



03086
Universidad Nacional Autónoma de México 5
Luj

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado
Centro de Neurobiología

**Fosforilación de los canales de Calcio
por la cinasa A en respuesta a la
suspensión dopaminérgica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

MARIA ELENA HERMANDEZ AGUILAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN** México, D.F.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CREDITOS



- La presente tesis fue realizada en el Centro de Neurobiología con sede en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, México D.F., bajo la dirección del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

- Esta tesis fue realizada bajo el patrocinio de las instituciones y programas listados a continuación:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Registro No.84383

Programa de Apoyo a las divisiones de Estudios de Posgrado
Universidad Nacional Autónoma de México
Proyectos 030372 (1993) y 030379 (1994)

AGRADECIMIENTOS



A todas aquellas personas que me impulsaron en mi desarrollo académico y confiaron en mí: al Dr. Pablo Pacheco Cabrera, al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, a la Dra. Carmen Clapp, al Mtro. Porfirio Carrillo Castilla y de manera muy especial a mi esposo el Dr. Jorge Manzo Denes.

De manera particular quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Mauricio Díaz por su apoyo fundamental para la realización de esta tesis.

Al equipo de trabajo del Laboratorio del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y al de la Dra. Carmen Clapp sobre todo a Luz Torner Aguilar, a Francisco García, a Salvador Mejía, a Zulma Dueñas y a Ana Corbacho no solo por ofrecerme su amistad sino por su apoyo y ayuda en la realización de esta tesis.

A todo el personal del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana: Marcela Vázquez, Regina Cruz, Leticia Nicolás, Rebeca Toledo, María de Jesús Rovlosa, Luis García, Adriana Esquivel y Sofía Verónica González.

A los revisores de esta tesis, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Pablo Pacheco, Dr. Mauricio Díaz, Dra. Marcia Hiriart, Dra. Magda Giordano, Dr. Carlos Arámburo y Dr. Darvid García.

A mi familia y en especial a mi madre.

INDICE



RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCION	5
ANTECEDENTES	
Regulación Pleiotrópica en la secreción de prolactina	7
Participación de segundos mensajeros en la secreción de prolactina	14
Segundos mensajeros asociados a la acción de dopamina	15
Efecto de la dopamina sobre la regulación de calcio intracelular	19
Efecto de la dopamina sobre las propiedades eléctricas de la membrana celular del lactotrofo	21
Segundos mensajeros asociados a la acción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH)	23
Efecto de la TRH sobre los niveles de calcio intracelular	25
Efecto de la TRH sobre las propiedades eléctricas de la membrana celular del lactotrofo	28
Mecanismos intracelulares involucrados en la secreción potenciada de prolactina	30
Generalidades de los canales de calcio	34
Purificación y caracterización de los canales de calcio	37
Modulación de los canales de calcio por fosforilación	
Estudios bioquímicos	39
Estudios electrofisiológicos	42

Sitios de fosforilación	45
Regulación de los canales de calcio por fosfatasa	47
Células GH4 transfectadas con el receptor a dopamina	49
HIPOTESIS	53
PROPOSITO Y OBJETIVOS	55
METODOLOGIA	57
Experimento 1 (Bloque farmacológico de la cinasa A y C)	61
Experimento 2 (Inducción de la secreción potenciada en la línea celular GH ₄ ZR ₁)	62
Experimento 3 (Determinación de la densidad de los canales de calcio)	63
Experimento 4 (Ubicación electroforética de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L)	64
Experimento 5 (Inducción de la fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje por la suspensión transitoria de dopamina)	66
RESULTADOS	67
DISCUSION	90
REFERENCIAS	106
APENDICE	
Dopamine-escape potentiation of prolactin release may involve the activation of calcium channels by protein kinases A and C. Endocrine. 2: 779-786.	122

RESUMEN



La prolactina (PRL) es una hormona proteica que se sintetiza y secreta por los lactotrofos en la adenohipofisis. Su secreción está regulada por factores hipotalámicos tanto de tipo inhibitorio como estimulador. A la fecha, es ampliamente aceptado que su secreción está inhibida de manera tónica por la dopamina (DA), mientras que su secreción fásica es estimulada, entre otros factores, por la hormona liberadora de tirotrina (TRH).

Los estímulos fisiológicos tales como el estrés, la estimulación vaginal, el aumento de los estrógenos en la tarde del proestro y la succión, causan un importante aumento de la secreción de PRL a la sangre periférica. Por su parte se ha mostrado que dicha secreción es la resultante de una interacción espacio temporal entre la disminución de la concentración tónica de la DA hipotalámica en sangre portal y el efecto estimulante de la TRH, otra hormona de origen hipotalámico. En otras palabras, el decremento en los niveles de DA resulta en dos efectos: 1) estimula por sí misma la secreción de PRL, y 2) potencia el efecto estimulante de la TRH para secretar PRL.

Los estudios realizados sobre los mecanismos intracelulares involucrados en producir este segundo efecto, es decir, potenciar la acción secretora de la TRH, indican la participación proximal del sistema del AMP cíclico. Dado que la TRH estimula la secreción de PRL al activar al sistema de los fosfoinosítidos y la importación de calcio extracelular, se ha pensado que la interacción entre la cascada evocada por la suspensión dopaminérgica y aquella producida por la TRH podría converger a nivel de los canales de calcio tipo L sensibles a voltaje, regulando su función y por lo tanto modulando la entrada de calcio. Trabajos realizados en células GH3, cardíacas y musculares estriadas han mostrado que los canales de calcio tipo L sensibles a voltaje, más específicamente la subunidad alfa de este canal, es sustrato de las cinasas que son activadas por el AMP cíclico (cinasa A) y por el diacilglicerol (cinasa C). La fosforilación de esta subunidad del canal, resulta en un incremento de la probabilidad de apertura del mismo, y esto produce un aumento en el flujo iónico. Como consecuencia de ello, se obtiene una mayor contracción muscular o secreción hormonal.

En base a estos antecedentes, la hipótesis que se planteó en este trabajo es que la secreción potenciada de PRL, que se obtiene en respuesta a la TRH, es consecuencia de un cambio en el índice de fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje, por efecto de la suspensión transitoria de DA. Así, uno de los objetivos que se planteó en este estudio, consistió en determinar cual de las dos cinasas que fosforilan el canal de calcio en condiciones *in vitro*, alteran el funcionamiento de éste en condiciones fisiológicas. Con ese propósito, se utilizaron bloqueadores tanto de la cinasa activada por AMP cíclico (H-89) como de la cinasa C (Calfofina C). El otro objetivo del estudio, fué determinar en forma directa el efecto de la suspensión de la señal dopaminérgica sobre el grado de fosforilación de los canales de calcio en dos modelos de lactotrofos: cultivos primarios de lactotrofos de rata y una línea celular transfectada con el receptor a DA. Para esto fue necesario determinar la densidad de

canales de calcio en los sistemas de estudio, mediante ensayos de unión con un ligando específico (^3H -PN200-110), para posteriormente determinar la migración relativa de las subunidades del canal en electroforesis de poliacrilamida utilizando un fotoligando selectivo (^3H -Azidopina). Posteriormente, se determinó el índice de fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje en respuesta a la suspensión de la dopamina.

Con el uso de los bloqueadores selectivos de las cinasas, se demostró que cuando estas se bloquean de manera independiente, la secreción potenciada de PRL no se altera. Por el contrario, cuando ambas cinasas fueron bloqueadas simultáneamente, la respuesta potenciada que se obtiene al suspender transitoriamente a la DA y administrar TRH, se suprimió. Los resultados que se obtuvieron con los ensayos de unión, indican una densidad de canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas de 137 fmol/mg de tejido con una Kd de 105 pmol/mg de tejido en lactotrofos normales. En las células GH4 se obtuvo una densidad de canales de calcio de 143 fmol/mg de tejido con una Kd de 115 pmol/mg de tejido, que es similar a la reportada en lactotrofos. Para el caso de la migración relativa electroforética, en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes, se encontró un polipéptido de peso molecular aproximado de 160 kDa, en ambos tipos de células. En los lactotrofos, se observó un aumento en forma progresiva en el índice endógeno de fosforilación, en la subunidad de 160 kDa, y alcanzó una máxima incorporación a los 30 minutos de haber suspendido a la DA. Para las células GH4ZR7 se obtuvo una máxima incorporación del radioligando en dicha subunidad, 10 minutos después de haber suspendido a la dopamina.

En resumen, los resultados que se obtuvieron demuestran que la suspensión de la señal de dopamina induce un cambio en el grado de fosforilación de los canales de calcio en ambos tipos celulares. Esta acción parece estar mediada en forma redundante por acción de la cinasa dependiente de AMP cíclico y por la cinasa C. Se sugiere que la fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje forma parte del mecanismo de acción por el cual la señal negativa de la dopamina regula la eficiencia de secretagogos como la TRH en lactotrofos.

ABSTRACT



Prolactin (PRL) is a proteic hormone that is synthesized and released by lactotrops in the adenohypophysis. PRL release is controlled by both inhibitory and excitatory hypothalamic factors. It is known that PRL release is continuously inhibited by dopamine (DA), even though its release is stimulated by several factors, being tiotropine releasing hormone (TRH) one of them.

Physiological stimuli such as stress, vaginal stimulation, rising of estrogen levels in late proestrous, and suckling, provoke an important increase in PRL secretion in the blood stream. This secretion is evoked by the consecutive interaction of a decrement in the concentration of hypothalamic DA and the stimulatory effect of TRH. This, the decrement of DA has two effects: 1) direct stimulation of PRL release, and 2) potentiation of the releasing effect produced by TRH.

Studies on the intracellular mechanisms involved in the second effect, show a main role of the cyclic AMP system. Considering that TRH stimulates PRL release through the activation of the phosphoinositides system and the intake of extracellular calcium, it is proposed that the interaction between DA withdrawal and TRH could be integrated at the level of voltage-dependent calcium channels, probably regulating their function to modulate calcium intake. Some reports in GH3, cardiac and striated muscle cells, have shown that voltage-dependent calcium channels, in specific the alfa subunit, is the substrate of the kinases that are activated by cyclic AMP (kinase A) and diacylglycerol (kinase C). Phosphorylation of the alfa subunit produces an increment in the probability for the opening of the channel, hence it is promoted an increase in ionic influx. As a result it is observed the muscle contraction or hormonal secretion.

The hypothesis of this work was that the potentiated PRL release, produced by TRH after DA withdrawal, is produced by a change in the phosphorylation ratio of voltage-dependent calcium channels. Thus, our aim was to determine the nature of the kinase that phosphorylate calcium channels in *in vitro* conditions, and influence channel function in physiological conditions. For this purpose, we used blocking agents for the kinase activated by cyclic AMP (H-89), and for the kinase C (Calphostin C). Another objective in this study was to determine directly the effect of DA withdrawal on the phosphorylation of calcium channels in two lactotrophs models, primary cultives of dispersed cells from the rat adenohypophysis and cell line transfected with the DA receptor. To accomplish this, it was required to determine the density of calcium channels in both models through binding assays (^3H PN200-110), and the relative migration rate of channel subunits in polyacrilamide electrophoresis using ^{125}I -Azidopine. Finally, the phosphorylation ratio of voltage-dependent calcium channels in response to DA withdrawal was determined.

Using kinases blocking agents we demonstrated that their independent blockage did not alter the potentiated PRL release. However, when both kinases were blocked simultaneously it was reduced the potentiated effect of PRL release produced by TRH after DA withdrawal. Results obtained with binding assays indicated that the density of

dihydropyridine sensitive calcium channels was of 137 fmol/mg of tissue with a Kd of 105 pmol/mg of tissue in normal lactotrops. In GH4 cells, a density of calcium channels of 143 fmol/mg of tissue with a Kd of 115 pmol/mg of tissue was obtained, which is similar to that reported for lactotrophs. In respect of the relative electrophoretic migration, in polyacrilamide gels under denaturalized conditions, it was found a polypeptide of molecular weight around 160 kDa in both kind of cells. In lactotrops it was observed a progressive rise in the endogenous rate of phosphorylation in the subunit of 160 kDa, that reached a maximum incorporation 30 minutes after DA withdrawal. In GH4ZR7 cells it was obtained a maximum incorporation of the ^{32}P , in the same subunit 10 minutes after DA withdrawal.

Thus, results here show that DA withdrawal induces a change in the phosphorylation ratio of calcium channels in both kind of cells. This response seems to be mediated by the activity of the cyclic AMP dependent kinase and by kinase C. In conclusion, we propose that calcium channels phosphorylation plays a role in the potentiated release effect of TRH once the transitory suspension of DA has occurred.

INTRODUCCION



La prolactina (PRL) es una hormona proteica que es sintetizada y secretada por los lactotrofos localizados en la adenohipofisis. En los mamiferos, la secrecion de esta hormona esta bajo la influencia inhibitoria ejercida principalmente por la dopamina (DA), mientras que la hormona liberadora de tirotrpina (TRH), es considerada como la principal influencia fisiologica para estimular la secrecion de PRL.

Estudios realizados tanto in vivo como in vitro, han mostrado que la disociacion temporal de la DA de su receptor, trae consigo dos efectos: por un lado estimula por si misma la secrecion de PRL y, por el otro, potencia el efecto estimulante de la TRH para secretar prolactina (Mena et al., 1976; Chiochio et al., 1979; deGreef y Viser, 1981).

Estudios realizados en tejido muscular (Curtis y Caterrall, 1986) y cardiaco (Hosey et al., 1989), han mostrado que los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L son sustrato de fosforilacion por cinasas que son dependientes de AMP ciclico y/o por la cinasa C. Se ha mostrado que la fosforilacion induce un incremento tanto en la probabilidad de apertura de los canales de calcio tipo L, como un aumento en el tiempo total de apertura de los mismos. Ademàs, se mostrò que la fosforilacion produce un

cambio en la dependencia del voltaje para la activación e inactivación del canal de calcio tipo L. Como consecuencia de ello, las corrientes iónicas registradas están aumentadas, y esto induce una contracción muscular más intensa o una mayor secreción.

Por otro lado, estudios realizados en el laboratorio, han mostrado que el agonista de canales de calcio Bay K 8644 reproduce el efecto que se obtiene cuando se suspende a la dopamina; es decir, potencia la acción estimulante de la TRH para secretar PRL en condiciones tales donde la DA ejerció su efecto de manera tónica. Dicho efecto se impide mediante el uso de bloqueadores de canales de calcio como son la nifedipina y el metoxiliverapamil (Hernández et al., 1994).

En base a los estudios electrofisiológicos que han mostrado que el agonista de canales de calcio Bay K 8644 produce un efecto similar al que realiza la fosforilación, en este trabajo se propuso que la fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje es parte del mecanismo por el que se potencia la acción liberadora de la TRH.

Antecedentes



Regulación pleiotrópica de la secreción de prolactina

A diferencia de la mayoría de las hormonas de la hipófisis anterior, la prolactina es la única hormona adenohipofisaria que es secretada en cantidades substanciales en ausencia de una estimulación hipofisiotrópica del hipotálamo. Se ha demostrado ampliamente, que los lactotopos no están bajo el control de una retroalimentación negativa periférica. En su lugar, prevalece el concepto de que el principal control endócrino que el hipotálamo ejerce sobre los lactotopos es de tipo inhibitorio (ver: Ben-Jonathan, 1994). A pesar de la gran información que existe y apoya el concepto de que la PRL está bajo un control inhibitorio, también se reconoce que la secreción de PRL está regulada por múltiples interacciones entre los factores de tipo inhibitorio y los de tipo estimulador que provienen del hipotálamo, independientemente de las interacciones parácrinas que ejercen otros tipos celulares adenohipofisarios, así como autócrinas efectuadas por los mismos lactotopos.

El reconocimiento de que el hipotálamo ejerce un control inhibitorio sobre la secreción de PRL, inspiró la idea de la existencia de un factor inhibitorio de la secreción de PRL (PIF).

Estudios específicos mostraron que el núcleo arcuato proyecta sus terminales nerviosas hacia la capa externa de la eminencia media. Ahí, estas terminales nerviosas hacen contacto con los vasos sanguíneos largos del sistema porta donde liberan a la dopamina (ver: Ben-Jonathan, 1994). Su papel como el regulador fisiológico de la secreción de PRL se basa en lo siguiente: (1) se han reportado concentraciones altas de DA en la sangre portal, que se relacionan de una manera inversa con la secreción de PRL en diferentes contextos; (2) la demostración de que en los lactotrofos existen receptores del tipo D₂ para esta hormona; y, (3) los estudios en los que se mostró que la administración de la DA en concentraciones similares a las reportadas en condiciones in vivo, ejercen el mismo efecto inhibitorio reportado en condiciones fisiológicas (Ben-Jonathan et al, 1989). A raíz de ello, se mostró que el factor endógeno inhibitorio de la secreción de PRL es la catecolamina DA producida en el núcleo arcuato.

A la fecha, se ha mostrado que la secreción basal de PRL se encuentra bajo un control inhibitorio ejercido por la DA hipotalámica. Aunque, estudios realizados en la rata han manifestado la existencia de elevaciones significativas de PRL en plasma, en contextos conductuales tales como el apareamiento o la succión, así como en el estrés, se ha reportado que dichas elevaciones, no son el producto de la disminución en la concentración de DA en sangre portal. En su lugar, prevalece el concepto de que estos picos de secreción, son la resultante de la

interacción entre el factor liberador de PRL (PRF) y la DA.

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) son los dos PRF que se consideran como fisiológicos en la regulación de la secreción de PRL (Malven, 1993). Su papel como reguladores de la secreción de PRL se basa en el hecho de que: **1)** existen concentraciones altas de estas dos hormonas en la sangre portal; **2)** en condiciones in vitro, estas dos hormonas estimulan la secreción de PRL; y, **3)** la inmunización pasiva de cada una de estas hormonas afecta la descarga de la PRL en respuesta a un estímulo fisiológico.

La participación de un factor de tipo inhibitorio y de otro de tipo estimulador en la regulación de la secreción de PRL sigue siendo tema de discusión. Se ha propuesto que la elevación periférica en la concentración de PRL, puede ser la resultante de un decremento en la concentración del factor inhibitorio, o de un aumento en la concentración del factor estimulador (de Greef y Visser, 1981). Los estudios realizados, tanto en ratas ciclistas como en ratas lactantes, para analizar cada una de las hipótesis propuestas han aportado información acerca del papel que juegan ambos factores hipotalámicos para regular la secreción de PRL.

En la rata ciclista, se ha mostrado que la concentración de DA en sangre portal es más baja durante el proestro, que en los demás estadios del ciclo estral (Blake et al., 1974; Ben-Jonathan et al., 1977; Brandt et al., 1990). En este estadio del ciclo estral, se ha mostrado que la secreción de PRL se presenta en dos fases

consecutivas que tienen características propias. La primera fase de secreción de PRL es prominente y tiene poca duración, mientras que la segunda fase es menos elevada pero tiene mayor duración (Murat et al., 1989).

El análisis de los mecanismos que están involucrados en controlar estas dos fases, han mostrado que éstas son reguladas por eventos diferentes. Para el caso de la primera fase de secreción, se mostró que la lobectomía, es decir, la extirpación de la pituitaria posterior, o la eliminación del péptido intestinal vasoactivo (VIP) - por medio de inmunización pasiva-, todos ellos afectaron la primera fase de secreción, sin afectar a la segunda (Murat y Ben-Jonathan, 1987). En base a estos resultados, se propuso que la primera fase de secreción de PRL depende principalmente de la presencia de un PRF, más que de la ausencia del factor inhibidor.

Para el caso de la segunda fase, se mostró que el aumento en los niveles de PRL en sangre periférica, no depende de la presencia de un PRF sino que en su lugar, su secreción está vinculada con la interacción espacio-temporal entre la ausencia del factor de tipo inhibidor como a la presencia de un factor de tipo estimulador (Murat et al., 1989). En esta segunda fase de secreción, la DA parece participar de manera importante en la regulación de la secreción de PRL en las diferentes etapas del ciclo estral. Su participación en esta segunda fase de secreción quedó demostrada en aquellos estudios en los que la administración de domperidona (un antagonista dopaminérgico) produjo un aumento

rápido en la concentración de PRL en sangre periférica en cada periodo del ciclo estral (Haisenleder et al., 1990).

A su vez, se observó que la TRH estimula de manera más eficaz la secreción de PRL cuando ésta se administra posterior al tratamiento con domperidona. Cabe mencionar que el aumento en la concentración de PRL que se produce en la segunda fase de secreción, no sólo es consecuencia de la disminución que se da en la concentración de DA en sangre portal, sino que su secreción también está sujeta a la modulación del número de receptores a DA y TRH dispuestos en el lactotrofo (Bilinski y Tramezzani, 1990). Por lo tanto, se puede deducir que la segunda fase de secreción de PRL está bajo la acción conjunta entre la ausencia y la presencia del efecto inhibitorio y estimulador ejercido por el hipotálamo, respectivamente (Haisenleder et al., 1986).

Para el caso de los estudios realizados en la rata lactante, se ha mostrado que la elevación de la concentración de PRL se da de manera única y, tanto la DA como la TRH participan de manera importante en la regulación de la secreción de PRL.

Utilizando la succión como el estímulo fisiológico y/o la activación eléctrica del nervio mamario (Mena, Pacheco y Grosvenor, 1982) como una emulación de la primera, se pudo mostrar que ambos estímulos provocan una disminución transitoria en la concentración de DA en sangre portal (Mena et al., 1976; Chiocchio et al., 1979; de Greef y Viser, 1981). Sin embargo, la simulación experimental en la reducción transitoria de la infusión

exógena de DA en ratas tratadas con alfa-metil-p-tirosina (inhibidor de la síntesis de DA), no explica del todo la marcada y sostenida elevación que se da en la concentración de PRL circulante en respuesta al estímulo de la succión o la activación eléctrica del nervio mamario (deGreef, Plotski y Neill, 1981; Mena, Pacheco y Grosvenor, 1982). En este sentido, se observa una elevación significativa en los niveles de PRL en sangre periférica, pero esta regresa a niveles basales una vez que la DA también alcanza sus niveles basales.

Una probable explicación que se dió a estos resultados, es que la descarga de PRL es parte integral de un mecanismo complejo que puede incluir la disminución de la concentración de DA en sangre portal, así como la participación de otras hormonas hipotalámicas con actividad liberadora de prolactina (deGreef, Plotski y Neill, 1981). De acuerdo a ello, se pone de relieve la hipótesis originalmente planteada por Grosvenor y Mena (1980) donde plantea que un breve periodo de succión produce una disminución transitoria del tono dopaminérgico el cual es esencial para que la TRH, así como otros factores hipotalámicos con actividad de PRF (Pan y Main, 1990), sea más eficaz en estimular la secreción de PRL.

