



# UNIVERSIDAD VERACRUZANA

---

---

## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN CÉLULAS SOMATOTROPAS DE ORIGEN BOVINO TRATADAS CON GHRELINA

#### TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MAESTRA EN CIENCIA ANIMAL**

PRESENTA:

**MVZ. ADASUÉ MAGDALENO MÉNDEZ**

DIRECTORES:

**DIRECTOR: DR. BELISARIO DOMÍNGUEZ MANCERA**

**CO-DIRECTOR: DR. ANTONIO HERNÁNDEZ BELTRÁN**

**DIRECTOR EXT: DR. JORGE LUIS VALENTE FLORES HERNÁNDEZ**

VERACRUZ, VER. 19 DE SEPTIEMBRE DE 2013

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN  
CÉLULAS SOMATOTROPAS DE ORIGEN BOVINO TRATADOS  
CON GHRELINA”**

Por:

**ADASUÈ MAGDALENO MÈNDEZ**

Tesis propuesta al Colegio de Profesores del Posgrado

de la

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

de la

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA ANIMAL

AGOSTO 2013

**CONTENIDO**

	Pàg:
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÌNDICE.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia que es lo más hermoso y valioso que tengo, pues gracias a ellos puedo sentir la presencia de Dios en mi vida, cada vez que veo a mi mamá, mi papá, mis hermanos, mis abuelos, mis primos, mis tíos y amistades cercanas, puedo sentir que soy muy afortunada y me siento plenamente agradecida con Dios por este regalo tan maravilloso. Gracias al amor de todos y cada uno de ellos mediante su ejemplo y apoyo incondicional es que puedo concluir esta meta más de mi vida. Reitero la dedicación especial a mi mamá por ser la persona más maravillosa que conozco en la faz de la tierra, porque siempre he sentido el amor y la sabiduría de Dios gracias a ella, a sus palabras, su ejemplo y sobre todo el amor incondicional que siempre he recibido de ella.

A Dios, por ser el centro de mi vida y por darme todo lo que necesito y aún más para ser feliz.

A mis amigos que hacen que la vida sea más amena en momentos difíciles, por compartir tristezas y alegrías, por ser la familia que se escoge y por estar siempre cuando tienen que estar. Principalmente a los amigos que estuvieron conmigo durante el transcurso de esta maestría, aunque solo fuera por periodos cortos pero muy significativos, a Toño Andrade, a Félix García, Arely Sánchez, Gladys Aguilar, Aida Guzmán, Marissi Castillo y sobre todo Sandy y Karen porque juntas pudimos concluir esta etapa profesional, a pesar de todo lo logramos y me alegra haber hecho amistades tan hermosas y valiosas como lo son ellas.

A mi pareja Javier Hermida por ser un regalo más de Dios, por su compañía, su apoyo y su amor incondicional, porque los tiempos de Dios son perfectos y por ello estamos juntos en este momento de nuestras vidas iniciando esta aventura que es tener una familia...Te Amo.

A mi hija que viene en camino...el que estés creciendo dentro de mí y esperar tu llegada es lo más maravilloso que me pudo ocurrir, eres lo más hermoso de mi vida y el mejor regalo del mundo, le agradezco a Dios infinitamente tu llegada y tu presencia y con su ayuda, seremos la mejor familia para ti. No existen palabras para decirte cuanto y como Te Amo, solo quiero demostrártelo cada día de tu vida. TE AMO SOFÍA.

A mi alma mater FMVZ , a todos mis maestros y personal que con su apoyo, conocimientos y enseñanzas hicieron posible que culminara esta etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Veracruzana y a la Facultad de Veterinaria por ser mi casa de estudios.

Al CONACYT por la beca otorgada y la oportunidad de poder realizar una maestría, de igual forma por la beca otorgada para la realización de mi estancia académica.

Al Dr. Belisario Domínguez por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto y el apoyo brindado como asesor del mismo.

Al Dr. Antonio Hernández por su gran apoyo como co-director de este trabajo.

Al Dr. Jorge Flores por su tiempo, el cual fue indispensable para que yo lograra involucrarme en el área de conocimiento de este trabajo. Por su gran apoyo para la realización de mi estancia académica, por sus palabras sabias y su energía positiva que lo hacen ser un gran ejemplo y un ser humano grandioso.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarnos apoyo en material e instalaciones.

A la Dra. Zhen Yan por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, por todo el apoyo brindado durante mi estadía.

A la University at Buffalo, New York, por el material e instalaciones brindadas para el desarrollo de mi estancia académica.

A la Dra. Paty Cervantes por su apoyo en los tutoriales, el préstamo de material e instalaciones, por su amistad y su ejemplo como una gran profesionista y mujer.

Al Dr. Apolo Carrasco por su apoyo en los tutoriales y seminarios.

Al honorable jurado por su tiempo para la lectura de mi tesis y la sugerencia de correcciones y consejos.

A los profesores de la Maestría que contribuyen en nuestra formación profesional.

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en el Área de Electrofisiología y en el Laboratorio de Cultivos Celulares ubicado en la Unidad de Diagnóstico "Augusto Mancisidor Ahuja" de la Posta Zootécnica Torreón del Molino, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.

Director de tesis:

Dr. Belisario Domínguez Mancera

Co-Director:

Dr. Antonio Hernández Beltrán

Director externo: Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

El autor de esta tesis recibió durante el periodo agosto 2011 a Julio 2013, el beneficio de la beca **323267** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo de tesis fue realizado dentro del proyecto de investigación denominado "Evaluación de la Ghrelina en la estimulación de la secreción de hormona de crecimiento: Mecanismos de secreción y señalización intracelular". Financiado por SEP-PROMEP, con número de folio 103.5/09/4482 (PTC-346) y por Ciencia Básica SEP-CONACyT 2008-1 con número 104264.

Director del proyecto:  
MVZ. Dr. Belisario Domínguez Mancera

## ÍNDICE

	Pàg:
Introducción	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Pituitaria	3
1.2 Células de la pituitaria	5
1.3 Somatotropos	6
1.4 Hormona de crecimiento	7
1.5 Acciones biológicas de la hormona del crecimiento	8
1.6 Control endocrino de la secreción de hormona del crecimiento	9
1.7 Ghrelina	11
1.8 Actividad eléctrica en somatotropos	16
1.9 Acople excitación- secreción	21
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
2. MATERIAL Y MÉTODOS	25
2.1 Localización	25
2.2 Medidas de bioseguridad	25
2.3 Cultivo celular	25
2.3.1 Obtención de la muestra	25
2.3.2 Cortes histológicos	26
2.3.3 Obtención de cultivo primario	26
2.3.4 Separación de células por gradiente de percoll	26
2.3.5 Viabilidad y cuantificación celular	26
2.3.6 Identificación de somatotropos por inmunocitoquímica	27

2.3.7 Registro electrofisiológico	27
2.3.8 Análisis estadístico	30
3. RESULTADOS	31
3.1 Viabilidad y cuantificación del cultivo primario	33
3.2 Actividad eléctrica espontánea	34
3.3 Corrientes totales y potenciales de acción evocados en somatotropos de bovino	36
3.4 La corriente de sodio	39
3.5 La Ghrelina y el GHRP-6 modulan la amplitud y la densidad de corriente de sodio	40
3.6 La corriente de calcio	47
3.7 La corriente de potasio	51
3.8 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio dependiente de voltaje	55
3.9 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio	56
3.10 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio rectificadora entrante ( $K_{IR}$ )	59

**LISTA DE CUADROS**

PÁGINA

CUADRO 1	Tipos celulares y hormonas producidas en la adenohipófisis	5
CUADRO 2	Propiedades de los canales iónicos dependientes de voltaje presentes en la membrana de los somatotropos	19

## LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
FIGURA 1	Anatomía de la glándula hipófisis	3
FIGURA 2	Tinción de células somatotropas con hematoxilina-eosina	6
FIGURA 3	Estructura de la hormona del crecimiento	7
FIGURA 4	Vía de señalización de la hormona del crecimiento	9
FIGURA 5	Factores de regulación de la hormona del crecimiento	10
FIGURA 6	Secuencia primaria y estructura bidimensional del receptor a secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R)	12
FIGURA 7	Estructura de la Ghrelina	12
FIGURA 8	Relación positiva entre la actividad eléctrica, la concentración de calcio libre intracelular y la secreción de hormona de crecimiento	15
FIGURA 9	Identificación de la Ghrelina en bovinos	15
FIGURA 10	Mecanismo de señalización de la Ghrelina	15
FIGURA 11	Estructura terciaria de un canal iónico dependiente de voltaje	18
FIGURA 12	Participación de los canales iónicos en las diferentes etapas del potencial de acción	21
FIGURA 13	Células de la pituitaria anterior de bovino	32
FIGURA 14	Cuantificación celular	33
FIGURA 15	Viabilidad celular	34
FIGURA 16	Patrones de disparo de la actividad eléctrica espontánea en los somatotropos de bovino	35
FIGURA 17	Patrones de disparo de la actividad eléctrica espontánea en somatotropos de bovino	36
FIGURA 18	Corrientes totales en modalidad de célula completa de somatotropos de bovino bajo condiciones control	37
FIGURA 19	Características del potencial de acción (PA) en somatotropos de	38

	bovino	
FIGURA 20	Patrones morfológicos del potencial de acción evocado por inyección de corriente	39
FIGURA 21	Actividad de canales de sodio en somatotropos de bovino	40
FIGURA 22	Efecto del tratamiento crónico con Ghrelina 10 nM o GHRP-6 100 nM sobre la amplitud de la corriente de sodio	41
FIGURA 23	Efecto del tratamiento crónico con Ghrelina 10 nM o GHRP-6 100 nM sobre la amplitud de la corriente de sodio. Capacitancia celular y densidad de corriente	42
FIGURA 24	Efecto del tratamiento crónico con Ghrelina 10 nM o GHRP-6 100 nM sobre la amplitud de la corriente de sodio	44
FIGURA 25	Efecto de la Ghrelina 10 nM o el GHRP-6 100nM sobre la curva de activación de los canales de sodio	46
FIGURA 26	Actividad de canales de calcio en somatotropos de bovino	48
FIGURA 27	Curso temporal del efecto de la Ghrelina 10nM sobre la corriente (A) y el porcentaje (B) de incremento en la densidad de corriente de bario	50
FIGURA 28	La Ghrelina Incrementa la densidad de corriente de cola de Bario	51
FIGURA 29	Corriente de potasio dependiente de voltaje en somatotropos de Bovino	52
FIGURA 30	Componentes de la corriente de potasio dependiente de voltaje en los somatotropos de bovino	53
FIGURA 31	Inactivación en estado estacionario del total de la corriente $I_K$ en los somatotropos de bovino	55
FIGURA 32	Capacitancia y Corriente de $K^+$ en somatotropos de bovino bajo condiciones control y tratadas crónicamente con Ghrelina	56
FIGURA 33	Curva de activación de los componentes transitorio (pico) y sostenido de la corriente de $K^+$ activada por voltaje en los somatotropos de bovino	57
FIGURA 34	Inactivación en estado estacionario del total de la corriente de $K^+$ dependiente de voltaje en somatotropos de bovino	58
FIGURA 35	Efecto de la Ghrelina sobre la corriente rectificadora entrante de $K^+$ ( $K_{IR}$ ) en somatotropos de bovino	60

## RESUMEN

Magdaleno Méndez, Adasué, MCA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Agosto 2013. **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA EN CÉLULAS SOMATOTROPAS DE ORIGEN BOVINO TRATADAS CON GHRELINA.** Asesores: Dr. Belisario Domínguez Mancera, Dr. Antonio Hernández Beltrán y Dr. Jorge Valente Flores Hernández.

Los somatotropos producen Hormona de Crecimiento (GH), presentan potenciales bioeléctricos, resultado de la actividad electroquímica de su membrana. Esta actividad es realizada por proteínas estructurales transmembranales denominadas canales iónicos los cuales son activados por el potencial de membrana. La secreción de GH se encuentra bajo el control de dos neuropéptidos hipotalámicos; uno estimulador, la hormona liberadora de GH y otro inhibidor, la somatostatina. Existen liberadores de GH sintéticos denominados secretagogos de GH; investigaciones en relación a los mecanismos de acción de los GHS sobre la liberación de GH dirigieron el descubrimiento del receptor a GHS (GHS-R) y más tarde a la Ghrelina, ligando endógeno para GHS-R. Con el objetivo de investigar si el tratamiento crónico con Ghrelina o con GHRP-6 promueve un incremento en la expresión funcional de los canales iónicos en los somatotropos de origen bovino, se obtuvieron cultivos de somatotropos de glándulas pituitarias separados por gradiente de Percoll® e identificados por inmunocitoquímica. Se utilizó la técnica de Patch-Clamp en la configuración de célula completa. Los resultados se analizaron con los programas Clampfit v10.2 y SigmaPlot (2009) v11. Los somatotropos fueron tratados con Ghrelina (10 nM) o GHRP-6 (100 nM) por 48 h. El tratamiento en los somatotropos bovinos promovió un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la corriente de sodio de  $2.51 \pm 0.73$  veces más con Ghrelina, y  $1.50 \pm 0.75$  veces más con GHRP-6, que el valor control. En lo referente al calcio, se muestra que existen dos componentes en la corriente, uno de rápida activación y de rápida inactivación (LVA) y otro de lenta activación y de no inactivación (HVA), ambas son incrementadas alrededor del 100% respecto al valor control. La corriente de potasio no sufre cambios significativos. No se observaron cambios en el tamaño de las células medido por su capacitancia. Se concluye que la presencia de Ghrelina o GHRP-6 a largo plazo altera la fisiología de los somatotropos, lo cual se refleja en una modificación de su actividad eléctrica a través de un incremento en la expresión funcional de canales de sodio y de canales de calcio, sin modificar las propiedades cinéticas macroscópicas de estos canales.

## ABSTRACT

Magdaleno Méndez, Adasué, MCA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Agosto 2013. **ANALYSIS OF THE SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITY IN BOVINE SOMATOTROPHS CELLS TRATED WITH GHRELIN.** Asesores: Dr. Belisario Domínguez Mancera, Dr. Antonio Hernández Beltrán y Dr. Jorge Valente Flores Hernández.

The somatotrophs produce growth hormone (GH) present bioelectric potential as result of the electrochemical membrane activity. This activity is performance by transmembrane structural proteins called ionic channels wich are activated by membrane potential. The secretion of GH is under control of two hipotalamic neuropeptids, the first stimulate the release hormone of GH and the second is inhibiter, the somatostatin. There are synthetic releases of GH called secretagogue of GH (GHS), some research in relation to the mechanism of action about the release of GH drive to the develop to the GHS receptor (GHS-R) and latter to the Ghrelin which is endogenous ligand of GHS-R. With the goal to research if the chronic treatment with Ghrelin or GHRP-6 promote an increase in the functional expression of the ionic channels in the bovine somatotrophs we obtained somatotrophs cultures from separate pituitary gland by percoll gradient and then they were identified by inmunocitochemistry. We used the patch clamp technique in the whole cell recording. The result were analyzed with the Clamp fit v.10.2 and Sigma Plot v.11 programs. The somatotrophs were treated with Ghrelin (10 nM) or GHRP-6 (100 nM) during 48 hours. The treatment promoted an significative increase in the sodium current ( $p < 0.05$ )  $2.51 \pm 0.73$  times more with Ghrelin and  $1.50 \pm 0.75$  times with GHRP-6 than the control value. In reference to the calcium show two components in the current, one of the fast activation and fast inactivation (LVA) and other of slow activation and no inactivation (HVA) both are increased around 100% respect to the control value. The potassium current do not suffer significative changes. We do not observe any changes in the cell sizes measured by the capacitance. In conclusion the presence of Ghrelin or GHRP-6 at long term modified the physiology of somatotrophs which reflex in a modification of their electrical activity through incrementing the functional expression of the sodium channels and calcium channels without modifiers macroscopic kinetics properties of these channels.

## INTRODUCCIÓN

La hormona del crecimiento (GH) es sintetizada, segregada y almacenada por las células somatotropas de la hipófisis anterior, es una de las hormonas que regulan la homeostasis del organismo ya que cumple con diversas funciones al participar en el crecimiento de huesos largos, en la diferenciación celular, participa en el aumento del transporte de glucosa, ácidos grasos, aminoácidos, minerales y favorece la síntesis de proteínas tanto en animales domésticos como en el humano (Fanciulli et al., 2009).

La secreción de GH es controlada por complejos factores hipotalámicos y periféricos. El somatotropo expresa receptores específicos para la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) proveniente del núcleo arcuato del hipotálamo, para secretagogos de GH (Ghrelin) y receptores para la somatostatina, todos estos encargados de mediar la secreción de GH (Álvarez, 2008).

De manera comercial se ha utilizado un análogo sintético de la GH, la somatotropina bovina recombinante (bGH), la cual se utiliza para incrementar la síntesis y secreción de leche por la glándula mamaria en vacas lecheras; sin embargo, también se reportan efectos no deseados como infecciones en la glándula mamaria, disminución en las tasas de concepción, longevidad de la vaca y se ha relacionado con cáncer de próstata y de mama en humanos (Annen et al., 2004). Por ello resulta importante conocer más sobre su regulación para el uso correcto tanto en animales domésticos como en el humano.

En 1999 Kojima y colaboradores reportan la existencia de una hormona aislada del estómago de ratones, la cual se consideró un promotor en la secreción de GH y se denominó Ghrelin. Esta hormona actúa de forma directa sobre la hipófisis; sin embargo, ésta secreción se encuentra regulada también a nivel hipotalámico (Álvarez, 2008). El mecanismo de acción de la Ghrelin es a través de su receptor (GHS-R), el cual activa a la fosfolipasa C para generar inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol, lo cual induce un aumento del calcio libre intracelular, señal necesaria para estimular la secreción de GH (Pierno et al., 2003).

El somatotropo es una célula eléctricamente excitable; es decir, presenta la característica de producir potenciales de acción como resultado de la actividad

electroquímica de su membrana, al igual que las células nerviosas y musculares. Cada célula presenta una actividad eléctrica característica y la medida de ésta actividad proporciona información sobre su funcionamiento (Guerrero, 2010).

Se han realizado diversos trabajos acerca de la Ghrelina, pero se sabe poco acerca de los mecanismos intracelulares por los cuales esta hormona ejerce su acción. Debido a la importancia que adquiere la GH sobre diversas funciones en el organismo, en la producción láctea y su relación con el cáncer, el objetivo del presente trabajo es proporcionar conocimiento para establecer las bases electrofisiológicas con la finalidad de determinar la participación de la Ghrelina en células somatotropas de bovino, a través del análisis de la actividad eléctrica de dichas células.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Pituitaria (hipófisis)

Este órgano, es una pequeña estructura de 1 cm de diámetro y 0.5 a 1 gr de peso, situada en la silla turca, cavidad ósea en la base del cráneo y conectada con el hipotálamo por el tallo hipofisario. Desde el punto de vista anatómico, la hipófisis se puede dividir en dos porciones de diferente origen embrionario, anatómico y funcional: hipófisis anterior (adenohipófisis) e hipófisis posterior (neurohipófisis) (FIGURA 1).

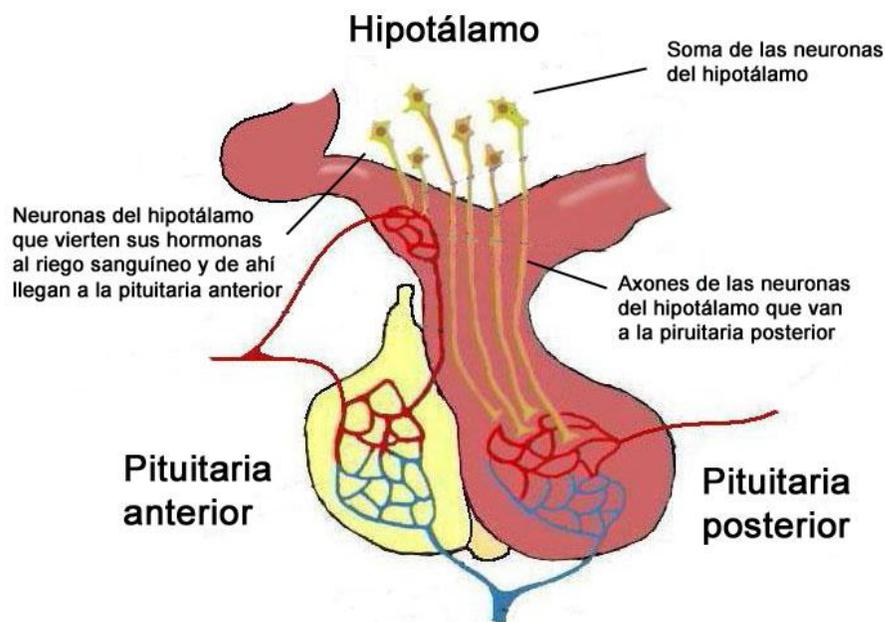


FIGURA 1. Anatomía de La glándula hipófisis. (<http://las-hormonas.blogspot.mx/2012/10/las-hormonas-del-cerebro.html>).

Entre ambas regiones se encuentra una zona llamada lóbulo medio o pars intermedia. La hipófisis se forma en la etapa embrionaria durante el desarrollo craneofacial, momento en el cual se produce la separación del neuroepitelio y la superficie ectodérmica de toda la zona, excepto en la región media donde se forma la bolsa de Rathke que origina la hipófisis anterior (Zhu *et al.*, 2007). La adenohipófisis

es una glándula con un epitelio color marrón-rojizo, y la neurohipófisis es una estructura nerviosa firme de color gris compuesta por axones y su estroma de sostén proviene del hipotálamo.

