

Canales de K^+ en la señal celular del calcio

F. Barros, D. del Camino, L.A. Pardo y P. de la Peña

Departamento de Biología Funcional. Área de Bioquímica. Universidad de Oviedo.

Introducción

Desde los trabajos pioneros de Hodgkin y Huxley a principios de la década de los cincuenta^{1,2}, se ha hecho evidente que los canales de K^+ son responsables de la repolarización de los potenciales de acción mediados por Na^+ , Ca^{2+} , Na^+ y Ca^{2+} o Cl^- en células eléctricamente excitables. Sin embargo, los canales de K^+ aparecen ampliamente distribuidos tanto en células eléctricamente excitables como en las no excitables, y en los últimos años está cada vez más claro que además de su ubicuidad, poseen un importante papel en la producción y/o el control de una gran variedad de respuestas en prácticamente todos los tipos celulares. Así, aparte de su capacidad para modular el patrón de disparo neuronal y de su papel en la codificación e integración de las señales neuronales, los canales de K^+ son componentes esenciales de los sistemas que controlan en todo tipo de células la homeostasis del Ca^{2+} celular, los procesos contráctiles y secretores o el volumen celular.

Desde hace más de 2 décadas se ha reconocido también un importante papel del Ca^{2+} intracelular como mediador en el denominado «proceso de acoplamiento estímulo-secreción»³. Tanto en tejidos eléctricamente excitables clásicos (nervio y músculo) como en células neuroendocrinas o exocrinas, el Ca^{2+} es ampliamente utilizado como mediador intracelular. Esto ha conllevado la aparición de una gran variedad de procesos celulares dedicados al control eficiente de la homeostasis del Ca^{2+} . Entre ellos se incluyen sistemas de entrada de Ca^{2+} extracelular (p. ej., canales de Ca^{2+} operados por receptor o por voltaje), sistemas de salida del Ca^{2+} citoplásmico al medio externo (p. ej., Ca^{2+} -ATPasas e intercambiadores Na^+ - Ca^{2+}) y mecanismos de almacenamiento de Ca^{2+} (p. ej., orgánulos como el retículo sarcoplásmico, el retículo endoplásmico o las mitocondrias). Sin embargo, junto a estos sistemas de control directo de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico, existen otros, como los canales de

K^+ que, aunque de modo indirecto, modulan de forma esencial la homeostasis del Ca^{2+} celular. Así, estos canales aportan una vía de repolarización para las células despolarizadas manteniendo, pues, el potencial de membrana basal. La hiperpolarización celular debida a la apertura de canales de K^+ , tiende a eliminar el flujo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, y estimula la salida de Ca^{2+} a través de los intercambiadores Na^+ - Ca^{2+} electrogénicos. Inversamente, el bloqueo de los canales de K^+ con la subsiguiente despolarización del potencial de membrana celular promueve la apertura de canales de Ca^{2+} y aumenta la excitabilidad celular. No obstante, es importante constatar que en células no excitables eléctricamente (p. ej., linfocitos, células endoteliales^{4,5}) dicha despolarización puede causar una reducción del flujo de Ca^{2+} desde el medio externo a través de canales independientes de voltaje, debido a la disminución del gradiente electroquímico de Ca^{2+} . En células como las de los epitelios especializados en procesos de transporte de fluidos y electrólitos, las variaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son un parámetro importante de control del proceso secretor. En este caso, además de su posible papel en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} , los canales de K^+ son esenciales para funciones como: 1) el reciclado del K^+ co-transportado con los iones secretados a través del epitelio⁶; 2) la repolarización de la membrana celular, necesaria para el mantenimiento de los gradientes electroquímicos requeridos para la energización de los flujos pasivos de iones⁷ o del transporte acoplado de iones y solutos⁸, y 3) la prevención de los grandes cambios de volumen celular causados por las rápidas variaciones en las tasas de transporte transcelular^{7,8}.

La aparición de la técnica de *patch-clamp* en sus distintas configuraciones a comienzos de los años ochenta⁹ hizo posible la caracterización de los canales iónicos presentes en una enorme variedad de células, así como el conocimien-

