

03068



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

8

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

24

## CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

DESACOPLE FUNCIONAL ENTRE EL INCREMENTO  
EN LA  $[Ca^{2+}]_i$  Y LA SECRECIÓN DE  
GONADOTROPINAS EN LA LÍNEA CELULAR  $\alpha$ T3-1

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

CITLALI TRUETA SEGOVIA

Tutor: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

- Comité tutorial:
- Dr. Luis Vaca Domínguez
  - Dr. Mauricio Díaz Muñoz
  - Dr. Rogelio Arellano Ostoa
  - Dr. David García Díaz

Juriquilla, Querétaro  
1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

26 2780



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, en el laboratorio del Dr. Mauricio Díaz Muñoz del Centro de Neurobiología de la U.N.A.M. y en el laboratorio del Dr. Luis Vaca en el Instituto de Fisiología Celular, con el apoyo de una beca de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la U.N.A.M. durante el período de febrero de 1996 a enero de 1998.

## AGRADECIMIENTOS

- A Gonzalo, por todo lo que he aprendido de él, tanto de la ciencia como de la vida, por su apoyo, su paciencia, su cariño y sus agradables pláticas.

-A Ana, Zulma y Luz por su gran ayuda con la inmunoprecipitación y por su amistad y cariño, y por todos los momentos que hemos compartido juntas y espero que sigamos compartiendo.

-A Gabriel, Gino, Alejandra, Luis y Eileen, por su apoyo de siempre en el laboratorio y por crear un ambiente de trabajo tan agradable.

-Al Dr. Mauricio Díaz y al Dr. Luis Vaca por, su gran ayuda en la realización de los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -Ryanodina y  $^3\text{H}$ -IP3 y las determinaciones de calcio intracelular, respectivamente, y por su importante aporte en la discusión de los avances del proyecto, su paciencia y sus agradables conversaciones.

- Al Dr. Rogelio Arellano por sus valiosos comentarios a lo largo de la realización de este trabajo y por su cariño de siempre.

-Al Dr. David García y al Dr. Jesús García Colunga por sus valiosos comentarios sobre esta tesis.

-A la Dra. Sofía Díaz Miranda y al Dr. Flavio Mena por el apoyo que siempre he recibido de ellos durante la realización de mi maestría.

-A mis padres por su apoyo y amor de siempre, por soportar mis ratos malos y compartir los buenos y ayudarme siempre en todos los aspectos de mi vida.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. Importancia de la secreción como mecanismo de comunicación.	3
I.2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas: ejemplo de regulación de la secreción por factores endocrinos.	5
I.2.1 Funcionamiento del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas.	6
I.3 El calcio como acoplador en el proceso estímulo-secreción.	8
I.3.1 Mecanismos de acción del calcio en el acoplamiento estímulo-secreción.	11
I.3.2 Mecanismos de regulación de la concentración de calcio intracelular en células excitables.	13
I.4 Gonadotropos: un modelo para el estudio de la regulación de la secreción.	18
I.4.1 Mecanismo de acción de la GnRH en la secreción de gonadotropinas.	19
I.5 Células $\alpha$ T3-1: un modelo para el estudio de los gonadotropos.	26
I.5.1 Antecedentes inmediatos (resultados preliminares).	
I.6 Planteamiento del problema.	29
II. OBJETIVOS.	30
III. MATERIALES Y METODOS	30
III.1. Cultivo celular.	30
III.2 Ensayos de unión específica de $^3\text{H}$ -ryanodina y de $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3 a membranas de la fracción microsomal de las células $\alpha$ T3-1.	31

III.2.1 Obtención de la fracción microsomal de membranas de las células $\alpha$ T3-1.	31
III.2.2 Ensayos de unión con $^3\text{H}$ -ryanodina.	32
III.2.3 Ensayos de unión con $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3.	33
III.3. Determinación de la secreción hormonal con la técnica de precipitación de proteínas totales marcadas con $^{35}\text{S}$ -met y $^{35}\text{S}$ -cys.	34
III.4. Determinación de la viabilidad celular después de los tratamientos farmacológicos:	35
III.4.1 Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de incubación.	35
III.4.2 Reacción con MTT.	36
III.5 Inmunoprecipitación de la hormona $\alpha$ -glicoprotéica.	37
III.6 Determinación de la concentración de calcio intracelular mediante indicadores fluorescentes, utilizando como fluoróforo el INDO-1.	39
III.7 Estadística	41
 IV. RESULTADOS	 41
IV.1. Ensayos de unión específica de $^3\text{H}$ -ryanodina y de $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3.	41
IV.2. Efecto de distintos secretagogos sobre las células $\alpha$ T3-1.	43
IV.2.1 Ausencia de estimulación de la secreción por la Hormona Liberadora de Gonadotropinas y por la despolarización de la membrana plasmática.	44
IV.2.2 Estimulación de la secreción con ionomicina.	45
IV.2.3 Inmunoprecipitación de la hormona $\alpha$ -glicoprotéica.	45
IV.3 Determinaciones de la viabilidad celular después de los tratamientos farmacológicos.	46
IV.4 Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta GnRH, ionomicina y	

V. DISCUSIÓN.	53
VI. CONCLUSIONES.	63
VII. BIBLIOGRAFÍA.	64



## RESUMEN

La secreción es el mecanismo más importante para la comunicación entre las células de un organismo. En las células secretoras el calcio es de fundamental importancia en el acoplamiento estímulo-secreción. La hipótesis del calcio postula que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es necesario y suficiente para activar la secreción.

El acoplamiento estímulo-secreción ha sido muy estudiado en los gonadotropos de la hipófisis anterior, que sintetizan y secretan las hormonas gonadotropinas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica. La estimulación de los receptores a GnRH en los gonadotropos activa la producción de IP3, con la consecuente liberación de calcio de las pozas intracelulares. La GnRH además, produce un influxo de calcio proveniente del medio extracelular por medio de canales dependientes de voltaje. Estas respuestas causan un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que lleva a la secreción de las gonadotropinas.

El estudio de gonadotropos en cultivos primarios resulta difícil debido a que estas células constituyen una proporción pequeña de la población celular total de la hipófisis y además no se pueden dividir en cultivo. Estas dificultades han podido ser resueltas gracias al desarrollo de líneas celulares inmortalizadas. Una de ellas es la línea  $\alpha T3-1$ , que expresa únicamente la subunidad alfa de las hormonas glicoprotéicas, pero presenta receptores específicos para la GnRH acoplados positivamente a la producción de IP3. La activación de los receptores para GnRH en estas células causa un incremento bifásico en la concentración intracelular de calcio. La línea celular  $\alpha T3-1$  ha sido ampliamente utilizada para estudiar las vías de señalización intracelular acopladas al receptor de GnRH, así como la regulación de la expresión de los genes de la subunidad  $\alpha$  y de los receptores para GnRH. Sin embargo, la regulación de la secreción en estas células no ha sido estudiada. Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo mostraron que dos distintos estímulos, que se sabe elevan la  $[Ca^{2+}]_i$ , tenían sin embargo efectos muy distintos sobre la secreción: mientras que la GnRH no era capaz de estimularla, la ionomicina, un ionóforo de calcio, la estimulaba significativamente. Con base en estos resultados, se planteó como objetivo de este trabajo, caracterizar las respuestas tanto en secreción como en la  $[Ca^{2+}]_i$  a estos y otros tratamientos, y caracterizar también los receptores liberadores de calcio de las pozas intracelulares en estas células.

La determinación de la secreción por precipitación con TCA de proteínas totales marcadas con  $^{35}S$ , mostró que la incubación por 60

minutos con GnRH no tuvo ningún efecto sobre la secreción de proteínas en las células  $\alpha$ T3-1. Otros tratamientos que incrementan la concentración intracelular de calcio, como la despolarización por alto potasio o con veratridina, tampoco estimularon la secreción, y de hecho causaron una ligera inhibición. La determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en poblaciones celulares cargadas con el fluoróforo Indo-1, mostró que la GnRH produce una respuesta bifásica, que consiste en un pico rápido, seguido por una meseta ligeramente superior al nivel basal que se sostiene durante varios minutos. La amplitud de la respuesta es dependiente de la dosis de GnRH. El pico depende de la liberación de calcio de las pozas intracelulares, mientras que la meseta depende del influjo de calcio extracelular.

La caracterización de los receptores liberadores de calcio de las pozas intracelulares reveló la ausencia de cantidades detectables de receptores de ryanodina, y la presencia de receptores de IP3, saturables, con un solo sitio de unión, una  $K_d$  de 3.18 nM y una densidad de 50.5 fmoles/mg de proteína.

La despolarización por KCl 50 mM produjo un incremento rápido y sostenido en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que aparentemente depende de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. El hecho de que estos tratamientos que causan un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  no estimulen la secreción, sugiere que las células  $\alpha$ T3-1 presentan algún defecto en el acoplamiento entre estos estímulos y la secreción, que se encuentra en un nivel posterior al incremento de calcio intracelular.

Por el contrario, el tratamiento por 60 minutos con ionomicina, produjo una estimulación dependiente de la dosis en la secreción de proteínas al medio de incubación en las células  $\alpha$ T3-1, lo que demuestra que las células son responsivas, y capaces de secretar ante determinados estímulos. Las respuestas en calcio intracelular a ionomicina fueron muy similares a las observadas con GnRH: respuestas bifásicas, de amplitud dependiente de la dosis, cuyo componente rápido depende de la liberación de calcio de las pozas intracelulares, mientras que el componente sostenido depende del influjo de calcio del medio extracelular. La cantidad total de calcio involucrada en las respuestas a ionomicina y a GnRH en los primeros tres minutos no difirió significativamente, lo que sugiere que cuantitativamente no hay diferencias entre estas dos respuestas. Sin embargo, la respuesta a GnRH no fue suficiente para estimular la secreción, mientras que la de ionomicina sí. Esto sugiere que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  no es suficiente para activar la secreción y que debe existir alguna diferencia cualitativa entre las respuestas en calcio a ionomicina y a GnRH que no puede ser detectada con el método que se utilizó en este trabajo.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Importancia de la Secreción como mecanismo de comunicación.

La secreción es el proceso mediante el cual una sustancia sintetizada dentro de una célula es liberada al exterior de ésta, generalmente para poder ejercer una acción sobre otras células del organismo (en caso de la secreción endocrina), o bien para ser vertida al exterior del organismo y cumplir otras funciones (en este caso se habla de secreción exocrina, y no hablaremos de ella en el presente trabajo). En cuanto a la secreción endocrina, según las células blanco de la sustancia secretada, se habla de efectos de varios tipos: a) endocrinos, cuando la sustancia es vertida en el torrente sanguíneo o líquidos de transporte del organismo y ejerce una acción sobre células distantes al lugar de la secreción, b) parácrina, en la que la sustancia actúa sobre células vecinas a la secretora y c) autócrina, en la que la sustancia tiene efectos sobre la misma estirpe celular que la produjo.

En cualquier caso, la secreción es un mecanismo de gran importancia para la comunicación entre distintas células en el organismo, ya que las sustancias secretadas llevan un mensaje que regula las funciones de las células blanco y da información del estado de las células secretoras y del organismo en general. En los organismos pluricelulares la comunicación entre las distintas células es fundamental para el funcionamiento del mismo. Sin esta comunicación no sería posible la existencia de organismos pluricelulares, ya que es necesario que exista una integración de todas las funciones celulares para el funcionamiento adecuado y la supervivencia del organismo. La secreción, como mecanismo de comunicación intercelular desempeña

entonces un papel fundamental en el funcionamiento integral de los organismos pluricelulares.

La secreción entonces, es uno de los mecanismos más importantes de comunicación entre células y órganos, y de ella dependen una gran variedad de funciones fisiológicas, entre las que se encuentran, sólo por mencionar algunas, el metabolismo, la proliferación y diferenciación celular, la transmisión de señales nerviosas, la contracción muscular, la reproducción, etc.

La secreción se puede llevar a cabo de distintas maneras, dependiendo de la naturaleza de la sustancia secretada. Si ésta es liposoluble, puede atravesar la membrana de la célula que la sintetiza y salir de esta manera al medio circundante. En cambio, si es hidrofílica, no puede atravesar por sí misma la membrana celular, y para salir de la célula necesita ser empacada dentro de vesículas membranales. Estas vesículas, ante un estímulo adecuado, se fusionan con la membrana plasmática, liberando así su contenido al exterior celular. Este proceso es conocido como exocitosis, y es el mecanismo que emplean las células para secretar las hormonas de naturaleza proteica, así como una gran variedad de neurotransmisores y neuromoduladores.

La exocitosis es un proceso muy complejo, que involucra el empaquetamiento de la sustancia que se va a secretar en las vesículas membranales, el transporte de éstas hacia la membrana plasmática, y su fusión con ella. Todo el proceso es finamente regulado por mecanismos intracelulares que se desencadenan en respuesta a un estímulo determinado. Este estímulo externo, debe ser traducido por la célula secretora para desencadenar el proceso de exocitosis, de manera que ocurra el acople del estímulo con la secreción.

## 2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas: ejemplo de regulación de la secreción por factores endocrinos.

Uno de los ejemplos más claros de comunicación y regulación a través de la secreción hormonal está representado en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La comunicación entre los elementos de este eje permite el control central de la reproducción en todos los vertebrados. En cada una de las partes de este eje, se puede ver a su vez cómo la integración de estímulos y su acoplamiento con la secreción mantienen al sistema informado del funcionamiento del mismo, así como de señales externas, lo cual permite que siga funcionando de forma coordinada con el estado general del organismo.

En el control de la reproducción interviene una gran cantidad de órganos del sistema neuroendócrino, que establecen complejas redes de comunicación. Sin embargo, el control central de las funciones reproductivas reside en ciertos elementos que se encuentran en la base del cerebro y en la hipófisis, por lo que, para simplificar su estudio, se habla de un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en el cual cada uno de los órganos mencionados regula al siguiente mediante la secreción de hormonas y además existen asas de retroalimentación tanto positiva como negativa a todos los niveles, que informan al sistema del grado de funcionamiento del mismo.

### 2.1 Funcionamiento del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadas.

La reproducción en todos los organismos está regulada por factores tanto externos (como la duración del día, la disponibilidad de alimento, la receptividad de los organismos del sexo opuesto, etc.) como

internos (entre las que se encuentran el metabolismo, el peso, la cantidad de grasa, las emociones y algunos otros), que convergen a través de la secreción de neuromediadores y neuromoduladores, en una vía final común de integración, que son las células GnRHérgicas en el hipotálamo. La integración de todos los estímulos que reciben estas células tiene como resultado la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el sistema portal hipotálamo-hipofisario a través de terminales axónicas en la eminencia media. Por medio del sistema porta, este factor liberador es transportado a la hipófisis anterior, donde actúa sobre sus células blanco, los gonadotropos, en los que estimula tanto la síntesis como la secreción de las gonadotropinas (hormona luteinizante o LH y hormona estimulante de los folículos o FSH) a la circulación sistémica. De esta forma, la señal hipotalámica es amplificada varias veces, ya que una molécula de GnRH es capaz de facilitar la liberación de varias moléculas de gonadotropinas. Aunque la GnRH estimula la liberación de ambas gonadotropinas, aparentemente es más potente para estimular la liberación de LH que la de FSH (Clark y Cummins, 1982).

Al parecer, la liberación pulsátil de la GnRH es necesaria para la respuesta adecuada de la hipófisis, ya que la administración continua de GnRH a células hipofisarias de rata en perfusión abate la secreción de LH y FSH (Smith y Vale, 1981)

La LH es secretada por la hipófisis también en forma pulsátil, en respuesta a los pulsos de GnRH. En la oveja, los pulsos de LH presentan una clara sincronía temporal así como una buena correlación en amplitud con los de GnRH (Clarke y Cummins, 1982; Levine et al., 1982).

Se ha observado que, después de una pequeña dosis de GnRH, los gonadotropos presentan una respuesta mucho mayor a una segunda

dosis, es decir, la GnRH tiene un efecto facilitador o potenciador (*priming effect*) sobre los gonadotropos. Para explicar este efecto, se ha propuesto que se da un cambio de orientación de los microfilamentos lo cual provoca una migración de los gránulos de gonadotropinas hacia zonas cercanas a la membrana, de donde pueden ser liberados más fácilmente en respuesta a una segunda estimulación (Fink, 1988).

Este trabajo se centrará en la regulación que ejerce la GnRH sobre la liberación de las gonadotropinas en la hipófisis, por lo que hablaremos de este aspecto con mayor detalle más adelante.

Una vez secretadas a la circulación sistémica, las gonadotropinas, viajan hasta sus órganos blanco, que son las gónadas. Las células de las gónadas tienen receptores para la LH y la FSH, las cuales modulan distintas funciones en estos órganos. La FSH actúa en el testículo sobre las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis, mientras que la LH actúa principalmente sobre las células de Leydig, donde estimula la producción de testosterona y estradiol. En el ovario, la FSH estimula a las células de la granulosa para inducir el desarrollo de los folículos y la síntesis de estradiol, además de aumentar la capacidad de respuesta a la LH en estas células. La LH a su vez, promueve la ovulación mediante la degradación del folículo de Graaf por medio de la activación de proteasas séricas y además estimula a las células de la granulosa, a las de la teca y a las células lúteas, donde promueve la síntesis de estradiol, progesterona y testosterona. En las gónadas, la señal secretora iniciada en el hipotálamo y en la hipófisis, se amplifica aún más, ya que cada molécula de LH y de FSH es capaz de estimular la liberación de varias moléculas de las hormonas esteroideas.

Los esteroides sexuales secretados por las gónadas en respuesta a las gonadotropinas, tienen efectos sobre las mismas gónadas,

principalmente en la regulación de la gametogénesis, y además tienen una gran cantidad de efectos extragonadales, entre ellos la coordinación de cambios en el útero, vagina y glándulas mamarias en la hembra como preparación para la cópula, fertilización e implantación, la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la modulación de la conducta y la libido a nivel del sistema nervioso central, etc. Los esteroides gonadales además, ejercen asas de retrocontrol tanto positivo como negativo a nivel hipotalámico e hipofisario, regulando así directa o indirectamente la secreción de GnRH y gonadotropinas.

### 3. El calcio como acoplador en el proceso estímulo-secreción.

El calcio es considerado como un segundo mensajero universal, que interviene en la regulación de una gran diversidad de funciones celulares entre las que se encuentran la transcripción de algunos genes, la contracción muscular, y en particular la secreción tanto de hormonas en las células endocrinas como de neurotransmisores en el sistema nervioso. La liberación del contenido vesicular por exocitosis se ha convertido en el proceso más estudiado en el que se ha establecido el papel crucial que juega el calcio como el elemento activador y controlador del proceso.

El conocimiento del papel del calcio en el acoplamiento estímulo-secreción surgió a partir de los estudios sobre liberación cuántica de transmisores en la placa neuromuscular, realizados por Bernard Katz y sus colegas a lo largo de varios años (Katz, 1969). Esta visión fue extendida a otras células excitables, como las células cromafines y las beta



principalmente en la regulación de la gametogénesis, y además tienen una gran cantidad de efectos extragonadales, entre ellos la coordinación de cambios en el útero, vagina y glándulas mamarias en la hembra como preparación para la cópula, fertilización e implantación, la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la modulación de la conducta y la libido a nivel del sistema nervioso central, etc. Los esteroides gonadales además, ejercen asas de retrocontrol tanto positivo como negativo a nivel hipotalámico e hipofisario, regulando así directa o indirectamente la secreción de GnRH y gonadotropinas.

### 3. El calcio como acoplador en el proceso estímulo-secreción.

El calcio es considerado como un segundo mensajero universal, que interviene en la regulación de una gran diversidad de funciones celulares entre las que se encuentran la transcripción de algunos genes, la contracción muscular, y en particular la secreción tanto de hormonas en las células endocrinas como de neurotransmisores en el sistema nervioso. La liberación del contenido vesicular por exocitosis se ha convertido en el proceso más estudiado en el que se ha establecido el papel crucial que juega el calcio como el elemento activador y controlador del proceso.

