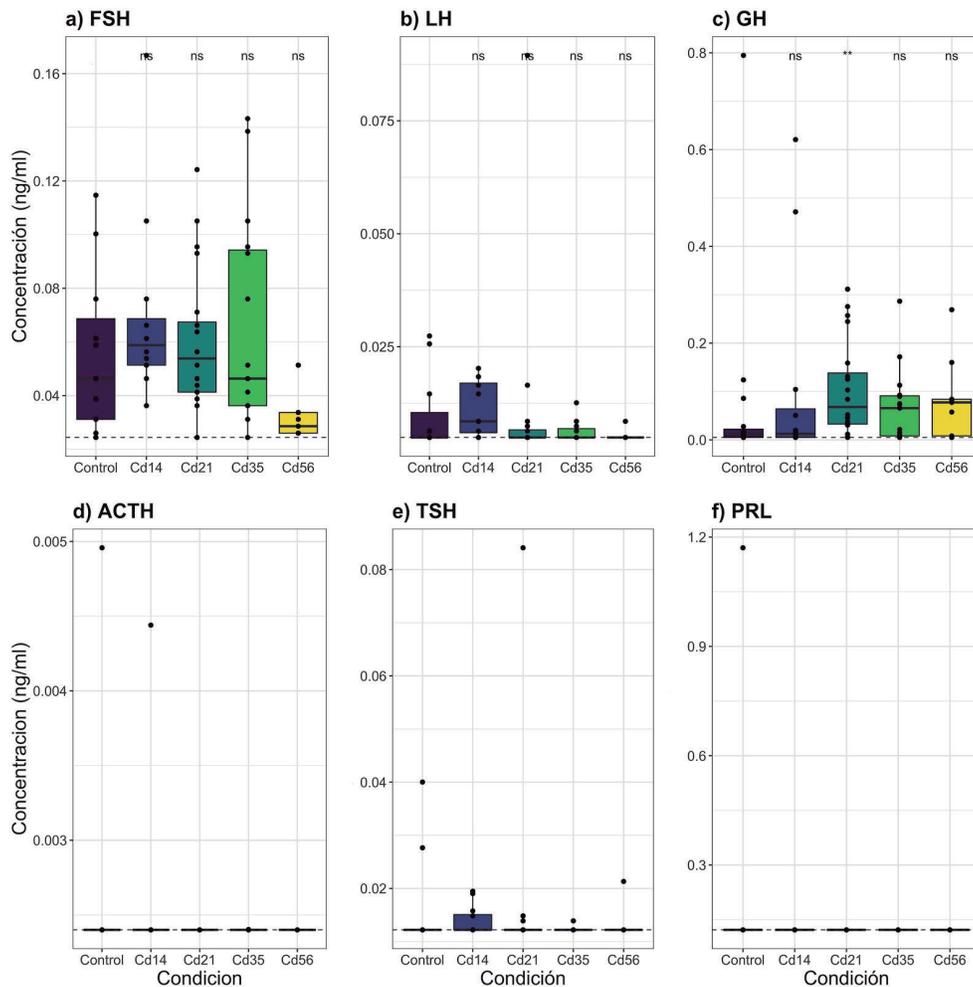
comparado al grupo control. Además, sin importar la condición fisiológica o el tipo de hormona que producen los gonadotropos, a nivel poblacional, existe una importante variabilidad en el tamaño de las células que puede estar influida por la posición de la célula con respecto al corte de las secciones que se realizaron.

### **Modificaciones en la secreción hormonal de la hipófisis por el tratamiento con cadmio**

Para verificar que el cadmio administrado a los ratones produce disrupción en la secreción de hormonas hipofisarias, se cuantificó la cantidad de hormonas de las muestras de sangre colectadas a los 14, 21, 35 y 56 días después de la inyección de cadmio. El diseño de la placa de Milliplex permite cuantificar las seis hormonas hipofisarias a partir de la misma muestra dada la especificidad de los anticuerpos. Así, se cuantificó la secreción de las gonadotropinas, LH y FSH, y también la prolactina, GH, TSH y ACTH (figura 32).

A pesar de la sensibilidad de la placa para cuantificar cantidades muy pequeñas de hormona, los resultados para la LH, FSH y GH, están tan solo por arriba del límite de detección inferior. Incluso, algunas muestras quedaron por debajo de dicho límite (figura 32). En la cuantificación de FSH se observa variabilidad entre muestras del mismo grupo y se mantiene así en las diferentes condiciones, excepto en Cd56 donde parece disminuir, aunque no significativamente (figura 32.a). Para el caso de la concentración de LH en sangre, parece haber una tendencia a disminuir después del tratamiento con cadmio, aunque éste no es significativo (figura 32.b). En GH, la única diferencia significativa con respecto al grupo control se observa en el grupo Cd21, donde hay incremento en la concentración de ésta hormona (figura 32.c).

Por otra parte, no fue posible cuantificar la cantidad de hormonas ACTH, TSH y prolactina debido a que la concentración de estas hormonas en las muestras se encontraba por debajo del límite de detección del ensayo (figura 32.d-f).