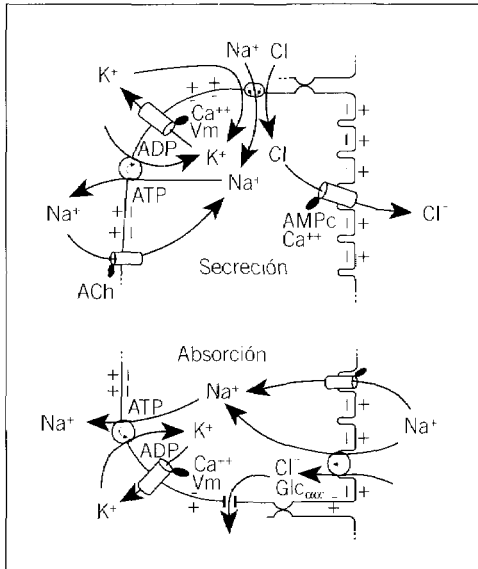


Fig. 1. Modelo esquemático de los componentes celulares clave en el control de movimientos iónicos durante los procesos absorptivo-secretorios en células epiteliales. Nótese la participación en el proceso secretor de canales de Cl^- regulados por segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc) y situados en el polo luminal de la célula. Así mismo, se destaca la importancia de canales de K^+ en la membrana basolateral operados por Ca^{2+} y/o voltaje. Para más explicaciones, véase el texto; Glc: glucosa; $\alpha\alpha$: aminoácidos; ACh: acetilcolina; Vm: potencial de membrana.

to de la contribución de cada uno a las corrientes celulares totales. Estos conocimientos han sido complementados a partir de alrededor de 1985 mediante el uso de dicha técnica para obtener información acerca de los mecanismos de generación de señales por medio del Ca^{2+} citoplasmático. La comprobación de los efectos de la activación de distintos receptores, la introducción en el interior celular de distintos mensajeros o sus análogos, la combinación de los registros de *patch-clamp* con el uso de colorantes fluorescentes y, más recientemente quizá, la imbricación de la citada técnica con poderosas herramientas como la biología molecular, han permitido un acelerado avance en el campo de la transducción de señales incluidas, por supuesto, las mediadas por Ca^{2+} . A continuación se resumen algunos de los resultados y conclusiones obtenidos en nuestro laboratorio en los últimos años, centrados en las características y el posible papel de algunos canales de K^+ en las señales celulares mediadas fundamental-

mente por Ca^{2+} en células adenohipofisarias, así como por Ca^{2+} y/o AMPc en epitelios secretorios.

Canales de K^+ en epitelios secretorios de fluidos y electrolitos

A pesar de la existencia de excepciones a esta regla, podría afirmarse que mientras la mayoría de las células endocrinas poseen la capacidad de generar potenciales de acción, las células epiteliales carecen de dicha capacidad⁶. Sin embargo, los epitelios absorptivo-secretorios de muchos tejidos (glándula salival, intestino, glándula sudorípara, páncreas exocrino, mucosa gástrica, córnea, glándula lacrimal y epitelio traqueal, entre otros), están sometidos a un estricto control nervioso y/o hormonal. En la mayor parte de estos tejidos, la activación hormonal o nerviosa de la secreción desencadena un incremento en la conductancia de la membrana luminal al Cl^- . El esquema simplificado de la figura 1 muestra, dejando aparte las evidentes variaciones particulares existentes entre distintos epitelios, un modelo general de los componentes claves en el control del transporte de electrolitos durante los procesos absorptivo-secretorios transepiteliales. Aunque incompleto, el modelo destaca la necesidad de un aporte de Cl^- a través de la membrana basolateral durante la secreción que compense el flujo del anión promovido por los mensajeros intracelulares (Ca^{2+} , AMPc) a través de la membrana luminal, y que asegure el mantenimiento de la tasa secretora durante un período de tiempo adecuado. Este aporte de Cl^- es realizado en muchos casos mediante la operación de un sistema de cotransporte $Na^+ -K^+ -Cl^-$, dependiente del gradiente de Na^+ y, por ello, de la operación de la $Na^+ -K^+ -ATPasa$ selectivamente localizada en la membrana basolateral. El funcionamiento adecuado del sistema necesita, sin embargo, de un componente adicional, es decir, un canal de K^+ situado en la membrana basolateral que permita: a) el drenaje del posible exceso intracelular de K^+ aportado por el cotransportador $Na^+ -K^+ -Cl^-$ y la $Na^+ -K^+ -ATPasa$; b) el aporte de K^+ al espacio extracelular que asegure la operación correcta del sistema de cotransporte $Na^+ -K^+ -Cl^-$, y c) el mantenimiento del potencial de membrana celular negativo en el interior, que compense el flujo de cargas negativas producido por la salida de los iones Cl^- y que mantenga así el gradiente electroquímico del anión asegurando el flujo continuado de este a través de la membrana luminal.