Más tarde, esta hipótesis se sustentó bajo una serie de observaciones entre las cuales se incluyen las siguientes: 1) por un lado, deGreef y colaboradores (1984) mostraron que los niveles inmunoreactivos de TRH en sangre portal aumentan de 5.3 a 8.7

ng/ml en respuesta al estímulo de la succión; 2) la administración de la TRH a ratas (Burnet y Warkeley, 1976) o a monos rhesus (Norman, 1980) no succionados, no produce un aumento significativo en los niveles de PRL en sangre periférica. En base a estos resultados se sugirió que el incremento dramático que se da en los niveles de PRL en sangre periférica, en respuesta al estímulo de la succión, no resulta tampoco por el sólo aumento en los niveles de la TRH en sangre portal (deGreef y Visser, 1981). En su lugar, dicho efecto es consecuencia de la interacción entre ambos factores hipotalámicos. Esta implicación quedó sustentada con aquellos estudios en los que la administración de la TRH en animales donde la infusión de DA se redujo en un 50% (de Greef y Visser, 1981) como en aquellos donde se suspende transitoriamente (Fagin y Neill, 1981; Plotski y Neill, 1982), muestran un aumento significativo en la concentración de PRL circulante. De esta manera se concluye que la secreción masiva de PRL que se produce por efecto de la succión en la rata lactante, es una consecuencia directa de la interacción entre la disminución en la concentración de DA en sangre portal y del aumento en la concentración de TRH. Sobre todo el efecto que esta disminución en la concentración de DA tiene sobre la capacidad estimulante de la TRH para estimular la secreción de PRL.

Una vez que se demostró que la secreción potenciada de PRL que se da por efecto del estímulo de la succión es consecuencia de la disminución de la concentración de DA en sangre portal, y el efecto que esta disminución tiene sobre la efectividad de la TRH para estimular la secreción de PRL, la pregunta a indagar es: ¿Cuales son los pasos bioquímicos que median esta secreción masiva de PRL?. Para poder responder esta pregunta, primero es necesario conocer cuales son los mecanismos de transducción que emplean tanto la DA como la TRH para regular la secreción de PRL.

De manera resumida, se puede mencionar que la DA ejerce múltiples acciones para inhibir la secreción de PRL. A grandes rasgos, los mecanismos de transducción que la DA utiliza para realizar dicha función se pueden agrupar de la siguiente manera: (1) ejerce una inhibición sobre segundos mensajeros tales como el AMP cíclico (Kebabian y Calne, 1979) y los fosfatos de inositol (Simmonds y Strange, 1985); (2) provoca la activación de canales iónicos que favorecen la hiperpolarización de la membrana celular (Taraskevich y Douglas, 1978), y (3) produce una reducción en la concentración de calcio intracelular necesario para que se lleve a cabo la secreción de PRL (Shofield et al., 1983).

Para el caso de la TRH se ha mostrado que esta promueve la secreción de PRL al: 1) estimular la producción de los fosfatos de inositol (Martin, 1983); 2) provocar un aumento en la

concentración de calcio intracelular (Albert y Thasjian, 1984) y 3) producir una depolarización en la membrana celular del lactotrofo, lo que favorece la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (Imgran et al., 1986). La evidencia que sustenta cada uno de los eventos moleculares utilizados por la DA y la TRH para regular la secreción de PRL serán desglosados en los siguientes apartados.

Segundos mensajeros asociados a la acción de dopamina

Inicialmente, los receptores a DA se habían clasificado farmacológicamente como subtipos D_1 y D_2 . Dicha clasificación se basó en el efecto que la activación del receptor tiene sobre el sistema del AMP cíclico. Se observó que los receptores del subtipo D_1 están acoplados de manera positiva al sistema de la adenilato ciclasa, es decir estimulan la producción de AMP cíclico, mientras que los del subtipo D_2 la inhiben (Kebabian y Calne, 1979). Recientemente, se ha mostrado la existencia de otros tres subtipos de receptores a DA, los cuales se han denominado como D_3 , D_4 y D_5 . Farmacológicamente, los receptores D_3 y D_4 se comportan de manera similar a los receptores del subtipo D_2 , es decir inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y por lo tanto la producción de AMP cíclico; mientras que los receptores denominados D_5 parecen actuar de manera similar a los del subtipo D_1 (Paulssen et al., 1991; Pedersen et al., 1994).

Los estudios realizados con lactotrofos obtenidos de ratas (Kimura, et al., 1976; Ray y Wallis, 1981) y de adenomas de humanos (de Camilli y Macconi, 1979; Schettini et al., 1983; Dal Toso et al., 1989) han mostrado que la DA inhibe la secreción de PRL mediante su unión a receptores del subtipo D₂; es decir, aquellos receptores que están acoplados de manera negativa al sistema de la adenilato ciclasa y que inhiben la producción de AMP cíclico (Kebabian y Calne, 1979; Swennen et al., 1982; Enjalbert y Bockaert, 1983).

Diversas estrategias se utilizaron para tratar de mostrar que la DA inhibe la secreción de PRL al impedir la formación de AMP cíclico. Inicialmente se mostró que la administración aguda de la DA o la somatostatina en cultivos celulares de lactotrofos (Koch et al., 1985), produjeron una reducción en los niveles de AMP cíclico. Este efecto no sólo se observó en cultivos donde se administró de forma aguda a la DA (Swennen y Denef, 1982), sino también se observó en aquellos trabajos en los que se estimuló la producción de AMP cíclico al administrar forskolina (Delbecke et al., 1986). Este efecto inhibitorio que la DA tiene sobre la producción de AMP cíclico se observó inmediatamente de haber sido administrada y alcanzó su máximo efecto 10 minutos después (Swennen y Denef, 1982). En ambos casos, la activación del receptor dopaminérgico produjo una reducción en la concentración de PRL contenida en el medio de cultivo, que se correlacionó con el decremento en los niveles de AMP cíclico (Swennen y Denef, 1982; Koch et al., 1985;

Delbeke et al., 1986).

El efecto que la activación del receptor a DA tiene sobre la producción de AMP cíclico no se da de manera directa. En el lactotrofo, dicho receptor se encuentra acoplado a una proteína G de tipo inhibitorio, por lo que la activación de este tipo de proteína G trae consigo la inactivación de la adenilato ciclasa. La expresión de las proteínas G varían dependiendo del tejido. En la pituitaria normal de rata, se encontraron tres subtipos de proteínas G: la G_i , la G_{i2} y la G_{i3} (Cronin et al., 1983; Paulssen et al., 1991). Así, la activación de este tipo de proteína G, en el lactotrofo, trae consigo la inactivación de la adenilato ciclasa y, además, la disminución de la secreción de PRL (Freissmuth et al., 1989; Wilson et al., 1994; Wang et al., 1995).

Por otro lado, se ha reportado que los receptores a DA no sólo se encuentran acoplados de manera negativa al sistema del AMP cíclico, sino que también lo están para el sistema de los fosfatos de inositol. Inicialmente se mostró que la administración aguda de la DA produjo un decremento en la incorporación de fósforo marcado o 3H -inositol en respuesta a la administración de la TRII o angiotensina. Simultáneamente, se observó que dicho tratamiento produjo una disminución en la concentración de PRL en el medio de cultivo (Simmonds y Strange, 1985; Journet et al., 1987; Forget et al., 1990).

A pesar de que existe información que apoya el concepto de que los receptores dopaminérgicos están acoplados de manera

negativa al sistema de los fosfatos de inositol, a la fecha existe controversia sobre el papel que juega este sistema de segundo mensajero en la regulación de la secreción de PRL. Es evidente que cuando la DA se administra de forma aguda al medio de cultivo, la secreción de PRL se afecta considerablemente. Sin embargo, con este mismo procedimiento, se ha reportado que la producción de los fosfatos de inositol no se altera aún cuando la DA está presente en el medio (Canonico et al., 1986). Es necesario considerar, que dicha controversia pudiera ser la resultante de las estrategias experimentales utilizadas en cada uno de los trabajos por lo es necesario realizar más estudios que muestren el efecto que la DA tiene sobre esta vía de transducción.

Considerando que la activación del sistema de los fosfatos de inositol provoca la subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) por el diacilglicerol (DG), otros trabajos reportan que la actividad de dicha cinasa disminuye cuando se administra de forma aguda a la DA. En este caso se observa que la DA altera marcadamente la actividad de la proteína cinasa C y que este efecto es dependiente de la dosis (Giambalvo y Wagner, 1994). El mecanismo molecular mediante la cual la DA altera la actividad de la PKC e inhibe la secreción de PRL aún no se conoce, pero es posible pensar que este efecto pudiera ser consecuencia de una alteración a nivel del DG o en la inhibición de la expresión del gen de PRL en este tipo de células, respectivamente (Chuang et al., 1993).

La participación del calcio (Ca^{2+}) en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción hormonal se ha apoyado en numerosos estudios realizados en diversas células secretoras, incluyendo a los lactotrofos. En el caso específico de la PRL, existe considerable evidencia que muestra que la secreción de esta hormona depende enormemente de la concentración de calcio intracelular.

La secreción espontánea de PRL depende del aumento en la concentración de calcio intracelular. En dicho evento, el aumento en la concentración de calcio intracelular es consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de calcio sensibles de voltaje, como de la liberación de calcio de pozas intracelulares (Wagner et al., 1993).

Para el caso de la secreción estimulada de PRL, se ha mostrado que esta depende principalmente del calcio extracelular, más que de la participación del mismo de las pozas intracelulares. Esta concepción se apoya de diferentes estudios en los que se muestra que el impedimento de la entrada de calcio extracelular, por el uso de bloqueadores específicos de canales de calcio, dan como resultado una disminución sustancial en la secreción de PRL. Por el contrario su secreción es favorecida al aplicar en el medio ionóforos de calcio o activadores de canales de calcio (Thorner et al., 1980; Gershengorn, 1982; Ozawa y Kimura, 1982; Albert y

Tahsijan, 1984).

Dada la importancia que el Ca^{2+} tiene para estimular la secreción de PRL en el lactotrofo, no es sorprendente imaginar que el efecto inhibitorio de la DA involucre la regulación de la concentración de calcio intracelular. Los experimentos que se realizaron y que involucraron el análisis de tal propuesta, mostraron que la DA inhibe la secreción de PRL al producir un decremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Con la ayuda de indicadores fluorescentes o el uso de calcio radiactivo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), se pudo mostrar que la eliminación de la influencia inhibitoria de la dopamina se acompaña de un aumento en la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Lafond y Collu, 1986). Por el contrario, la administración aguda de DA produce una caída en la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ cuando la secreción de PRL se estimuló al administrar neurotensina (Shofield et al., 1983; Login et al., 1985; Memo et al., 1985; Scherey et al., 1986; Malgaroli et al., 1987).

Además, se ha propuesto que la DA tiene un efecto diferencial sobre la inhibición de la concentración de calcio intracelular en diferentes poblaciones celulares de lactotrofos. Usando el indicador fluorescente Fura-2, se mostró que en un grupo celular la administración aguda de la DA produjo un decremento en la concentración de calcio intracelular, mientras que en otro grupo su efecto no fue tan marcado. Estos resultados, aún preliminares, revelan una heterogeneidad en términos del efecto de la DA sobre la regulación de calcio intracelular (Malgaroli

et al., 1987; Winiger et al., 1987; Gregerson et al., 1995) así como en control de la regulación de la secreción de PRL.

Efecto de la dopamina sobre las propiedades eléctricas de la membrana celular del lactotrofo

Los estudios realizados en los que se analizaron las propiedades electrofisiológicas en diferentes tipos de células endócrinas, han mostrado que los cambios en las propiedades eléctricas de su membrana externa juegan un papel importante en la regulación de la secreción de la hormona.

La demostración de que las células secretoras de PRL (normales o tumorales) son eléctricamente excitables, proviene de estudios de registros extracelulares en donde se muestra que la DA inhibe la actividad de disparo espontánea en estas células (Taraskevich y Douglas, 1978; Israel et al., 1987). Esta propiedad en los lactotrofos, aportó una herramienta más de estudio para tratar de comprender como se regula la secreción de PRL en respuesta a un estímulo fisiológico. A partir de estos estudios, se genera la hipótesis de que la DA puede tener influencia sobre la secreción de la PRL al modificar las propiedades eléctricas en el lactotrofo.

Mediante el uso de los registros intracelulares se mostro que la DA inhibe la generación de potenciales de acción al producir una hiperpolarización en la membrana celular del lactotrofo (Israel et

al., 1985; Ingram et al., 1986; Israel et al., 1987). En base a ello, se propuso que el mecanismo mediante el cual la DA produce esta hiperpolarización es a través de aumentar la conductancia al potasio.

Con este tipo de registros se pudo determinar que cuando se aplican pulsos depolarizantes, el potencial de membrana en el lactotrofo cambia de -55mV a 39mV . Analizando las corrientes iónicas responsables de generar los picos depolarizantes, se encontró que estos se bloquean cuando en el medio se aplica al ión cobalto. Estos resultados sugirieron que los picos depolarizantes en los lactotrofos dependen de calcio. Tal propuesta se apoyó aún más con aquellos estudios en los que se utilizó el bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina. Con este tipo de experimentos, se observó que los picos depolarizantes no se afectaron. Sin embargo, se encontró que su duración se modifica cuando se aplica en la solución de registro bloqueador de canales de potasio tetraetilamonio (Hagiwara y Ohmori, 1982; Israel et al., 1987).

Analizando el efecto que tiene la aplicación aguda de DA (Ingram et al., 1986; Israel et al., 1987) o somatostatina (Mollard et al., 1988) sobre la membrana, se encontró que esta hiperpolarización es producto de un incremento en la conductancia al potasio, en base a que el potencial de inversión ocurre a nivel del potencial de equilibrio del potasio, es decir a -100 mV aproximadamente (Pfanfänger et al., 1985; Ingram et al., 1986; Cobbet et al., 1987; Israel et al., 1987; Mollard et al., 1988;

al., 1985; Ingram et al., 1986; Israel et al., 1987). En base a ello, se propuso que el mecanismo mediante el cual la DA produce esta hiperpolarización es a través de aumentar la conductancia al potasio.

Con este tipo de registros se pudo determinar que cuando se aplican pulsos depolarizantes, el potencial de membrana en el lactotrofo cambia de -55mV a 39mV . Analizando las corrientes iónicas responsables de generar los picos depolarizantes, se encontró que estos se bloquean cuando en el medio se aplica al ión cobalto. Estos resultados sugirieron que los picos depolarizantes en los lactotrofos dependen de calcio. Tal propuesta se apoyó aún más con aquellos estudios en los que se utilizó el bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina. Con este tipo de experimentos, se observó que los picos depolarizantes no se afectaron. Sin embargo, se encontró que su duración se modifica cuando se aplica en la solución de registro bloqueador de canales de potasio tetraetilamonio (Hagiwara y Ohmori, 1982; Israel et al., 1987).

Analizando el efecto que tiene la aplicación aguda de DA (Ingram et al., 1986; Israel et al., 1987) o somatostatina (Mollard et al., 1988) sobre la membrana, se encontró que esta hiperpolarización es producto de un incremento en la conductancia al potasio, en base a que el potencial de inversión ocurre a nivel del potencial de equilibrio del potasio, es decir a -100 mV aproximadamente (Pfanfänger et al., 1985; Ingram et al., 1986; Cobbet et al., 1987; Israel et al., 1987; Mollard et al., 1988;

Lledo et al., 1990). Por el momento, es posible suponer que la DA bloquea la secreción de PRL al provocar una hiperpolarización en la membrana celular del lactotrofo. De esta manera bloquea el aumento en la concentración de calcio intracelular al evitar la apertura de los canales de calcio sensibles de voltaje.

Segundos mensajeros asociados a la acción de la hormona liberadora de tirotrópica (TRH)

A mediados de los años 70 y principios de los 80 se mostró que la TRH estimula la secreción de PRL. El efecto estimulatorio que esta hormona tiene sobre la secreción de PRL ha sido intensamente, aunque no exclusivamente, estudiado en las células GH. Esta línea celular tumoral, originada de los lactotrofos normales, es un modelo adecuado para realizar este tipo de estudios.

Utilizando este modelo celular se ha mostrado que los receptores de la TRH están acoplados a la vía de los fosfoinosítidos de membrana. De tal manera que la activación de este receptor por la TRH induce la hidrólisis de los mismos generando inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG).

Uno de los primeros trabajos que mostró que el receptor a TRH está acoplado a la vía de los fosfolípidos de membrana fue realizado por Sutton y Martin (1982). En este trabajo estos autores mostraron que la administración de la TRH (4 nM) estimuló la

incorporación del [³²P]-ortofosfato en fosfolípidos extraídos con cloroformo. La máxima incorporación se encontró 20 minutos después de haberse aplicado (Sutton y Martín, 1982).

Con el objeto de verificar si la unión de TRH a su receptor provoca la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana, se cuantificaron los niveles de inositolmonofosfato y diacilglicerol utilizando al [³H]-inositol. En base a ello se encontró que la TRH estimula la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana a través de activar a la fosfolipasa C (Gordeladze et al., 1996). La rápida desaparición en el contenido de fosfatidil inositolbifosfato y la consecuente acumulación de trifosfato de inositol sugiere la activación de la fosfolipasa C (Martín, 1983; Rebecchi et al., 1983; Drummond et al., 1984).

Adicionalmente, se encontró que la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana no depende de un aumento en los niveles de calcio intracelular, debido a que el bloqueo de la entrada de calcio al espacio intracelular no interfiere con la formación de IP₃ y DG una vez que el receptor ha sido estimulado. Estos resultados sugieren que la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana es un evento que ocurre tempranamente al formarse el complejo hormona-receptor, y es independiente de los niveles intracelulares de calcio. (Martín, 1983; Rebecchi y Gershengorn, 1983; Drummond et al., 1984; Kolesnick y Gershengorn, 1985; Kolesnick, 1987; Pachter et al., 1991; Varney et al., 1992).

A mediados de los años 80 se reportó que la hidrólisis de los

fosfolinosítidos requiere de la activación de una proteína G. Cuando la hidrólisis de los fosfolinosítidos es estimulada por la TRH en presencia del análogo no hidrolizable de GTP (GTP γ S), se encontró que TRH fué más eficaz para estimular la hidrólisis del inositol 4.5-bisfosfato (Martin et al., 1986; Straub y Gershengorn, 1986). En este caso dicha proteína no es sensible a la toxina pertusis por lo que probablemente pertenece a la familia de las Gq (G_q, G₁₁; Gollasch et al., 1993).

Efecto de la TRH sobre los niveles de calcio intracelular

La hidrólisis de los fosfolinosítidos de membrana es un evento que ocurre tempranamente al formarse el complejo hormona-receptor, y es independiente de los niveles intracelulares de calcio. Sin embargo, es evidente que cuando se impide la entrada de calcio extracelular al espacio intracelular, se bloquea la secreción de PRL aún en presencia de TRH (Straub y Gershengorn, 1986). Por tal motivo, se propuso que un aumento en la concentración de calcio intracelular es necesario para que la TRH estimule la secreción de PRL (Schofield, 1983; Wintger et al., 1987; Wagner et al., 1993; Nelson y Hinkle, 1994). Dicha dependencia quedó demostrada en diversos estudios.

Utilizando EGTA (quelador de calcio), o un medio sin calcio o bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje, se pudo mostrar que todos estos tratamientos bloquearon la secreción de

PRL aún en presencia de TRH (Ozawa y Kimura, 1982; Albert y Tashjian, 1984; Gershengorn y Thaw, 1985). Con estos resultados se concluyó que el efecto estimulante de la TRH depende de un aumento en la concentración de calcio intracelular.

Posteriormente se mostró que la elevación intracelular del calcio en el lactotrofo se produce de forma bifásica. Inicialmente, se observó un incremento rápido y transitorio en los niveles de calcio intracelular, que dura unos cuantos segundos a la que se le denominó fase de pico o primera fase. Posteriormente, se observa otra elevación que muestra un comportamiento diferente al inicial, que se denominó fase sostenida o segunda fase, que dura más tiempo (varios minutos) y es menos pronunciada (Albert y Tashjian, 1984; Gershengorn y Thaw, 1985; Winiger y Schlegel, 1988).

Utilizando varias estrategias para analizar cómo se originan estas dos fases, se concluyó que la primera fase depende de la movilización de calcio intracelular, mientras que la segunda fase es producida por la entrada de calcio extracelular. Esta conclusión se basó de las siguientes observaciones: **1)** la primera fase de elevación de Ca^{2+} es resistente a la presencia de EGTA (Albert y Tashjian, 1984; Guillemete et al., 1987; Shorte et al., 1991). **2)** la segunda fase de secreción se afectó considerablemente cuando las células que fueron incubadas en un medio que carecía de calcio, o en presencia de EGTA, o de bloqueadores de canales de calcio tales como verapamil o nifedipina (Albert y Tashjian, 1984; Gershengorn y Thaw, 1985), y se reestableció cuando se administró en el medio

un activador de canales de calcio como es el Bay K 8644 (Pachter et al., 1991; Carew y Mason, 1995).

Estos resultados sugirieron que la primera fase de elevación de calcio es producto de la movilización de calcio de almacenes intracelulares, específicamente de retículo endoplásmico, (Gershengorn, 1985) y mediada por IP_3 (Guillemette et al., 1987). Mientras que la segunda fase es la resultante de la entrada de calcio extracelular (Kaczorowski et al., 1983; Druova et al., 1988; Enyeart et al., 1990; Gollasch et al., 1993; Cui et al., 1994; Akita et al., 1994; Nelson y Hinkle, 1994). En este último caso, el DG y la PKC parecen estar involucradas (Martin y Kowalchuk, 1984).

Recientemente, se ha reportado que entre la primera y la segunda fase de secreción de PRL, se produce un bloqueo transitorio de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L o de alto umbral. Este fenómeno parece ocurrir 3 minutos después de haberse administrado a la TRH. A pesar de ello, se ha encontrado que bajo estas condiciones la TRH continúa estimulando la secreción de PRL. La explicación que se ha dado a este fenómeno, es que la secreción de PRL pudiera ser la resultante de la activación de canales de calcio de bajo umbral. Es decir, de la activación de canales de calcio tipo T. Así, se ha propuesto que la segunda fase de elevación de la concentración de calcio intracelular, se origina inicialmente de la activación de canales de calcio tipo T (de bajo umbral) y posteriormente de la activación de los canales tipo L (de alto umbral). Con base en ello, se puede

concluir que la TRH emplea de manera temporal, distintos mecanismos para estimular la secreción de PRL (Carew y Mason, 1995; Fomina y Levitan, 1995).