El conocimiento del papel del calcio en el acoplamiento estímulo-secreción surgió a partir de los estudios sobre liberación cuántica de transmisores en la placa neuromuscular, realizados por Bernard Katz y sus colegas a lo largo de varios años (Katz, 1969). Esta visión fue extendida a otras células excitables, como las células cromafines y las beta

pancreáticas y pronto surgió la "hipótesis del calcio" en la que se consideró a este ion como el mecanismo universal de control en el acoplamiento estímulo-secreción (Douglas, 1968). Las observaciones cruciales que corroboraron esta hipótesis en la exocitosis fueron: 1) Se requiere calcio extracelular para producir la liberación de transmisores, 2) los canales de calcio activados por voltaje permiten el influjo de calcio a la célula, la magnitud del cual determina la cantidad de transmisor liberada, 3) procedimientos que elevan la concentración de calcio intracelular inducen la exocitosis, y el bloqueo del influjo de calcio inhibe la secreción (Katz y Miledi, 1967; del Castillo y Stark, 1952).

El concepto de que el calcio controla la exocitosis parecía aplicarse también a las células no excitables, que carecen de canales de calcio activados por voltaje. Esto se basó en las siguientes observaciones: 1) la estimulación antigénica de mastócitos o basófilos de rata depende de la concentración de calcio extracelular y es mimetizada por la entrada de calcio (Foreman, Hallett y Mongar, 1977), 2) la inyección de calcio en mastocitos induce secreción (Kanno, Cochrane y Douglas, 1973), 3) los ionóforos de calcio producen respuestas secretoras en mastocitos (Cochrane y Douglas, 1974; Penner y Neher, 1988a), células RBL (Beaven et al., 1987), neutrófilos (Rubin, Sink y Freer, 1981) y plaquetas (Feinman y Detwiler, 1974). Además, estudios que utilizan indicadores fluorescentes de calcio han mostrado incrementos en la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en respuesta a la estimulación con secretagogos en prácticamente todos los tipos de células no excitables investigados (Tsien, Pozzan y Rink, 1984). Ahora se sabe que en el caso de las células no excitables, la fuente principal de calcio son los depósitos intracelulares de este ion, liberados por segundos mensajeros, y no el calcio extracelular. En las células no excitables el

calcio extracelular es necesario sobre todo para rellenar las pozas intracelulares de calcio. En este caso el calcio liberado de los depósitos intracelulares es considerado como un "tercer mensajero" (Penner y Neher, 1988 b).

A partir de todas estas observaciones, se consideró durante las últimas décadas que el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que ocurre en las células secretoras como respuesta a diferentes estímulos que activan la secreción es necesario y suficiente para producir la exocitosis en todas las células capaces de llevar a cabo esta función. Sin embargo, estudios recientes en células no excitables, sugieren que el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  no es necesario ni suficiente para activar la exocitosis, ya que se ha observado que la exocitosis se produce aun con niveles basales de calcio intracelular, y que en algunos casos, la elevación en la  $[Ca^{2+}]_i$  no produce secreción (Penner y Neher, 1988 a, b).

En las células excitables, por el contrario, la hipótesis del calcio sigue siendo aceptada como mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción.

### 3.1 Mecanismos de acción del calcio en el acoplamiento estímulo-secreción

Aunque el mecanismo por medio del cual el calcio produce el acoplamiento estímulo-secreción no ha podido ser completamente elucidado, se cree que por un lado puede participar en la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática y que puede además regular las interacciones entre las vesículas de secreción y algunos elementos del citoesqueleto. Dichas interacciones pueden ser

importantes en la regulación de la exocitosis, ya sea manteniendo las vesículas cerca de la membrana plasmática listas para su fusión con ésta (como en el caso de las terminales nerviosas), o previniendo el acceso de los gránulos secretores a la membrana plasmática hasta que se presente un estímulo adecuado para activarla (en el caso de las células endocrinas). Estas interacciones vesícula-citoesqueleto, son generalmente mediadas por proteínas que pueden ser citosólicas, del citoesqueleto, o proteínas integrales de la membrana de las vesículas de secreción.

Algunas proteínas citosólicas (como la sinapsina I en el caso de las neuronas) cuando se encuentran desfosforiladas se unen con una alta afinidad a la membrana de las vesículas de secreción y a los filamentos de actina del citoesqueleto, manteniendo las vesículas ancladas a éste e impidiendo así que se acerquen a la membrana. Por el contrario, cuando estas proteínas son fosforiladas, su afinidad por las vesículas disminuye notablemente, permitiendo así la translocación de éstas hacia la membrana plasmática. La fosforilación de estas proteínas es llevada a cabo frecuentemente por una cinasa dependiente de calcio-calmodulina, de modo que cuando aumenta la concentración de calcio por un estímulo externo, las vesículas pueden ser liberadas del anclaje al citoesqueleto, para acercarse a la membrana plasmática (Lindstedt y Kelly, 1987).

Otras proteínas reguladas por calmodulina como el caldesmón, a concentraciones bajas de calcio ( $0.1 \mu\text{M}$ ), se unen a los filamentos de actina, y pueden producir su entrecruzamiento. En presencia de concentraciones micromolares de calcio, la unión del caldesmón a los

filamentos de actina es inhibida, y el caldesmón se puede unir entonces reversiblemente a los gránulos de secreción. El incremento de calcio por la activación celular podría resultar en el desprendimiento del gránulo de los filamentos de actina y la unión del caldesmón a la vesícula podría regular interacciones con la membrana plasmática o con el citoesqueleto cercano a ésta y coadyuvar así a la exocitosis (Burgoyne, 1990). Se ha observado que los gránulos en células que se encuentran secretando activamente están unidos a la membrana por estructuras filamentosas. El caldesmón o proteínas relacionadas podrían estar involucradas en este tipo de uniones. La fodrina es otra proteína que podría también jugar un papel similar.

Se conocen también proteínas integrales de la membrana de las vesículas secretoras que pueden estar relacionadas con la exocitosis, como la SV2, la p65, la sinaptobrevina o la sinaptofisina. Estas proteínas pueden también unirse a calcio y a calmodulina . Se cree que la sinaptofisina puede estar involucrada en la formación del poro de fusión de las vesículas con la membrana celular (Burgoyne, 1990).

### 3.2 Mecanismos de regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células excitables

Dada la importancia de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la regulación de las funciones celulares, no es sorprendente que las células presenten diversos mecanismos para regular la concentración de este ion.

En condiciones fisiológicas, la concentración de calcio libre en el exterior celular es alrededor de cuatro órdenes de magnitud mayor que

en el interior. Dentro de la célula, sólo una pequeña parte del calcio está libre en el citosol, y la mayor parte se encuentra unido ya sea a proteínas citosólicas solubles, o a superficies membranales. La mayor parte del calcio está contenido dentro de compartimentos membranales, como las mitocondrias (Hehl et al., 1996), el complejo de Golgi, el núcleo y en particular el retículo endoplásmico, donde su concentración puede exceder varios milimoles por litro (Pozzan et al., 1997). En el citoplasma de la célula en reposo, la  $[Ca^{2+}]_i$  es mantenida en niveles basales más o menos estables (en un intervalo entre  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M) por mecanismos sensores que regulan dicha concentración, ya sea por medio del almacenamiento del  $Ca^{2+}$  en los depósitos intracelulares antes mencionados o de su transporte hacia el exterior celular por medio de bombas de calcio e intercambiadores  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática. Además existen canales de calcio tónicamente activos que contribuyen a la entrada de calcio y bombas e intercambiadores que sacan calcio de la célula en ausencia de estimulaciones eléctricas o químicas y ayudan a establecer la  $[Ca^{2+}]_i$  basal. El mantenimiento de la concentración basal de calcio citoplásmico es necesario para la homeostasis celular, ya que las concentraciones altas de  $Ca^{2+}$  durante un tiempo prolongado tienen efectos tóxicos para las células y pueden inducir la apoptosis (Schwartzman, R. y Cidlowski, J., 1993).

El almacenamiento del calcio dentro de las pozas intracelulares, principalmente el retículo endoplásmico, es realizado por enzimas ATPasas, que utilizando energía obtenida a partir de la hidrólisis del ATP son capaces de transportar el calcio en contra de su gradiente de concentración hacia el interior de la poza, en donde se alcanzan concentraciones de calcio muy elevadas gracias a la capacidad de "amortiguar" el calcio mediante su unión a proteínas del tipo de las

calsecuestrinas y las calreticulinas dentro del depósito (Pozzan et al., 1994). La actividad de la ATPasa de calcio es regulada por las concentraciones tanto citoplásmica como intraluminal de este ion y también por cinasas dependientes de calcio y calmodulina. La ATPasa de calcio del retículo endoplásmico puede ser inhibida farmacológicamente por un sesquiterpeno llamado thapsigargina.

Generalmente existe una fuga pasiva de calcio de las pozas intracelulares hacia el citoplasma, la cual es revertida por la ATPasa de calcio, que recaptura el ion en las pozas, de manera que si esta enzima es inhibida, hay una liberación pasiva de la poza intracelular, incrementándose la  $[Ca^{2+}]_i$  en el citoplasma (Pozzan et al., 1996).

Hemos dicho que la hipótesis del calcio sostiene que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por un estímulo adecuado en las células secretoras, acopla el estímulo con la secreción. Ahora bien, ¿cómo ocurre y cómo es regulado este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ ?

En las células excitables, el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a estímulos externos es regulado básicamente por dos mecanismos diferentes: por una parte, en la membrana plasmática existen canales de calcio dependientes e independientes del voltaje, que al abrirse permiten el flujo de este ion hacia el interior celular, a favor de su gradiente de concentración. Por otro lado, algunos segundos mensajeros provocan la movilización del  $Ca^{2+}$  almacenado en los depósitos intracelulares, al interactuar con receptores específicos localizados en las membranas de dichos depósitos, que al activarse permiten la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  en éstas (Penner y Neher, 1988b). A continuación se hablará brevemente de cada uno de estos dos mecanismos.

- Canales de calcio de la membrana plasmática:

Existen diferentes tipos de canales de calcio en la membrana de distintas células. En general los canales de calcio se clasifican (por los mecanismos que los activan) en canales dependientes de voltaje y canales independientes de éste. Entre los independientes del voltaje existen canales activados por ligandos, y también canales activados mecánicamente, por tensión, además de los canales pasivos que contribuyen a la  $[Ca^{2+}]_i$  basal.

El mecanismo de mayor importancia para la entrada de calcio en respuesta a un estímulo externo en las células excitables es la apertura de canales dependientes de voltaje. Estos canales han sido clasificados de acuerdo con características funcionales como la conductancia unitaria, la dependencia del voltaje y del tiempo en sus cinéticas de apertura y cierre, su farmacología y su distribución celular (Tsien y Tsien, 1990). La clasificación que más se utiliza divide a los canales dependientes de voltaje en cinco tipos: L, T, N, P y Q. Cada uno de estos tipos de canales tiene una sensibilidad al voltaje y una farmacología distintas, es decir, se activan con cambios de voltaje de distinta magnitud y se pueden bloquear con ciertas drogas específicas para cada tipo, aunque en muchos casos algunas de estas propiedades se sobrelapan entre distintos tipos de canales, por lo que es necesario analizar varias de ellas para distinguir el tipo de canal que se observa (Stea et al., 1995). Es frecuente que en una misma célula coexistan más de un tipo de canales (Bean et al., 1989).

Recientemente, las técnicas de la biología molecular han permitido la clonación y secuenciación de las proteínas que forman los distintos tipos de canales, y esto ha abierto un gran campo de estudio en la relación estructura-función de estos, permitiendo también entender en



detalle algunos de los mecanismos de apertura, cierre y regulación de los canales iónicos. Los canales de calcio dependientes de voltaje son complejos heterooligoméricos. Por ejemplo, el canal tipo L del músculo esquelético está compuesto por cinco subunidades llamadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha_1$  es la que forma el poro y es el sitio de acción de los agonistas y los antagonistas de los canales tipo L (Stea et al., 1995).

Los canales de calcio dependientes de voltaje se abren ante estímulos que despolarizan la membrana celular y se inactivan a determinados potenciales de membrana, que varían según el tipo de canal. Cuando se abren ante una despolarización, producen corrientes entrantes de calcio que contribuyen de manera significativa al incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y pueden ser responsables del disparo de potenciales de acción en algunas células.

Los canales de calcio dependientes de voltaje pueden ser modulados selectivamente por neurotransmisores, proteínas G, cinasas de proteínas y mensajeros difusibles.

- Liberación de las pozas intracelulares de calcio:

Dentro de los organelos membranales que guardan calcio en su interior, aparentemente sólo el retículo endoplásmico puede liberar calcio de manera rápida (Pozzan et al., 1994). Este compartimento se considera la poza intracelular de calcio más importante, y su liberación juega un papel crucial en el acoplamiento de un gran número de estímulos con respuestas celulares, entre ellos la contracción muscular y la secreción. Se conocen varios tipos de receptores activadores de las pozas intracelulares de calcio, entre ellos los receptores a inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). Estos receptores son canales de calcio que se abren cuando el segundo mensajero IP3 se une a ellos. Además, la actividad

de los receptores a IP3 es regulada por la concentración tanto citoplásmica como intraluminal de calcio (Stojilkovic et al., 1994) y también puede ser regulada por cinasas de proteínas como la dependiente de AMP cíclico (PKA) y la dependiente de diacilglicerol (PKC).

Otro tipo de receptores que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares en distintos tipos de células (entre ellas las neuronas y las células musculares) son los receptores conocidos como receptores de ryanodina, ya que son sensibles a un alcaloide así llamado. Estos receptores son también activados por la cafeína y nucleótidos de adenina y se han relacionado con mecanismos de liberación de calcio inducidos por el propio calcio (Tsien y Tsien, 1990).

La liberación de las pozas intracelulares de calcio por la acción de segundos mensajeros produce un incremento muy rápido en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , generalmente de corta duración debido al vaciado de la poza. Para volver a llenar las pozas intracelulares de calcio es necesario que entre calcio del medio extracelular.

La liberación de calcio de las pozas intracelulares se relaciona además con el influjo de calcio transmembranal mediante el mecanismo llamado "entrada capacitativa de calcio". Esto se da por medio de canales en la membrana que son activados cuando la concentración de calcio en las pozas intracelulares disminuye a un determinado nivel. Aparentemente, hay una activación mecánica del canal por alguna proteína de la membrana del retículo endoplásmico que se activa cuando se vacía la poza (Petersen, 1996).

#### 4. Gonadotropos: un modelo para el estudio de la regulación de la secreción.

Uno de los tipos celulares que más se han utilizado como modelo para estudiar la regulación de la secreción hormonal y el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción son los gonadotropos de la hipófisis anterior. Los gonadotropos constituyen entre el 5 y el 15% de la población celular total de la hipófisis (Childs, 1986) y como ya se dijo, sintetizan y secretan las hormonas conocidas como gonadotropinas, (LH y FSH), en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que es secretada por el hipotálamo en el sistema portal hipotálamo-hipofisario. El 80% de los gonadotropos contiene ambas hormonas; el 10% contiene sólo LH y el 10% sólo FSH (Fink, 1988).

La LH y la FSH son hormonas glicoprotéicas, con un peso molecular de 28-29 kDa, formadas por dos subunidades llamadas alfa y beta, unidas por enlaces no covalentes. La llamada subunidad alfa es común en ambas hormonas, así como en la hormona estimulante de la tiroides (TSH), mientras que la subunidad beta es específica de cada una de ellas. La subunidad alfa libre es secretada por los gonadotropos en respuesta a la estimulación con GnRH con un patrón pulsátil similar al de la secreción de la LH y la FSH y una desensibilización paralela ante la estimulación continua con la hormona liberadora (Weiss et al., 1990).

Las gonadotropinas están glicosiladas con carbohidratos como N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina, lo cual es una característica importante para su reconocimiento por sus receptores en las gónadas (Pierce, 1988).

#### 1.4.1 Mecanismo de acción de la GnRH en la secreción de gonadotropinas.

Los gonadotropos presentan receptores específicos para la GnRH, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores de siete segmentos transmembranales acoplados a proteínas G.

Al unirse la GnRH a sus receptores en la superficie de los gonadotropos, dichos receptores activan proteínas G del tipo  $G_q/G_{11}$ , (Shah y Milligan, 1994), que a su vez estimulan a la enzima fosfolipasa C para hidrolizar fosfolípidos de membrana como el difosfato de fosfatidil inositol (Naor, 1990). Esto produce la formación de dos segundos mensajeros: trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Berridge, 1987; Morgan et al., 1987; Chang et al., 1988). El DAG activa a la enzima cinasa de proteínas C (PKC), que es capaz entonces de fosforilar otras proteínas, entre ellas algunas de las proteínas que favorecen las interacciones entre las vesículas de secreción y el citoesqueleto o la membrana, lo cual, como ya se dijo, puede contribuir a la activación de la exocitosis. La PKC puede también fosforilar canales iónicos, incluyendo canales de calcio en la membrana, lo que contribuye al incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . El IP3 por su parte, se une a receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico y abre canales de calcio, lo cual produce un aumento transitorio en la concentración de este ion en el citoplasma. La liberación de las pozas intracelulares de calcio es de gran importancia en el acoplamiento estímulo-secreción, sobre todo en células no excitables (Penner y Neher, 1988b), pero también en células excitables, como los gonadotropos. Por ejemplo, se ha observado que la thapsigargina, que bloquea a la enzima  $Ca^{2+}$ -ATPasa que secuestra el calcio en las pozas intracelulares, causa secreción por sí misma en dosis alrededor de 20 mM ( $EC_{50}$ ), mientras que dosis menores, que no tienen efecto por sí mismas

sobre la secreción, bloquean aquella estimulada por la GnRH (McArdle y Poch, 1992).

En condiciones de reposo, los gonadotropos presentan un potencial de membrana de alrededor de -50 mV. A este potencial, la mayor parte de los canales de calcio y de sodio dependientes de voltaje están inactivos. El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la liberación de las pozas intracelulares activa canales de potasio dependientes de calcio (Tse y Hille, 1992; Vergara et al., 1995; Heyward et al., 1995), lo cual produce corrientes salientes de potasio que resultan en una hiperpolarización de la membrana del gonadotropo. Esto remueve la inactivación de los canales de calcio y de sodio, que se activan entonces, produciendo el disparo de varios potenciales de acción. La despolarización producida por los canales de sodio activa a su vez a los canales de calcio dependientes de voltaje y esto produce la entrada de calcio del medio extracelular, incrementando la respuesta de calcio intracelular a GnRH (Tse y Hille, 1993). Cuando hay oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ , se producen hiperpolarizaciones rítmicas (Tse y Hille, 1992) y el potencial de membrana puede a su vez modular la frecuencia de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  (Kukuljan et al., 1994). La PKC puede también modular tanto las corrientes de  $K^+$  dependientes de calcio (incrementando la corriente por una acción directa sobre el canal), como la frecuencia de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  (probablemente por una inhibición de la fosfolipasa C) (Tse et al., 1995).

Tanto la entrada de calcio a través de canales en la membrana plasmática como la liberación de las pozas intracelulares producidas por la GnRH en los gonadotropos, generan un incremento en la concentración de calcio citoplasmático  $[Ca^{2+}]_i$  que puede seguir básicamente tres tipos de dinámicas (Leong y Thorner, 1991; Guerineau et

al., 1992;): respuestas subumbrales (que consisten en un incremento pequeño y transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  que no llega a producir respuesta de secreción), oscilatorias o bifásicas. Estos últimos dos tipos de respuesta se han relacionado con eventos secretores, y se describen con más detalle a continuación.

#### A) respuestas oscilatorias.

Cuando la concentración de GnRH aplicada a los gonadotropos es menor de 10 nM, se produce un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que al llegar a un cierto umbral comienza a presentar una serie de oscilaciones con una amplitud que llega hasta 3 mM y cuya frecuencia depende de la concentración de GnRH aplicada, la cual se refleja a su vez en la concentración de IP3 producido en la célula (la frecuencia puede ser hasta de  $30 \text{ min}^{-1}$ ) (Stojilkovic et al., 1994; Leong y Thorner, 1990). Este tipo de respuesta puede producir pulsos de secreción paralelos a las oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ . La generación de oscilaciones tiene además la ventaja de mantener una secreción comparable a la que se obtendría con una elevación sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$  reduciendo los efectos tóxicos del calcio (Tse et al., 1993). El patrón oscilatorio ha sido observado también en otros tipos celulares, como los linfocitos T (Dolmetsch y Lewis, 1994), las neuronas y las células pancreáticas (Gilon et al, 1993; Bergesten et al., 1994).