Dependiendo del tipo de epitelio considerado y del tipo de secretagogo implicado en la secreción, un control primario del proceso secretor es ejercido mediante la regulación de la apertura de los canales de Cl⁻ luminales por variaciones en las concentraciones citoplasmáticas de Ca²⁺ y/o AMPc. Sin embargo, la existencia en un gran número de epitelios de un canal basolateral de K⁺ dependiente de Ca²⁺ y voltaje (frecuentemente del tipo maxi-K) asegura, así mismo, la coordinación del funcionamiento polarizado luminal-basolateral del epitelio. Bajo condiciones iónicas normales, pues el secretagogo tenderá a producir una corriente de Cl⁻ a través de la membrana luminal y una corriente de salida de K⁺ a través de la basolateral, complementadas con un flujo paracelular de Na⁺ hacia el lumen eléctricamente negativo y a través de las uniones intercelulares permeables, así como un flujo transepitelial de agua promovido por el gradiente osmótico generado.

La aplicación al epitelio ciliar ocular de un esquema como el descrito es complicada por la particular organización anatómica de aquél. Este epitelio, especializado en la producción del humor acuoso, está formado por 2 capas celulares, la pigmentada y la no pigmentada, enfrentadas por sus membranas apicales y conectadas por desmosomas y *uniones gap*. Esta complicada estructura ha dificultado enormemente la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la formación del humor acuoso. También resulta evidente que la orientación de ambas capas supone el funcionamiento de la capa no pigmentada como un epitelio típicamente secretor, y el de la pigmentada como un epitelio absorbivo.

Los estudios iniciales en preparaciones de iris-cuerpo ciliar revelaron la existencia de conductancias a K⁺ dependientes de Ca²⁺ y bloqueables por Ba²⁺, así como el importante papel secretor de la capa no pigmentada. La existencia de conductancias a K⁺ bloqueables por Ba²⁺ fue posteriormente demostrada en células pigmentadas. Sin embargo, la realización de estudios similares en células no pigmentadas ha sido limitada por la escasa tasa de proliferación de dichas células en cultivo, especialmente de las células de origen humano. En nuestro laboratorio hemos utilizado una línea celular de epitelio ciliar humano que retiene la mayoría de las propiedades eléctricas del epitelio intacto y de las células no pigmentadas en cultivo primario, obtenida por transformación viral en el laboratorio del Dr. Coca-Prados¹⁰. Nuestros resultados¹¹ nos han permitido obtener una evi-

dencia directa de la presencia de canales de K⁺ de gran conductancia (203 ± 20 pS [n=6] con concentraciones simétricas de K⁺ a ambos lados de la membrana) activados por Ca²⁺ y voltaje. Las características de dichos canales, los detectados más frecuentemente en parches de membrana de las células utilizadas, los colocan en la familia de los maxi-K. Del estudio de su operación *in situ* hemos podido deducir también que las células cultivadas mantienen un potencial de membrana basal de -36 ± 9 mV (n=10). Las propiedades de activación por Ca²⁺ y bloqueo por Ba²⁺ dependiente de voltaje son coherentes con la hipótesis de que estos canales tienen un importante papel en los procesos secretores que participan en la formación del humor acuoso. No obstante, puesto que no ha sido posible demostrar si las células cultivadas mantienen su polarización anatómica, la localización precisa de los canales estudiados no ha podido ser determinada. Así mismo, hemos podido detectar otros canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ de menor conductancia y también bloqueables por Ba²⁺¹¹. Es, pues, evidente que tras la detección de estas entidades moleculares, el conocimiento de la importancia relativa de los distintos canales de K⁺ en la secreción de fluidos y electrólitos por el epitelio ciliar requeriría una investigación mucho más detallada. Algo parecido podría decirse de los mecanismos por los que distintos efectores fisiológicos regulan el funcionamiento de los canales iónicos en las células del epitelio, controlando con ello la secreción del humor acuoso.

La actividad eléctrica en la señal del Ca²⁺ y en la función secretora de células endocrinas

Un gran número de células endocrinas almacenan sus productos de secreción principalmente en gránulos o vesículas secretoras. Existen actualmente amplias evidencias tanto bioquímicas como morfológicas de que, aunque estas células son estimuladas por distintos factores externos y secretan distintos productos, los secretan por la vía de un proceso común, la exocitosis. En la mayoría de las células endocrinas, la exocitosis requiere iones Ca²⁺ y la elevación de las concentraciones del catión en el citoplasma dispara o contribuye al proceso secretor. La alteración de la concentración de Ca²⁺ intracelular se produce esencialmente mediante tres mecanismos: a) incremento de la entrada de Ca²⁺ extracelular por aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca²⁺; b) movili-