Por otro lado, también se ha propuesto que este segundo aumento de calcio intracelular puede ser producto de la entrada de calcio de tipo capacitativo, es decir, que obedece al vaciamiento del calcio intracelular. Sin embargo, aunque existe evidencia al respecto, todavía se requiere de más estudios que apoyen este último concepto (Villalobos et al., 1995).

Efecto de la TRH sobre las propiedades eléctricas de la membrana celular del lactotrofo

En base a que la secreción estimulada de PRL depende en gran medida de la participación de calcio extracelular, una pregunta que surge es ¿Que efecto tiene la TRH sobre las propiedades eléctricas de la membrana?. Esta pregunta se origina en base a que el paso del calcio extracelular al espacio intracelular, depende en gran medida de la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Los trabajos en los que se analizó el efecto que la TRH tiene sobre las propiedades eléctricas en la membrana del lactotrofo se iniciaron a mediados de los años 70. Los estudios en los que se analizaron las propiedades eléctricas de la membrana celular del

lactotro, muestran que estas células son eléctricamente excitables y despliegan potenciales de acción cuando se aplica una corriente despolarizante. Mientras que algunas células, aproximadamente el 28% de la población total de lactotro, presentan actividad eléctrica espontánea (Dufy et al., 1979). Es decir, que se generan potenciales de acción sin un estímulo "aparente".

Analizando el efecto que la TRH tiene sobre las propiedades eléctricas sobre la membrana celular del lactotro, se reportó que un alto porcentaje de las células registradas presentan potenciales de acción. Cuando la TRH se administra de manera repetida, con intervalos de 10 minutos entre cada administración, se registran trenes de potenciales de acción. Además, se encontró que dicho efecto depende principalmente de calcio extracelular. Esta conclusión se basó en el hecho de que cuando se usan bloqueadores de canales de calcio se anula el efecto despolarizante de la TRH. Por el contrario, cuando el sodio es eliminado del medio, es mínimo el cambio que se produce en la generación de los potenciales de acción (Dufy et al., 1979; Aizawa y Hinkle, 1985; Ingram et al., 1986; Barros et al., 1991; Simasko, 1991).

En base a que la TRH estimula la secreción de PRL mediante la activación del sistema de los fosfatos de inositol, se evaluó si la activación de la PKC utilizando ésteres de forbol también produce algún efecto sobre la actividad eléctrica del lactotro. Se encontró que cuando se activa a la proteína cinasa C, se registra un aumento

en la frecuencia de disparo de la membrana celular del lactotrofo (Dufy et al., 1987; Gammon et al., 1989; Sismako, 1991; Akita et al., 1994). Por lo que se concluye que esta proteina participa en la inducción de los cambios en la actividad eléctrica de la membrana.

Los estudios arriba mencionados indican que la TRH produce una depolarización sobre la membrana celular del lactotrofo. Sin embargo, esta respuesta no se da de manera única, ya que también se ha reportado produce una hiperpolarización. En este caso, esta respuesta es la resultante de la activación de los canales de potasio dependientes de calcio (Bauer et al., 1990). Esta hiperpolarización dura pocos segundos y en este tiempo las células están en un periodo refractario (Dufy et al., 1982; Dubinsky y Oxford, 1985). Posteriormente, se registra un incremento en la frecuencia de disparo que parece corresponder con la segunda fase de elevación de calcio intracelular y la secreción de PRL (Fomina et al., 1995).

Mecanismos intracelulares involucrados en la secreción potenciada de prolactina

De acuerdo a lo descrito en la sección anterior, la DA inhibe la secreción de PRL por **1)** inhibir la activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C al activar a una proteina G de tipo inhibitorio; **2)** reducir los niveles intracelulares de calcio y **3)** provocar una hiperpolarización membranar, al activar canales de potasio y por ende inhibir la apertura de los canales de calcio

sensibles a voltaje.

Para el caso de la TRH esta estimula la secreción de PRL al: **1)** estimular la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana al activar a la fosfolipasa C; **2)** producir un incremento bifásico en los niveles intracelulares de calcio y, **3)** producir una depolarización en la membrana celular, de esta manera facilita la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Por otro lado, es claro que el estímulo de la succión produce un decremento en los niveles de DA en sangre portal y que dicho efecto altera la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL. En otras palabras, se potencia el efecto estimulante de la TRH para inducir la secreción de PRL. Tomando en cuenta los mecanismos intracelulares mediante los cuales la DA y la TRH regulan la secreción de PRL y el efecto que la disminución o la suspensión transitoria de la DA tiene sobre la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL, la pregunta que se deriva de ello es: ¿En que punto interactúan ambas vías de segundos mensajeros para potenciar el efecto estimulante de la TRH?

En nuestro laboratorio se ha reproducido, en condiciones in vitro, el efecto que la disminución transitoria en la concentración de la DA tiene sobre la capacidad estimulante de la TRH. En este caso, la DA se suspende de forma aguda seguida de la administración de la TRH. Con este diseño experimental se obtiene la secreción potenciada de PRL, de manera similar a la que se reportó en condiciones in vivo (ver metodología). Por lo tanto, con

este modelo es posible evaluar cual es el punto de interacción entre esta dos vías de segundos mensajeros, utilizadas por estas dos hormonas, para generar dicha respuesta.

Tomando en consideración lo anterior, se ha mostrado que la activación temprana del sistema del AMP cíclico aumenta la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL. Es decir, las estrategias tales como la administración del péptido intestinal vasoactivo (VIP), o la adición del 8-Br-AMP cíclico en presencia constante de DA potencian el efecto estimulante de la TRH (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988) de una manera similar a la que se obtiene cuando se suspende a la DA.

El mismo efecto se obtiene cuando se suspende a la DA y en lugar de administrar a la TRH, las células son tratadas con el ionóforo de calcio A23187 o con el TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación del sistema del AMP cíclico es necesaria para que se potencie el efecto estimulante de la TRH (Martínez de la Escalera et al., 1988). Además, de que dicho mecanismo requiere de un aumento en la concentración de calcio intracelular.

Como se refirió anteriormente, la secreción de PRL depende en gran medida de un aumento en la concentración de calcio intracelular. Dicho aumento se da a expensas de calcio extracelular por su paso a través de canales de calcio sensibles a voltaje. Además, esta entrada puede ser favorecida por la modulación de dichos canales por fosforilación (como se verá más adelante). Así,

utilizando al activador de canales de calcio con el Bay K 8644, que produce un efecto similar al de la fosforilación, se propuso si la modulación de los canales de calcio sensibles a voltaje, pudiera ser el mecanismo mediante el cual la suspensión transitoria de DA pudiera estar potenciando el efecto de la TRH para estimular la secreción de PRL.

Por tal motivo, el Bay K 8644 se administró en presencia tónica de DA con el objeto de evaluar la hipótesis propuesta. Bajo estas condiciones se encontró que dicho agonista reproduce el efecto que se obtiene cuando se suspende a la DA. Incluso, la respuesta es mayor, si se compara con la que se produce cuando se suspende a la DA. Por el contrario, si en el medio se administra nifedipina ó metoxiverapamil (bloqueadores de canales de calcio) se bloquea la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de la DA. Para el caso de la secreción potenciada inducida por el Bay K 8644, esta se reduce considerablemente pero no se bloquea completamente (Hernández et al., 1992). Los resultados obtenidos, muestran que la modulación de los canales de calcio está participando en la generación de la secreción potenciada de PRL. Además, indican que este mecanismo es el punto de interacción entre la vía activada por la suspensión transitoria de DA y la vía activada por la TRH para inducir la secreción potenciada de PRL (Hernández et al., 1994; Hernandez et al., 1996).

Generalidades de los canales de calcio

Inicialmente, los canales de calcio se clasificaron en base a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Para el caso de los canales de calcio tipo T, estos canales se activan con voltajes bajos, es decir, son activados a potenciales de membrana negativos. Los estudios electrofisiológicos muestran que este tipo de canal presenta una corriente de calcio pequeña y transitoria, en base a que se inactivan rápidamente. Por el contrario, los canales L, N y P son activados a voltaje más altos, es decir, requieren un potencial de membrana más positivo para que se activen. Los canales de calcio tipo N y P se inactivan a voltajes más positivos de -40mV y tienen una conductancia intermedia comparada con los canales de calcio tipo T y L. El canal de calcio tipo L tiene una conductancia más larga comparada con los demás canales que son sensibles a voltaje. Su inactivación, a diferencia de los demás canales, no sólo depende del voltaje, sino también puede ser regulado por mecanismos dependientes de calcio. Además de estos subtipos de canales de calcio, también se han identificado otros dos tipos de canales que se conocen como Q y R (ver Catterall y Striessnig, 1992; Catterall et al., 1995).

Como se mencionará en los apartados siguientes, los canales de calcio tipo L han sido los más estudiados, debido a estan

presentes en una alta densidad, en el túbulo transverso del músculo esquelético. Por esta característica, este tipo de canal ha sido purificado con la finalidad de estudiar su constitución y regulación. Así, se ha mostrado que este canal está constituido por un complejo de 5 subunidades. La subunidad alfa 1 ($\alpha 1$) es el componente funcional central del canal. Esta subunidad presenta una movilidad relativa de 155-175 kDa. Las demás subunidades que lo componen son la subunidad β (55-50 kDa), la γ (33-30 kDa) y un complejo de glicoproteínas unidas por un enlace disulfuro $\alpha 2$ y δ que tienen una movilidad relativa de 143 y 27 kDa, respectivamente (ver Catterall y Striessnig, 1992; Catterall et al., 1995).

Recientemente, se ha mostrado que el gen que codifica para la subunidad $\alpha 1$, da lugar a una proteína que está constituida por 1873 aminoácidos. En su longitud completa esta proteína tiene un peso molecular de 212 kDa, que es considerablemente más larga que la que se había estimado anteriormente (155-175 kDa). Posteriormente, con la producción de anticuerpos dirigidos contra secuencias específicas del RNA mensajero que da origen a esta proteína, se ha mostrado que estos anticuerpos inmunoprecipitan, en un 90% aproximadamente, una proteína que tiene un peso molecular de 190 kDa y en un 10% una proteína que tiene un peso de 212 kDa. Ahora se sabe que la subunidad primeramente reportada (155-175 kDa), es producto de la modificación

proteolítica que sufre entre los residuos 1685 y 1699 del terminal carboxilo. Así, cuando proteína es aislada de la membrana celular, presenta una migración relativa, en geles de SDS, de 175 kDa aproximadamente. Dado que ambas formas se han reportado en las células del músculo esquelético en la rata, se ha sugerido que ambas pueden estar presentes en condiciones in vivo. En apoyo a ello, está el hecho de que a la fecha no se ha encontrado un RNA mensajero que codifique para la subunidad $\alpha 1$ truncada, es decir, para la subunidad $\alpha 1$ de 155-175 kDa (ver Catterall y Striessnig, 1992; Catterall et al., 1995).

Además, se ha mostrado que la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio existe en múltiples isoformas. Mediante la clonación y secuenciación del cDNA que da lugar a esta proteína, se mostró que cinco genes diferentes participan en la expresión de la misma. En base a ello, la subunidad $\alpha 1$ se ha clasificado en 5 clases que se denominaron como A, B, C, D, y E. Por esta razón, ahora los canales de calcio sensibles a voltaje no sólo se clasifican en base a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, sino también en base a la subunidad $\alpha 1$ que es expresada en la célula. Considerando esto último, los canales de calcio se han agrupado en base a la similitud en su secuencia de aminoácidos de la subunidad $\alpha 1$. Así, los genes que codifican por la clase C y D conforman a los canales de calcio tipo L, debido a que estas subunidades tienen un 75% de

similitud en la secuencia de aminoácidos, comparada con aquella que se expresa en el músculo esquelético. Esta clase de subunidad es expresada en diferentes células que incluyen aquellas que constituyen al corazón, el cerebro, el páncreas y en las células GH₃.

Los genes que codifican para las clases A, B y E, no codifican para los canales tipo L. Para el caso de la clase A se ha propuesto que forma parte del canal de calcio tipo P, la clase E para el canal de calcio tipo R, mientras que la clase B forma parte del canal de calcio tipo N (Dunlap et al., 1995). La distribución celular de estas últimas 3 clases es muy amplia, pero ninguna de ellas se localiza en los lactotrofos.

Purificación y caracterización de los canales de calcio

La purificación del canal de calcio fue uno de los primeros pasos que se realizaron con el objeto de conocer su constitución molecular. En vista de que el canal en estudio se localiza embebido en la membrana plasmática, se necesitó del uso de un apropiado método que ayudara a aislar el canal de su lugar de origen. Con base en que el sistema del túbulo T tiene una concentración 10 veces mayor de canales de calcio tipo L que cualquier otra preparación realizada hasta el momento (Catterall et al., 1988; Catterall et al., 1989; Florio y Catterall, 1992; Kuniyasu et al., 1992), esta ha sido la razón por la que la mayor parte de los estudios que se han

realizado sobre los canales de calcio tipo L, se han llevado a cabo en tejido.

Varias herramientas de trabajo fueron necesarias para estudiar a los canales de calcio tipo L. Una de ellas, consistió en solubilizar los canales de la fracción membranal para posteriormente ser sedimentados y concentrados por su paso a través de columnas de cromatografía e identificados por estar unidos al radioligando [³H]-PN200-110 (Hosey et al., 1989). La otra, se ayudó del uso de otra clase de radioligando que tiene la propiedad de unirse covalentemente al canal cuando este es expuesto a la luz ultravioleta (Striessnig et al., 1986; Hosey et al., 1987; Sieber et al., 1987; Takahashi et al., 1987; Vaghy et al., 1987). Ambos procedimientos fueron de gran importancia, y cada uno de ellos proporcionó información que dió lugar a un mayor conocimiento sobre la constitución molecular de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Con el uso de este tipo de técnicas se mostró que la subunidad alfa del canal de calcio podía ser sedimentada en un sólo pico. Las características de sedimentación entre los complejos obtenidos de cerebro (Curtis y Catterall, 1983; Massieu y Tapia, 1988) y de músculo esquelético (Glossman et al., 1983; Curtis y Catterall, 1984; Bosorto et al., 1985; Flockerzi et al., 1986; Striessnig et al., 1987; Striessnig et al., 1990) y cardíaco (Cooper et al., 1987; Haase et al., 1991; Kuniyasu et al., 1992) fueron semejantes, por lo que esto indicaba que dichos canales

presentaban características similares (Catterall et al., 1989).

Una alternativa para determinar mejor la composición de los canales de calcio, fué mediante el uso del antagonista del canal de calcio que se conoce como azidopina. Ferry y col. (1984) fué el primero en marcar covalentemente el canal de calcio usando a la [³H]-azidopina. Con este procedimiento logró aislar una molécula de peso molecular aproximado de 145 kDa. Mientras que Galizzi y col. (1986) y Striessnig y col. (1986), utilizando el mismo procedimiento de Ferry y col (1984), separaron un polipeptido de aproximadamente 170 y 165 kDa, respectivamente. Dada la especificidad que tiene esta droga para unirse a los canales de calcio, se concluyó que dicha molécula, es parte constitucional del canal.

Modulación de los canales de calcio
por fosforilación: Estudios bioquímicos

El término de modulación de los canales de calcio es usado en el sentido de que la regulación del funcionamiento del canal no se da de manera directa. Es decir, que la modificación del funcionamiento del canal requiere de la activación de segundos mensajeros. Así, la modulación del canal puede durar desde unos segundos hasta unas horas dependiendo del estímulo que lo generó (Gunter et al., 1987; Hlosey et al., 1988; Hille, 1989; Numoki et al., 1987). En este sentido, la fosforilación de una de las subunidades que componen el canal de calcio, es el mecanismo fisiológico que

se ha mostrado modula el comportamiento del mismo en respuesta a un estímulo fisiológico. Como se verá más adelante, se ha reportado que la subunidad alfa 1 y la beta son sustrato de fosforilación por diferentes cinasas (Catterall et al., 1989; Hosey et al., 1989).

Inicialmente, esta idea se originó de los estudios que se realizaron en el tejido cardiaco. Está bien establecido que la epinefrina aumenta la fuerza de contracción del tejido cardiaco. Se encontró que dicha respuesta parece ser la resultante de un aumento en la concentración de calcio intracelular. Se postuló que dicho aumento en los niveles de calcio intracelular fue consecuencia de la activación de un mayor número de canales de calcio en respuesta al pulso depolarizante que generó la epinefrina (Reuter, 1983). Posteriormente, se mostró que el aumento en la concentración de calcio intracelular podía ser mimetizado al activar al sistema del AMP cíclico utilizando análogos del AMP cíclico o al inyectar la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (Reuter, 1983; Sperelakis et al., 1994). En base a ello, se propuso que quizás este aumento tan marcado en los niveles de calcio intracelular eran producto de la modulación o fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Hagiwara y Ohmori, 1982; Reuter, 1983; Armstrong y Matteson, 1985; Curtis et al., 1985; Josephson et al., 1990; Armstrong y Eckert, 1987; Sperelakis y Wahler, 1988; Hosey et al., 1989; Murphy y Tuana, 1989; Lai et al., 1990; Yabu et al., 1992;

Sculptoreau et al., 1995). Sin embargo, parece que dicha característica no se presenta en aquellos canales que fueron extraídos de tejido cardíaco humano. En este caso, se ha observado que el bloqueo de la proteína cinasa A no impide la facilitación de la activación de estos canales en respuesta a un pulso depolarizante. Por ello, estos autores concluyeron que en este tipo de tejido, la fosforilación de los canales de calcio no está participando en la modulación de la activación del canal de calcio tipo L (Zong et al., 1995; Eisfeld et al., 1996).

Los estudios bioquímicos, han mostrado que la subunidad α del canal de calcio es el sitio de acción de la cinasa dependiente de AMP cíclico y de otras cinasas. En condiciones *in vitro* se ha mostrado que los residuos de serina y treonina de la subunidad α son los sitios más rápidamente fosforilados por la cinasa A (PKA) y PKC (Amstrong y Eckert, 1987). De la misma manera que ocurre en el tejido cardíaco, en las células del músculo esquelético, la fosforilación del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L por la PKA aumenta la probabilidad de apertura del canal (Lazdunski et al., 1988), aún cuando ellos hayan sido purificados y reconstituidos en bicapas lipídicas (Curtis y Catterall, 1986).

Estos resultados muestran que la fosforilación de esta subunidad es suficiente para modular la actividad del canal de calcio en este tipo de células (Taraskevich y Douglas, 1978; Duly et al., 1979; Taraskevich y Douglas, 1980; Yue et al., 1990; Josephson y Sperelakis, 1991; Sculptoreanu et al., 1993). Por el contrario, se

ha mostrado que remoción del grupo fosfato, por efecto de una fosfatasa o por la calcineurina (Hosey et al., 1989), provoca la rápida inactivación del canal (Hosey et al., 1986, 1989; Armstrong y Eckert 1987).

Aunque estos estudios fueron principalmente realizados en canales de calcio de tejido muscular, actualmente existe un trabajo en tejido glandular que ha mostrado que los canales de calcio tipo L también son fosforilados cuando se activa el sistema del AMP cíclico. Utilizando varias herramientas de trabajo como son la inducción de la fosforilación de los canales de calcio tipo L en condiciones in vivo, la inducción de la fosforilación en condiciones in vitro y la inmunoprecipitación, se pudo mostrar de manera directa que la subunidad $\alpha 1$ es fosforilada por la PKA, en condiciones in vivo. Esta conclusión se tomó en base a que la inducción de la fosforilación de los mismos en condiciones in vitro (back phosphorylation), se reduce en comparación con aquellos que no se fosforilaron anteriormente (Leiser y Fleischer, 1996).

Estudios electrofisiológicos

Los estudios electrofisiológicos han sido otra alternativa que se ha utilizado para tratar de mostrar cual es el/o los mecanismo(s) mediante los que la fosforilación produce un cambio en la conducta del canal de calcio. Además, constituye una herramienta muy útil para mostrar dicho mecanismo en aquellos.

Inicialmente, se ha encontrado que la fosforilación produce:

- 1) un aumento en la probabilidad de apertura del canal de calcio; es decir, aumenta el número de veces en que el canal se encuentra en un estado abierto en un determinado periodo de tiempo;
- 2) produce un incremento en la probabilidad máxima de apertura del mismo; y,
- 3) cambia su dependencia al voltaje. Es decir, requiere de voltajes menos depolarizantes para que se active el canal de calcio (Chang et al., 1991; Ma et al., 1991).

Los trabajos realizados por Mundiña-Wellenmann y col. (1991 a, b) muestran lo que anteriormente se mencionó. En este caso, la administración intracelular de la cinasa dependiente de AMP cíclico produjo un aumento en las corrientes iónicas al aumentar la probabilidad máxima de apertura del canal de calcio tipo L, y al cambiar la dependencia de voltaje a valores menos depolarizantes. Sin embargo, este efecto no parece ser universal para todas las cinasas, ya que la proteína cinasa C parece actuar de manera diferente. En este caso, la cinasa C también provoca un aumento en la probabilidad máxima de apertura del canal, pero parece ser consecuencia del cambio entre tiempo de apertura y cierre del canal. En otras palabras, se encontró que la proteína cinasa C favorece la apertura del canal y disminuye el tiempo de cierre del mismo. En este caso, no se observó ningún cambio en la dependencia al voltaje (Ma et al., 1992; Sperelakis et al., 1994; Yuan y Bers, 1995).

En los lactotrofos así como en las células GH₃, se han identificado dos tipos de canales de calcio. Aquellos que tienen un umbral alto (tipo L) y los que tienen un bajo umbral de activación (tipo T; DeRiemer, 1989; Herrington y Lingle, 1992) y recientemente, se ha reportado la existencia de canales tipo N.

En estado de reposo, los canales de calcio sensibles a voltaje se encuentran en un estado donde la probabilidad de apertura es baja. Pero, dicho estado cambia a uno de alta probabilidad de apertura en presencia de la TRH (Mantegazza et al., 1995). De acuerdo a ello, se propuso que este efecto puede ser consecuencia de la fosforilación del canal de calcio en este tipo de células (Armstrong y Eckert, 1987; Sikdar et al., 1990; Dreijer et al., 1995) cuando se activa al sistema del AMP cíclico o a la PKC (Armstrong y Eckert, 1987).