Aunque algunos autores sugieren que el patrón de oscilaciones depende exclusivamente de la liberación de calcio de depósitos intracelulares (Guerineau et al., 1992), en algunos modelos experimentales se ha visto que la generación de oscilaciones depende también del influjo de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular (Dolmetsch y Lewis, 1994). Se han propuesto dos modelos distintos para tratar de explicar el

mecanismo de la generación de oscilaciones en la concentración intracelular de este ion. Uno de ellos propone la existencia de dos pozas intracelulares de calcio diferentes: una sensible al IP3 y la otra sensible a la ryanodina, entre las cuales opera un mecanismo de liberación de calcio inducido por el propio calcio que las acopla (Stojilkovic et al., 1994; Lytton y Nigam, 1992). La alternancia entre la liberación y el secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  entre las dos pozas, en conjunto con la entrada de calcio del medio extracelular, explicaría las oscilaciones en la concentración de este ion. Aparentemente en los gonadotropos las oscilaciones dependen de una sola poza intracelular de calcio, sensible a IP3, y los receptores de ryanodina no parecen tener ningún papel en las respuestas de calcio intracelular ni en el acoplamiento estímulo-secreción en estas células (Stojilkovic et al., 1994).

El modelo que mejor explica la generación de oscilaciones de calcio en los gonadotropos propone la existencia de una sola poza de calcio intracelular, sensible a IP3. La producción de este segundo mensajero libera calcio de esta poza, produciendo un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tiene un efecto bifásico sobre los receptores de IP3: a bajas concentraciones tiene un efecto positivo, mientras que a altas concentraciones tiene un efecto negativo. La actividad del receptor de IP3 también es modulada por la concentración de calcio intraluminal. Cuando la poza está llena, su sensibilidad al segundo mensajero es baja, mientras que cuando disminuye la concentración intraluminal de calcio, esta sensibilidad se incrementa, de manera que al producirse una liberación inicial no es necesario mantener una concentración de IP3 constante para continuar con la liberación de la poza. Las oscilaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no requieren tampoco que ocurran oscilaciones en la

concentración de IP3 para iniciarse ni para mantenerse. Cuando la poza se libera y aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$ , los receptores de IP3 son regulados negativamente, de manera que cesa esta liberación. Como ya se dijo, el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  activa una corriente saliente de potasio dependiente de calcio (por medio de canales sensibles a la apamina), lo que produce una hiperpolarización de la membrana que remueve la inactivación de los canales de calcio y de sodio dependientes de voltaje. Al activarse los canales de sodio se dispara una serie de potenciales de acción, lo que hace que se activen a su vez los canales de calcio y entre  $Ca^{2+}$  a la célula. La ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico bombea este ion al interior del depósito, y las bombas en la membrana plasmática sacan calcio de la célula, disminuyendo la  $[Ca^{2+}]_i$  y reiniciando así el ciclo. La generación de oscilaciones de calcio en los gonadotropos ha sido simulada con algunos modelos matemáticos (Goldbeter et al., 1990; Keizer y De Young, 1992; Li et al., 1994)

Además de las oscilaciones temporales, la compleja dinámica que sigue el  $Ca^{2+}$  intracelular produce gradientes espaciales en las concentraciones de este ion, es decir, la  $[Ca^{2+}]_i$  es diferente en distintas zonas del citoplasma celular. Dada la velocidad de difusión de los iones de calcio en el citoplasma, se cree que en los tiempos relevantes para las respuestas fisiológicas las señales de calcio deben estar restringidas a zonas cercanas a aquellas en donde entran los iones a través de los canales en la membrana o donde son liberados a través de los canales de IP3. Estas zonas ocupan aparentemente volúmenes subcelulares muy pequeños, dentro de los cuales probablemente la concentración de calcio es mucho mayor de lo que se ha estimado (Augustine y Neher,



1992b). Esto se ha demostrado directamente en espinas dendríticas en neuronas del hipocampo (Mueller y Connor, 1991) y en somas de neuronas simpáticas (Hernández-Cruz et al, 1990). En células cromafines, la entrada de calcio a través de canales en la membrana plasmática es mucho más efectiva para estimular la secreción que la elevación del calcio a niveles similares por liberación de pozas intracelulares o por diálisis a través de una micropipeta, lo que sugiere que al entrar calcio por dichos canales la  $[Ca^{2+}]_i$  que se alcanza en la vecindad de éstos (y probablemente en las zonas de exocitosis) es mucho mayor que el promedio que se mide con Fura-2, mientras que cuando se eleva la  $[Ca^{2+}]_i$  por los otros métodos la respuesta no llega con la misma intensidad a las zonas de exocitosis. Esto demuestra indirectamente que deben haber gradientes subcelulares en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Augustine y Neher, 1992a). En los gonadotropos se han obtenido resultados similares. Por medio de determinaciones de la secreción por medidas de la capacitancia membranal, se ha observado que hay mucha más secreción cuando la  $[Ca^{2+}]_i$  es elevada mediante la aplicación de GnRH (por la liberación de pozas intracelulares) que cuando se eleva de manera uniforme por medio de la fotólisis de calcio enjaulado. Esto demuestra también de manera indirecta que ante la estimulación fisiológica hay gradientes espaciales de calcio y que la medición promedio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la célula subestima las concentraciones de este ion en algunos sitios relacionados con la exocitosis y con las pozas intracelulares que liberan  $Ca^{2+}$  (Tse et al., 1997). La determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en situaciones en las que hay gradientes espaciales presenta grandes dificultades metodológicas (Augustine y Neher, 1992b).

## B) Respuestas bifásicas

Cuando la concentración de GnRH aplicada a los gonadotropos es de 10<sup>-8</sup> nM o mayor, la respuesta en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en los gonadotropos presenta un patrón bifásico, que consiste en un incremento inicial rápido y de gran amplitud pero de corta duración en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; seguido por una elevación menor pero sostenida por encima del nivel basal de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (meseta), sin presentar oscilaciones. Aparentemente, la respuesta rápida depende de la liberación de las pozas intracelulares de calcio, mientras que la sostenida depende del influjo de calcio extracelular. Este tipo de respuesta produce una secreción sostenida de gonadotropinas. Se ha reportado que los gonadotropos pueden presentar una secreción transitoria, que depende únicamente de la liberación de las pozas intracelulares y se puede presentar aún en ausencia de calcio extracelular (Tse et al., 1993; Chang et al., 1988; Naor et al., 1988; McArdle y Poch, 1992).

Aparentemente estos tipos de respuestas (subumbrales, oscilatorias y bifásicas), así como la frecuencia de oscilaciones en el segundo tipo de respuesta, son una forma de codificar las diferentes señales producidas por distintas concentraciones de los agonistas que las regulan (Leong, 1991).

Para evitar los efectos tóxicos del calcio, la concentración de este ion regresa al nivel basal unos minutos después de la estimulación, mediante los mecanismos de recaptura del calcio en las pozas intracelulares, y su salida a través de canales o bombas en la membrana plasmática.

## 5. Células $\alpha$ T3-1: un modelo para el estudio de los gonadotropos.

Uno de los obstáculos para analizar los mecanismos de transducción que utiliza la GnRH para regular la secreción de las gonadotropinas es el hecho de que los gonadotropos constituyen sólo entre el 5 y el 15% de la población celular total de la hipófisis (Childs, 1986). La incapacidad de los gonadotropos para dividirse en cultivo limita el número de células que puede ser obtenida en cultivos primarios (Tougaard y Tixier-Vidal, 1994). Estas dificultades han podido ser superadas al menos en parte gracias al desarrollo de algunas líneas celulares transformadas de gonadotropos de ratón, entre las que se encuentra la llamada  $\alpha$ T3-1 (Windle et al., 1990). Las células  $\alpha$ T3-1 fueron desarrolladas mediante la técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida, uniendo el promotor del gen que codifica para la subunidad alfa de las hormonas glicoprotéicas con el gen del antígeno T del virus SV40. Este gen híbrido fue inyectado en ovocitos fecundados de ratón, que fueron implantados en hembras pseudoembarazadas para su desarrollo. Al nacimiento, algunos de los productos presentaron tumores hipofisarios a partir de uno de los cuales se pudo aislar la línea celular  $\alpha$ T3-1. Esta línea sintetiza y secreta únicamente la subunidad alfa de las hormonas glicoprotéicas, sin embargo expresa receptores específicos para la GnRH pero no para la TRH, lo que la define como una línea celular del linaje de los gonadotropos (Windle et al., 1990).

Los receptores para la GnRH expresados en las células  $\alpha$ T3-1 presentan una afinidad por la GnRH similar a la de los receptores que se expresan en la hipófisis de ratón y de rata ( $K_d = 0.50$  nM) y una densidad aproximadamente 5 veces mayor (1.6 pmol/mg contra 0.33 pmol/mg en hipófisis de ratón). Aunque no es posible hacer una comparación directa

de las células  $\alpha$ T3-1 y los gonadotropos, ya que éstos representan aproximadamente el 10% de las células hipofisarias, el número de receptores en las células  $\alpha$ T3-1 no parece ser significativamente distinto que en los gonadotropos (Horn et al., 1991).

Los receptores para la GnRH en la línea celular  $\alpha$ T3-1 están acoplados positivamente a la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de proteínas G del tipo  $G_q/G_{11}$  (Shah y Milligan, 1994), con la consecuente formación del IP3 (Horn et al., 1991; Perrin et al., 1993).

La unión de la GnRH a sus receptores en estas células produce un incremento bifásico en la  $[Ca^{2+}]_i$ , similar al observado en gonadotropos normales (Merelli et al., 1992; Anderson et al., 1993); cuyo primer componente (pico) involucra la liberación de  $Ca^{2+}$  dependiente de IP3 así como la entrada de calcio del medio extracelular a través de canales operados por segundos mensajeros, mientras que el segundo (meseta) involucra la entrada de  $Ca^{2+}$  por medio de canales activados por la cinasa de proteínas C (Anderson et al., 1992). Sin embargo, no se han observado oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en esta línea celular. Además, la movilización de  $Ca^{2+}$  en respuesta a la GnRH en las células  $\alpha$ T3-1 tiene una sensibilidad de uno a dos ordenes de magnitud menor que los gonadotropos normales (Merelli et al., 1992; Stojilkovic et al., 1993). La activación de los receptores para la GnRH en estas células aumenta también la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje (Bosma y Hille, 1992). Estas células presentan canales de calcio tanto de tipo T como de tipo L (Horn et al., 1991), además de canales de sodio sensibles a tetrodotoxina, y varios tipos de canales de potasio, que incluyen canales sensibles a calcio (Bosma y Hille, 1992).

La GnRH además estimula la transcripción del gen de la hormona  $\alpha$  glicoprotéica y regula la cantidad de receptores para la propia GnRH en la superficie de estas células (Windle et al., 1990; Ben-Menahem et al., 1992; Ben-Menahem et al., 1994; Mason et al., 1994).

La línea celular  $\alpha$ T3-1 ha sido utilizada ampliamente para estudiar la regulación de la transcripción del gen de la hormona  $\alpha$ -glicoprotéica así como la expresión funcional y el reciclaje de los receptores para la GnRH (Windle et al., 1990; Ben-Menahem et al., 1992; Barnhart y Mellon, 1994). Sin embargo, la regulación de la secreción hormonal en ésta línea celular no ha sido estudiada.

#### 1.5.1 Antecedentes inmediatos (resultados preliminares).

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo mostraron que al tratar a las células  $\alpha$ T3-1 con distintos fármacos que se sabe producen un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , resultaban en distintas respuestas secretoras: mientras que algunos tratamientos (como algunos ionóforos de calcio) sí eran capaces de estimular la secreción, otros (entre ellos la GnRH) eran completamente inefectivos para desencadenar la respuesta secretora (Martínez de la Escalera et al., 1991).

#### 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Estas observaciones sugieren que las células  $\alpha$ T3-1 presentan un defecto en el acoplamiento funcional entre la señal producida por la GnRH y la secreción hormonal y proveen las bases para proponer que el aumento transitorio bifásico de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que se sabe es producido por la GnRH en estas células, no es suficiente para causar la exocitosis. Es

posible que en las células  $\alpha$ T3-1 esté ausente algún componente de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  disparada por la GnRH, el cual puede ser substituido farmacológicamente por la acción de un ionóforo de calcio. El desacoplamiento entre la activación de los receptores para la GnRH y la secreción podría ser el resultado de un defecto en los mecanismos de movilización de calcio de las pozas intracelulares, aunque no se puede descartar la posibilidad de que los mecanismos efectores de la exocitosis en estas células presenten una menor sensibilidad al calcio, o un umbral de activación de la exocitosis más alto que los gonadotropos normales. Las células  $\alpha$ T3-1 pueden por lo tanto representar un modelo único para estudiar este paso crucial en el acoplamiento entre las señales estimuladoras y la secreción.

## II. OBJETIVOS

### General:

Estudiar el papel del calcio en el acoplamiento estímulo-secreción en células endocrinas, utilizando como modelo a las células  $\alpha$ T3-1.

### Particulares:

- Comprobar mediante ensayos de unión específica de radioligandos, la presencia de los receptores que liberan las pozas intracelulares de calcio en las células  $\alpha$ T3-1, específicamente los receptores de IP3 y de ryanodina.
- Caracterizar las respuestas tanto de secreción como en la concentración de calcio intracelular a la aplicación de GnRH, a la despolarización de la membrana plasmática por alto potasio, y a la ionomicina, un ionóforo de calcio.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Cultivo celular

Las células  $\alpha$ T3-1 entre los pasajes 10 y 30 fueron cultivadas sobre cajas de petri de 10 cm de diámetro (Costar corporation, Cambridge, MA), con medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbeco (D-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (P-S), 100 U/ml de gentamicina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a temperatura constante de 37°C con alta humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 3 días. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 90-100% eran subcultivadas dissociándolas con una solución salina balanceada con tripsina al 0.05% y EDTA-4Na 0.53 mM (Gibco BRL) y centrifugándolas a 800 rpm por 8 minutos en una centrífuga clínica, para después resuspenderlas y resembrarlas en con medio de cultivo.

#### 2. Ensayos de unión específica de <sup>3</sup>H-ryanodina y de <sup>3</sup>H-Ins 1,4,5 P3 a membranas de la fracción microsomal de las células $\alpha$ T3-1.

Con el objeto de comprobar la presencia de los receptores de Ins 1,4,5 P3 y la ausencia de los receptores de ryanodina, y caracterizar así los mecanismos de liberación de calcio de las pozas intracelulares en esta línea celular, se realizaron ensayos de unión específica de <sup>3</sup>H-ryanodina y de <sup>3</sup>H-Ins 1,4,5 P3 a membranas de la fracción microsomal de las células  $\alpha$ T3-1. La técnica que se utilizó para realizar el fraccionamiento

subcelular es una modificación de la descrita por Damiani et al. (1991) y se describe brevemente a continuación.

## 2.1 Obtención de la fracción microsomal de membranas de las células $\alpha$ T3-1

Se cultivaron, para cada extracción de membranas, 40 cajas de petri de 10 cm de diámetro con células  $\alpha$ T3-1. Cuando llegaron al 80-90% de confluencia, se les retiró el medio de cultivo, y se agregaron 2 ml de un buffer de lisis (sacarosa 0.25 M, MOPS 10 mM, DTT 1 mM) con inhibidores de proteasas (PMSF 0.2 mM, benzamidina 0.2 mM, pepstatina 2 mg/ml, leupeptina 2 mg/ml, aprotinina 2 mg/ml) frío. Las células se despegaron del plato con un raspador Costar, y se transfirieron a tubos de centrifuga, manteniendo los tubos en hielo. Una vez colectados los 80 ml en dos tubos de 50 ml, se centrifugaron las células a 800 rpm en una centrifuga clínica, se les retiró el medio, se determinó el peso húmedo de las células, y se resuspendieron en el mismo buffer de lisis, en un volumen de 5 veces su peso húmedo. Se lisaron las células por homogeneización (teflón-vidrio por un minuto a la velocidad máxima del homogenizador) y sonicación (3 pulsos de 1 minuto) , y se aislaron las membranas de la fracción microsomal mediante las siguientes centrifugaciones consecutivas: 10 minutos a 1000 X g para eliminar los núcleos y las células que quedaron enteras, seguido de 20 minutos a 7700 X g para eliminar las mitocondrias y finalmente 60 minutos a 110,000 X g para precipitar la fracción microsomal. Esta fue resuspendida y homogenizada en un volumen pequeño (aprox. 500  $\mu$ l) del buffer de lisis y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l que se guardaron a -70°C.



Una vez extraídas las membranas, se determinó la concentración de proteínas en el extracto mediante el método descrito por Lowry et al. (1951), y se calculó el volumen del extracto de membranas necesario para obtener 100  $\mu\text{g}$  de proteína, cantidad que se utilizó para los ensayos de unión.

## 2.2 Ensayos de unión con $^3\text{H}$ -ryanodina

Los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -ryanodina (según Hamilton et al., 1989) se realizaron incubando 100  $\mu\text{g}$  de membranas con HEPES 10 mM, KCl 300 mM y  $\text{CaCl}_2$  100 mM pH 7.2, y 7.5 nM de  $^3\text{H}$ -rya durante 15 a 17 horas a temperatura ambiente. Para cuantificar la unión inespecífica, a algunos tubos se les adicionó 25 mM de ryanodina fría. Se utilizó un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  en cada tubo, y cada determinación se realizó por triplicado. La ryanodina no unida a las membranas se separó de la unida por filtración. Las muestras fueron filtradas con filtros Whatman GF/F y lavadas 5 veces con 5 ml de KCl 0.3 M. La radioactividad retenida en los filtros fue determinada por conteo en centelleo líquido. Como control positivo, y para validar el método, se utilizaron membranas microsomales de músculo esquelético (retículo sarcoplásmico) y de cerebro (fracción microsomal) de rata. Estas últimas, se aislaron siguiendo la misma metodología empleada para las células  $\alpha\text{T3-1}$ .

## 2.3 Ensayos de unión con $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3

Para los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3 se siguió el procedimiento descrito por Furiuchi et al. (1993), que se resume a continuación: se mezclaron 100  $\mu\text{g}$  de membranas de las células  $\alpha\text{T3}$  con

un buffer de Tris HCl 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0.25 mM pH 8, 10 nM de <sup>3</sup>H-IP3 y 1 μM de IP3. Se utilizó un volumen total de 120 μl en cada tubo y cada determinación se realizó por duplicado. Se incubó en hielo durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos. El IP3 no unido a las membranas se separó del unido por filtración. Las muestras fueron filtradas con filtros Whatman GF/F y lavadas 5 veces con 5 ml de buffer Tris HCl 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8. La radioactividad retenida en los filtros fue determinada por conteo en centelleo líquido. Como control positivo, y para validar el método, se utilizaron membranas microsomales de cerebro de rata.

Después de ensayos preliminares para determinar la presencia de unión específica, se realizó una curva de saturación, utilizando concentraciones crecientes de <sup>3</sup>H-IP3. A partir de esta curva se realizó una transformación de Scatchard para obtener la afinidad de los receptores y su densidad en las membranas microsomales de las células αT3-1.

### 3. Determinación de la secreción hormonal con la técnica de precipitación de proteínas totales marcadas con <sup>35</sup>S-met y cys.