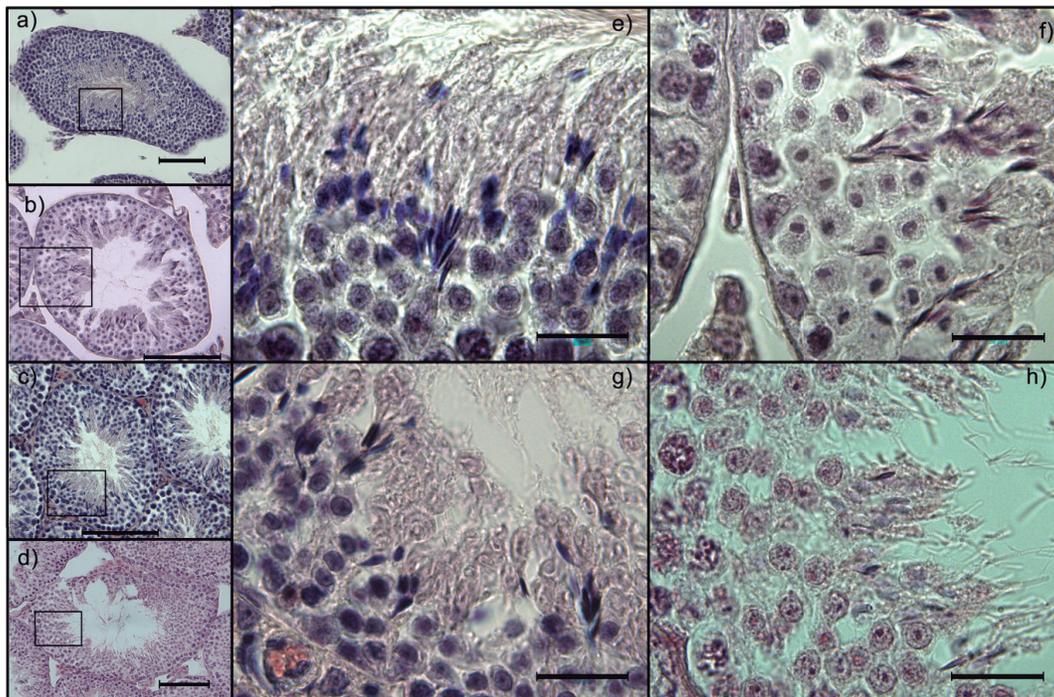


**Figura 32. Cuantificación hormonal hipofisaria en sangre. a) - f)** Cuantificación de la secreción hormonal en sangre hipofisaria en el grupo control y los animales tratados con cadmio. Los puntos representan muestras de diferentes ratones. Los valores mostrados representan la dilución de 4 ul de sangre completa en 116 ul de PBS-Tween (ver método), no se realizaron duplicados. Prueba Mann-Whitney-Wilcoxon comparado con el grupo control; \*\* $p = 0.01$ ; ns, valor no significativo. Las líneas punteadas indican el límite de detección inferior para cada hormona.

### **Cambios morfológicos en los testículos por el efecto del cadmio**

Las tinciones con hematoxilina y eosina permitieron identificar cambios morfológicos de los testículos por la administración de cadmio. En los animales tratados con cadmio, se observa que existe discontinuidad entre los túbulos seminíferos, es decir, los túbulos no se encuentran conectados físicamente con los adyacentes. Además, parece existir disminución en la cantidad de células germinales en las últimas etapas de desarrollo, espermátidas y espermatozoides (figura 33), aunque no se realizó un análisis cuantitativo al respecto.

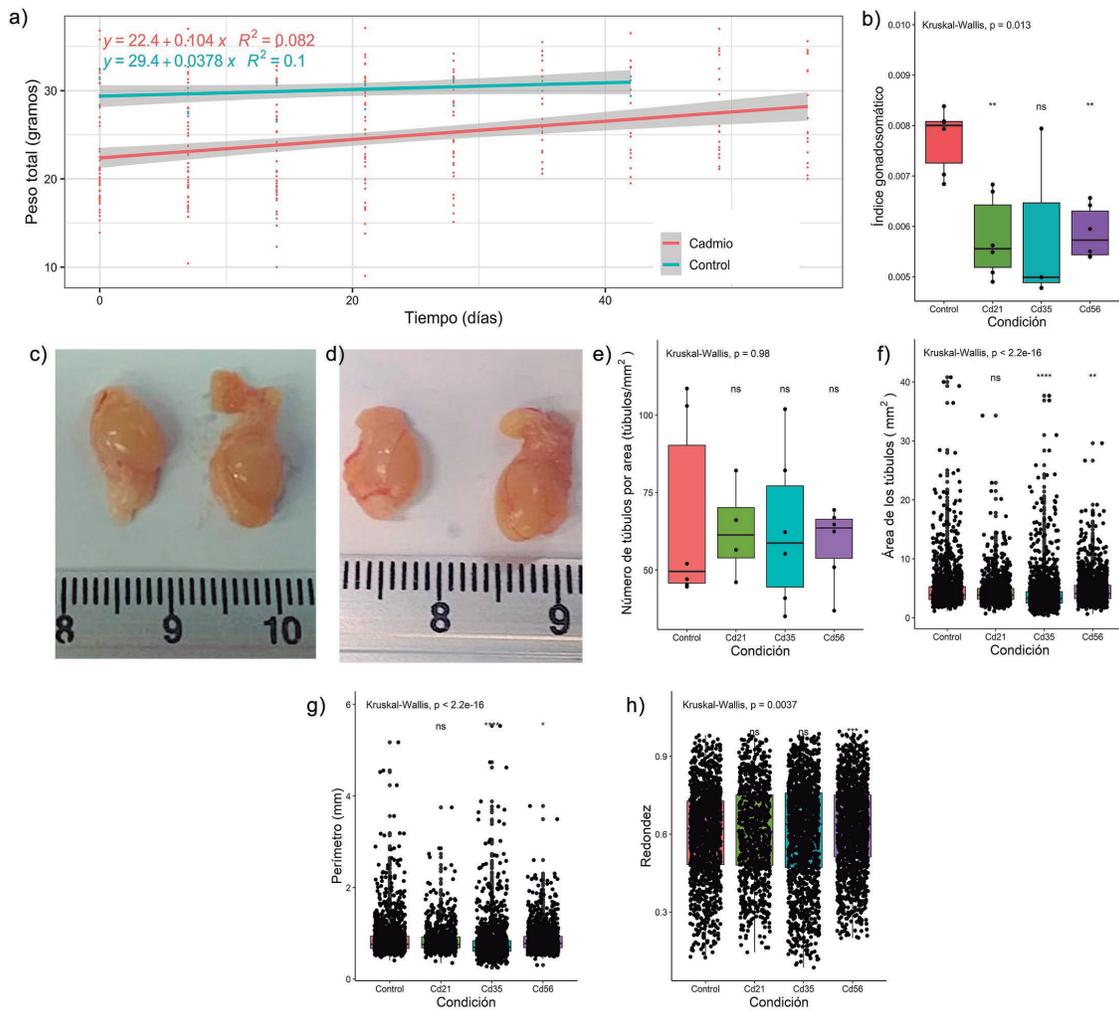
La tasa de crecimiento en los ratones no difiere significativamente en los ratones expuestos a cadmio con respecto al grupo control (figura 33.a). Sin embargo, cuando se analizó la relación del peso de los animales con respecto al peso de los testículos, se encontró que el índice gonadosomático es menor en los animales tratados con cadmio (figura 33.b - d). Esto sugiere que los testículos se ven afectados específicamente.