En las células AtT-20 (una línea celular adenohipofisiaria secretora de ACTH; Loechner et al., 1996) como en las células cromafines (Artalejo et al., 1992) se han reportado 3 tipos de canales de calcio que son sensibles a diferentes drogas, entre estos canales destacan aquellos que son sensibles a las dihidropiridinas (DHP). A diferencia de los lactotrofos en los que se analizó el efecto de la TRH sobre la conducta del canal, en estas células se analizó la participación de cada uno de estos canales en la secreción. Los resultados que obtuvieron mostraron que solamente los canales que son sensibles a las DHP, están acoplados a la secreción de la ACTH, cuando son estimuladas con la ACTH. Aunque

con estos estudios no se analiza si la fosforilación de los canales pudiera estar participando en mediar la respuesta de la secreción hormonal es este tipo de células, se ha demostrado que existe una facilitación en la activación de los canales de calcio que son sensibles a las DHP probablemente de una manera similar a como se ha propuesto en los somatotropos (Kato, 1995) o en otros tipos celulares (Dolphin, 1996). Aunque se ha mostrado que cuando la expresión de la PKA se altera genéticamente, las corrientes de calcio se reducen y que esto se correlaciona con la reducción en la secreción de la β -endorfina en las células AtT-20 (Gross et al., 1994).

Sitios de fosforilación

Como se mencionó anteriormente, tanto los estudios de tipo bioquímico como los de tipo electrofisiológico, muestran que la fosforilación de la subunidad alfa es un mecanismo de regulación de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Más tarde, se mostró que los sitios frecuentemente fosforilados por las diferentes cinasas son los residuos de serina y treonina (Armstrong y Eckert, 1987; Janh et al., 1988; Sculptoreanu et al., 1993). Posteriormente, se mostró que aunque las diferentes cinasas fosforilan serinas y treoninas no las fosforilan de la misma manera. Para el caso de la cinasa dependiente de AMP cíclico se mostró que ésta fosforila preferencialmente residuos de

serina y en menor grado residuos de treonina (Hosey et al., 1986; Yoshida et al., 1992). Aunque existe controversia en ese sentido, ya que existen otros reportes que indican que la PKA fosforila de manera similar a ambos residuos (Armstrong y Eckert, 1987; Janh et al., 1988; Sculptoreanu et al., 1993). Para el caso de la cinasa C, se ha encontrado que fosforila preferencialmente residuos de treonina más que los de serina (O'Callahan y Hosey, 1988; O'Callahan et al., 1988). La cinasa dependiente de calcio/calmodulina fosforila de manera casi similar ambos residuos (Hosey et al., 1986; Yoshida et al., 1992).

Independientemente del peso molecular de la subunidad alfa (200 o de 175 kDa), se ha mostrado que tanto en condiciones in vivo (Rotman et al., 1992) como en condiciones in vitro (Rohrkasten et al., 1988; De Jongh et al., 1989) ambas subunidades son sustrato de fosforilación por la cinasa dependiente de AMP cíclico. Aunque ambas proteínas son bastante similares en cuanto a la secuencia de sus aminoácidos, parece ser que los sitios aceptores del grupo fosfato son diferentes. Para el caso de la subunidad $\alpha 1$ de 175 kDa, se ha mostrado que la serina 687 (Rohrkasten et al., 1988) y las serinas 1757 y 1772 son los sitios en los que actúa la PKA. Para la subunidad $\alpha 1$ de 200 kDa, el lugar de acción es la serina 1854 (Rotman et al., 1992; Rotman et al., 1995). Este último aminoácido se localiza en el carboxilo terminal que es eliminado por efecto de la proteólisis y que da lugar a la

forma de 175 KDa. Por otro lado, se ha mostrado que la eliminación de la serina 1928 de la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio, abole la modulación del mismo realizada por la PKA. Es por ello que se ha propuesto que la fosforilación de la serina 1928 es otro sitio más de fosforilación para la PKA en el tejido cardíaco (Perets et al., 1996).

Aunque estos trabajos muestran específicamente los sitios de acción de la cinasa dependiente de AMP cíclico, todavía es necesario realizar más estudios que indiquen cuales son los sitios para la cinasa dependiente de calcio/calmodulina y de la PKC. Esto con la finalidad de poder explicar las diversas respuestas de la célula en relación a diferentes estímulos fisiológicos.

Regulación de los canales por las fosfatasas

El balance entre los estados de fosforilación y defosforilación depende de la acción equilibrada entre las cinasas y las fosfatasas. Aunque se conoce algo sobre los mecanismos mediante los cuales se pueden modular los canales de calcio, poco se conoce los mecanismos que median la defosforilación de los mismos por las fosfatasas. Por el momento, existen pocos trabajos que muestran la existencia de estas proteínas. En el músculo esquelético se ha mostrado la existencia de las fosfatasas, pero hasta ahora no se ha reportado cual de ellas es la que participa en defosforilar al canal de calcio.

Una manera de abordar el problema ha sido mediante la utilización del ácido okadaico o de la caliculina A, que son potentes bloqueadores de las fosfatasa (ver Obara y Yabu, 1993). En este caso, evitan la defosforilación de los canales de calcio al bloquear la actividad de las fosfatasa.

El bloque de la defosforilación de los canales de calcio que han sido fosforilados por la diferentes cinasas, se traduce en un aumento de la apertura del canal de calcio al prolongar el tiempo de fosforilación del mismo (Obara y Yabu, 1993). Los estudios realizados en el músculo liso de pollo (Ishihara et al., 1989), rata (Woscholski y Marmé, 1992) y de cobayo (Obara y Yabu, 1993) utilizando este tipo de bloqueadores, mostraron que la contractilidad del músculo se favorece en presencia de estos bloqueadores. Por lo que se ha podido mostrar que la defosforilación realiza el efecto contrario a la fosforilación. Es decir, un canal que se encuentra en un estado fosforilado y que se inactiva lentamente, puede ser cambiado a uno de los que se inactivan rápidamente por su defosforilación (Allen y Chapman, 1995; Wiechen et al., 1995; Chen et al., 1995).

Aunque este mecanismo pudiera ser generalizado para cualquier tipo de células, se ha visto que esto no ocurre en las células de insulinooma de rata (RIn5F). En estas células, el bloqueo de las fosfatasa PP-1 y PP-2A al administrar al ácido okadaico, produce un decremento en la concentración de calcio intracelular inducida en respuesta a diferentes estímulos. En este caso, se

propuso que quizás este mecanismo se acople a la reducción de la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje más que a su prolongación (Ammon et al., 1996). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se está modificando el funcionamiento de estos canales aún necesita ser analizado con mayor detalle.

Células GH₄ transfectadas con el receptor a dopamina

A pesar de los estudios realizados en el lactotrofo arrojan suficiente información que indica que la DA inhibe la formación de segundos mensajeros (Hanna y Shin, 1992) y que decrementa el potencial de membrana al activar la apertura de canales de potasio, aún no está del todo esclarecido cual es(son) el(los) mecanismo(s) celulares que intervienen para impedir la secreción de PRL cuando la DA se une a su receptor. Aunado a ello, existe controversia sobre el verdadero papel que la DA tiene sobre los fosfatos de inositol para inhibir la secreción de PRL. Tal controversia, parece ser la resultante del procedimiento experimental utilizado, así como de la diversidad celular que existe en la adenohipófisis. Por esta razón, con el objeto de poder evaluar los mecanismos de transducción utilizados por la DA para impedir la secreción de PRL hubo la necesidad de producir una línea celular de lactotrofos.

Las células GH₄, una línea celular que secreta tanto PRL como hormona de crecimiento, que fueron generadas con la finalidad de obtener una población homogénea donde poder realizar estudios

bioquímicos en lactotopos. Sin embargo, esta línea celular mostró algunas limitaciones. Una de ellas implicó la carencia de receptores dopaminérgicos. Por esta razón, no se pudieron utilizar para discernir de manera más concreta los mecanismos intracelulares mediante los cuales impide la secreción de PRL. Aunque resultaron ser un buen modelo para obtener información de los mecanismos intracelulares que median la secreción de PRL inducida por la TRH.

Recientemente, y con la finalidad de obtener una línea celular que respondiera a la DA una subclona de las células GH₃, las células GH₃C₁, fueron transfectadas con el cDNA que codifica para el receptor D₂ dopaminérgico (Vallar et al., 1990; Civelli et al., 1991; Seabrook et al., 1992; Pedersen et al., 1994; Senogles, 1994; Ventra et al., 1995). Esta línea celular se denominó como GH₃ZR₇ (Civelli et al., 1991). La unión de la DA a su receptor implica el primer paso de toda una cascada de eventos que finalmente resultan en la inhibición de la secreción de PRL. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar el efecto que esta hormona tiene sobre el sistema del AMP cíclico.

Se encontró que la administración de la DA en estas células, inhibe la producción de AMP cíclico de una manera similar como se ha reportado en los lactotopos obtenidos de la adenohipofisis. Cuando la secreción de PRL se estimuló mediante la administración del VIP (el cual se sabe estimula la secreción de PRL al activar el sistema del AMP cíclico), se encontró que la subsecuente

administración de la DA produjo una reducción en la actividad de la adenilato ciclasa en un 45%. Este efecto se tradujo en un decremento en los niveles de AMP cíclico (Albert et al., 1989; Civelli et al., 1991; Nestler y Duman, 1994).

Dada las características del receptor (Bunzow et al., 1988) se evaluó si dicho receptor pudiera estar acoplado a una proteína G de tipo inhibitorio (Offermanns et al., 1991). En este sentido, se encontró que la administración de DA a células que han sido pretratadas con la toxina pertusis (la cual previene el desplazamiento de la GDP y por lo tanto la mantiene inactiva), fue capaz de desacoplar el efecto de la forskolina y del VIP tienen sobre la adenilato ciclasa. Es decir, impidió que el aumento en los niveles de AMP cíclico se afectaran en respuesta al efecto inhibitorio que la DA tiene sobre esta vía de transducción (Albert et al., 1989). En conclusión, en las células GH₄ZR₇, la unión de la DA a su receptor, evita la activación de la adenilato ciclasa y por lo tanto la consecuente formación del AMP cíclico (Civelli et al., 1991; Seabrook et al., 1992) de una manera similar a como lo realiza en lactotropos normales. Así, esta línea celular resulta ser un modelo adecuado para estudiar más a fondo los mecanismos intracelulares que participan en la regulación de la secreción de PRL, y sobre todo en aquellos involucrados en la interacción entre la DA y la TRH, es decir, en la regulación pleiotrópica.

Por lo anteriormente mencionado, en este trabajo se emplearon dos modelos celulares. Por una parte, se utilizaron

lactotropos disgregados y cultivados en forma primaria, obtenidos de ratas estrogenizadas, y por otro células GH₄ZR, (Civelli et al., 1991) con la finalidad de estudiar y comparar los efectos de la suspensión de la DA sobre la regulación de los canales de calcio tipo L.

HIPOTESIS



La regulación de la secreción de PRL involucra la participación de dos sistemas de segundos mensajeros con efectos diferentes. En este caso la DA y la TRH parecen tener efectos antagónicos en la regulación de la secreción de PRL.

La DA inhibe tónicamente la secreción de PRL al inhibir la formación de AMP cíclico como de los fosfatos de inositol, IP_3 y DG. De manera más tardía, el efecto inhibitorio de la DA parece converger sobre la regulación de la concentración de calcio intracelular. En este caso impide su aumento debido a que bloquea la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L. Por el contrario, la TRH produce los efectos contrarios a los que realiza la DA. En este caso, esta hormona estimula su secreción al activar al sistema de los fosfatos de inositol. Como consecuencia de ello, produce un aumento en la concentración de calcio intracelular necesario para que se estimule la secreción de PRL. Este aumento parece ser la resultante de facilitación de la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L.

Dado que se ha mostrado que la entrada de calcio del espacio intracelular al intracelular puede ser modulada por fosforilación, en este trabajo se ha propuesto que este mecanismo pudiera ser el

reponsable de aumentar la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL en respuesta a la suspensión transitoria de DA. Considerando todos estos antecedentes, la hipótesis que se planteó fue la siguiente:

La suspensión transitoria del tono dopaminérgico produce, a través de la activación tanto de la cinasa dependiente de AMP ciclico como de la cinasa C, un aumento en el indice de fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L. Esta fosforilación en parte es responsable del aumento en la eficacia que muestra la TRH para liberar PRL, cuando esta actúa en células que han escapado de la acción tónica de la DA.

PROPOSITO Y OBJETIVOS



En la presente tesis se analizó si la activación de la proteína cinasa C y/o la proteína cinasa A es(son) esencial(es) para inducir la potenciación de la acción liberadora de la TRH por efecto de la suspensión transitoria de la DA. Se examinó si la suspensión transitoria del tono dopaminérgico afecta el índice de fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje. Para tales propósitos se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1) Determinar cual de las dos cinasas activadas por la suspensión transitoria de DA es la responsable de cambiar la responsividad a la TRH. En este caso se utilizaron a los inhibidores H-89 y la calfoestina C, que bloquean a la cinasa dependiente de AMP cíclico y a la cinasa C, respectivamente.

2) Determinar si las células GH4C1 transfectadas con el receptor a DA del tipo D_2 , constituyen un modelo apropiado de potenciación en lactotropos. Para ello, medimos el grado de respuesta a TRH antes y después de una suspensión transitoria del tono dopaminérgico.

3)- Determinar la densidad de los canales de calcio tipo L tanto en lactotopos en cultivo primario como en la línea celular GH₄ZR₇ usando a la dihidropiridina tritiada PN200-110.

4) Determinar electrofóreticamente la migración relativa de la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio tipo L en ambos modelos, utilizando como estrategia al fotoligando tritiado Azidopina.

5) Determinar si la suspensión de DA provoca un cambio en el índice endógeno de la fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L, determinado por la incorporación de fósforo radiactivo.

METODOLOGIA



Animales

Se utilizaron ratas hembras ciclantes de la cepa Wistar, con pesos entre los 180-200 gramos. Los animales fueron ovariectomizados bilateralmente por 30 días e implantados subcutáneamente en el dorso con cápsulas de silastic (MI: 0.125 inch od; 0.062 inch id) conteniendo estradiol en 1cm de longitud. Dicho tratamiento fundamentalmente aumenta el peso de la hipófisis a expensas de lactotropos. Se ha descrito que su número aumenta de 1.5 a 4 millones de lactotropos por pituitaria y una proporción de un 30% a un 70-90% (Martínez de la Escalera et al., 1989). Los lactotropos obtenidos de este grupo de animales, responden de manera similar a estímulos de suspensión de la DA y la administración de la TRH, así como a la potenciación inducida por la suspensión transitoria del tono dopaminérgico.

De aquí en adelante, para diferenciar los lactotropos que son obtenidos de la adenohipófisis de ratas estrogenizadas de aquellos que se obtienen de la línea celular GH₄ZR₇, los primeros serán denominados como lactotropos normales, mientras que los segundos se denominarán de la misma manera que GH₄ZR₇ Civelli y col. (1991).

Cultivo de células adenohipofisarias dispersas y de las GH₄ZR₇

La dispersión de las células se llevó a cabo incubando por una hora a 37°C en solución salina de Hanks libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ conteniendo 3 mg/ml de colagenasa (Worthington Biochemical Co) y 40 µg/ml de DNAasa (Sigma Chemical Co) fragmentos adenohipofisarios no mayores de un milímetro cúbico. Los fragmentos se dispersaron a células aisladas por trituración mecánica a través de una pipeta pasteur siliconizada. Las células se sembraron en DME en presencia de suero bovino (10%) y dopamina (500 nM) diluida en presencia de ácido ascórbico (100 µM), 100 U/ml de penicilina-estrptomina, 25 µg/ml de fungizona y 100 µg/ml de gentamicina. La concentración fue de 300.000 células/ml en cajas de 15 mm de diámetro. Finalmente se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO₂ para ser utilizadas al día siguiente (Martínez de la Escalera et al., 1989).

Antes de iniciar el experimento, se agregó 1µl de DA a cada pozo por una hora. Inmediatamente después el medio se cambió por DME sin suero y DA (500 nM) por una hora más. Posteriormente las células fueron incubadas en tres periodos consecutivos de 30 minutos cada uno en la presencia o ausencia de DA (500 nM) o TRH (1µM). Es decir, en el primer periodo todas las células estuvieron en presencia de DA (500 nM); en el segundo periodo, dos grupos de células estuvieron en presencia de un medio libre de DA y en el tercer periodo se reincorporó la DA a

aquellas células que carecieron de la misma en el periodo anterior y se administró la TRH ($1\mu\text{M}$) a aquellas células que estuvieron en presencia tónica de DA como a las que se les suspendió aguadamente a la misma. Para el caso de las células GH₄ZR₇, el procedimiento experimental fué similar al de los lactotrofos normales, sólo que en este caso el medio que se utilizó fue F-10 (Martinez de la Escalera et al., 1989).

Obtención de las Membranas

Ambos grupos celulares se homogenizaron en un buffer que contenía sacarosa (0.32 M) y tris (50 mM pH 7.4) a 4°C. El homogenado fué centrifugado por 10 minutos a 700 g. El precipitado se descartó y el sobrenadante se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 20.000 g. El precipitado se resuspendió en 500 μl de 50 mM de buffer Tris pH 7.4 a 4°C y se centrifugó a 20.000 g por 10 minutos. El precipitado resultante fue almacenado a -70 °C hasta su uso. En todos los pasos se usaron inhibidores de proteasas PMSF (0.1 mM), pepstatina A ($1\mu\text{M}$), leupeptina ($2\mu\text{M}$) y calpaina 1 y 2 a una concentración de 8.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (De Jongh et al., 1989). Las membranas que se obtuvieron de los lactotrofos normales y de las células GH₄ZR₇, se destinaron para los estudios de unión y de fotoafinidad.

Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica endocrinológica que se desarrolla en una fase líquida para producir una reacción inmunológica. En base a su especificidad y sensibilidad, esta técnica es una herramienta bastante útil para medir la concentración de un péptido u hormona contenida en una muestra. En términos generales consiste en poner a competir a dos antígenos, uno marcado con ^{125}I (ioduro de sodio 125) con su contraparte no marcada (muestra) por una cantidad limitada de anticuerpo.

Para la curva estandar se utilizó la PRL 23 kDa (RP-3, NIH) y las concentraciones de la misma fueron de 0.05 ng a 6 ng. Adicionalmente, se colocaron aquellos tubos que contenían tanto la PRL marcada como la muestra obtenida en cada uno de los experimentos. Posteriormente, se administró el anticuerpo (S-9 1/3000, NIH). La mezcla se dejó durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó la proteina A de Staphylococcus aureus para separar la fracción unida al anticuerpo. Este paso se dejó por espacio de 30 minutos. Después de este periodo, los tubos se centrifugaron por 30 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se desechó y el precipitado se cuantificó en un contador gamma. Todo se realizó por duplicado. Los resultados se expresaron en términos del estandar RP-3. Las muestras de cada grupo experimental fueron

analizadas al mismo tiempo y la variación Intraensayo fue menor al 5%.

Experimento 1

Bloqueo farmacológico de las cinasa A y C

Con el objeto de determinar si la secreción potenciada de PRL, que se dá en respuesta a la breve suspensión de DA, involucra la activación de la proteína cinasa A y/o la proteína cinasa C, los lactotropos normales fueron expuestos a bloqueadores específicos para cada una de estas cinasas. Se utilizó el H-89, que es un potente bloqueador de la cinasa A (10^{-6} M; Chijiwa et al., 1990), y a la calfosfina C, que actúa específicamente sobre la cinasa C (10^{-6} M; Kobayashi et al., 1989).

El experimento se dividió en dos partes: en la primera, los bloqueadores se administraron por separado; y, en la segunda, ambos bloqueadores se agregaron simultáneamente al cultivo celular. Con esta estrategia experimental, se pudo determinar si la activación de una de estas cinasas era suficiente para potenciar el efecto estimulante de la TRH o si la activación de ambas cinasas era necesaria para que se produzca la secreción potenciada de PRL. El procedimiento experimental se realizó con la metodología descrita para el cultivo celular (ver métodos). Una vez finalizado el experimento, los medios se recolectaron, centrifugaron y almacenaron para su análisis posterior por RIA. Los experimentos

se realizaron en cultivos primarios de lactotropos. Los resultados que se presentan, corresponden a la medición por radioinmunoensayo (RIA) del tercer periodo de experimentación (60-90 minutos). Los resultados fueron sometidos a la prueba estadística t de Student. La significancia se marca con: * = $p < 0.05$ con respecto a su grupo control (DA+TRH).

Experimento 2

Inducción de la secreción potenciada
en la línea celular GH₄ZR₇

Para determinar el efecto directo que la suspensión transitoria de DA tiene sobre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, se utilizó la línea celular GH₄ZR₇, que derivan de las células de la línea celular GH₄C₁. La transfección del cDNA que codifica para el receptor dopaminérgico D₂ en las células GH₄C₁, les confiere la capacidad de que la DA active las vías intracelulares que intervienen para inhibir la secreción de PRL (Giros et al., 1989; Toso et al., 1989; Seabrook et al., 1992; Senogles, 1994). Por tal motivo, la inducción de la secreción potenciada en estas células se realizó de la misma manera que para los lactotropos.

Experimento 3

Determinación de la densidad de los canales de calcio

Con el objeto de establecer la cantidad de proteína de membrana con la cual se necesita trabajar en los experimentos de fotoafinidad como en los de fosforilación, se determinó la densidad de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, contenida en los lactotropos primarios y en línea celular GH₁ transfectada con el receptor a DA. Para esto, las membranas (100 µg) obtenidas de ambos grupos celulares, fueron incubadas con el radioligando ³H-PN200-110 (50-1000 pM) en 1 ml de MOPS (50 mM, pH 7.4) por 3 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. El pegado no específico se determinó al utilizar nifedipina (1µM). El radioligando unido, fue separado del libre por filtración rápida usando filtros GF/F. Cada filtro fue lavado cinco veces con 5 ml de agua desionizada fría. Posteriormente los filtros se secaron durante toda la noche. Al día siguiente, se les administró 5 ml de tritosol y se incubaron por una hora en agitación constante. La radioactividad se cuantificó por un minuto en un contador de centelleo líquido (Beckman).

Experimento 4

Ubicación electroforética de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L

Como se mencionó en los antecedentes, el peso molecular de los canales de calcio dependientes de voltaje en el tejido muscular y cardíaco esta entre 160-200 kDa. En base a que el tejido con el que se esta trabajando es de tipo glandular, fue necesario determinar su movilidad relativa en ambos grupos celulares.