Para las determinaciones de la secreción hormonal en respuesta a distintos fármacos, las células αT3-1 fueron sembradas en cajas de 24 pozos (Costar corporation, Cambridge, MA) cubiertos con matrigel, y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar aproximadamente el 70-80% de confluencia. Entonces se sustituyó el medio por D-MEM libre de metionina y cisteína y suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.3 mg/ml de glutamina y 100 U/ml de P-S y con 50 μl de una mezcla de <sup>35</sup>S-

met y  $^{35}\text{S}$ -cys (10 mCi/ml). Las células se incubaron con este medio durante 18 horas para permitir que incorporaran los aminoácidos marcados. Al cabo de este tiempo se retiró el medio y se lavaron las células con D-MEM sin suero durante 30 minutos. El medio se volvió a cambiar y se agregaron los diferentes tratamientos farmacológicos, incubando durante 60 minutos, al cabo de los cuales se colectó el medio de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Se realizaron controles con cada uno de los vehículos en los que se disolvieron los fármacos. El medio de incubación se centrifugó para eliminar las células desprendidas y se mezclaron 500  $\mu\text{l}$  de medio de incubación con 500  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y 10  $\mu\text{l}$  de albúmina de suero bovino 10 mg/ml. Se incubó a 4°C durante 60 minutos y después se centrifugó durante 15 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 1N y se contó la radioactividad en 40  $\mu\text{l}$  de esta suspensión por centelleo líquido.

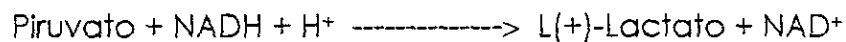
#### 4. Determinación de la viabilidad celular después de los tratamientos farmacológicos:

Como el método que se utilizó para determinar la secreción de proteínas en las células  $\alpha\text{T3-1}$  puede detectar cualquier proteína que haya sintetizado la célula durante el periodo de marcaje metabólico y que se encuentre en el medio de incubación, se realizaron controles de viabilidad celular después de aplicar cada uno de los tratamientos utilizados, ya que en el caso de que hubiera muerte celular, las proteínas de las células rotas podrían ser detectadas como proteínas secretadas al medio de cultivo, sin serlo.

Para determinar la viabilidad celular se utilizaron dos métodos distintos: 1) determinación de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de incubación, y 2) el método colorimétrico de reducción de MTT. Estos métodos se describen a continuación:

#### *4.1 Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de incubación.*

En caso de que algunas células murieran y su membrana se rompiera, se liberarían al medio enzimas intracelulares, de manera que determinando la presencia de alguna de estas enzimas en el medio podemos tener un índice del porcentaje de muerte celular. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) transforma el piruvato en lactato, utilizando al NADH como coenzima, siguiendo la reacción que se muestra a continuación:



El equilibrio es hacia el lactato y el NAD<sup>+</sup>.

La actividad de LDH es medida por la disminución de la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADH.

Para medir la actividad de lactato deshidrogenasa en el medio de incubación de las células  $\alpha$ T3-1 se mezclaron 2.5 ml de una solución de Tris 81.3 mM, NaCl 203.3 mM NADH 0.244 mM pH7.2 con 50  $\mu$ l del medio de incubación que se desea analizar y para comenzar la reacción se agregaron 0.5 ml de una solución de Tris 81.3 mM, NaCl 203.3 mM piruvato 9.76 mM. Se mezcló bien agitando en un vortex, se leyó la absorbancia a 340 nm inmediatamente después de adicionar el piruvato, y después cada minuto durante 4 minutos. Las lecturas se transformaron a nmol de NADH consumidos por minuto por mililitro con la siguiente fórmula:

$$\text{nmol NADH/min ml} = \frac{\text{Lectura inicial} - \text{Lectura final}}{(\text{C.E.M.}) (\text{tiempo en min}) (\text{volumen de muestra en ml})}$$

donde C.E.M. es el coeficiente de extinción molar del NADH = 0.00622

#### 4.2 Reacción con MTT.

Este método utiliza una sal tetrazólica soluble, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) que las células viables reducen a formazán (insoluble) pero las muertas no. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables. La ventaja de éste método es que permite cuantificar el número de células vivas en una monocapa adherida al plato de cultivo. El formazán forma cristales de color azul-violeta y al ser solubilizado con un solvente orgánico se puede cuantificar su densidad óptica en un espectrofotómetro para microplatos (lector de ELISA).

Para realizar las pruebas de viabilidad con MTT, se siguió una modificación del método descrito por Mossmann (1983): se sembraron células  $\alpha$ T3-1 en cajas de 96 pozos, y cuando llegaron a confluencia del 90% se lavaron con solución de Locke (NaCl 154 mM; KCl 5.6 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2.2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 6 mM; HEPES 2 mM; glucosa 10 mM) durante 30 minutos, al cabo de los cuales se les aplicó el tratamiento farmacológico (los mismos que se utilizaron en los experimentos de determinación de la secreción) durante 1 hora, y posteriormente se les retiró el medio, y se les reemplazó por 100  $\mu$ l de la solución de Locke. A cada pozo se le agregaron 10  $\mu$ l de MTT disuelto previamente en amortiguador de fosfatos (5 mg de MTT/ml) y se incubaron durante cuatro horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada. Posteriormente a cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ l de una solución con de lauryl sulfato

de sodio (SDS) al 10% p/v y HCl 0.03% v/v. La placa se incubó durante 30 minutos para asegurar la disolución de los cristales de formazán. Se homogeneizó el colorante pipéteandolo varias veces y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA. Se compararon los distintos tratamientos con el control mediante la prueba de t de Student.

##### 5. Inmunoprecipitación de la hormona $\alpha$ -glicoprotéica.

Para comprobar la presencia de la hormona  $\alpha$ -glicoprotéica tanto en las células como en los medios de incubación, y validar así el método de precipitación con TCA, se realizó una inmunoprecipitación (Lane, 1988), utilizando el anticuerpo AFP-66P9986 NIDDK-NIH dirigido contra la hormona  $\alpha$ -glicoprotéica.

Las células fueron cultivadas en 3 platos de 3.5 cm de diámetro cubiertos con matrigel, y marcadas con  $^{35}\text{S}$ -met y  $^{35}\text{S}$ -cys, como se describió anteriormente. Al cabo de las 18 horas de incubación con el medio de marcaje, éste fue colectado y guardado en refrigeración con inhibidores de proteasas. Las células fueron lavadas durante 30 minutos con D-MEM sin suero y una de las cajas se trató por una hora con ionomicina 1 mM. Al cabo de este tiempo, se colectaron los medios de incubación, se les agregaron inhibidores de proteasas y tanto estos últimos, como los medios de marcaje, se concentraron en centricones No. 3. en una centrífuga Sorvall durante 80 minutos.

##### *Prelavado:*

Las muestras se incubaron con suero preimmune (5 ml por cada 500 ml de muestra) a 4°C agitando durante 1 hora. Después se agregó pansorbina, se incubó durante 30 minutos con agitación a 4°C y se centrifugó para eliminar las proteínas que se unieron inespecíficamente a

las inmunoglobulinas. Los sobrenadantes se colectaron y se les agregó proteína A-sefarosa, incubando una hora a 4°C con agitación. Al término de este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos.

#### *Inmunoprecipitación:*

A un máximo de 500-600 µl de muestra se agregó el volumen necesario de buffer Net-gel para completar 1 ml. Se adicionó el equivalente de 1 ml de anticuerpo anti-α-LH sin diluir a cada muestra. A una de las muestras control se le puso suero preinmune en lugar del anticuerpo. Se incubó toda la noche a 4°C con agitación.

Al día siguiente se añadió a cada tubo 25 µl de proteína A-sefarosa y se incubó con agitación durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga y se descartaron los sobrenadantes.

#### *Lavados:*

El pellet de sefarosa fue lavado tres veces durante 20 minutos: el primer lavado con buffer Net-gel (NaOH 0.5 M), el segundo con buffer Net-gel con SDS y el tercero con buffer Tris-NPO<sub>4</sub>. El pellet se resuspendió en 20 ml de solución de Laemli 2X CR, se taparon los tubos, se agitó y se calentó a baño María en ebullición durante 5 minutos.

#### *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Las muestras de las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se destiñeron con una solución de ácido acético 10% y metanol 20% y se sumergieron en solución "enhance" por una hora a temperatura ambiente, con agitación. Se retiró la solución y se bañó el gel con agua desionizada fría, incubando

por 30 minutos. Los geles se dejaron secar y se expusieron en hyperfilm durante tres semanas.

#### 6. Determinación de la concentración de calcio intracelular mediante indicadores fluorescentes, utilizando como fluoróforo el INDO-1.

Para las determinaciones de la concentración de calcio intracelular se cultivaron las células  $\alpha$ T3-1 en cajas de petri de 10 cm de diámetro. Cuando las células alcanzaron el 90-100% de confluencia se cargaron con INDO-1/AM, para lo cual se incubaron con 10  $\mu$ M de éste indicador (concentración final en 5 ml de medio D-MEM) durante 60 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El fluoróforo no incorporado se eliminó incubando a continuación en una solución extracelular compuesta por NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 1.5 mM; glucosa 10 mM, pH 7.2-7.4 durante 30 minutos y lavando después tres veces con esta misma solución. Las células se desprendieron del plato con una pipeta de plástico (Falcon) y se resuspendieron en 15 ml de solución extracelular (obteniéndose una concentración de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml). Las células en suspensión se mantuvieron en un incubador a 37°C.

Se utilizaron 1.5 ml de esta suspensión de células cargadas con INDO-1 para cada experimento de determinación de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, colocando la suspensión en una cubeta de plástico dentro de un espectrofluorómetro (Aminco-Bowman AB-2), con agitación continua. Se midió la fluorescencia emitida a 410 y 485 nm, con una longitud de onda de excitación a 349 nm, registrando la fluorescencia emitida una vez por segundo, y se calculó la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mediante la fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = (R - R_{min} / R_{max} - R) \beta,$$



donde R es el cociente de las fluorescencias emitidas a 410 y 485 nM en cada determinación;  $R_{max}$  y  $R_{min}$  los cocientes de las fluorescencias a 410 y 485 nM obtenidas al lisar las células con tritón y al agregar EGTA 5 mM respectivamente (estas manipulaciones se realizaron al final de cada experimento) y  $\beta$  es el cociente de la fluorescencia a 485 nM del indicador libre entre la fluorescencia a 485 nM del indicador saturado con  $Ca^{2+}$ .

Se determinó en cada experimento la  $[Ca^{2+}]_i$  basal de la población celular durante dos minutos, y después se aplicaron los distintos tratamientos, adicionando los fármacos con una jeringa Hamilton a través de un orificio en la tapa del espectrofluorómetro.

Se determinaron los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a GnRH, ionomicina, maitotoxina y alto potasio, así como el efecto de la ausencia de calcio extracelular y de fármacos que afectan la liberación de calcio de las pozas intracelulares de calcio sobre algunos de estos tratamientos.

Se calcularon las áreas bajo la curva de cada registro de  $[Ca^{2+}]_i$ , y se promediaron todas las áreas bajo la curva de las réplicas de cada tratamiento. Los distintos tratamientos se compararon mediante ANOVA de una vía.

### Estadística

En los experimentos de secreción de proteínas se compararon los distintos tratamientos mediante ANOVA de una vía.

En las determinaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó el área bajo la curva de cada trazo y se compararon las áreas de las respuestas a GnRH 100 nM, ionomicina 1  $\mu$ M y  $K^+$  50 mM mediante una ANOVA de una vía, y las

respuestas a GnRH con y sin pretratamiento con thapsigargina mediante una *t* de Student.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Ensayos de unión específica de $^3\text{H}$ -ryanodina y de $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3.

Con el objeto de caracterizar los receptores liberadores de las pozas intracelulares de calcio presentes en las células  $\alpha\text{T3-1}$ , y confirmar así la presencia de algunos de los mecanismos que se ha propuesto que regulan la dinámica de calcio intracelular en esta línea, se realizaron ensayos de unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina y de  $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3 a membranas de la fracción microsomal de las células.

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -ryanodina se encuentran resumidos en la Tabla 1. En estos ensayos no se pudo detectar unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina a la fracción microsomal de las células  $\alpha\text{T3-1}$ , aún cuando se incrementó tres veces la cantidad de membranas en el ensayo. Se realizaron ensayos con las fracciones mitocondrial y nuclear así como con extractos de membranas totales para comprobar que, de estar presentes, los receptores no hubieran quedado en estas otras fracciones al hacer la separación de membranas. En las fracciones mitocondrial y nuclear, así como en el extracto de membranas totales de las células  $\alpha\text{T3-1}$  tampoco se encontró unión específica detectable. Se realizaron asimismo ensayos de unión en extractos de membranas totales de adenohipófisis de rata, en los que tampoco se pudo detectar unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina.

respuestas a GnRH con y sin pretratamiento con thapsigargina mediante una *t* de Student.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Ensayos de unión específica de $^3\text{H}$ -ryanodina y de $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3.

Con el objeto de caracterizar los receptores liberadores de las pozas intracelulares de calcio presentes en las células  $\alpha\text{T3-1}$ , y confirmar así la presencia de algunos de los mecanismos que se ha propuesto que regulan la dinámica de calcio intracelular en esta línea, se realizaron ensayos de unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina y de  $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3 a membranas de la fracción microsomal de las células.

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -ryanodina se encuentran resumidos en la Tabla 1. En estos ensayos no se pudo detectar unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina a la fracción microsomal de las células  $\alpha\text{T3-1}$ , aún cuando se incrementó tres veces la cantidad de membranas en el ensayo. Se realizaron ensayos con las fracciones mitocondrial y nuclear así como con extractos de membranas totales para comprobar que, de estar presentes, los receptores no hubieran quedado en estas otras fracciones al hacer la separación de membranas. En las fracciones mitocondrial y nuclear, así como en el extracto de membranas totales de las células  $\alpha\text{T3-1}$  tampoco se encontró unión específica detectable. Se realizaron asimismo ensayos de unión en extractos de membranas totales de adenohipófisis de rata, en los que tampoco se pudo detectar unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina.

Como controles positivos en estos ensayos de unión se utilizaron membranas microsomiales de cerebro y membranas de la fracción pesada del retículo endoplásmico de músculo de rata. En el primer tejido se obtuvo una unión específica correspondiente a 3.7 fmol de receptor/mg proteína y en el segundo se encontraron 200 fmol de receptor/mg proteína, cantidades similares a las reportadas previamente (Zimanyi y Pessah, 1991), lo que demuestra que el ensayo funcionó adecuadamente, y no hubo detección de unión de  $^3\text{H}$ -ryanodina en las membranas de las células  $\alpha\text{T3-1}$ .

Tejido o fracción	pmoles de receptor/mg de proteína
Músculo	0.2
Corteza cerebral	0.0037
$\alpha\text{T3-1}$ :	
Microsomas	No detectable
Núcleos	No detectable
Mitocondrias	No detectable
Memb. totales	No detectable
Hipófisis	No detectable

Tabla 1. Unión específica de  $^3\text{H}$ -ryanodina a las diferentes fracciones membranales de las células  $\alpha\text{T3-1}$  y a membranas de la fracción microsomal de cerebro, músculo e hipófisis.

En cuanto a los ensayos de unión de  $^3\text{H}$ -Ins 1,4,5 P3, se detectó unión específica a la fracción microsomal de las células  $\alpha\text{T3-1}$ ,

corroborando así la presencia de los receptores a este segundo mensajero en la línea celular  $\alpha$ T3-1. La figura 1 A muestra la curva de saturación obtenida al incubar 100  $\mu$ g de membranas microsomales con concentraciones crecientes de  $^3$ H-Ins 1,4,5 P3 y después de restar la unión no específica de la unión total. La curva muestra una unión específica saturable, con una saturación aparente a partir de 10 nM de IP3. La transformación de Scatchard, presentada en la figura 1 B, fue consistente con la presencia de un solo sitio de unión, ya que la recta presenta una pendiente continua. Con esta transformación se estima una constante de afinidad (Kd) por el Ins 1,4,5 P3 de 3.18 nM y una densidad de receptores (Bmax) de 50.5 fmol/mg de proteína.

## 2.Efecto de distintos secretagogos sobre las células $\alpha$ T3-1

La determinación de la secreción por la técnica de precipitación de proteínas totales marcadas con  $^{35}$ S comprobó los resultados preliminares que mostraban la ausencia de estimulación de la secreción con algunos secretagogos en contraste con otros, a pesar de los incrementos en calcio intracelular reportados en la literatura (Perrin et al., 1993; Anderson et al., 1992). Los resultados obtenidos en estos estudios se describen a continuación:

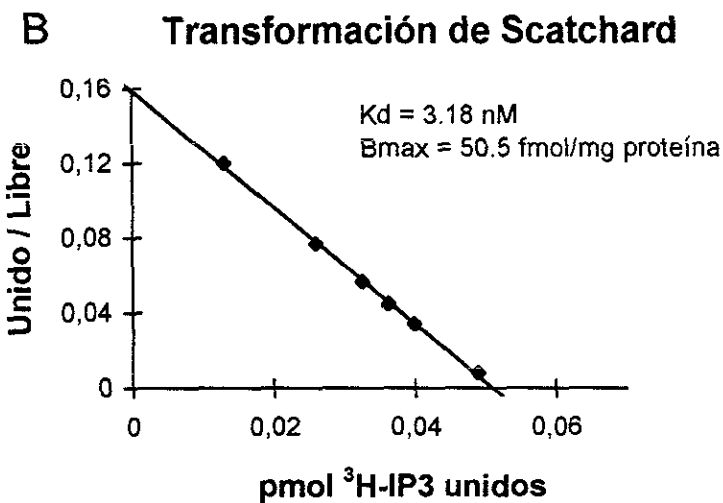
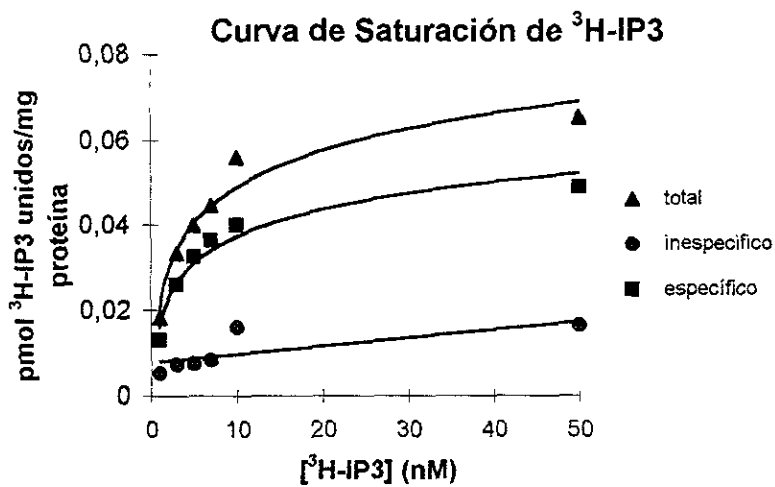


Figura 1. Ensayos de unión específica de  $^3\text{H-IP3}$  a la fracción microsomal de las células  $\alpha\text{T3-1}$ . A, Curva de saturación de  $^3\text{H-IP3}$ . B, Transformación de Scatchard de la unión de  $^3\text{H-IP3}$ .

## *2.1 Ausencia de estimulación de la secreción por la Hormona Liberadora de Gonadotropinas y por la despolarización de la membrana plasmática.*

Como se muestra en la figura 2, la incubación de las células  $\alpha$ T3-1 durante 60 minutos con la hormona liberadora de gonadotropinas (100 nM), el estímulo fisiológico que regula la secreción hormonal en los gonadotropos, fue completamente inefectiva para estimular la secreción de proteínas al medio de incubación con respecto al control. Concentraciones menores de la hormona tampoco tuvieron ningún efecto sobre la secreción hormonal (estos datos no se muestran).

De manera similar, otros tratamientos que se espera eleven la  $[Ca^{2+}]_i$ , como la despolarización de la membrana celular con veratridina 50 mM (un activador de canales de sodio), o con concentraciones altas de potasio (56 mM) en el medio extracelular, fueron igualmente inefectivos para estimular la secreción, e incluso se puede observar una tendencia a la inhibición de la secreción con respecto a las células control, aunque ésta no es estadísticamente significativa.