**Figura 33. Morfología en los testículos por la acción de cadmio.** Tinciones de hematoxilina-eosina para teñir los cortes transversales a nivel medio de los testículos del grupo control mostrado en **a) y e)**, Cd21 en **b) y f)**, Cd35 en **c) y g)** y Cd56 visto en **d) y h)**. Imágenes en e)-h) son acercamientos de las imágenes a)-d) señaladas por recuadros. Las barras de escala en a)-d) representan 100µm y en e)-h) 20µm.

En vista de que el índice gonadosomático es menor en los grupos tratados con cadmio, y además parece haber una discontinuidad entre ellos, se analizó si el área y el número de túbulos en los cortes de testículos es menor con respecto al control. Se encontró que el número de túbulos con respecto al área total de los cortes de testículo no cambia significativamente (figura 34.e). Sin embargo, el área y el perímetro de los túbulos seminíferos sí disminuye significativamente en los grupos Cd35 y Cd56, pero no en Cd21 (figura 34.f y g). Además, la redondez no cambia significativamente en los grupos Cd21 y Cd35, pero sí en Cd56 donde un mayor número de túbulos seminíferos son más redondeados (figura 34.h).

De esta forma, la disminución de la relación peso total-peso de los testículos parece ser una consecuencia de la disminución en el tamaño de los túbulos seminíferos y no por disminución en la cantidad de los mismos. Sumado a esto, la disminución en el número de células de la línea germinal también puede estar asociado a la disminución del índice gonadosomático, pero no se realizó análisis estadístico al respecto (figura 33).



**Figura 34. Cambios morfológicos en los testículos por la acción de cadmio.** a) Incremento del peso de los ratones en las semanas posteriores a la inyección de cadmio. b) Índice gonadosomático. c) y d) Fotografías de testículos del grupo control y Cd56, respectivamente. Las líneas de la escala son milímetros. e) Número de túbulos seminíferos por milímetro cuadrado. f) Área de los túbulos seminíferos. g) Perímetro de los túbulos seminíferos. h) Redondez de los túbulos seminíferos medido por  $4\pi(\text{área}/\text{perímetro}^2)$ , donde 1 es un círculo perfecto.

## DISCUSIÓN

En los tipos celulares hipofisarios lactotrofos y somatotrofos, la actividad basal de calcio está asociada a secreción hormonal. De esta forma, existe una secreción basal de hormona incluso cuando no hay estímulo del hipotálamo (Stojilkovic, et al., 2017). Sin embargo, en los gonadotrofos la secreción de LH y FSH está regulada potencialmente por GnRH y la actividad basal no produce la secreción observada en organismos en condiciones normales (Iida et al., 1991; Stojilković et al., 1991). Se ha sugerido que la actividad basal de calcio intracelular no produce una secreción de LH o FSH porque no alcanza el umbral necesario de concentración de calcio que permite poner en acción a toda la maquinaria de secreción. Por otro lado, se ha reportado que la secreción basal de gonadotropinas no es dependiente de calcio extracelular porque cuando la entrada de calcio a la célula es anulada, la secreción basal no cambia (Iida et al., 1991; Stojilković, et al., 1992). Esto plantea la pregunta de cuál es el papel fisiológico de la actividad basal de los gonadotrofos.

Se piensa que la actividad basal de movilización de calcio en los gonadotrofos les permite mantenerse en un estado de actividad cercano al umbral de secreción. Si bien la actividad basal no permite llegar al umbral, ésta permite estar cerca de él, de tal forma que el estímulo que llegue a la célula (principalmente GnRH) permita desencadenar una respuesta del gonadotrofo sin que sea necesaria una gran cantidad del estímulo. Además, la actividad basal permite la entrada y la recaptura de calcio en los reservorios intracelulares (principalmente el retículo endoplasmático). En este sentido, una mayor acumulación de calcio en los reservorios, permite a las células responder por tiempos más largos y posiblemente secretar más hormona (Stojilkovic et al., 2017).