La adenohipófisis ocupa alrededor del 80% del total de la glándula. Está compuesta por tres porciones: la pars distalis, la pars intermedia y la pars tuberalis. La pars distalis constituye la porción más grande de la glándula, generalmente conocida como lóbulo anterior o pars glandularis. La pars intermedia es rudimentaria, y es considerada como un vestigio de la extremidad posterior de la bolsa de Rathke. La pars tuberalis es una prolongación ascendente de las células adenohipofisiarias que rodean la porción inferior del tallo hipofisario (Guyton y Hall, 2006).

La neurohipófisis se deriva del neuroepitelio que proviene de la base del diencéfalo y está integrada por terminaciones axonales de neuronas magnocelulares que se originan en el hipotálamo, en específico de los núcleos paraventricular y supraóptico, donde son sintetizadas las hormonas vasopresina y oxitocina, que son liberadas al torrente sanguíneo en la adenohipófisis. El lóbulo intermedio está poblado por melanotrofos, células que sintetizan y liberan hormona estimuladora de melanocitos (MSH) o bien llamadas intermedinas (Zhu *et al.*, 2007; Stojilkovic *et al.*, 2010).

La glándula pituitaria está envuelta por duramadre, una capa de tejido conjuntivo denso que tapiza la silla turca. El diafragma sellae es una reflexión de la duramadre que constituye el techo de la silla turca, tiene un pequeño orificio para el tallo hipofisario. La función más importante del diafragma sellae es el de proteger a la glándula de la presión del líquido cefalorraquídeo (Álvarez, 2008).

La adenohipófisis segrega diversas hormonas de gran importancia para la correcta fisiología del organismo, éstas hormonas son segregadas por 5 tipos celulares diferentes, son de origen epitelial y por ser glándulas endocrinas están rodeadas de capilares sinusoides a los cuales se vierte su producto de secreción (Zhu *et al.*, 2007).

## 1.2.- Células de la pituitaria

En la pituitaria se producen seis hormonas peptídicas indispensables para la reproducción (gonadotropos), lactación (lactotropos), crecimiento (somatotropos), desarrollo (tirotropos) y respuesta al estrés (corticotropos). Secretan su hormona de acuerdo con las necesidades funcionales del organismo, la concentración circulante depende de diversos factores como el ambiente, la edad y el estado fisiológico (Stojilkovic *et al.*, 2010).

Existe un tipo celular por cada hormona principal formada en esta glándula. Es posible diferenciar los tipos de células existentes mediante tinciones especiales de anticuerpos de gran afinidad que se unen a las distintas hormonas (Guyton y Hall, 2006).

Cuadro 1. Tipos celulares y hormonas producidas en la pituitaria.

Tipo celular	Hormona producida	% de la población celular	Hormona hipotalámica regulatoria	Núcleo predominante hipotalámico de síntesis
Tirotripo <sup>+</sup>	TSH	3-5%	TRH(+) Somatostatina (-)	Paraventricular, periventricular anterior
Corticotropo <sup>+</sup>	ACTH	15-20%	CRH (+) Vasopresina	Paraventricular supra óptico
Gonadotropo+	LSH Y FSH	10-15%	GnRH (+)	Arcuato
Somatotropo*	GH	40-50%	GHRH (+) Somatostatina (-)	Arcuato, periventricular anterior
Lactotropo*	Prolactina	10-25%	Dopamina (-) TRH(+) PRF's (+)	Arcuato, paraventricular

Adaptado de Nussey y Whitehead (2001)

+Basofilos; \*Acidofilos; (+) estimulatorio; (-) inhibitorio

### 1.3.- Somatotropos

Una fracción de células de la glándula pituitaria, son conocidas como mamosomatotropos y son productoras de prolactina y hormona de crecimiento, éstas son células transicionales que posteriormente se diferencian para convertirse en lactotropos o somatotropos (Stojilcovic, 2010). Los somatotropos, son células productoras de GH, son el tipo celular adenohipofisario más común, se encuentran localizados predominantemente en la porción lateral del lóbulo anterior de la hipófisis y comprenden entre el 50% de la población endocrina total. La GH sintetizada es un polipéptido de cadena sencilla de 191 aminoácidos, empaquetada en vesículas secretoras de diferentes tamaños (Horvath y Kovacs, 1988). El empleo de técnicas de microscopía electrónica han permitido identificar morfológicamente al menos tres subpoblaciones de somatotropos: células con gránulos secretorios abundantes grandes (de 200 hasta 500nm de diámetro), células con gránulos secretorios abundantes pequeños (menores de 200nm) y células con gránulos dispersos (Pelletier *et al.*, 1978) (FIGURA 2).

El principal producto de secreción de los somatotropos es la GH, aunque también sintetizan otras hormonas y factores de crecimiento, entre los que podemos mencionar la prolactina, activina, urocortina, galanina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF-1) (Schwartz, 2000). El diámetro de los somatotropos va de las 10 a 13 $\mu$ m en la mayoría de las especies (Nakane, 1970; Moriarty, 1973; Mason y Rawlings, 1988).

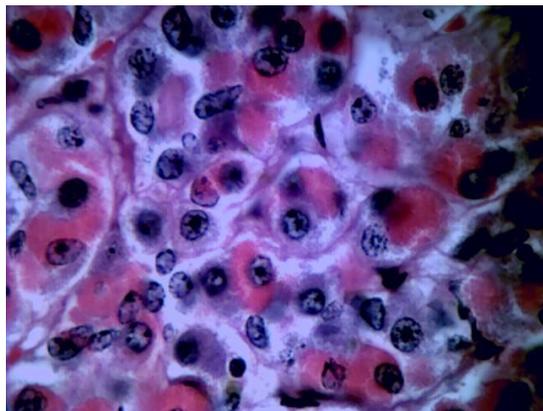


FIGURA 2. Tinción de células somatotropas con hematoxilina-eosina (Domínguez *et al.*, 2007).

### 1.4.- Hormona de crecimiento

La GH es una hormona peptídica formada por una sola cadena de 191 aminoácidos, posee dos puentes disulfuro entre las cisteínas que ocupan los lugares 53-165 y 182-189 (FIGURA 3). Es una proteína de cadena única y no presenta carbohidratos unidos a la misma. La GH fue aislada inicialmente en 1944 a partir de hipófisis de bovino, y en 1956 de hipófisis de humano. En el año de 1973 Santomé y colaboradores lograron secuenciar su estructura química. Hasta la fecha, se han identificado en el humano 4 isoformas de GH de diferente peso molecular (22 kDa, 20 kDa, 17.5 kDa, y 7.5 kDa) (Baumann, 1991; Ranke *et al.*, 1999). La isoforma de 22 kDa es la más abundante y consiste de una cadena polipeptídica (Ranke *et al.*, 1999). Las razones por las cuales se presenta esta alta heterogeneidad de GH pueden ubicarse a diferentes niveles: a) nivel genético (diferentes genes codifican para GH), b) nivel del RNA mensajero (dos variantes originadas por procesamiento alternativo) y c) nivel post-traducciona (modificaciones a formas monoméricas y oligoméricas de GH) (Baumann, 1991; 1999).

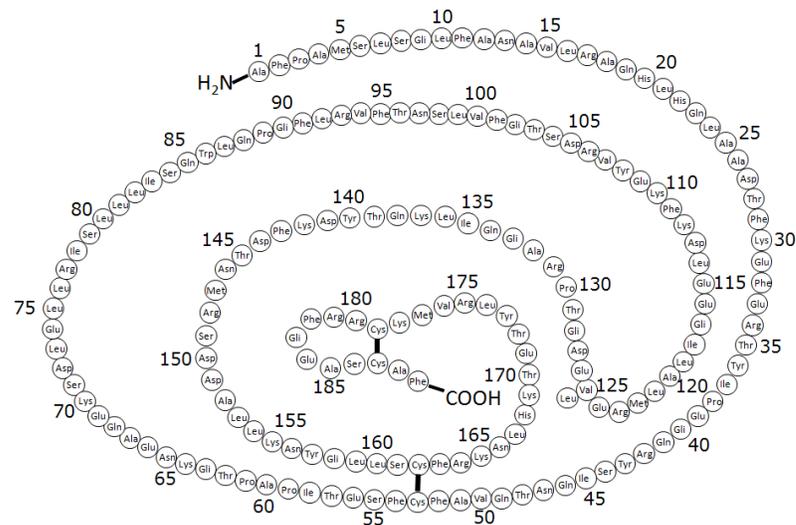


FIGURA 3. Estructura de la Hormona de Crecimiento bovino (Adaptada de Santomé *et al.*, 1973).

En condiciones fisiológicas, más del 50% de la isoforma de GH de 22 kDa está unida a la proteína GHBP de alta afinidad (GH binding protein), mientras que la GH restante se encuentra libre o unida a una GHBP de baja afinidad (Baumann *et al.*, 1988). La concentración de GHBP influye en la acción biológica que ejerce la GH sobre sus sitios blanco, así como también, interfiere en la medición de los niveles de GH.

Existen cinco genes distintos que expresan GH, todos ellos derivan de un precursor común, son el hGH-N, hCS-A, hCS-B, hCS-L y hGH-V. Entre ellos el GH-N es el único que se expresa en la hipófisis y es el que regula la síntesis de la GH, concretamente la forma 22K. Los otros cuatro genes se expresan también en la placenta (Cooke *et al.*, 1988).

La regulación del gen hipofisario GH-N es compleja. El desarrollo tisular específico de los somatotropos y la expresión de GH parece estar determinado fundamentalmente por el gen Prop-1 y el factor de transcripción Pit-1. Existen mutaciones raras en el gen de GH que se asocian a déficit aislado de GH. Existen también mutaciones en el gen Prop-1 y en el Pit-1 igualmente raras y que inducirían un déficit de GH y de otras hormonas hipofisarias (Procter *et al.*, 1988).

### **1.5.- Acciones biológicas de la GH**

La GH tiene diversas acciones metabólicas específicas: aumenta la lipólisis y la oxidación de lípidos lo que contribuye a la movilización de los triglicéridos almacenados aumentando los ácidos grasos libres. Efecto anabolizante: estimula el transporte y captación de aminoácidos por los tejidos acelerando la síntesis de proteínas. Antagoniza la acción de la insulina. Produce retención de agua, sodio y fosfato. La GH estimula el crecimiento lineal actuando de manera directa e indirecta (vía IGF-1) sobre el cartílago de crecimiento. Su efecto fundamental es promover el crecimiento longitudinal postnatal (Melmedy y Kleinberg, 2004).

Sus acciones fisiológicas son a través del IGF-1. Es un factor de crecimiento con estructura similar a la proinsulina. Está formado por una cadena de 70 aminoácidos, se sintetiza fundamentalmente en el hígado y su síntesis depende de los niveles circulantes de GH. Actúa localmente regulando el crecimiento y la diferenciación celular (Bereket *et al.*, 1995).

El receptor a GH (GH-R) está presente en casi todos los tejidos del organismo, y comienza a ser detectado a partir del séptimo mes de gestación en el humano. Estudios de clonación y de secuenciación de DNA complementario (cDNA) revelaron que el GH-R es una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 130 kDa, distinguiéndose tres diferentes dominios, un dominio extracelular, un dominio

transmembranal y un dominio intracelular. Un segmento del dominio extracelular es homólogo al sitio de unión de las GHBP. La dimerización del GH-R inducida por la unión de una molécula de GH es el paso clave para la activación de la cascada de señalización. La cual es seguida, por el reclutamiento y activación de proteínas cinasas de tirosina de la familia Janus tipo 2 (*Jak-2*) y de la fosforilación y dimerización de factores de transcripción del tipo STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (FIGURA 4).

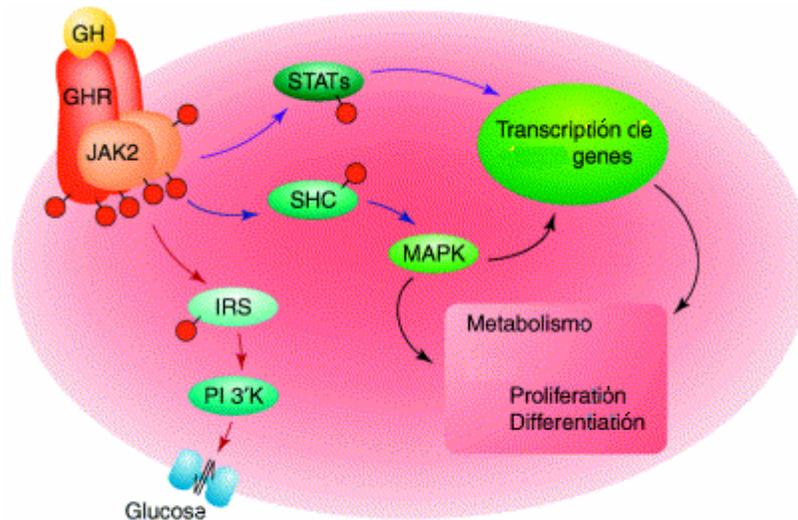


FIGURA 4. Vía de señalización de la GH. (Herrington and Carter-Su, 2001).

La GH (también llamada somatotropina) recombinante es utilizada para incrementar la síntesis y secreción de leche por la glándula mamaria de los bovinos (Akers, 2006), siendo administrada a razón de 500mg/kg cada 2 semanas (Akers, 2006). Sin embargo, existe controversia sobre los efectos no deseados por su uso, entre los que se encuentran: detrimentos en la salud (infecciones en la glándula mamaria), efectos en la reproducción (disminución en las tasas de concepción) y longevidad de la vaca lechera (Ceelen, 1995; Annen *et al.*, 2004).

### 1.6.- Control endocrino de la secreción de GH.

La secreción de GH está controlada por complejos factores hipotalámicos y periféricos. La célula somatotropa expresa receptores específicos para GHRH, secretagogos de GH y los subtipos 2 y 5 del receptor de la somatostatina que median la secreción de GH (Schwartz, 2000) (FIGURA 5).

La GHRH es un péptido de 44 aminoácidos, cuya principal función es estimular la liberación y síntesis de GH. Las neuronas hipotalámicas secretoras de GHRH se ubican predominantemente en el núcleo arcuato, cuyas terminales axónicas terminan en la eminencia media. El GHRH estimula tanto la síntesis (aumentando la transcripción del gen) como la liberación de GH. Las acciones estimulantes de la secreción de GH se realizan por unión a un receptor específico presente en las células hipofisarias. El receptor de GHRH es un receptor acoplado a proteína G, su activación aumenta la síntesis de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico). Se ha visto también que variaciones en los niveles de calcio intracelular a través de canales de calcio dependiente de voltaje tipo L, intervienen en el mecanismo de acción de la GHRH (Silvermann *et al.*, 1988).

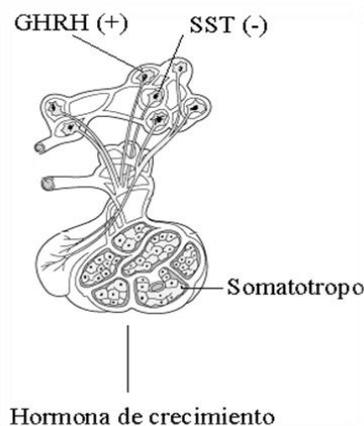


FIGURA 5. Factores reguladores de la GH (<http://med.unne.edu.ar>).

La activación de la proteína G estimula la actividad de la adenilato ciclasa, elevando los niveles de AMPc y activando la proteína cinsasa A (PKA). La PKA activada fosforila la proteína CREB, la cual exacerba la transcripción del gen que codifica para Pit-1, a su vez, la proteína Pit-1 estimula la transcripción del gen para GH (adaptado de Müller *et al.*, 1999).

La somatostatina (SST) es un péptido cíclico de 14 o 28 aminoácidos, esta hormona inhibe la liberación de GH sin afectar su síntesis (Tannenbaum *et al.*, 1998). Las neuronas hipotalámicas productoras de SST se concentran en el núcleo paraventricular, cuyo contenido es liberado en la región de la eminencia media. El receptor a somatostatina (SST-R) es codificado por cinco genes diferentes (SST-R1 a SST-R5) (Tannenbaum *et al.*, 1998). El SST-R2 está predominantemente presente en

la membrana plasmática de los somatotropos (Reed *et al.*, 1999). Este receptor, al igual que los otros SST-R, posee siete dominios transmembranales y está acoplado a una proteína G del tipo inhibitorio (Gi) (Bell and Reisine, 1993), cuya activación provoca una reducción en los niveles del AMPc (Epelbaum *et al.*, 1987), un incremento en la corriente de K<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 1989b; 1990b) y una disminución en la corriente de Ca<sup>2+</sup> tipo L y tipo T (Chen *et al.*, 1990a).

### **1.7.- Ghrelina**

Durante mucho tiempo se creía que la secreción de GH estaba regulada únicamente por dos péptidos hipotalámicos con acciones antagónicas que son la GHRH y la SS (Pierno *et al.*, 2003). En 1976 Bowers y colaboradores descubren una serie de péptidos sintéticos, denominados secretagogos de GH (GHS), que actúan a nivel hipofisario estimulando de forma específica la secreción de GH. El más potente de estos secretagogos es el GHRP-6. A partir de entonces, un gran número de sustancias peptídicas y no peptídicas han sido desarrolladas las cuales son efectivas liberadoras de GH cuando son administradas de forma intravenosa, subcutánea, intranasal y oral (Smith *et al.*, 1997; Camanni *et al.*, 1998). Estudios biológicos iniciales revelaron una acción sinérgica por coadministración de GHRPs y GHRH sobre la liberación de GH en diferentes especies (Bowers, 1998). Aunque los secretagogos de GH (GHS) y la GHRH actúan sobre diferentes receptores, aparentemente existe un receptor único (GHS-R) en la pituitaria y en el hipotálamo que media la acción de los GHS sobre la liberación de GH (Howard *et al.*, 1996) (FIGURA 6).

En 1999 se reportó un ligando natural para el GHS-R, aislado del estómago de ratas, al cual se le denominó Ghrelina, (que significa péptido liberador de GH) (FIGURA 7) (Kojima *et al.*, 1999). La Ghrelina tiene una cadena de ácido graso en el tercer aminoácido del extremo N- terminal que tiene importancia para algunas de sus acciones biológicas. El receptor de Ghrelina se expresa en el núcleo arcuato y ventromedial del hipocampo y es altamente sensible a las concentraciones de GH, se ha visto que el receptor se expresa también en muchos tejidos periféricos.

La Ghrelina al unirse a su receptor, induce un aumento en la concentración de calcio libre intracelular a través de la producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y estimular la secreción de GH (Kojima *et al.*, 1999; Arvat *et al.*, 2000).

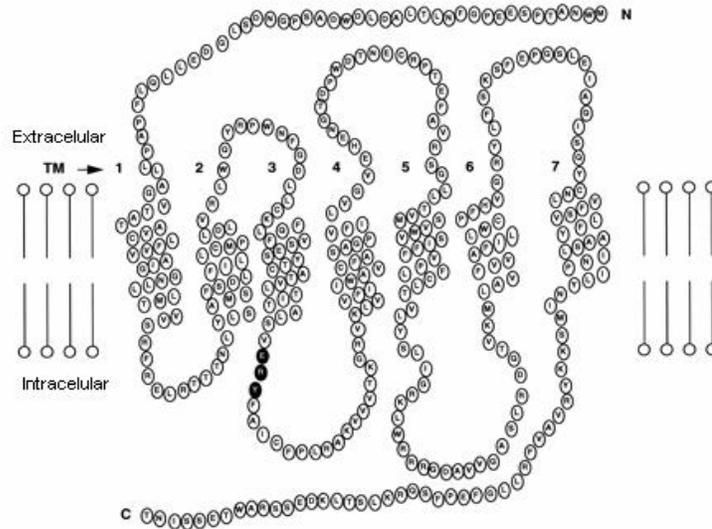


FIGURA 6. Secuencia primaria y estructura bidimensional del receptor a secretagogos de hormona de crecimiento (GHS-R) (Feighner *et al.*, 1998).

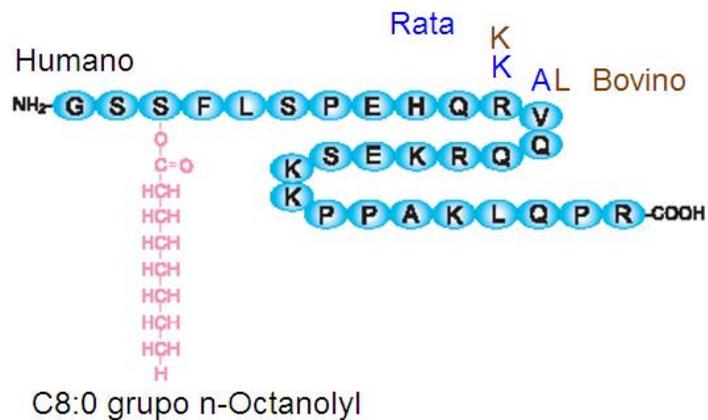


Figura 7. Estructura de la Ghrelina (Kojima and Kangawa, 2005; Anderson *et al.*, 2005).

La Ghrelina está involucrada en el control de la ingesta de alimento (el consumo voluntario) y en el peso corporal en humanos y ratas (Takaya *et al.*, 2000; Seoane *et al.*, 2000).

La Ghrelina se produce en los órganos gastrointestinales como respuesta al hambre y sirve como señal periférica para estimular la ingesta a nivel del sistema nervioso central. Los niveles plasmáticos de Ghrelina aumentan inmediatamente

antes de cada comida y descienden a sus niveles más bajos una hora después, por lo tanto es una señal de iniciación para la ingesta de alimentos (Anderson *et al.*, 2004).