## *2.2 Estimulación de la secreción con ionomicina.*

En contraste con esta ausencia de estimulación, el tratamiento por 60 minutos con el ionóforo de calcio ionomicina, estimuló significativamente la secreción de proteínas en las células  $\alpha$ T3-1 de manera dependiente de la dosis, obteniéndose efectos significativos con respecto al control con las concentraciones de 100 nM y 1  $\mu$ M del ionóforo, como se muestra en la figura 3. Estas concentraciones produjeron un incremento de 100 y 500 % con respecto a la secreción

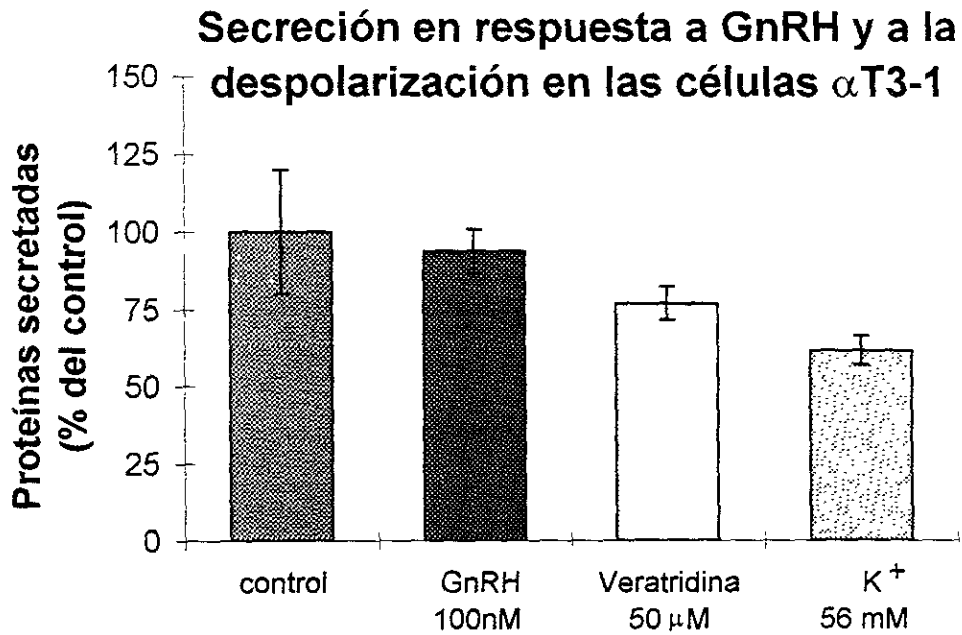


Figura 2. Secreción de  $^{35}\text{S}$ -proteínas totales determinadas por precipitación con TCA. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar de cuatro réplicas en un experimento representativo de cinco realizados.

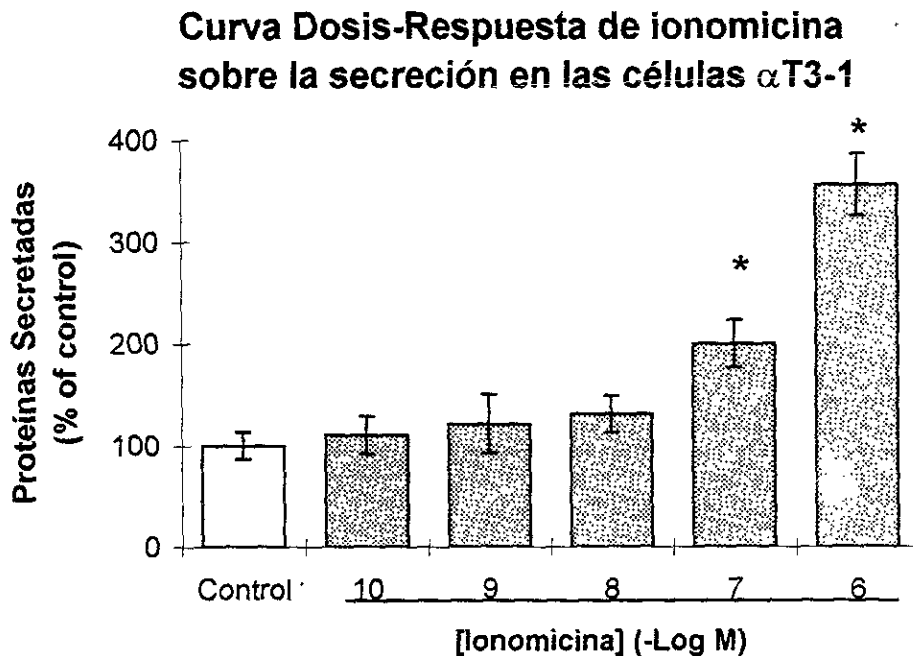


Figura 3. Relación dosis-respuesta de la estimulación de la secreción con ionomicina. Se muestra el promedio  $\pm$  el error estándar de cuatro réplicas, en un experimento representativo de tres realizados.



basal respectivamente. Las concentraciones de 10 nM o menores de ionomicina no tuvieron efecto sobre la secreción. En la figura 3 se muestra un experimento representativo de al menos 3 realizados para cada tratamiento, con 4 réplicas en cada caso. Las barras muestran la media +/- el error estándar de estas 4 réplicas.

### *2.3 Inmunoprecipitación de la hormona $\alpha$ -glicoprotéica.*

Con el objeto de comprobar la presencia de la hormona  $\alpha$ -glicoprotéica en el medio de incubación así como en homogenados de las células  $\alpha$ T3-1, y verificar así que la secreción de proteínas totales refleja la secreción específica de ésta hormona, que es regulada por el receptor a GnRH, se realizó una inmunoprecipitación de proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$ -met y  $^{35}\text{S}$ -cys, utilizando un anticuerpo específico anti- $\alpha$ -LH (NIH). La autorradiografía del gel en el que se separó el material inmunoprecipitado se muestra en la figura 4. Mediante la separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida, se obtuvo una banda marcada con un peso molecular de aproximadamente 20 KDa, el peso esperado para la hormona  $\alpha$ -glicoprotéica (Ramabhadran et al., 1984). Esto sugiere que efectivamente la hormona se encuentra en el medio de incubación de las células y por lo tanto que es secretada por éstas, por lo que al determinar las proteínas totales secretadas al medio de incubación podemos obtener un índice de la secreción de la  $\alpha$ -LH. Se ha determinado que la cantidad de hormona  $\alpha$ -glicoprotéica inmunoprecipitada corresponde a aproximadamente al 23% de las proteínas totales precipitadas con TCA (Martínez de la Escalera y Weiner, resultados sin publicar).

## Inmunoprecipitación de la hormona $\alpha$ -glicoprotéica

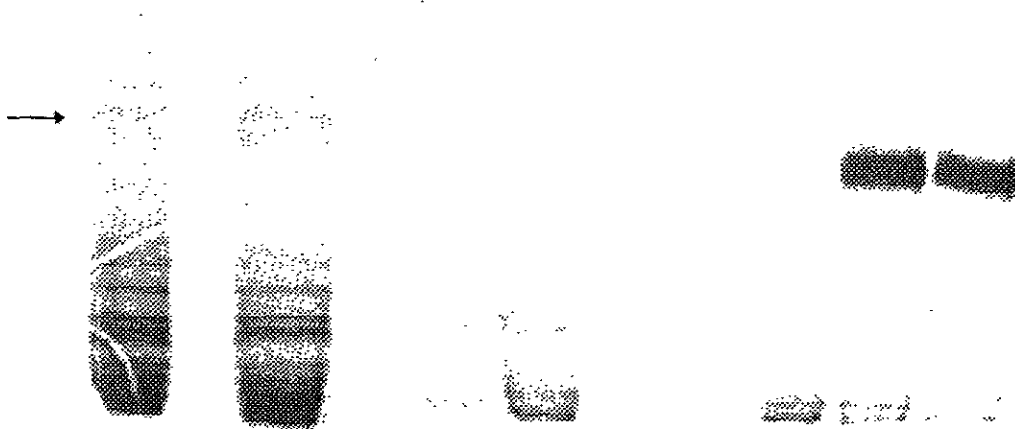


Figura 4. Autorradiografía del gel de los productos inmunoprecipitados con el anticuerpo AFP-66P9986.

Carriles 1 y 2.- marcadores de peso molecular preteñidos. La flecha indica el peso molecular de 20 KDa. 3, 4 y 5.- medio condicionado de células  $\alpha$ T3-1 incubadas por 60 minutos con ionomicina 1  $\mu$ M. 6, 7 y 8.- homogenado de células  $\alpha$ T3-1. 3 y 6.- incubación con suero preinmune.

### 3. Determinaciones de la viabilidad celular después de los tratamientos farmacológicos.

Para comprobar que las proteínas marcadas detectadas en el medio de incubación después del tratamiento con ionomicina eran efectivamente producto de la secreción por exocitosis y no de la muerte celular o el escape inespecífico por algún tipo de daño causado por el fármaco aplicado, se realizaron determinaciones de la viabilidad de las células después de ser tratadas durante 60 minutos con los diferentes fármacos que se utilizaron en los experimentos de secreción. Para ello se utilizaron 2 métodos: 1) la determinación de la actividad de la enzima lactato-deshidrogenasa (L-DH) en el medio de incubación como un indicador de la liberación de enzimas citoplásmicas por muerte celular, y 2) la técnica de reducción de MTT, que determina la cantidad proporcional de células viables en el plato de cultivo, ya que el metabolismo de éstas causa la reducción del MTT a cristales de formazán, que dan un color azul-violeta de manera que la densidad óptica obtenida en el cultivo es proporcional al número de células viables en éste.

Como se observa en la figura 5, las determinaciones de actividad de L-DH en el medio de incubación de las células no mostraron ninguna diferencia significativa entre las células control y las tratadas con 100 nM ó 1  $\mu$ M de ionomicina (las concentraciones que provocaron estimulación significativa de la secreción). Concentraciones menores del ionóforo tampoco causaron una disminución en la viabilidad celular (estos datos no se muestran). Como control positivo en estas determinaciones se midió la actividad de L-DH en el medio de incubación de células lisadas con tritón X 100 al 0.1%. En este caso todas las enzimas citoplásmicas son

**Actividad de Lactato-Deshidrogenasa en el medio de Incubación de células  $\alpha$ T3-1 tratadas con ionomicina**

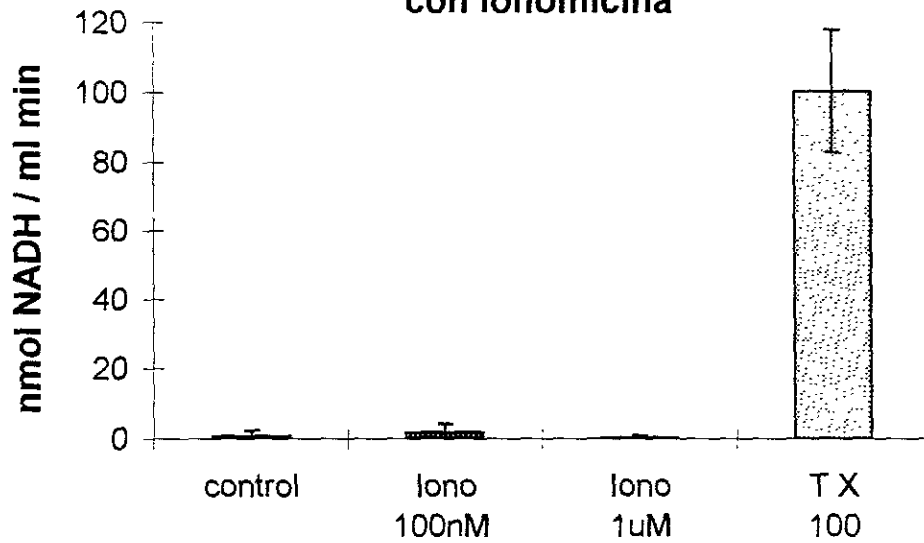


Figura 5. Determinación de la viabilidad celular por actividad de la enzima Lactato-Deshidrogenasa en el medio de incubación de las células  $\alpha$ T3-1. Las células fueron incubadas durante 60 minutos con las concentraciones indicadas de ionomicina. Como control positivo, se lisaron células con tritón X100 al 0.1% y como control negativo se incubaron con D-MEM. se muestra el promedio de 8 pozos de células para cada tratamiento +/- el error estándar.

liberadas al medio de cultivo al lisarse la membrana plasmática. En estos controles se obtuvo una actividad enzimática de aproximadamente 100 nmol de NADH/ml min en el medio de incubación, mientras que tanto las células control como las tratadas con ionomicina mostraron menos del 5% de la actividad observada en el control positivo.

La técnica de reducción del MTT (figura 6) reveló resultados que llevan a conclusiones similares. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de formazán entre las células control y las tratadas con GnRH 100 nM,  $K^+$  56 mM, ionomicina 100 nM o 1  $\mu$ M durante 60 minutos tanto en ausencia como en presencia de calcio extracelular. Únicamente la aplicación de una concentración mayor (10  $\mu$ M) de ionomicina causó una disminución en la viabilidad celular determinada por este método. Esta disminución se observó sólo en presencia de calcio extracelular, pero no en medio deficiente en calcio. Esta concentración de ionomicina no fue empleada en los experimentos de determinación de secreción, y únicamente se muestra como control positivo en estas determinaciones de viabilidad celular. También como control positivo de la disminución de la viabilidad celular, se utilizaron células lisadas con SDS al 0.1%, las cuales no presentaron actividad de reducción del MTT a formazán.

Dado que la viabilidad celular no difirió significativamente en las células tratadas con ionomicina, GnRH o alto potasio y las células control, podemos inferir que las proteínas detectadas en el medio de incubación de las células tratadas con ionomicina no fueron el resultado de la liberación inespecífica de proteínas debida a daños de la membrana celular.

## Viabilidad de las células $\alpha$ T3-1 determinada por MTT

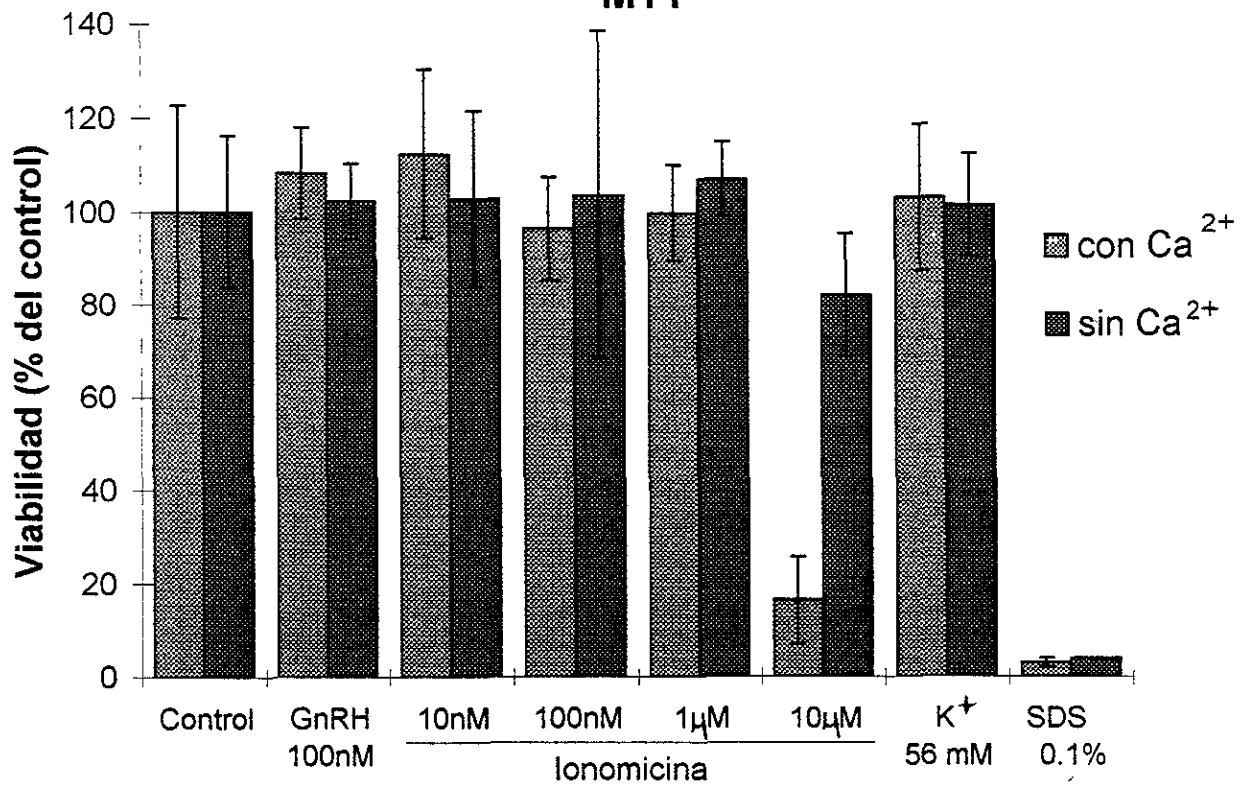


Figura 6. Viabilidad celular determinada por la reducción de MTT. Las células sembradas en una placa de 96 pozos fueron incubadas durante 60 minutos con los tratamientos indicados y al final se determinó la viabilidad en cada pozo se muestra el promedio de 8 réplicas para cada tratamiento +/- la desviación estándar.

Ante el hallazgo inesperado de que tanto la GnRH, el estímulo fisiológico que regula la secreción de las gonadotropinas, como la despolarización, son inefectivos para estimular la secreción en esta línea celular gonadotrópica y ante el contraste de este efecto con el del ionóforo de calcio a pesar de que se han reportado incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a ambos tratamientos en esta línea celular, decidimos determinar y caracterizar las respuestas en la  $[Ca^{2+}]_i$  a todos estos fármacos para observar si las respuestas eran distintas.

#### 4. Efectos de la GnRH, ionomicina y alto $K^+$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en la línea celular $\alpha T3-1$ .

Las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  a distintas dosis de GnRH (0.01 a 500 nM) se muestran en la figura 7. La aplicación de la hormona produjo un incremento casi inmediato en la  $[Ca^{2+}]_i$ , con una amplitud dependiente de la dosis pero de corta duración, seguido por un incremento menor, pero sostenido por encima del nivel basal, en forma de meseta que persistió durante varios minutos (al menos tres). La figura 7 A muestra un trazo representativo en respuesta a cada una de las concentraciones de GnRH probadas, de al menos 6 que se realizaron para cada caso. En el panel B se muestra el promedio +/- el error estándar de la amplitud del pico de  $[Ca^{2+}]_i$  obtenido en 6 trazos para cada concentración. La curva dosis-respuesta muestra una forma sigmoïdal, con una dosis efectiva al 50% de 79 nM ( $7.9 \times 10^{-8}$  M) y una saturación aproximadamente a partir de 1  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M).

