

GI
ZEJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"MODULACION DOPAMINERGICA DE CANALES
DE Ca²⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE (HVA) EN
CELULAS GH4C1/D2-DAR"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :

MARIA DEL MAR HERNANDEZ GAZQUEZ

DIRECTOR: GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM
ASESOR: DAVID GARCIA DIAZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM



1999

271080

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Modulación dopaminérgica de canales de calcio dependientes
de voltaje (HVA) en células GH4C1/D2-DAR"

realizado por María del Mar Hernández Gazquez

con número de cuenta 9251707-5, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera
Propietario	Dr. David Erasmo García Díaz
Propietario	Biol. Julio Alejandro Prieto Sagredo
Suplente	Dr. Emilio Rojas del Castillo
Suplente	Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte

[Handwritten signatures and stamps]

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz
Coordinadora de Licenciatura.



*A mis abuelos, por el ejemplo de sus vidas,
a mis padres, por un poco de locura,
a mi tío José Luis, por la ciencia y el amor al conocimiento.*

Agradecimientos

Agradezco especialmente a Gretel por las largas horas de intrusión.

A Emilio por proporcionarme la fuerza para terminar esta tesis.

A Rafael por su enorme ayuda y por volver ligeras las horas más pesadas.

Al Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera y al Dr. David García por su infinita paciencia.

INDICE.

1. INTRODUCCION

I. LA PROLACTINA (PRL)

I.1. Estructura molecular de la PRL

I.2. Secreción de PRL

I.2.1. Control hipotalámico:

i. DA

ii. TRH

iii. Regulación pleiotrópica de la secreción de PRL

I.2.2. Vías de señalización

i. Mecanismos de acción de DA

ii. Mecanismos de acción de TRH

iii. Interacción de vías de señalización en la regulación pleiotrópica de la secreción de PRL: El Ca^{2+} una pieza clave

II. El Ca^{2+}

II.1. Ca^{2+} como regulador de secreción

II.2. Mecanismos de entrada de Ca^{2+}

II.2.1. Diversidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

i. Canales de Ca^{2+} tipo L

ii. Canales de Ca^{2+} tipo T

iii. Canales de Ca^{2+} tipo N

iv. Canales de Ca^{2+} tipo P

II.3. Características comunes de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

II.4. Estudios moleculares y nuevas clasificaciones

III. Células hipofisarias GH3 y GH4

2. OBJETIVO

3. METODO

I. Cultivo celular

II. Mediciones electrofisiológicas

III. Análisis estadístico

IV. Diseño experimental

4. RESULTADOS

I. Estimulación de una K^+_{ir} en respuesta a la administración de DA

- II. Efecto de diferentes manipulaciones dopaminérgicas sobre la I_{Ba2-}
- III. Caracterización de la I_{Ba2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células GH4C1/D2-DAR
- IV. Facilitación de la I_{Ba2+} en respuesta a la suspensión del tono dopaminérgico

5. DISCUSION

6. ABREVIATURAS

7. BIBLIOGRAFIA

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito;
Intelectualmente nos hallamos en un islote
en medio del océano ilimitado de lo inexplicable.
La tarea de cada generación es reclamar un poco más de ese terreno,
añadir algo a la extensión y solidez de nuestras posesiones.
THOMAS HENRY HUXLEY, en la presentación de
Orígen de las especies (1887)

El eterno misterio del mundo es su comprensibilidad.
ALBERT EINSTEIN (1939)

RESUMEN

La Dopamina hipotalámica (DA), suprime tónicamente la secreción de Prolactina (PRL) de la hipófisis anterior. El escape transitorio del tono dopaminérgico se relaciona, no solo con una amplia secreción de PRL, sino con la potenciación sostenida de la acción de secretagogos como la Hormona Liberadora de Tirotrófinas (TRH).

Evidencias previas sugieren que la modulación específica de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje HVA pudiera estar involucrada en esta potenciación.

Utilizando la línea lactotrópica GH4C1, transfectada con el receptor dopaminérgico D2 humano, se probó la hipótesis de que la suspensión aguda de la acción dopaminérgica induce la facilitación del influjo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (HVA).

Utilizando Ba^{2+} como acarreador de carga a través de canales de Ca^{2+} ; los efectos de la administración y suspensión de DA sobre la corriente macroscópica de Ca^{2+} fueron analizados utilizando la técnica de fijación de voltaje (patch-clamp) en la configuración de célula entera.

Los resultados obtenidos muestran que la administración de DA activa una corriente rectificadora entrante de K^+ que se ha relacionado con eventos de hiperpolarización de la membrana de los lactotopos.

Paralelamente, la corriente macroscópica de Ba^{2+} disminuyó significativamente ante la exposición fásica y crónica a DA, en forma proporcional al tiempo de exposición a esta neurohormona.

La suspensión del tono dopaminérgico, por su parte, provocó una facilitación bifásica de la corriente de Ba^{2+} conducida principalmente a través de canales dependientes de voltaje tipo L. Un incremento inicial del 100% se detectó entre los primeros 10 y 40 minutos; mientras que un segundo aumento, de la misma magnitud se registró 24 horas después.

Los presentes resultados demuestran directamente que la disociación de la DA de receptores específicos D2, expresados en células GH4C1 causa un incremento en la conductancia de los canales de Ca^{2+} activados por alto voltaje, los cuales juegan un importante papel en la amplificación de las cascadas de señalización endocrinas; así como en la potenciación de la secreción de PRL, evocada por TRH ante la suspensión del tono dopaminérgico.

1. INTRODUCCION.

El interés de este proyecto es determinar si la señal dopaminérgica, en particular la suspensión de DA, modula la corriente de Ca^{2+} en los lactotropos hipofisarios. Este trabajo se enmarca dentro del contexto de los estudios de fenómenos de neurosecreción, que ocurren en el eje hipotálamo-hipófisis, en los que esta glándula actúa como un órgano o relevo de amplificación de señales neurales para su transformación en señales endocrinas.

Durante la lactancia, y en una variedad de condiciones funcionales, los impulsos neurales generados por la succión y otros estímulos, son procesados en el sistema nervioso central, donde tienen efecto sobre neuronas hipotalámicas secretoras, que liberan factores hipofisiotrópicos a la circulación portal. De esta forma, el mensaje neurogénico originado por la succión, es transformado en mensajeros químicos que inhiben o estimulan la secreción de PRL.

La existencia de un microsistema de circulación especializado hace posible este tipo especial de comunicación intercelular: la comunicación neuroendocrina. Esta actúa como interfase entre el sistema nervioso y el endocrino, ya que la actividad de las células se relaciona directamente con su actividad endocrina.

El proceso de neurosecreción permite regular en forma homeostática los niveles de diversas hormonas relevantes para el buen funcionamiento del organismo, en función de la integración de información sobre el estado del medio interno del mismo (en parte producido por esas mismas hormonas) y el medio externo.

I. La Prolactina (PRL)

El estudio de la secreción de prolactina (PRL), se ha convertido en un paradigma de los procesos de secreción, debido en un principio a varias características que facilitan su análisis. Entre estas características, destacan la facilidad del manejo experimental del estímulo que evoca el proceso: la succión; los altos niveles de hormona secretada, que facilitan su cuantificación, así como la integración de múltiples señales extracelulares y transmembranales de regulación y control.

Las hipótesis iniciales desarrolladas para explicar esta regulación se basaban en las siguientes suposiciones:

i) los factores reguladores involucrados actúan a través de su unión a receptores específicos.

ii) la información de este complejo activa señales transmembranales únicas.

iii) el efecto final de la interacción de múltiples factores reguladores resulta de la suma algebraica de los efectos individuales.

Estas suposiciones, que resultaron ser falsas, por lo menos parcialmente, no eran privativas del proceso de secreción de prolactina, sino compartidas con otros modelos experimentales de secreción. En este sentido, el modelo de la secreción de PRL, ha mostrado ser particularmente útil para el análisis de estos aspectos. La información que su estudio está proporcionando empieza a extenderse a otros sistemas de secreción.

La PRL es la hormona hipofisaria más versátil, tanto en el número como en la diversidad de los procesos fisiológicos que regula.

El papel que juega en la preparación, mantenimiento y actividad secretora de la glándula mamaria es de fundamental importancia. La PRL es una molécula esencial para la supervivencia de los mamíferos después del nacimiento.

Durante la lactancia, el desencadenamiento del proceso de la secreción de PRL es provocado por la cría mediante la succión, estimulando el pezón de la madre. Los impulsos nerviosos generados por la succión son transportados al sistema nervioso central, donde tienen efectos sobre neuronas secretoras localizadas en el hipotálamo. Estas neuronas liberan hormonas hipofisiotrópicas hacia la circulación portal, que conecta el sistema nervioso con la adenohipófisis. De esta manera, el mensaje neural desencadenado por la succión es finalmente transformado en forma de factores hipotalámicos que estimulan o inhiben la secreción de PRL. Pero como se mencionó anteriormente esta hormona ejerce otros efectos adicionales a su papel en la lactancia.

La PRL, fue descubierta hace alrededor de 60 años en extractos hipofisarios y se consideró como una hormona exclusivamente adenohipofisaria por muchos años. En estudios recientes se ha demostrado que también es producida por fuentes extrahipofisarias tales como la decidua uretrina, el cerebro y diversos tejidos del sistema inmune (Sinha, 1992). Así mismo posee una notable versatilidad

funcional. Si bien sus acciones más conocidas son las ejercidas sobre la glándula mamaria y el sistema reproductor, se la han descrito más de 100 efectos distintos a lo largo de la escala de los vertebrados (DeVlaming, 1979). La gran variabilidad de sus efectos se ha asociado con su notable polimorfismo estructural, así como con la heterogeneidad de sus receptores. Esta hormona constituye un claro ejemplo de divergencia funcional entre las proteínas reguladoras.

La molécula de PRL está compuesta por una sola cadena polipeptídica constituida de 197-199 aminoácidos. Dependiendo de la especie presenta tres enlaces disulfuro: uno cerca del extremo aminoterminal, otro cercano al extremo carboxilo terminal, y otro en la región media (Fig.2). La hormona entera tiene un peso molecular de 23-24 Kd; sin embargo, se han detectado diversas isoformas con distintos pesos moleculares y con diferente bioactividad.

I.1 ESTRUCTURA MOLECULAR DE PRL

El gen de PRL reportado originalmente tenía un tamaño de 10 Kb, y estaba constituido por cinco exones y cuatro intrones (Fig. 3). Aunque estudios más recientes sobre la estructura del gen de PRL humana proponen un tamaño de 15 Kb y la presencia de un sexto exón. Esta secuencia aparece solamente en el mensajero de la PRL placentaria, más no en la hipofisiaria, y además no se traduce.

La forma dominante de PRL en la hipófisis es aquella de 23 KD, que corresponde como se mencionó anteriormente a la forma nativa. Sin embargo se han encontrado numerosas variantes o formas moleculares, aunque menos abundantes (J.D. Neil & G.M.Nagy, 1994). Hasta el momento las evidencias apuntan a la existencia de un solo gen para PRL en el genoma haploide, por lo que se ha propuesto que las variantes moleculares reportadas son el resultado de diferentes procesamientos postraduccionales del mensajero (RNAm).

I.2 SECRECIÓN DE PRL

I.2.1 Control hipotalámico.

En 1955, Geoffrey Harris y sus colegas propusieron la hipótesis neurohumoral para explicar el control hipotalámico de la secreción adenohipofisiaria. Es entonces cuando se propone por primera vez que la secreción de PRL podría ser estimulada por un factor hipofisiotrópico.

La secreción de PRL está regulada en los mamíferos por factores hipotalámicos tanto inhibidores como estimuladores. Los modelos iniciales de regulación de PRL proponían que la unión de estos factores a receptores específicos provocaba la activación de vías únicas, y que las acciones de múltiples vías hormonales de regulación, eran integradas de forma aditiva. Sin embargo, la regulación de la secreción de PRL en los lactotrofos, no resulta de la simple suma algebraica de acciones inhibitorias y estimuladoras; sino de un sistema pleiotrópico altamente interactivo.

La síntesis y secreción de PRL por los lactotrofos adenohipofisarios han sido extensamente estudiadas tanto in vivo como in vitro a lo largo de las últimas dos décadas (Weiner, et al., 1988; Lamberts y MacLeod, 1990). In vivo ambos procesos están sometidos a una regulación tónica inhibitoria. En ausencia de control hipotalámico, los lactotrofos muestran una elevada tasa de secreción espontánea, lo que contrasta con otros tipos celulares que componen la adenohipofísis. La incubación in vitro de fragmentos o células hipofisarias dispersas se asocia con una liberación sustancial de PRL (Pasteels, 1961).

Entre 1960 y 1963 Pasteels y sus colaboradores demostraron que podían reducir la concentración de PRL secretada in vitro, cuando incubaban hipófisis con fragmentos o extractos hipotalámicos. En 1963, Meites y su equipo confirmaron la existencia de un factor inhibidor de la secreción de PRL (PIF).

La lesión de la eminencia media hipotalámica, la sección del tallo hipofisiario y el trasplante de hipófisis a la cápsula renal (Everett, 1945; Chen et al., 1970) producen hiperprolactinemia.

Poco tiempo después, se reportó que la utilización de fármacos que interrumpían el metabolismo de catecolaminas provocaba alteraciones en la secreción de PRL; este hecho aunado a las elevadas concentraciones, fisiológicamente activas, de Dopamina (DA), presentes en la eminencia media y en el plasma de sangre portal (Ben-jonathan et al, 1980; de Greef y Visser, 1981), llevaron al estudio de esta neurohormona como el posible y principal PIF.

La detección de receptores dopaminérgicos en membranas de células hipofisiarias, y en particular receptores D2 en los lactotrofos, (Caron et al., 1978; Cronin y Weiner, 1979), fue un dato importante para concebir a la DA como el principal PIF, aunque no el único.

A pesar de la aparente suficiencia del sistema dopaminérgico para inhibir la secreción de PRL, otros PIFs de origen hipotalámico han sido detectados, aún cuando su papel fisiológico no esta muy claro todavía. Uno de ellos es el ácido GAMMA-aminobutírico (GABA), que al parecer inhibe directamente la liberación de PRL. Receptores para GABA han sido detectados en células hipofisiarias con técnicas inmunohistoquímicas.

Las endotelinas 1 y 2 también han sido reportadas como inhibidores de la secreción de PRL in vitro, y en forma dosis dependiente, sin afectar de manera alguna los receptores dopaminérgicos (Neill y Nagy, 1994; Samson, et al., 1992).

Estos péptidos están presentes en los tres lóbulos de la hipófisis, donde además se encuentran en concentraciones mas elevadas que en el resto del cerebro; lo que podría indicar su participación en los procesos de regulación de la secreción de PRL.

i. Dopamina.

La DA es capaz de regular la secreción de PRL mediante la ocupación y la desocupación de receptores específicos, clasificados farmacológicamente como D2.

En una variedad de condiciones fisiológicas, la administración de antagonistas dopaminérgicos, incluyendo aquellos que no cruzan la barrera hematoencefálica, causan un aumento rápido en la liberación de PRL (Cocchi et al., 1980; Lamberts y MacLeod, 1990). En forma semejante, la secreción de PRL aumenta dramáticamente cuando se elimina a la DA del medio en que se cultivan los lactotrofos (Denef et al, 1984; Martínez de la Escalera et al., 1988, Martínez de la Escalera y Weiner, 1988).

La suspensión de la neurohormona DA provoca la secreción de PRL con un patrón rítmico (Swearingen et al.,1990). Estos resultados muestran que además del papel que juega la DA como inhibidor, su suspensión aguda es un potente estímulo facilitador de la secreción de PRL. La secreción pulsátil observada subsecuentemente a la suspensión de DA sugiere que la inhibición tónica dopaminérgica juega entre otros un papel sincronizador de los lactotopos.

Como se ha mencionado, la DA inhibe tónicamente la secreción de PRL al ocupar receptores específicos en la membrana de los lactotopos adenohipofisarios. La concentración de DA en sangre portal es suficiente para ocupar el 80% de los receptores dopaminérgicos D2 en la hipófisis anterior (Martin,MC,1984) y el grado de inhibición es proporcional al grado de ocupación de los receptores. Disminuciones breves en la concentración de DA en sangre de la vena porta se han asociado con incrementos en los niveles circulantes de PRL en respuesta a diversos estímulos.

Durante la lactancia, el estímulo de la succión induce una disminución en la concentración de DA en el hipotálamo basal, precediendo a aumentos importantes en la concentración de PRL en sangre (Mena et al,1976). La disminución de DA en sangre portal se observa también en la tarde del proestro, en paralelo al pico de PRL evocado por el estradiol circulante (Ben-Jonathan et al.,1977; de Greef et al., 1985).

La estimulación eléctrica del nervio mamario, simulando la succión (Mena et al.,1980), induce una disminución del 50-70% en la concentración de DA en la vena porta. Dicha disminución tiene una duración aproximada de 3 a 10min, a pesar de que la secreción de PRL perdura tanto como el estímulo de la succión (30-60min) (Grosvenor et al., 1979).