A nivel gástrico, la administración intravenosa de Ghrelina induce un aumento de la secreción ácida gástrica y estimula la motilidad gástrica. A nivel cardiovascular la administración intravenosa de Ghrelina produce un descenso de la presión arterial sin que disminuya la frecuencia cardíaca. El papel de la Ghrelina en la secreción de insulina aún no está aclarado, se ha visto que inhibe la secreción de insulina en algunos experimentos y estimula su liberación en otros. Los niveles plasmáticos de Ghrelina e insulina se encuentran ambos influenciados por la concentración de glucosa, así niveles elevados de glucosa inhiben la secreción de Ghrelina y estimulan la secreción de insulina (Fanciully *et al.*, 2009).

En cuanto a la regulación de la secreción de Ghrelina, el factor más importante que la regula es la ingesta de alimentos, su concentración está elevada en el ayuno y desciende tras la ingesta. Los niveles de Ghrelina aumentan también durante el sueño (Álvarez, 2008).

La liberación de GH inducida por Ghrelina en los somatotropos depende de un aumento significativo en los niveles de calcio libre citosólico debido a un incremento en la entrada de iones calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Malagon *et al.*, 2003), proponiéndose así, una modulación de la actividad eléctrica de los somatotropos por los GHRPs (FIGURA 8).

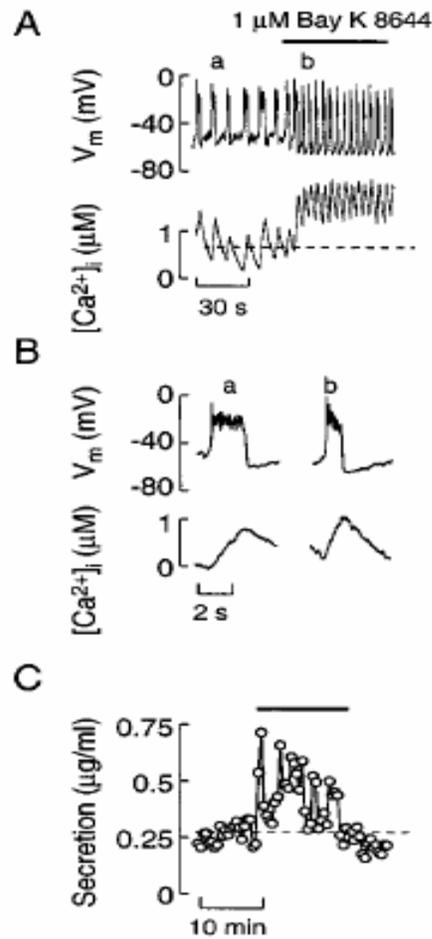


FIGURA 8. Relación positiva entre la actividad eléctrica, la concentración de calcio libre intracelular y la secreción de GH en somatotropos de rata (Van Goor *et al.*, 2001).

Hayashida y sus colaboradores, reportaron la existencia de células inmunoreactivas a Ghrelina en las glándulas oxínticas del estómago de los bovinos (FIGURA 9) (Hayashida *et al.*, 2001). Los estudios iniciales sobre el efecto de la Ghrelina en los bovinos han sido en el animal íntegro, reportando que la inyección de Ghrelina incrementa las concentraciones de glucosa plasmática en vacas adultas e incrementos transitorios en insulina y glucagón (Itoh *et al.*, 2006), además de su efecto sobre la secreción de GH (Roche *et al.*, 2007).

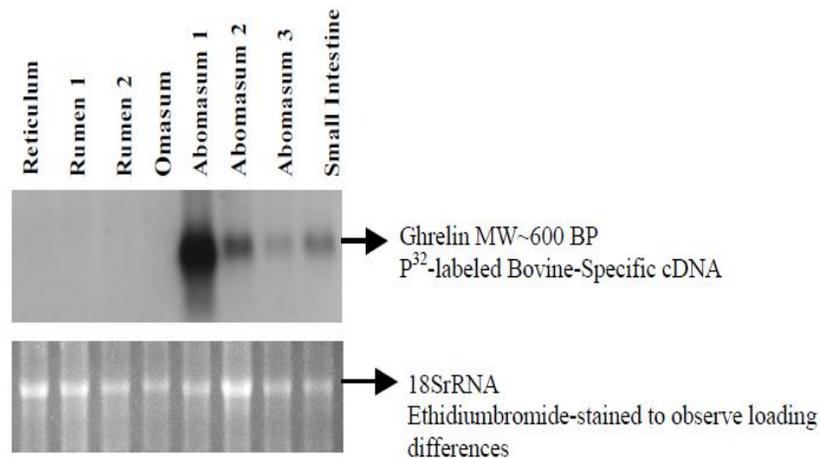


FIGURA 9. Identificación de Ghrelina en bovinos (Leaflet, 2004).

Se ha propuesto que la unión de los secretagogos a su receptor, promueven la activación de dos cascadas de señalización intracelular, la vía del AMPc-PKA (Chen *et al.*, 1996) y la vía del DAG-PKC ambas encaminadas a provocar un aumento de la concentración de calcio libre intracelular (FIGURA 10). Aunado a esto, se sabe que los secretagogos de GH, tanto La GHRH como los GHRPs modulan la actividad eléctrica de los somatotropos, incrementando la corriente de calcio (Chen y Clarke, 1995; Chen *et al.*, 1998), Sin embargo, pese a la existencia de diversos trabajos acerca de las acciones de la Ghrelina, poco se sabe sobre los mecanismos celulares por los que este péptido regula la secreción de GH en los somatotropos.

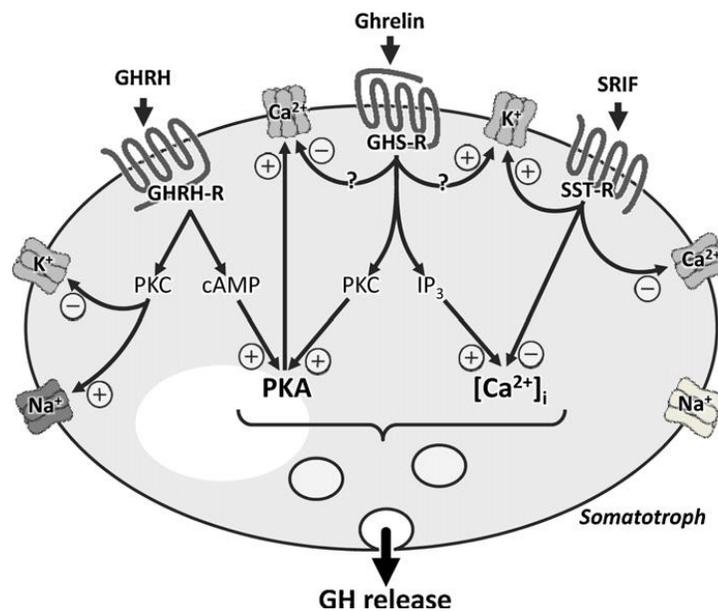


FIGURA 10. Mecanismo de señalización del receptor a Ghrelina (Yang *et al.*, 2012).

### **1.8.- Actividad eléctrica en somatotropos**

Los somatotropos, al igual que el resto de las células endocrinas adenohipofisarias son eléctricamente excitables, es decir, capaces de generar potenciales de acción incluso de manera espontánea (Ozawa y Sand 1986). El potencial de membrana en los somatotropos no es estable, fluctúa de manera espontánea en el sentido despolarizante a partir de un valor promedio basal (Corrette *et al.*, 1995).

El empleo de la técnica de *patch-clamp* en sus diferentes modalidades (Hamill *et al.*, 1981; Marty and Neher, 1995) ha permitido identificar y caracterizar los canales iónicos expresados en su membrana plasmática que participan en la actividad eléctrica de las células endocrinas adenohipofisarias (Dubinsky and Oxford, 1984; 1986). Los canales iónicos, son compuestos proteicos presentes en la membrana de todas las células animales, integrados por cadenas largas de residuos de aminoácidos, que en conjunto forman estructuras; en su mayoría acarreadores y canales, cuya función es la de permitir el libre paso a moléculas de tamaño y carga adecuadas a través de la membrana celular. Los canales iónicos son de respuesta rápida alterando durante un breve tiempo la permeabilidad iónica de la membrana y modificando su carga (Roseto, *et al.*, 2003; Alices-Villanueva, 2007).

Los canales iónicos poseen características particulares que los hacen altamente especializados. La velocidad para transportar iones a través de ellos es superior en comparación con una proteína transportadora. Se ha reportado que a través de los canales iónicos, puede existir un flujo de entre  $10^7$  y  $10^8$  iones por segundo. Las proteínas que conforman la estructura del canal se abren o cierran para permitir o impedir el flujo de iones en ambos sentidos. La apertura de estos puede ser activada en respuesta a la unión de neurotransmisores o ligandos, los cuales producen un cambio en la carga eléctrica de la membrana celular o la variación del pH, entre otros. Una de sus principales características es la elevada selectividad hacia algún tipo de ión en específico dada su carga eléctrica y su tamaño. Solo permiten el paso de partículas inorgánicas. Existen canales iónicos para Sodio ( $\text{Na}^+$ ), Potasio ( $\text{K}^+$ ), Cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). (Siegelbaum y Koester, 2001; Roseto, *et al.*, 2003; Alices-Villanueva, 2007).

Los canales iónicos, en general, se expresan de dos formas, abiertos o cerrados y el proceso de transición entre ambos estados es conocido como control de puerta (*gating*, en inglés). Los CI pueden ser estimulados de distintas formas y de acuerdo con la naturaleza del impulso que produce su activación, han sido descritos tres principales tipos de CI (Vega y Félix, 2001; Siegelbaum y Koester, 2001; Alberts, *et al.*, 2002).

a) Canales dependientes de voltaje (Electroexcitables): Algunos de los canales se abren o cierran sin importar las variaciones en el potencial de membrana; sin embargo, existen otros en los que su activación depende de las fluctuaciones eléctricas en la membrana por lo que se dice que son dependientes de voltaje. En estos, la regulación de la apertura o cierre procede de la variación en el potencial de membrana, este efecto eléctrico activa al sensor de voltaje de cada una de las subunidades que integran al canal, lo que provoca un cambio en la conformación del mismo.

b) Canales dependientes de sustancias químicas (Quimioexcitables): Los principales activadores (ligandos) de estos CI son los neurotransmisores, mensajeros intracelulares y sustancias del medio externo. La energía producida por la unión del ligando, impulsa al canal al estado abierto.

c) Canales que responden a deformaciones mecánicas de la membrana (Mecanoexcitables): Estos canales se pueden activar por distensión o presión, efecto producido en la membrana por el citoesqueleto. Este tipo de canales se encuentran en células receptoras auditivas y mecanoreceptoras en general.

A pesar de esta clasificación, es necesario indicar que pueden existir canales iónicos para un tipo de elemento, pero que la activación de cada uno de ellos puede ser de diferente naturaleza, como ejemplo; los canales de  $K^+$ , de los cuales existen tanto canales dependientes de voltaje como canales excitables en presencia de  $Ca^{2+}$  intracelular (Vega y Félix, 2001; Alberts, *et al.*, 2002).

Los canales iónicos dependientes de voltaje se han clasificado en dos subfamilias: la primera y más numerosa, se integra por más de 140 tipos con estructuras similares y con especificidad para los iones positivos (cationes); dentro de este grupo se encuentran los canales para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ . La segunda sub familia es pequeña y los canales que la integran poseen estructuras diferentes entre sí, además de ser específicos para iones negativos (aniones), en este grupo se incluyen los canales para  $\text{Cl}^-$  (Stojilkovic, *et al.*, 2010).

Mediante procesos de purificación, clonación molecular y determinación de la estructura primaria de los canales, se ha podido identificar que la estructura de sus subunidades principales se basa en un mismo patrón en lo general. La subunidad a (S a) está constituida por una secuencia continua de aminoácidos que integran cuatro dominios proteicos homólogos, cada uno de ellos constituido por seis segmentos transmembranales con estructura de  $\alpha$ -hélice (FIGURA 11). En acople con las subunidades auxiliares (b, g y d), rodean a un poro iónico hidrofílico central, lo que le da la forma característica de cono. De esta forma cada dominio contribuye con un cuarto de la pared del poro (Siegelbaum y Koester, 2001; Alberts, *et al.*, 2002; Roseto, *et al.*, 2003; Stojilkovic, *et al.*, 2010).

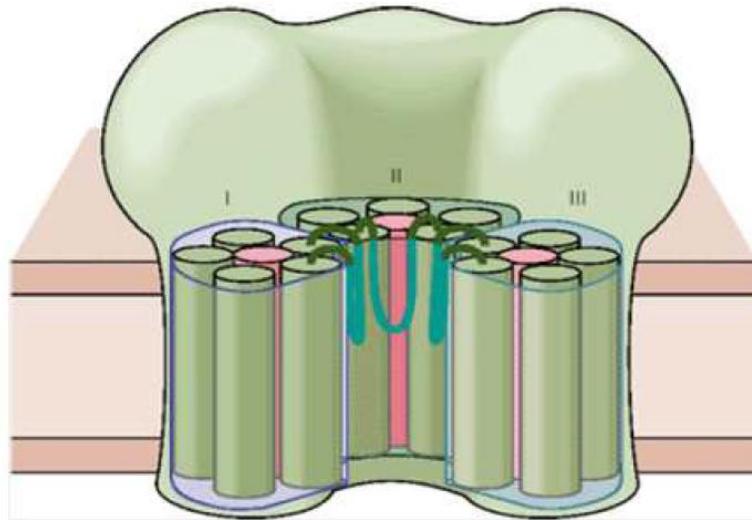


FIGURA 11. Estructura terciaria de un canal iónico dependiente de voltaje. El poro central está rodeado por la subunidad a integrada por cuatro dominio transmembranales homólogos. El asa que sobresale en cada cuadrante representa un segmento llamado región P que penetra en la membrana para formar la región más estrecha de la pared del poro. (Koester y Siegelbaum,2001b).

Los somatotropos expresan en su membrana plasmática una amplia diversidad de canales iónicos dependientes de voltaje: a) canales de potasio, que incluye los rectificadores anómalos (Xu *et al.*, 2002), canales tipo A, rectificadores tardíos y canales activados por calcio intracelular (Van Goor *et al.*, 2001a); b) canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (TTX) (Biales *et al.*, 1977; Corrette *et al.*, 1995; Dubinsky and Oxford, 1984; Kidokoro 1975) y c), canales de calcio de bajo umbral de activación (LVA) tipo T y canales de calcio de alto umbral de activación (HVA) tipo L (Matteson and Armstrong, 1986; DeRiemer and Sakman 1986; Mason and Rawlings 1988; Chen *et al.*, 1990c; Lewis *et al.*, 1988; Yamashita *et al.*, 1988; Sims *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2002) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades de los canales iónicos expresados en la membrana de somatotropos (Yang *et al.*, 2012).

Properties of calcium, potassium and sodium ion channels expressed on somatotrophs.

Channel type	Activation voltage	Effective holding potential	Inactivation rate	Specific blocker
<b>Calcium channels</b>				
L-type Ca <sup>2+</sup> channels	High	Below -40 mV	Slow	Nifedipine
T-type Ca <sup>2+</sup> channels	Low	-80 mV	Fast	Nickel
N-type Ca <sup>2+</sup> channels	High	Below -40 mV	Moderate	$\omega$ -Conotoxin GVIA
<b>Potassium channels</b>				
Transient outward (I <sub>A</sub> ) K <sup>+</sup> channels	Low	-80 mV	Fast	4-Aminopyridine
Delayed rectifying (I <sub>K</sub> ) K <sup>+</sup> channels	High	-40 mV	Slow very slow	Tetraethylammonium
Inward rectifying (I <sub>Kr</sub> ) K <sup>+</sup> channels	Very low			Barium (Ba <sup>2+</sup> )
<b>Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels</b>				
BK ('big' conductance)	Ca <sup>2+</sup> dependent			Iberiotoxin
SK ('small' conductance)	Ca <sup>2+</sup> dependent			Apamin and UCL 1848
<b>Sodium channels</b>				
<b>Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels</b>				
Tetrodotoxin sensitive (TTX-S)	Low	Below -80 mV	Very fast	Nanomolar concentrations of TTX
Tetrodotoxin resistant (TTX-R)	High	-50 mV	Slow	Micromolar concentrations of TTX

Los canales de potasio están involucrados en la fase de repolarización del potencial de acción así como en determinar la frecuencia de disparo en las células adenohipofisiarias (Corrette *et al.*, 1995; Van Goor *et al.*, 2001).

Por su parte, los canales de calcio tipo T participan en la despolarización subumbral del potencial de membrana, mientras que los canales de sodio y los canales de calcio tipo L son los responsables de la fase de ascenso del potencial de acción (Corrette *et al.*, 1995; Simasko, 1988; Van Goor *et al.*, 2001).

Los canales tipo T comienzan a activarse a partir de -60 mV, mientras que los canales tipo L lo hacen a -40 mV (Van Goor *et al.*, 2001a). Además de su bajo umbral de activación, los canales tipo T muestran una lenta cinética de desactivación

o cierre y una rápida cinética de inactivación. Los canales tipo L por su parte, se desactivan o cierran con rapidez al repolarizar el potencial de membrana y se inactivan muy lentamente durante despolarizaciones sostenidas, permitiendo un flujo masivo de iones calcio al interior celular (Matteson and Armstrong, 1986; Kalman *et al.*, 1988; Herrington and Lingle, 1992; Meza *et al.*, 1994).

Los canales de sodio se diferencian por su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX), habiendo entonces canales de sodio sensibles y canales de sodio resistentes a TTX. La apertura del canal de sodio genera una corriente entrante transitoria en condiciones fisiológicas, siendo su cinética de activación e inactivación más rápida que la de los canales tipo T (Sims *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1990c; Mason and Rawlings 1988; Yamashita *et al.*, 1988).

El análisis de las propiedades cinéticas macroscópicas de la corriente de calcio y de la corriente de sodio permite sugerir que el disparo de potenciales de acción requiere de la activación secuencial de canales tipo T, canales de sodio sensibles a TTX y canales tipo L (Matteson and Armstrong, 1986).

El potencial de membrana es el resultado de la separación de cargas positivas y negativas por medio de la membrana celular. Se habla de potencial de membrana en reposo cuando la célula tiene un exceso de cargas positivas en la parte externa de la membrana, contrario a las cargas en el interior que son preponderantemente negativas. El potencial de membrana ( $V_m$ ) se define como la razón de la carga interna ( $V_i$ ), menos la carga externa ( $V_e$ ), ambas cargas medidas en milivoltios (mV) y se expresa con la ecuación  $V_m = V_i - V_e$  (Koester y Siegelbaum, 2001a).

El potencial de acción es una onda de descarga eléctrica que se genera en la membrana citoplasmática de las células excitables. El impulso eléctrico es generado como respuesta a la despolarización de la membrana celular, mecanismo desencadenado por la activación de un receptor o por la liberación de iones intracelulares como el  $Ca^{2+}$ . La carga de una célula en reposo se mantiene siempre en valores negativos (supraumbrales), que por lo general es de -70mV, pero cuando se rebasa este umbral (-65 y -55 mV) se produce un potencial de acción (despolarización) (Koester y Siegelbaum, 2001a; Purves, *et al.*, 2008).

Un potencial de acción está integrado por varios sucesos secuenciados y de forma cíclica, en cada fase, interviene un tipo de canal de forma específica como se observa en la FIGURA 12. La amplitud del potencial de acción va a depender del tiempo que se mantenga despolarizada la membrana, este tiempo se ha de medir en milisegundos (Purves, *et al.*, 2008).

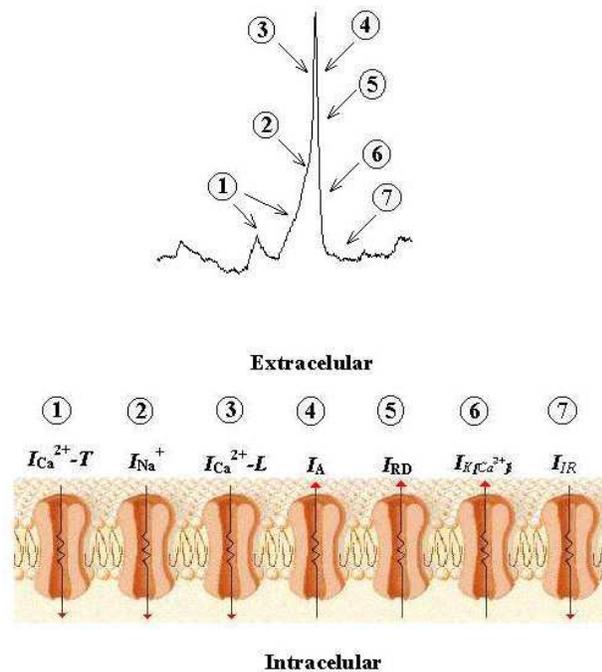


FIGURA 12. Participación de los canales iónicos en las diferentes etapas de potencial de acción (Modificado de Monjaraz, 1999).

### 1.9.-Acople excitación-secreción

La actividad eléctrica de los somatotropos se ve acompañada por un flujo intenso de iones calcio al citoplasma. La concentración de calcio libre intracelular registrada por microespectrofluorometría en somatotropos, muestran dos fases: una fase "estacionaria" durante los intervalos sin espigas, en la cual la concentración del ion se mantiene entre 60 y 150 nM, y una fase "transitoria" que se presenta cada vez que la célula dispara un potencial de acción, de modo que la  $[Ca^{2+}]_i$  llega a rebasar los 200 nM (Schlegel *et al.*, 1987; Mollard *et al.*, 1989, 1994; Charles *et al.*, 1999). Los canales tipo L permiten el paso masivo de iones calcio del medio extracelular al citoplasma durante los potenciales de acción (Matteson and Armstrong 1986).

La liberación de hormonas adenohipofisarias es el resultado de un proceso llamado exocitosis, que depende directamente de la concentración de calcio en el citoplasma (Zorec, 1996), en este proceso se observa un incremento de la actividad secretora de los somatotropos como respuesta a un aumento transitorio en el  $[Ca^{2+}]_i$ , ocasionado por un cambio en el potencial de membrana de las células en el sentido despolarizante (Fomina y Levitan, 1995).