Las membranas (500 μ g) se incubaron en la presencia del fotoradioligando 3 H-Azidopina (20 nM) en 100 μ l de MOPS (50 mM) a 4°C en la oscuridad por 30 minutos. En presencia de nifedipina inespecífico (50 μ M) se determinó el pegado inespecífico. Después de este periodo, las membranas se expusieron a la luz ultravioleta (longitud de onda 365 nm) por 15 minutos, a una distancia aproximada de 5 cm y a 4°C. Posteriormente, las membranas se centrifugaron en una microcentrifuga (Eppendorf) a 15.000 rpm por 5 minutos. El precipitado fué resuspendido en 40 μ l de buffer de muestra (sample buffer), en presencia de 2-mercaptoetanol. Finalmente, se colocaron en los geles de poliacrilamida (ver más adelante) para cuantificar la cantidad de radioligando contenido en cada fracción del gel y así poder determinar la posición de la subunidad alfa del

canal de calcio tipo L de ambos grupos celulares.

Geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE)

Veinte microlitros de cada muestra que contenían 200 µg de proteína de membrana, fueron cargados en geles de poliacrilamida al 5%, de 1mm de grosor en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Este procedimiento se realizó por duplicado. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, por aproximadamente 45 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Posteriormente, con la finalidad de determinar el pico de la ³H-Azidopina unida a la subunidad alfa del canal de calcio tipo L, éstos se cortaron en fragmentos de 2 mm. Una vez determinada la posición de la subunidad alfa de los canales de calcio tipo L, se realizaron los experimentos de fosforilación como se describe más adelante.

Experimento 5

Inducción de la fosforilación de los canales de calcio sensibles a voltaje en respuesta a la suspensión transitoria de DA

Para determinar el índice de fosforilación inducida por la suspensión transitoria de DA, una hora antes de realizar el experimento, el medio DME se cambió por otro fresco en ausencia de fósforo radiactivo y conteniendo DA. El experimento se realizó por espacio de una hora. Pero 30, 10 y 1 minuto antes de que finalizara el experimento, el medio se cambió por uno carente de DA y que contenía el isótopo radiactivo (0.1 mCi/ml). La reacción se detuvo al aspirar el medio y lavar dos veces las células con PBS (0.01 M) que contenía DA a temperatura ambiente. Posteriormente las células se almacenaron a -70 °C. Para lisar las células, estas fueron expuestas a tres cambios de congelación y descongelación, en 0.2 ml de un buffer que contenía sacarosa (0.3 M) y tris (50 mM; pH 7.4). Las membranas se prepararon de acuerdo con el método descrito anteriormente (experimento 3). La determinación del contenido radiactivo y la ubicación de los canales de calcio dependientes de voltaje se realizó de manera similar al experimento 3.

RESULTADOS



De manera resumida, los resultados obtenidos muestran un aumento en el índice de fosforilación de la subunidad alfa 1 de los canales de calcio tipo L en respuesta a la suspensión aguda de la DA. Además, señalan que el cambio en la efectividad de la TRH para estimular la secreción de PRL requiere de la activación redundante de la cinasa dependiente de AMP cíclico y de la cinasa C.

Experimento 1

Bloqueo farmacológico de las cinasas A y C

Una de las estrategias utilizadas en el proyecto, consistió en utilizar a los bloqueadores H-89 y calfostina C para inhibir a la cinasa dependiente de AMP cíclico y a la cinasa C, respectivamente. Con ello se pretendió analizar si la activación de estas dos cinasas es necesaria y/o suficiente para potenciar el efecto estimulante de la TRH.

Efecto de la administración independiente del H-89 y la calfofina C sobre la secreción potenciada de PRL Inducida por la suspensión transitoria de DA

En la figura 1 se muestra que la administración de TRH a células que carecieron de DA en el periodo anterior (-DA+TRH), produce una mayor secreción de PRL que cuando se administra en un medio donde la DA estuvo presente de manera tónica (DA+TRH). En otras palabras, se potencia el efecto estimulante de la TRH para secretar PRL cuando es administrada después de suspender agudamente a la DA. Por otro lado, en el grupo experimental (H-89) se puede observar que la administración del bloqueador de la cinasa A, desde el primer periodo de experimentación, no tuvo efecto sobre la magnitud de la secreción de PRL inducida por la TRH donde la DA se suspendió transitoriamente es decir, el H-89 no afectó la potenciación de la actividad secretora de la TRH.

En la figura 2 se muestra el efecto de la administración de la calfofina C. Como se puede apreciar en la figura, la administración del inhibidor de la cinasa C tampoco afectó la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA. Es decir, no afectó la secreción de PRL inducida por la administración de TRH posterior a la suspensión aguda de DA.

Efecto de la administración simultánea del H-89 y de la calfofina C sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA

Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran que el bloqueo independiente de cada una de las cinasas, no es suficiente para evitar la secreción potenciada de PRL inducida por la TRH y en respuesta a la suspensión transitoria de DA. Por esta razón, se procedió a administrar de manera simultánea a ambos bloqueadores con la finalidad de mostrar si el bloqueo simultáneo de las dos cinasas es necesario para impedir la secreción potenciada de PRL. Como se puede observar en el grupo control (fig. 3) la administración de TRH posterior a la suspensión aguda de la DA, produce una secreción potenciada de PRL comparada con la secreción de PRL que se obtiene cuando se administra en aquellas células que estuvieron en presencia tónica de la misma (DA+TRH). En el grupo experimental (H-89 + calfofina C), la administración de ambos bloqueadores, impidió la secreción potenciada de PRL inducida por la TRH cuando fué precedida de la suspensión transitoria de DA.

Los resultados obtenidos sugieren que la suspensión transitoria del tono dopaminérgico activa a ambas cinasas, y que tanto la cinasa A y la C están participando en la modulación de los canales de calcio de manera redundante.

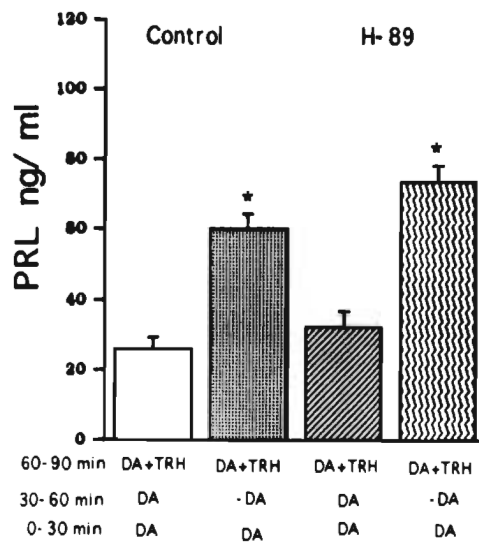


Fig. 1.- Efecto de la administración del bloqueador H-89 sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA. En la figura se muestra la secreción de PRL obtenida en el tercer periodo de experimentación (60-90 minutos) tanto en ausencia como en presencia del H-89 (1 μ M). El bloqueador de la cinasa dependiente de AMP cíclico se administró desde el primer periodo de experimentación. Los valores se muestran como la media \pm error estandar de tres experimentos independientes con determinaciones por sextuplicado. DA= dopamina tónica; -DA= suspensión transitoria de DA; TRH= hormona liberadora de tirotrópina. *= diferencias significativas con respecto al control (DA+TRH; $p < 0.05$).

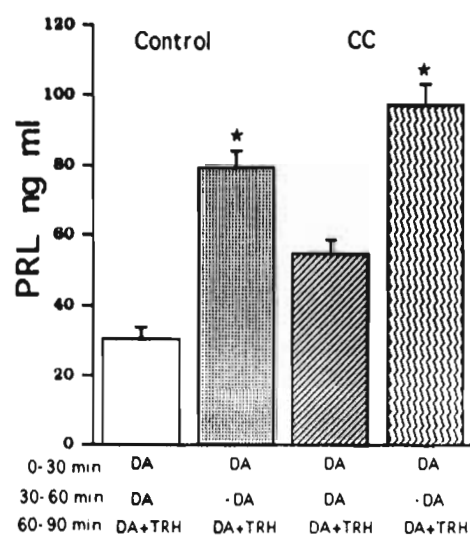


Fig. 2.- Efecto de la administración del bloqueador calfofostina C sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA. En la figura se muestra la secreción de PRL obtenida en el tercer periodo de experimentación (60-90 minutos) tanto en ausencia como en presencia de la calfofostina C (1 μ M). El bloqueador de la cinasa C se administró desde el primer periodo de experimentación. Los valores se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por sextuplicado. DA= dopamina tónica; -DA= suspensión transitoria de DA; TRH= hormona liberadora de tiotropina. *= diferencias significativas con respecto al control (DA+TRH; $p < 0.05$).

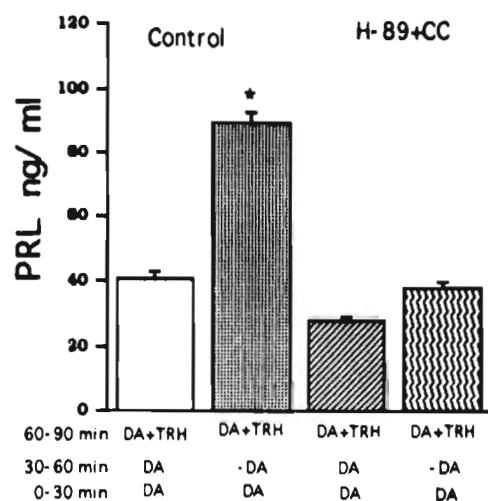


Fig. 3.- Efecto de la administración de los bloqueadores H-89 y la calfoestina C sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA. En la figura se muestra la secreción de PRL obtenida en el tercer periodo de experimentación (60-90 minutos) tanto en ausencia como en presencia del H-89 y de la calfoestina C (1 μ M). El H-89 y la calfoestina C se administraron desde el primer periodo de experimentación. Los valores se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por sextuplicado. DA= dopamina tónica; -DA= suspensión transitoria de DA; TRH= hormona liberadora de tirotrópina. * = diferencias significativas con respecto al control (DA+TRH; $p < 0.05$).

Experimento 2

Inducción de la secreción potenciada
de PRL en las células GH4ZR7

Hasta este momento, todos los experimentos se han realizado en cultivos primarios de lactotopos obtenidos de ratas estrogenizadas. Sin embargo, un problema para realizar la determinación del grado de fosforilación de los canales de calcio en este tipo de células consiste en la heterogenidad celular de la preparación. Por esta razón, se decidió caracterizar una población celular homogénea con la finalidad de descartar interferencia alguna de las otras poblaciones celulares que pudieran enmascarar el índice de fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje en lactotopos. Para esto, se utilizó a la línea celular GH₄ transfectada con el receptor D₂ a DA para tratar de mostrar con ella y comparar con los lactotopos, el efecto que la suspensión aguda de DA pudiera tener sobre dichos canales.

Independientemente de que en esta línea ya se ha mostrado que la administración de DA inhibe la secreción de PRL, en nuestro trabajo fué necesario probar que en este modelo se reproduce el fenómeno de estudio, es decir, la potenciación del efecto secretor de la TRH como se ha mostrado para los lactotopos obtenidos de la adenohipófisis.

En la fig. 4 se muestra el efecto de la suspensión transitoria de DA sobre la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL en ambos modelos. En esta figura se presentan los valores

obtenidos en el tercer periodo de experimentación; es decir, aquella condición experimental donde la DA se reincorpora y se administra a la TRH. Como se puede observar, en ambos grupos celulares, la suspensión aguda de la DA cambia la capacidad estimulante de la TRH para secretar PRL (-DA+TRH). Su efecto es menor si esta se administra en presencia tónica de DA (DA+TRH). Además, la reincorporación de DA al segundo grupo (-DA) mantiene los niveles de PRL en condiciones similares a los del grupo control (DA). Aunque la secreción de PRL en las células GH₁ZR₇ es 6 veces menor a la encontrada en los lactotopos, para efectos de la potenciación ambas respuestas son similares.

Una vez que se mostró que en este tipo celular también se puede inducir la secreción potenciada de PRL, esto nos permitió proceder a realizar los experimentos que forman la parte medular del trabajo y que consiste en mostrar los cambios en el índice de fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L por efecto de la suspensión transitoria de DA.

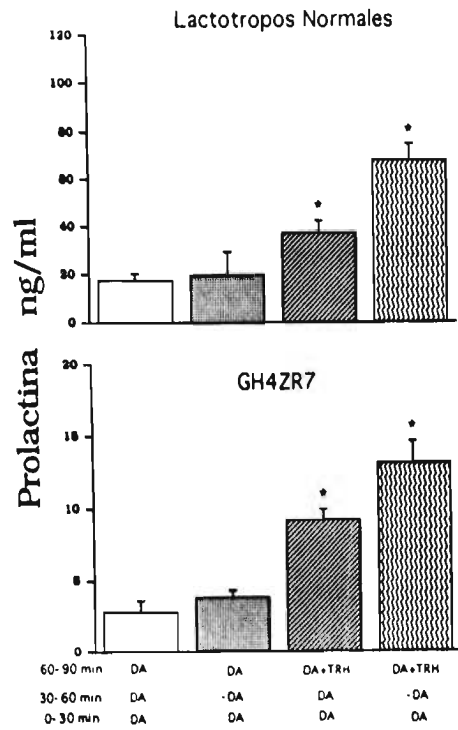


Fig. 4.- Estimulación de la secreción potenciada de prolactina por TRH en respuesta a la suspensión transitoria de DA. En ambas figuras se muestra la secreción de PRL obtenida en el tercer período de experimentación (60-90 minutos) de cultivos celulares de lactotrofos obtenidos de ratas estrogenizadas y de la línea celular GH₄ZR₇. Los valores se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por sextuplicado. DA= dopamina tónica; -DA= suspensión transitoria de DA; TRH= hormona liberadora de tirotrópina. PRL= prolactina. *= diferencias significativas con respecto al control (DA+TRH) $p < 0.05$. Las gráficas representan la media con su error estándar.

Experimento 3

Unión de ^3H -PN200-110 a su receptor en membranas
obtenidas de hipófisis de ratas estrogenizadas
y de la línea celular GH_4ZR_7

La información que se pretende obtener al realizar este tipo de estudios es conocer la densidad de los canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas, presentes en ambos modelos experimentales. Esto con el propósito de poder determinar la cantidad de proteína con la que se necesita trabajar para realizar los experimentos de movilidad relativa y de fosforilación; además de aportar información sobre las características de los canales de calcio tipo L en este tipo de células.

En el panel superior de la fig.5 se muestra la curva de saturación de los canales de calcio, sensibles a las dihidropiridinas, de membranas obtenidas de la adenohipófisis de ratas estrogenizadas. En este estudio se utilizó una concentración fija de proteína de membrana (10 μg) y concentraciones crecientes del radioligando. Estas fueron desde los 50 pM hasta 1 nM. Como se puede observar en la figura, el pegado total del ^3H -PN200-110 a las membranas aumenta de forma curvilínea. El pegado no específico, que se obtuvo en la presencia de una concentración saturable de nifedipina (1 μM), aumenta de manera lineal con respecto a la concentración de ^3H -PN200-110. El pegado específico, que se determinó de la resta entre el pegado total de ^3H -PN200-110 y el inespecífico, muestra una curva de saturación de forma hiperbólica.

que alcanza una meseta a partir de las 0.5 nM. Además, en ella misma se puede observar que existe una clase homogénea de receptores ya que la curva no presenta ninguna deflexión.

Para determinar la unión máxima (Bmax) del radioligando y su constante de disociación (afinidad por el receptor, Kd), fué necesario realizar los estudios de cinética utilizando el análisis de Scatchard. En la parte inferior de la misma figura, se puede observar que existe una sola población de canales de calcio que se une con alta afinidad al ³H-PN200-110. Esta conclusión se toma en base a que la gráfica que se obtuvo es de tipo lineal. La Bmax fué de 137 fmoles/mg de proteína con una constante de disociación de 105 pM. Los resultados que se obtuvieron en este estudio son similares a los obtenidos por los de Massieu y Tapia (1988). Estos autores utilizaron membranas obtenidas de cerebro de ratón y reportan una Bmax de 90 fmoles/mg de proteína y una Kd de 98.6 pM.

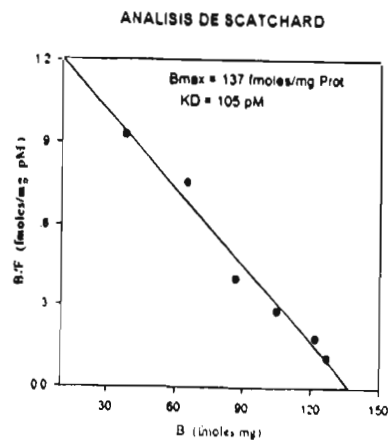
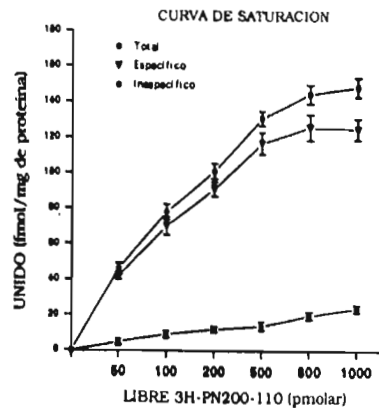


Fig. 5. Unión del ^3H -PN200-100 a membranas obtenidas de hipófisis de ratas estrogenizadas. En la parte superior de la figura se muestra la curva de saturación de las membranas incubadas con concentraciones crecientes de ^3H -PN200-110 a 25°C . Los valores del pegado total (●), el pegado inespecifico (◻) y el especifico (▽) se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado. En la figura inferior se muestra el análisis de Scatchard. El coeficiente de correlación fue de 0.99.

En la fig. 6 se muestra la curva de saturación de los canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas, de membranas obtenidas de la línea celular GH₄ZR₇. De la misma manera que en los lactotropos, en la parte superior de la figura se muestra la curva de saturación y en la parte inferior el análisis de Scatchard. Los resultados obtenidos con esta línea celular son similares a los que se obtuvieron con los lactotropos normales. Como se puede observar en la figura el pegado total del ³H-PN200-110 aumenta de forma curvilínea, el pegado no específico es lineal con respecto a la concentración de ³H-PN200-110 y el pegado específico presenta una curva de saturación de tipo hiperbólica sencilla que alcanza una meseta a partir de las 0.5 nM. De igual manera, el análisis de Scatchard indica que se trata de una sola población de canales de calcio en base a que la gráfica es una recta. La Bmax fue de 143 fmoles/mg de proteína con una constante de disociación de 115 pM. En base a que los resultados que se obtuvieron en ambos grupos celulares fueron similares, estos sugieren la expresión semejante de canales de calcio en ambos modelos.

ESTA TESIS NO DEBE ⁷⁹
SALIR DE LA BIBLIOTECA

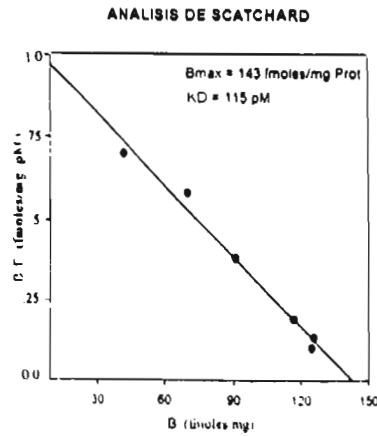
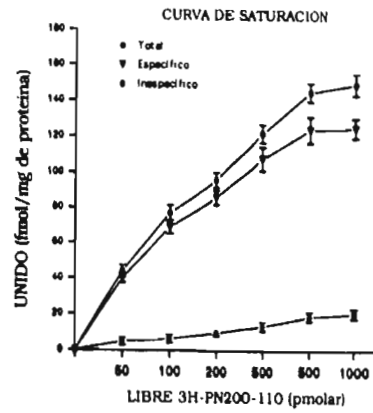


Fig. 6. Unión del ^3H -PN200-100 a membranas obtenidas de las células GH₂₂. En la parte superior de la figura se muestra la curva de saturación de las membranas incubadas con concentraciones crecientes de ^3H -PN200-110 a 25°C. Los valores del pegado total (●), el pegado inespecífico (■) y el específico (▲) se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado. En la figura inferior se muestra el análisis de Scatchard. El coeficiente de correlación fue de 0.99.

Experimento 4

Mobilidad electroforética de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas

Los estudios de fotoafinidad se realizaron con la finalidad de poder identificar electroforéticamente la subunidad alfa del canal de calcio sensible a las dihidropiridinas, de membranas obtenidas de adenohipófisis de ratas tratadas con estrógenos como de las células GH₄ZR₇. En ambos casos las membranas se fotomarcaron con el radioligando ³H-Azidopina. En la fig. 7 se muestran los resultados que se obtuvieron con las membranas obtenidas de la adenohipófisis. La droga que se utilizó en este estudio pertenece al grupo de las dihidropiridinas y se une con alta afinidad a receptores localizados en la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio sensible a voltaje. En la figura 7 se muestran los resultados que se obtuvieron al fraccionar el gel en segmentos de 2 mm. Se observa una fracción que contiene una alta proporción de la ³H-Azidopina (fracción 12 del gel de poliacrilamida). En condiciones reductoras como no reductoras (datos no mostrados), el polipéptido tiene una movilidad relativa aproximada de 160 kDa. A pesar de que en este trabajo se utilizaron inhibidores de proteasas, no se descarta la posibilidad de la existencia de proteolisis, ya que el polipéptido que se une al radioligando tiene una movilidad relativa inferior a la reportada por Rotman y col. (1995). Estos autores mencionan que la subunidad alfa del canal de calcio de tejido muscular es de 200

kDa. Sin embargo, la movilidad relativa de la subunidad obtenida en este trabajo se parece a las primeramente reportadas de 165 a 175 kDa, pero a pesar de ello la movilidad relativa de esta subunidad sigue siendo menor.