La DA presenta una rápida tasa de disociación de su receptor; lo cual es consistente con la idea de la transmisión de una señal a través de una disminución rápida y marcada en los niveles de DA. La observación de que disminuciones transitorias en la concentración dopaminérgica resulta tan solo en una secreción modesta de PRL, sugiere, que la secreción de esta hormona en respuesta a la succión debería estar regulada por factores adicionales. Sin embargo, el hecho de que la administración de antagonistas dopaminérgicos bloquea el aumento de PRL circulante inducido por la succión (Grosvenor et al.,1980), parece indicar, que la disminución transitoria de DA portal no es suficiente, pero sí necesaria para la secreción masiva de PRL; ejerciendo además, un efecto modulador de la respuesta de los lactotopos a la acción estimuladora de TRH.

ii. Hormona liberadora de tirotrifinas.

Los dos mecanismos generales mediante los cuales la actividad neuronal hipotalámica puede estimular la secreción de PRL en la hipófisis anterior

involucran la inhibición de PIF; como se ha visto, y la estimulación de un factor liberador de PRL (PRF).

El péptido hipotalámico TRH fue originalmente considerado como el factor hipofisiotrópico encargado de estimular la secreción de la hormona estimulante de tiroides (TSH), pero pronto se demostró su capacidad para estimular la secreción de PRL en forma dependiente de la dosis tanto in vivo como in vitro en cultivos de células hipofisarias y líneas celulares secretoras de PRL (Tashjian et al.,1971; Blake,1974; Burnet y Wakerley,1976; Grosvenor y Mena,1980).

Receptores de membrana específicos para TRH han sido caracterizados en células hipofisarias secretoras de PRL normales y transformadas (Hinkle y Tashjian,1973).

El nivel circulante de TRH en sangre portal aumenta en paralelo a la prolactinemia, durante la tarde del proestro (Fink et al.,1982), y en respuesta a la succión (Greef y Visser, 1981). Así mismo, la hiperprolactinemia característica de la tarde del proestro y la inducida por la succión son bloqueadas mediante el pretratamiento con antisuero anti-TRH.

Aunque se han reportado aumentos en la concentración circulante de hormona estimulante de la Tiroides (TSH) en respuesta a la succión (Blake,1974; Burnet y Wakerley, 1976). existen evidencias contradictorias respecto a la participación de TRH en la secreción de PRL. Una de ellas es la falta de coordinación entre la secreción de TSH y PRL in vivo (Reskind et al.,1984). Una explicación que reconciliaría estas discrepancias sería la existencia de una regulación redundante de la secreción de PRL, que incluyera factores facilitadores o estimuladores de la secreción adicionales a TRH. Además, la regulación de PRL podría variar de acuerdo a la especie, cepa y estado fisiológico del animal.

iii. Regulación Pleiotrópica de la secreción de PRL.

Una serie de observaciones sugirieron que las hormonas hipotalámicas inhibitoras y facilitadoras de la secreción de PRL, podrían estar actuando en forma interactiva y no independiente. La más importante de estas observaciones fue quizás, que en ratas lactantes, el escape momentáneo de la acción dopaminérgica produce un incremento dramático en la eficacia de la TRH y de otros factores estimuladores de la liberación de PRL (Grosvenor et al.,1980;1984;Grosvenor y Mena,1980). Un breve periodo de succión potencia la eficacia de TRH y de los extractos hipotalámicos crudos para secretar PRL. La preadministración de un agonista dopaminérgico, previene este efecto, lo que sugiere que el mecanismo responsable de la potenciación involucra la disminución transitoria en los niveles activos de DA.

Este aumento en la eficacia de TRH para estimular la secreción de PRL en respuesta a la breve disminución del tono dopaminérgico, ha sido comprobado in vivo en ratas ciclantes, lactantes, embarazadas y tratadas con estrógenos y progesterona (de Greef y Visser,1981; Plotsky y Neill,1982; Pan y Mai,1990; Haisenleder et al,1991), y en células hipofisarias dispersas de ratas lactantes

(Martínez de la Escalera et al.,1988), de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas (Martínez de la Escalera et al., 1988;1989; Martínez de la Escalera y Weiner, 1988; 1990). Experimentos perfundiendo estos cultivos celulares han permitido un análisis temporal del efecto de la suspensión transitoria de DA, mostrando en forma clara la marcada sensibilización que ésta produce sobre el efecto facilitador de TRH.

La suspensión de DA no potencia la eficacia de todos los factores secretores de PRL. Tal es el caso del péptido intestinal vasoactivo (VIP), cuya administración incrementa modestamente los niveles de PRL liberados tanto en cultivos perfundidos tónicamente con DA, como en aquellos que han sido sometidos a una suspensión transitoria de la mencionada neurohormona (Martínez de la Escalera et al, 1988). La administración de antagonistas dopaminérgicos que alteran la respuesta a TRH, no modifican la respuesta a VIP. Así mismo, el bloqueo temporal de los receptores dopaminérgicos no potencia la secreción de PRL inducida por oxitocina y por vasopresina (Pan y Mai, 1990).

Estos resultados indican que la disociación del complejo dopamina-receptor activa una cascada de eventos intracelulares, que distalmente acopla la secreción de PRL con la vía evocada por TRH, más no con aquella activada por otras neurohormonas como VIP.

De manera inversa, el escape temporal del tono dopaminérgico no es la única señal con capacidad para potenciar la respuesta secretora de los lactotrofos a TRH. Un efecto similar ocurre también como consecuencia de la acción previa del VIP (Martínez de la Escalera y Weiner,1988).

1.2.2 Vías de señalización.

i. Mecanismos de acción de la DA

Efectos inducidos por la formación del complejo DA-receptor.

Varias son las vías de señalización transmembranal que están acopladas a los receptores dopaminérgicos D2 en los lactotrofos. Los receptores dopaminérgicos en la hipófisis anterior pertenecen a la familia de los llamados receptores con siete segmentos transmembranales (Grandy et al,1989), cuyas acciones son mediadas por proteínas G.

Las acciones inhibitorias de la DA pueden bloquearse mediante el pretratamiento con la toxina de Pertussis (Cronin et al.,1983), lo que sugiere que el acoplamiento del receptor con su efector involucra la acción de una proteína inhibidora dependiente de GTP (Gi).

La administración de DA inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, y disminuye así mismo la concentración de AMP cíclico (AMPc). Estos efectos se reproducen por la administración de agonistas, y se bloquean por antagonistas dopaminérgicos selectivos de receptores D2.

Existen evidencias que relacionan la acción dopaminérgica con un efecto inhibitorio del sistema Ca^{2+} /cinasa C (PKC) (Taraskevich y Douglas,1978; Schofield,1983; Lafond et al.,1986; Thorner et al., 1980; Simmonds y Strange,1985).

Los efectos de la DA sobre la homeostasis del Ca^{2+} son consistentes con un acoplamiento negativo de los receptores dopaminérgicos con la fosfolipasa C (Canónico et al.,1982; Enjalbert et al 1986; Journot et al.,1987). Una disminución en los niveles de inositol trifosfato (IP_3) explica parcialmente el efecto inhibitorio de la DA sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} , dado que IP_3 promueve la liberación del ión de los almacenes intracelulares.

La DA parece ejercer efectos directos sobre la actividad eléctrica de las células. La aplicación aguda de DA provoca un marcado aumento en la permeabilidad al K^+ , induciendo una hiperpolarización de la membrana de los lactotropos que se relaciona con el cese de la actividad espontánea. Este fenómeno ocurre en forma independiente de Ca^{2+} (Chen et al.,1993; Gregerson K.A. et al.,1994).

Efectos inducidos por la disociación del complejo DA-receptor.

La suspensión física de DA produce un aumento rápido en la concentración intracelular de AMPc (Martínez de la Escalera y Weiner,1988), lo que promueve la activación de la proteína cinasa A (PKA). La disociación del complejo DA-receptor activa a la adenilato ciclasa con tanta potencia como la asociación del mismo la inhibe. Este hecho pareciera indicar que la adenilato ciclasa en los lactotropos está intrínsecamente activa o estimulada tónicamente.

Por otro lado, el acople de los receptores dopaminérgicos con la vía de la fosfolipasa C sólo se observa en respuesta a la disociación del complejo DA-receptor. Células incubadas con DA por 24hs. responden a la suspensión física de ésta con un aumento significativo de la concentración intracelular de los fosfatos de inositol, mientras que la administración física a células incubadas en ausencia de DA por el mismo período, no parece tener ningún efecto (Martínez de la Escalera et al.,1987; Martínez de la Escalera y Weiner,1988). Esto podría deberse a que a diferencia de la vía del AMPc, la vía de los fosfatos de inositol no parece estar activada en forma constante en los lactotropos.

Son varios los componentes del sistema Ca^{2+} /PKC que están acoplados a la señal de la suspensión dopaminérgica. Esta señal estimula también la translocación de la PKC a una fracción membranal, y la fosforilación de un sustrato específico de esta cinasa (Martínez de la Escalera et al,1989), una proteína que parece ser idéntica a la que se encuentra asociada a los microtúbulos, (referida como MAP-80). Al parecer, la suspensión del tono dopaminérgico induce la fosforilación de al menos ocho proteínas asociadas a microtúbulos, lo cual pudiera tener relevancia en cuanto a los procesos de transporte y exocitosis de gránulos de secreción con contenido hormonal.

La suspensión de DA aplicada transitoriamente, tiene como resultado un aumento en la actividad eléctrica de los lactotropos, que coincide con eventos de secreción de PRL. (Chen et al.,1993; Gregerson, K.A. et al.,1994).

ii. Mecanismos de acción de TRH.

La transducción del efecto de TRH ha sido profundamente estudiado, sobre todo en las líneas celulares GH. La clonación del receptor específico demostró que pertenece a la familia de los receptores con siete segmentos transmembranales (Straub et al.,1990).

Hasta el momento todas las evidencias muestran al sistema Ca^{2+} /PKC como el principal mediador involucrado en la acción de TRH sobre la secreción de PRL.

La unión de TRH a su receptor causa un rápido incremento en los niveles de los fosfatos de inositol y de diacilglicerol (Martin, 1983; Rebecchi et al.,1983). Esta respuesta es dependiente de Ca^{2+} , e involucra como intermediario a una proteína dependiente de GTP (Hinkle y Kinsella,1984).

TRH provoca elevaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular con un patrón bifásico (Albert y Tashjian, 1984). En la fase temprana el Ca^{2+} proviene de fuentes intracelulares, mientras que en la fase sostenida, se debe al influjo del mismo del medio extracelular a través de canales dependientes de voltaje (Hagiwara y Ohmori,1983).

La acción de TRH estimula la fosforilación de una variada colección de proteínas en forma dependiente de Ca^{2+} y de la PKC.

iii. Interacción de vías de señalización en la regulación pleiotrópica de la secreción de PRL: El Ca^{2+} una pieza clave.

La regulación fisiológica de la secreción hormonal involucra la interacción finamente orquestada de múltiples vías de señalización. El control de la secreción de PRL es particularmente complejo, debido a la interacción de varias fuentes sensoriales que actúan a través de factores hipotalámicos, tanto estimuladores como inhibidores; así como por la acción de hormonas hipofisarias con efectos parácrinos y autocrinos.

El análisis de las interacciones de las vías de transducción evocadas por DA y TRH, hace suponer que la activación de la proteína cinasa A (PKA) es determinante para que ocurra el fenómeno de potenciación del efecto de TRH. La magnitud de dicha potenciación ante la suspensión temporal del tono dopaminérgico es muy similar cuando se administran análogos del AMPc, o con la administración previa de VIP, que a su vez activa a la adenilato ciclasa. Estas observaciones apoyan la idea de un papel central de la PKA en la regulación del sistema.

Un sustrato potencial para la cinasa A son los canales de Ca^{2+} (Curtis y Catterall,1985). La fosforilación de estos, incrementa al parecer su probabilidad

de apertura y hace posible el reclutamiento de canales silenciosos en respuesta a una activación (Reuter, 1987). Ambos efectos resultarían en un aumento en el flujo de Ca^{2+} , y probablemente en una mayor secreción de PRL en respuesta a factores como TRH. Esta hipótesis se fundamenta en evidencias experimentales. La administración del activador de canales de Ca^{2+} , Bay K 8644 a células en presencia tónica de DA, potencia también la acción liberadora de TRH (Hernández y Martínez de la Escalera, 1994). Este efecto es bloqueado por inhibidores de canales de Ca^{2+} tipo L como nifedipina y metoxiverapamil.

La suspensión del tono dopaminérgico activa también al sistema Ca^{2+} /PKC; sin embargo la activación de esta vía por TRH no autopotencia su efecto. El aumento en la sensibilidad de los lactotrofos a TRH ante la suspensión de DA parece involucrar la fosforilación de canales de Ca^{2+} mediada por la acción redundante de la PKA y la PKC; ya que el bloqueo selectivo de cada una en particular no parece afectar el fenómeno de la potenciación, sin embargo, la inactivación conjunta de estas cinasas bloquea por completo dicho fenómeno. (Hernández y Martínez de la Escalera, 1994).

La idea de la participación del Ca^{2+} como la molécula acopladora entre estímulo y secreción de PRL se ha sustentado sobre los efectos de la homeostásis del ión sobre el proceso de exocitosis. La secreción de PRL disminuye en medios deficientes de Ca^{2+} y en presencia de bloqueadores de canales de Ca^{2+} , en particular canales tipo L, (Thorner et al., 1980; Chen et al., 1993; Gregerson K.A. et al., 1994); mientras que la elevación en los niveles de Ca^{2+} intracelular por la administración de ionóforos (Delbeke y Dannies, 1985, Martínez de la Escalera y Weiner, 1988), por depolarizaciones provocadas con altas concentraciones de K^+ (Tan y Tashjian, 1984), y la administración de activadores de canales de Ca^{2+} estimulan la secreción de PRL. El flujo de Ca^{2+} del medio extracelular parece ser un requisito indispensable para la secreción, y para fenómenos como el de la potenciación.

Como se ha mencionado, la ocupación de los receptores dopaminérgicos en los lactotrofos provoca una hiperpolarización del potencial de membrana, que se ha relacionado con la activación de canales de K^+ . Dicha hiperpolarización parece ser crítica para que ocurran fenómenos como el rebote de secreción posterior a la suspensión de DA aplicada transitoriamente. El aumento en la corriente de Ca^{2+} provocada por el escape de la acción dopaminérgica pudiera relacionarse en forma directa con dicha hiperpolarización, si ésta involucrara la remoción de la inactivación de canales de Ca^{2+} , activados por alto voltaje (HVA), como es el caso de los L, reportados en células hipofisarias secretoras de PRL.

La hiperpolarización de la membrana de lactotrofos con fármacos como valinomicina, mimetizó las acciones de la DA, inhibiendo la secreción de PRL, y estimulando la liberación después del lavado. Impidiendo el efecto hiperpolarizante de la aplicación de DA o valinomicina, utilizando concentraciones elevadas de K^+ extracelular, en presencia de éstas, se bloquea tanto la inhibición como el llamado

rebote de secreción de PRL posterior a la suspensión dopaminérgica (Gregerson K.A. et al.,1994).

Los efectos de DA sobre la actividad eléctrica de las células, inducidos por la suspensión dopaminérgica, parecen preceder a los cambios en los sistemas de segundos mensajeros involucrados. (Gregerson et al.,1994).

II. El Ca^{2+} .

El incremento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular que ocurre en muchos tipos de células secretoras, como parte de la respuesta a diversos estímulos que activan la exocitosis, parece constituir una pieza importante en la regulación de dicho proceso.

Los mecanismos que regulan el incremento del Ca^{2+} intracelular conocidos hasta el momento son: la presencia y apertura de canales iónicos en la membrana plasmática, que permiten el flujo del ión del exterior al interior celular; y la movilización de Ca^{2+} almacenado en depósitos intracelulares, provocada también por la activación de canales a través de segundos mensajeros que interactúan con receptores específicos.

Los canales de Ca^{2+} se encuentran en prácticamente todas las células excitables. Comparten algunas propiedades con canales de Na^+ y rectificadores tardíos de K^+ , con quienes parecen tener una relación evolutiva. Los miembros de la familia de canales dependientes de voltaje, responden abriéndose con retardo después de un evento de despolarización. Se cierran rápidamente después de la repolarización y muestran una forma de inactivación característica durante depolarizaciones sostenidas.

Estos canales presentan una alta selectividad iónica, indicativa de un poro con radio mínimo pequeño, y son susceptibles de ser bloqueados por varios agentes hidrofóbicos que actúan desde el interior de la célula. Los tres tipos de canales mencionados también presentan similitudes considerables a nivel de sus secuencias de aminoácidos. Sin embargo, los canales de Ca^{2+} juegan un papel único; el de traducir señales eléctricas en señales químicas. Mediante el control del flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma pueden regularse una enorme cantidad de eventos intracelulares que son dependientes de Ca^{2+} .

II.1 Ca²⁺ COMO REGULADOR DE SECRECION:

Los canales de Ca²⁺ juegan dos papeles trascendentales, uno es electrogénico, y el otro es regulador.