## **JUSTIFICACIÓN**

Dada la importancia que tiene la Hormona de crecimiento (GH) sobre las diferentes funciones en el organismo, como el crecimiento, el metabolismo de las proteínas, la proliferación celular, la lipogénesis, así como su uso en la producción láctea y en el consumo voluntario del bovino, resulta necesario conocer la regulación que ejerce la Ghrelina (secretagogo natural de GH) sobre la fisiología celular de los somatotropos de manera general y de forma particular sobre la actividad eléctrica de estas células.

### **HIPÓTESIS**

La presencia de Ghrelina modifica la fisiología celular de los somatotropos bovinos, estimulando su actividad secretora debido a una modificación en su actividad eléctrica.

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto que ejerce la Ghrelina sobre la actividad eléctrica en los somatotropos de origen bovino.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Analizar la actividad eléctrica espontánea de los somatotropos.
- 2.- Analizar el efecto que ejerce la Ghrelina sobre la secreción de hormona de crecimiento.
- 3.- Determinar la participación de los canales iónicos dependientes de voltaje (canales de sodio, de calcio y canales de potasio) en el efecto que ejerce la Ghrelina sobre la actividad eléctrica.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Localización

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Biología Celular, en el área de Cultivos celulares y el área de electrofisiología en la Unidad de Diagnóstico de la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" (PZTM) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, ubicado en el kilómetro 14.5 de la Carretera libre Veracruz-Xalapa, en el municipio de Veracruz.

### 2.2 Medidas de bioseguridad

Se utilizaron una serie de procedimientos experimentales bajo condiciones controladas de esterilidad y bioseguridad dentro de las instalaciones, como en el rastro y el laboratorio de cultivos celulares; dentro del cual se utilizó un mechero de gas butano, campana de flujo laminar (Nuair®), material de vidriería esterilizado por calor húmedo (115 Atm/132°C), además de consumibles estériles desechables y estrictas reglas de higiene

### 2.3 Cultivo celular

#### 2.3.1 Obtención de la muestra:

Se utilizaron 18 glándulas pituitarias de cabezas de bovinos sacrificados bajo la NOM-033-ZOO-1995, que considera el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Estas muestras se obtuvieron del Rastro Frigorífico "Tipo Inspección Federal 353", ubicado en la comunidad de Vargas, Ver., latitud 96° 18' 4.39", longitud 9° 18' 37.58", altitud 40.00 msnm.

Las cabezas se trasladaron al área de necropsias de la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" en un tiempo no mayor a 1 hora *post mortem* donde se realizó la extracción de la pituitaria de forma aséptica para evitar contaminación. Cada glándula extraída, se colocó en un tubo cónico estéril de 50 ml con 20 ml de medio de cultivo DMEM ("Dubelcco's Modified Eagle's Medium, BioWest™") (4500 mg/L de glucosa con L-glutamina y 110 mg/L de piruvato sódico) suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino BioWest™) al 10%, y una combinación de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomina-fluconazol) al 1%. Posteriormente se transportó a 37°C al área de cultivos celulares para la dispersión celular en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

### **2.3.2 Cortes histológicos**

Se realizaron tres cortes histológicos para corroborar que se extrajo tejido hipofisario, de acuerdo al procedimiento reportado por Gallardo *et al.* (2005), para la preparación y tinción Hematoxilina-Eosina de cortes histológicos.

### **2.3.3 Obtención del cultivo primario**

La glándula se colocó en una caja de Petri estéril con medio de cultivo DMEM+SFB en cantidad suficiente para cubrir el tejido (20ml). Por microdissección se retiró el tejido fibroso (meninges) que rodea la hipófisis (Melmed, 2011). Por estereomicroscopía se identificó la adenohipófisis y se colocó en otra caja de Petri con medio de cultivo DMEM+SFB y se dividió en trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Las fracciones de tejido se colocaron en un recipiente estéril con 3 ml de medio DMEM+ASB (Albumina Sérica Bovina) y 6 ml de solución de Papaína (Papainasa; EC 3.4.22.2) diluido con buffer fosfato salino (PBS) 3mg/ml, se colocó un agitador magnético y se dejó a baño María por 45 min a 37°C, sobre una termoplatina magnética. El lisado celular se colocó en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm/5min a 24°C. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular para ser suspendido en 2 ml de medio DMEM+ASB.

### **2.3.4 Separación de células por gradiente de Percoll**

Para la obtención de poblaciones enriquecidas de somatotropos, se utilizó el gradiente discontinuo de Percoll<sup>®</sup> (SIGMA<sup>®</sup>) diluido al 80, 60, 40 y 20% con Solución Buferada de Fosfatos PBS (SIGMA<sup>®</sup>) para obtener las siguientes densidades: 1.118, 1.094, 1.071 y 1.048 g/cm<sup>3</sup> respectivamente (Hall *et al.*, 1982); de cada gradiente se tomaron 2ml en un tubo cónico de 15ml y colocados de mayor a menor densidad y por último 2ml de la suspensión celular para un total de 10ml. El tubo se centrifugó a 800g por 20min para su posterior siembra en placas multipozos.

### **2.3.5 Viabilidad y cuantificación celular**

Para determinar la viabilidad de las células obtenidas y su cuantificación se utilizó el método propuesto por Freshney (2005) y la observación con un hematocitómetro (cámara de Neubauer). El uso de la técnica de exclusión de azul de tripano, permitió conocer la concentración celular y diferenciar las células viables de las no viables antes de la siembra; cuando el colorante penetra en las células que presenten dañada su integridad (en la membrana) las células muertas se tiñen de azul. Se agregaron 25

μl de la suspensión celular en un tubo cónico con 75 μl de azul de tripano al 1%. En el hematocitómetro, se agregó la solución a cada cámara y se dejó reposar de 1 a 2 min, se observó al microscopio (Iroscope®) en seco débil (10x) y se realizó el conteo celular.

### **2.3.6 Identificación de somatotropos por inmunocitoquímica**

Para identificar el gradiente de Percoll con mayor población de células productoras de GH se utilizó un kit comercial de inmunodetección con el complejo avidina-biotina de Millipore® dónde por cada gradiente se sembró una placa para la identificación celular.

Para fijar las células a la placa de cultivo se retiró el medio de cada pozo y se realizaron 2 lavados con PBS, se añadieron 2ml de glutaraldehído/PBS al 2% y se dejó incubar durante una hora, finalizado el tiempo se lavó 3 veces con PBS. Se añadieron 2ml de Tritón (Sigma®) a 0.25% por pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30min, se lavó 2 veces con 2ml de PBS. Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena se colocaron 2ml de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0.5%/PBS/10min, se lavo 2 veces con PBS y 1 vez con la solución de lavado (5% rinse buffer, 95% H<sub>2</sub>O desionizada y 100μl de Tween 20), se colocaron 2ml de solución bloqueadora/2horas, posteriormente 1ml de anticuerpo primario/4horas (1:1000), se lavó 3 veces con 2ml de solución de lavado; y se añadió 1ml de anticuerpo secundario/1hora, se lavó 3 veces con 2ml de solución de lavado y se agregó 1ml de estreptavidina/1hora, se lavó 3 veces con solución de lavado; se agregaron 700μl del cromógeno/10min, se lavó 3 veces con solución de lavado y se agregó por último 2ml H<sub>2</sub>O desionizada, se observó en el microscopio invertido (DMIL Leica), se cuantificaron 100 células por pozo teñidas (café) y no teñidas y se determinó el gradiente de Percoll con mayor proporción de somatotropos.

### **2.3.7 Registro electrofisiológico**

Las somaotropos se sembraron en cajas Petri de 35mm de diámetro, las cuales se mantuvieron en cultivo por 24 horas antes de iniciar su tratamiento con Ghrelina o GHRP-6 con el propósito de que se adaptaran a su condición de cultivo, posteriormente fueron sometidos a registro electrofisiológico mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa en sus dos modalidades: fijación de corriente para el registro de la actividad eléctrica espontánea y fijación de voltaje para el análisis de los diferentes componentes de las corrientes iónicas de la

membrana. El registro electrofisiológico se realizó a temperatura de cuarto (19-22 °C). Las cajas Petri, se trasladaron de la incubadora a una cámara de experimentación montada en la platina de un microscopio invertido (DMIL, Leica). Se colocaron 1.5 ml de solución externa de registro y se conectó a tierra mediante un electrodo de referencia. La solución externa de registro se añadió a la caja Petri y se registró en un periodo de una a dos horas.

Los electrodos fueron elaborados de micropipetas de vidrio duro (borosilicato; SUTTER INSTRUMENTS) fabricados en un estirador horizontal (P30; Sutter Instruments Co.) con resistencias entre 4.5 y 8 M $\Omega$ . Las micropipetas se llenaron con solución interna de registro cuya composición varía según la corriente iónica que se pretenda aislar.

Los electrodos se conectaron al transductor corriente-voltaje del amplificador de *patch clamp* (Axopatch 200B), cuyo lazo de realimentación es de 500 M $\Omega$ . El posicionamiento del electrodo sobre la célula se realizó con ayuda de un micromanipulador motorizado (MP-225, Sutter Instruments Company). Una vez que se obtuvo un gigasello eléctrico (de resistencia igual o mayor a 1 G $\Omega$ ) entre la punta del electrodo y la membrana plasmática, se aplicó presión negativa en el interior del electrodo para romper la microárea de membrana y así establecer la configuración de célula completa. La captura de datos se inició aproximadamente 30 segundos después de alcanzar configuración completa, y concluyó generalmente en menos de 5 min.

Las corrientes de membrana fueron inducidas con pulsos cuadrados despolarizantes de amplitud y duración variable, mismos que se sumaron al potencial de mantenimiento (-80mV en todos los experimentos) en la entrada no inversora del transductor corriente-voltaje del amplificador Axopatch 200B. Cada patrón de pulsos se aplicó dos a tres veces de manera consecutiva y se obtuvo la respuesta promedio de la célula. Los patrones de pulsos fueron generados por una interfase Digidata 1322A que es controlada por una computadora personal. Las señales de corriente proporcionadas por el amplificador fueron filtradas a 5KHz; digitalizadas por la interfase a una velocidad de muestreo variable que va desde 10 hasta 100 $\mu$ s. Los pasos de voltaje fueron en intervalos de 1 a 10seg en los protocolos de registro, finalmente los datos se guardaron en el disco duro de la computadora. En la captura y análisis de las señales de voltaje se utilizó el programa pCLAMP1 v10.1 de Axon Instruments y el programa Sigma Plot 2007 v 11.02 de Jandel Corporation. Al realizar la cancelación analógica de corrientes capacitivas, el amplificador proporciona

estimaciones de la  $C_m$  (capacitancia celular; un índice electrofisiológico del área de la membrana plasmática: 1 picofaradio (pF) de capacitancia equivale a  $100 \mu\text{m}^2$  de membrana) y de la resistencia en serie con dicha capacitancia ( $R_{\text{serie}}$ ). La capacitancia celular y la resistencia en serie fue compensada ( $\sim 80\%$ ) antes de cada registro y la corriente de fuga rutinariamente sustraída usando la opción ofrecida por el programa Clampfit 10.1. También se supervisó el cambio en la resistencia en serie de cada registro y los registros con cambios significativos en resistencia en serie fueron excluidos del análisis final de los datos. La composición iónica de las soluciones de registro utilizadas es la siguiente:

**a) Corrientes totales** (Gomora *et al.*, 1996)

Sol. Externa (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes y 5 glucosa; pH 7.30, ajustado con NaOH.

Sol. Interna (mM): 100 KCl,, 30 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 Hepes, 2 ATP, 0.05 GTP, y 5 glucosa (pH 7.30 ajustado con KOH).

**b) Corriente de sodio** (Monjaraz *et al.*, 2000)

Sol. Externa (mM): 150 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 CdCl<sub>2</sub>, 10 Hepes y 5 glucosa; pH 7.30, ajustado con NaOH.

Sol. Interna (mM): 100 CsCl, 30 NaCl, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.05 GTP, 10 Hepes y 5 glucosa (pH 7.30 ajustado con CsOH).

**c) Corriente de calcio (bario):** (Kwiecien *et al.*, 1998)

Sol. Externa (mM): 133 NaCl, 10 TEA, 10 BaCl<sub>2</sub>, 0.001 TTX, 10 Hepes, 5 glucosa, (pH 7.30 ajustado con NaOH)

Sol. Interna (mM): 100 CsCl, 30 NaCl, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.05 GTP, 10 Hepes y 5 glucosa (pH 7.30 ajustado con CsOH).

**d) Corriente de Potasio:** (Gomora *et al.*, 1996)

Sol. Externa (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 1 CdCl<sub>2</sub>, 0.001 TTX y 5 glucosa; pH 7.30, ajustado con NaOH.

Sol. Interna (mM): 100 KCl, 30 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 Hepes, 2 ATP, 0.05 GTP, y 5 glucosa (pH 7.30 ajustado con KOH).

### **2.3.8 Análisis estadístico**

Se utilizó el programa STATISTICA v 7.0 para Windows StatSoft, Inc. (2001), para todos los análisis estadísticos. Utilizando ANDEVA de una sola vía; las comparaciones múltiples usadas para evaluar la diferencia entre grupos dentro del mismo experimento fueron analizadas por la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Las gráficas se realizaron con ayuda del programa SigmaPlot (2007) v 10 y Origin 7 (2002), en ellas se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar de la media en cada grupo experimental dentro de cada experimento.

### 3. RESULTADOS

Se extrajo tejido hipofisario, que muestra similitud en la morfología y tinción reportada (Sisson y Grossman 2005; Melmed 2011). Las glándulas se encontraron viables y sin cambios patológicos aparentes, únicamente presentaron diferencias en el tamaño de cada glándula, probablemente ligado con la edad y la talla de los animales.

En la FIGURA 13 se muestra la identificación de los somatotropos; en el panel A, se realizó un corte histológico a una glándula pituitaria para confirmar que se trabajó con tejido adenohipofisario. Con la técnica de hematoxilina y eosina se observan las células y los acinos que confirman que es adenohipofisis; en el panel B, se observan células de la pituitaria en cultivo primario, cabe mencionar que aquí, se pueden encontrar los cinco tipos celulares antes mencionados. En el panel C; se muestran las células adenohipofisarias en uno de los protocolos de inmunocitoquímica, dichas células se encuentran con el anticuerpo primario que reconoce a GH (1:000) elaborado en conejo y sin el anticuerpo secundario que reconoce al primario (40X); en esta imagen no se observa coloración café rojizo. La imagen que se muestra en el panel D, son células adenohipofisarias que se encuentran en el protocolo de inmunocitoquímica, las cuales están sin el anticuerpo primario que reconoce a GH elaborado en conejo y con el anticuerpo secundario (1:1000) elaborado en cabra que reconoce al primario (40X), en esta imagen no se observa coloración café rojizo. En el panel E, son células teñidas de café rojizo, células adenohipofisarias con el anticuerpo primario que reconoce a GH (1:000) elaborado en conejo y con el anticuerpo secundario (1:1000) elaborado en cabra que reconoce al primario (40X), en la fracción 40% del gradiente discontinuo de percoll. Por último, en el panel F, se muestra el resumen del conteo de las células, normalizadas a por ciento en cada uno de los diferentes gradientes, el gradiente con mayor proporción es el de 40%, el cual fue utilizado para los experimentos de electrofisiología.

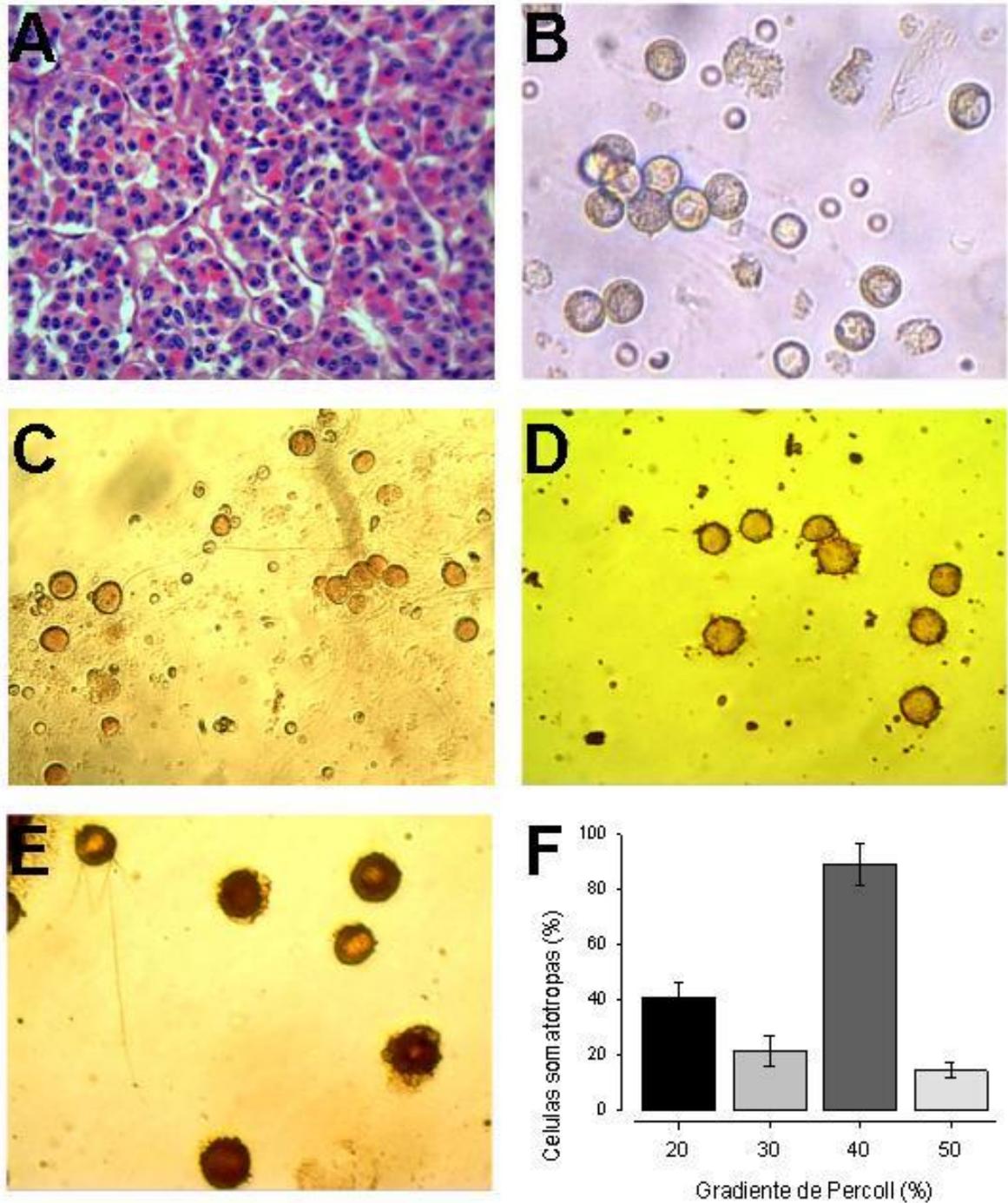


FIGURA 13. Células de la pituitaria anterior de bovino: Imágenes de Immunocitoquímica. (A) Corte histológico de adenohipofisis con tinción de hematoxilina y eosina (10x). (B) Cultivo primario de células adenohipofisiarias (40X). (C) Células adenohipofisiarias con el anticuerpo primario que reconoce a GH (1:1000) elaborado en conejo y sin el anticuerpo secundario que reconoce al primario (40X). (D) Células adenohipofisiarias sin el anticuerpo primario que reconoce a GH elaborado en conejo y con el anticuerpo secundario (1:1000) elaborado en cabra que reconoce al primario (40X). (E) Células adenohipofisiarias el anticuerpo primario que reconoce a GH (1:1000) elaborado en conejo y con el anticuerpo secundario (1:1000) elaborado en cabra que reconoce al primario (40X), en la fracción 40% del gradiente discontinuo de percoll. (F) porcentaje de células teñidas en los diferentes gradientes de percoll.

### 3.1 Viabilidad y cuantificación del cultivo primario por azul de tripano.

El conteo obtenido en promedio fue de  $3.3 \times 10^6$  células/ml  $\pm 0.5 \times 10^6$  células/ml. La cuantificación mínima requerida para una placa de cultivo debe de ser de  $1.2 \times 10^6$  células, es decir  $2 \times 10^5$  células por pozo; para este trabajo se sembraron una mayor cantidad de células por pozo y suficientes para realizar de 2 a 3 placas por experimento (FIGURA 14).

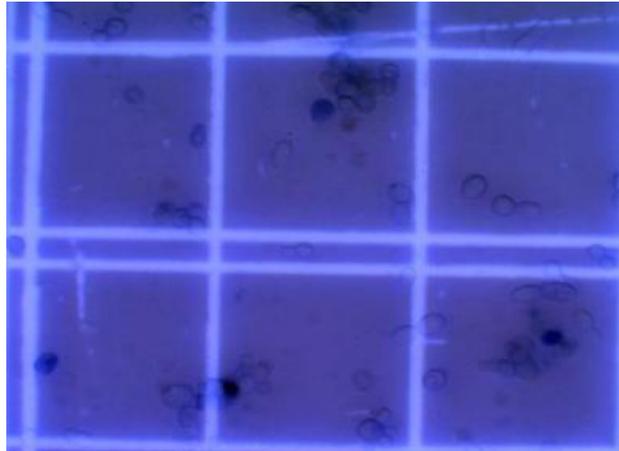


FIGURA 14. Cuantificación celular (40X)

En la Figura 15 se distingue una célula no viable, la viabilidad de las células en cultivos primarios debe ser mayor del 70% (Freshney, 2005) y en este trabajo se obtuvo en promedio 89%.