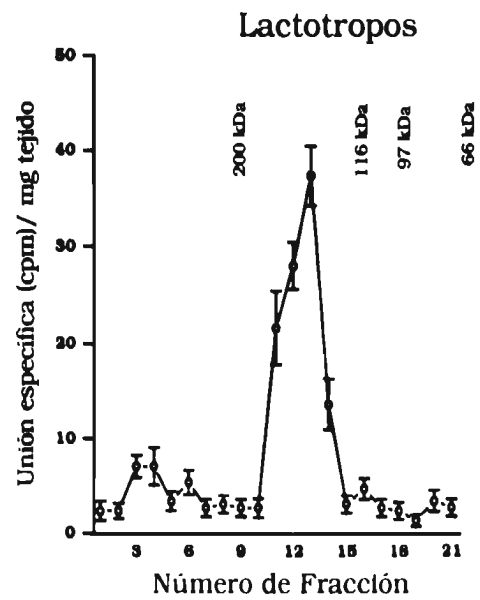


Fig. 7.- Ubicación del polipéptido unido al fotoligando ^3H -Azidopina en membranas obtenidas de hipófisis de ratas estrogenizadas. Las membranas se corrieron en condiciones reductoras. Los valores se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado del polipéptido unido a la ^3H -Azidopina. El gel que se cortó en fracciones de 2 mm y se solubilizaron en H_2O_2 a 60°C .

En la fig. 8 se muestran los resultados que se obtuvieron con las membranas obtenidas de la línea celular GH₄ZR₇. En la figura se muestran los resultados que se obtuvieron al fraccionar el gel en segmentos de 2 mm. Se observa una fracción que tiene una alta proporción de la ³H-Azidopina (fracción 10 del gel de poliacrilamida). De manera similar a los lactotropos, la subunidad alfa en estos canales tiene una movilidad relativa de 163 kDa tanto en condiciones reductoras como no reductoras (datos no mostrados).

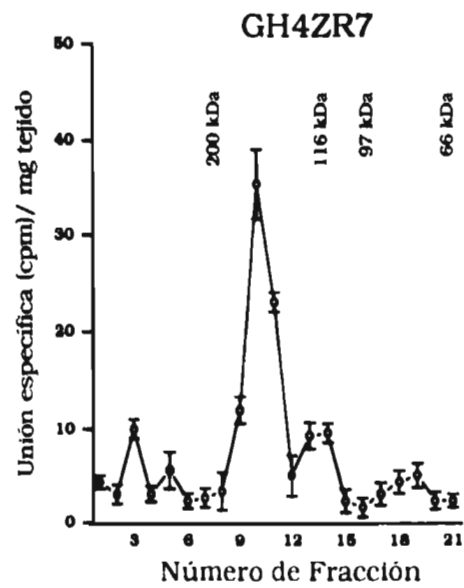


Fig. 8.- Ubicación del polipéptido unido al fotoligando ³H-Azidopina en membranas obtenidas de la línea celular GH₄ZR₇. Las membranas se corrieron en condiciones reductoras. Los valores se muestran como la media ± error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado del polipéptido unido a la ³H-Azidopina. El gel que se cortó en fracciones de 2 mm y se solubilizaron en H₂O₂ a 60°C.

Experimento 5

Modulación del índice de fosforilación en los canales de calcio sensibles a voltaje en lactotropos y en las células GH₄ZR₇

Una vez determinada la densidad y la movilidad electroforética relativa de los canales de calcio sensibles a voltaje, se procedió a realizar los experimentos de fosforilación. En este caso, ambos grupos celulares se incubaron en presencia de $^{32}\text{PO}_4$ con la finalidad de mostrar si la suspensión aguda de la DA induce un cambio en el índice de fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio. Para esto, se utilizaron tres grupos experimentales sometidos a diferentes tiempos de suspensión dopaminérgica. En la fig 9 (lactotropos normales) se muestra el índice de incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ al suspender a la DA por 1, 10 y 30 minutos. Como se puede observar en la figura, la suspensión aguda de la DA por un minuto no produjo un cambio significativo en la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$, en comparación al que se obtuvo con el grupo control, es decir en presencia tónica de DA. Cuando la DA se suspendió por espacio de 10 minutos la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ aumentó significativamente. En este caso se observó un incremento de aproximadamente 1.5 veces su valor en relación al grupo control. Sin embargo, la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ aumento dos veces su valor cuando la dopamina se suspendió por espacio de 30 minutos.

Es evidente que en este tipo de células, la suspensión transitoria de la DA produce un aumento en la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$. El efecto es significativo a los 10 minutos y aumenta conforme se aumenta el tiempo de suspensión dopaminérgica. Dado que en este experimento no se realizaron periodos más prolongados de suspensión dopaminérgica, no es posible saber si la incorporación del grupo radiactivo continúa o alcanza una meseta de fosforilación a los 30 minutos. Esto es porque se ha mostrado que la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio obtenida del músculo esquelético se mantiene fosforilada por periodos más prolongados a los 30 minutos cuando se induce la fosforilación con la proteína cinasa C a 37°C . Por el contrario, dicho efecto no se observa cuando la proteína se purifica; es decir, cuando se aísla de la membrana celular (Hosey et al., 1989).

En la fig 10 se muestra la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ al suspender el tono dopaminérgico en la línea celular GH_4ZR_7 . El protocolo experimental fue igual al mencionado en los lactotropos normales. Como se puede observar en la figura, la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ en estas células es significativa al minuto de haberse suspendido a la DA. En este caso, la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ aumentó aproximadamente 1.2 veces su valor con respecto al grupo control. Cuando la DA se suspendió por 10 minutos se observa un aumento de casi 2 veces en la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ en relación al grupo control. Pero en este caso, dicha incorporación alcanza una meseta a los 10 minutos, ya que la suspensión de la DA por este periodo no

indujo un aumento superior a los 30 minutos de haberla suspendido.

Como se desprende de ambas figuras, la dinámica del fenómeno tiene un curso temporal ligeramente distinto en ambos modelos celulares. Para el caso de las células GH₄ZR, la incorporación del ³²PO₄ fué casi 10 veces comparada con la incorporación obtenida en los lactotrofos normales. Esta diferencia podría deberse al hecho de que la adenohipófisis está constituida por diferentes poblaciones celulares. Independientemente de que el tratamiento con los estrógenos incrementa la población celular de lactotrofos, no se descarta la posibilidad de que exista interferencia de las demás poblaciones celulares, como por ejemplo de los melanotrofos que se sabe también responden a la dopamina.

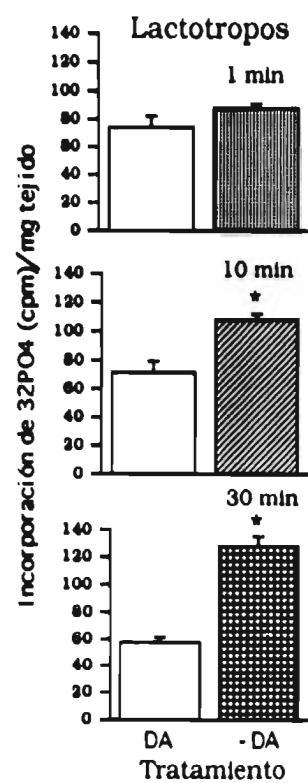


Fig. 9- Modulación del índice de fosforilación en los canales de calcio sensibles a voltaje en lactotrofos. En la figura se muestra la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ /mg de proteína de membranas obtenidas de lactotrofos. La DA se suspendió por 1, 10 y 30 minutos. Los valores se muestran como la media \pm error estandar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado.

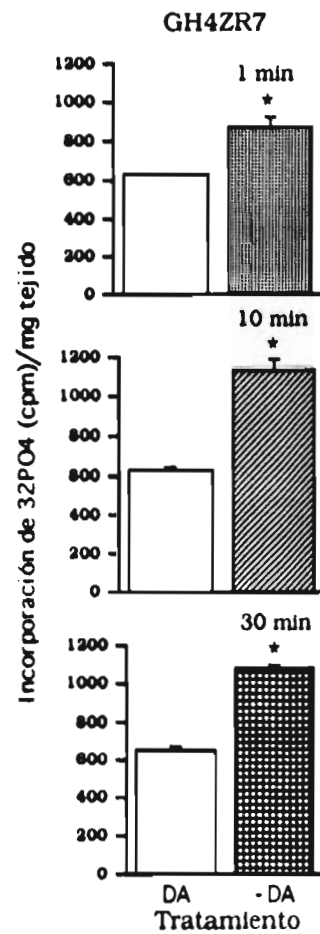


Fig. 10. **Modulación del índice de fosforilación en los canales de calcio dependientes de voltaje en la línea celular GH₄ZR₇.** En la figura se muestra la incorporación del $^{32}\text{PO}_4$ /mg de proteína de membranas obtenidas de la línea celular GH₄ZR₇. La DA se suspendió por 1, 10 y 30 minutos. Los valores se muestran como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes con determinaciones por duplicado

DISCUSION



Los datos obtenidos en la presente tesis permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1) La secreción potenciada de PRL, inducida por la suspensión transitoria de DA, no se modifica cuando la cinasa A y C se bloquean de manera independiente. Por el contrario, si ambas cinasas son bloqueadas al mismo tiempo se evita la secreción potenciada de PRL. Estos resultados muestran que el bloqueo independiente de ambas cinasa no es suficiente para prevenir la secreción potenciada de PRL, pero el bloqueo simultáneo de ambas cinasas obstaculiza el efecto potenciador.

2) En la línea celular transfectada con el receptor a DA (GH_4ZR_7), se puede inducir la secreción potenciada de PRL en respuesta a la suspensión transitoria de DA. La magnitud de la respuesta que se obtiene con este modelo es similar a la que se logra en lactotropos normales obtenidos de la adenohipófisis de la rata estrogénizada.

3) Tanto en los lactotropos en cultivo primario como en la línea celular GH_4ZR_7 , la densidad de canales de calcio es similar. En ambos casos la concentración de los canales de calcio dependientes de voltaje se localiza en el rango de 143 y 137 fmolas/mg de tejido, respectivamente.

4) La fracción que se identificó con la ³H-Azidopina, que parece corresponder a la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio sensible a las dihidropiridinas, presenta una movilidad relativa aproximada de 160-163 kDa. en ambos modelos experimentales.

5) Tanto en lactotopos como en la línea celular GH₄ZR₇, la suspensión transitoria de DA produce un aumento en el índice de fosforilación en la fracción correspondiente a la subunidad alfa 1 del canal de calcio tipo L.

La secreción potenciada de PRL, que se da en respuesta a la suspensión transitoria de DA, involucra la activación de la cinasa dependiente de AMP cíclico y de la cinasa C.

En el presente estudio se mostró que el cambio en la capacidad estimulante de la TRH requiere de la activación de la cinasa dependiente de AMP cíclico como de la cinasa C. Al parecer ambas cinasas participan de manera redundante para mantener fosforilados a los canales de calcio dependientes de voltaje, ya que el bloqueo simultáneo de ambas cinasas impide que la TRH sea más eficaz para estimular la secreción de PRL en respuesta a la suspensión transitoria de DA (fig. 3). Este efecto no se observó cuando se bloqueó de manera independiente a cada una de estas cinasas (fig. 1 y 2).

Está bien establecido que la DA activa receptores del tipo D₂ localizados en la membrana celular del lactotrofo (Enjalbert y

Bockaert, 1983). La ocupación de estos receptores por la DA, o agonistas específicos, reduce la actividad de la adenilato ciclasa (Barnes et al., 1982; Sweenen et al., 1982; Pedersen et al., 1994). Por esta razón, los niveles de AMP cíclico aumentan posterior a la suspensión transitoria de la DA (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988). De manera similar, la suspensión transitoria de la DA activa la formación de los fosfatos de inositol, que se acompaña de un decremento en la concentración de los fosfoinosítidos. Esto sugiere la activación de la fosfolipasa C (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988; Goderladze et al., 1996). La activación de estas vías de transducción por la disociación temporal de la DA de su receptor, constituye el primer paso en toda una cascada de eventos que incluye la activación de la cinasa dependiente de AMP cíclico y de la cinasa C, así como la entrada de calcio extracelular (McFerran et al., 1996).

Existe suficiente evidencia que indica que la secreción de PRL depende del aumento en la concentración de calcio intracelular, a expensas principalmente de calcio extracelular (Albert y Tashjian, 1984). El paso de los iones calcio al espacio intracelular se da a través de la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Ozawa y Kimura, 1982; Malgaroli et al., 1987). Estas elevaciones son suficientes para estimular la secreción de PRL, y se ha mostrado que existe una correlación entre la densidad de canales de calcio localizados en la membrana celular del lactotrofo y la secreción de PRL (Cota et al., 1990).

La reducción en la concentración de calcio intracelular, es otro de los mecanismos mediante la cual la DA inhibe la secreción de PRL. Se ha mostrado que la DA provoca la inactivación de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L al producir una hiperpolarización en la membrana celular del lactotrofo (Israel et al., 1985; Ingram et al., 1986; Gregerson et al., 1994). La consecuencia de ello es el decremento en los niveles de calcio intracelular (Albert y Tashjian, 1984; Gershengorn y Thaw, 1985).

Por otro lado, se ha reportado que la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje se modifica cuando estos han sido fosforilados por las cinasas A y/o C (Reuter, 1983; Hosey et al., 1989; Ma et al., 1991; Ma et al., 1992). Así, cuando los canales son activados a la apertura se da un mayor influjo de iones calcio, promoviendo una mejor respuesta celular.

Es claro que la secreción de PRL además de depender del incremento en los niveles de calcio intracelular, también incluye la modulación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Por estas razones, la activación de las cinasas A y C, en respuesta a la suspensión transitoria de DA, juegan un papel importante en la modulación de la capacidad estimulante de la TRH. En este caso, el efecto no parece repercutir directamente sobre la activación de ambas cinasas, sino más bien sobre los canales de calcio dependientes de voltaje.

Por lo tanto, en este trabajo se propone que el punto de interacción que potencia el efecto estimulante de la TRH entre las

vías de señalización activadas por la suspensión transitoria de DA y la subsecuente administración de TRH, involucra la modulación de los canales de calcio (Hernández et al., 1993; Hernández et al., 1994). En este caso, la fosforilación de los canales de calcio estaría mediada en forma redundante por las cinasas A y C. Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos con los bloqueadores específicos ya que la inactivación simultánea de la cinasa A y C usando el H-89 y la calfoestina C, respectivamente (Kobayashi et al., 1989; H-89; Chijiwa et al., 1990; fig. 3), bloqueó la potenciación.

La suspensión transitoria de DA produce aumento en el índice de fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio tipo L a expensas de la activación tanto de la cinasa dependiente de AMP cíclico como de la cinasa C.

Los resultados obtenidos con los bloqueadores de la cinasa A y C junto con los del activador de canales de calcio Bay K 8644, apoyan de manera indirecta la hipótesis de que el cambio en el índice de fosforilación endógena de los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L, es el punto de interacción que modifica la efectividad de la TRH para estimular la secreción de PRL.

Para mostrar tal propuesta, uno de los primeros problemas que se necesitó resolver, fué encontrar un método adecuado que nos permitiera abordar el problema. Dado que el sistema utilizado en este estudio es un tejido de tipo glandular, la primera estrategia a analizar fue conocer la densidad de canales de calcio en nuestro

sistema de trabajo. Para esto se utilizó al radioligando PN200-110 que se sabe tiene afinidad por los canales de calcio tipo L. En este caso, los estudios se realizaron con el receptor embebido a la membrana celular de células adenohipofisarias enriquecidas en lactotropos y de las células GH₄ZR₇.

Los resultados obtenidos mostraron que la densidad de los canales de calcio sensibles a las DHP es similar en ambos modelos celulares (fig. 5 y 6). El análisis de Scatchard mostró una unión máxima del radioligando a su receptor (en este caso en la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio) de 137 fentomolas/mg proteína para el caso de los lactotropos, mientras que para línea celular la densidad de este mismo tipo de canales fué de 143 fmoles/mg proteína. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los reportados para cerebro. En estos trabajos se encontró que la densidad de los canales de calcio tipo L es de 80 fmoles/mg de tejido (Curtis y Catterall, 1983; Massieu y Tapia, 1988). Por el contrario, en el tejido muscular se ha reportado un rango mayor en cuanto a la densidad de este mismo tipo de canal de calcio. Por ejemplo, para el caso del músculo del sistema del tubulo T en la rata, se reportó una densidad de 17 pmolas/mg tejido con una Kd de 20 nM, mientras que para el tejido cardiaco se reportó una Bmax de 15 pmolas/mg tejido y una Kd de 83 nM (García et al., 1986). Si estos resultados se comparan con los obtenidos en este trabajo (ver fig. 4 y 5) y los de cerebro (Curtis y Catterall, 1983; Massieu y Tapia, 1988), el rango de canales en los primeros es

aproximadamente 500 veces mayor. Esto muestra la dificultad de estudiar los canales de calcio tipo L en este tipo de tejido.

El presente trabajo no sólo se muestra que tanto en el lactotrofo como en la línea celular GH₄ZR₇, existen canales de calcio que son sustrato a drogas que pertenecen tanto al grupo de las dihidropiridinas como al de las fenilaklamidas (DeRiemer, 1989; Hernández et al., 1994), sino que además se muestra que existe una clase de canales de calcio tipo L. Esta conclusión se basa de los resultados obtenidos con la curva de saturación en base a que no presenta ninguna deflexión (fig. 5 y 6).

Debido a la afinidad que los canales de calcio tipo L tienen por las dihidropiridinas, fué posible confirmar la existencia de este tipo de canales en estos modelos celulares. Así, estos resultados son consistentes con aquellos en los que se muestra la existencia de estos canales utilizando como estrategia la electrofisiología. Con esta técnica no sólo se ha reportado que en los lactotrofos existen los canales de calcio tipo L, sino que se ha mostrado la existencia de otro tipo de canales de calcio que se comportan de manera diferente a los canales de calcio tipo L. Por sus características electrofisiológicas y bioquímicas, estos se han agrupado dentro de los canales de calcio tipo T (DeRiemer, 1989).

A la fecha, sólo ha sido posible aislar y purificar a los canales de calcio del tejido muscular debido a que se encuentra una alta densidad de estos canales en este tejido. Por esta misma razón, toda la información que se conoce sobre las características

bioquímicas y la regulación de los mismos provienen de este tipo de tejido. En nuestro caso, este trabajo muestra la densidad de los canales de calcio tipo L tanto en lactotrofos como en las células GH₄ZR₇. Dada la baja densidad de canales de calcio que se localizan en este tipo de tejido, por el momento no es posible aislarlo y purificarlo, con la finalidad de conocer más sobre su composición y regulación.

La demostración de que los canales de calcio sensibles a las DHP pueden ser modulados por fosforilación, proviene de los estudios realizados sobre los canales de calcio obtenidos de tejido muscular. El DNA que codifica para la subunidad alfa del canal de calcio da lugar a una proteína que tiene un peso molecular de 212 kDa. Sin embargo, cuando esta se aísla de la membrana celular, su masa molecular es aproximadamente de 155-175 kDa (Rotman et al., 1992).

Varios estudios han mostrado que la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio es fosforilada por diferentes cinasas (Hosey et al., 1987). Una manera directa de demostrar el grado de fosforilación de los canales de calcio es mediante la inmunoprecipitación (Rotman et al., 1992). Esta ha sido una de las estrategias ampliamente utilizadas una vez que se logró producir anticuerpos dirigidos contra esta subunidad. En nuestro caso, la utilización de la inmunoprecipitación hubiera sido el mecanismo más apropiado para mostrar que la suspensión transitoria de la DA induce un cambio en el índice de fosforilación de los canales de calcio tipo L.

Dado que en nuestro sistema de trabajo la densidad de canales de calcio sensibles a voltaje es más baja que en tejido muscular, no fué posible utilizar esta estrategia experimental para mostrar la hipótesis propuesta en este trabajo. Por tal motivo, fué necesario utilizar otra estrategia que nos permitiera contrastar, de manera indirecta, la hipótesis propuesta en ambos modelos celulares.

Varios grupos de trabajo utilizaron a la azidopina con el objeto de evaluar electroforéticamente la movilidad relativa del canal de calcio en el músculo (Ferry et al., 1984; Striessnig et al., 1986; Hamilton et al., 1989). La confiabilidad del uso de este ligando se basa en: **1)** que esta droga pertenece al grupo de las dihidropiridinas, por lo que tiene afinidad con el canal de calcio tipo L; y **2)** al exponerse a la luz ultravioleta este ligando forma un enlace covalente con la subunidad alfa del canal de calcio. Por esta última característica, es posible rastrear la ubicación de esta subunidad en geles de poliacrilamida (Ferry et al., 1984; Striessnig et al., 1986; Hamilton et al., 1989). Así, el uso de este sistema de trabajo fue el más adecuado para identificar el canal de calcio tipo L en nuestro sistema de estudio.

Con este procedimiento, se localizó una mayor emisión del radioligando entre los marcadores de peso molecular de 200 y 116 kDa que parece corresponder a la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio en ambos grupos celulares. En base a su movilidad en los geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, esta proteína parece tener una masa molecular aproximada de 160 kDa, en ambos

grupos celulares.

En los estudios realizados en el músculo de la rata y del conejo, se han utilizado diferentes estrategias con la finalidad de aportar mayor información sobre la conformación, funcionamiento y regulación de los canales de calcio tipo L. Debido a la alta densidad de canales de calcio tipo L que se localizan en el tejido muscular, todo lo que se conoce acerca de ellos proviene de este tipo de tejido. De manera resumida se sabe que este canal tiene una movilidad relativa que va de los 155-175 a los 190 kDa (Bosorto et al., 1985; Striessnig et al., 1986; Cooper et al., 1987; Striessnig et al., 1987) y, más recientemente se ha reportado que puede llegar a hasta 200 kDa (De Jongh et al., 1989). En nuestro caso la subunidad identificada con la azidopina, presenta una movilidad relativa que cae dentro de las primeramente reportadas para el tejido muscular. Como se mencionó anteriormente, el DNA que codifica para esta proteína da lugar a una subunidad de 212 kDa. Es de suponer, entonces, que la imposibilidad de identificar a una subunidad con una masa molecular mayor sea consecuencia: **1)** del tipo de tejido con el se trabajó y, **2)** la estrategia experimental que se utilizó; es decir, que puede ser producto de la degradación del polipéptido durante la obtención de las membranas.

Los lactotopos son parte estructural de un tejido de tipo glandular. En este sentido, existe heterogeneidad no solo de tipo morfológico sino también funcional entre estos tejidos y es posible suponer que esto también suceda para los canales de calcio. Esta

bién establecido que los canales de calcio tipo L juegan un papel crucial en el acople excitación-contracción en el tejido muscular. Por ello, es posible sugerir que las propiedades estructurales de los canales de calcio en este tejido se correlacionen en favor de la función en la que están implicados; en este caso la secreción de PRL.

Por el momento, no es posible mostrar si la masa molecular que se reporta para esta proteína identificada con la azidopina sea producto de un efecto proteolítico. Sin embargo, debido al bajo índice de canales de calcio tipo L que se localizan tanto en la adenohipófisis como en el cerebro (Curtis y Catterall, 1983; Massieu y Tapia, 1988), no es posible realizar estudios más específicos que muestren si existen diferencias entre la composición molecular de canal de calcio tipo L en ambos tejidos.