La función electrogénica es la misma en todos los casos: el cambio en el potencial es utilizado para la apertura de los canales, y a su vez, la activación de los canales genera cambios eléctricos. Pero lo importante de este proceso, es que las células excitables transforman estos cambios eléctricos en acción mediante flujos de Ca²⁺ modulados por canales de Ca²⁺ sensibles o dependientes de voltaje. Este ión constituye un mensajero intracelular capaz de activar y modular una gran cantidad de procesos y funciones celulares.

Cambios, al parecer puntuales o locales en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i), pueden controlar funciones especializadas como la excitabilidad, la contracción o la exocitosis, y al mismo tiempo regular actividades celulares universales como el metabolismo y la expresión génica.

En una célula en reposo, el Ca²⁺ libre en el citoplasma se encuentra en niveles extremadamente bajos. La concentración normal de este ión en el reposo se encuentra entre 20 y 300 nM. Estas concentraciones se mantienen dentro de los rangos adecuados por la acción combinada de la bomba dependiente de ATP, y el sistema de intercambio Na⁺-Ca²⁺ en la superficie de la membrana. Bombas dependientes de ATP actúan también en organelos intracelulares como los retículos endoplásmico y sarcoplásmico.

Como se ha mencionado con anterioridad, las elevaciones en [Ca²⁺]_i se producen como resultado de la entrada de este ión del medio extracelular, a través de canales en la superficie de la membrana celular, o bien por la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares.

Los mecanismos encargados de regresar la [Ca²⁺]_i a los niveles basales en el reposo, incluyen la extrusión del ión a través de la membrana hacia el medio externo, así como el secuestro de Ca²⁺ hacia los almacenes intracelulares. Estos procesos involucran, como ya se mencionó, bombas de Ca²⁺ e intercambiadores Na⁺-Ca²⁺ (Inesi 1985; Carafoli 1987; Blaustein 1988; Schatzmann 1989).

En los últimos años, el conocimiento sobre los mecanismos de entrada y descarga de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares se ha incrementado notablemente.

La aplicación de la técnica de fijación de voltaje y otros estudios electrofisiológicos han aportado nueva información sobre la actividad de los canales de Ca²⁺.

Los canales presentes en organelos intracelulares han sido estudiados mediante su incorporación en membranas artificiales. Nuevos métodos para medir y

manipular la $[Ca^{2+}]_i$ han permitido un mayor acercamiento al estudio de su compleja regulación.

La utilización de la clonación molecular ha llevado a la caracterización de la estructura primaria de moléculas clave en el proceso; entre estas todas las grandes subunidades del receptor-(DHP) sensor de voltaje del canal de Ca^{2+} (DHPR) del músculo esquelético, así como canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a Rianodina o inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). Los resultados obtenidos en estos estudios indican hasta el momento, que los canales de Ca^{2+} en la superficie de la membrana y aquellos canales liberadores, presentes en almacenes intracelulares, son miembros de diferentes superfamilias de canales iónicos (Tsien y Tsien, 1990).

La multiplicidad de mecanismos que regulan e involucran la movilización de Ca^{2+} aporta gran flexibilidad para el control celular, pero representa una gran dificultad en cuanto al estudio de estos mecanismos y sus funciones. Para ello se requiere forzosamente de la integración de información electrofisiológica, bioquímica y de biología molecular.

II.2 MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca^{2+}

Las vías que median la entrada regulada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular son muy diversas. La clasificación de las mismas se ha realizado, durante mucho tiempo, en base a la forma de regulación del mecanismo de entrada, más que en base a la estructura misma de las moléculas que lo median (Tabla 1).

Tabla 1. Categorización general de Canales que median la entrada de Ca^{2+} en vertebrados. Publicada por Tsien y Tsien (1990), a partir de la propuesta de Maldolesi y Pozzan (1987).

Tipo	Propiedades	Ubicación/función
Voltaje-dependiente (VOCs)		
Tipo L	HVA. Alta sensibilidad a DHPs.	Participación en el acoplamiento excitación-contracción en músculo, y en excitación-secreción en células endocrinas y ciertos tipos neuronales.
Tipo T	LVA: Activados por bajos voltajes. Deactivación lenta. Sensibles a bajas $[Ni]_o$ y Octanol	Contribuye a la actividad marcapasos en corazón, y al sostenimiento de trenes de disparos en neuronas.

Tipo N	HVA. Alta sensibilidad a W-conotoxina	Identificados en la mayoría de las neuronas. Involucrado en procesos de liberación de neurotransmisores.
Tipo P	Moderadamente HVA. Sensibles a FTX. Insensibles a DHPs o w-conotoxina.	Involucrado en los procesos de liberación de neurotransmisores en neuronas de altas espigas.
Operados por Receptores (ROCs)		
NMDA	Activados por ligandos que dependen del voltaje en forma indirecta (por la liberación del bloqueo con Mg^{2+}).	Median la entrada de Ca^{2+} en neuronas, en respuesta a la acción conjunta de transmisores y depolarizaciones de membrana.
ATP	Activados por ligandos en forma independiente del voltaje.	Median la entrada de cationes y Ca^{2+} en músculo liso.
Operados por segundos mensajeros (SMOCs)		
Ca^{2+} o IP3		Mediadores entre la unión de ligandos específicos y la activación de secreción o expresión génica
Operados mecánicamente (MOCs).		
Activables o inactivables por estiramiento.		Mediadores entre la actividad mecánica y la actividad de enzimas dependientes de Ca^{2+} en músculo esquelético y células endoteliales
tónicamente activos		mantenimiento del influjo de Ca^{2+} en ausencia de estimulación eléctrica o química. Regulación de $[Ca^{2+}]$ en músculo

II.2.1 Diversidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs)

Los canales VDCCs se caracterizan entre otras cosas, porque su activación es dependiente de pasos depolarizantes de voltaje (Fox et al, 1987).

Presentan una afinidad de unión muy alta y selectiva a Ca^{2+} (Tsien et al.1987;), y son modulados específicamente por distintos neurotransmisores, proteínas G, y mensajeros difusibles (Tsien y Tsien,1990)

La clasificación más general de los subtipos de VDCCs se observa en la tabla 2.

La clasificación de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} , se basa principalmente en características funcionales tales como conductancias unitarias, dependencia del voltaje, dependencia temporal (cinética de apertura y cierre del canal), farmacología, y distribución celular. Nueva información obtenida por estudios de clonación molecular aporta evidencias para redefinir esta categorización. Sin embargo, estos parámetros siguen siendo aceptados en forma general.

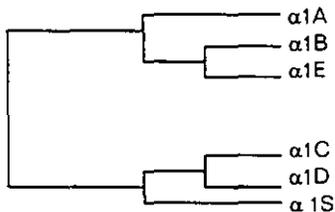
De esta forma, la clasificación que se utiliza más extensamente, distribuye los VDCCs bajo las cuatro grandes categorías denominadas: L, T, N, P (Tabla 1).

Tabla 2. Nueva clasificación de VDCCs.

		LVA	HVA	HVA
		T	N	L
Rango de activación ^a	de	Positivo - -70mV	Positivo - -20mV	Positivo - -10mV
Rango de inactivación	de	-100 a -60mV	-120 a -30mV	-60 a -10mV
Tasa de decaimiento ^b	de	Moderada: $\tau \approx 20$ -50ms	Moderada: $\tau \approx 50$ -80ms	Muy lenta: $\tau > 500$ ms
Tasa de deactivación ^c	de	Rápida	Lenta	Rápida
Conductancia (canal unitario)		8 ps	13ps	25pS
Cinética (canal unitario)		Breves aperturas	Ráfagas prolongadas de aperturas-cierres.	Continua reapertura.
Conductancia relativa		$\text{Ba}^{2+} = \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$
Bloqueo por cadmio		Resistente	Sensible	Sensible
Bloqueo por níquel		Sensible	Poco sensible	Poco sensible
Bloqueo por conotoxinas ^e		Débil	Muy fuerte	Débil
Bloqueo por dihidropiridinas ^f		Resistente	Resistente	Sensible.

Tabla tomada de Hille (1992) (Canales de Ca^{2+} en neuronas sensoriales).

Tabla3. Nueva Clasificación de Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.
 Filogenia de la subunidad α :



Subunidad α	Sensibilidad a ω -conotoxina (GVIA)	Sensibilidad a 1,4-DHPs	Sensibilidad a Cd^{2+}	Sensibilidad a ω -conotoxina (IVA)	Sensibilidad a ω -conotoxina (MVIC)	Tipo de canal de Ca^{2+}
$\alpha 1A$	NO	NO	SI	SI	SI	P/Q
$\alpha 1B$	SI	NO	SI	NO	SI	N
$\alpha 1E$	NO	NO	SI	NO	NO	Novel
$\alpha 1C$	NO	SI	SI	NO	NO	L
$\alpha 1D$	NO	SI	SI	NO	NO	L

i. CANALES DE Ca^{2+} TIPO "L"

El título de tipo "L" se ha utilizado para nombrar cualquier canal VDCCs, susceptible de activarse por altos voltajes (HVA), y que presente una sensibilidad elevada a 1,4-dihidropiridinas (DHP).

Esta familia de canales fué descrita inicialmente en células de corazón y neuronas periféricas, en las que muestran una conductancia por canal unitario de 20-27pS, con 10 mM de Ba^{2+} como carga acarreadora (Tsien et al,1987); y de 5-9 pS con 10 mM Ca^{2+} como carga acarreadora (Friel & Tsien,1989).

Los canales de Ca^{2+} tipo L presentan cambios dramáticos en su patrón de apertura en respuesta a agonistas de DHPs como Bay K 8644.

Estos canales son ubicuos en células de tejidos excitables, y en algunos no excitables (Tsien & Tsien, 1990). Constituyen la vía dependiente de voltaje más importante para la entrada de Ca^{2+} ; e intervienen en fenómenos de activación de la contracción en corazón y músculo liso, control de liberación de transmisores de células endocrinas, neuronas sensoriales y ciertas terminales nerviosas motoras (Tsien & Tsien,1990).

Los canales tipo L son blanco de diversas drogas antagonistas de Ca^{2+} tales como: verapamil, diltiazem o DHPs, pero también responden a diversos compuestos endógenos (Janis et al,1988;Tsien y Tsien,1990).

En muchos tipos celulares este tipo de canales se encuentra fuertemente modulado por catecolaminas, actuando vía fosforilación dependiente de cAMP (Kameyama et al,1985; Tsien et al.1986, Yue & Marban, 1990, Armstrong, et al,1991), y a través de la acción de proteínas G del tipo Gs (Tsien y Tsien,1990).

En ausencia de drogas, la apertura de canales tipo L puede sufrir cambios espontáneos, caracterizados por largas aperturas, cierres breves, y una alta probabilidad de apertura (Hess et al 1984). Este estado es denominado modo 2 de activación; y puede ser inducido por agonistas de DHPs (Hess et al, 1990), fosforilación dependiente de AMPc (Yue et al,1990); fosforilación dependiente de Ca^{2+} (Armstrong et al,1988), y depolarizaciones fuertes repetitivas (Artalejo et al,1989).

ii. CANALES DE Ca^{2+} TIPO "T"

Caracterizados como canales activados por bajos voltajes (LVA), debido a que se abren en respuesta a depolarizaciones pequeñas a partir de potenciales de mantenimiento relativamente negativos. La cinética de inactivación de estos canales es muy rápida, y depende por completo del voltaje.

En contraste con los canales tipo L, descritos anteriormente, presentan una alta sensibilidad al Ni^{2+} , pero son menos sensibles al Cd^{2+} (Tsien & Tsien,1990). Son prácticamente resistentes a antagonistas DHPs.

Este tipo de canales de Ca^{2+} se encuentra en una gran variedad de células excitables y no excitables (Hess,1990, Tsien & Tsien,1990).

La función más característica de los canales T, es probablemente el mantenimiento de la actividad marcapasos en el corazón, y la de permitir la entrada de Ca^{2+} a potenciales de membrana muy negativos (Tsien et al 1988, Tsien & Tsien, 1990).

iii. CANALES DE Ca^{2+} TIPO "N"

Estos canales comparten con los tipo L la característica de ser activados por altos voltajes; pero difieren de ellos en varios sentidos.

Farmacológicamente han sido caracterizados como un grupo diferente al presentar resistencia a DHPs, y ser altamente sensibles al bloqueo con w-conotoxina.

La conductancia definida para canales unitarios (Tsien y Tsien,1990) es de 11-20pS con 100mM Ba^{2+} como acarreador de carga, la cual es considerablemente menor que la conductancia que presentan en general los canales L.

Los canales tipo N muestran además una mayor tendencia a la inactivación con potenciales de mantenimiento despolarizantes.

Al parecer estos canales se encuentran prácticamente restringidos a neuronas, y parecen ser un elemento importante en la mediación de la liberación de transmisores en algunos sistemas neuronales.

iv..CANALES DE Ca^{2+} TIPO "P"

Estos canales han sido identificados como canales relativamente HVA. Conducen corrientes de Ca^{2+} insensibles a DHPs o ω -conotoxina; pero son altamente sensibles al compuesto de bajo peso molecular denominado FTX.

II.3 CARACTERISTICAS COMUNES DE LOS VDCCs

Además de su dependencia de pasos de voltaje depolarizantes para su activación, estos canales comparten otras características comunes. Entre ellas se encuentran:

La selectividad iónica:

Los VDCCs presentan una selectividad 1000 veces mayor al paso de Ca^{2+} sobre Na^+ o K^+ .

Al parecer, la elevada sensibilidad al Ca^{2+} no se debe únicamente a la afinidad de tamaños (perfecto acoplamiento estructural) entre el ión Ca^{2+} no hidratado y el poro del canal, ya que los iones Na^+ y Ca^{2+} son virtualmente del mismo tamaño. El canal de Ca^{2+} sensible a DHP permite el paso de TEA, lo que es consistente con un diámetro de poro de 6 Å, incluso mayor que el propuesto para los canales de Na^+ (Tsien & Tsien,1990).

A este respecto, existen varias teorías que involucran la unión de alta afinidad del Ca^{2+} a un sitio de regulación en la porción externa de la molécula del canal (Kostyuk & Mironov, 1986), o bien en diferentes sitios a lo largo del poro de conducción (Friel & Tsien,1989; Yue & Marban, 1990).

Nuevas evidencias obtenidas a nivel de canales únicos apoyan la idea de interacciones ión-ión en el interior del poro del canal (Tsien et al,1990). Niveles micromolares de $[Ca^{2+}]_i$ en el citoplasma producen un rápido bloqueo al flujo de cationes monovalentes a través de los canales de Ca^{2+} . Al parecer esto se relaciona con la presencia de sitios de unión específica a lo largo del poro del canal así como en los extremos a ambos lados de la membrana.

II.4 ESTUDIOS MOLECULARES Y NUEVAS CLASIFICACIONES

Composición de las subunidades de canales sensibles a DHPs:

Aun cuando la clasificación farmacológica anteriormente descrita sigue siendo válida y sigue utilizándose para el diagnóstico de los distintos subtipos de canales de Ca^{2+} , existe la complicación de que algunos canales de Ca^{2+} no pertenecen estrictamente a ninguna de las categorías mencionadas, y de la variabilidad de las propiedades descritas aun para los canales ubicados en una misma categoría.

Los recientes estudios han mostrado, que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs) son heteroligómeros complejos, que constan de 5 subunidades distintas: $\alpha 1, \alpha 2, \beta, \delta, \gamma$. (Campbell et al., 1988; Catterall et al., 19880). La nueva propuesta de clasificación de los VDCCs, se basa en las diferencias encontradas en la estructura de la subunidad $\alpha 1$ del canal (Tabla 3).

La subunidad $\alpha 1$, forma el poro, y contiene el receptor o sitio de acción de agonistas y antagonistas de los canales tipo L. Su estructura fue descrita por primera vez por Tanabe y sus colaboradores (1987). La clonación y secuenciación de esta subunidad ha revelado la existencia de varios subtipos de canales de Ca^{2+} tipo L, cuya expresión varía entre los distintos tejidos y tipos celulares (Tabla 3).

También se han reportado múltiples subtipos de la subunidad β , que parecen ejercer distintos efectos sobre las propiedades biofísicas de la subunidad $\alpha 1$.

III. Células hipofisarias: clonas GH3 y GH4.

La mayoría de los estudios electrofisiológicos relacionados con los mecanismos de acción de las hormonas hipotalámicas reguladoras se han realizado utilizando como modelo experimental líneas celulares transformadas derivadas de tipos particulares de células hipofisarias, eliminando así la variable de la heterogeneidad celular presente en la adenohipófisis.

La línea celular GH3, fue desarrollada originalmente por Tashjian en 1968 (Tashjian, A. H. Et al, 1968). Este tipo celular secreta tanto PRL como hormona de crecimiento (GH). Kidokoro (1975) reportó potenciales de acción espontáneos y dependientes de Ca^{2+} en estas células, demostrando además, que la frecuencia de disparo de dichos potenciales aumentaba en presencia del secretagogo TRH. Este efecto correspondía con un aumento en los niveles secretados de PRL y GH. La línea celular GH3 se ha convertido en el modelo por excelencia para el estudio y caracterización electrofisiológica y bioquímica de los mecanismos intracelulares que median la secreción inducida por TRH.