zación de Ca^{2+} contenido en depósitos intracelulares, y c) disminución de la salida del Ca^{2+} intracelular por el intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ o por la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática. Los tres mecanismos han sido identificados en células endocrinas o neuroendocrinas. La contribución de cada uno al proceso secretor varía dependiendo del tipo de célula o de estímulo considerado. Sin embargo, en células productoras de potenciales de acción con un componente de Ca^{2+} , el control de la frecuencia y/o duración de dichos potenciales parece desempeñar un importante papel en el acoplamiento estímulo-secreción. Así, si bien la situación resulta más variada y compleja en las células endocrinas, la entrada de Ca^{2+} unida a los potenciales de acción puede resultar crucial para el control de la elevación de Ca^{2+} intracelular ligada a la exocitosis, de forma similar a la descrita para la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas. Finalmente, junto a un papel directo en la secreción de la entrada de Ca^{2+} debida a un incremento en actividad eléctrica, dicha entrada puede resultar en un aporte de Ca^{2+} citoplasmático que 1) amplifique la magnitud, la duración y la distribución espacial de las señales de Ca^{2+} originadas por la liberación del catión de depósitos intracelulares, y 2) constituya en células excitables un mecanismo de recarga de los depósitos intracelulares, vaciados tras la interacción con la célula de determinados agonistas que generen mensajeros que movilicen Ca^{2+} de los citados depósitos.

Regulación hormonal de la respuesta secretora en células GH_3 de hipófisis anterior

La hormona liberadora de tirotrina (TRH) tiene un importante papel neuroendocrino en la hipófisis anterior, estimulando la liberación de TSH en células tirotróficas de todas las especies de mamífero estudiadas, así como la síntesis y secreción de prolactina en células lactotrofas²⁻¹⁴. Debido a la complejidad del análisis de los datos derivados de hipófisis normales, una parte sustancial de lo que se conoce sobre los mecanismos de acción de factores hipotalámicos como la TRH se ha obtenido estudiando líneas celulares transformadas, de las cuales la línea lactotrofa/somatotrofa GH_3 está entre las más utilizadas. La unión de la TRH a su receptor específico desencadena en las células GH_3 una serie de acontecimientos que incluyen la interacción del complejo hormona-

receptor con una proteína del tipo $\text{G}_{\alpha 11}$ ^{15,16}, seguida de una activación de la fosfolipasa C. Esta activación da lugar a la producción de dos segundos mensajeros, inositol (1,4,5) trifosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Estos efectos se acompañan con una clara modificación bifásica de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , de la actividad eléctrica celular y de la secreción de prolactina y hormona del crecimiento^{17,19}. Así, la adición de TRH produce inicialmente una rápida elevación de las concentraciones de Ca^{2+} , debida a la liberación del ion de depósitos intracelulares, que causa una rápida y transitoria estimulación de la secreción, así como una fase inicial de hiperpolarización transitoria debida a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Esta primera fase es seguida de otra en la que la conductancia basal de la membrana se reduce por inhibición de canales de K^+ y en la que tanto la frecuencia de producción como la duración de los potenciales de acción es incrementada. Dado que los potenciales de acción de las células GH_3 son de Ca^{2+} , esta segunda fase de actividad eléctrica incrementada causa una elevación sostenida de las concentraciones intracelulares del catión divalente, fundamentalmente por entrada desde el medio extracelular, acompañada de una secreción hormonal mantenida.

La modulación por TRH de ciertos canales de Ca^{2+} o K^+ no es la causa primaria del incremento de la actividad eléctrica

Los mecanismos implicados en la producción incrementada de potenciales de acción por la TRH y las conductancias concretas causantes de este efecto no eran conocidos. El carácter dual de la cascada basada en la activación de la fosfolipasa C, junto con experimentos fundamentalmente bioquímicos, ha llevado a sugerir que la activación de la proteincinasa C (PKC) está implicada en los efectos mantenidos de la TRH, incluyendo la modulación de la actividad de los canales de K^+ que determinan la tasa de disparo. Sin embargo, aún no ha podido demostrarse ningún efecto de la PKC en una conductancia a K^+ concreta en células GH_3 . Mediante experimentos de *clamp* de voltaje utilizando la configuración de «célula entera» de la técnica de *patch-clamp*, se ha descrito la atenuación de corrientes de K^+ dependientes de voltaje (del tipo denominado I_{Kv}) en células GH_3 ²⁰. Así mismo, tanto en nuestro laboratorio como en otros, se ha comprobado mediante ex-

perimentos en condiciones de «parche perforado» la reducción por TRH de corrientes de K⁺ activadas por Ca²⁺ y voltaje^{21,22}, así como de la actividad de los canales de Ca²⁺ tipo L^{22,24}. No obstante, es improbable que la reducción de cualquiera de estas corrientes sea la causa primaria de la segunda fase de hiperexcitabilidad porque:

1. El descenso de las corrientes activadas por despolarización y la dependencia de voltaje de las mismas difícilmente podrían explicar los rápidos cambios en el potencial y la resistencia basal que causan la leve despolarización que conlleva el incremento en la frecuencia de los potenciales de acción.