En éste trabajo encontramos que la proporción de gonadotropos que presentan actividad basal de calcio durante los siguientes días a la inyección de cadmio aumenta considerablemente. En este sentido, podría ser que una mayor cantidad de gonadotropos se encuentre en un estado disponible para responder a GnRH. Además, el número de células que responden a GnRH también incrementa hasta 40% con respecto al total de células responsivas a GnRH.

Tomando en cuenta estas dos características del nuevo estado fisiológico de los gonadotropos, los resultados indican que estas células se vuelven más sensibles al estímulo de GnRH y a su vez, a su capacidad de secretar: por una parte, existen más gonadotropos con actividad basal y por otra, el total de ellos también aumenta. Ésta capacidad de cambio en los gonadotropos es la que Leong y Thorner observan durante el proestro del ciclo estral (la etapa del ciclo en el que se produce un pico en la concentración de LH en los organismos), donde un mayor número de gonadotropos responde a GnRH en bajas concentraciones con respecto al metaestro. En metaestro, son necesarias altas concentraciones de GnRH para lograr que la mayor cantidad de gonadotropos respondan (Leong & Thorner, 1991).

De la misma forma, Leong y Thorner reportan que son menores las concentraciones de GnRH necesarias para que los gonadotropos secreten LH y además, el máximo de secreción de esta misma hormona se alcanza también con bajas concentraciones de GnRH (ver figura 7). Sin embargo, en este trabajo, aunque una mayor cantidad de gonadotropos se vuelven responsivos a GnRH y muestran el patrón oscilatorio de movilización de calcio, la secreción de LH, medida en sangre, no aumenta significativamente, por el contrario, parece existir una tendencia a disminuir a medida que aumentan los días después de la inyección de cadmio. El número de células que responden a GnRH en la condición control de este trabajo es mucho mayor del que se reporta en la literatura. En promedio, 25 a 30 por ciento del total de células

que responden a potasio también responden a GnRH. Sin embargo, en la literatura se describe que los gonadotropos ocupan el 10% de la población celular de la adenohipófisis. Una posible explicación, es que si bien, los gonadotropos se distribuyen en toda la adenohipófisis, en la región ventral de la misma la población es más densa como se ha reportado en éste trabajo y otros estudios de inmunohistoquímica (Budry et al., 2011; Mollard, et al., 2016). Los registros de calcio intracelular aquí reportados fueron realizados en la región ventral de la glándula, por lo que una proporción mayor a 10% de células que responden a GnRH es posible y esperada.

Además, según nuestros resultados, la proporción de células que responden a GnRH en las condiciones Cd35 y Cd56 aumenta significativamente con respecto a la condición control. Una posibilidad de éste cambio es que el aumento en la expresión del receptor de GnRH reportado por Wu y colaboradores, no sólo les confiera mayor sensibilidad a los gonadotropos para responder a GnRH, sino que la población de gonadotropos pudiera tener, en general, mayor expresión del receptor (Wu et al., 2017). De esta forma, los gonadotropos que en condición control se mantienen silentes a GnRH, en Cd35 y Cd56 tienden a responder en mayor proporción.

Se sabe que la testosterona juega un papel importante en la expresión del GnRHR, porque disminuye su expresión en las células. Cuando ésta asa de retroalimentación negativa al eje se pierde, como pasa en animales gonadectomizados, la expresión del GnRHR aumenta significativamente (Tilbrook & Clarke, 2001; Wilson, et al., 1986). El cadmio también reduce las concentraciones de testosterona en la sangre de organismos expuestos a este metal (Lafuente et al., 2001; Wu et al., 2017). Por lo que es probable que el aumento en la responsividad de los gonadotropos con el tratamiento de cadmio reportado en este trabajo,

esté asociado a la disminución en la producción de testosterona. Los cambios morfológicos de los testículos observados en los grupos Cd21, Cd35 y Cd56 también refuerzan esa posibilidad. En este trabajo no fue evaluado el cambio en el número de células de Leydig, sin embargo, existen reportes de la disminución del número de células después de la administración de cadmio (Wu et al., 2017).

Si el número total de células que responden a GnRH son más y también más sensibles, es de esperar que secreten más LH y FSH después de la administración de cadmio. Sin embargo, la cuantificación de mRNA no refleja estrictamente aumento de la expresión, al menos de LH, para cada célula (Wu et al., 2017). En éste trabajo se realizaron inmunotinciones para cuantificar la cantidad de gonadotropos positivos a LH y FSH en la región ventral de la hipófisis y con esto, tratar de esclarecer posibles diferencias en este resultado.

De los experimentos de inmunohistoquímica, se encontró que existe aumento en la cantidad de gonadotropos que poseen la LH y FSH. Los resultados de este trabajo concuerdan con las observaciones de que se produce hiperplasia (aumento en el número de células), pero es contradictorio a la hipertrofia (aumento en el tamaño) reportada en los gonadotropos, es decir, aumenta el número de gonadotropos pero no su tamaño después del tratamiento con cadmio (Allanson & Deanesly, 1962; Madhyastha & Gopal-Dutt, 1979). La disminución en el tamaño de los gonadotropos concuerda con los resultados reportados de cuantificación de mRNA donde la expresión del gen *Lh-β* disminuye después de la inyección de cadmio (Wu et al., 2017). Cabe resaltar que Wu y colaboradores trataron a los animales con EDS antes de la inyección de cadmio. EL EDS elimina a las células de Leydig y por lo tanto cambia la fisiología del eje reproductivo (Ariyaratne et al., 2003). Si bien, la administración de cadmio, en ese trabajo, se hizo después del restablecimiento de la población de células de Leydig, sí

existen diferencias entre los animales que se usaron como control y los tratados con EDS (ver figura 9 y (Wu et al., 2017)). Es posible que esta diferencia se deba a la administración de EDS en este último trabajo.