Sin embargo, estas células carecen de receptores dopaminérgicos, elemento que es esencial en la regulación de la secreción de PRL in vivo. Por tal motivo, la línea celular de somatotropos GH4C1, una subclona de la GH3, fue transfectada con

las isoformas larga y corta del receptor dopaminérgico D2 (cDNA de metalotioneína RGB-2) (Civelli et al, 1990). Receptor que como se ha mencionado está presente en los lactotrofos normales de la hipófisis anterior.

Las células transformadas fueron a la vez clonadas y crecidas. Entre estas clonas se encuentran las GH4Zr7 y GH4C1hD2L (GH4C1 7em-228-hD2long clone 2). Esta última denominada de manera genérica GH4C1/D2-DAR, transfecteda con la isoforma larga del receptor dopaminérgico D2 humano, fue utilizada en el presente trabajo.

La administración de DA en estas células inhibe a la adenilato ciclasa, disminuyendo tanto la producción basal de AMPc, como la estimulada por VIP, de manera similar a lo reportado en lactotrofos obtenidos de cultivos primarios hipofisiarios (Civelli et al ; 1991, Nestlar y Duman, 1994).

La activación del receptor clonado involucra la activación de una proteína Gi (Offermanns et al, 1991), como lo demuestra el pretratamiento con la toxina de Pertuis (PTX), que previene el desplazamiento de GDP, y provoca el desacople del efecto inhibitorio de la administración de DA, tal y como se ha reportado en lactotrofos normales.

Esta línea celular resulta ser, hasta el momento, un modelo adecuado para estudiar más a fondo los mecanismos intracelulares que participan en la regulación pleiotrópica de la secreción de PRL, y sobre todo de aquellos involucrados en la interacción entre DA y TRH.

Los estudios electrofisiológicos realizados con técnicas de fijación de voltaje reportan potenciales de membrana en reposo promedio entre -40 y -50 mV en las clonas GH4 y GH3 respectivamente (Ozawa S. Et al 1986). Asumiendo una forma esférica para estas células con un diámetro promedio de 14 μm ; la resistencia específica de membrana estimada también con esta técnica electrofisiológica es de 12 a 24 $\text{K}\Omega\cdot\text{cm}^2$. La correspondiente capacitancia de membrana fue estimada en 1.6-2.3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Ozawa et al, 1986).

Como se mencionó anteriormente, Kicodoro propuso que los potenciales de acción en estas células son mediados por Ca^{2+} , las evidencias que sustentaron esta hipótesis son las siguientes: dichos potenciales de acción no se bloquean con TTX (2 μM), ni con la sustitución de Na^+ con Tris. Por otro lado, la administración de antagonistas de Ca^{2+} inorgánicos (La^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}); así como antagonistas orgánicos (verapamil y D600) eliminan por completo la actividad eléctrica.

Tanto Ba^{2+} como Sr^{2+} , pueden sustituir al Ca^{2+} en cuanto a la respuesta regenerativa en células GH, así como en otros tipos celulares que generan picos de depolarización por Ca^{2+} .

Las propiedades particulares de los canales de Ca^{2+} en la líneas GH se han investigado extensamente. Las corrientes de Ca^{2+} caracterizadas hasta el momento parecen presentar los mismos componentes tanto en células GH3 como en las GH4. El comportamiento de uno de estos componentes es muy similar al descrito para los canales tipo T en músculo y neuronas: tiene un umbral de activación bajo y una cinética de inactivación rápida. Presentan prácticamente la

misma conductancia tanto al Ca^{2+} como al Ba^{2+} . El segundo componente presenta un alto umbral de activación y una cinética de inactivación lenta ; la conductancia al Ba^{2+} es por lo menos del doble de la de Ca^{2+} , y la inactivación es claramente menor cuando se utiliza Ba^{2+} como acarreador de carga. Estas características coinciden con las reportadas para los canales tipo L (Bean, B.P. 1989).

Los experimentos farmacológicos realizados en estas clonas hipofisiarias muestran que la corriente de alto umbral es bloqueada potentemente por dihidropiridinas, mientras que la corriente de bajo umbral presenta muy poca sensibilidad a este tipo de drogas.

Hasta el momento no se han reportado canales de Ca^{2+} tipo N en este tipo de células.

Los resultados obtenidos en la caracterización electrofisiológica de los lactotropos normales, son muy consistentes con los reportados para las clonas GH. Presentan los dos componentes de Ca^{2+} descritos anteriormente y su comportamiento en células normales es prácticamente idéntico.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es bien conocido que la DA constituye el principal factor regulador de la secreción de PRL. Como se ha mencionado, la unión de esta neurohormona a receptores D2 en los lactotrofos hipofisarios y en células GH4C1/D2-DAR inhibe la liberación de PRL, mientras que su disociación la estimula. Dado que además el proceso de liberación de PRL es dependiente de Ca^{2+} , se probó la capacidad de la DA para modular la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células GH4C1/D2-DAR.

El interés general de este proyecto fue el de estudiar los mecanismos que subyacen a la regulación de la secreción de PRL; en particular, aquellos involucrados con la acción dopaminérgica y su relación con fenómenos de potenciación o amplificación del efecto de otros factores hipotalámicos, como es el caso de TRH. Para ello se utilizó la línea lactotrópica GH4C1, transfectada con el receptor dopaminérgico D2, eliminando así la variable de la heterogeneidad celular presente en los cultivos primarios hipofisarios.

Debido a que como se ha mencionado, el proceso de secreción de PRL es enteramente dependiente de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, ya que se inhibe por completo en presencia de bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L y en medios deficientes de Ca^{2+} ; y de que el fenómeno de la potenciación puede mimetizarse con activadores de canales tipo L, cuya forma de acción es análoga a la fosforilación de los mismos; el objetivo particular de este trabajo fue determinar si la señal dopaminérgica, y en especial la suspensión de DA, regula en forma directa la actividad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células GH4C1/D2-DAR; e identificar qué conductancias de Ca^{2+} son sensibles a la manipulación dopaminérgica.

3. METODO

I. CULTIVO CELULAR

Células de la línea hipofisiaria de rata GH₄C, transfectadas con el cDNA que codifica para la isoforma larga del receptor dopaminérgico humano D2 (GH₄C, 7em 228 hD_{2L} clone2) (Albert et al, 1990; Grandy et al, 1989) nos fueron donadas amablemente por el Dr. Olivier Civelli (Vollum Institute for Advanced Biochemical Research, Portland, OR).

Estas células se crecieron en cajas de cultivo de 35x10mm (Falcon 1008. Easy Grip (polystyren) esteril), tratadas con matrigel. El medio de cultivo utilizado fue Ham F-10 complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina-streptomicina (P-S) y 100 µg/ml de neomicina. Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a 37°C, en una atmósfera saturada de humedad y una mezcla de 95% de O₂ y 5% CO₂ para mantener los niveles de pH deseados en el medio de cultivo. El recambio de medio se realizó dos veces por semana.

Los cultivos fueron subdivididos al alcanzar el 90% promedio de confluencia. Este proceso se realizó retirando el medio de cultivo y disociando las células con 2 ml de solución salina balanceada (HBSS-Hanks Balanced Salt Solution) con tripsina al 0.05% y EDTA 0.53 mM, para después sembrar las células en nuevas cajas con medio de cultivo F-10 preparado como se mencionó anteriormente. Los cultivos se mantuvieron entre los pasajes 3 y 10.

II MEDICIONES ELECTROFISIOLOGICAS

II.1 Dispositivo de registro y manipulación de soluciones:

Las células GH₄C1/D2-DAR se registraron entre el primero y el tercer día consecutivos a su siembra. Las cajas de cultivo fueron colocadas especialmente sobre la platina de un microscopio (Nikon Diaphot).

Las soluciones de registro se aplicaron localmente a la célula (1ml/min) a través de una pipeta de vidrio con una punta de 50 µm de diámetro, y fueron removidas del medio a través de un aspirador ajustable.

El recambio de soluciones se realizó a través de válvulas de solenoide. (AutoMate Sci.), permitiendo el control del flujo, y una velocidad de recambio local del orden de milisegundos.

II.2 Registro de corrientes de Ca²⁺ y K⁺:

Todos los registros se llevaron a cabo utilizando la técnica de fijación de voltaje. (Patch-clamp) en la modalidad de célula entera, utilizando el método descrito por Hamill, (Hamill et al, 1981)

Las corrientes a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje se registraron utilizando Ba²⁺ como acarreador de carga. Estas corrientes se observaron rutinariamente a partir de potenciales de mantenimiento de -80 y -40 mV, al llevar el potencial de membrana a 0 mV por 50 ms.

La determinación de las relaciones de corriente en función del voltaje (I-V), también se realizó a partir de los mismos potenciales de mantenimiento: -40 y -80 mV, aplicando pulsos depolarizantes en pasos de 10 mV, que se mantuvieron por 100 ms, hasta alcanzar un potencial de membrana de +50 mV. Las corrientes de Ba^{2+} ($I_{Ba^{2+}}$) fueron aisladas farmacológicamente de conductancias de Na^+ y K^+ utilizando para ello una solución externa (de baño) que contenía en mM: 140 NaCl, 5 CsCl₂, 10 BaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES y tetrodotoxina (200 nM). El pH final se llevó a 7.3 con CsOH.

La solución intracelular (de pipeta) contenía (mM): 100 CsCl, 40 HEPES, 10 EGTA, 5 MgCl₂, 3 MgATP, 0.3 GTP y leupeptina 0.1. El pH se ajustó a 7.2 con CsOH.

Para los registros de corriente de K^+ (I_K), el contenido de la solución externa fue (en mM): 40 KCl, 110 N-methylglucamina (NMG), 1 CaCl₂, 25 HEPES, 10 glucosa. El pH final se llevó a 7.35 con HCl. La solución intracelular contenía (mM): 130 KCl, 20 HEPES, 10 EGTA, 5 MgCl₂, 3 Na₂ATP, 0.3GTP, 0.1 leupeptina; finalmente se aplicó KOH para obtener un pH de 7.25.

Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (Hamill et al, 1981); utilizando microelectrodos para fijación de voltaje (Patch-clamp) con una resistencia de acceso entre 1.1-1.3 MΩ, construidas con vidrio de borosilicato (Kimax glass) y pulidas con fuego en una microforja.

Una vez balanceados los electrodos, se realizó la formación del gigasello y utilizando la configuración de célula entera, se registraron las corrientes de Ba^{2+} en condiciones control. Las soluciones de prueba (500 nM DA, nifedipina 2μM o CdCl₂ 100 μM) se administraron a través una pipeta de perfusión colocada sobre la célula registrada, evitando así perturbaciones mecánicas al sistema.

Se utilizó Ba^{2+} como acarreador de carga, en sustitución del Ca^{2+} puesto que produce corrientes entrantes de mayor magnitud y fluye selectivamente a través de canales de Ca^{2+} . Esta manipulación no afecta otras corrientes dependientes de Ca^{2+} , pero si bloquea algunas corrientes salientes de K^+ .

La I_{Ba} se define como el componente de la corriente macroscópica sensible a 100 μM de Cd²⁺. Por su parte, la corriente rectificadora entrante de K^+ (I_K) que nos interesa particularmente se definió como el componente sensible a 1mM Ba^{2+} , generado durante los 150 ms finales de los 250 ms que duró el pulso hiperpolarizante a -100 mV, aplicado a partir de un potencial de mantenimiento fijo a -45 mV.

Las corrientes iónicas fueron registradas y filtradas con un amplificador Patch-clamp L/M-EPC7 (List Medical). Todas las corrientes se filtraron a 3KHz, y se digitalizaron a 5 KHz en el caso de la I_{Ba} , y a 1 KHz en el caso de la I_K . En ambos casos utilizando el convertidor analogico-digital Axon 1200 A/D (Axon instruments, Foster City, CA). Los datos fueron almacenados y procesados en una computadora compatible (PC. IBM).

La adquisición y el análisis de datos se realizaron utilizando los programas Clampex y Clampfit respectivamente, ambos de pClamp 6 (Axon Instruments).

La capacitancia de membrana se calculo para cada célula, a partir la integral del transiente capacitivo promedio generado por 5 pulsos de 10 mV y duración de 5 ms, aplicados desde un potencial de mantenimiento de -120 mV. Las corrientes capacitivas fueron digitalizadas a 50 KHz. El valor de la capacitancia de membrana se obtuvo en función de:

$$C = Q/V$$

$$\int i \cdot dt = Q$$

Donde C es la capacitancia de la membrana (pF), Q es la carga (A/s), y V es el voltaje (V).

La capacitancia de membrana es directamente proporcional al área de la cual se genera, por ello se utilizo como un parámetro de normalización de la corriente máxima, para reportarla como densidad de corriente (DI, que implica corriente iónica (i) que fluye por unidad de área):

$$DI = I_{max}/C_m$$

Para cada célula individual, el valor pico de la I_{max} de Ba^{2+} registrada se determinó a partir de la relación de corriente en función del voltaje. La corriente pico (máxima I_{Ba}) fue dividida por el valor de capacitancia determinado previamente para la misma célula, y el resultado se reporta como densidad de corriente. La cancelación de los componentes lineales que se realizó con el método de P/n, con un total de 4 pulsos de resta ($n=4$), desde un potencial de mantenimiento de -120 mV.

III. ANALISIS ESTADISTICO

Los valores se expresan como promedio \pm error estándar del mismo. Las comparaciones estadísticas se realizaron como variables independientes, utilizando la prueba t de Student. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Se aplicó un algoritmo no lineal para el ajuste de las fórmulas numéricas a los datos experimentales de las curvas de corriente en función del voltaje que se presentan en la figura 3.

IV DISEÑO EXPERIMENTAL

IV.1 Caracterización de I_{K+}

Como parte de la caracterización del modelo utilizado, se buscó la presencia de una corriente rectificadora entrante de K^+ , en células GH4C1/D2-DAR, para posteriormente determinar los posibles efectos de la administración de DA (500 nM) sobre ella.

Se analizó el curso temporal de la administración de DA, partiendo de un potencial de mantenimiento de -45 mV, y aplicando un pulso hiperpolarizante a -100 mV.

Se administró como prueba farmacológica 1 mM de Ba^{2+} . Este ión bivalente es un potente bloqueador de canales rectificadores entrantes de K^+ asociados a proteínas G.

Todas las mediciones fueron normalizadas como densidad de corriente (pA/pF), utilizando para ello el valor de capacitancia registrado para cada célula al comenzar el registro. Los resultados se reportan, por lo tanto, como corriente por unidad de área, eliminando así las posibles diferencias debidas al tamaño de las células.

El porcentaje de inhibición reportado se calculó considerando la corriente control como el 100%.

IV.2 Manipulación dopaminérgica

Con el objeto de determinar si la señal dopaminérgica, en particular la suspensión fásica de DA, modula directamente la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células lactotrópicas, se formaron tres series de estudio que incluyeron los siguientes grupos experimentales sometidos a diferentes manipulaciones de la acción dopaminérgica:

i. Administración de DA:

En esta serie experimental se registró la $I_{Ba^{2+max}}$ (10 mM) en células control (ausencia crónica de DA), y en células incubadas en presencia de DA (500 nM) por un periodo de 24 hrs. Este último grupo se consideró bajo la acción tónica de DA.

Se determinaron las relaciones I-V (corriente vs voltaje), para ambos grupos a dos potenciales de mantenimiento diferentes: -80 y -40 mV. Se calcularon los valores de densidad de corriente, de la misma forma que en el protocolo anterior, normalizándolos por unidad de área.

ii. Suspensión del tono dopaminérgico:

Células en presencia tónica de DA (500 nM, por un periodo de 24 hrs.), fueron sometidas a la suspensión fásica de esta neurohormona. En estas condiciones se registraron las variaciones en la I_{max} , y el curso temporal del efecto de dicho estímulo.

La DA fué suspendida un minuto después de haber comenzado el registro. El efecto inmediato de la suspensión de DA se registró en forma continua durante los primeros dos minutos, sin embargo, con la intención de relacionar dicho efecto con resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, se registró el curso temporal de la I_{Ba} , 10 minutos después de suspender a la DA del medio extracelular.

Adicionalmente, se realizaron registros de la relación de corriente de I_{Ba} en función del voltaje, partiendo de potenciales de mantenimiento a -40 y -80 mV, y otra serie de cursos temporales con la misma duración que los anteriores, ambos 10 min. después de haber suspendido la DA del medio extracelular. Un tercer registro se realizó 24 hrs después en las mismas condiciones.

La realización de estas series experimentales permitió por un lado la caracterización del efecto inmediato o a corto plazo del escape de la acción dopaminérgica sobre la I_{Ba} en forma continua durante los primeros dos minutos; y posteriormente, 10 min después de suspendido el tono dopaminérgico, con la intención de relacionar los posibles resultados con observaciones previas realizadas en nuestro grupo de trabajo en relación a los efectos de este mismo estímulo sobre la tasa de secreción.