A pesar de que durante la obtención de las membranas se utilizan inhibidores de proteasas, es probable que no se evite del todo la degradación de las proteínas que conforman el canal de calcio sensible a voltaje (Bosorto et al., 1985). Por lo tanto, es posible sugerir que la diferencia en la movilidad relativa del canal de calcio pueda ser la resultante de una modificación proteolítica. Esta justificación se apoya en el hecho de que al determinar la posición del canal de calcio electroforéticamente, se obtienen un pico máximo de incorporación del radioligando y varios picos más pequeños que se distribuyen dentro del gel (fig. 7 y 8). Cabe mencionar que aún trabajando sobre el mismo tejido, se han

reportado diferentes pesos para el mismo canal (Striessnig et al., 1986; Hosey et al., 1987; Sieber et al., 1987; Striessnig et al., 1987; Takahashi et al., 1987; Vaghy et al., 1987), y apoyan la posibilidad de que estas diferencias sean la resultante de la degradación del canal de calcio. Por esta razón, es posible considerar que los fragmentos que se están originando por la proteólisis tengan afinidad por el fotoligando por ser parte estructural del mismo canal y contener el receptor a las dihidropiridinas.

Los resultados obtenidos en nuestro sistema coinciden con los obtenidos por Striessnig y col. (1986). Estos autores reportan que el fotoligando se unió, en menor grado, a polipéptidos que tenían pesos moleculares de 240, 99 y 55-52 kDa. En este caso, la banda de 240 kDa se identificó como un heterodimero unido por enlaces disulfuro. Para las bandas más pequeñas se pensó que acarreaban el receptor a las dihidropiridinas. Más tarde, esta sugerencia se apoyó por el hecho de que las condiciones desnaturalizantes constituyen el mayor problema para generar la proteólisis. Aunque se reportó que si bajo estas condiciones se usa 10 mM de N-etilmaleimida se evita el rompimiento del polipéptido de 155 kDa a fragmentos más pequeños (Striessnig et al., 1986).

Todo ello apoya el hecho de que la distribución del fotoligando en el gel de poliacrilamida, es producto de la degradación del polipéptido generado por las condiciones bajo las cuales se obtuvieron las membranas. Aunque exista tal posibilidad,

se puede decir que el polipéptido que aquí se reporta, parece ser parte estructural del canal de calcio tipo L, en base a que el fotoligando que se está utilizando se une covalentemente y con alta afinidad al canal de calcio cuando esta se expone a la luz ultravioleta. Por otra parte hay que considerar que si bien es cierto pudiera existir proteólisis durante la obtención de las membranas, la incorporación del fotoligando se localiza en una mayor cantidad (aproximadamente un 70%) en una fracción del gel de poliacrilamida. Además, hay que considerar que el fotomarcaje se realizó a una temperatura de 4°C con la finalidad de minimizar la disociación del fotoligando y la degradación de la proteína.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la técnica del fotomarcaje puede ser una herramienta para identificar a los canales de calcio en un tejido diferente al músculo, donde la densidad de los canales está varias órdenes de magnitud más abajo a los reportados para el músculo esquelético y cardíaco. Por otro lado, y considerando que la droga que se usó en este sistema pertenece al grupo de las dihidropiridinas, se puede sugerir que el polipeptido de 160-163 kDa que se obtuvo corresponde a la subunidad α_1 del canal de calcio en estos grupos celulares. Usando este mismo procedimiento experimental, Striessnig y col (1986) identificaron un polipéptido que se une con bastante afinidad al fotoligando azidopina. En este caso estos autores utilizaron canales de calcio altamente purificados obtenidos de músculo esquelético de cobayo, y concluyeron que esta técnica

podría ser de gran importancia para identificar canales de calcio en otros tejidos independientemente de que su densidad sea más pequeña. Así, este trabajo se muestra que mediante el uso de una adecuada técnica es posible localizar y determinar la ubicación y masa molecular del canal de calcio dependiente de voltaje.

Una vez identificada la posición en la que se localiza la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio, se procedió con la parte medular del trabajo que fue mostrar el cambio en el índice de fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio tipo L. De manera sintetizada, en el presente trabajo se muestra que la suspensión transitoria de DA produce un aumento en el índice de fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ en este tipo de canal, tanto en los lactotrofos como en la línea celular GH₄ZR₇.

Es ampliamente aceptado que la fosforilación de los canales de calcio es un importante mecanismo en la modulación del funcionamiento de los canales de calcio tipo L sensibles a voltaje. Se ha demostrado que estos canales son fosforilados por la cinasa A (activada por el AMP cíclico), por la cinasa C y por la cinasa activada por calcio/calmodulina (Nunoki et al., 1989; Nastainczyk et al., 1988; Rotman et al., 1992). Como se mencionó anteriormente, la fosforilación provoca cambios funcionales en el canal de calcio que resulta en un mayor influjo de calcio en el interior de la célula (Curtis et al., 1985; Armstrong y Eckert et al., 1987; Yue et al., 1990; Josephson et al., 1991; Sculptoreanu et al.,

1993; Gregerson et al., 1996).

Los estudios de patch clamp con la modalidad de registro de canal único, señalan que la fosforilación incrementa la probabilidad de apertura del canal de calcio, decrecienta el umbral de activación y aumenta el tiempo máximo de apertura del mismo (Ma et al., 1991; Mundiña-Weilenmann et al., 1991; Ma et al., 1992). En conjunto, estas modificaciones provocan una mayor corriente de calcio del medio extracelular al espacio intracelular (Wolscholski y Marme, 1992).

En el tejido muscular se ha mostrado de manera directa que los canales de calcio tipo L son sustrato de fosforilación por las diferentes cinasas y que dicho índice varia en respuesta a un estímulo fisiológico. En otro tipo de tejido como por ejemplo el glandular, dichos estudios no se han podido realizar. Una de las razones consiste por el hecho de que la densidad de canales de calcio en estas células está varias ordenes de magnitud abajo en comparación con el sistema del túbulo T del tejido muscular (Striessnig et al., 1986). Así, el mayor acercamiento que se ha realizado para tratar de mostrar que dicho mecanismo también participa en este tipo de tejido, provienen de estudios indirectos en los que utilizan drogas específicas que inhiben a las cinasas (Yuan y Bers, 1995), o a las fosfatasas (Dolphin, 1992) acoplados al uso de registros electrofisiológicos (Armstrong y Eckert, 1987). Bajo estas condiciones se mostró que los canales de calcio localizados en el lactotropo (Armstrong y Mateson, 1985; Cota et

al., 1990) también son fosforilados por la cinasa dependiente de AMP cíclico (Armstrong y Eckert, 1987).

El objetivo central de este trabajo consistió en analizar si la suspensión transitoria de DA induce un cambio en el índice de fosforilación endógena de los canales de calcio tipo L. Se pudo mostrar que cuando se suspende de manera aguda a la DA, hay un cambio en el índice endógeno de fosforilación de los canales de calcio tipo L. El polipéptido que se identificó electrofóreticamente, presentó un cambio en su índice de fosforilación cuando la DA se suspendió hasta por 30 minutos. En los lactotrofos la fosforilación alcanzó un máximo a los 30 minutos, mientras que la línea celular se dió desde los 10 minutos de haberla suspendido. En base a la movilidad relativa, es posible suponer que el polipéptido marcado corresponde a la subunidad alfa del canal de calcio en estos grupos celulares. La confirmación de esta aseveración ocurrirá cuando se cuente con anticuerpos específicos contra el canal expresado en lactotrofos.

BIBLIOGRAFIA



- Aizawa, T. y P.M. Hinkle (1985). Differential effects of thyrotropin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, phorbol ester, and depolarization in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Endocrinol.* 116: 909.
- Akita, Y.; S. Uhno; Y. Yajima; Y. Konno; T.C. Saigo; K. Mizuno; K. Chida; S. Osada; T. Kuroki; S. Kawashina y K. Suzuki (1994). Overproduction of a Ca²⁺-independent protein kinase C isozyme, nPKC ϵ , increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH₄C₁ cells. *J. Biol. Chem.* 269: 4653.
- Albert, P.R. y A.H. Tashjian, Jr. (1984). Thyrotropin-releasing-hormone-induced spike and plateau in cytosolic free Ca²⁺ concentrations in pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 259: 5827.
- Albert, P.R.; K.A. Neve; J.R. Bunzow y O. Civelli (1989). Coupling of a cloned rat dopamine D₂ receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J. Biol. Chem.* 265: 2098
- Allen, T.J. y R.A. Chapman (1995). The effect of a chemical phosphatase on single calcium channels and the inactivation of whole-cell calcium current from isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 430: 68.
- Ammon, H.P.; R.O. Heurich; H.A. Kolb; F. Long; R. Schaich; G. Drews y T. Leters (1996). The phosphatase inhibitor okadaic acid blocks KCl-depolarization-induced rise of cytosolic calcium of rat insulinoma cells (RINm5F). *Arch. Pharmacol.* 354: 95-101.
- Armstrong, C.M. y D.R. Matteson (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science.* 227: 65.
- Armstrong, A. y R. Eckert (1987). Voltage activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2518.
- Artalejo, C.R.; S. Rossie; R.L. Perlman y A.P. Fox (1992). Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca²⁺ current facilitation in cromaffin cells. *Nature.* 358: 63.
- Barros, F.; L.M. Delgado; C. Maciá y P. de la Peña (1991). Effects of hypothalamic peptides on electrical activity and membrane currents of 'patch perforated' clamped GH₄ anterior pituitary cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 279: 1.
- Bauer, C.K.; W. Meyerhof y J. Schwarz (1990). An inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. *J. Physiol.* 429: 169.
- Ben-Jonathan, N.; C. Oliver; H.J. Weiner; R.S. Mical y J.C. Porter (1977). Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinol.* 100: 452.

- Ben-Jonathan, N.; L.A. Arbogast y J.F. Hyde (1989).- Neuroendocrine regulation of prolactin. *Prog. Neurobiol.* 33: 399.
- Ben-Jonathan, N (1994).- Regulation of prolactin Secretion. En: Imura, H. (Ed.).- *The pituitary gland*. Raven Pres. New York. pp 261.
- Bilinski, M. y J.H. Tramezzani (1990).- Regulación de la secreción de prolactina a nivel celular. *Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40: 437.
- Blake, C.A. (1974).- Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrus rats. *Endocrinol.* 94: 503
- Bosortto, M.; J. Barhanin; M. Fosset y M. Lazdunski (1985).- The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.* 260: 14255.
- Brandt, A.M.; S. Joannidis; F. Peillon y D. Joubert (1990).- Changes of prolactin response to dopamine during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinol.* 51: 449.
- Bunzow, J.R.; H.H.M. Van Tol; D.K. Grandy; P. Albert; J. Salon; M. Christie; C.A. Machida; K.A. Neve y O. Civelli (1988).- Cloning and expression of a rat D_2 dopamine receptor cDNA. *Nature*: 336: 783.
- Bumet, F.R. y J.B. Warkeley (1976).- Plasma concentrations of prolactin and thyrotrophin during suckling in urethane-anesthetized rats. *J. Endocrinol.* 70: 429-437.
- Burris, T.P.; L. Clarence y M.E. Freeman (1991).- Pharmacologic evidence that a D_2 receptor subtype mediates dopaminergic stimulation of prolactin secretion from the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinol.* 54:175.
- Canonico, P.L.; W.D. Jarvis; A.M. Judd y R.M. MacLeod (1986).- Dopamine does not attenuate phosphoinositide hydrolysis in rat anterior pituitary cells. *J. Endocrinol.* 110: 389.
- Carew, M.A. y W.T. Mason (1995).- Control of Ca^{2+} entry into rat lactotrophs by thyrotrophin-releasing hormone. *J. Physiol.* 486: 349.
- Catterall, W.A. (1987).- Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5478.
- Catterall, W.A.; M.J. Seagar y M. Takahashi (1988).- Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263: 3535.
- Catterall, W.A.; M.J. Seagar; M. Takahashi y K. Nunoki (1989).- Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels. En: Wray, W.; R.I. Norman y P. Hess (Eds.).- *Calcium channels: structure and function*. New York Acad. Sci. vol. 560. pp 1.
- Catterall, W.A. y J. Striessnig (1992) - Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Tips.* 13: 256.
- Catterall, W.A. (1995).- Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 493.

- Chang, C.F.; L.M. Gutierrez; C. Mundiña-Wellenmann y M. Hosey (1991).- Dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. II. Functional effects of differential phosphorylation of channel subunits. *J. Biol. Chem.* 265: 16395.
- Chen, T.C.; B. Law; T. Kondratyuk y S. Rossie (1995).- Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J. Biol. Chem.* 270: 7750.
- Chijiwa, T.; A. Inohara; M. Hagiwara; M. Sano; K. Hayashi; T. Inoue; K. Naito, T. Toshioka y H. Hidaka (1990) - *J. Biol. Chem.* 265: 5267
- Chiocchio, S.R.; M.A. Cannata; J.R. Corero Funes y J.H. Tramezzani (1979).- Involvement of adenylyltransferase in the regulation of prolactin release during suckling. *Endocrinol.* 105: 544.
- Chuang, T.T.; L. Caccavelli; C. Kordon y A. Enjalbert (1993).- Protein kinase C regulation of prolactin gene expression in lactotroph cells: involvement in dopamine inhibition. *Endocrinol.* 132: 832.
- Civelli, O.; J.R. Bunzow; D.K. Grandy; Q.Y. Zhou y H.H.M. Van Tol (1991).- Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 207: 277.
- Cobbett, P.; C.D. Ingram y W.T. Mason (1987).- Sodium and Potassium Currents involved in action potential propagation in normal bovine lactotrophs. *J. Physiol.* 392: 273.
- Cobbett, P.; P. Legendre y W.T. Mason (1989).- Characterization of three types of potassium current in cultured neurons of rat supraoptic nucleus area. *J. Physiol.* 419: 443.
- Cooper, C.L.; S. Vandaele; J. Barhanin; M. Fosset; M. Lazdunski y M.M. Hosey (1987).- Purification and characterization of the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent calcium channel from cardiac tissue. *J. Biol. Chem.* 262: 509.
- Cota, G.; M. Hiriart; J. Horta y J.L. Torres-Escalante (1990).- Calcium channels and basal prolactin secretion in single male rat lactotrophs. *Am. J. Physiol.* 259: C949.
- Cronin, M.J.; G.A. Myers; R.M. MacLeod y E.L. Hewlett (1983).- Pertussis toxin uncouples dopamine agonist inhibition of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 244: E499.
- Cui, Z.J.; F.S. Gorelick y P.S. Dammes (1994).- Calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II activation in rat pituitary cells in the presence of thyrotropin-releasing hormone and dopamine. *Endocrinol.* 134: 2245.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1983).- Solubilization of the calcium antagonist receptor from rat brain. *J. Biol. Chem.* 258: 7280.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1984).- Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochem.* 23: 2113.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1985).- Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci.* 82: 2528

- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1986).- Reconstitution of the Voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*. 25: 3077.
- Dal Toso, R.B.; B. Sommer; M. Ewert; A. Herb; D.B. Pritchett; A. Bach; B.D. Shivers y P.H. Seeburg (1989).- The dopamine D₂ receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* 8: 4025.
- DeCamilli, P. y D. Maconi (1979).- Dopamine inhibits adenylate cyclase in the human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature*. 278: 252.
- deGreef, W.J. y T.J. Visser (1981).- Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocrinol.* 91: 213.
- de Greef, W.J.; P.M. Platsky y J.D. Neill (1981).- Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a stimulated suckling stimulus. *Neuroendocrinol.* 32: 229.
- deGreef, W.J.; W. Klootwijk; B. Karels y T.J. Visser (1984).- Levels of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in hypophysial stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J. Endocrinol.* 105: 107.
- De Jongh, K.S.; D. K. Merick y W.A. Catterall (1989).- Subunits of purified calcium channels: a 212-Kda form of α 1 and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8585.
- DeRiemer, S.A. (1989).- Functions for calcium channels in pituitary cells. En: Wra. D.W.; R. I. Norman y P. Hess (Eds).- *Calcium Channels: Structure and Function*. New York Academic Press. USA. pp 413.
- Delbeke, D.; J.G. Scammell; A. Martinez-Campos y P.S. Dannies (1986).- Dopamine inhibits prolactin release when cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels are elevated. *Endocrinol.* 118: 1271.
- Dolphin, A.C. (1996).- Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells. *Tins*. 19: 35.
- Dreljer, A.M.C.; y K.S. Kits (1995).- Multiple second messenger routes enhance two high-voltage-activated calcium currents in molluscan neuroendocrine cells. *Neurosci.* 64: 787.
- Drouva, S.V.; E. Rerat; C. Bihoreau; E. Laplante; R. Rasolonjanahary; H. Clauser y C. Kordon (1988).- Dihydropyridine-sensitive calcium channel activity related to prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone release from anterior pituitary cells in culture: interactions with somatostatin, dopamine, and estrogens. *Endocrinol.* 123: 2762.
- Drummond, A.H. y C.A. Raeburn (1984).- The interaction of lithium with thyrotropin-releasing hormone-stimulated lipid metabolism in GH₃ pituitary tumour cells. *Biochem. J.* 224: 129.
- Drust, D.S. y T.F.J. Martin (1985). Protein Kinase C translocates from cytosol to membrane upon hormone activation: effects of thyrotropin-releasing hormone in GH3 cells. *J. Biol. Chem.* 257: 7566.
- Dubinsky J.M. y G.S. Oxford (1985).- Dual modulation of K channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4282.

- Dufy, B.; V. Jean-Didier; H. Fleury; P.D. Parquier; D. Gourdjy y Tixier-Vidal (1979).- Dopamine inhibition of action potential in a prolactin secreting cell line is modulated by oestrogen. *Nature*. 282: 855.
- Dunlap, K.; J.I. Luebke y T.J. Turner (1995).- Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Tins*. 18: 89
- Eisfeld, J.; G. Mikala; A. Schwartz y G. Varadi (1996).- Lack of involvement of protein kinase A phosphorylation in voltage-dependent facilitation of the activity of human cardiac L-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 446.
- Enjalbert, A. y J. Bockaert (1983).- Pharmacological characterization of the D_2 Dopamine Receptor Negatively Coupled with Adenylate Cyclase in Rat Anterior Pituitary. *Mol. Pharmacol.* 23: 576.
- Enjalbert, A.; F. Sladeczek; G. Guillon; P. Bertrand; C. Shu; J. Epelbaum; A. Garcia-Zainz; S. Jard; C. Lombard; C. Kordon y J. Bockaert (1986).- Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositolphosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 261: 407.
- Enyeart, J.J.; T. Aizawa; y P.M. Hinkle (1986).- Interaction of dihydropyridine Ca^{2+} agonist Bay K 8644 with normal and transformed pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 250: C95.
- Fagin, K.D. y J.D. Neill (1981).- The effect of dopamine on tryptophan-releasing hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinol.* 109: 1835.
- Fearon, C.W. y A.H. Tashjian (1985).- Thyrotropin-releasing hormone induces redistribution of protein kinase C in GH_4C_1 rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 260: 8366.
- Ferry, D.R.; A. Goll y H. Glossmann (1984).- Photoaffinity labeling of Ca^{2+} channels with [3H]-azidopine. *FEBS Lett.* 169: 112.
- Flockerzi, V.; H.J. Oeken y F. Hofmann (1986).- Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur. J. Biochem.* 161: 217.
- Florio, V.; J. Striessnig y W.A. Catterall (1992).- Purification and reconstitution of skeletal muscle. *Meth. Enzymol.* 207: 529.
- Fomina, A.F. y E.S. Levitan (1995).- Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs. *J. Neurosci.* 15: 4982.
- Forget, H.; C. Huot y R. Collu (1990).- Control of phospholipid turnover and prolactin release in a dopamine-sensitive, prolactin-secreting rat pituitary adenoma and in two dopamine-resistant, prolactin-secreting rat pituitary tumors. *J. Neuroendocrinol.* 2: 833.
- Freissmuth, M.; P.J. Casey y A.G. Gilman (1989).- G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J.* 3: 2125
- Galizi, J.P.; M. Bosotto; J. Barhanin; M. Foset y M. Lazdunski (1986).- Characterization and photoaffinity labeling of receptor sites for the Ca^{2+} channel inhibitors d-cis-diltiazem, (+)-bepridil, disinetoxiverapamil and (+) PN200-110m skeletal muscle transverse tubule membranes. *J. Biol. Chem.* 261: 1393.

Gammon, C.M.; G.S. Oxford; A.C. Allen; K.D. McCarthy y P. Morrel (1989).- Diacylglycerol modulates action potential frequency in GH₃ pituitary cells: correlative biochemical and electrophysiological studies. *Brain Res.* 479: 217.

Gershengorn, M.C. (1982).- Thyrotropin releasing hormone. *Mol. Cell. Biochem.* 45: 163.

Gershengorn, M.C. (1985).- Thyrotropin releasing hormone action: mechanism of calcium-mediated stimulation of prolactin secretion. *Recent. Prog. Horm. Res.* 41: 607.

Gershengorn, M.C. y C. Thaw (1985).- Thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in GH₃ cells. Further evidence that TRH mobilizes cellular and extracellular Ca²⁺. *Endocrinol.* 116: 591.

Giambalvo, C.T. y R.L. Wagner (1994).- Activation D₁ and D₂ dopamine receptors inhibits protein kinase C activity in striatal synaptoneurosome. *J. Neurochem.* 63: 169.

Giros, B.; P. Sokoloff; M.P. Martres; J.F. Riou; L.J. Emorine y J.C. Schwartz (1989).- Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature.* 342: 923.

Glossmann, H.; D.R. Ferry y C.B. Boschek (1983).- Purification of the putative calcium channel from skeletal muscle with the aid of [³H]-nimodipine binding. *Arch. Pharmacol.* 323: 1.

Gollasch, M.; C. Kleuss; J. Heschler; B. Wittig y G. Schultz (1993).- G_i and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat pituitary GH3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6265.

Gordeladze, J.Q.; T. Haugen; E.J. Paulsen y R.H. Paulsen (1996).- Phospholipase C activation in rat pituitary adenoma (GH) cells. *Biosci. Rep.* 16: 65.

Gregerson, K.A.; R. Chuknyska y N. Galesorkhi (1995).- Tittle stimulation of prolactin release by dopamine withdrawal: role of calcium influx. *Ann. J. Physiol.* 267: E789.