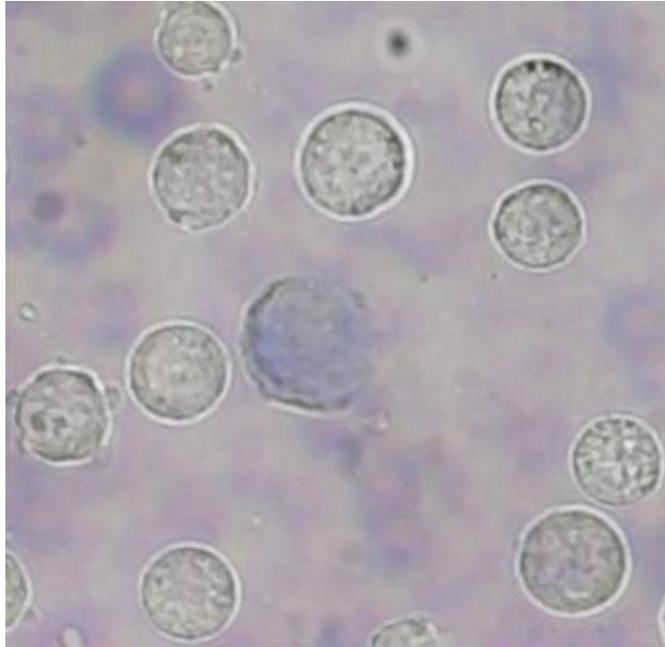


FIGURA 15. Viabilidad Celular. En el centro se muestra una célula no viable.

### 3.2 Actividad eléctrica espontánea

Los somatotropos de bovino mantenidos en cultivo por 72 h, tanto en ausencia como en presencia de Ghrelina (10 nM) o GHRP-6 (100 nM) generan de manera espontánea potenciales de acción. El potencial de membrana de las células es inestable (valor promedio de entre -70 y -80 mV), con pequeñas fluctuaciones de voltaje en el sentido despolarizante ~10 mV, que ocasionalmente llegan a ser lo suficientemente grandes para conducir al disparo de potenciales de acción. Los somatotropos de bovino exhiben 3 diferentes patrones de actividad eléctrica: a) células silentes; b) células con disparo en espiga; c) células con disparo en meseta (FIGURA 16). La actividad eléctrica espontánea de estas células fue registrada en la modalidad de fijación de corriente en la configuración de célula completa mediante la técnica de *patch-clamp*. La resistencia de acceso de las células no fue mayor a 10 M $\Omega$  durante el registro, el cual tuvo una duración promedio de 3 min.

La FIGURA 17 muestra la variabilidad de la actividad eléctrica espontánea que presentan los somatotropos de bovino (duración de los trazos de 50 seg). Con el propósito de observar más detalladamente la morfología del potencial de acción se amplificó el trazo de los primeros 5 segundos.

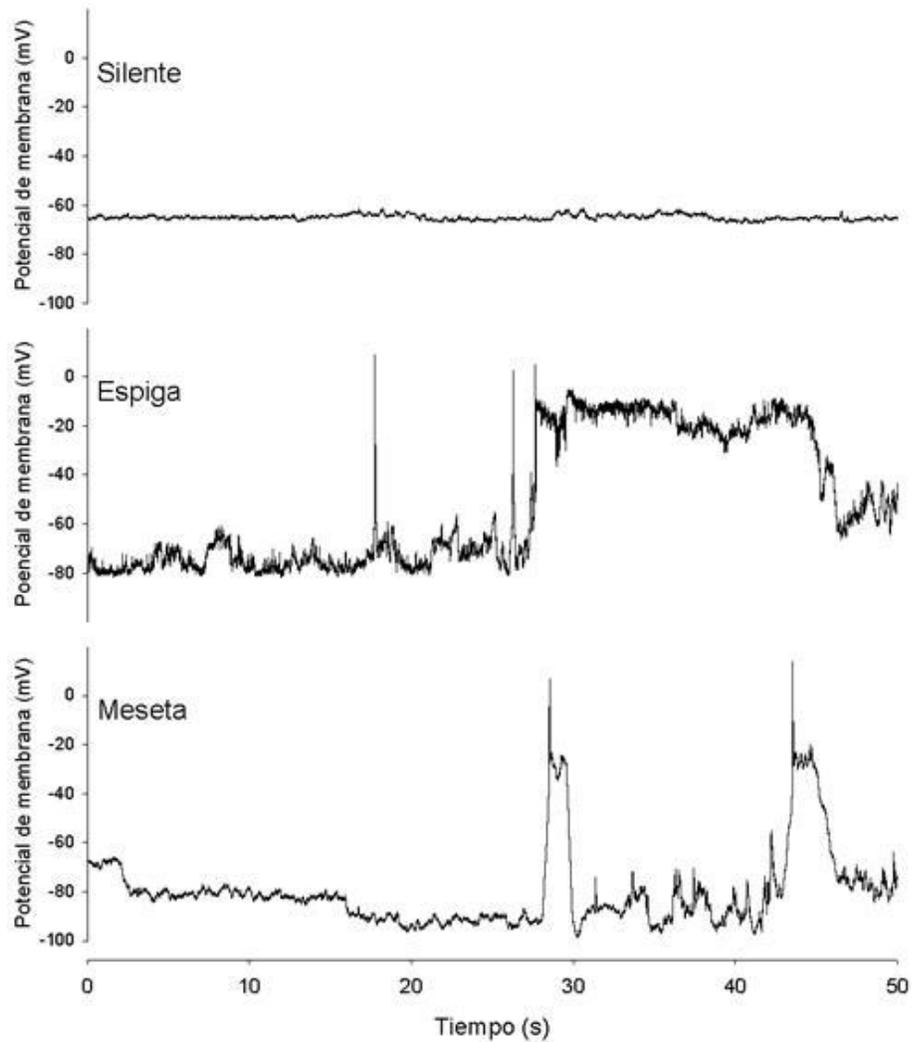


FIGURA 16. Patrones de disparo de la actividad eléctrica espontánea en los somatotropos de bovino. Trazos representativos con una duración de 50 segundos de registro. (De superior a inferior); Se muestra al patrón de oscilación del potencial de membrana de una célula silente, (célula sin actividad eléctrica espontánea). Patrón de disparo de una célula con oscilación del potencial de membrana en forma de espigas y por último, patrón del potencial de membrana mostrando la oscilación del potencial de membrana en forma de mesetas y regenerando al potencial de membrana en reposo.

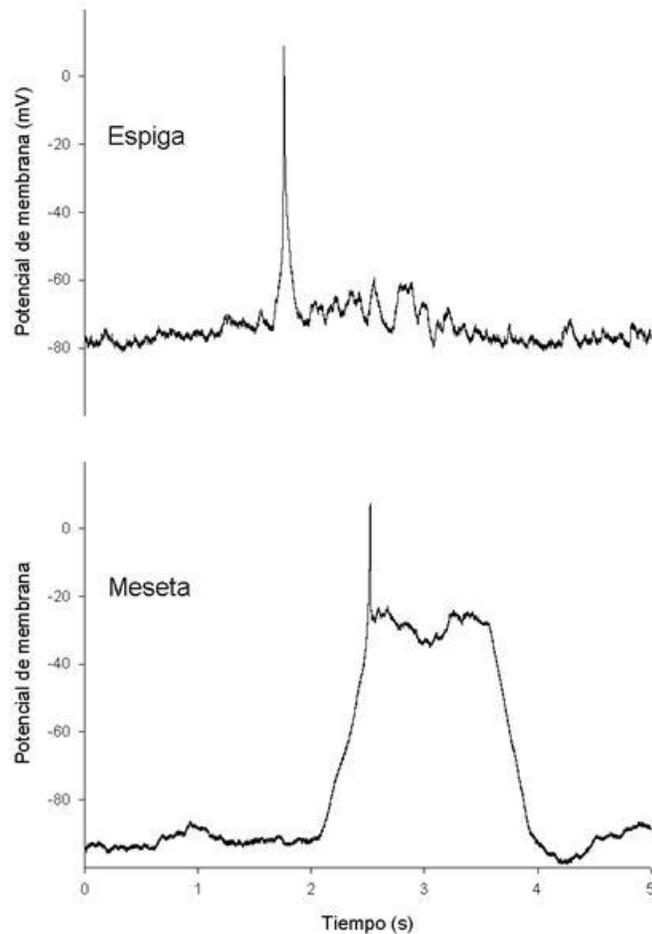


FIGURA 17. Patrones de disparo de la actividad eléctrica espontánea en somatotropos de bovino. Trazos representativos con una duración de 5 segundos de registro. (De superior a inferior); Se muestra el patrón de disparo de una célula con oscilación del potencial de membrana en forma de espigas y patrón del potencial de membrana mostrando la oscilación del potencial de membrana en forma de mesetas y regenerando al potencial de membrana en reposo.

### 3.3 Corrientes totales y potenciales de acción evocados en somatotropos de bovino

Se realizaron los registros de fijación de corriente y voltaje en la modalidad de célula completa. Las corrientes totales fueron evocadas por pasos despolarizantes de 10 mV que partieron de un potencial de mantenimiento (Hp) de -80 mV con una duración de 100 ms (FIGURA 18). Las células registradas en este estudio, mostraron corrientes salientes que tenían características de lenta inactivación, corriente de  $K^+$  parecidas a la rectificadora tardía, que se muestran en otros tipos celulares de somatotropos de diferentes especies o en otras células endocrinas; también se evocaron corrientes entrantes que son la suma de la participación de los canales de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , la relación

corriente voltaje para los componentes entrantes y salientes se muestran en la Figura 18C; las corrientes entrantes iniciaron alrededor de -40mV y llegaron al máximo alrededor de -10 mV, el potencial de reversión se alcanzó en valores cercanos a +40mV; en la mayoría de los somatotropos de bovino (n=8) se registró un potencial de membrana estable en valores entre -85 a -75 mV (-80 mV  $\pm$  4.5 mV) El componente sostenido de la corriente de salida se activó alrededor de -10 mV.

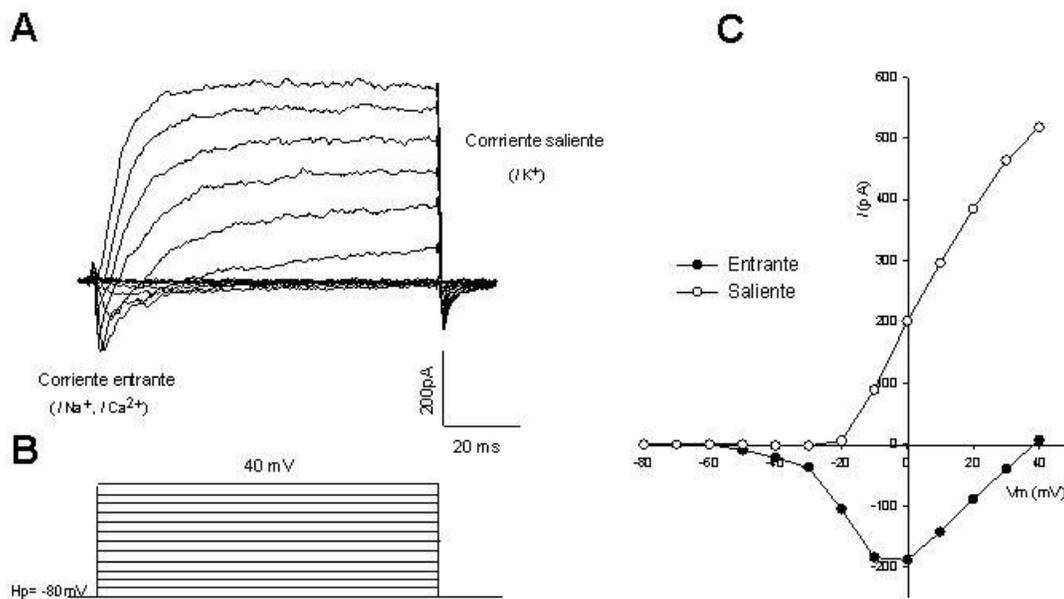


FIGURA 18. Corrientes totales en modalidad de célula completa de somatotropos de bovino bajo condiciones control. (A) Familia de trazos de corriente entrante ( $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ) y corriente saliente evocado por pasos despolarizantes de 10 mV de un potencial de mantenimiento de -80 mV. (B) Relación corriente voltaje de la corriente entrante (valor al pico) y el componente saliente (máxima corriente en el último 1 ms).

La inyección de corriente en pulsos de 2 nA con una duración de 500ms evocó un simple potencial de acción en todas las células (FIGURA 19 A); las oleadas eléctricas, en la mayoría consistieron de espigas despolarizantes (amplitudes de 50-60 mV) con una relativa rápida fase repolarizante seguida por una rápida hiperpolarización. El promedio del ancho medio de los potenciales de acción fue de  $55 \pm 12.4$  ms (n=8). Los cambios en el potencial de membrana en respuesta a inyecciones de corriente (-0.010 - 008 nA) fue lineal (FIGURA 19 B) y el promedio de resistencia de entrada calculado de la pendiente de la relación corriente voltaje fue de  $4.33 \pm 0.14$  G $\Omega$  (n=8)

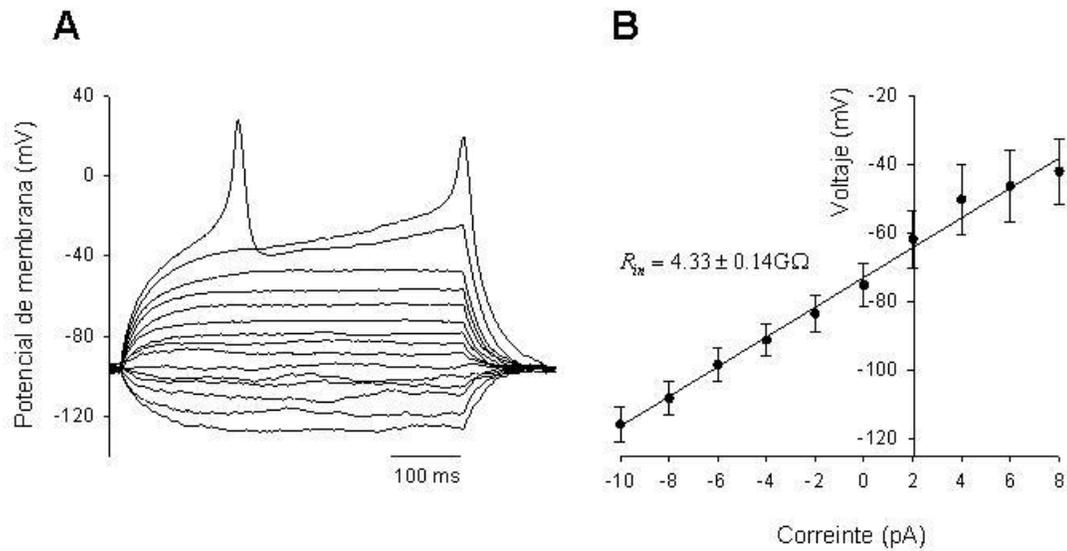


FIGURA 19. Características del potencial de acción (PA) en somatotropos de bovino. (A) Ejemplo de trazos de un PA evocado por pulsos de inyección de corriente en pasos de 2 pA con una duración de 500ms. (B) Relación de los cambios en el voltaje en respuesta a corriente inyectada con la pendiente de la línea que muestra un estimado del promedio de resistencia de entrada ( $R_{in}$ ) ( $n = 8$ ).

Se han encontrado células que muestran a la inyección de corriente (2 nA) una morfología de potencial de acción en espiga y otras que muestran una morfología del potencial de acción en meseta (FIGURA 20).

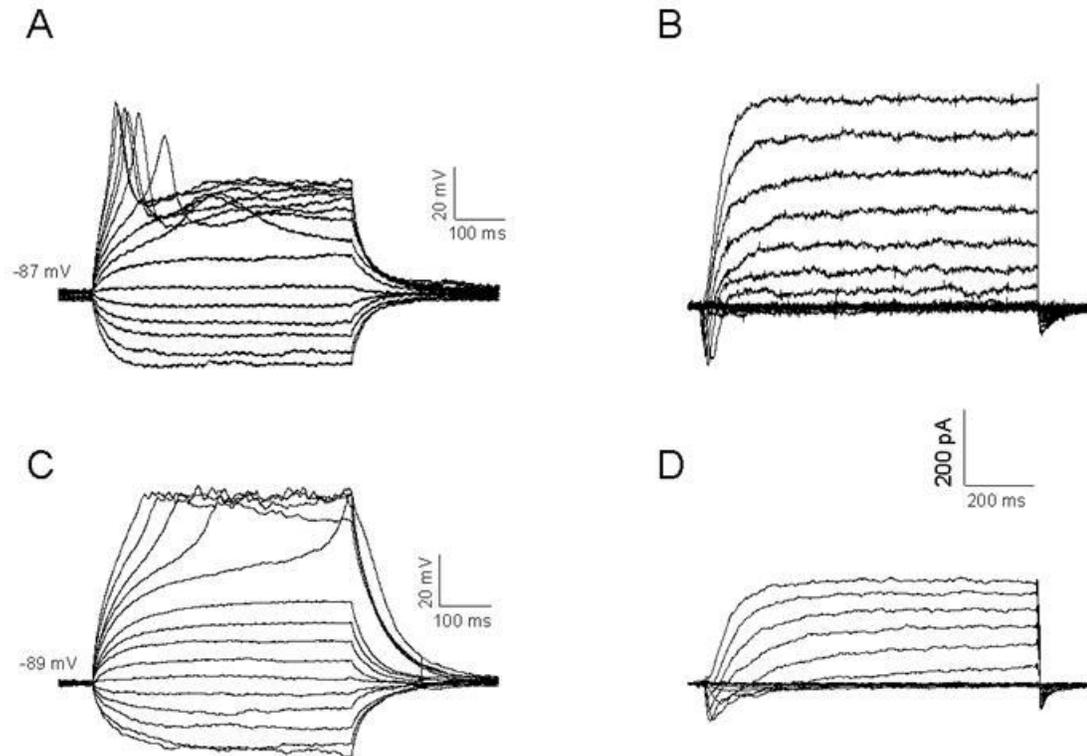


FIGURA 20. Patrones morfológicos del potencial de acción evocado por inyección de corriente. A. Potenciales de acción en morfología de espiga evocada por inyección de corriente. B Corrientes totales de la célula en A, mostrando una mayor cantidad de corriente de potasio. C. Potencial de acción en morfología de meseta evocado por inyección de corriente. D. Corrientes totales de la célula en C, mostrando una menor cantidad de corriente de potasio.

### 3.4 La corriente de sodio

Con el fin de analizar si la Ghrelina o el GHRP-6 pudiera modificar las corrientes entrantes como la de sodio, se propuso registrar la corriente y analizar las propiedades cinéticas macroscópicas. La FIGURA 21A muestra trazos representativos de la corriente de sodio de una célula control en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes de amplitud variable, aplicados a partir de un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV. La corriente de sodio a partir de  $-50$  mV es pequeña y de lenta activación, pero conforme se va despolarizando la membrana plasmática, ésta crece de manera significativa y se hace más rápida, alcanzando su valor máximo a  $-30$  mV. A este voltaje la corriente de sodio alcanzó su valor máximo en aproximadamente  $1.2$  ms y se inactivó casi por completo en los siguientes  $7$  ms. La cinética de la corriente de sodio se aceleró aún más a  $-20$  mV, pero su amplitud disminuyó debido a la reducción de la fuerza impulsora para la entrada de iones

sodio. El apartado B de la FIGURA 21 muestra la relación entre la amplitud de la corriente y el pulso despolarizante aplicado (curva I-V) en cada una de las condiciones experimentales (control, Ghrelina 10 nM y GHRP-6 100 nM). La corriente de sodio comienza a ser detectada a partir de  $-50$  mV, alcanzando su valor máximo a  $-30$  mV y cambiando de dirección de entrante a saliente en la vecindad de  $+40$  mV, valor muy cercano al potencial de equilibrio calculado por la ecuación de Nerst ( $E_{Na} = +40.23$  mV) a  $20^{\circ}\text{C}$  con respecto a la concentración de sodio en las soluciones de registros usadas.

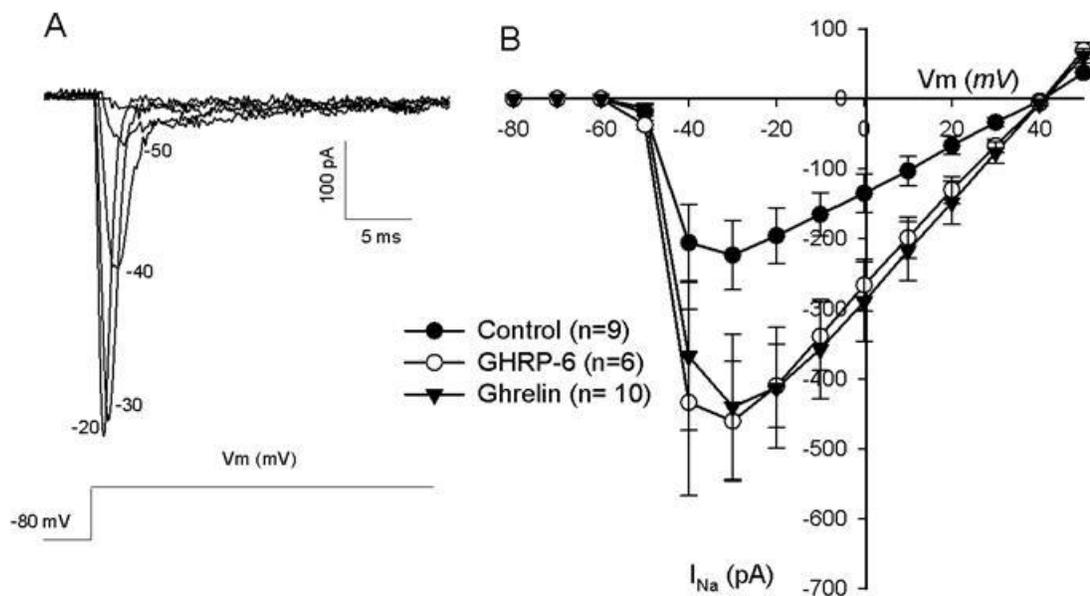


FIGURA 21. Actividad de canales de sodio en somatotropos de bovino. A. Familia de trazos de corriente de sodio registrado en un somatotropo de bovino en condiciones de cultivo estándar. Las corrientes fueron evocadas por pulsos despolarizantes; los números junto a los trazos indican el potencial de membrana ( $V_m$ ) en milivoltios durante el pulso despolarizante correspondiente. El potencial de mantenimiento fue de  $-80$  mV con una duración de 7ms. B. Amplitud al pico de la corriente de sodio en función del  $V_m$ . Los datos corresponden a las mediciones de los trazos en A.