Por otro lado, el registro realizado 24 hrs. después de la suspensión de DA permitió analizar el efecto tardío o a largo plazo de este estímulo.

ii. Efecto de TRH:

Como se ha mencionado, la suspensión fásica de DA provoca la potenciación o amplificación de la secreción de PRL en respuesta a secretagogos como TRH. Para determinar si esta acción obedece a una modulación específica de la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, se evaluó el efecto de la administración de TRH (1 mM) en presencia del tono dopaminérgico, con la intención de poder caracterizar el efecto de este péptido hipotalámico de manera individual.

En estas condiciones se realizaron registros de la relación de corriente en función del voltaje, partiendo de un potencial de mantenimiento (H_p) de -80 mV.

IV.3. Caracterización de la $I_{Ba^{2+}}$ a través de canales de Ca^{2+} en células GH4C1/D2-DAR.

Con el propósito de determinar la proporción de corriente que fluye a través de canales de Ca^{2+} HVA, tipo L en células GH4C1/D2-DAR se midió el grado de sensibilidad a Nifedipina. Esta última es una DHP que tiene la característica de bloquear específicamente los canales de Ca^{2+} tipo L.

Con esto en mente, se determinó el valor de la corriente máxima (I_{max}) a través de canales de Ca^{2+} , utilizando como acarreador de carga 10 mM de Ba^{2+} . La determinación de esta corriente se realizó mediante una curva I-V, registrada a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV.

Las células se registraron en condiciones control, y una vez determinado el valor de la I_{max} , fueron perfundidas con 10 μ M de nifedipina. El registro de la curva I-V se repitió en estas condiciones. Finalmente, las mismas células fueron sometidas, de manera individual, a la exposición de 100 μ M de $CdCl_2$, para determinar el grado de selectividad de la I_{Ba} a través de canales de Ca^{2+} , ya que estos últimos son bloqueados de manera inmediata por la presencia de Cd^{2+} . Los resultados obtenidos se expresan como densidad de corriente (DI).

4. RESULTADOS

I. Estimulación de una K^+ ir en respuesta a la administración de DA

Se ha reportado que los efectos de la DA sobre las características electrofisiológicas de las células lactotrópicas preceden a cambios en los sistemas de segundos mensajeros involucrados (Gregerson et al, 1994; Gregerson et al, 1994(II); Chen et al, 1993). En lactotrofos normales, aplicaciones breves de DA ocasionan una clara hiperpolarización del potencial de membrana, el cuál se recupera normalmente después del lavado (20 art.). La hiperpolarización observada en respuesta a la administración de DA se acompaña en todos los casos del cese de la actividad espontánea, y por ende de los potenciales de acción que en este caso están mediados por Ca^{2+} . La actividad eléctrica y los potenciales de Ca^{2+} reaparecen al recuperarse el valor normal del potencial de membrana en reposo (20,21 art.). Dicha hiperpolarización parece involucrar la activación de una corriente entrante de K^+ . De tal forma, la modulación directa de los canales de Ca^{2+} podría no ser la única forma de control del influjo de Ca^{2+} en respuesta a la activación de receptores dopaminérgicos D2.

Con la intención de confirmar estas observaciones, y de caracterizar el modelo experimental utilizado en el presente trabajo, se probó el efecto de la administración de DA sobre una corriente rectificadora entrante de K^+ en células GH4C1/D2-DAR.

Como se observa en las figuras 1A y 1B, la aplicación de DA (500 nM) estimula, en forma reversible, una corriente entrante de K^+ . La elevada sensibilidad que mostró esta corriente a la aplicación de Ba^{2+} (1 mM), que es un bloqueador selectivo de canales de K^+ asociados a proteínas G, sugiere la presencia de un canal tipo Girk involucrado en el proceso (fig. 1C). La modulación de las propiedades de este canal de K^+ , altera las propiedades eléctricas de la célula, modificando así, de manera indirecta, la conductancia de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, posiblemente mediante la remoción de la inactivación de canales HVA, lo que a su vez resultaría en un mayor influjo de Ca^{2+} a la célula.

Estos resultados muestran que las células GH4C1/D2-DAR son un modelo adecuado para investigar los mecanismos involucrados en la facilitación de la secreción de PRL evocados por la suspensión transitoria de la acción tónica de DA, y permite proseguir con el análisis del papel de los canales de Ca^{2+} en este fenómeno.

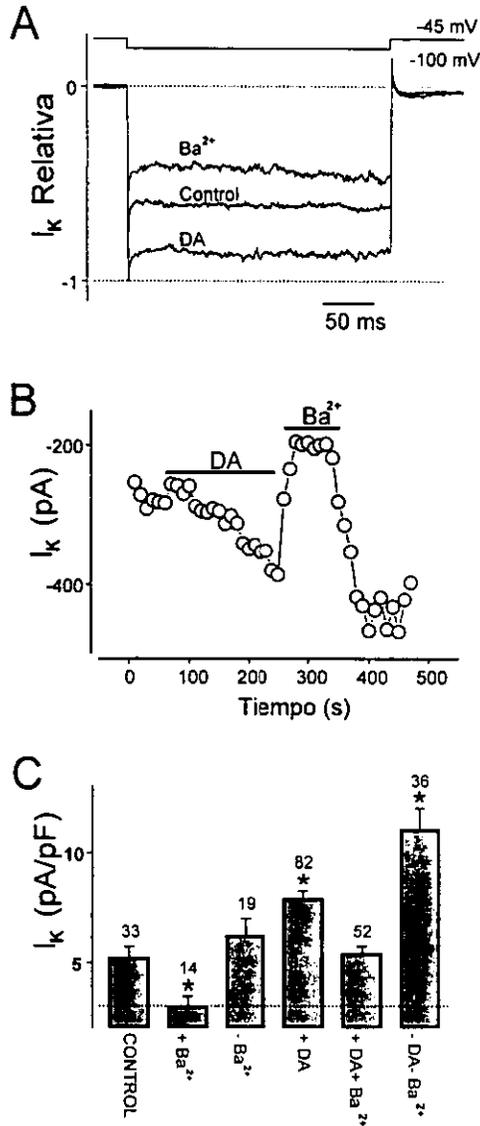


Figura 1. Estimulación de una corriente rectificadora entrante de K^+ por la acción de DA. A, registro de corriente de K^+ (I_K) en células GH4C1/D2-DAR bajo condiciones control, en presencia de DA (500 nM) y ante la administración de Ba^{2+} (1 mM). B, Curso temporal de la respuesta a DA y ante el bloqueo con Ba^{2+} . C, Densidad de corriente promedio bajo las condiciones anteriormente mencionadas. La línea punteada delimita la corriente sensible a Ba^{2+} . * $p < 0.05$ vs control. Los números sobre las barras denotan el número de células analizadas en cada condición.

II. Efecto de diferentes manipulaciones dopaminérgicas sobre la corriente macroscópica de Ba^{2+}

La perfusión de DA (500 nM) por 1 minuto (fásica) provocó en células de la línea GH4C1/D2-DAR, una disminución del $27.7 \pm 0.22\%$ en la densidad de corriente de Ba^{2+} , mientras que el cultivo de estas células con la misma concentración de DA por 24 horas (tónica) tuvo un efecto mucho más profundo, reduciendo la densidad de corriente en un $56.6 \pm 0.7\%$ (fig. 2A). La respuesta electrofisiológica de estas células sigue el mismo patrón que se ha reportado en la respuesta secretora ya que la inhibición es proporcional al tiempo de exposición a DA.

Un posible efecto de la DA sobre la dependencia del voltaje de la activación de los canales de Ca^{2+} se analizó a potenciales de mantenimiento de -80 y -40 mV. Partiendo de un potencial de mantenimiento de -80 mV, la inhibición producida por la exposición crónica a DA (por 24 hrs), es muy clara en la región desde los -20 mV hasta los +40 mV, una región de voltaje característica de corrientes de Ca^{2+} HVA. Esta corriente mantuvo su sensibilidad a DA aún después de cambiar el potencial de mantenimiento a -40 mV. (fig. 3C).

La mayor parte de la corriente obtenida mediante la substracción del componente registrado al potencial de mantenimiento de -40 mV de aquel registrado a -80mV fué sensible a DA (fig 3D), lo que sugiere que las corrientes de Ca^{2+} afectadas son principalmente L. Además, un aparente, aunque no significativo, cambio de alrededor de 10 mV hacia valores de potencial de membrana más negativos, se observó subsecuentemente a la aplicación tónica o crónica de DA, en la corriente máxima generada a partir del potencial de mantenimiento fijo a -80mV (fig 3B).

Dado que el control fisiológico que ejerce la DA sobre la secreción de PRL está mediado por el escape transitorio de su acción tónica, uno de los objetivos de este trabajo fué el determinar los efectos de esta señal sobre corrientes de Ca^{2+} HVA. Con esta intención se probó el efecto de la suspensión aguda del tono dopaminérgico, a dos diferentes potenciales de mantenimiento: -80 y -40mV, con la intención de separar los componentes HVA y LVA (23,27).

A partir del potencial de mantenimiento de -80mV, la suspensión de DA por 10 min, facilitó significativamente la corriente de Ba^{2+} , lo que se muestra en la figura 2B como un incremento del $81.6 \pm 1.4\%$ en la densidad de corriente. Este incremento también se observó al partir de un potencial de mantenimiento de -40 mV, aunque en este caso fué significativamente mayor, ($222 \pm 1.2\%$); lo que indica que la suspensión de DA afecta principalmente canales de Ca^{2+} HVA.

Este componente de la corriente macroscópica no parece ser afectado por la administración de TRH, cuyo efecto secretor es potenciado por el escape transitorio de la acción tónica de DA. La administración de TRH (1 μ M) en presencia del tono dopaminérgico, y en condiciones de fijación de voltaje no tiene efecto sobre la densidad de corriente de Ba^{2+} (fig 2C).

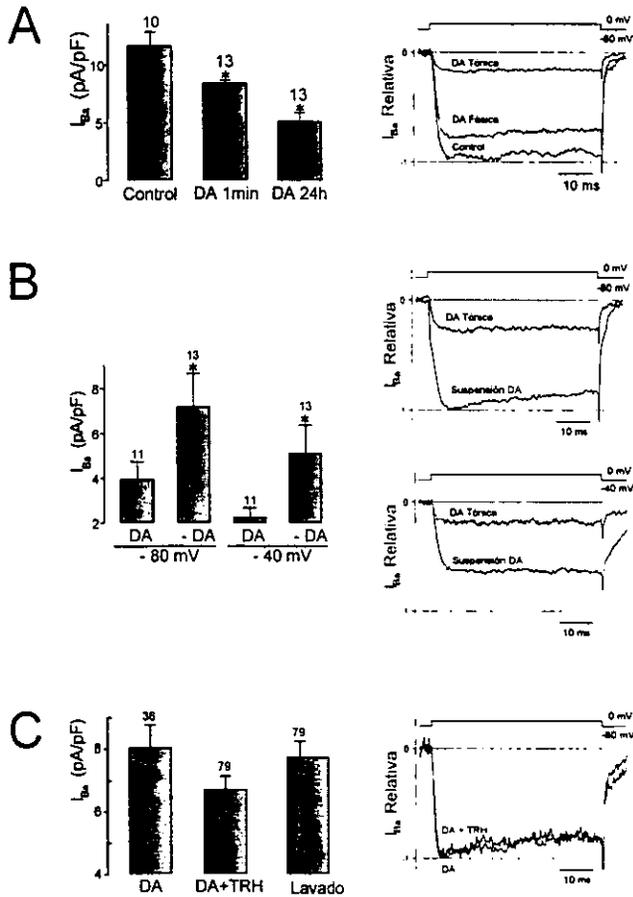


Figura 2. Efecto de la DA sobre la corriente de Ba^{2+} . A. Densidad de corriente de Ba^{2+} (I_{Ba}) producto de un pulso despolarizante (a 0 mV) sostenido durante 50 ms, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Las células fueron expuestas a DA (500 nM) por 1 minuto y 24 horas respectivamente. B. Densidad de I_{Ba} provocada por despolarización a 0 mV partiendo de potenciales de mantenimiento de -40 y -80 mV. Las células se registraron bajo la acción tónica de DA (DA) (por 24 horas), y 10 minutos después de su suspensión (-DA). C. Densidad de I_{Ba} registrada bajo la acción tónica de DA (DA), de DA en conjunto con TRH (1 μ M) (DA+TRH), y después del lavado de TRH (lavado). A la derecha aparecen los registros de corriente relativa correspondientes a cada serie experimental. * $p < 0.05$ vs control correspondiente. Los números sobre las barras representan el número de células registradas en cada condición.

III. Caracterización de la corriente macroscópica de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células GH4C1/D2-DAR.

Para evaluar la presencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje HVA en este modelo celular, como han sido descritos previamente en células GH3 (11 y 22 art.), se analizó la corriente macroscópica de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} .

La figura 3A muestra el registro obtenido a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Pulsos de prueba a 0 mV provocaron la activación de corrientes entrantes de Ba^{2+} , que se caracterizaron por un curso temporal lento, y prácticamente no se inactivaron durante los 50 ms de duración del pulso aplicado. Debido a que este componente entrante de la corriente decae muy lentamente en el tiempo, de manera consistente con el comportamiento de los canales tipo L (23 art.), este resultado sugiere la expresión de una proporción importante de canales de Ca^{2+} HVA en la línea lactorópica GH4C1/D2-DAR.

La coexistencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L y T ha sido reportada tanto en células GH3 y subclonas relacionadas, como en lactotropos normales, con base en estudios a nivel de canal unitario, y sensibilidad de las corrientes a DHP's entre otros fármacos específicos (25,26, art.). Sin embargo, la presencia de canales de Ca^{2+} LVA no es tan aparente en los registros en los que el potencial de mantenimiento se mantuvo fijo a -80 mV. A este valor de potencial de membrana, los canales LVA, en particular tipo T, se encuentran parcialmente inactivos (24,art.); por lo que para poder estimar la proporción de corriente HVA y LVA de manera significativa, se probó el efecto de un bloqueador específico de canales tipo L sobre la corriente macroscópica de Ba^{2+} .

Como se observa también en la figura 3A, la aplicación de nifedipina (2 mM) provocó la inhibición del 60% de la densidad de corriente con respecto al control, lo que sugiere la predominancia de la población L en el total de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje expresados en esta línea celular. Por su parte, la administración de 100 μ M de $CdCl_2$ (fig. 3A), bloqueó la corriente remanente en un 91% con respecto al control, lo que prueba la selectividad de la corriente de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} .

Con la intención de caracterizar la dependencia de voltaje de la activación de los canales de Ca^{2+} presentes en este tipo celular, y de evaluar algunas de las características de la inhibición de la corriente ante la presencia tónica de DA, se analizaron las relaciones de corriente, en función del voltaje, partiendo de dos potenciales de mantenimiento diferentes: -80 y -40 mV, en ambos casos, bajo condiciones que eliminan del registro corrientes de Na^+ y K^+ (fig. 3).

La variación en el potencial de mantenimiento de -80 a -40 mV es un método

clásico para separar corrientes de Ca^{2+} HVA de aquellas LVA (Tsien, 1985, 23 art.). Como se observa en la figura 3B, partiendo de un potencial de mantenimiento de -80 mV, pulsos de prueba superiores a -50 mV provocaron corrientes de Ba^{2+} entrantes, que en ausencia de DA, exhibieron su valor máximo a 0 mV, y mostraron un potencial de inversión cercano a los +60 mV. El hecho de que esta corriente esté activa aún después de cambiar el potencial de mantenimiento a -40 mV, apoya la presencia de un componente HVA en estas células. A partir de este potencial de mantenimiento, potenciales de prueba superiores a -20 mV provocaron pequeñas corrientes entrantes de Ba^{2+} que también presentaron su máximo alrededor de los 0 mV (fig. 3C). El hecho de que las corrientes observadas a -40 mV sean considerablemente menores que aquellas observadas a -80 mV, sugiere que el componente HVA se encuentra parcialmente inactivo cuando el potencial de mantenimiento se fija a -40 mV; lo que no resulta extraño, ya que estas corrientes comienzan a inactivarse desde los -60 mV (24 art.).

El componente HVA de la corriente inactivo a -40 mV puede reactivarse al regresar el potencial de mantenimiento a -80 mV; y se vuelve aparente cuando de este registro, se sustrae el componente registrado a -40 mV (fig. 3D).