2. La disminución de la corriente I_{Kv} no ha sido detectada de forma consistente ni aun en condiciones de «*clamp* de célula entera», en las cuales, por otro lado, es difícilmente observable el incremento en la frecuencia de producción de potenciales de acción²¹. Además, dicha disminución no es detectable en condiciones de «parche perforado», en las que la respuesta hormonal es preservada en su totalidad^{21,22}.

3. La reducción de las corrientes de Ca²⁺, que a su vez origina la disminución de las corrientes de K⁺ dependientes de Ca²⁺, es aún difícil de reconciliar con la tasa incrementada de producción de potenciales de acción de Ca²⁺ y con los valores elevados del catión producidos durante la segunda fase de acción de la TRH.

Se ha sugerido que la inhibición de las corrientes de Ca²⁺ podría dar lugar indirectamente a una reducción en la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y, con ello, el aumento en la excitabilidad celular^{22,23}. Si bien es posible que la reducción de estas corrientes sea un importante determinante de la disminución de las tasas de despolarización y/o repolarización, y con ello en el aumento de la duración de las espigas, probablemente no constituya un factor crucial en la regulación de los intervalos entre espigas, es decir, de su frecuencia de producción. Así: a) los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ de alta conductancia parecen desempeñar un papel fundamental en la repolarización de las espigas, pero no en la regulación de los intervalos entre espigas^{25,26}; b) tras el tratamiento de las células GH₃ con ácido okadaico (OKA, un inhibidor de proteinofosfatasa de los tipos 1 y 2A), no ha podido detectarse incremento en la reducción por TRH de ningún componente de corriente de K⁺ dependiente de Ca²⁺ ni de los canales de Ca²⁺ tipo L.

Sin embargo, el efecto de la TRH sobre la actividad eléctrica sí es manifiestamente potenciado por el tratamiento con OKA^{27,28}, y c) la reducción de las corrientes de Ca²⁺ tipo L no es afectada por el tratamiento de las células GH₃ con toxina del cólera (CT). Sin embargo, de nuevo el efecto de la TRH sobre la actividad eléctrica se incrementa y su reversibilidad se antagoniza por dicho tratamiento²⁴.

Papel crucial de la corriente de K⁺ rectificadora anómala en el control de la excitabilidad celular de las células GH₃ y mecanismos implicados en su modulación por TRH

Contrariamente a lo que ocurre con la reducción de las corrientes de Ca²⁺ tipo L (e indirectamente, pues, con la de las corrientes de K⁺ dependientes de Ca²⁺), existe una correlación directa entre los efectos de la hormona sobre la corriente de K⁺ «rectificadora anómala» y la alteración de las tasas de disparo. Dicha corriente y su reducción por TRH fueron originalmente descritas por Bauer et al.²⁹. Sin embargo, la interpretación de sus resultados, obtenidos en condiciones de «*clamp* de célula entera» convencional es complicada por la rápida pérdida de los efectos de la TRH sobre la actividad eléctrica y sobre las corrientes iónicas bajo estas condiciones experimentales. De hecho, la reducción de esta corriente por TRH resulta irreversible en esta situación técnica, probablemente por la pérdida de factores citoplásmicos necesarios para restaurar el estado normal de los canales. Mediante el uso de la variante de «parche perforado», en nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que indican que la reducción de la corriente rectificadora anómala constituye el punto más importante de control por TRH de la excitabilidad celular. Así mismo, la introducción de distintos compuestos y enzimas en el interior celular en condiciones de «*clamp* de célula entera» nos ha permitido concluir que la regulación de la corriente por la hormona es ejercida mediante un mecanismo de fosforilación/desfosforilación. Si bien la naturaleza de la proteinquinasa implicada no es conocida aún, hemos podido demostrar que la proteinofosfatasa 2A es la enzima encargada de revertir los efectos de la hormona sobre la citada corriente. Estas conclusiones están basadas en los siguientes datos:

1. Las características cinéticas de la corriente de K⁺ rectificadora anómala la convierten en

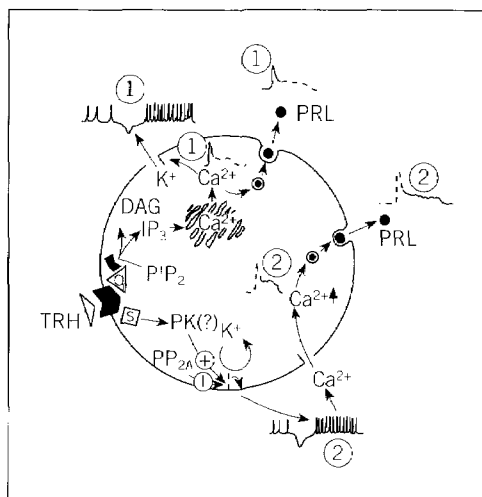


Fig. 2. Modelo esquemático de los componentes moleculares implicados en el acoplamiento estímulo-secreción a la TRH en células adenohipofisarias GH₃. La unión de la hormona a su receptor provoca: a) la activación de una fosfolipasa C por vía de una proteína G con la subsiguiente producción de inositol (1, 4, 5) trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a partir del fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PAP²). La interacción del IP₃ con un receptor situado en la membrana de depósitos intracelulares de Ca²⁺ causa la liberación del catión al citoplasma, que a su vez origina una primera fase de secreción transitoria de prolactina (PRL) acompañada de una hiperpolarización de la membrana plasmática por apertura de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, y b) la activación de una proteincinasa (PK(?) K⁺) de identidad aún desconocida que, mediante la inhibición por fosforilación de canales de K⁺ del tipo rectificador anómalo, origina la producción incrementada de potenciales de acción, con la subsiguiente entrada de Ca²⁺ extracelular al citoplasma y la generación de una segunda fase de secreción mantenida. Nótese la existencia de un mecanismo de recontrol de la operación de los canales de K⁺ mediante la operación de la proteínfosfatasa 2A (PP_{2A}).

un candidato óptimo para actuar como un regulador de potencial a valores cercanos al potencial de membrana celular basa^{27,29}.

2. Las reducciones en la corriente se extienden durante períodos de tiempo coincidentes con aquellos en los que se produce el incremento en la actividad eléctrica^{21,24,27,28}.

3. El aumento del bloqueo de la corriente producido por la TRH tras la incubación con OKA se correlaciona con un incremento en el efecto de la hormona sobre la actividad eléctrica^{27,29}.

4. Un aumento similar al que se acaba de indicar tanto en la inhibición de la corriente como en los incrementos en actividad eléctrica se produce tras el tratamiento de las células con CT^{24,30}.

5. Únicamente la reducción de la corriente rectificadora anómala por TRH, pero no las reducciones de corrientes de Ca²⁺ o de K⁺ dependientes de Ca²⁺ es potenciada por el tratamiento de las células con OKA o con CT^{24,27}.

6. La adición de TRH produce un desplazamiento del voltaje de inactivación de la corriente rectificadora anómala hacia potenciales menos negativos^{27,29}.

7. La incubación de las células GH₃ con CT produce una reducción de la tasa de oscilación de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular asociada con la actividad eléctrica. Bajo estas condiciones, la dependencia de voltaje de inactivación de la corriente rectificadora anómala es desplazada hacia potenciales más negativos²⁴.

8. La potenciación de la inhibición de la corriente rectificadora anómala por OKA indica que las reducciones en la misma causadas por la TRH son producidas mediante un mecanismo de fosforilación. La presencia de tal mecanismo es confirmada por la práctica anulación del efecto de la hormona al dializar el interior celular con un análogo de ATP incapaz de donar su fosfato gamma en reacciones de fosforilación³⁰.

9. La inhibición irreversible de la corriente observada en condiciones de «clamp de célula entera» convencional puede ser convertida en reversible de modo específico al dializar el interior celular con medios conteniendo la subunidad catalítica de la proteínfosfatasa 2A³⁰.

A partir del estudio de los efectos causados por el tratamiento con CT, y dado que los efectos de la toxina se producen por un mecanismo independiente de alteraciones en las concentraciones de AMP-cíclico celular hemos podido deducir así mismo, que junto a la activación de la fosfolipasa C por una proteína G insensible a modificación por CT y toxina pertúsica (es decir, del tipo G_{q/11}^{16,17}), la TRH causa la inhibición de la corriente rectificadora anómala (y con ello el incremento de la actividad eléctrica) mediante el acoplamiento de su receptor a una proteína modificable por CT (probablemente del tipo G_s)^{24,30}.

Los conocimientos que hemos expuesto acerca de las células GH₃, se recogen de forma esquemática en el modelo mostrado en la figura 2. Es importante destacar que, si bien aplicable de forma estricta a la TRH y a estas células, es muy

probable que muchos de los aspectos considerados hasta aquí sean aplicables a otros tipos celulares. En cualquier caso, tras el estudio de los modelos celulares que hemos considerado, es evidente que la operación de los canales de K⁺ y su modificación por distintos factores neurohormonales pueden resultar cruciales en la generación de señales de Ca²⁺ y en la regulación de la actividad secretora de muy diversos tipos celulares.