Como se mencionó en la introducción, la mayoría de los gonadotropos son bihormonales, es decir, que poseen tanto la hormona FSH y LH. Sin embargo, una fracción es monohormonal a LH (16%) y otra es monohormonal a FSH (14%) (Childs et al., 1985; Ramaswamy & Weinbauer, 2014). La cuantificación de células que aquí se reportan muestra por separado a las células positivas a LH y FSH debido a que el anticuerpo primario para las gonadotropinas fue hecho en ambos casos en conejo. Esto impidió inmunotinciones dobles, y, por lo tanto, cuantificar si existe cambio en el porcentaje de gonadotropos bihormonales y monohormonales como consecuencia del tratamiento con cadmio. Dada la disparidad que se encontró en la concentración de LH y FSH en el plasma sanguíneo, en el número de células positivas a FSH y LH por inmunohistoquímica en éste trabajo y el aumento en el mRNA de FSH reportado por (Wu et al., 2017), es probable que más gonadotropos contengan gránulos con contenido de FSH. El uso de anticuerpos primarios hechos en diferentes hospederos en trabajos futuros puede ser una opción para probar si existe tal cambio en los gonadotropos.

Leong y Thorner formularon un modelo para dilucidar la función del calcio en la regulación de diferentes procesos fisiológicos de los gonadotropos, que podrían explicar las múltiples respuestas con respecto a un rango amplio de concentraciones de agonistas. Se propuso que el umbral de GnRH para la liberación de LH, el cambio en la cantidad de mRNA de la LH-beta y de GnRH-R cambia durante el ciclo reproductivo y se procesa en los gonadotropos como un código oscilatorio o bifásico de calcio (Leong & Thorner, 1991).

La propuesta es de la siguiente forma para el caso del ciclo estral: en la mayor parte del ciclo estral el umbral de concentración de GnRH es alto y en este estado la mayoría de los gonadotropos responde con el patrón oscilatorio de movilización de calcio. El patrón oscilatorio disminuye la secreción de LH y aumenta la cantidad de mRNA de LH-beta. Además, el patrón oscilatorio también permite el incremento de la cantidad de receptores de GnRH en las células, de tal forma que disminuye el umbral de concentración de GnRH. Progresivamente, los patrones oscilatorios van disminuyendo el umbral de GnRH hasta tal punto que incluso bajos niveles de GnRH en la hipófisis producen patrones bifásicos de calcio y con ello secreción de LH durante el proestro del ciclo estral. Es esta etapa, el patrón bifásico activa la secreción de LH, mientras reduce la expresión de mRNA de LH y también el número de GnRH-R, y en este sentido, aumenta el umbral de GnRH. El cambio a un umbral alto de GnRH promueve el patrón oscilatorio de calcio y el ciclo se vuelve a repetir (Leong & Thorner, 1991).

El modelo de dependencia de la secreción de LH con el patrón bifásico de incremento de calcio intracelular en los gonadotropos fue probado en este trabajo. El tratamiento con cadmio, ciertamente, aumenta la responsividad en los gonadotropos, medido por el cambio en la actividad basal, así como en la cantidad de células que responden a GnRH. También, el número de células que poseen gránulos con la LH aumenta en los días posteriores al tratamiento con cadmio. Además, la mayoría de las células responden con el patrón bifásico de calcio, por lo que se esperaría incremento en la secreción de LH por los gonadotropos. Sin embargo, la cuantificación de la LH en sangre demuestra que la secreción de esta hormona no cambia significativamente con respecto al grupo control. Por el contrario, la secreción y expresión de LH parece disminuir (Wu et al., 2017).

Parece ser que la secreción y el patrón de movilización de calcio de los gonadotropos no están relacionados de manera lineal, sino que parecen depender del contexto del sistema reproductivo. El tipo de patrón de movilización de calcio, oscilatorio o bifásico, parece depender del estado del oscilador intracelular de calcio. Éste oscilador, como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, depende de la concentración de IP<sub>3</sub>, del estado activo del receptor de IP<sub>3</sub> del retículo endoplasmático (que funciona como receptor y como canal de calcio), así como de la concentración del calcio mismo en el citoplasma de las células. De tal forma que el balance de estos componentes produce patrones de actividad de calcio oscilatorio o bifásicos. Por otra parte, las células que responden con el patrón oscilatorio de calcio también secretan gonadotropinas como se ha demostrado con la medición de la capacitancia en los gonadotropos (Thomas & Waring, 1997).

En este trabajo, el patrón más abundante de movilización de calcio fue el bifásico. En el caso del trabajo de Leong y Thorner, en metaestro, los gonadotropos responden mayormente con patrones bifásicos a concentraciones de GnRH, donde un mayor número de células secreta. Hay que resaltar aquí que la interpretación de esos autores es de correlación, y, por lo tanto, que no significa que un proceso sea causa o efecto del otro. En éste sentido, otro estado fisiológico de los gonadotropos que vale la pena considerar, es el patrón de incremento de calcio intracelular en animales a los que se remueven los testículos (orquiectomía, OQX). En los animales OQX los gonadotropos responden principalmente con el patrón oscilatorio y esto es cierto para células tanto en cultivo como en preparaciones *in vivo*. Se conoce que en animales OQX la secreción de LH es alta con respecto a la condición control. Sin embargo, de datos obtenidos en el laboratorio (Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada) se sabe que el patrón oscilatorio representa el 85.71% sobre el bifásico de 14.28% (Cubillos-Álvarez, 2018; Durán-Pastén et al., 2013; Tobin & Canny, 1996, 1998; Tobin et al., 1997).