### 3.5 La Ghrelina y el GHRP-6 modulan la amplitud y la densidad de corriente de sodio

Inicialmente, se decidió averiguar si la amplitud de la corriente de sodio es afectada por la presencia crónica de Ghrelina o de GHRP-6. Se realizaron experimentos de fijación de voltaje en somatotropos de bovino mantenidos en condición control, así como en células cultivadas durante 3 días en presencia de 10 nM de Ghrelina o 100 nM de GHRP-6.

La FIGURA 22A muestra trazos representativos de la corriente de sodio a -30 mV en células control y tratadas con los secretagogos Ghrelina 10 nM y GHRP-6 100nM, mientras que la FIGURA 22 B grafica los resultados promedios obtenidos para cada condición experimental. Resulta evidente que las células tratadas con GHS, exhiben corrientes de sodio de mayor amplitud que las células control. En promedio y tomando como referencia las células control, la amplitud al pico de la corriente de sodio se incrementó más de 2 veces por el tratamiento. La presencia crónica de este péptido no modificó el área membranal de las células (FIGURA 23 A). El efecto estimulador de los GHS sobre la densidad de corriente de sodio sigue mintiéndose en la misma proporción (FIGURA 23 B).

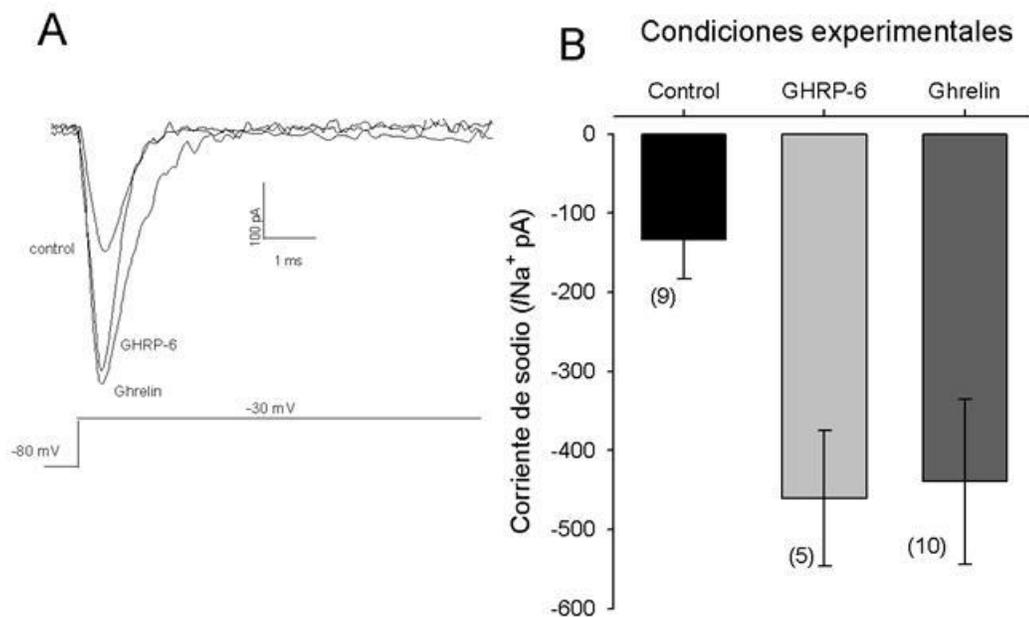


FIGURA 22. Efecto del tratamiento crónico con Ghrelina 10 nM o GHRP-6 100 nM sobre la amplitud de la corriente de sodio. A. Trazos representativos de la corriente de sodio inducida por un pulso despolarizante a -30 mV partiendo de un potencial de mantenimiento de -80 mV, en las condiciones control y tratadas. B. Valores promedio de la amplitud de la corriente de sodio. Los números a un costado de las barras de error representan el número de células analizadas.

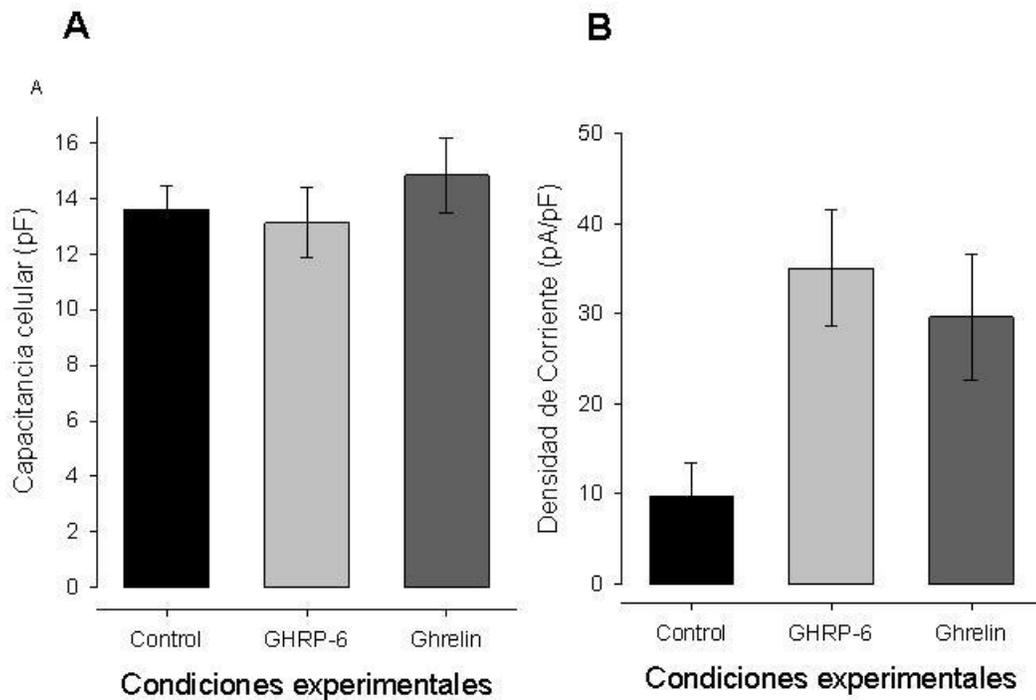


FIGURA 23. Efecto del tratamiento crónico con Ghrelina 10 nM o GHRP-6 100 nM sobre la amplitud de la corriente de sodio. A. La capacitancia celular no mostró cambio significativo ( $p > 0.05$ ). B. La densidad de corriente se obtuvo al dividir el valor al pico de la corriente de sodio evocada a  $-30$  mV entre la capacitancia de cada célula registrada. El tratamiento con los secretagogos induce un aumento en la densidad de corriente de sodio ( $p < 0.05$ ). La densidad de corriente esta expresa en pA/pF. Los datos se encuentran expresados como promedios  $\pm$  ee.

El efecto estimulador que ejerce la Ghrelina o el GHRP-6 sobre la densidad de corriente de sodio puede deberse a un incremento en la proporción de canales de sodio disponibles a ser abiertos al potencial de mantenimiento con el cual se fijó las células durante el registro electrofisiológico, que fue de  $-80$  mV. Con la finalidad de poner a prueba esta hipótesis, se decidió analizar la cinética de inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio en cada uno de los grupos experimentales. Para construir la curva de inactivación fue utilizado el procedimiento descrito por Hodgkin & Huxley 1952, el cual consistió en: (a) la aplicación de un protocolo de dos pulsos, el primero de ellos se denomina condicionante el cual tiene una duración de 30 ms y con una amplitud variable (de  $-90$  a  $0$  mV), y un segundo pulso llamado de prueba, que llevó el potencial de membrana a  $-30$  mV y tuvo una duración de 10 ms; (b) se graficó la amplitud al pico de la corriente de sodio inducida por el pulso de prueba en función del voltaje del pulso condicionante, y (c) se ajustaron los datos obtenidos de cada célula con una ecuación tipo Boltzmann.

$$I_{Na} = I_{max} / \left( 1 + \exp \left[ \frac{V_m - V_{1/2}}{k} \right] \right)$$

Dónde:

$I_{Na}$  = es la amplitud de la corriente durante el pulso de prueba

$I_{max}$  = es el valor máximo de la  $I_{Na}$

$V_{1/2}$  = es el voltaje al cual se encuentran inactivados el 50% de los canales de sodio.

$k$  = es un factor de pendiente que determina la forma de la curva

Posteriormente, los datos y la función ajustada se normalizaron respecto al valor de  $I_{max}$ . El resultado de la curva de inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio se muestra en la FIGURA 24. Las curvas en la FIGURA 24 A indican de qué manera va disminuyendo la fracción de canales de sodio no inactivados a medida que se incrementa la despolarización de la membrana. Los valores de  $V_{1/2}$  y de  $K$  se comparan en la FIGURA 24 B, y los de  $I_{max}$  en la FIGURA 24 C. Se puede apreciar que a pesar de las claras diferencias en  $I_{max}$  en las células tratadas con GHRP-6 Y Ghrelina, el porcentaje de canales no inactivados al potencial de mantenimiento es superior al 90% en las tres condiciones experimentales. Asimismo, los valores de  $V_{1/2}$  y de  $K$  tampoco resultaron afectados por ninguno de los tratamientos.

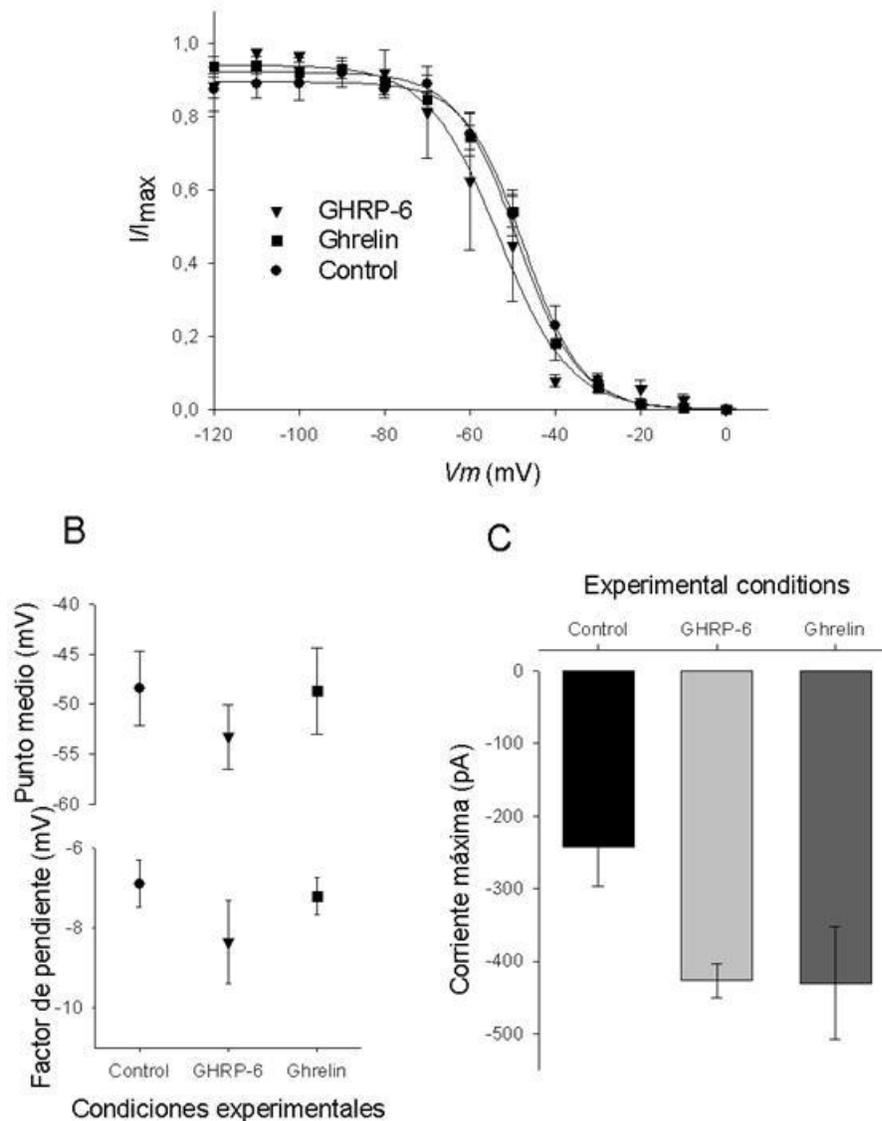


FIGURA 24. Curva de inactivación en estado estacionario de la corriente de sodio en ausencia (control) y en presencia crónica de secretagogos. A. Amplitud normalizada de la corriente de sodio evocada por el pulso de prueba a  $-30\text{mV}$  que se alcanza durante el pulso condicionante, en función del potencial de membrana. Los datos se obtuvieron a partir de 6 células control ( $\bullet$ ), 4 células tratadas con GHRP-6 ( $\blacktriangledown$ ) 8 células tratadas Ghrelin ( $\blacksquare$ ) B. Parámetros del ajuste de los datos experimentales mediante una ecuación tipo Boltzmann; punto medio ( $V_{1/2}$ ) y factor de pendiente ( $k$ ) C. Valor máximo de la corriente de sodio ( $I_{\text{max}}$ ) durante el pulso de prueba.  $*(p < 0.01)$ .

El siguiente aspecto examinado, fue si el tratamiento crónico con los secretagogos alteraba la cinética de activación de los canales de sodio, es decir su dependencia al voltaje. Esto implicó, como primer paso, la obtención de curvas  $I-V$  a partir de mediciones de la amplitud al pico de la corriente de sodio cuando se aplicaron pulsos

de voltaje a diversos valores de  $V_m$ , desde -80 hasta +50 mV. El tratamiento con GHRP-6 indujo un aumento en la amplitud de la corriente en cada uno de los voltajes investigados, sin observarse cambios en las condiciones experimentales (FIGURA 22).

El segundo paso fue dividir los datos individuales de la corriente entre la fuerza impulsora respectiva ( $V_m - V_{rev}$ ) para calcular la conductancia al sodio ( $G_{Na}$ ), y el tercer paso fue ajustar los datos experimentales con una función tipo Boltzmann.

$$G_{Na} = G_{max} / \left[ 1 + \exp \left\{ - \left( V_m - V_{1/2} \right) / k \right\} \right]$$

Donde:

$G_{Na}$  = es la conductancia al sodio

$G_{max}$  = es la conductancia máxima al sodio

$V_m$  = es el potencial de membrana

$V_{1/2}$  = es el voltaje al cual se encuentran abiertos el 50% de los canales de sodio

$k$  = es el factor de pendiente que determina la forma de la curva de activación

Finalmente, los datos y la función ajustada se dividieron entre  $G_{max}$  a fin de obtener las curvas de activación normalizadas que se muestran en la FIGURA 25 A. En todos los casos, la conductancia normalizada (es decir, la fracción de canales de sodio abiertos) se incrementó a lo largo del eje de voltaje siguiendo una función sigmoial y tendió a saturar por arriba de -10 mV. El tratamiento crónico con Ghrelina o GHRP-6 no afectaron de manera significativa ( $p > 0.05$ ) los parámetros que determinan la forma y la posición de la curva de activación en el eje de voltaje (FIGURA 25 B), únicamente provocaron un aumento en el valor promedio de  $G_{max}$  (FIGURA 25 C).

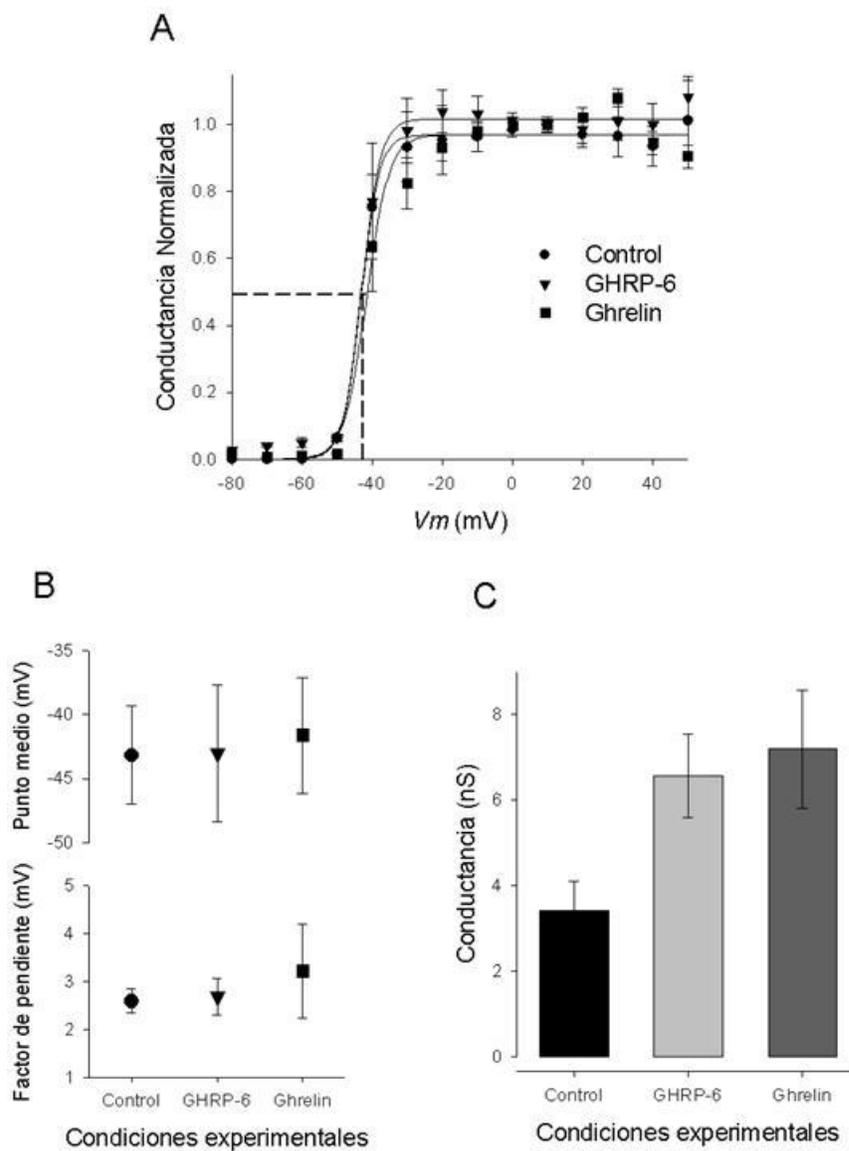


FIGURA 25. Efecto de la Ghrelina 10 nM o el GHRP-6 100nM sobre la curva de activación de los canales de sodio. A. Curvas de activación de los canales de sodio normalizados, obtenidas a partir de los datos de corriente de la 7B. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales con una función tipo Boltzmann. Los datos se obtuvieron a partir de 8 células control (●), 6 células tratadas con GHRP-6 100nM (▼) 5 células tratadas con Ghrelina (■). B. Parámetros de las curvas de activación; punto medio ( $V_{1/2}$ ) y factor de pendiente ( $k$ ). C. Valor máximo de la conductancia al sodio ( $G_{max}$ ). \*( $p < 0.05$ ).

### 3.6 Corriente de calcio

El disparo de un potencial de acción esta dado por la entrada masiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que ocasiona un incremento transitorio en la concentración de calcio libre intracelular, señal suficiente para estimular la secreción de GH.

La Ghrelina como el GHRP-6 inducen un aumento en la expresión funcional de canales de sodio, por lo que se decidió investigar, si estos péptidos ejercían un efecto similar en la expresión funcional de canales de calcio.

Se registró inicialmente la actividad de los canales de calcio en somatotropos de bovino, mantenidos en condiciones de cultivo estándar, la solución externa fue suplementada con  $1 \mu\text{M}$  de TTX para bloquear la corriente de sodio, y con  $10 \text{ mM}$  de cloruro de bario como acarreador de carga, mientras que en la solución interna se sustituyó el potasio por cesio para bloquear la corriente de potasio.

Como se muestra en la FIGURA 26 A, las corrientes de bario fueron activadas por pulsos despolarizantes de voltaje aplicados a partir de un potencial de mantenimiento de  $-80\text{mV}$  y con una duración de  $250 \text{ ms}$ . La corriente de bario muestra dos componentes: un componente de rápida activación y de rápida inactivación en los primeros  $50 \text{ ms}$ , el segundo componente de lenta activación y de lenta inactivación que se mantiene durante los  $250 \text{ ms}$  que dura el pulso despolarizante. El primer componente tiene las propiedades cinéticas de la corriente LVA tipo T y el segundo componente tiene propiedades cinéticas de la corriente de calcio que fluye a través de los canales HVA.

También se determinó la dependencia al voltaje de la corriente de bario (FIGURA 26 B y C), observándose que los canales de calcio comienzan abrirse a partir de  $-50 \text{ mV}$ , alcanzando su valor máximo en la vecindad de  $-10 \text{ mV}$ . La amplitud de la corriente de bario va disminuyendo a medida que el potencial de membrana se despolariza más y se acerca a su potencial de equilibrio. Con base en estas observaciones y en las propiedades cinéticas reportadas de cada una de las dos poblaciones de canales de calcio, se puede sugerir, que las somatotropos de bovino, expresan canales de calcio LVA así como HVA en su membrana plasmática.