Agradecimiento

Los trabajos presentados han sido financiados con cargo a los Proyectos de Investigación PB87-1046 y PB90-0789 de la CICYT, así como por la concesión de una Beca de Investigación y un Contrato de Reincorporación de la FICYT y el MEC a D. del Camino y L.A. Pardo, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Hodkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loigo*. *J Physiol* 1952; 116: 473-496.
- Hodkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117: 500-544.
- Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 1968; 34: 451-474.
- Mason MJ, Mahaut-Smith MP, Grinstein S. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of the plasma membrane Ca²⁺ permeability of unstimulated rat lymphocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 10.872-10.879.
- Laskey RE, Adams DJ, Cannell M, Van Breemen C. Calcium entry-dependent oscillations of cytoplasmic calcium concentration in cultured endothelial cell monolayers. *Proc natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1.690-1.694.
- Petersen OH, Maruyama Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 1984; 307: 693-696.
- Welsh MJ, McCann JD. Intracellular calcium regulates basolateral potassium channels in a chloride-secreting epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8.823-8.826.
- Schultz SG. Homocellular regulatory mechanism in sodium-transporting epithelia: avoidance of extinction by «flush-through». *Am J Physiol* 1981; 241: F579-F590.
- Hamill OP, Marty E, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
- Martín-Vasallo P, Ghosh S, Coca-Prados M. Expression of Na, K-ATPase alpha subunit isoforms in the human ciliary body and cultured ciliary epithelial cells. *J Cell Physiol* 1989; 141: 243-252.
- Barros F, López-Briones LG, Coca-Prados M, Belmonte C. Detection and characterization of CA²⁺-activated K⁺ channels in transformed cells of human non-pigmented ciliary epithelium. *Curr Eye Res* 1991; 10: 731-738.
- Reichlin S. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. En: Wilson JD, Foster DW, editores. *Williams textbook of endocrinology*. Filadelfia: Saunders, 1985; 492-548.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog Neurobiol* 1989; 33: 399-447.
- Lamberts SWJ, McLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990; 70: 279-318.
- Hsieh KP, Martin TFJ. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine trisphosphate-binding proteins G_α and G_β. *Mol Pharmacol* 1992; 6: 1.673-1.681.
- Aragay AM, Ketz A, Simon MI. The G_α and G_β proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in rat GH₃ rat pituitary cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 24.983-24.988.
- Ozawa S, Sand O. Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol Rev* 1986; 66: 887-952.
- Drummond AH. The pituitary gland and its constituents cells. En: Michell RH, Drummond AH, Bushfield M, MacPhee CH, editores. *Inositol lipids in cell signalling*. Londres: Academic Press, 1989; 355-375.
- Gershengorn MC. Role of inositol lipid second messengers in regulation of secretion: studies of thyrotropin-releasing action in pituitary cells. En: Oxford GS, Armstrong CM, editores. *Secretion and its control*. Nueva York: Rockefeller University Press, 1989; 1-15.
- Dubinsky JM, Oxford GS. Dual modulation of K channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4.282-4.286.
- Barros F, Delgado L, Maciá C, De la Peña P. Effects of hypothalamic peptides on electrical activity and membrane currents of «patch perforated» clamped GH₃ anterior pituitary cells. *FEBS Lett* 1991; 279: 33-37.
- Simasko SM. Reevaluation of the electrophysiological actions of thyrotropin-releasing hormone in a rat pituitary cell line (GH₃). *Endocrinology* 1991; 128: 2.015-2.026.
- Kramer RH, Kaczmarek LK, Levitan ES. Neuropeptide inhibition of voltage-gated calcium channels mediated by mobilization of intracellular calcium. *Neuron* 1991; 6: 557-563.
- Barros F, Villalobos C, García-Sancho J, Del Camino D, De la Peña P. The role of the inwardly rectifying K⁺ current in resting potential and

- thyrotropin-releasing-hormone-induced changes in cell excitability of GH₃ rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 1994. En prensa.
25. Lang DG, Ritchie AK. Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels in a pituitary cell line. *J Physiol (Lond)* 1990; 425: 117-132.
 26. Lang DG, Ritchie AK. Tetraethylammonium ion sensitivity of a 35-pS Ca²⁺ activated K⁺ channel in GH₃ cells that is activated by thyrotropin-releasing hormone. *Pflügers Arch* 1990; 415: 704-709.
 27. Barros F, Delgado LM, Del Camino D, De la Peña P. Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K⁺ current in patch-perforated GH₃ anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 1992; 422: 31-39.
 28. Delgado LM, De la Peña P, Del Camino D, Barros F. Okadaic acid and calyculin A enhance the effect of thyrotropin-releasing hormone on GH₃ rat anterior pituitary cells excitability. *FEBS Lett* 1992; 311: 41-45.
 29. Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR. An inward-rectifying K⁺ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. *J Physiol (Lond)* 1990; 429: 169-189.
 30. Barros F, Mieskes G, Del Camino D, De la Peña P. Protein phosphatase 2A reverses inhibition of inward rectifying K⁺ currents by thyrotropin-releasing hormone in GH₃ pituitary cells. *FEBS Lett* 1993; 336: 433-439.