Otra prueba de que la secreción no depende del patrón de movilización de calcio es que una misma célula no responde con el mismo patrón de calcio cuando se aplican dos estímulos de calcio de la misma magnitud. Por ejemplo, una célula que responde con un patrón oscilatorio, 50 minutos después, puede responder con un patrón bifásico, o al revés (ver figuras 24-26). Si el patrón de calcio bifásico fuera el único con la función de secretar LH, se esperaría que una célula respondiera siempre de la misma forma. Además, también resulta interesante que existe una gran variabilidad en la movilización de calcio. El número de picos en el patrón oscilatorio puede variar entre células que responden a GnRH en la misma preparación. Sumado a esto, células vecinas pueden presentar diferentes patrones de movilización de calcio, por ejemplo, la célula A puede responder de forma bifásica, la célula B en forma oscilatoria, mientras que una C puede tener un patrón transitorio.

La heterogeneidad también se ve expresada en la cantidad de movilización de calcio en la respuesta a GnRH. No todas las células presentan la misma amplitud de elevación de calcio ni tampoco la duración de esa movilización. En todo caso, parece ser que un determinado estado fisiológico del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, canaliza la plasticidad de los gonadotropos a presentar un tipo de respuesta de calcio. Los diferentes componentes de dicha respuesta se combinan y dan como resultado los patrones descritos de movilización de calcio o nuevos patrones, como el patrón de oscilaciones prolongadas observado en este trabajo. Desconocemos el mecanismo por el que se produce el patrón de oscilaciones que se prolongan a través del registro de calcio, pero la evidencia de este trabajo parece indicar que se debe al oscilador intracelular de calcio de los gonadotropos puesto que el bloqueo del aporte extracelular no elimina este patrón. El cambio en el oscilador interno puede suceder a nivel del receptor de IP<sub>3</sub>, que se mantiene activo por más tiempo y puede ser por un efecto

directo del cadmio en la señalización intracelular de calcio o por medio de la retroalimentación que generan las hormonas de los testículos.

Por último, la comprensión de las interacciones en el proceso de estímulo-secreción y su plasticidad resulta importante porque permite comprender la forma en la que diferentes partes del cuerpo se comunican y mantienen su homeostasis. También permiten dilucidar procesos de secreción que resultan paradójicos, como la secreción desigual de LH y FSH en los gonadotropos. A la fecha se desconoce el mecanismo por el que los gonadotropos secretan estas dos hormonas con diferentes ritmos y, más aún cómo es que estos ritmos en el ciclo estral se puedan invertir. Muchas disfunciones reproductivas, como la infertilidad, el ovario poliquístico o disrupciones neuroendocrinas como la que produce el propio cadmio, tienen que ver con el cambio en la función del eje hipotálamo-hipófisis y la secreción hormonal. Por lo que la comprensión del sistema hipotálamo-hipófisis, permite avanzar en la comprensión y tratamiento de estos estados fisiológicos.

## CONCLUSIÓN

El cadmio produce cambios fisiológicos y morfológicos a diferentes niveles del sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas. El modelo de disrupción por cadmio nos permitió probar el modelo propuesto por Leong & Thorner en 1991 en el que el patrón de secreción de LH es explicado por el tipo de movilización de calcio intracelular en los gonadotropos. En este trabajo se demostró que el patrón bifásico de calcio no está siempre asociado a la secreción de LH y que el patrón oscilatorio también puede estar asociado a la secreción de gonadotropinas dependiendo del contexto fisiológico del organismo. Además, la respuesta de los gonadotropos a GnRH es heterogénea y muy plástica en la glándula, tanto a nivel temporal, como a nivel espacial. Por último, esta heterogeneidad puede ser la razón por la que la hipófisis cambia adaptativamente a los retos fisiológicos que se presentan a los organismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allanson, M., & Deanesly, R. (1962). Observations on cadmium damage and repair in rat testes and the effects on the pituitary gonadotrophs. *The Journal of Endocrinology*, *24*, 453–462.
- Alvarez-Bolado, G., Paul, F. A., & Blaess, S. (2012). Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: from progenitor domains to hypothalamic regions. *Neural Development*, *7*, 4.
- Ariyaratne, S., Kim, I., Mills, N., Mason, I., & Mendis-Handagama, C. (2003). Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Archives of Andrology*, *49*(4), 313–326.
- Budry, L., Lafont, C., El Yandouzi, T., Chauvet, N., Conéjero, G., Drouin, J., & Mollard, P. (2011). Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(30), 12515–12520.
- Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Comprehensive Physiology*, *6*(2), 623–643.
- Campos, P., & Herbison, A. E. (2014). Optogenetic activation of GnRH neurons reveals minimal requirements for pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(51), 18387–18392.
- Childs, G. V., Hyde, C., Naor, Z., & Catt, K. (1985). Heterogeneous Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Storage Patterns in Subtypes of Gonadotropes Separated by Centrifugal Elutriation. *Obstetrical & Gynecological Survey*, Vol. 40, pp. 45–47. <https://doi.org/10.1097/00006254-198501000-00014>
- Choong, G., Liu, Y., & Templeton, D. M. (2014). Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *211*, 54–65.
- Cubillos-Álvarez, J. F. (2018). *Multirrespuesta de células en rebanadas de adenohipófisis de ratón en respuesta a alteraciones de los ejes neuroendócrinos* (Tesis de licenciatura; T. Fiordelasio-Coll, Ed.). UNAM.
- Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 34, pp. 451–474. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb08474.x>
- Douglas, W. W., & Rubin, R. P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the