De manera complementaria, se empleó una estrategia electrofisiológica para registrar la corriente de canales de calcio HVA, y esto se realizó modificando el potencial de mantenimiento de  $-80$  a  $-40 \text{ mV}$  con la finalidad de inactivar los canales de calcio LVA

y registrar únicamente la corriente generada por canales de calcio HVA. La FIGURA 26 D muestra que la corriente de bario evocada por diferentes pulsos despolarizantes se inactiva muy lentamente a lo largo del pulso despolarizante. La dependencia al voltaje de estos canales se muestra en la curva I-V de la Figur 26 E.

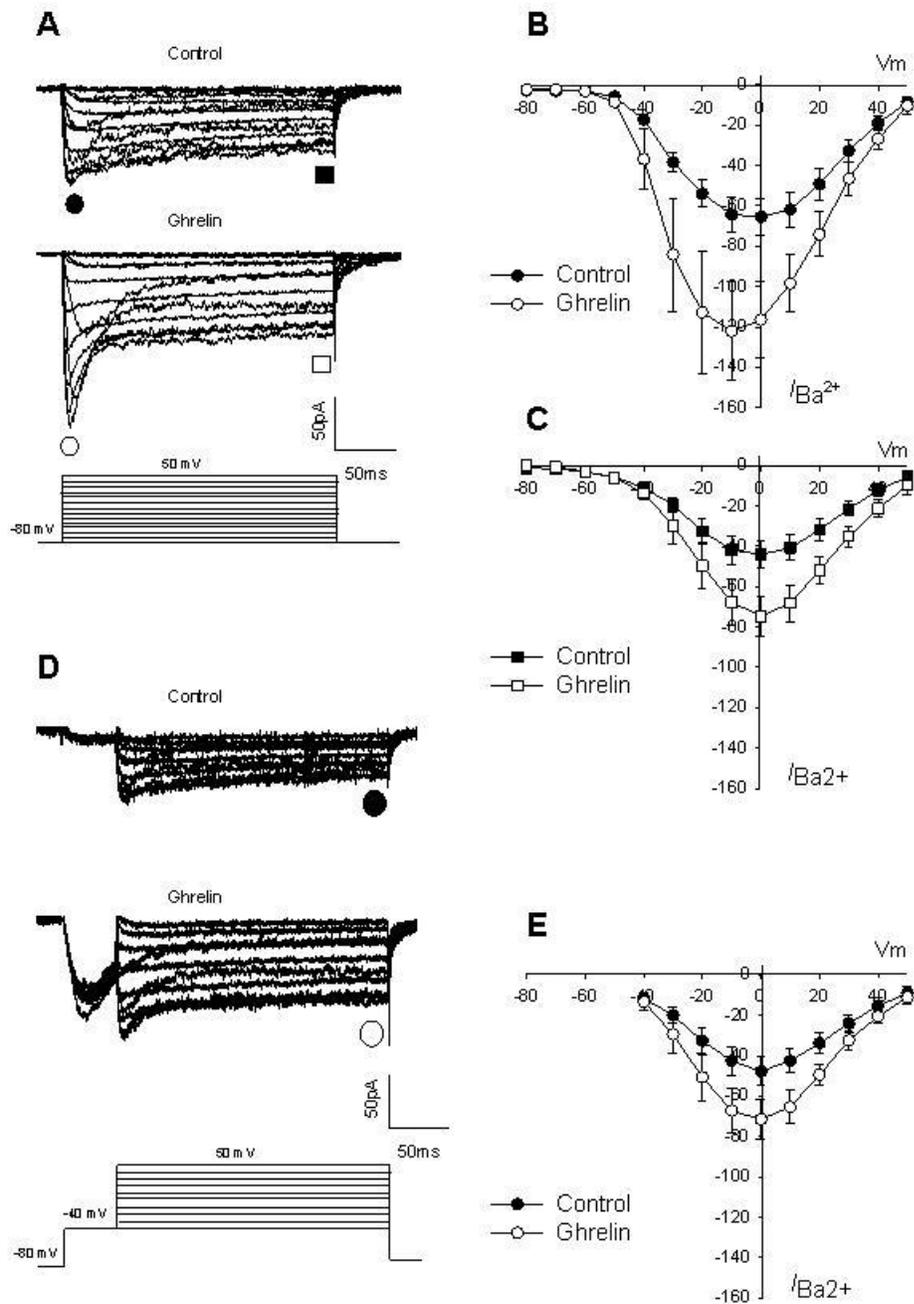


FIGURA 26. Actividad de canales de calcio en somatotropos de bovino. A. Familias de trazos de corriente de la corriente de bario en somatotropos de bovino evocadas por pulsos despolarizantes cada 10 mV a partir

de un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV con una duración de 250 ms bajo condiciones control y tratadas con Ghrelina 10 nM. B y C. Relación corriente-voltaje, se obtuvo el valor al pico que alcanza la corriente de bario en los primeros 20 ms (•, o) y al término del trazo (□, ■) (245ms) esta medición de la corriente corresponde a dos poblaciones de canales de calcio que se abren a diferentes potenciales de membrana (LVA [círculos]; bajo umbral de voltaje y HVA, alto umbral de voltaje [cuadrados]. D. Actividad de canales de calcio HVA en los somatotropos de bovino, familias de trazos de corriente de la corriente de bario evocadas por pulsos despolarizantes cada 10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV con una duración de 250 ms. E. Relación corriente-voltaje, se obtuvo el valor máximo (•, o) que alcanza la corriente de bario en los últimos 5 ms antes del término del trazo (245 ms) con el propósito de evitar alguna contaminación con la corriente LVA, esta medición corresponde a la actividad de canales de calcio de alto umbral de activación HVA.

Como se puede observar en los trazos de la FIGURA 26, la Ghrelina induce un aumento en la corriente de ambas poblaciones, tanto LVA como HVA.

La modificación de la amplitud de la corriente de Bario por Ghrelina es tiempo dependiente, tal y como se muestra en la FIGURA 27 A y B; el experimento consistió en analizar el curso temporal con el cual se establece el efecto estimulador de la Ghrelina sobre la densidad de corriente de Bario. Es necesario que transcurran por lo menos 48 horas de tratamiento para que se comience a observar un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la densidad de corriente de bario.

Como ocurre con la corriente de sodio, solo se ve incrementada la densidad de corriente de bario en las células tratadas con Ghrelina 10 nM FIGURA 27 C y D.

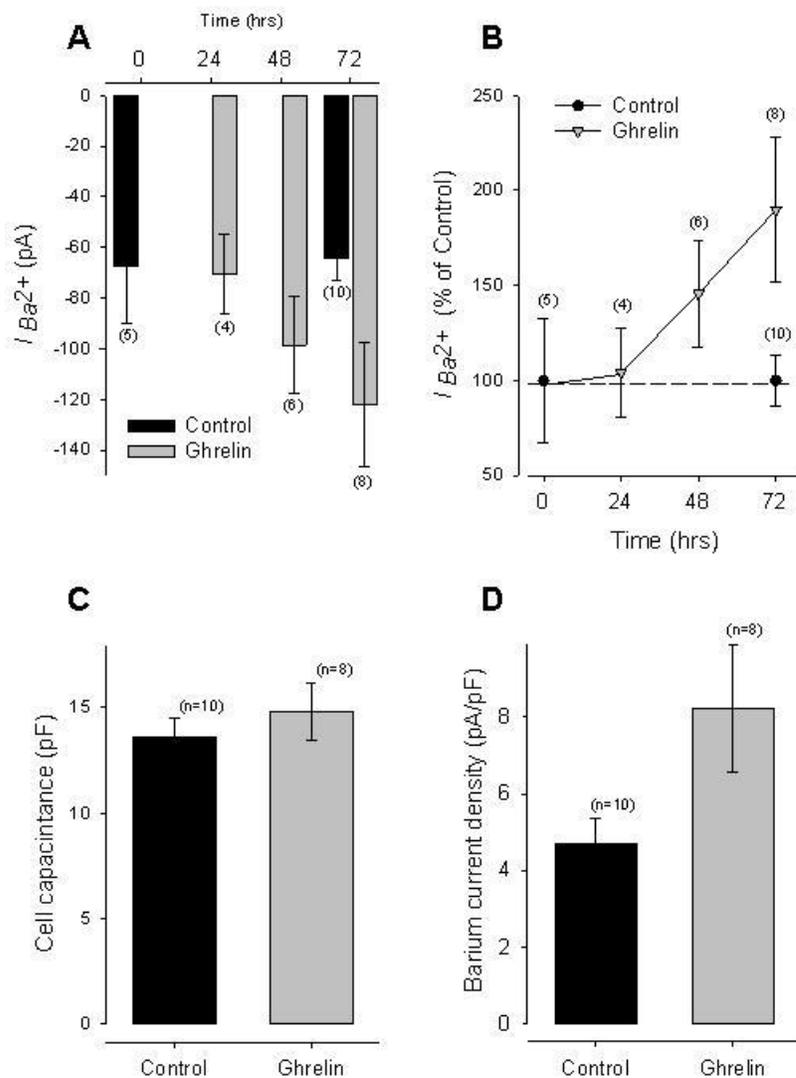


FIGURA 27. Curso temporal del efecto de la Ghrelina 10nM sobre la corriente (A) y el porcentaje (B) de incremento en la densidad de corriente de bario. Se graficó la densidad de corriente de bario evocada a -10 mV en función de la duración del tratamiento, siendo un valor de 100% en valor control, el potencial de mantenimiento fue fijado en -80 mV. Las cifras adjuntas a cada barra de error indican el número de células analizadas \*( $p < 0.05$ ). C. Capacitancia celular. D. Densidad de corriente de Bario.

La Ghrelina no altera las propiedades cinéticas de desactivación y activación de los canales de calcio LVA y HVA.

El aumento en la corriente de bario que muestran los somatotropos de bovino tratadas crónicamente con Ghrelina (10 nM) podría tener al menos dos explicaciones, la primera sería debido a un cambio en sus propiedades cinéticas macroscópicas, como su activación y desactivación, o la segunda explicación sería por un aumento en el número de canales de calcio HVA funcionales presentes en la membrana plasmática.

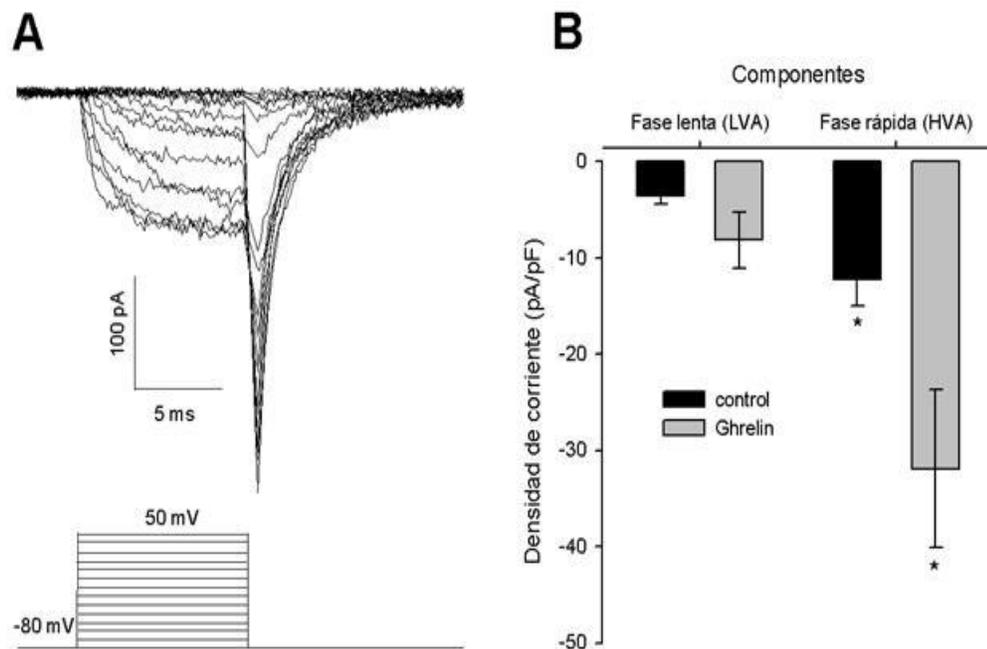


FIGURA 28. La Ghrelina Incrementa la densidad de corriente de cola de Bario. A. familia de trazos de corriente de Bario evocadas por pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de mantenimiento de -80mV, en pasoso de 10 mV, con una duración de 10 ms. B. Densidad de corriente de Bario, se han disecado los dos componentes el lento que representa a los canales de calcio LVA y el componente rápido que representa a los canales HVA.

### 3.7 La corriente de potasio

La corriente total de  $K^+$  dependiente de voltaje en somatotropos de bovino fue examinada por la aplicación de un protocolo de pulsos, iniciando con un prepulso (duración de 500ms), el cual fija el potencial de mantenimiento a -130mV; posterior a ello, una serie de pulsos de voltaje con una duración de 1.5 segundos iniciado de -

80mV a 60mV con incrementos de 10mV (FIGURA 29 A). En los somatotropos de bovino se observa que la corriente de potasio muestra dos componentes, un componente transitorio en los primeros 50ms y un componente sostenido que se mantiene en los 1.5 segundos que dura el pulso despolarizante; tanto el pico como la parte sostenida, fueron activadas en potenciales de membrana más despolarizantes que -30mV (FIGUR 29 B). Una vez activada, la corriente total de potasio dependiente de voltaje inactiva lentamente durante el paso despolarizante de voltaje de 1.5 segundos.

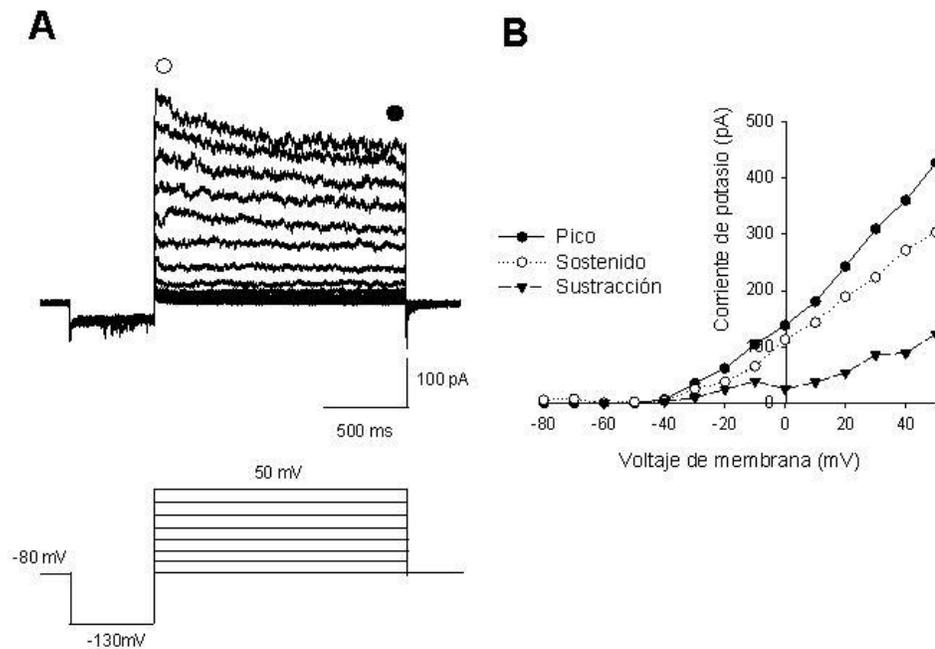


FIGURA 29. Corriente de potasio dependiente de voltaje en somatotropos de Bovino. A. Familia de trazos representativos de la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje en somatotropos de bovino, evocadas por pulsos despolarizantes de voltaje con incrementos de 10mV partiendo de un potencial de mantenimiento en el prepulso de -130mV con una duración de 500ms; posteriormente un pulso de voltaje con una duración de 1.5s; el potencial de mantenimiento inicial fue fijado en -80mV. En la parte inferior se muestra el protocolo de adquisición. B. Relación corriente voltaje del componente transitorio ( $\bullet$ ; los primeros 50ms), el componente sostenido (O; 1.455-1.50s) y la sustracción ( $\bullet$ -O= $\nabla$ ).

Para aislar la corriente de potasio de lenta inactivación ( $I_K$ ), la corriente de potasio transitoria ( $I_A$ ) fue eliminada mediante la maniobra de cambiar el potencial de mantenimiento de -130mV a -40mV por 500ms en el prepulso, antes de los pasos despolarizantes de 1.5 segundos de duración que van de -40 a 50mV (FIGURA 30), posterior a ello, se realizó la sustracción punto por punto en las dos familias de trazos

de corriente para cada potencial, obteniéndose la corriente de rápida activación y rápida inactivación conocida como  $I_A$ .

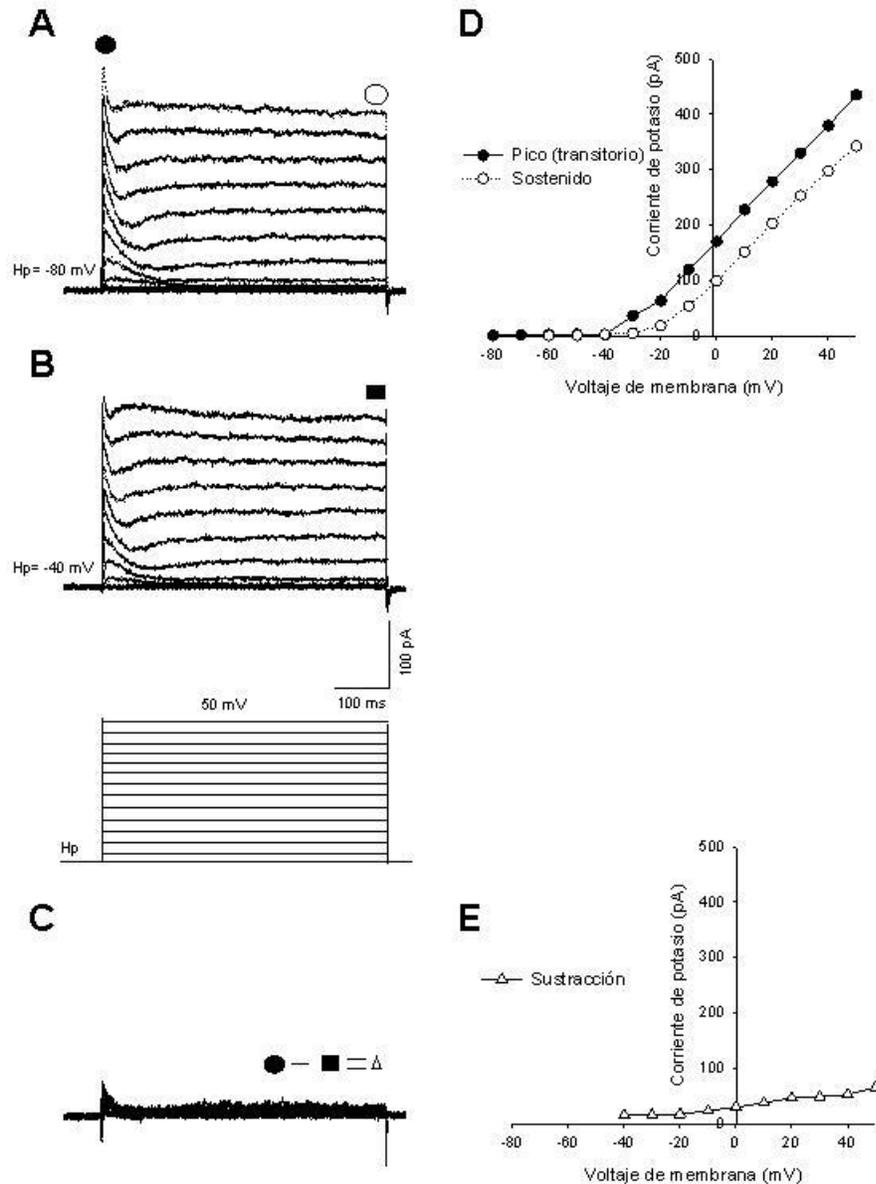


FIGURA 30. Componentes de la corriente de potasio dependiente de voltaje en los somatotropos de bovino. A. Familia de trazos representativos de la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje en las células somatotropas de bovino, evocadas por pulsos despolarizantes de voltaje de 1.5s de duración, con incrementos de 10mV que parten de un prepulso con una duración de 500ms y un potencial de mantenimiento de -130mV, el potencial de mantenimiento inicial fue fijado en -80mV. En la parte inferior se muestra el protocolo de adquisición. B. Trazos representativos de la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje evocados por pulsos despolarizantes de 1.5s de duración partiendo de un prepulso con una duración de 500ms y un potencial de mantenimiento de -40mV y posteriormente a 50mV con incrementos de 10mV, en la parte inferior se muestra el protocolo de pulsos. C. Corriente de  $K^+$  transitoria ( $I_A$ ) aislada al sustraer

punto por punto las corrientes de los trazos A y B (●-■=Δ) D. Relación corriente voltaje del pico de la corriente; componente transitoria (●; los primeros 50ms), componente sostenido (○; 1.455-1.5s) E. Relación corriente voltaje de la sustracción punto por punto entre A y B; la medición fue realizada en los primeros 50ms (●-■=Δ).

Para determinar la proporción de la corriente total de  $K^+$  en los somatotropos de bovino evocada en diferentes potenciales de membrana; las propiedades de inactivación en estado estacionario de la corriente de  $K^+$  fueron examinadas con el uso de un protocolo de doble pulsos. Este protocolo consistió en una serie de pulsos condicionantes de amplitud variada con una duración de 1.5 segundos que van desde -130 a 50mV en incrementos de 10mV; seguidos por un pulso condicionante a 50mV con una duración de 500ms (FIGURA 31 A).