Con el objeto de comprobar si el efecto de la GnRH sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  era específicamente producido a través de receptores para esta hormona, se utilizó un antagonista GnRHérgico. El pretratamiento con el

# Respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ a GnRH en las células $\alpha$ T3-1

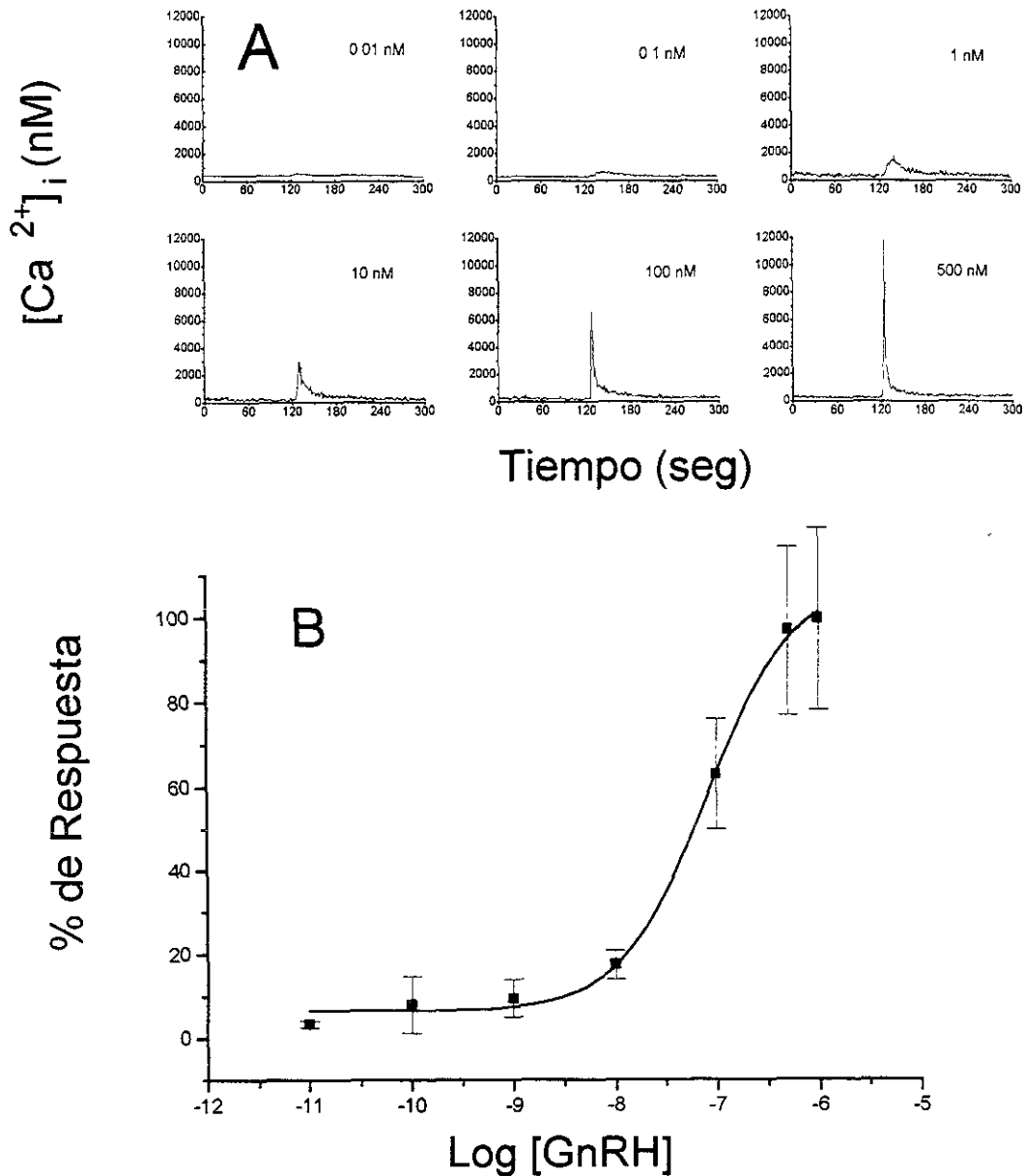


Figura 7. A Respuestas en  $[Ca^{2+}]_i$  a concentraciones crecientes de GnRH. B Curva dosis-respuesta del pico de calcio para cada concentración de GnRH. Se muestra el promedio de 6 trazos para cada concentración.



antagonista suprimió completamente la respuesta a una aplicación posterior de GnRH (100 nM) (figura 8 B), lo cual indica que efectivamente la respuesta a la hormona es mediada por receptores específicos para ésta. La aplicación del antagonista durante la fase de meseta bloqueó esta parte de la respuesta (figura 8 A), lo que muestra también la especificidad de la respuesta y sugiere además que la meseta observada es efectivamente una elevación sostenida por encima del nivel basal de  $Ca^{2+}$  dependiente de la actividad del receptor, y no una nueva concentración basal más elevada que la previa a la aplicación de la hormona.

Para caracterizar algunos de los elementos involucrados en las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  a GnRH y discernir qué parte de la respuesta depende de la liberación de calcio de las pozas intracelulares y qué parte de la entrada de calcio extracelular, se realizaron tratamientos que eliminaran alguno de los dos componentes. Para tratar de eliminar el componente de las pozas intracelulares de calcio, se aplicó thapsigargina (TG) 200 nM, un fármaco bloqueador de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, que se sabe produce una liberación pasiva del calcio de este organelo, y por lo tanto se espera que disminuya la cantidad de calcio que se puede liberar de la poza intracelular. La figura 8 C muestra que la aplicación de la thapsigargina por sí misma produjo un pequeño incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que llegó a su máximo en un lapso de aproximadamente un minuto, y se sostuvo durante varios minutos. La posterior aplicación de GnRH 100 nM produjo únicamente un incremento pequeño y sostenido en la  $[Ca^{2+}]_i$ , parecido a la fase de meseta, pero el pico de calcio fue completamente suprimido por el pretratamiento con TG. La figura 12 muestra el promedio de las áreas bajo la curva de los trazos de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a estos y otros

# Caracterización de la Respuesta en $[Ca^{2+}]_i$ a GnRH en la línea celular $\alpha$ T3-1

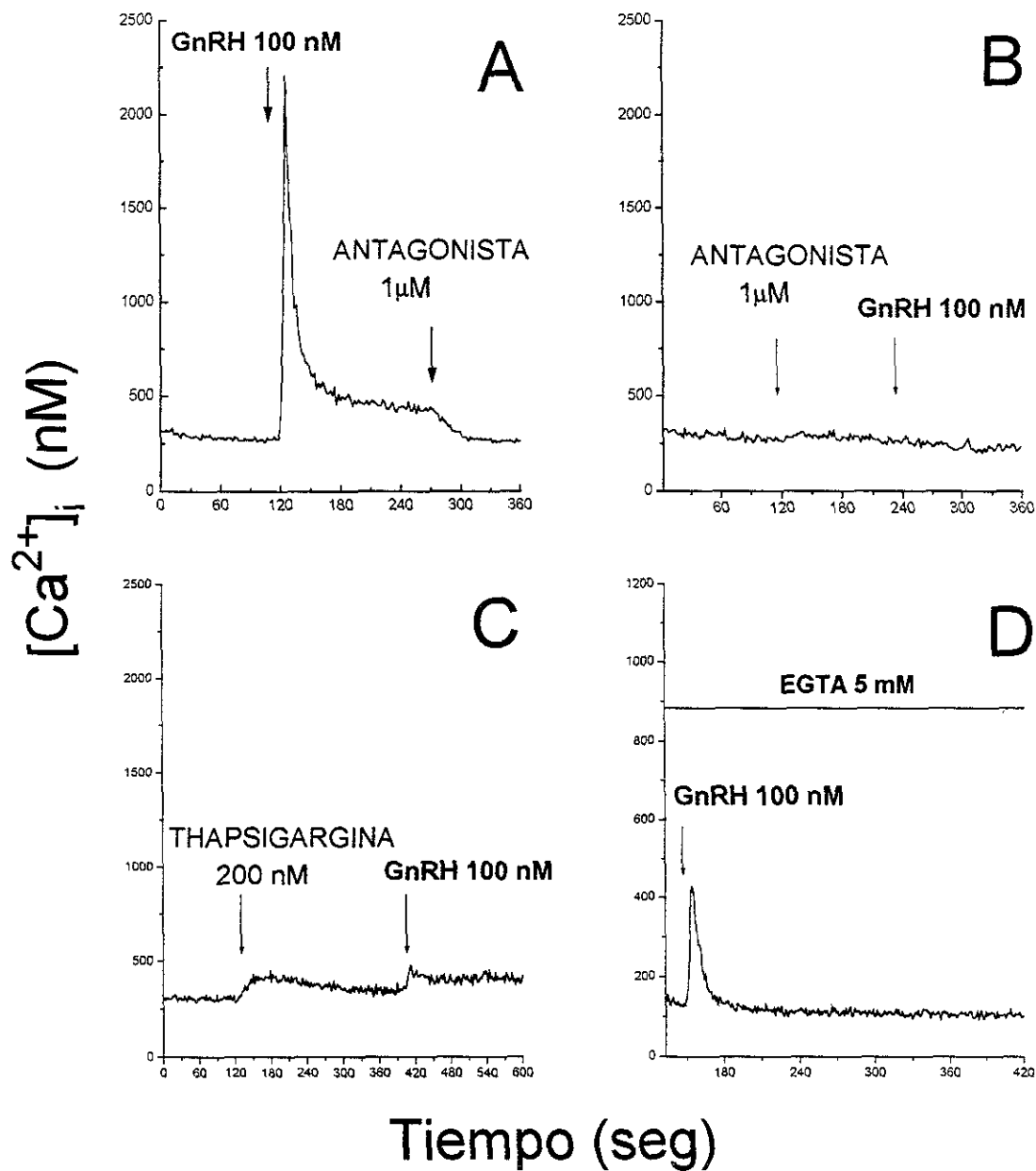


Figura 8. Caracterización de la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  a GnRH. Las células  $\alpha$ T3-1 cargadas con INDO-1 fueron tratadas como sigue en los tiempos indicados por las flechas: A GnRH 100 nM. La fase de meseta fue inhibida por un antagonista GnRHérgico. B Efecto del pretratamiento con el antagonista. C Efecto del pretratamiento con TG 200 nM. D Respuesta en ausencia de calcio extracelular. En cada panel se muestra un experimento representativo de al menos 5 realizados para cada condición.

tratamientos calculadas dentro de un límite de tres minutos a partir del momento de la aplicación de cada tratamiento. Como se ve en esta figura, el efecto de la GnRH fue reducido aproximadamente al 20% por el pretratamiento con TG. Estos resultados sugieren que la fase rápida de la respuesta a GnRH, representada con un pico en la  $[Ca^{2+}]_i$  depende en su mayor parte de la liberación de las pozas intracelulares de este ion.

Por otra parte, la eliminación del calcio extracelular añadiendo EGTA (5 mM) al medio, permitió ver que la GnRH produjo un incremento rápido en la  $[Ca^{2+}]_i$ , aunque de menor amplitud que el observado en presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, pero no se pudo observar la fase de meseta (figura 8 D). La observación del pico de calcio en respuesta a GnRH en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular demuestra también que éste depende en gran parte de la liberación de pozas intracelulares de calcio, mientras que la meseta depende de la entrada de calcio del medio extracelular. El área bajo la curva de los trazos obtenidos con GnRH en ausencia de calcio extracelular es aproximadamente del 10% con respecto a aquellos obtenidos en presencia de 1.8 mM de  $Ca^{2+}$  extracelular, como se observa en la figura 9 D.

La meseta en la  $[Ca^{2+}]_i$  producida por la GnRH también fue abolida por el pretratamiento con nifedipina, un bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje, así como con gadolinio, un bloqueador inorgánico no selectivo de los canales de calcio. Los trazos correspondientes a estos tratamientos se muestran en la figura 9 B y C respectivamente, y la comparación de las áreas bajo la curva se muestra en el panel D, donde se observa que el bloqueo de los canales de calcio causó una disminución de aproximadamente el 50% en la cantidad de calcio involucrada en la respuesta a GnRH .

# Bloqueo de la fase de meseta y disminución de la respuesta a GnRH con bloqueadores de canales de calcio

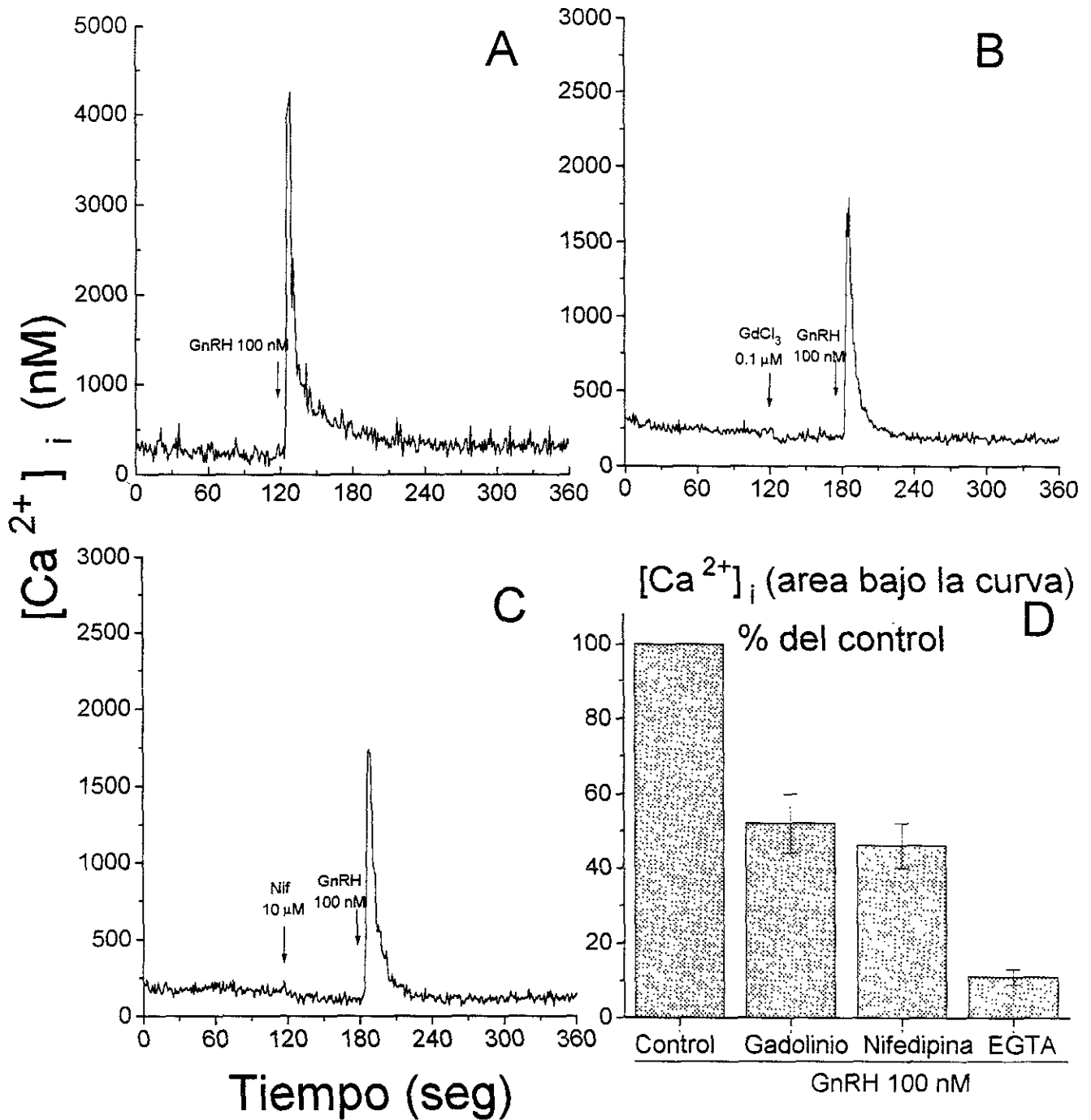


Figura 9. Eliminación de la respuesta sostenida (meseta) de  $[Ca^{2+}]_i$  a GnRH por el pre-tratamiento con bloqueadores de canales de calcio. A Control con GnRH. B y C en el segundo 240 se aplicó GnRH 100 nM, precedido en el segundo 120 de la aplicación de 0.1  $\mu$ M de cloruro de gadolinio (B) o de 10  $\mu$ M de nifedipina (C). D Promedio de las áreas bajo la curva de 4 trazos para cada condición.

La aplicación de ionomicina a las células  $\alpha$ T3-1 cargadas con Indo-1, mostró respuestas en la  $[Ca^{2+}]_i$  muy similares a las observadas con la GnRH. Las respuestas a la ionomicina, representadas en la figura 10 A, consisten en un incremento rápido en la  $[Ca^{2+}]_i$ , de amplitud dependiente de la dosis y de corta duración, seguidas por una meseta sostenida por encima del nivel basal previo a la estimulación. Se obtuvieron incrementos observables en la  $[Ca^{2+}]_i$  con concentraciones de ionomicina a partir de 10 nM, más notables con las concentraciones de 100 nM y 1  $\mu$ M, lo cual concuerda con la relación dosis-respuesta observada en los experimentos de secreción. La relación dosis-respuesta que se muestra en la figura 9B presenta una forma sigmoidal con una dosis efectiva al 50% de 234 nM ( $2.34 \times 10^{-7}$  M) de ionomicina.

Al igual que con las respuestas a GnRH, se caracterizó el efecto tanto del vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio con TG como de la ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular sobre la respuesta a ionomicina. El pretratamiento con TG suprimió completamente el pico de calcio producido por la ionomicina, pero se observó una pequeña elevación sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$  (correspondiente a la meseta), como se muestra en la figura 10 C. En ausencia de calcio extracelular sí se observó un incremento rápido, pero de mucho menor amplitud que el observado en presencia de  $[Ca^{2+}]_i$ , pero no el componente sostenido (figura 10 D).

La comparación de las áreas bajo la curva de los trazos obtenidos con ionomicina y con GnRH se muestra en la figura 12. Se puede observar que no hubieron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de calcio involucrado en estas respuestas, en términos del área bajo la curva de la concentración.

# Caracterización de la Respuesta en $[Ca^{2+}]_i$ a Ionomicina en las células $\alpha$ T3-1

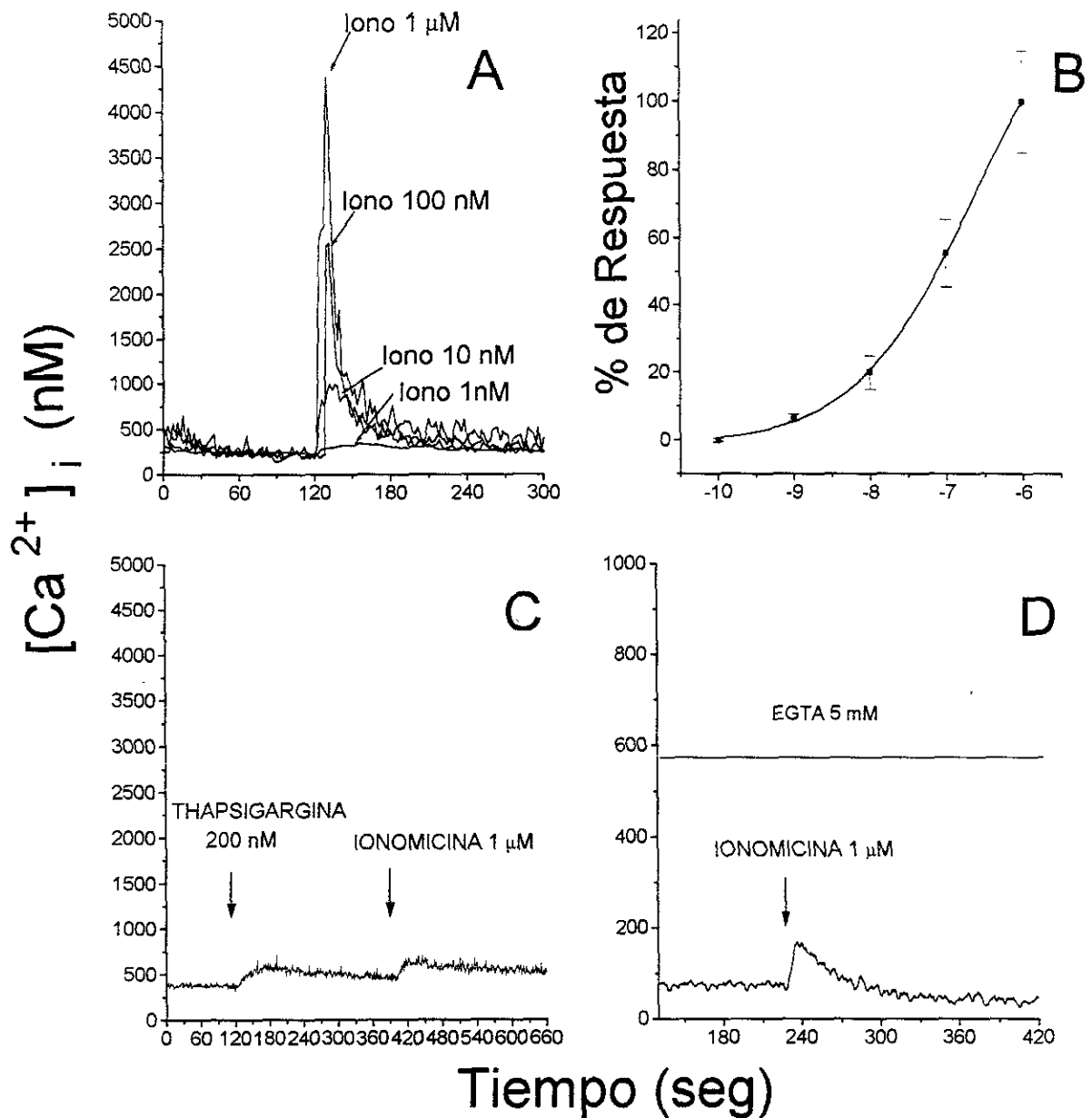


Figura 10. Caracterización de la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  a ionomicina. En los paneles A, C y D las células  $\alpha$ T3-1 cargadas con INDO-1 fueron tratadas como se indica. A. respuestas a concentraciones crecientes de ionomicina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M). Cada concentración se probó en un experimento independiente. C Efecto del pretratamiento con TG. D. Respuesta a ionomicina en ausencia de calcio extracelular. Se muestra un experimento representativo de al menos 5 realizados para cada condición. B Curva dosis-respuesta del pico máximo alcanzado con cada concentración de ionomicina. Se muestra el promedio de 6 experimentos  $\pm$  ES para cada concentración.