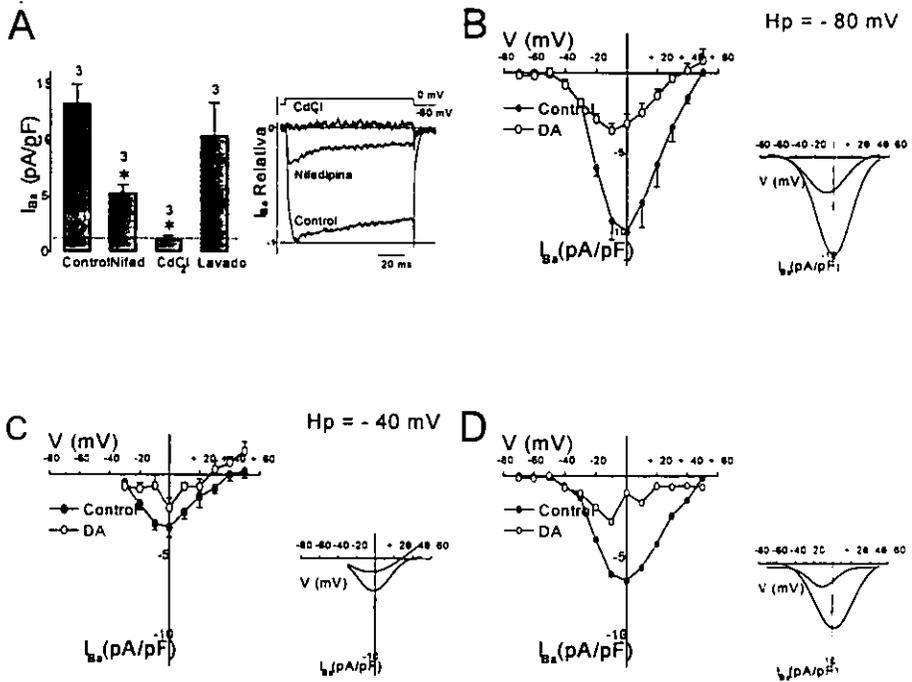


Figura 3. Especificidad de los efectos de DA sobre las corrientes de Ba^{2+} . A, Densidad de I_{Ba} evocada por un pulso depolarizante (a 0 mV) por 100 ms, en células GH4C1/D2-DAR, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, bajo condiciones control, en presencia de Nifedipina ($2 \mu M$) y $CdCl_2$ (100 mM) respectivamente. La línea punteada representa el límite de la I_{Ba} sensible a Cd^{2+} . A la derecha se muestra el registro de corriente relativa correspondiente. B, Relación de corriente en función del voltaje (I-V) a -80 mV de potencial de mantenimiento, en células en ausencia y presencia tónicas (por 24 horas) de DA (500 nM). C, Relación I-V al potencial de mantenimiento de -40 mV bajo condiciones control y en presencia tónica de DA. A la derecha se presenta el ajuste de las curvas experimentales, al igual que en la gráfica anterior (B). D, Relación I-V obtenida de la substracción de B-C. A la derecha se presenta su correspondiente ajuste. Los números sobre las barras (en A) representan el número total de células registradas en cada condición.

IV. Facilitación de la corriente macroscópica de Ba^{2+} en respuesta a la suspensión del tono dopaminérgico.

Con el objeto de caracterizar el desarrollo temporal de la respuesta electrofisiológica a la suspensión del tono dopaminérgico, la corriente macroscópica de Ba^{2+} fue monitoreada de manera continua por más de 100 minutos posteriores a la eliminación de la DA del medio extracelular. Los valores de corriente registrados en este lapso temporal se compararon con aquellos obtenidos 24 horas después.

Sorpresivamente, la suspensión aguda de DA en células GH4C1/D2-DAR tratadas con DA por 24 horas., induce un rápido decremento del $36.4 \pm 0.3\%$ en la corriente de Ba relativa, (fig. 4A, trazos b vs a), así como en la densidad de corriente (fig 4B). Sin embargo, este efecto fué transitorio, ya que una segunda fase, registrada 10 minutos después se caracterizó por un aumento de la densidad de corriente de Ba^{2+} del $270 \pm 15\%$ sobre el promedio bajo el efecto tónico de DA, alcanzando su máximo entre los 10 y los 40 minutos posteriores a la aplicación del estímulo (fig. 4B, trazos c vs a). Este efecto se mantuvo durante 30 minutos, tiempo después del cual, los valores de corriente regresaron a aquellos observados bajo la acción del tónica de DA. Un segundo incremento, de magnitud similar, se observó 24 horas después de la suspensión del tono dopaminérgico.

Estos resultados reflejan en su conjunto, que los canales de Ca^{2+} HVA, en particular tipo L, expresados en células GH4C1/D2-DAR, son regulados por la disociación de la DA de su receptor.

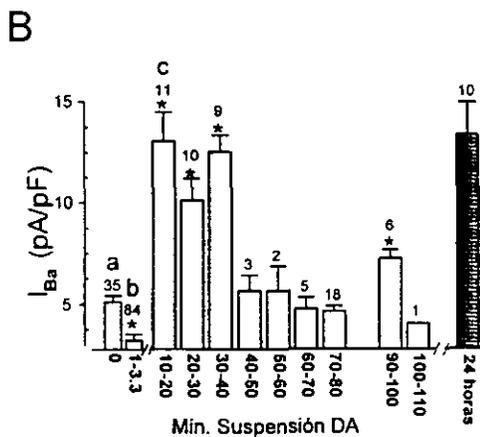
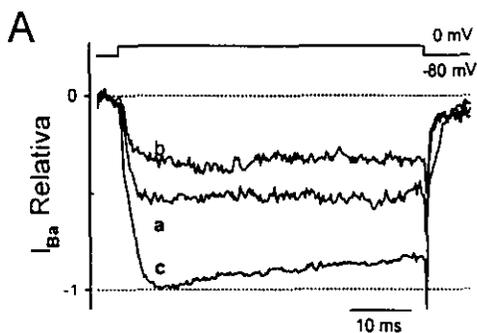


Figura 4. Estimulación de la corriente de Ba^{2+} por la suspensión del tono dopaminérgico. A, Registro de la I_{Ba} bajo la acción tónica de DA (500 nM por 24 horas) (a); 1 minuto (b); y 10 minutos después de la suspensión del tono dopaminérgico (c). B, Curso temporal de la variación en la densidad de I_{Ba} provocada por la suspensión del tono dopaminérgico en células GH4C1/D2-DAR previamente cultivadas por 24 horas con DA (500 nM). Las células se sometieron a un pulso despolarizante a 0 mV por 50 ms; a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. El tiempo cero representa la densidad de corriente bajo la acción tónica de DA (control positivo). a, b, c, refieren a los trazos de corriente relativa correspondientes en A. * $p < 0.05$ vs control. Los números sobre las barras representan el número de células analizadas en cada intervalo temporal.

5. DISCUSION

En la naturaleza los híbridos son generalmente estériles, pero en la ciencia ocurre a menudo lo contrario.

Francis Crick

En el presente estudio, se investigaron los efectos de diversas acciones dopaminérgicas en células GH4C1/D2-DAR; particularmente aquellas que ejerce la suspensión del tono dopaminérgico sobre la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

El objetivo de este trabajo fué el de identificar qué conductancias de Ca^{2+} son sensibles a la manipulación dopaminérgica en este modelo celular reconstituido, así como evaluar su posible papel en la facilitación de la secreción de PRL inducida por secretagogos como TRH, ya que este fenómeno es desencadenado por el escape transitorio de la acción tónica de DA.

Los resultados obtenidos (fig. 1), muestran la habilidad de la DA para estimular una corriente rectificadora entrante de K^+ en células GH4C1/D2-DA, confirmando resultados y observaciones previas (Albert et al, 1990; Vallar et al, 1990) que apoyan la consistencia de los receptores heterogéneamente expresados en estas células para acoplar la vía de transducción de señales que previamente se ha demostrado es activada por la señal dopaminérgica en lactotrofos hipofisarios (Israel et al, 1987; Ingram et al, 1986) para inhibir la secreción de PRL.

Los presentes resultados también indican la expresión funcional de canales de Ca^{2+} HVA, sensibles a DHP's (canales tipo L) (fig. 3), en el mismo modelo celular. Estos canales juegan un papel fundamental en el influjo de Ca^{2+} del medio extracelular inducido por eventos de depolarización.

Las corrientes de Ca^{2+} aquí descritas, presentaron relaciones de corriente en función del voltaje similares a aquellas reportadas anteriormente para células GH3 y GH4C1, así como para lactotrofos bovinos y de rata; en los que el influjo de Ca^{2+} ocurre primordialmente a través de canales tipo L (Dubinsky et al, 1984; Lledo et al, 1990). Otro componente de la corriente macroscópica de Ca^{2+} dependiente de voltaje, aparente

mediado por canales tipo T, parece también estar presente en células lactotrópicas (Israel et al, 1987; Lledo et al, 1990).

Adicionalmente, estas observaciones muestran que tanto la asociación como la disociación de la DA de sus receptores afecta substancialmente la actividad de canales de Ca^{2+} sensibles a DHPs. La densidad de corriente a través de estos canales disminuyó progresivamente hasta en un 50% en células expuestas a DA. Este resultado es consistente con observaciones previas realizadas en lactotrofos hipofisarios (Lledo et al, 1990).

La magnitud de la inhibición de esta corriente varia directamente en función del tiempo de exposición a DA. La administración fásica de DA (1 min) provocó en estas células una disminución inmediata de la densidad de corriente del $27.7 \pm 0.22\%$ con respecto al control, mientras que en forma tónica, la inhibición fue del $56.6 \pm 0.7\%$.

Las curvas de relación corriente-voltaje de células en ausencia y presencia crónicas de DA, revela que la disminución en la corriente máxima observada en presencia de DA parece asentarse con el aumento en la hiperpolarización del potencial de mantenimiento, como es claro al comparar las curvas I-V obtenidas a partir de -40 y -80 mV. Este resultado sugiere que la DA ejerce sus efectos principalmente sobre la población de canales HVA presentes en estas células.

Los canales tipo L están claramente activos a -80 mV, pero comienzan a inactivarse desde -40 mV. Esto podría explicar la diferencia en la magnitud de la corriente observada a ambos potenciales de mantenimiento.

Por su parte, la suspensión del tono dopaminérgico parece ejercer un efecto bifásico sobre la corriente macroscópica de Ca^{2+} . A tiempos cortos, la densidad de corriente de Ca^{2+} sufrió un rápido decremento al que siguió de un marcado y tardío aumento de la misma en respuesta a la suspensión de DA. Un incremento del 100% se observó inicialmente alrededor de los 10 minutos posteriores a la aplicación del estímulo mencionado, y tuvo una duración aproximada de 30 minutos.

Un segundo aumento en la densidad de corriente de magnitud similar se observó 24 horas después de la suspensión de la acción tónica inhibitoria de la DA.

Está bien establecido, que la DA, actuando a través de receptores D2 es el principal regulador de la liberación de PRL (Martínez de la Escalera & Weiner, 1992). Cambios cíclicos en la concentración de DA en sangre portal de ratas hembras se observan paralelos a cambios recíprocos en las concentraciones de PRL en sangre sistémica (Martínez de la Escalera & Weiner, 1992). Mena y Gonsevor (Grosvenor et al, 1980) fueron los primeros en postular una posible facilitación provocada por la suspensión del tono dopaminérgico, basada en la observación de que disminuciones en la concentración de DA asociadas al estímulo de la succión facilitaba la liberación de PRL estimulada por TRH y otros factores liberadores. De esta observación, se demostró que una breve caída en los niveles de DA en sangre portal (de Greef et al, 1981; Plotsky et al, 1982), el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos en ratas hembras (Haisenleder et al, 1990), y la suspensión breve de la perfusión de DA a fragmentos hipofisarios (Fagin et al, 1981) o células adenohipofisarias dispersas (Martínez de la Escalera & Weiner, 1988; Martínez de la Escalera et al, 1988) resultan en una marcada potenciación de la secreción de PRL en respuesta a la acción de TRH.

El mecanismo de acción involucrado en este acoplamiento potenciador o facilitador de los efectos de TRH inducidos por la señal de la disociación del complejo DA-receptor no ha

sido aun completamente elucidado. Muchas evidencias apuntan hacia una participación fundamental de canales de calcio tipo L en el proceso, ya que la secreción de PRL es dependiente de Ca^{2+} (Ronning & Martin, 1986), y es fuertemente modulada por la manipulación farmacológica del influjo de iones Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje en la membrana plasmática (Enyeart et al, 1985).

Aunado a esto, la tasa de liberación espontánea de PRL de lactotopos individuales se relaciona positivamente con la densidad de canales de Ca^{2+} tipo L presentes en la membrana plasmática de los lactotopos (Cota et al, 1990).

De la misma forma, el mecanismo de acción de TRH, sugiere que la modulación positiva de los canales de Ca^{2+} podría tener consecuencias funcionales importantes en el acoplamiento de los efectos de TRH. Este péptido hipotalámico provoca depolarizaciones dependientes de Ca^{2+} en los lactotopos (Israel J.M., et al, 1990) e incrementa las concentraciones intracelulares de este ion en dos fases sucesivas claramente distinguibles (Gershengorn, 1986). Una liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, dependiente de inositol-trifosfato (IP3) (Martin, 1983), es seguida por una entrada sostenida de este ion del medio extracelular (Björö et al, 1990). El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular evocado por TRH y la secreción de PRL son boqueadas por antagonistas, orgánicos e inorgánicos de canales de Ca^{2+} , y son estimulados por BAY K 8644, agonistas de canales de Ca^{2+} tipo L (Enyeart et al, 1987). Dado que el Ca^{2+} citosólico parece ser el segundo mensajero mas importante en el acoplamiento entre los eventos de depolarización inducidos por TRH y la liberación de PRL (Sato et al, 1992), las señales que afecten la actividad de canales de Ca^{2+} tipo L debieran modular la magnitud de la secreción estimulada por este secretagogo.

La naturaleza de las vías o mecanismos de transducción de señales asociadas a receptores D2-DAR sugiere también la participación de los canales de Ca^{2+} en la potenciación de la secreción de PRL observada en respuesta al escape transitorio del tono dopaminérgico. La formación del complejo DA-receptor provoca disminuciones claras en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Malgaroli et al, 1987) a través de la activación de una conductancia de K^+ lo que a su vez resulta en la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de los lactotopos. Esta hiperpolarización disminuye la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y suprime los potenciales de acción, que en estas células son dependientes de Ca^{2+} (Israel et al, 1987, Gregerson, et al, 1989).

Datos presentes en la literatura muestran que dicha hiperpolarización, precede a aumentos importantes en la corriente macroscópica de Ca^{2+} (Gregerson et al, 1994, Israel et al, 1985). Al parecer este evento es critico para el desarrollo de fenómenos como el rebote de secreción subsecuente a la suspensión dopaminérgica, aun en ausencia de estimulación con TRH (Gregerson et al, 1994). La utilización de fármacos como Valinomicina, que directamente hiperpolariza la membrana celular, mimetiza los efectos de la DA, inhibiendo la secreción de PRL durante su aplicación, y estimulando la liberación después del lavado.

El tratamiento con altas concentraciones de K^+ extracelular, impide el efecto hiperpolarizante de la administración de DA o valinomicina, aun en presencia de ambos factores, y bloquea tanto la inhibición como el rebote de secreción de PRL observado posteriormente a la suspensión dopaminérgica (Gregerson, et al, 1994).

La estimulación consistente de la corriente rectificadora entrante de K^+ reportada en el presente trabajo puede relacionarse con la acción hiperpolarizante asociada a la unión de la DA con su receptor. Esta corriente presenta dos características importantes: esta

claramente activa a voltajes hiperpolarizantes, y tiene una elevada sensibilidad al Ba^{2+} ; lo que podría indicar la participación de un canal rectificador entrante de K^+ asociado a proteínas G

Los episodios de hiperpolarización de la membrana se han relacionado con disminuciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} (Albert & Tashjian, 1984; Gershengorn & Thaw, 1985). Esta disminución, observada en presencia de DA, involucra también la inhibición de corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Lledo, 1990). Aun no es claro si la modulación ejercida por la activación de receptores D2 sobre estos canales de Ca^{2+} ocurre en forma directa o está mediada por una cascada de señales intracelulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran evidencia de que el voltaje constituye un factor principal en la modulación dopaminérgica.

Un periodo de mayor actividad eléctrica es característica de la recuperación de la hiperpolarización inducida por DA, (Gregerson et al, 1994, 1995, Israel, Kirk & Vincent, 1987). Las células GH4C1/D2-DAR presentan un potencial de membrana en reposo cercano a los -40 mV. En este sentido, la hiperpolarización establecida por la acción dopaminérgica pudiera involucrar la remoción de la inactivación de los canales HVA, tipo L, contribuyendo así al aumento en la corriente de Ca^{2+} subsecuente a la despolarización de la membrana.

A pesar de que la conductancia de estos canales en condiciones de salinidad fisiológicas es relativamente pequeña (~ 60 iones/ms a 0mV) y de que presentan un promedio de apertura breve (~ 1 ms), estos canales son muy eficientes para elevar la concentración de Ca^{2+} intracelular (Schlegel, W., et al, 1987, Armstrong et al, 1990). Por esta razón pequeños cambios en la frecuencia o duración de la apertura de los canales pueden tener efectos importantes en los sistemas de señalización intracelular que dependen de Ca^{2+} .

En nuestro grupo de trabajo se demostró previamente que la disociación de la DA de receptores D2 activa a la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (Martínez de la Escalera & Weiner, 1988), con la consecuente activación de las proteínas cinasas A (pkA) y C (pkC). Los canales de tipo L son regulados por fosforilación mediada por pkA (Armstrong & Eckert, 1987; Curtis & Catterall, 1985) y pkC (O'Callahan et al, 1988), lo que provoca aumentos en su probabilidad de apertura (Mundiña-Weilenmann et al, 1991).