DISCUSIÓN

A.G. GARCIA: Me pregunto si la movilización de calcio intracelular a priori por TRH no puede estar activando estos canales de potasio calcio-dependientes y ser motivo de esta hiperpolarización. Por otra parte, no acabo de entender todavía la vinculación con ese fenómeno de hiperexcitabilidad que da lugar después a la selección de canales de calcio y a la secreción. Algo parecido ocurre en la célula cromafín de gato donde los agonistas muscarínicos producen una respuesta secretora y no se conoce bien cómo se produce eléctricamente, lo que sí sabemos es que los agonistas muscarínicos generan una señal de calcio intracelular por movilización de calcio intracelular y que activan una corriente de potasio de pequeña conductancia calcio-dependiente. Lo que por el momento se desconoce es si existe un canal de cloro involucrado que pueda producir una despolarización subsiguiente por salida de cloro y eso generar potenciales de acción y reclutamiento de canales de calcio. Quisiera preguntarle: ¿existe alguna analogía entre este sistema que describo en la célula cromafín con el receptor muscarínico y la TRH en la hipófisis anterior?

F. BARROS: No existe una correlación entre la denominada fase 1 producida por la liberación de calcio en depósitos y la fase 2, y parece que los dos mecanismos son independientes. Respecto a si puede haber en otros tipos de células mecanismos parecidos, creo que en cada tipo de célula la hiperexcitabilidad se podrá dar de forma distinta.

W. BUÑO: En el experimento que mostró de *current clamp* se observan potenciales de acción e inmediatamente después de la hiperpolarización las espigas son más pequeñas, lo que apoya un aumento de conductancia durante este tiempo. Sin embargo, propone que se están cerrando canales de potasio, y que la despolarización que ve y el aumento de la actividad es por un cierre de los canales de potasio. Creo que debe intervenir algún otro factor, por ejemplo, activación de canales de calcio ya que de otro modo no se explica que las espigas sean más pequeñas de tamaño. Por otra parte, me gustaría que aclarara algunas cuestiones relativas al rectificador anómalo. La primera es cómo un bloqueo de un rectificador anómalo logra aumentar la actividad y, la segunda, ¿cómo es que después de que termine el curso hiperpolarizante con el que activa, el rectificador anómalo tiene una tremenda cca de entrada?, y ¿qué es esa cola de entrada?

F. BARROS: Para la obtención de estos registros se aplicó una considerable cantidad de filtrado, a efectos de observar frecuencias de espiguelo en períodos largos de tiempo porque, de lo contrario, sería absolutamente imposible obtener 30 min de registro, debido a limitaciones en la capacidad del ordenador. Por otra parte, los potenciales de acción durante la fase 2 no son cinéticamente iguales a los que la célula tiene antes de añadir TRH, sino que son bastante más anchos, tienen una despolarización y una repolarización bastante más

lenta, de tal forma que aparte de que haya más potenciales de acción se debe considerar también la posibilidad de que los propios canales de calcio que en parte se encuentran bloqueados estén abiertos durante mucho más tiempo, y que la señal del calcio verdaderamente pueda ser bastante mayor.

En cuanto a la cola de entrada, la explicación es muy sencilla; estas células tienen una corriente de potasio voltaje dependiente, que cuando se mantiene un potencial de membrana fijo de entre -20 y 0 mV está totalmente inactivada, pero durante 500 , 600 ms o 1 s de hiperpolarización que se utiliza para ver el rectificador anómalo esta corriente se reactiva, y al volver a -10 , o 0 o -20 mV, se ve la cola que se debe a la operación de los canales de potasio voltaje dependientes que, por

cierto, no se modifica con TRH ni con otra serie de fármacos. Es un control interno que nos puede servir, y por eso hacemos el experimento y mantenemos esa cola ahí para saber si el efecto es realmente específico sobre el rectificador o existen problemas de resistencia en serie u otro tipo de problemas que modifiquen otras conductancias, y específicamente este canal dependiente de voltaje.

J. GARCIA-SANCHO: Quisiera insistir en un punto que usted ha mencionado al principio. En células no excitables la apertura de canales de potasio o de cloruro es importante para mantener el gradiente electroquímico para que el calcio pueda entrar, es decir, si el calcio entra y esa entrada es electrogénica y se colapsa el gradiente, eso mismo detiene la entrada.