- adrenal medulla to acetylcholine. *The Journal of Physiology*, Vol. 159, pp. 40–57.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1961.sp006791>
- Durán-Pastén, M. L., Fiordeliso-Coll, T., & Hernández-Cruz, A. (2013). Castration-induced modifications of GnRH-elicited  $[Ca^{2+}]_i$  signaling patterns in male mouse pituitary gonadotrophs in situ: studies in the acute pituitary slice preparation. *Biology of Reproduction*, *88*(2), 38.
- Durán-Pastén, M. L., & Fiordeliso, T. (2013). GnRH-Induced  $Ca^{2+}$  Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 4.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00127>
- Flanagan, C. A., & Manilall, A. (2017). Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 368.
- Froment, P., Seurin, D., Hembert, S., Levine, J. E., Pisselet, C., Monniaux, D., ... Monget, P. (2002). Reproductive abnormalities in human IGF binding protein-1 transgenic female mice. *Endocrinology*, *143*(5), 1801–1808.
- Gregersen, S. (2014). *Flourescent peptide-stabilized silver-nanoclusters, a solid-phase approach for high-throughput ligand discovery* (Phd; K. J. Jensen & T. Vosch, Eds.). University of Copenhagen.
- Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C., Ortolano, G. A., Marshall, J. C., & Shupnik, M. A. (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.
- Herbison, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews. Endocrinology*, *12*(8), 452–466.
- Herbison, A. E. (2018). The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology*, *159*(11), 3723–3736.
- Hille, B., Tse, A., Tse, F. W., & Almers, W. (1994). Calcium oscillations and exocytosis in pituitary gonadotropes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *710*, 261–270.
- Iida, T., Stojilković, S. S., Izumi, S.-I., & Catt, K. J. (1991). Spontaneous and Agonist-Induced Calcium Oscillations in Pituitary Gonadotrophs. *Molecular Endocrinology*, Vol. 5, pp. 949–958. <https://doi.org/10.1210/mend-5-7-949>
- Janjic, M. M., Stojilkovic, S. S., & Bjelobaba, I. (2017). Intrinsic and Regulated Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene Transcription in Mammalian Pituitary Gonadotrophs. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 221.

- Jiménez-Ortega, V., Cano Barquilla, P., Fernández-Mateos, P., Cardinali, D. P., & Esquifino, A. I. (2012). Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. *Free Radical Biology & Medicine*, *53*(12), 2287–2297.
- Kandel, E. (2013). *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw Hill Professional.
- Lafuente, A. (2013). The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 59, pp. 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.024>
- Lafuente, A., Márquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D., & Esquifino, A. I. (2001). Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. *Experimental Biology and Medicine*, *226*(6), 605–611.
- Leong, D. A., & Thorner, M. O. (1991). A potential code of luteinizing hormone-releasing hormone-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(14), 9016–9022.
- Le Tissier, P., Campos, P., Lafont, C., Romanò, N., Hodson, D. J., & Mollard, P. (2017). An updated view of hypothalamic-vascular-pituitary unit function and plasticity. *Nature Reviews. Endocrinology*, *13*(5), 257–267.
- Lewy, H., Naor, Z., & Ashkenazi, I. E. (1996). Rhythmicity of luteinizing hormone secretion expressed in vitro. *European Journal of Endocrinology*, Vol. 135, pp. 455–463. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1350455>
- Li, J., Savolainen, H., Tan, F., & Zheng, S. (2010). Orthotopic testicular transplantation in mice. *Reproduction*, *139*(2), 447–452.
- Lindzey, J., Wetsel, W. C., Couse, J. F., Stoker, T., Cooper, R., & Korach, K. S. (1998). Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology*, *139*(10), 4092–4101.
- Li, Y. X., Rinzel, J., Keizer, J., & Stojilković, S. S. (1994). Calcium oscillations in pituitary gonadotrophs: comparison of experiment and theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(1), 58–62.
- Loreau, M., & de Mazancourt, C. (2008). Species synchrony and its drivers: neutral and nonneutral community dynamics in fluctuating environments. *The American Naturalist*, *172*(2), E48–E66.
- Madhyashta, N. A., & Gopal Dutt, N. H. (1979). Cadmium induced hypertrophy &