La figura 11 A muestra que la despolarización con potasio 20 mM produjo también un incremento rápido y sostenido en la  $[Ca^{2+}]_i$ , presumiblemente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (la adición de KCl 50 mM produjo un efecto muy similar al observado con 20 mM). El efecto del potasio fue bloqueado tanto por la adición posterior de nifedipina (figura 11 A), como por el pretratamiento con este bloqueador (figura 11 B), lo que demuestra que el efecto observado se da efectivamente a través de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Además, se hicieron controles con manitol para comprobar que la respuesta no es provocada únicamente por el cambio de osmolaridad en el medio. La adición de manitol 20 mM no produjo ningún cambio en la  $Ca^{2+}$  (figura 10 C), lo que demuestra que el cambio de osmolaridad del medio no es responsable de los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ , y ayuda a sugerir que el efecto del alto potasio se da a través de la despolarización y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje.

# Efecto de la Despolarización con $K^+$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en las células $\alpha T3-1$

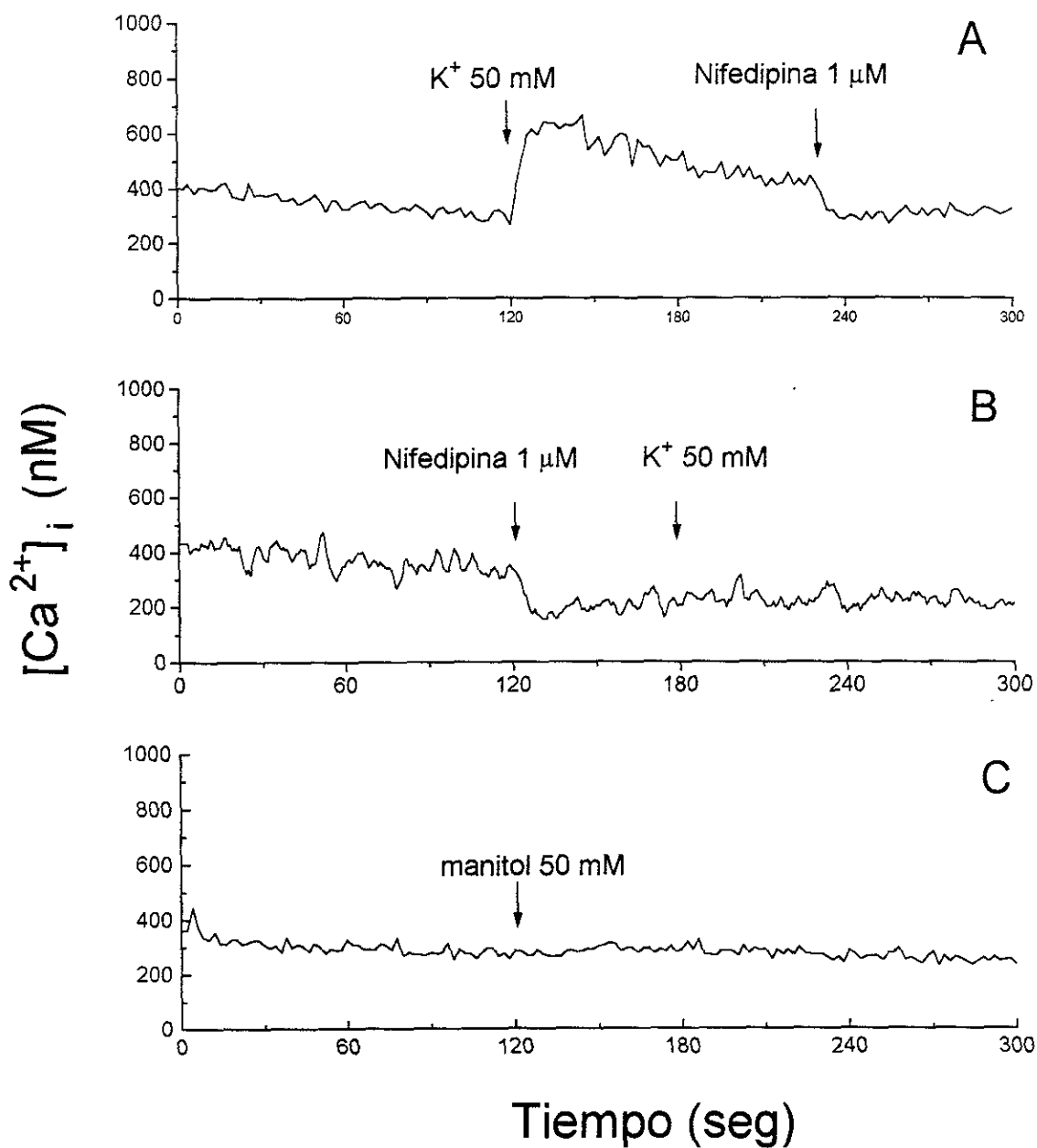


Figura 11. A Efecto de la despolarización con  $K^+$  50 mM sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células  $\alpha T3-1$ . A Terminación de la respuesta por la adición de nifedipina, un bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje. B inhibición de la respuesta a  $K^+$  por el pretratamiento con gadolinio. C control con manitol para comprobar que las respuestas no se deben al cambio de osmolaridad del medio. Se muestra un experimento representativo de 6 realizados para cada condición.



## Cantidad total de calcio involucrada en las respuestas a los distintos tratamientos

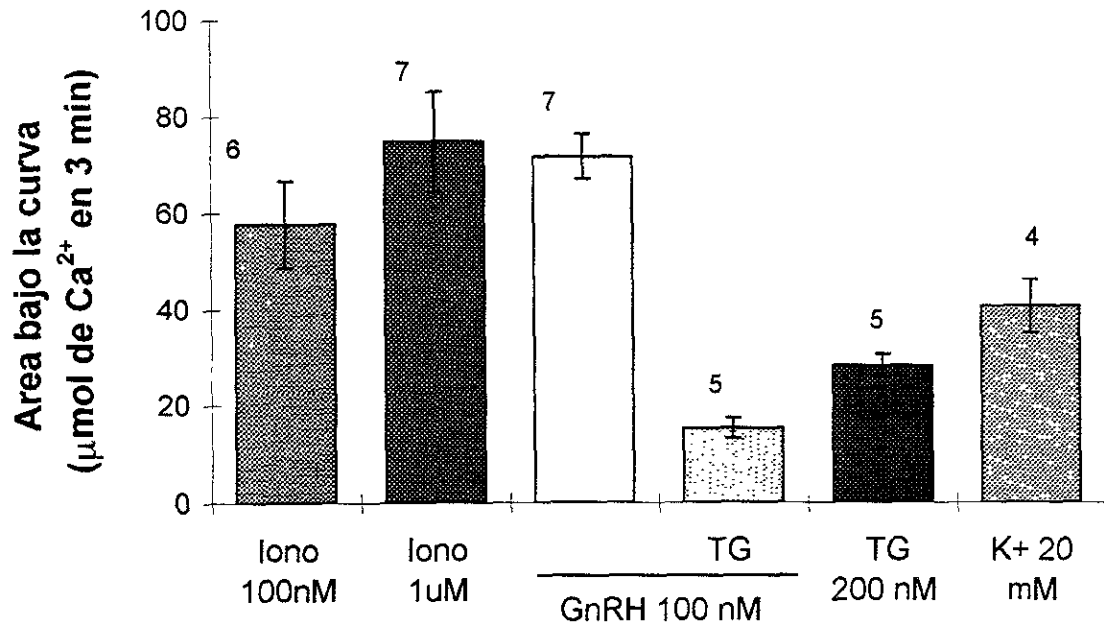


Figura 12. Areas bajo la curva de los trazos de  $[Ca^{2+}]_i$ , obtenidos en respuesta a los distintos fármacos. Se integró a partir del momento de la adición del tratamiento y hasta 3 minutos después. Los números encima de cada barra representan el número de trazos que fueron promediados en cada caso. La cuarta barra de izquierda a derecha muestra el area bajo la curva de la respuesta a GnRH en células pretratadas con thapsigargina 200 nM.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que en las células  $\alpha T3-1$  existe un desacoplamiento funcional entre la activación del receptor para GnRH y la secreción, a pesar de que las señales intracelulares desencadenadas por el receptor, que llevan a la elevación de la concentración de calcio citoplásmica, funcionan aparentemente de manera normal.

En el presente trabajo se realizó una caracterización de las respuestas tanto secretoras como en  $[Ca^{2+}]_i$  a distintos fármacos, y además se identificaron los tipos de receptores liberadores de calcio de las pozas intracelulares. En cuanto a la liberación de calcio del retículo endoplásmico, en los gonadotropos se ha descrito que el IP3 juega un papel importante, tanto en las respuestas bifásicas como en las oscilatorias, mientras que los receptores de ryanodina no parecen intervenir en las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  en este tipo celular (Stojilkovic et al., 1994). En este trabajo comprobamos que las células  $\alpha T3-1$  efectivamente presentan receptores a IP3 en las membranas microsomales, con un solo sitio de unión, y una constante de disociación y una densidad cercanas al rango que se ha descrito en otros tipos celulares (Walton et al., 1991; Feng et al., 1992). También de acuerdo con los trabajos que reportan la ausencia de efectos de fármacos que regulan a los receptores de ryanodina en los gonadotropos, los ensayos de unión realizados no fueron capaces de detectar la presencia de estos receptores. Esto no descarta la posibilidad de que las células expresen este receptor en cantidades pequeñas, a las cuales los ensayos realizados no sean sensibles, pero concuerda con los trabajos en los que se ha buscado y no

se ha encontrado la intervención de estos receptores en las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  en los gonadotropos.

Dado que el método utilizado para medir las respuestas de secreción detecta la acumulación de proteínas en el medio de incubación, fue necesario incubar a las células por periodos de 60 minutos con los tratamientos farmacológicos para poder acumular una cantidad detectable de proteínas en el medio. Aunque no se muestra en las figuras, la incubación con ionomicina durante periodos de 30 ó 45 minutos, produjo cantidades menores, mientras que incubaciones mas cortas resultaron en cantidades no detectables de proteínas secretadas al medio.

La detección de proteínas en el medio de cultivo mediante el método de precipitación de proteínas totales en este trabajo, parece ser efectivamente debida a la secreción y no a la liberación inespecífica de proteínas por la destrucción de la membrana de las células, ya que las determinaciones de viabilidad celular realizadas con dos métodos distintos después de los tratamientos farmacológicos muestran claramente que ésta no es afectada por las concentraciones de ionomicina utilizados en los experimentos de secreción, y que la viabilidad en las células no tratadas, es similar a la de las células a las que se administraron los distintos tratamientos farmacológicos. Únicamente el tratamiento con una concentración de ionomicina 10 veces más alta que las empleadas en los estudios de secreción (10 mM) causó una disminución de la viabilidad celular, y esto se observó solamente en presencia de calcio extracelular (2 mM), lo que sugiere que fue un efecto específico causado por la exposición prolongada a concentraciones de calcio tóxicas dentro de las células y sirvió también como control positivo

en los ensayos de viabilidad celular. La ionomicina entonces, no tuvo ningún efecto tóxico que no estuviera asociado con su acción ionoforética. Las concentraciones intracelulares de calcio en respuesta a  $1 \mu\text{M}$  o concentraciones menores de ionomicina no fueron tóxicas para las células, a juzgar por las determinaciones de viabilidad. Por lo tanto, la diferencia observada entre las células control y las tratadas con ionomicina parece ser un efecto secretor verdadero.

La medición de la secreción de  $^{35}\text{S}$ -proteínas por precipitación con TCA mostró una ausencia total de estimulación de la secreción en respuesta a  $100 \text{ nM}$  de GnRH o a la despolarización con alto potasio o con veratridina. Las respuestas intracelulares desencadenadas por la activación del receptor para GnRH en esta línea celular han sido ampliamente estudiadas y se sabe que incluyen la formación de IP3 y diacilglicerol (Horn et al., 1991), la liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de los receptores para IP3 (Perrin et al., 1993; Anderson et al., 1992), la activación de corrientes entrantes de calcio a través de canales tipo T y tipo L en la membrana plasmática (Bosma y Hille, 1992) y la estimulación tanto de la expresión como de la actividad de la cinasa de proteínas C (Shraga-Levine et al., 1994). En este trabajo confirmamos que efectivamente, la aplicación de GnRH causa un incremento bifásico en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a pesar de lo cual no ocurre una estimulación de la exocitosis.

Por otro lado, se sabe que estas células presentan canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (Bosma y Hille, 1993), por lo que la estimulación con veratridina debe causar una despolarización de la membrana plasmática debida a corrientes entrantes de sodio (Brazil y Fontana, 1993), lo cual debería activar a su vez a los canales de calcio

dependientes de voltaje y producir también un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Las células  $\alpha T3-1$  presentan también varios tipos de canales de potasio (Bosma y Hille, 1992). En la célula en reposo, la permeabilidad del potasio es alta, por lo que al incrementar la concentración extracelular de éste, el ion puede entrar a la célula, acarreado una corriente de carga positiva que provoca la despolarización de la membrana. Esto activa también a los canales de calcio dependientes de voltaje (Tse y Hille, 1993), lo que produce una entrada de calcio a la célula, con el consiguiente incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En este trabajo demostramos que efectivamente la aplicación de cloruro de potasio 50 mM en el medio extracelular provoca un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que depende de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, ya que es bloqueada por la nifedipina, un bloqueador selectivo de estos canales. Sin embargo, a pesar de que tanto la veratridina como el alto potasio incrementan la  $[Ca^{2+}]_i$ , ambos fueron completamente inefectivos para estimular la secreción en las células  $\alpha T3-1$ .

Por el contrario, el tratamiento con ionomicina, un ionóforo de calcio, estimuló claramente la secreción de proteínas en esta línea celular de manera dependiente de la dosis.

El hecho de que se pueda detectar secreción después de la estimulación con ionomicina sugiere que la maquinaria necesaria para llevar a cabo la exocitosis en las células  $\alpha T3-1$  es capaz de funcionar adecuadamente en respuesta a determinados estímulos. Sin embargo la GnRH, el estímulo fisiológico que regula la secreción en los gonadotropos, es incapaz de activar esta respuesta. Los resultados obtenidos sugieren que hay algún defecto en el mecanismo de acoplamiento del estímulo producido por la GnRH y la secreción, que aparentemente puede ser sustituido por la acción de la ionomicina. Se

sabe que la ionomicina ejerce su acción a través de la apertura de poros en la membrana plasmática por los que puede entrar calcio a la célula, y también es capaz de provocar la liberación de calcio de las pozas intracelulares. Dado que el efecto conocido de la ionomicina es únicamente el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , y dado que en las células excitables, como los gonadotropos, se considera que el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  es necesario y suficiente para activar la exocitosis, la pregunta que surge de estos resultados es si existe alguna diferencia en cuanto a las respuestas de calcio intracelular que producen la GnRH o la despolarización y aquellas producidas por la ionomicina. Por esta razón se realizaron determinaciones de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  producidos por estos tratamientos.

Utilizando el INDO-1 como fluoróforo para medir la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células  $\alpha T3-1$ , encontramos que la aplicación de GnRH produce una respuesta bifásica en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que consiste en una elevación rápida y de gran amplitud pero de corta duración, seguida por una meseta de pequeña amplitud pero sostenida por varios minutos. La respuesta rápida es inhibida por el pretratamiento con thapsigargina, que produce la liberación pasiva de las pozas intracelulares de calcio, pero la respuesta no es bloqueada por la ausencia de calcio en el medio extracelular ni por bloqueadores de canales de calcio de la membrana plasmática, aunque con estas últimas dos condiciones la amplitud del pico de  $Ca^{2+}$  disminuye. Además, la amplitud de esta respuesta es claramente dependiente de la dosis de GnRH, lo cual es consistente con la liberación de calcio de las pozas intracelulares, ya que la cantidad de IP3 producido es también dependiente de la dosis del agonista que activa al receptor. La meseta, por el contrario, se presenta aún después del pretratamiento con thapsigargina, pero es eliminada completamente

por el bloqueo de canales de calcio y por la ausencia de calcio extracelular. Todo esto sugiere que la respuesta rápida (pico) depende en su mayor parte de la liberación de calcio de las pozas intracelulares, aunque también puede estar involucrada la entrada de calcio del medio extracelular, mientras que la respuesta sostenida (meseta) depende completamente del influjo de calcio a través de canales de membrana.

Además de los cambios en la amplitud y en el perfil de las respuestas, el efecto del pretratamiento con thapsigargina o con bloqueadores de canales de calcio o la eliminación del calcio extracelular fue analizado mediante la comparación de las áreas bajo la curva de la respuesta a GnRH con y sin estos tratamientos. El cálculo de las áreas bajo la curva de estas respuestas muestra claramente que hay una disminución en la cantidad total de calcio involucrada en la respuesta a GnRH después del pretratamiento con thapsigargina o con bloqueadores de canales de calcio, así como por la aplicación de EGTA al medio extracelular. Esta última maniobra produce una disminución mayor de la cantidad de calcio involucrada en la respuesta a GnRH que el tratamiento con gadolinio o nifedipina. En experimentos preliminares observamos que la incubación por un tiempo mayor con EGTA producía una eliminación completa de la respuesta, por lo que pensamos que esto puede ser debido a que al quelar el calcio extracelular puede haber también una pérdida de calcio en los compartimentos intracelulares, ya que se requiere de la entrada de calcio extracelular para mantener las pozas llenas (Pozzan, 1994). Esta disminución en la cantidad de calcio que puede ser liberada de las pozas intracelulares podría ser la causa de que la respuesta a GnRH en ausencia de calcio libre extracelular sea menor que cuando se bloquean los canales de calcio. Cabe mencionar

que para asegurarnos de que la concentración de EGTA aplicada quelaba todo el calcio extracelular en el tiempo en que se observaron las respuestas a GnRH y a ionomicina (30 seg), se realizaron controles aplicando maitotoxina, una toxina que produce el influjo de calcio extracelular. Al aplicar maitotoxina 30 segundos después del EGTA no se observó ningún incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo que demuestra que no quedaba calcio libre extracelular, y que las respuestas observadas en las figuras 8 y 10 D se deben a la liberación de calcio de las pozas intracelulares.

Las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  a GnRH que se obtuvieron en este trabajo coinciden con las reportadas previamente en la literatura para esta línea celular (Anderson et al., 1992 ; Perrin et al., 1993) así como con las respuestas de tipo bifásico observadas en gonadotropos primarios (Leong y Thorner, 1991).

Dado que a pesar de presentarse un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la GnRH esta hormona no fue capaz de estimular la secreción, parece evidente que la forma en que ocurre este incremento de calcio intracelular en estas célula no es suficiente para activar la exocitosis.

Las respuestas a la ionomicina que se obtuvieron fueron muy similares a las producidas por la GnRH, tanto en el perfil de los trazos, su duración y sus características como en cuanto a la cantidad de calcio total involucrada en las respuestas. Los trazos de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la ionomicina fueron también bifásicos, con un pico rápido y de corta duración que depende aparentemente de la liberación de calcio de las pozas intracelulares, seguido de una meseta que depende de la entrada de calcio extracelular. Cabe mencionar que hay una consistencia entre las concentraciones de ionomicina que produjeron una estimulación de



la secreción y las que tuvieron una respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  de amplitud más notoria.