La potenciación de la secreción de PRL en respuesta a la suspensión de la acción tónica de DA es bloqueada por inhibidores específicos de estas cinasas, y por antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo L como metoxiverapamil y nifedipina, mientras que el mismo efecto se mimetiza con la administración de Bay K 8644 (Hernández et al, 1994), cuya forma de acción es análoga a la fosforilación del canal de Ca^{2+} .

En su conjunto estos datos nos llevan a proponer la hipótesis de que la señal de la suspensión de la acción tónica de DA modula la actividad de los canales de Ca^{2+} , provocando incrementos en el influjo de este ion, en respuesta a subsiguientes depolarizaciones de la membrana evocadas por la administración de secretagogos como TRH, produciendo así aumentos significativos en la cantidad de hormona secretada.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan evidencias de que los canales de Ca^{2+} HVA, particularmente tipo L representan la vía más importante para la entrada de Ca^{2+} acoplada a eventos de depolarización en células GH4C1/D2-DAR. Adicionalmente los datos obtenidos muestran la modulación funcional de la actividad de estos canales por DA. Mientras que la administración aguda de esta neurohormona provoca la disminución progresiva de la densidad de corriente macroscópica a través de canales de

Ca^{2+} . un patrón de activación complejo fué inducido por la señal de la suspensión del tono dopaminérgico. El escape de la inhibición tónica ejercida por DA provocó un rápido aunque transitorio aumento en la conductancia de Ca^{2+} , a la que siguió un incremento tardío de similar amplitud.

Las bases moleculares de esta regulación no han sido completamente determinadas. Aún así, es un hallazgo significativo el que la suspensión de DA activa la densidad de corriente de Ca^{2+} por un periodo aproximado de 30 minutos, después de un breve periodo de latencia.

El pico de aumento en la corriente de Ca^{2+} es paralelo, incluso temporalmente, a la facilitación de la respuesta secretora a TRH posterior a la suspensión del tono dopaminérgico observada en una variedad de condiciones fisiológicas (Martínez de la Escalera & Weiner, 1988; Martínez de la Escalera et al. 1988; Plotsky & Neill, 1982; Haisenleder, et al. 1990; Fagin & Neill, 1981).

Esta estimulación en la conductancia de Ca^{2+} es consistente con la modulación de la actividad de canales dependientes de voltaje por fosforilación de las subunidades α y β de los canales de Ca^{2+} , por la acción de proteínas cinasas A y C (Curtis & Cattrall, 1985; O'Callahan, et al. 1988). Dicho evento, provoca aumentos en su probabilidad de apertura, y consecuentemente un mayor influjo de Ca^{2+} a la célula (Mundiña-Weilenmann et al. 1991; Yoshida et al. 1992). Estos efectos no se han asociado con cambios obvios en las propiedades de la corriente que dependen del tiempo y del voltaje, lo que sugiere que las alteraciones en la densidad de corriente de Ca^{2+} pueden depender de cambios en el estado de fosforilación de los canales.

En este sentido, observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo muestran, que la suspensión de DA aumenta el grado de fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en lactotropos adenohipofisarios y en células GH4C1/D2-DAR, en un rango temporal consistente con el incremento en la conductancia de Ca^{2+} (Hernández ME, et al, en prensa).

La subunidad $\alpha 1$ contiene el sitio de unión a DHP's y constituye un componente esencial del canal, puesto que contiene también al poro y al sensor de voltaje. Esta subunidad presenta varias regiones consenso de serina y treonina, que corresponden a sitios de fosforilación, la mayoría localizadas en la porción citoplasmática, ubicada hacia la región carboxilo terminal. La fosforilación mediada por pK_A en los lactotropos es necesaria y suficiente para restaurar la actividad de los canales de Ca^{2+} previamente inactivados (Armstrong 1990; Dolphin, 1996). En cuanto a la fosforilación mediada por pK_C, existen ciertas controversias. Algunos grupos afirman que no hay evidencias de efectos directos de pK_C sobre la modulación de la apertura de este tipo de canales en células lactotrópicas (Armstrong, 1990).

Por otro lado, el efecto bifásico observado ante la eliminación del tono dopaminérgico, podría deberse a una acción dual de los sistemas de señalización intracelular evocados por la disociación de la DA de su receptor. Como se ha mencionado, esta señal provoca la activación de por lo menos dos vías de señalización intracelular mediadas por segundos mensajeros. Sin embargo, la velocidad con que se instaura la primera fase del efecto de la suspensión de DA, podría indicar la participación de una vía de señalización probablemente delimitada a la membrana, que no requiere de un segundo mensajero difusible. Existen pruebas en muchos sistemas, incluyendo a células lactotrópicas de la línea GH3, de que las proteínas G (en particular G_s y G_o), tienen efectos duales sobre la modulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y sensibles a DHPs, siendo

capaces de estimular por un lado la acción de un segundo mensajero, y por el otro, ejercer un efecto directo sobre la actividad del canal (Lutz Birnhaumer, et al, 1989).

Los resultados obtenidos en este trabajo, también muestran un aumento en la densidad de corriente de Ca^{2+} 24 horas después de la suspensión dopaminérgica. Este efecto tardío podría involucrar aumentos en el número total de canales de Ca^{2+} funcionalmente activos en la membrana celular, más que cambios a nivel unitario; implicando así una posible regulación de la expresión génica por la señal dopaminérgica. Se ha demostrado que la influencia tónica de DA produce decrementos en la expresión de canales de Ca^{2+} HVA en melanotropos (Cota, 1989). Sin embargo, las consecuencias funcionales de este efecto no son claras.

Otras maniobras experimentales parecen promover la expresión funcional de canales de Ca^{2+} HVA, particularmente tipo L en la membrana plasmática de células GH4C1. El tratamiento crónico con 1,25dihidroxicolecalciferol, un metabolito de la vitamina D3, amplifica el influxo de Ca^{2+} sensible a DHP's, del medio extracelular, provocado por depolarizaciones de la membrana (Tornquist & Tashjian, 1989).

El tratamiento de células GH3 por 6 días con EGF también incrementa en dos ordenes de magnitud la densidad de corriente de Ca^{2+} HVA (Meza et al, 1994). En forma similar al fenómeno de la facilitación de TRH ante el cese de la acción tónica de DA, la exposición breve y transitoria a DA produce eventos de secreción mayores a aquellos observados antes de la aplicación de DA (Denef et al, 1984). Este llamado "rebote" en la secreción parece involucrar también, la modulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, puesto que es prevenido por bloqueadores de Ca^{2+} (Chen et al, 1993; Gregerson et al, 1994). Este disparo repentino en la tasa secretora es precedido por la hiperpolarización de la membrana del lactotrofo como resultado de la activación de canales de K^+ (Israel et al, 1987; Gregerson et al, 1994), lo que se cree disminuye la proporción de canales de Ca^{2+} en estado inactivo (Ho et al, 1996). De esta forma, la subsecuente suspensión de la acción de DA podría inducir la recuperación del potencial de membrana en reposo acompañado de aumentos en la frecuencia de disparo de los potenciales de acción (Gregerson et al, 1994).

De manera general, este trabajo muestra que la suspensión de DA es una señal fisiológicamente significativa para estimular la densidad de corriente macroscópica que fluye a través de canales de Ca^{2+} HVA sensibles a DHPs en la línea lactotrófica GH4C1 transfectada con el receptor dopaminérgico D2.

Aún cuando las bases moleculares de la estimulación de estas corrientes de Ca^{2+} no han sido aún determinadas por completo, estos canales parecen ser un punto esencial en el control de la regulación de la secreción hormonal. Los presentes resultados permiten proponer la hipótesis de que el escape de la acción tónica de DA recluta canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Consecuentemente a la suspensión de la DA, un mayor número de canales de Ca^{2+} , presumiblemente HVA, tipo L, quedan disponibles para conducir Ca^{2+} en respuesta a una depolarización que puede ser inducida, entre otros factores, por TRH. El incremento en el influxo de Ca^{2+} podría entonces provocar aumentos en la concentración intracelular de este ion, por encima de aquella observada ante el mismo estímulo en células que no han sido expuestas previamente a la suspensión física del tono dopaminérgico. Este efecto provocaría a su vez, una mayor liberación de PRL. De esta forma, el resultado de la acción estimuladora del escape del tono dopaminérgico sobre la densidad de corriente HVA, sería un marcado aumento en la liberación de PRL, debido a un mayor influxo de Ca^{2+} durante los potenciales de acción inducidos por eventos de depolarización.

ABREVIATURAS

AMPC: Adenosin monofosfato cíclico
Cm: Capacitancia de membrana (pF)
DA: Dopamina
DI: Densidad de corriente (pA/pF)
DHP: Dihidropiridina
DGC: Diacil glicerol
GABA: Acido Gamma-aminobutírico
HVA: Canales iónicos activados por alto voltaje
Hp: Potencial de mantenimiento
IP₃: Inositol trifosfato
IKir: Corriente rectificadora entrante de K⁺
I_{max}: Corriente máxima
PIF: Factor inhibidor de PRL
PRF: Factor estimulador de la liberación de PRL
PRL: Prolactina
PKA: Proteína cinasa A
PKC: Proteína cinasa C.
TRH: Hormona Liberadora de Tirotrifinas
TSH: Hormona estimulante de Tiroides
TTX: Tetradotoxina
VDCCs: Canales de Ca²⁺ Dependientes de Voltaje
VIP: Péptido intestinal vasoactivo

7. BIBLIOGRAFIA

Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. 1994. Three types of Ca^{2+} channels trigger secretion with different efficacy in chromaffin cells. *Nature*. 367:72.

Albert PR and Tashjian AH 1984. Thyrotropin-releasing-hormone-induced spike and plateau in cytosolic free Ca^{2+} concentrations in pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 259:5827-5832.

Albert PR, Neve KA, Bunzow JR and Civelli O, 1989. Coupling of a cloned rat dopamine D2 receptor to inhibition of adenylylase and prolactin secretion. *J. Biol. Chem.* 265:2098

Albert PR, Tashjian AH, 1984. TRH-induced spike and plateau in cytosolic free Ca^{2+} concentrations in pituitary cells. *J Biol Chem* 259:5827/5832.

Armstrong D, Erxleben C, Kalman D, Lai Y, Nairn A, Greengard P, 1988. Intracellular calcium controls the activity of dihydropyridine-sensitive calcium channels through protein phosphorylation and its removal. *J. Gen. Physiol. Abst.* 92:10a.

Armstrong CM and Matteson DR, 1985, Two distinct populations of calcium channels in clonal lines of pituitary cells. *Science*. 227:65-67.

Armstrong, A, Eckert R, 1987. Voltage activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc. Natl Acad Sci.* 84:2518.

Armstrong A and Eckert R. 1987. Voltage activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:2518-2522.

Armstrong DL, et al. 1990. Calcium channels and phosphorylation. Annals New York Academy of Sciences.

Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. 1994. Three types of Ca^{2+} channels trigger secretion with different efficacy in chromaffin cells. *Nature*. 367:72.

Aizawa T, Hinkle PM. 1985. Differential effects of thyrotropin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, phorbol ester and depolarization in GH4C1 rat pituitary cells. *Endocrinology* 116:909-919.

Bauer CK, Meyerhorf W and Swartz JR 1990. An inward rectifying K^{+} current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. *J. Physiol.* 429:169-189.

Barros F, Delgado C, Maciá C and de la Peña P. 1991. Effects of hypothalamic peptides on electrical activity and membrane currents of patch perforated clamped GH3 anterior pituitary cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 279:1.

Bean, BP, Nowycky M C, Tsien RW, 1984, *Nature* 307:371-375.

Bean BP, 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 367-384.

Bean BP, 1989. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature (Lond)* 340: 153-156.

Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS and Porter JC 1977. Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinol.* 100:452.

Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL, Hoefler MT. 1980. Dopamine in hypophyseal portal blood: relationship to circulating PRL in pregnant and lactating rats. *Endocrinol.* 106:690-696.

Ben-Jonathan N. 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 6:564-589.

Ben-Jonathan N 1994. Regulation of prolactin secretion. In: Imura H. *The pituitary gland*. Raven Pres. New York. pp 261.

Birnbaumer L, et al, 1989. Identification of G-protein-gated and G protein-modulated ion channels. *Molecular basis for G protein action. Secretion and its control*. Rockefeller University Press.

Blabe CA, 1974 Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrus rats. *Endocrinology* 94:503-508.

Blaustein MP, , Goldman. 1968. The action of certain polyvalent cations on the voltage-clamp lobster axon. *J Gen. Physiol* 51: 279-291.

Burnet FR, Wakerley JB 1976 Plasma concentrations of prolactin and thyrotropin during suckling in urethane-anesthetized rats. *J Endocr.* 70:429-437.

Canonico PL, Valdenegro CA, McLeod RM 1982 Dopamine inhibits ³²Pi incorporation into phosphatidylinositol in the anterior pituitary gland of the rat. *Endocrinology* 111:347-349.

Carew MA and Mason WT 1995. Control of Ca²⁺ entry into rat lactotrophs by thyrotropin-releasing hormone. *J. Physiol.* 486:349-360.

Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F 1978, Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J Biol Chem* 256: 2244-2253.

Caron MG, Kilpatrick BF, McDonald WM 1985 The dopamine receptor of the anterior pituitary gland: involvement of a guanine nucleotide-sensitive agonist high

affinity form of the receptor in the mechanism of action of dopamine. En: Ben-Jonathan N, Bahr JM, Weiner RI (eds), Catecholamines as hormone regulators. Raven Press, New York, pp 89-103.

Catterall, WA, Seagar MJ, Takahashi, 1988. Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J Biol Chem* 263:3535.

Chang CF, Gutierrez C, Mundiña C., Hosey M, 1991. Difenidol sensitive calcium channels from skeletal muscle. II. Functional effects of differential phosphorylation of channel subunits. *J. Biol. Chem.* 25: 16395.

Chen CL, Amenomori Y, Lu KH, Voogt JL, Meites J 1970. Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 6: 220-227.

Chen C, Zhang J, Israel JM and Vincent JD (1993). Mechanism of the prolactin rebound after dopamine withdrawal in rat pituitary cells. *Am Physiol. Soc.* 265:E145-E152.

Chen, TC, Law B, Kondraytuk, Rossie, S, 1995. Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J Biol Chem.* 270:7750.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY and Van Tol HHM 1991. Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 207:277-286.

Cocchi D, Gil-Ad I, Parenti M, Stefanini E, Locatelli V, Muller E, 1980, Prolactin-releasing effect of a novel anti-dopaminergic drug, domperidone, in rat. *Neuroendocrinology* 30:65-69.

Cohen CJ and McCarthy RT. (1987). Nimodipine block of calcium channels in rat anterior pituitary cells. *J. physiol. Lond.* 387:195-225.

Cota G, Hiriart M, Horta J and Torres-Escalante JL. 1990. Calcium channels and basal secretion in single male rat lactotropes. *Am. J. Physiol.* 259:C949.

Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI, 1978. Dopamine and dihydroergocriptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. *Endocrinology* 103:302-309.

Cronin MJ, Weiner RI, 1979. 3H-spiroperidol binding to a putative dopamine receptor in sheep and steer pituitary and stalk median eminence. *Endocrinology* 104: 307-3012.

Cronin MJ, Faure N, Martial JA and Weiner RI 1980. Absence of high affinity dopamine receptors in GH3 cells: a prolactin-secreting clone resistant to the inhibitory action of dopamine. *Endocrinology* . 106:718-723.

Cronin MJ, Myers GA, MacLeod RM and Hewitt 1983. Pertusis toxin uncouples dopamine agonist inhibition of prolactin release. *Am J. Physiol.* 244:E499.

Curtis BM and Catterall WA 1985. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:2528-2532.

Denef, Baes and Schramme 1984. Stimulation of prolactine secretion after short term or pulsatil exposure to dopamine in superfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology.* 114:1371-1378.

de Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD, 1981. Dopamine levels in hypofiseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of stimulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 32: 229-233.

de Greef WJ and Visser TI, 1981. Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling induced release of prolactin. *J. Endocrinol.* 91:213-223.

de Greef WJ, Klootwijk W, Karels B, Visser TJ, 1985. Levels of dopamine and TRH in hypophyseal stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J Endocr* 105:107-112.

de Greef WF, Voogt PS, Visser TJ, Lamberts SWF, van der Schoot P, 1987. Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology* 117: 439-446.

Delbebe D, Dannies PS 1985, Stimulation of the adenosine 3', 5'-monophosphate and the Ca^{2+} messenger systems together reverse dopaminergic inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 117:439-446.

Denef C, Baes M, Schramme C, 1984. Stimulation of prolactin secretion after short term or pulsatile exposure to dopamine in superfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 114:1371-1378.

De Vlaming VL. 1979. Actions of prolactin among vertebrates. En: Barrington EJW, ed. *Hormones and evolution*. New York: Academic Press; 1979:561-642.