Gross, R.A.; J. Huggenvik; E. Massa; R.G. Allen y M. Uhler (1994).- Genetic alteration of cyclic adenosin 3', 5'-inOphosphate-dependent protein kinase subunit expression affects calcium currents and β-endorphin release in AtT-20 clonal pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* 8: 970.

Grosvenor, C.E. y F. Mena (1980).- Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinol.* 107: 863.

Guillemette, G.; T. Balla; A.J. Baikov y K.J. Catt (1987) Inositol 1,4,5-triphosphate binds to a specific receptor and releases microsomal calcium in the anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8195.

Gunter, T., R. Grob y M. Schramm (1984).- Calcium channels modulation: ability to inhibit or promote calcium influx resides in the same dihydropyridine molecule. *J. Card. Pharmacol.* 6: 1170.

- Haase, H.; J. Strlessnig; M. Holtzhauser; R. Vetter y H. Glossmann (1991).- A rapid procedure for the purification of cardiac 1,4-dihydropyridine receptors from porcine heart. *Eur. J. Pharmacol.* 207: 51.
- Hagiwara, S. y H. Ohmori (1982).- Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp. *J. Physiol.* 331: 231.
- Hatsenleder, D.J.; J.A. Moy y D.M. Lawson (1990).- The effects of dopaminergic antagonism by sulpiride on THR and VIP-induced prolactin release in nonsuckled lactating rats. *Life. Sci.* 46: 1867.
- Hamilton, S.L.; R. Mejia-Alvarez; M. Fill; M.J. Hawkes; K.L. Brush; W.P. Schilling y E. Stefani (1989).- [³H]PN200-110 and [³H]Ryanodine binding and reconstitution of ion channel activity with skeletal muscle membranes. *Anal. Biochem.* 183: 31.
- Hanna, S. y S.H. Shih (1992).- Differential inhibition of dopamine and bromocriptine on induced prolactin release: multiple sites for the inhibition of dopamine. *Neuroendocrinol.* 55: 591.
- Hernández, M.E. y G. Martínez de la Escalera (1992).- El agonista de canales de calcio Bay K 8644 potencia la secreción de prolactina inducida por TRH en lactotrofos enriquecidos en cultivo. XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Veracruz, ver. Agosto 2-6.
- Hernández, M.E.; C. Clapp; L. Torner y G. Martínez de la Escalera (1994).- Dopamine-escape potentiation of prolactin release may involve the activation of calcium channels by protein Kinases A and C. *Endocrine.* 2: 779.
- Hernández, M.E.; Diaz, M.; López-Gómez, F.; Clapp, C. y G. Martínez de la Escalera (1996).- Fosforilación de canales de calcio tipo L en lactotrofos en respuesta a la suspensión del tono dopaminérgico. XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla, Septiembre 22-26.
- Herrington, J. y C.J. Lingle (1992).- Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca²⁺ current in rat clonal (GH³) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 68: 213.
- Hille, B. (1989).- Voltage-gated channels and electrical excitability. En: Patton, H.D.; A.F. Fugs; B. Hille; A.M. Scher y R. Steiner (Eds.).- *Textbook of physiology excitable cells and neurophysiology.* W.B. Sanders Company. 21st Edition. pp 80.
- Hosey, M.M.; M. Borsotto y M. Lazdunski (1986).- Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine sensitive voltage dependent Ca²⁺ channel skeletal muscle membranes by cAMP³ and Ca²⁺-dependent processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 3733.
- Hosey, M.M.; J. Barhanin; A. Schmid; S. Vandaele; J. Ptasiński; C. O'Callahan; C. Cooper y M. Lazdunski (1987).- Photoaffinity labeling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylakylanine-sensitive calcium channels. 147: 1137.
- Hosey, M. y M. Lazdunski (1988).- Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *Membrane Biol.* 104: 81.
- Hosey, M.M.; F.C. Chang; C.M. O'Callahan y J. Ptasiński (1989).- L-Type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. En: Dennis, W.W., R.I. Norman y P. Hess (Eds.).- *Calcium channels: structure and function.* New York Acad. Sci. New York.

- Ingram, C.D.; R.J. Mason; W.T. Mason (1986).- Intracellular recordings from bovine anterior pituitary cells: modulation of spontaneous activity by regulators of prolactin secretion. *Endocrinol.* 119: 2508.
- Ishihara, H.; B.L. Martin; D.L. Brautigam; H. Karaki; H. Ozaki; Y. Kato; N. Fusetani; S. Watabe; K. Hashimoto; D. Uemura y D.J. Hartshorne (1989).- Calyculin and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 159: 871.
- Israel, J.M.; P. Jaquet y J.D. Vincent (1985).- The electrical properties of isolated human prolactin-secreting adenoma cells and their modification by dopamine. *Endocrinol.* 117: 1448.
- Israel, J.M.; C. Kirk y J.D. Vincent (1987).- Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophysial cells in lactotroph-enriched primary cultures. *J. Physiol.* 390: 1.
- Izawa, T. y P. M. Hinkle (1985).- Differential effects of thyrotropin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, phorbol ester, and depolarization in GH_4C_1 rat pituitary cells. *Endocrinol.* 116: 909.
- Jaken, S. (1985).- Increased diacylglycerol content with phospholipase C or hormone treatment: inhibition of phorbol ester binding and induction of phorbol ester-Like biological response. *Endocrinol.* 117: 2301.
- Janh, H.; W. Nastalnczyk; A. Rohrkasten; T. Schneider y F. Hofmann (1988).- Site-specific phosphorylation of the purified dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 178: 535.
- Josephson, I.R. y N. Sperelakis (1990).- Fast activation of cardiac Ca^{2+} channel gating charge by the dihydropyridine agonist, Bay K 8644. *Biophys. J.* 58: 1307.
- Josephson, I.R. y N. Sperelakis (1991).- Phosphorylation shifts the time-dependence of cardiac Ca^{2+} channel gating currents. *Biophys. J. Biophysical. Soc.* 60: 491.
- Journet, L.; V. Homburger; C. Pantoloni; M. Priam; J. Bockaert A. Enjalbert (1987).- An islet-activating protein-sensitive protein G is involved in dopamine inhibition of angiotensin and thyrotropin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262: 15106.
- Judd, A.M.; I.S. Login y R.M. MacLeod (1989).- Evidence that phorbol diester-sensitive protein kinase-C(s) may not be directly involved in secretagogue-stimulated prolactin release and arachidonate liberation. *Endocrinol.* 125: 1134.
- Kaczorowski, G.J.; R.L. Vandlen; G.M. Katz y J.P. Reuben (1983).- Regulation of excitation-secretion coupling by thyrotropin-releasing hormone (TRH): evidence for TRH receptor-ion channel coupling in cultured pituitary cells. *J. Memb. Biol.* 71: 109.
- Kebabian, J.W. y D.B. Calne (1979).- Multiple receptors for dopamine. *Nature.* 277: 93.
- Kikkawa, U.; Y. Takai; R. Minakuchi; S. Inohara y Y. Nishizuka (1982).- Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257: 13341.

Kimura, H.; M.A. Calabro y R.M. MacLeod (1976).- Suppression of prolactin secretion and cAMP accumulation by dopamine in the pituitary. *Fed. Proc.* 35: 305.

Kobayashi, E.; H. Nakano; M. Morimoto y T. Tamaoki (1989).- Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitors of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 548.

Koch, B.D.; L.J. Dorflinger y A. Schonbrunn (1985).- Pertussis toxin blocks both cyclic AMP-mediated and cyclic AMP-independent actions of somatostatin. Evidence for coupling of Ni to decreases in intracellular free calcium. *J. Biol. Chem.* 260: 13138.

Kolesnick, R.N. y M.C. Gershengorn (1985).- Direct evidence that burst but not sustained secretion of prolactin stimulated by thyrotropin-releasing hormone is dependent on elevation of cytoplasmic calcium. *J. Biol. Chem.* 260: 5217.

Kolesnick, R.N. (1987).- Thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters induce phosphatidylcholine synthesis in GH₃ pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262: 14525.

Koike, K.; A.M. Judd; T. Yasumoto y R.M. MacLeod (1985).- Calcium mobilization potentiates prolactin release induced by protein kinase C activators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 40: 137.

Krsmanovic, L.Z.; S.S. Stanko; F. Merelli; S.M. Dufour; M.A. Virmani y K.J. Catt (1992).- Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8462.

Kunlyasu, A.; K. Oka; T. Ide-Yamada; Y. Hatanaka; T. Abe; H. Nakayama y Y. Kanaoka (1992).- Structural characterization of the dihydropyridine receptor-linked calcium channel from porcine heart. *J. Biochem.* 112: 235.

Lacey, M.G.; N.B. Mercuri y R.A. Nath (1987).- Dopamine acts on D₂ receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J. Physiol.* 392: 397.

Lafond, J. y R. Collu (1986).- Role of calcium and sodium ions in the inhibitory control baseline and stimulated prolactin release. *Endocrinol.* 119: 2012.

Lai, Y.; M.J. Seagar; M. Takahashi y W.A. Catterall (1990).- Cyclic AMP-dependent phosphorylation of two size forms of α_1 subunits of l-type calcium channels in rat skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 265: 20839.

Lazdunski, M.; J. Barhanin; M. Bosotto; C. Cognard; C. Cooper; T. Coppola; M. Fosset; J.P. Gallzi; M.M. Hosey; C. Mourre; J.F. Renaud; G. Romey; A. Schmid y S. Vandale (1988).- Molecular properties of structure and regulation of the calcium channel. En: Vanhoute, P.M.; R. Paoletti y L.H. Opie (Eds.).- *Calcium Antagonists: Pharmacology and Clinical Research.* New York Acad. Sci. New York.

Leiser, M. y N. Fleischer (1996).- cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac-type alpha 1 subunit of the voltage-dependent Ca²⁺ channel in a murine pancreatic beta cell line. *Diabetes.* 45: 1412.

Lledo, P.M.; P. Legendre; J. Zhang; J.M. Israel y J.D. Vincent (1990).- Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotrophs cells. *Neuroendocrinol.* 52: 545.

- Loechner, K.J.; R.M. Kream y K. Dunlap (1996).- Calcium currents in a pituitary cell line (AtT-20): Differential roles in stimulus-secretion coupling. *Endocrinol.* 137: 1429.
- Login, J.S.; A.M. Judd y R.M. MacLeod (1985).- Dopamine inhibits calcium flux in the 7315a prolactin-secreting pituitary tumor cell. *Cell. Calcium.* 9: 27.
- Ma, J.; C. Mundiña-Weilenmann.; M. Hosey y E. Rios (1991).- Dihydropyridine sensitive skeletal muscle Ca channels in polarized planar bilayers. 1. kinetics and voltage dependence of gating. *Biophys. J.* 60: 890.
- Ma, J.; L.M. Gutierrez, M. Hosey y E. Rios (1992).- Dihydropyridine-sensitive skeletal muscle Ca channels in polarized planar bilayers. 3. effects of phosphorylation by protein kinase C. *Biophys. J.* 63: 639.
- McFerran, B.W. y S.B. Guild (1996).- The roles of adenosin 3',5'ic monophosphate-dependent protein kinase A and protein kinase C in stimulus-secretion coupling in AtT-20 cells. *J. Mol. Endocrinol.* 16: 133.
- Malgaroli, A.; L. Vallar; F.R. Elahi; T. Pozzan; A. Spada y J. Meldolesi (1987).- Dopamine inhibits cytosolic Ca²⁺ increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 262: 13920.
- Malven, P.V. (1983).- Transfer of prolactin from plasma into milk and associated physiological benefits to mammary cells. *Endocrinol. Exp.* 17: 283.
- Mantegazza, M.; C. Fasolato; J. Hescheler y D. Petronobon (1995).- Stimulation of single L-type calcium channels in rat pituitary GH₃ cells by thyrotropin-releasing hormone. *EMBO J.* 14: 1075.
- Martin, T.F.J. (1983).- Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates the phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in Ca²⁺ pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 258: 14816.
- Martin, T.F.J. y J.A. Kowalchuk (1984).- Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of Ca²⁺. *Endocrinol.* 115: 1527.
- Martin, T.F.J. (1986).- Measurement of phospholipid turnover in cultured hormone responsive pituitary cells. *Meth. Enzimol.* 124: 424.
- Martinez de la Escalera, G.; J. Guthrie y R.I. Weiner (1988).- Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by trh not vip: stimulation via ca²⁺/ protein kinase C pathway. *Neuroendocrinol.* 47: 38.
- Martinez de la Escalera, G. y R.I. Weiner (1988).- Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinol.* 47:186.
- Martinez de la Escalera, G.; K.C. Swearingen y R.I. Weiner (1989).- Superfusion and static culture techniques for the measurement of rapid changes in PRL secretion. *Methods. Enzimol.* 168:254.
- Massieu, L. y R. Tapia (1988) - Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium-dependent neurotransmitter release in synaptosomes. *J. Neurochem.* 51: 1184.

- Memo, M.; E. Carboni; M. Trabucchi; M.O. Carruba y P.F. Spano (1985).- Dopamine inhibition of neurotensin-induced increase in Ca^{2+} influx into rat pituitary cells. *Brain Res.* 347: 253.
- Mena, F.; A. Enjalbert; L. Carbonelli; M. Priam y C. Kordon (1976).- Effect of suckling on plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinol.* 99: 445.
- Mena, F.; P. Pacheco y C.E. Grosvenor (1982).- Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rats. *Endocrinol.* 106: 458.
- Mollarad, P.; P. Vacher; B. Dufy y J.L. Barker (1988).- Somatostatin blocks Ca^{2+} action potential activity in prolactin-secreting pituitary tumor cells through coordinate actions on K^{+} and Ca^{2+} conductances. *Endocrinol.* 123: 721.
- Monsma, F.J.; L.D. McVittie; C.R. Gerfen; S.C. Mahan y D.R. Sibley (1989).- Multiple D_2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature.* 342: 926.
- Mundiña-Weilenmann, C.; J. Ma; E. Rios y M. M. Hosey (1991a).- Dihydropyridine-sensitive skeletal muscle Ca channels in polarized planar bilayers. 2. effects of phosphorylation by camp-dependent protein kinase. *Biophys. J.* 60: 902.
- Mundiña-Weilenmann, C.; C.F. Chang; L.M. Gutierrez y M.M. Hosey (1991b).- Demonstration of the phosphorylation of the dihydropyridine-sensitive calcium channels in chick skeletal muscle and the resultant activation of the channels after reconstitution. *J. Biol. Chem.* 266: 4067.
- Murai, I. y N. Ben-Jonathan (1987).- Posterior pituitary lobectomy abolishes the suckling-induced rise in prolactin (PRL): evidence for a PRL-releasing factor in posterior pituitary. *Endocrinol.* 121: 205.
- Murai, I.; S. Reichlin y N. Ben-Jonathan (1989).- The peak phase of the proestrous prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to vasoactive intestinal peptide. *Endocrinol.* 124:1050.
- Murphy, B.J. y B.S. Tuana (1989).- Phosphorylation and the identification of a protein kinase activity associated with the dihydropyridine receptor isolated from rabbit heart and skeletal muscle. En: Dennis, W.W.; R.I. Norman y P. Hess (Eds).- *Calcium Channels: Structure and Function.* New York Acad. Sci. New York.
- Nagy, G.M. y L.S. Frawley (1990).- Suckling increases the proportions of mammotropes responsive to various prolactin-releasing stimuli. *Endocrinol.* 127: 2079.
- Negro-Villar, A. y E.G. Lapetina (1985).- 1,2-didecanoylglycerol and phorbol 12,13-dibutyrate enhance anterior pituitary hormone secretion in vitro. *Endocrinol.* 117: 1559.
- Nelson, E.J. y P.M. Hinkle (1994).- Characteristics of the Ca^{2+} spike and oscillations induced by different doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in individual pituitary cells and nonexcitable cells transfected with TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinol.* 135: 1084.
- Nestler, E.J. y R.S. Duman (1994).- G proteins and cyclic nucleotides in the nervous system. En: Siegel, G.J. (Ed).- *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* Raven Press. New York. pp 429-448

- Norman, R.L.; S.K. Quadri y H.G. Spies (1980).- Differential sensitive of prolactin Release to Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in Intact and Pituitary Stalk-Sectioned Rhesus Monkeys. *J. endocrinol.* 84: 479.
- Nunoki, K.; V. Florio; y W.A. Catterall (1989).- Activation of purified calcium channels by stoichiometric protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6816.
- Obara, K. y H. Yabu (1993).- Dual efect of phosphatase inhibitors on calcium channels in intestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 264: C296.
- O'Callahan, C.M. y M.M. Hosey (1988).- Multiple phosphorylation sites in the 165-kilodalton peptide associated with dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry.* 27: 6071.
- O'Callahan, C.M.; J. Ptasienski y M. M. Hosey (1988).- Phosphorylation of the 165 kDa dihydropyridine/phenylalkilamine receptor from skeletal muscle by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263: 17342.
- Offermanns, S.; M. Gollasch; J. Hescheler; K. Spicher; A. Schmid; G. Schultz y W. Rosenthal (1991).- Inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ currents and activation of pertussis toxin sensitive G-proteins via muscarinic receptors in GH₃ cells. *Mol. Endocrinol.* 5: 995.
- Ozawa, S. y N. Kimura (1982).- Membrane potential changes caused by thyrotropin-releasing-hormone in the clonal GH₃ cell and their relationship to secretion of pituitary hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6017.
- Pan, J.T. y L.M. Main (1990).- Dopamine does not potentiate the effects of oxytocin and vasopressin on prolactin secretion. *Life.* 5: 46: 2443.
- Le Penn, J.A.; G.F. Low y P.S. Danks (1991).- Ca²⁺ channel agonists enhance thyrotropin-releasing hormone-induced inositol phosphates and prolactin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 195: 373.
- Paulssen, E.; R.H. Paulssen; T.B. Haugen; K.M. Gautvik y J. O. Gørdelazze (1991).- Cell specific distribution of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in pituitary tumour cell lines. *Mol. cell. Endocrinol.* 76: 45.
- Pedersen, U.B.; B. Norby; A.A. Jensen; M. Schiødt; A. Hansen; P. Suhr-Jensen; M. Scheideler; O. Thastrup y P.H. Andersen (1994).- Characteristics of stably expressed human dopamine D_{1a} y D_{1b} receptors: atypical behavior of the dopamine D_{1b} receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 267: 85.
- Perets, T.; Y. Blumstein; E. Shistik; I. Lotan y N. Dascal (1996).- A potential site of functional modulation by protein kinase A in the cardiac Ca²⁺ channel alpha 1C subunit. *FEBS Lett.* 384: 189.
- Pfaffinger, P.J.; J.M. Martin; D.D. Hunter; N.M. Nathanson y B. Hille (1985).- GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature.* 317: 536.
- Plotsky, P.M. y J.D. Neill (1982).- Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinol.* 111: 168.
- Ray, K.P. y M. Wallis (1981).- Effects of dopamine on prolactin secretion and cyclic AMP accumulation in the rat anterior pituitary gland. *Bioch. J. Cell. Asp.* 194: 119.

- Rebecchi, M.J.; R.N. Kolesnick y M.C. Gershengorn (1983).- Thyrotropin-releasing hormone stimulates rapid loss of phosphatidylinositol and its conversion to 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in rat mammotropic pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 258: 227.
- Reuter, H. (1983).- Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature.* 301: 569.
- Rohrkasten, A.; H.E. Meyer; W. Nastainczyk; M. Sieber y F. Hoffmann (1988).- cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine-687 of the skeletal muscle receptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* 263: 15325.
- Rotman, E.I.; K.S. de Jongh; V. Florio; Y. Lai y W.A. Catterall (1992).- Specific phosphorylation of a COOH-terminal site on the full-length form of the α -1 subunit of the skeletal muscle calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 16100.
- Rotman, E.I.; B.J. Murphy y W.A. Catterall (1995).- Sites of selective cAMP-dependent phosphorylation of the L-type calcium channel α -1 subunit from intact rabbit skeletal muscle myotubes. *J. Biol. Chem.* 270: 16371.
- Rubinstein, J. E. y R.J. Hitzemann (1990).- further evidence against the coupling of dopamine receptors to phosphoinositide hydrolysis in rat striatum. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1965.
- Scherer, M.P.; H.J. Clark y S. Franks (1986).- The dopaminergic regulation of anterior pituitary $^{45}\text{Ca}^{2+}$ homeostasis and prolactin secretion. *J. Endocr.* 108: 423.
- Schettini, G.; M.J. Cronin y R.M. MacLeod (1983).- Adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) and calcium calmodulin interaction in the control of prolactin secretion: evidence for dopamine inhibition of cAMP accumulation and prolactin release after calcium mobilization. *Endocrinol.* 112: 1801.
- Schofield, J.C. (1983).- Use of a trapped fluorescent indicator demonstrate effects of thyroliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. *FEBS Lett.* 159: 79.
- Sculptoreanu, A.; E. Rotman; M. Takahashi; T. Scheuer y W.A. Catterall (1993).- Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel α -1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. sci.* 90: 10135.
- Sculptoreanu, A.; A. Figourov y W.C. de Groat (1995).- Voltage-dependent potentiation of neuronal L-type calcium channels due to state-dependent phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 269: C725.
- Seabrook, G.R.; S. Patel; R. Marwood; F. Emms; M.R. Knowles; S.B. Freedman y G. McAllister (1992).- Stable expression of human D₁ dopamine receptors in GH₄C₁ pituitary cells. *FEBS.* 312: 123-126.
- Senogles, S.E. (1994).- The D₂ dopamine receptor mediates inhibition of growth GH₄ZR₇ cells: involvement of protein Kinase-C α . *Endocrinol.* 134: 783-789.
- Shorte, S.L. y J.G. Schofield (1991).- Thyrotropin-releasing hormone-induced cytosolic calcium transients: characterization of store refilling in bovine anterior pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: 167.

FALTA PAGINA

No. 119 a la 120

Yuan, W. y D.M. Bers (1995).- Protein kinase inhibitors H-89 reverses forskolin stimulation of cardiac L-type calcium current. *Am. J. Physiol.* 268: C651.

Yue, D.T.; S. Herzig y E. Marban (1990).- β -adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 753.

Zong, X.; J. Schrieck; G. Mehrke; A. Welling; A. Schuster; E. Bosse; V. Flockerzi y F. Hofmann (1995).- On the regulation of the expressed L-type calcium channel by cAMP-dependent phosphorylation. *Pflügers Arch.* 430: 340.

APENDICE