La figura 12 muestra que no hay diferencias significativas entre las áreas bajo la curva de las respuestas a las concentraciones de ionomicina que estimularon la secreción (100 nM ó 1  $\mu$ M) y a la GnRH (100 nM), lo que sugiere que la cantidad total de  $Ca^{2+}$  involucrada en estas respuestas es similar. Por lo tanto, a grosso modo no parece haber ninguna diferencia cuantitativa entre ellas. Las respuestas secretoras de las células  $\alpha$ T3-1 a estos dos fármacos son sin embargo completamente distintas. Esto hace pensar que puede haber alguna diferencia cualitativa entre estas respuestas y de nuevo sugiere que el incremento en la concentración intracelular de calcio no es suficiente para activar la secreción, aunque probablemente sí es necesario (Setrn et al., 1981; Marian y Conn, 1979; Hopkins et al, 1978). La diferencia cualitativa más evidente que se podría observar sería la procedencia del calcio que eleva la concentración citoplásmica. En este sentido, la respuesta en  $[Ca^{2+}]_i$  a la ionomicina parece tener un componente mucho mayor de influjo de calcio extracelular que el componente de calcio intracelular liberado de las pozas, mientras que la respuesta a GnRH parece tener un componente de calcio de pozas intracelulares mucho más importante. Probablemente, para activar la exocitosis se requiera una concentración de calcio alta localizada cerca de la membrana plasmática, en los sitios de secreción y únicamente la ionomicina, introduzca una cantidad de calcio transmembranal suficiente para hacer que la  $[Ca^{2+}]_i$  en estos sitios alcance el umbral necesario para activar la exocitosis, mientras que el calcio liberado de las pozas intracelulares en respuesta a la GnRH no pudiera difundir hasta los sitios de localización de las vesículas, y la cantidad de calcio transmembranal que entra en respuesta a la

hormona no sea suficiente para alcanzar el umbral de activación de la exocitosis.

Una posibilidad complementaria para explicar la diferencia en la respuesta secretora a GnRH y a ionomicina es que las pozas intracelulares de calcio dependientes de IP3 tengan una localización alejada de la de los canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática y/o de los sitios donde se encuentran las vesículas de secreción. De esta manera, aunque la GnRH active los dos mecanismos de incremento de calcio, la concentración local en el sitio donde se encuentran las vesículas podría no ser suficiente para activar la exocitosis. Es bien conocida la importancia de la localización subcelular de las respuestas de calcio intracelular para activar el proceso de secreción (Neher y Augustine, 1990; Tse et al., 1997). Es probable también que en estas células las proteínas que intervienen en el transporte de los gránulos de secreción hacia la membrana y en su fusión con ésta tengan una sensibilidad al calcio disminuida y por esto la concentración de calcio que se alcanza con la estimulación de los receptores a GnRH no sea suficiente para desencadenar el proceso de exocitosis. Por su parte se espera que la ionomicina provoque la entrada de calcio a la célula de manera homogénea por toda la membrana plasmática, de modo que al sumarse esta entrada de calcio con el calcio liberado de las pozas intracelulares, podría alcanzarse una concentración regional mayor en el sitio donde están las vesículas de secreción y esto ser suficiente para activar la secreción. Si este fuera el caso, este sistema sería un claro ejemplo de que la  $[Ca^{2+}]_i$  local requerida para desencadenar la exocitosis es mucho mayor de lo que se cree actualmente por mediciones globales de la  $[Ca^{2+}]_i$ . La dificultad para detectar gradientes subcelulares en la  $[Ca^{2+}]_i$  ha llevado a pensar que las

concentraciones necesarias para activar procesos celulares como la secreción son relativamente pequeños. Esto puede ser resuelto actualmente con el uso del microscopio confocal, que permite una gran resolución espacial y el uso de células vivas para observar respuestas fisiológicas. Las determinaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el presente trabajo fueron realizadas en poblaciones celulares, por lo que las diferencias en las regiones subcelulares no son detectables, y únicamente se mide el promedio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en la población. Esto podría explicar la similitud en las respuestas de  $[Ca^{2+}]_i$  a GnRH y ionomicina que se observan tanto en los trazos como al comparar las áreas bajo la curva de los trazos obtenidos con cada tratamiento.

## VI. CONCLUSIONES

Tanto la GnRH como la ionomicina producen un incremento bifásico en la concentración intracelular de calcio, que consiste en una respuesta rápida y de corta duración que depende principalmente de la liberación de calcio de las pozas intracelulares seguida de una meseta sostenida que depende de la entrada de calcio extracelular.

La GnRH y la ionomicina, que presentan una respuesta muy similar en la  $[Ca^{2+}]_i$ , producen sin embargo una respuesta muy distinta en cuanto a secreción: mientras que la ionomicina la estimula significativamente, la GnRH es incapaz de activarla.

Estas observaciones sugieren que:

El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es necesario pero no es suficiente para la activación de la exocitosis y

Existe una diferencia cualitativa entre la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  producida por la ionomicina y la producida por la GnRH, que se traduce en una respuesta secretora distinta.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

-Anderson, L., J. Hoyland, W. Mason y K. Eidne, 1992. Characterization of GnRH calcium response in single  $\alpha$ T3-1 pituitary gonadotroph cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 86: 167-175.

-Augustine, G. y E. Neher, 1992a. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450: 247-271.

-Augustine, G. y E. Neher, 1992b. Neuronal  $Ca^{2+}$  signalling takes the local route. *Current Opinion in Neurobiology* 2: 302-307.

-Barnhart, K.M. y P. Mellon, 1994. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol. Endocrinol* 8 (7): 878-885.

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

-Beaven, M.A., D.F. Guthrie, J.P. Moore, G.A. Smith, T.R. Hesketh y J.C. Metcalfe, 1987. Synergistic signals in the mechanism of antigen-induced exocytosis in 2H3 cells: Evidence for an unidentified signal required for histamine release. *J. Cell Biol.* 105: 1129-1136.

-Ben-Menahem, D., Shraga, Z., Lewy, H., Limor, R., Hammel, I., Stein, R. y Naor, Z., 1992. Dissociation between release and gene expression of gonadotropin  $\alpha$ -subunit in GnRH stimulate  $\alpha$ T3-1 cell line. *Biochemistry* 31: 12893-12898.

-Ben-Menahem, D., Z. Shraga-Levine, R. Limor y Z. Naor, 1994. Arachidonic acid and lipoxygenase products stimulate gonadotropin alpha-subunit mRNA levels in pituitary alpha T3-1 cell line: role in gonadotropin releasing hormone action. *Biochemistry* 33 (43): 12795-12799.

-Bergsten, P, Grapengiesser, E., Gylfe, E., Tengholm, A. Y Hellam, B., 1994. Synchronous oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 269 (12): 8749-8753.

-Berridge, M.J., 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann.Rev. Biochem* 56:159-193.

- Bosma, M y B. Hille, 1992. Electrophysiological properties of a cell line of the gonadotrope lineage. *Endocrinology* 130: 3411-3420.
- Brazil, O. V. y M. D. Fontana, 1993. Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle fibre membrane. *Toxicon* 31(9): 1085-1098.
- Burgoyne, R., 1990. Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 647-659.
- Clarke, I.J. y J.T. Cummins, 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and Luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111: 1737-1739.
- Cochrane, D.E. y W.W. Douglas, 1974. Calcium-induced extrusion of secretory granules (exocytosis) in mast cells exposed to 48/80 or to the ionophores A-23187 and X-537<sup>a</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 408-412.
- Chang. J.P., Stojilkovic, S.S., Graeter, J.S. y Catt, K.J., 1988. Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* 123: 87-97.
- Childs, G.V., 1986. Funcional ultrastructure of gonadotropes: a review. *Current Topics in Neuroendocrinology* 7: 49-97.
- Damiani, E., G. Tobaldin, P. Volpe y A. Margreth, 1991. Quantitation on ryanodine receptor on rabbit skeletal muscle, heart and brain. *Biochemical and biophysical research communications* 175 (3): 858-865.
- Dolmetsch, R. Y Lewis, R., 1994. Signaling between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and depletion-activated Ca<sup>2+</sup> channels generates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in T Lymphocytes. *F. Gen. Physiol.* 103:365-388.
- Douglas, 1968. Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from cromaffin and other cells. *Br. J. Pharmac.* 34: 451-474.
- Feng, L., B. Pereira y N. Kraus-Friedmann, 1992. Different localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine binding sites in rat liver. *Cell calcium* 13: 79-87.

-Fink, G. 1988. "Gonadotropin secretion and its control" En: Knobil E. y Neill J. (eds) The physiology of reproduction. Raven Press Ltd., N.Y. pp 1349-1377.

-Foreman, J.C., M.B. Hallett y J.L. Mongar, 1977. The relationship between histamine secretion and <sup>45</sup>calcium uptake by mast cells. J. Physiol., Lond. 271: 193-214.

-Furiuchi, T., D. Simon-Chazottes, I. Fujino, , N. Yamada, M. Hasecawa, A. Miyawaki, S. Yoshikawa y K. Midoshiba, 1993. Receptors and channels 1: 11-24.

-Gilon, P, Shepherd, R y Henquin, J.C., 1993. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidenced in single pancreatic islets. J.Biol. Chem. 268 (30): 22265-22268.

-Goldbeter, A., G. Dupont y M.J. Berridge, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1461-1465.

-Guerineau, N., Bouali-Benazzouz, R., Corcuff, J.B., Audy, A.C., Bonnin, M. y Mollard, P., 1992. Transient but not oscillating component of the calcium mobilizing response to gonadotropin-releasing hormone depends on calcium influx in pituitary gonadotrophs. Cell Calcium 13: 521-529.

-Hamilton, S.L., R. Mejía Alvarez, M.D., Fill, M.J. Hawkes, K. Brush, W.P. Schilling y E. Stefani, 1989. <sup>3</sup>H-PN and <sup>3</sup>H-Ryanodine binding and reconstitution of ion channel activity with skeletal muscle membranes. Annalitical Biochemistry 183:31-41.

.Hehl, S., A. Golard y B. Hille, 1996. Involvement of mitochondria in intracellular calcium sequestration by rat gonadotropes. Cell Calcium 20 (6): 515-524.

-Hernandez-Cruz, A., F. Sala y P.R. Adams, 1990. Subcellular calcium transients visualized by confocal microscope in a voltage-clamped vertebrate neuron. Science 247: 858-862.

-Heyward, P., C.Chen y I.J. Clarke, 1995. Inward membrane currents and electrophysiological responses to GnRH in ovine gonadotropes. Neuroendocrinology 61: 609-621.

-Hopkins, C.R. y Walker, A.M., 1978. Calcium as a second messenger in the stimulation of luteinizing hormone secretion. Mol Cell Endocrinol 12: 189-208.

-Horn, F., Bilezikjian, L.M., Perrin, M.H., Bosma, M.M., Windle, J.J., Huber, K.S., Blount, A.L. Hille, B., Vale, W. y Mellon, P., 1991. Intracellular Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone in a Clonal Cell Line of the Gonadotrope Lineage. *Mol. Endocrinol.* 5: 347-355.

-Kanno, T., D. E. Cochrane y W. W. Douglas, 1973. Exocytosis (secretory granule extrusion) induced by injections of calcium into mast cells. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 51: 1001-1004.

-Katz, B. 1969. *The Release of neural transmitter substances.* Liverpool: Liverpool University Press.

-Keizer, J y G. De Young, 1992. Two roles for  $Ca^{2+}$  in agonist stimulated  $ca^{2+}$  oscillations. *Biophys. J.* 61(3): 649-660.

-Kukuljan, M., E. Rojas, K. Catt y S. Stojilkovic, 1994. Membrane potential regulates inositol 1,4,5-trisphosphate-controls cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations in pituitary gonadotrophs. *J. Biol. Chem.* 269: 4860-4865.

-Lane, D., 1998. *Antibodies, a laboratory manual.* Ed Harlow 421-466pp.

-Leong, D.A. y Thorner, M.O., 1991. A Potencial Code of Luteinizing Hormone-releasing Hormone-induced Calcium Ion Responses in the Regulation of Luteinizing Hormone Secretion among Individual Gonadotropes. *J. Biol. Chem.* 255 (14): 9016-9022.

-Leong, D. 1991. A model for intracellular calcium signaling and the coordinate regulation of hormone biosynthesis, receptors and secretion. *Cell calcium* 12: 255-268.

-Levine, J.E., K.F. Pau, V.D. Ramírez y G.L. Jackson, 1982. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 111(5): 1449-1455.

-Li, Y., J. Rinzel, J. Keizer y S. Stojilkovic, 1994. Calcium oscillations in pituitary gonadotrophs: comparison of experiment and theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.S.* 91:58-62.

-Linstedt, A.D. y R.B. Kelly, 1987. Overcoming barriers to exocytosis. *Trends in Neurosciences* 10 (11): 446-448.



-Lowry, O.H., O.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

-Lytton, J. Y Nigam, S., 1992. Intracellular calcium: molecules and pools. *Curr. Op. Cell. Biol.* 4: 220-226.

-Marian, J. y Conn, P.M., 1979. GnRH Stimulation of cultured pituitary cells requires calcium. *Mol. Pharmacol* 16: 196-201.

-Martínez de la Escalera G. P. Mellon y R. Weiner, 1991. Regulation of  $\alpha$ -glycoprotein hormone subunit release from aT3 cells by GnRH. 73<sup>rd</sup> Annual Meeting, The Endocrine Society, Washington DC. Abst 1707.

-Mason, D.R., K.K. Arora , L.M. Mertz y K. Catt, 1994. Homologous down-regulation of gonadotropin releasing hormone receptor sites and messenger ribonucleic acid transcripts in alpha T3-1 cells. *Endocrinology* 135(3): 1165-1170.

-McArdle, C.A. y Poch, A., 1992. Dependence of Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated Luteinizing Hormone Release upon Intracellular  $Ca^{2+}$  Pools is Revealed by Desensitization and Thapsigargin Blockade. *Endocrinology* 130: 3567-3574.

-Merelli, F., Stojilkovic, S., Iida, T., Krsmanovic, L., Zheng, L., Mellon, P. y Catt, K., 1992. GnRH-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 131: 925-932.

-Mossmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-59.

-Mueller, W. y J.A. Connor, 1991. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic  $Ca^{2+}$  responses. *Nature* 354: 73-76.

-Naor, Z., 1990. Signal transduction mechanisms of  $Ca^{2+}$  Mobilizing hormones: The case of Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocr. Rev.* 11 (2): 326-353.

-Penner, R. y E. Neher, 1988a. Secretory responses of rat peritoneal mast cells to high intracellular calcium. *FEBS Letts.* 226:307-313.

-Penner, R. y Neher, E., 1988b. The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J. exp. Biol.* 139: 329-345.

-Perrin, M.H., Bilezikjian, L.M., Hoeger, C., Donaldson, C.J., Rivier, J., Haas, Y. y Vale, W., 1993. Molecular and functional characterization of GnRH receptors cloned from rat pituitary and a mouse pituitary tumor cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191 (3): 1139-1144.

-Petersen, C.C., 1996. Store operated calcium entry. *Seminars in The Neurosciences* 8: 293-300.

-Pierce, J.G., 1988. Gonadotropin chemistry and biosynthesis. En: Knobil E. y Neill J.D. (eds.) *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 1335-1348.

-Pozzan, T, R. Rizzuto, P. Volpe y J. Meldolesi, 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews* 74 (3) 595-636.

-Ramabhadran, T., B. Reitz y D. Tiemeier, 1984. Synthesis and glycosilation of the common  $\alpha$  subunit of human glycoprotein hormones in mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81: 6701-6705.

-Rubin, R.P., L.E. Sink y F.J. Freer, 1981. Activation of (arachidonyl)phosphatidyl-inositol turnover in rabbit neutrophils by the calcium ionophore A23187. *Biochem.J.* 194: 497-505.

-Schwartzman, R. y Cidlowski, J., 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 14 (2): 133-151.

-Shah, B. y G. Milligan, 1994. The gonadotrophin-releasing hormone receptor of  $\alpha$ T3-1 pituitary cells regulates cellular levels of both of the phosphoinositidase C-linked G proteins,  $G_{\alpha\alpha}$  and  $G_{11\alpha}$ , equally. *Mol. Pharmacol.* 46: 1-7.

-Shraga-Levine, Z., D. Ben-Menahem y Z. Naor, 1994. Activation of protein kinase C beta gene expression by gonadotropin-releasing hormone in alpha T3-1 cell line. Role of  $Ca^{2+}$  and autoregulation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269 (49): 31028-31033.

-Smith, M.A. y Vale, W.W., 1981. Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 108: 752-759.

-Stea, A., T.W. Soong y T.P. Snutch, 1995. Voltage-gated calcium channels. *Handbook of receptors and channels*. CRC Press, Inc.

-Stern, J.E. y Conn, P.M., 1981. Perfusion of rat pituitaries: requirements of optimal GnRH-stimulated LH release. *Am. J. Physiol. (Endocrinol Metab)* 240:E504-E509.

-Stojilkovic, S., Kukuljan, M., Tomic, M., Rojas, E. y Catt, K., 1993. Mechanisms of agonist-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in pituitary gonadotrophs. *Journal of Biological Chemistry* 268: 7713-7720.

-Stojilkovic, S., M. Tomic, M. Kukuljan y K. Catt, 1994. Control of calcium spiking frequency in pituitary gonadotrophs by a single-pool cytoplasmic oscillator. *Mol. Pharmacol.* 45: 1013-1021.

-Stojilkovic, S., Reinhart, J y Catt, K., 1994. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors: Structure and Signal Transduction Pathways. *Endocr. Rev.* 15(4): 462-499.

-Thomas, P., A. Suprenant y W. Almers, 1990. Cytosolic  $Ca^{2+}$ , exocytosis and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. *Neuron* 5: 723-733.

-Tougaard, C. y Tixier-Vidal, A., 1994. Lactotropes and gonadotropes. In: Knobil E, Neill J.D. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp .

-Tse, A. y B. Hille, 1992. GnRH-induced  $Ca^{2+}$  oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. *Science* 255: 462-464.

-Tse, A. y B. Hille, 1993. Role of voltage-gated  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  channels in gonadotropin-releasing hormone-induced membrane potential changes in identified rat gonadotropes. *Endocrinology* 132 (4): 1475-1481.

-Tse, A., F.W. Tse y B. Hille, 1995. Modulation of  $Ca^{2+}$  oscillation and apamin-sensitive,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  current in rat gonadotropes. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.* 430:645-652.

-Tse, A., Tse, F.W., Almers, W. y Hille, B., 1993. Rhythmic Exocytosis Stimulated by GnRH-Induced Calcium Oscillations in Rat Gonadotropes. *Science* 260: 82-84.

-Tse, F.W., A. Tse, B. Hille, H. Horstmann y W. Almers, 1997. Local Ca<sup>2+</sup> release from internal stores controls exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* 18: 121-132.

-Tsien, R.W. and Tsien, R.Y., 1990. Calcium channels, stores and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 715-760.

-Tsien, R.Y., T. Pozzan y T.J. Rink, 1984. Measuring and manipulating cytosolic Ca<sup>2+</sup> with trapped indicators. *Trends biochem. Sci.* 9: 263-266.

-Vergara, L., S.Stojilkovic y El Rojas, 1995. GnRH-induced cytosolic calcium oscillations in pituitary gonadotrophs: phase resetting by membrane depolarization. *Biophys. J.* 69: 1606-1614.

-Walton, P., J.A. Airey, J.L. Sutko, C.F. Beck, G. A. Miknery, T.C. Südhof, T.J. Deerinck y M.H. Ellisman, 1991. Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in avian cerebellar purkinje neurons. *Journal of Cell Biology* 113 (5): 1145-1157.

-Weiss, J., K.A. Duca y W.F. Crowley, 1990. Gonadotropin-releasing hormone-induced stimulation and desensitization of free  $\alpha$ -subunit secretion mirrors luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 127:2364-2371.

-Windle, J., R.I. Weiner y P.L Mellon, 1990. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 4: 597-603.

-Zimanyi, I. e I. Pessah, 1991. Pharmacological characterization of the specific binding of <sup>3</sup>H-ryanodine to rat brain microsomal membranes. *Brain Research* 561: 181-191.