- hyperplasia of pituitary gonadotrophs of the brown spiny mouse *Mus platythrix* (Bennett). *Indian Journal of Experimental Biology*, 17(7), 637–639.
- McArdle, C. A., Willars, G. B., Fowkes, R. C., Nahorski, S. R., Davidson, J. S., & Forrest-Owen, W. (1996). Desensitization of gonadotropin-releasing hormone action in alphaT3-1 cells due to uncoupling of inositol 1,4,5-trisphosphate generation and Ca<sup>2+</sup> mobilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 23711–23717.
- Mollard, P., Hodson, D. J., Lafont, C., Rizzoti, K., & Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(6), 261–269.
- Murray, R. D., & Melmed, S. (2006). The Pituitary. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000065>
- Naor, Z. (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1), 10–29.
- Norris, D. O., & Carr, J. A. (2013). *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press.
- Oduwole, O. O., Peltoketo, H., & Huhtaniemi, I. T. (2018). Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 763.
- O’Shaughnessy, P. J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., & Abel, M. H. (2010). Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*, 139(1), 177–184.
- Patel, H., & Tiwari, V. (2018). Physiology, Posterior Pituitary. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Purves, D. (2012). *Neuroscience*. Sinauer Associates Incorporated.
- Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2014). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025.
- Rash, B. G., Ackman, J. B., & Rakic, P. (2016). Bidirectional radial Ca<sup>2+</sup> activity regulates neurogenesis and migration during early cortical column formation. In *Science Advances* (Vol. 2, Issue 2, p. e1501733). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501733>.
- Rutherford, H. J. V., Williams, S. K., Moy, S., Mayes, L. C., & Johns, J. M. (2011). Disruption of maternal parenting circuitry by addictive process: rewiring of reward and stress systems. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 2, 37.
- Sánchez-Cárdenas, C., & Hernández-Cruz, A. (2010). GnRH-Induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-signalling patterns in mouse gonadotrophs recorded from acute pituitary slices in vitro. *Neuroendocrinology*, 91(3), 239–255.
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale Journal*

- of Biology and Medicine*, 25(3), 176–201.
- Chamindrani-Mendis, S. M. L., Kerr, J. B., & de Kretser, D. M. (November- December 1990). Experimental cryptorchidism in the adult mouse: II. A hormonal study. *Journal of Andrology*, 11(6), 548–554.
- Stojilkovic, S. S. (2012). Molecular mechanisms of pituitary endocrine cell calcium handling. *Cell Calcium*, 51(3-4), 212–221.
- Stojilkovic, S. S., Bjelobaba, I., & Zemkova, H. (2017). Ion Channels of Pituitary Gonadotrophs and Their Roles in Signaling and Secretion. *Frontiers in Endocrinology*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00126>
- Stojilković, S. S., Iida, T., Merelli, F., Torsello, A., Krsmanović, L. Z., & Catt, K. J. (1991). Interactions between calcium and protein kinase C in the control of signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10377–10384.
- Stojilković, S. S., Kukuljan, M., Tomić, M., Rojas, E., & Catt, K. J. (1993). Mechanism of agonist-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in pituitary gonadotrophs. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 7713–7720.
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J., & Bertram, R. (2010). Ion Channels and Signaling in the Pituitary Gland. *Endocrine Reviews*, Vol. 31, pp. 845–915. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0005>
- Stojilković, S. S., Torsello, A., Iida, T., Rojas, E., & Catt, K. J. (1992). Calcium signaling and secretory responses in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 41, pp. 453–467. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90371-o](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90371-o)
- Thévenod, F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 221–239.
- Thomas, P., & Waring, D. W. (1997). Modulation of stimulus-secretion coupling in single rat gonadotrophs. *The Journal of Physiology*, 504 ( Pt 3), 705–719.
- Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2001). Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of Reproduction*, 64(3), 735–742.
- Tobin, V. A., & Canny, B. J. (1996). Testosterone regulates gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs. *Endocrinology*, 137(4), 1299–1305.
- Tobin, V. A., & Canny, B. J. (1998). The Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone-Induced Calcium Signals in Male Rat Gonadotrophs by Testosterone Is Mediated by

- Dihydrotestosterone\*. *Endocrinology*, Vol. 139, pp. 1038–1045.  
<https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5796>
- Tobin, V. A., Millar, R. P., & Canny, B. J. (1997). Testosterone acts directly at the pituitary to regulate gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotropes. *Endocrinology*, *138*(8), 3314–3319.
- Tomić, M., Cesnajaj, M., Catt, K. J., & Stojilkovic, S. S. (1994). Developmental and physiological aspects of Ca<sup>2</sup> signaling in agonist-stimulated pituitary gonadotrophs. *Endocrinology*, Vol. 135, pp. 1762–1771. <https://doi.org/10.1210/endo.135.5.7956899>
- Tse, A., Tse, F. W., Almers, W., & Hille, B. (1993). Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science*, *260*(5104), 82–84.
- Tse, F. W., Tse, A., Hille, B., Horstmann, H., & Almers, W. (1997). Local Ca<sup>2</sup> Release from Internal Stores Controls Exocytosis in Pituitary Gonadotrophs. *Neuron*, Vol. 18, pp. 121–132. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)80051-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)80051-9)
- Tsutsumi, R., & Webster, N. J. G. (2009). GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal*, *56*(6), 729–737.
- Wilson, C. A., Herdon, H. J., Bailey, L. C., & Clayton, R. N. (1986). Effect of testosterone on gonadotrophin-releasing hormone receptors in the castrated rat: preliminary evidence for a stimulatory effect of testosterone on gonadotrophin function in the male rat. *The Journal of Endocrinology*, *108*(3), 441–449.
- Wong, C.-H., & -h. Wong, C. (2004). Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *Journal of Cell Science*, Vol. 117, pp. 783–798. <https://doi.org/10.1242/jcs.00900>
- Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X., ... Ge, R.-S. (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Scientific Reports*, *7*(1), 6337.
- Yoshitomi, M., Ohta, K., Kanazawa, T., Togo, A., Hirashima, S., Uemura, K.-I., ... Nakamura, K.-I. (2016). Three-dimensional ultrastructural analyses of anterior pituitary gland expose spatial relationships between endocrine cell secretory granule localization and capillary distribution. *Scientific Reports*, *6*, 36019.