Dolphin AC. 1996. Facilitation of Ca^{2+} current in excitable cells. *Tins*. 19:35-43.

de Riemer SA, 1989. Functions for calcium channels in pituitary cells. En: Wra DW, Norman, RI, Hess P (eds). *Calcium channels: structure and function*. New York Academic Press USA, pp 413.

Drust DS, Martin TFJ, 1982. TRH rapidly and transiently stimulates cytosolic calcium-dependent protein phosphorylation in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* 257:7566-7573.

Dubinsky, J. M., Oxford GS. 1984. Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells. *J Gen Physiol*. 83:309-339.

Dunlap K, Holz GG, Lindgren A and Moore JW. 1989. Calcium channels that regulate neurosecretion. In: *Secretion and its control*. Edited by G.S. Oxford and C.M. Armstrong. New York: Rockefeller Univ. Press, 1989. p. 240-250.

Einhorn LC, Gregerson KA and Oxford GS. (1991). D2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: Whole-cell and single channel recording. *J. Neurosci.* 11:3727-3737.

Enjelbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, García-Sáinz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J, 1986. Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 261:4071-4075.

Enyeart JJ, Atzawa T and Hinkle PM. 1986. Interaction of dihydropyridine Ca^{2+} agonist Bay K 8644 with normal and transformed pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 250:C95.

Everett JW, 1954. Luteotrophic function of autografts on the rat hypophysis. *Endocrinology* 54:685-697.

Fagin KD and Neill JD. 1981. The effect of dopamine on thyrotropin-releasing-hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinol.* 109:1835-1840.

Fink G, Koch Y, Ben Aroya N 1982. Release of thyrotropin releasing hormones into hypophysial portalblood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Research* 243:186-189.

Fox AP, Nowycky C, Tsien RW, 1987. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J physiol (Lond).* 394: 149-172.

Friel D, Tsien, RW, 1989. Voltage-gated calcium channels: Direct observation of the anomalous mole fraction effect at the single channel level. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 5207-5211.

García DE, Cavalié A, Lux HD. 1994. Enhancement of voltage-gated currents induced by daily stimulation of hippocampal neurons with glutamate. *J. Neurosci.* 14:545-553.

García DE, Brown S, Hille B and Mackie K. 1998. Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 18:2834-2841.

Gershengorn MC, Thaw C. 1985. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in Gh3 cells. Further evidence that TRH mobilized cellular and extracellular Ca^{2+} . *Endocrinology* 116:591-596.

Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, Civelli O. 1989. Cloning of cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:9762-9766.

Gregerson KA, Einhorn L, Smith MM, Oxford GS. 1989. Modulation of potassium channels by dopamine in rat pituitary lactotrophs: a role in the regulation of prolactin secretion?. In: *Secretion and its control*. Edited by G.S. Oxford and C.M. Armstrong. New York: Rockefeller Univ. Press. 1989. p.123-141.

Gregerson KA. 1991. Dopamine-induced hyperpolarization of lactotrophs: primary mechanisms for inhibition of prolactin secretion. *Neuroendocrinol.* 52:161.

Gregerson KA, Chuknyiska R and Golesorkhi N. 1994. Stimulation of prolactin release by dopamine withdrawal: role of calcium influx. *Am. Physiol. Soc.* 267:E789-E794.

Grosvenor CE, Mena F, Whitword NS, 1979. The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. *Endocrinology* 104:372-376.

Grosvenor CE, Mena, Whitworth NS, 1980. Evidence that dopaminergic PIF mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretin during suckling in the rat. *Endocrinology* 106: 481-485.

Grosvenor CE, Mena F, 1980. Evidence that TRH and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107:863-868.

Grosvenor CE and Mena F 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinol.* 107:863-868.

Grosvenor CE, Goodman GT, Mena F, 1984. Control of the multiphase secretion of prolactin in the lactating rat. En: Mena F, Valverde C (eds) *Prolactin secretion: A multidisciplinary Approach*, Academic Press, Orlando FL, pp 275-296.

Hagiwara S, Ohmori H, 1983. Studies of single calcium channel in rat clonal pituitary cells. *J Physiol* 336: 649-657.

Haisenleder DJ, Moy JA, Lawson DM. 1990. The effects of dopaminergic antagonism by sulpiride on TRH and VIP induced prolactin release in nonsuckled lactating rats. *Life. Sci.* 46:1867.

Haisenleder DJ, Gala RR, Lawson DM 1991. The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in female rats during the estrous cycle. *Life Sciences* 48: 1911-1919.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

Harris GW. 1955. *Neural control of the pituitary gland*. Edward Arnold (Eds.) London.

Hernández ME, Clapp C, Torner L, and Martínez de la Escalera . (1994). Dopaminergic-escape potentiation of prolactin release may involve the activation of calcium channels by protein kinases A and C. *Endocrin.* 2:779-786.

Hess P, 1990. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci.* 13: 337-356.

Hille B.1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Chap. 4:83-114.

Hinkle PM, Tashjian AH, 1973. Receptors for TRH in prolactin producing rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 248: 6180-6186.

Hinkle PM, Kinsella PA, 1984. Regulation of TRH binding by monovalent cations and guanyl nucleotides. *J Biol Chem* 259: 3445-3449.

Ho MY, Kao J and Gregerson KA. 1996. Dopamine withdrawal elicits prolonged calcium rise to support prolactin rebound release. *Endocrin.* 137:3513-3521.

Hosey MM, Barhanin J, Schmid A, Vandaele S, Ptasienski J, O Callahan, Cooper C and Lazdunski. 1987. Photoaffinity labeling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylakylanine-sensitive calcium channels. 147:1137-1145.

Israel JM, Jaquet P and Vincent JD. 1985. The electrical properties of isolated human prolactin-secreting adenoma cells and their modification by dopamine. *Endocrinol.* 117:1448.

Israel JM, Kirk C and Vincent JD. (1987). Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophysial cells in lactotroph-enriched primary cultures. *J. Physiol. Lond.* 390:1-22.

Journet L, Homburger V, Pantoloni C, Priam M, Bockaert A, 1987. An islet-activating protein sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and TRH-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 262: 15106-15110.

Kidokoro Y, 1975. Spontaneous Ca action potentials in a clonal pituitary cell line and their relationship to prolactin secretion. *Nature Lond.* 258: 741-742.

Kostyuk PG, Mironov SL, Doroshenko PA, Panomarev VN, 1982. Surface changes on the outer side of mollusc neuron membrane. *J. Membr. Biol.* 70:171-179.

Kostuk PG, Mironov SL, Shuba, M, 1993. Two ion-selecting filters in the calcium channel of the somatic membrane of mollusc neurons. *J Membr. Biol.* 76: 83-93.

Lafond J, Collu R, 1986. Role of calcium and sodium ions in the inhibitory control of baseline and stimulated prolactin release. *Endocrinology* 119:2012-2017.

Lafond J, Ducharme JR, Collu R, 1986. Inhibition of prolactin release and blockade of adenohipofyseal cell cyclic AMP accumulation are two dissociable effects of dopaminergic and non-dopaminergic drugs. *Mol Cell Endocrinol* 44:219-227.

Lamberts SWJ, MacLeod RM, 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70: 279-318.

Lledo PM, Legendre P, Zhang J, Israel JM and Vincent JD. 1990. Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotrophs cells. *Neuroendocrinol.* 52:545.

Lledo PM, Israel JM and Vincent JD. 1990. A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium currents by dopamine in rat lactotrophs. *Brain Res.* 528:143-147.

Lledo PM, Israel JM and Vincent JD. 1991. Chronic stimulation of D2 dopamine receptors specifically inhibits calcium but not potassium currents in rat lactotrophs. *Brain. Res.* 558:231.

Malgaroli. A, Vallar L, Elahr FR, Pozzan T, Spada A and Maldolesi J. 1987. Dopamine inhibits cytosolic Ca^{2+} increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 262:13920-13927.

Martin TFJ, 1983 Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates the phosphodiester hydrolysis of polyphosphoinositides in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* 261:2918-2927.

Martin MC, Weiner RI, Monroe SE, Roberts JM, Licko V, Jaffe RB, 1984. Prolactin-secreting adenomas in women VII. Dopamine regulation of prolactin secretion. *J Clin Endo Metab* 59: 485-490.

Martínez de la Escalera G, Martin TFJ, Weiner RI. 1987 Phosphoinositide hydrolysis in response to the withdrawal of dopamine inhibition in enriched lactotrophs in culture. *Neuroendocrin.* 46:545-548.

Martínez de la Escalera G, Guthrie and Weiner RI. 1988. Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH not VIP: stimulation via Ca^{2+} /protein kinase C pathway. *Neuroendocrinol.* 47:38-45.

Martínez de la Escalera G and Weiner RI. 1988. Mechanisms by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinol.* 47:186-193.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI, 1988. Effect of dopamine withdrawal on activation of cyclase and phospholipase C in enriched lactotrophs. *Endocrinology* 123: 1682-1687.

Martínez de la Escalera G, Swearingen KC and Weiner RI. 1989. Superfusion and static culture techniques for the measurement of rapid changes in PRL secretion. *Methods. Enzimol.* 168:254-262.

Martínez de la Escalera G, Porter BW, Martin TFJ, Weiner RI 1989. Dopamine withdrawal and addition of TRH stimulate membrane translocation of PKC and phosphorylation of an endogenous 80 K substrate in enriched lactotrophs. *Endocrinology* 125: 1168-1173.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI, 1990. Transient dopamine withdrawal differentially potentiates TRH-induced release of prolactin of various ages. *Neuroendocrinology* 51: 694-702.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI. 1992. Dissociation of dopamine from its receptors as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocr. rev.* 13:241-255.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI, 1992 Hypothalamic regulation of microtubule-associated protein phosphorylation in lactotrophs. *Neuroendocrinology* 55: 327-335.

Meites J, Nicoll CS, Talwalker PK, 1963. The central nervous system and the secretion and release of prolactin. En: Nalbandov AV, (ed). *Advances in neuroendocrinology*. Urbana: University of Illinois Press, pp. 238-288.

Mena F, Enjalbert A, Carbonell L, Priam M, Kordon C, 1976. Effects of suckling on plasma and hypothalamic monoamine levels in rat. *Endocrinology* 99:445-451.

Mena F, Pacheco P, Grosvenor CE, 1980. Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma concentrations of prolactin in anesthetized lactating rats. *Endocrinology* 106: 458-462.

Mundiña-Weilenmann C, Rios JME and Hosey MM. 1991. 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, Chang CF, Gutierrez LM and Hosey MM. 1991. Demonstration of phosphorylation of the dihydropyridine-sensitive calcium channels in chick skeletal muscle and the resultant activation of the channels after reconstitution. *J. Biol. Chem.* 266:4067-4073.

Nagy GM, Neill JD, 1988. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 122: 364-366.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Nestler, EJ, Duman RS, 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.

Nowyky MC, Fox AP, Tsien RW. 1985. three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature.316:440-443.

Nunoki K, Florio V and Catterall WA. 1989. Activation of purified calcium channels by stoichiometric protein phosphorylation. proc. Natl. Acad. Sci. 86:6816-6820.

O Callahan CM, Ptasienski J and Hosey MM. 1988. Phosphorylation of the 165 KDa dihydropyridine/phenylalkylamine receptor from skeletal muscle by protein kinase C. J. Biol. Chem. 263:17342-17349.

Offermanns, S, Gollash M, Hescheler J, Spicher K, Schmid A, Schultz G, Rosenthal W, 1991. Inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} currents and activation of pertussis toxin sensitive G-proteins via muscarinic receptors in GH3 cells. Mol. Endocrinol. 5:995.

Ozawa S, Kimura N, 1982. Calcium channel and prolactin release in rat clonal pituitary cells: effects of verapamil. Am. J. Physiol 243 (Endocrinol. Metab. 6): E68-E73.

Ozawa S, Sand O, 1978. Action potentials in non tumor pituitary gland. Experientia 34: 542-543.

Ozawa S, Sand O, 1978. Electrical activity of rat anterior pituitary cells in vitro. Acta Physiol. Scand. 102: 330-341.

Pan JT and Main LM. 1990. Dopamine antagonism does not potentiate the effects of oxytocin and vasopressin on prolactin secretion. Life Sci. 46:2443-2449.

Pasteels JL, 1961. Secretion de prolactine par l'hypophyse en culture de tissus. CR Acad Sci Ser D 253:2140-2148.

Pasteels JL. 1963. Recherches morphologiques et experimentales sur la sécrétion de prolactine. Arch Biol 74:439-553.

Pean BP. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu. Rev. Physiol. 51:367.

Plotsky PM and Neill JD. 1982. Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. Endocrinol. 111:168-173.

Rebecchi MJ, Kolesnick RN, Gershengorn MC, 1983. TRH stimulates rapid loss of phosphatidylinositol and its conversion to 1,2 diacylglycerol and phosphatidic acid in rat mammatropic pituitary cells. J Biol Chem 258:227-234.

Reskind PN, Millard WJ, Martin JB, 1984 Evidence that the TRH is not a major prolactin-releasing factor during suckling in the rat. Endocrinology 115: 312-316.

Reuter H. 1987. Modulation of ion channels by phosphorylation and second messengers. News Physiol Sci 2: 168-171.

Samson WK, Martin L, Mogg RJ, Fulton RJ, 1990. A nonoxytocinergic prolactin releasing factor and a nondopaminergic prolactin inhibiting factor in bovine neurointermediate lobe extracts. En: In vitro and in vivo studies. Endocrinology 126: 1610-1617.

Samson WK, Skala KD, 1992. Comparison of the pituitary effects of the mammalian endothelins: vasoactive intestinal contractor (endothelin- β , rat endothelin-2) is a potent inhibitor of prolactin secretion. Endocrinology 130: 2964-2970.

Schofield JC. 1983. Use of a trapped fluorescent indicator demonstrate effects of thyroliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. FEBS Lett. 159:79-82.

Schrey MP, Clark HJ, Franks S, 1986. The dopaminergic regulation of anterior pituitary $^{45}\text{Ca}^{2+}$ homeostasis and prolactin secretion. *J Endocr* 108: 423-429.

Seabrook GR, Patel S, Marwood R, Emms F, KNOWles MR, Freedman SB and McAllister G. 1992. Stable expression of human D3 dopamine receptors in GH4C1 pituitary cells. *FEBS*. 312:123.

Senogles SE. 1994. The D2 dopamine receptor mediates inhibition of growth GH4ZR7 cells: Involvement of protein kinase-C α . *Endocrinol*.134:783.

Simasko SM. 1991. Reevaluation of the electrophysiological actions of thyrotropin-releasing hormone in a rat pituitary cell line (GH3). *Endocrinol*. 128:2015.

Simmonds SH, Strange PG, 1985. Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neuroscience Letters* 60: 267-271.

Sinha YN, 1992. Prolactin variants. *Trends Endocrinol Metab*. 3:100-106.

Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC 1990. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9514-9518.

Swearingen KC, artinez de la Escalera G, Weiner RI 1990. Episodic prolactin release after removal of dopamine inhibition in vitro. *Bol Estud Biol Mex* 38 43-48.

Tan K, Tashjian AH, 1984. Voltage-dependent calcium channels in pituitary cells in culture. I. Characterization of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fluxes. *J Biol Chem* 259:418-426.

Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S, 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature (London)* 328: 313-318.

Taraskevich PS, Douglas WW, 1978. Catecholamines of supposed inhibitory hypophysiotropic function suppress action potentials in prolactin cells. *Nature (London)* 276:832-834.

Tashjian A.H. Jr, Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML, 1968. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology*. 82: 342-352.

Tashjian AH, Barowsky NJ, Jensen DK 1971. Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 43:516-523.

Thorner MO, Hackett JT, Murad F, MacLeod RM, 1980. Calcium rather than cAMP as the physiological intracellular regulator of prolactin release. *Neuroendocrinology* 31: 390-402.

Tornquist K, Tashjian AH, 1990. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate decreases influx of extracellular Ca^{2+} induced by depolarization in GH4C1 cells: effects of pretreatment with 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Endocrinology* 126: 2068-2078.

Tsien WR, Giles W, Greengard P, 1972. Cyclic AMP mediates the action of adrenaline on the action potential plateau of cardiac Purkinje fibres. *Nature, New Biol.* 240: 181-183.

Tsien WR, 1983. Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 45: 341-358.

Tsien WR and Tsien RY. 1990. Calcium channels, stores and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:715-760.

Tsien RW, Hess EW, McCleskey, Rosenberg RL, 1987. Mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16:265-290.

Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Maldolesi J and Civelli O. 1990. Differential coupling of Dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. *J. Biol. Chem.* 265:10320.

Villalobos C and García-Sancho 1995. Capacitive Ca^{2+} entry contributes to the Ca^{2+} influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Plügers Arch.* 430:923.

Weiner RI, Findell PR, Kordon C. 1988 Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En Knobil E, Neill (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 1235-1281.

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

Yoshida A, Takahashi M, Nishimura S, Takeshima H, Kokubun S 1992. Cyclic AMP-dependent phosphorylation and regulation of the cardiac dihydropyridine-sensitive Ca channel. *FEBS Lett.* 309:343-349.