Una simple relación Boltzmann no pudo ser ajustada a los datos ya que se indicaba la presencia de componentes de rápida y de lenta inactivación. Se normalizó la corriente al pico del pulso de prueba entre la corriente máxima ( $I/I_{Max}$ ) y se graficó en relación al voltaje del pulso condicionante para poder obtener los porcentajes de la participación de las corrientes  $I_A$  y  $I_K$  (FIGURA 31 B). Se puede observar que la participación de la corriente  $I_A$  es menor al 0.4 (40%).

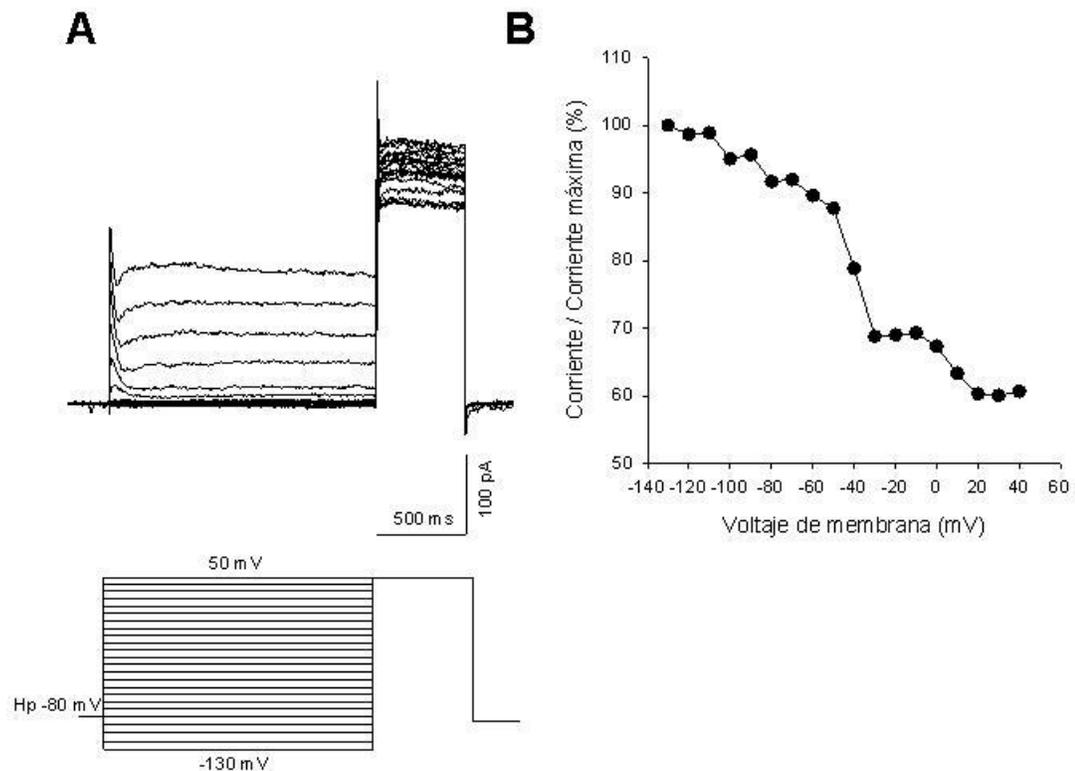


FIGURA 31. Inactivación en estado estacionario del total de la corriente  $I_k$  en los somatotropos de bovino. A. Familia de trazos representativos de la curva de inactivación en estado estacionario para los picos de la corriente  $I_k$  dependiente de voltaje generados por un protocolo de doble pulso de  $-130\text{mV}$  a  $+50\text{mV}$  con una duración de 1.5 segundos e incrementos de  $10\text{mV}$  antes de pasar a un pulso de prueba a  $50\text{mV}$  con una duración de  $500\text{ms}$ ; el potencial de mantenimiento inicial fue de  $-80\text{mV}$ . B. El pico de la  $I_k$  evocada durante el pulso de prueba a  $+50\text{mV}$  fue normalizada a por ciento con respecto al máximo ( $I/I_{Max}$ ) y graficada en relación al voltaje del pulso condicionante.

### 3.8 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio dependiente de voltaje.

El efecto crónico que ejerce la Ghrelina sobre la corriente de potasio dependiente de voltaje fue evaluado en los somatotropos de bovino, las células fueron tratadas por 96hrs con Ghrelina  $10\text{nM}$  y no se encontraron cambios en el tamaño de la célula, medido a través de la capacitancia celular (FIGURA 32 A). La FIGURA 32 B, muestra que el tratamiento crónico con Ghrelina no tiene efecto sobre la corriente de potasio dependiente de voltaje, las mediciones realizadas en la corriente fueron al pico (los

primero 50ms), el componente sostenido (los últimos 5ms; 1.455-1.5s) y la sustracción de ambas mediciones (FIGURA 32 C); la densidad de la corriente no se ve afectada.

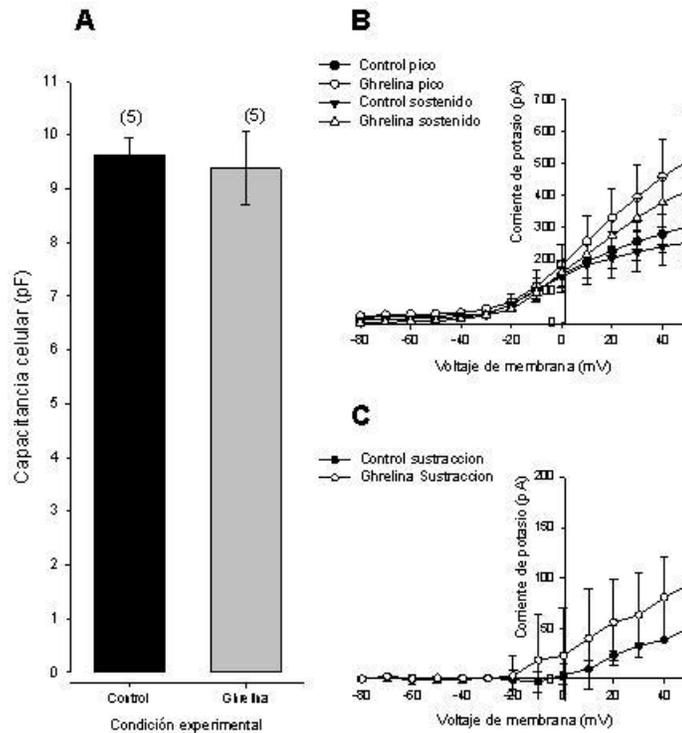


FIGURA 32. Capacitancia y Corriente de  $K^+$  en somatotropos de bovino bajo condiciones control y tratadas crónicamente con Ghrelina. A. Capacitancia celular en cada una de las condiciones experimentales. Los numero a un lado de la barra de error, representan el número de células analizadas. B. Relación de corriente-voltaje en los somatotropos de bovino en las condiciones control y tratadas crónicamente (72 horas) con Ghrelina 10nM. C. relación corriente voltaje de la sustracción punto por punto de los componentes de la corriente de potasio.

### 3.9 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio

Se evaluó el efecto que ejercía la Ghrelina (10nM) de manera crónica sobre el componente transitorio (pico de la corriente los primeros 50ms) y del componente sostenido (los últimos 50 ms) de la corriente de potasio dependiente de voltaje. Los valores obtenidos de las curvas corriente-voltaje fueron usados para calcular la curva de activación. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al valor de conductancia máxima y posteriormente ajustado a una función tipo Boltzmann, los resultados de dicho ajuste se muestran en la FIGURA 33.

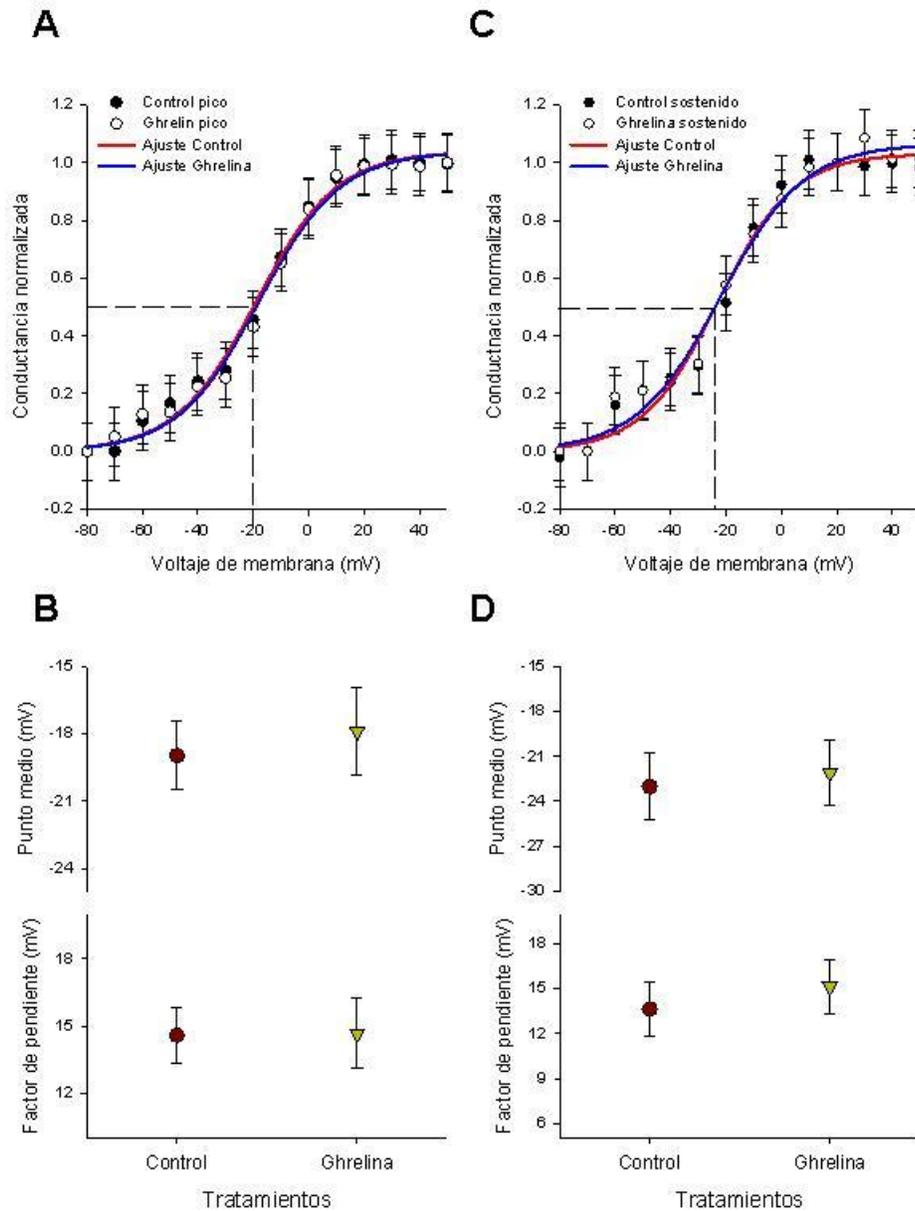


FIGURA 33. Curva de activación de los componentes transitorio (pico) y sostenido de la corriente de  $K^+$  activada por voltaje en los somatotropos de bovino. A y C. Ajustes de la conductancia normalizada en las células somatotropas de bovino bajo condiciones control, tratadas con Ghrelin 10nM por 72hrs, transitorio (pico de la corriente) y sostenido (parte final de la corriente) Los datos fueron obtenidos a partir de las curvas corriente voltaje de la Figura 7, las líneas continuas representan el ajuste de los datos con una función tipo Boltzmann. B y D. Valores de los parámetros del ajuste tipo Boltzmann para cada una de las condiciones experimentales, punto medio ( $V_{1/2}$ ) y factor de pendiente ( $k$ ), para cada componente de la corriente de potasio respectivamente.

Se muestran los resultados de las curvas de activación de la corriente  $I_K$ , el tratamiento crónico con Ghrelin no modifica las propiedades cinéticas de la corriente de potasio ya que el valor de voltaje al cual están activados el 50% de los canales no

es diferente significativamente ( $p > 0.05$ ), al igual que el valor de  $k$ , que determina la forma de la curva de activación.

Por otra parte, se determinó evaluar la cinética de inactivación en estado estacionario de la corriente total de potasio bajo las condiciones control y tratadas con Ghrelina; se utilizó un protocolo de doble pulso para tal fin (FIGURA 31). Se graficó la corriente al pico del pulso de prueba en función del voltaje del pulso condicionante normalizando esta con respecto a la corriente máxima.

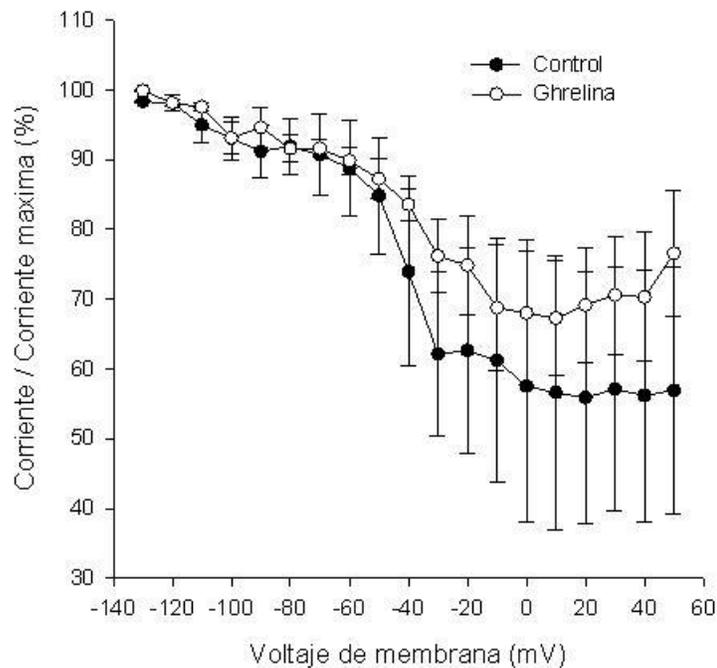


FIGURA 34. Inactivación en estado estacionario del total de la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje en somatotropos de bovino. La corriente fue evocada por un protocolo de doble pulso, el primero de ellos denominado condicionante, que inicia a partir de un potencial de membrana de  $-130\text{mV}$  con una duración de 1.5 segundos y de amplitud variada ( $10\text{mV}$ ) y el segundo pulso denominado de prueba que lleva el potencial de membrana a  $70\text{mV}$  con una duración de  $500\text{ms}$ ; se graficó la corriente al pico del pulso de prueba en función del voltaje del pulso condicionante normalizando esta con respecto a la corriente máxima, ( $n = 5$ , en cada condición)

Como puede apreciarse en la FIGURA 34, el tratamiento crónico con Ghrelina no modifica la cinética de inactivación del total de la corriente de  $K^+$ , concluyendo que la Ghrelina no modifica la corriente de potasio.

### **3.10 Efecto de la Ghrelina sobre la corriente de potasio rectificadora entrante ( $K_{IR}$ ).**

Dado el papel crucial de los canales  $K_{IR}$  en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo cercano al equilibrio del  $K^+$  e induciendo una entrada de potasio durante la hiperpolarización, se probó si el tratamiento crónico (72 hrs) con Ghrelina (10nM) inducía algún cambio en la corriente de  $K^+$   $K_{IR}$ .

En la FIGURA 35 A, se muestra el protocolo de registro para evocar la corriente rectificadora entrante en los somatotropos de bovino; El protocolo consiste de pulsos hiperpolarizantes de -160 a -40 que parten de un potencial de mantenimiento de -50mV y una duración de 250ms, en pasos de 10mV, con el uso de la misma solución de registro para la corriente de  $K^+$  ( $I_K$ ). En el apartado B, se muestra una familia de corrientes la cual muestra dos componentes de la corriente  $K_{IR}$ , un componente inicial (transitorio), de rápida activación e inactivación en los primero 2-3ms, seguido por un componente (sostenido) de lenta activación que permanece los 250ms que dura el pulso. El componente transitorio, fue medido 1ms posterior al término del componente capacitivo con el fin de evitar contaminación con dicho componente (círculos vacíos y llenos); el componente capacitivo tuvo una duración ~0.3ms; el componente sostenido fue medido 5ms antes del término del trazo de corriente (245-250ms) (cuadrados vacíos y llenos). El tratamiento crónico con Ghrelina al parecer incrementa de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la corriente de potasio  $K_{IR}$  en sus dos componentes, transitorio y sostenido (FIGURA 35 B) sin embargo son pocos los experimentos, y se necesitan hacer más para afirmar dicha aseveración.

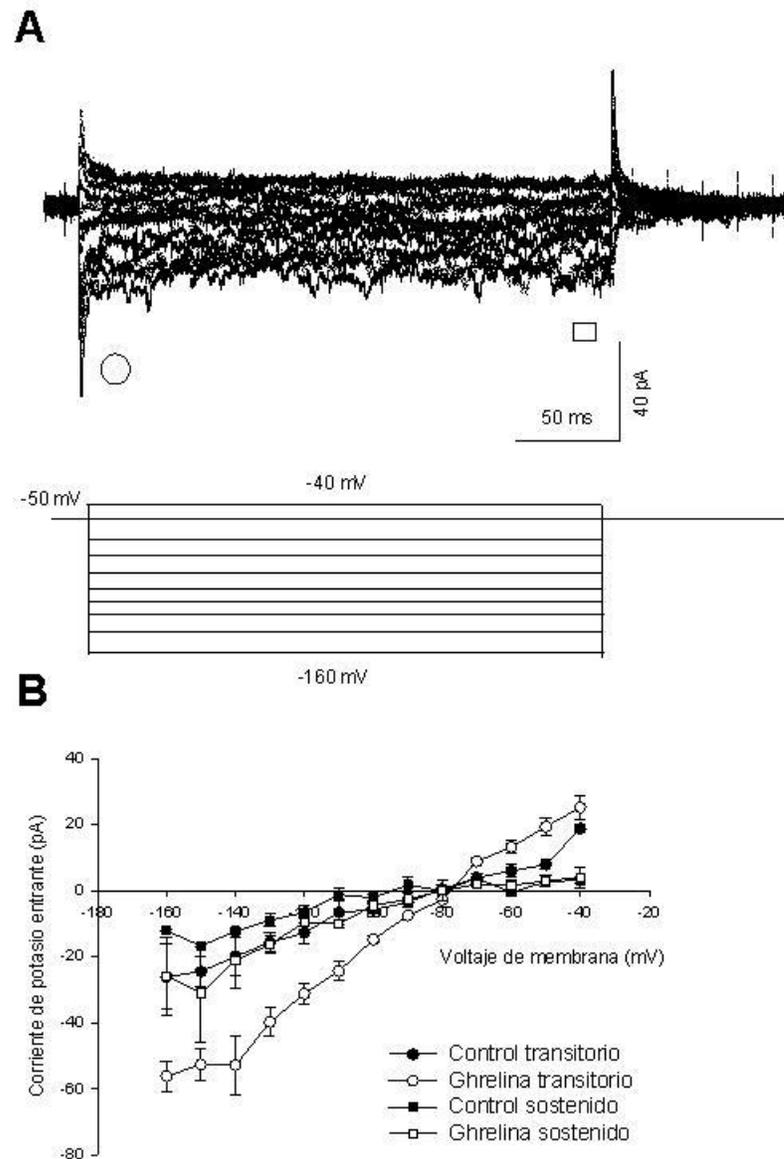


FIGURA 35. Efecto de la Ghrelin sobre la corriente rectificadora entrante de  $K^+$  ( $K_{IR}$ ) en somatotropos de bovino. A. Protocolo de registro para evocar la corriente rectificadora entrante en los somatotropos de bovino; el protocolo consiste de pulsos hiperolarizantes de -160 a -40 que parten de un potencial de mantenimiento de -50mV y una duración de 250ms en pasos de 10mV, con la misma solución de registro para la corriente de  $K^+$   $I_K$ . B. Familia de trazos de corriente  $K_{IR}$  la cual muestra dos componentes, un componente inicial (transitorio), de rápida activación e inactivación en los primeros 2-3ms, seguido por un componente (sostenido) de lenta activación que permanece los 250ms que dura el pulso. El componente transitorio, fue medido 1ms posterior al término del componente capacitivo con el fin de evitar contaminación con dicho componente; el componente capacitivo tuvo una duración  $\sim 0.3$ ms; el componente sostenido fue medido 5ms antes del término del trazo de corriente (245-250ms). B. Curvas corriente-voltaje, de los dos componentes de  $K_{IR}$ .

## DISCUSIÓN

De acuerdo con Zhang (1999), y Melmed (2011), se confirma que el tejido extraído corresponde al hipofisario, debido a que muestra similitud en la morfología y tinción reportada por estos autores. Las glándulas se encontraron viables y sin cambios patológicos aparentes reportando únicamente en ellas diferencias en el tamaño de cada glándula, probablemente ligado con la edad y la talla de los animales (Sisson y Grossman 2005; Melmed 2011). De acuerdo a Freshney (2005), la cuantificación mínima requerida para una placa de cultivo debe de ser de  $1.2 \times 10^6$  células, es decir  $2 \times 10^5$  células por pozo; para este trabajo se sembraron una mayor cantidad de células por pozo y suficientes para realizar los experimentos.

Los experimentos de inmunocitoquímica demuestran que los somatotropos presentan inmunoreactividad al anticuerpo dirigido contra la GH, y cuya intensidad se ve incrementada cuando las células son mantenidas crónicamente en presencia de 10nM de ghrelina. Trabajos previos (Domínguez et. al., 2008; Castañeda, 2011) han mostrado que el incremento en la intensidad de la inmunoreactividad muestra indirectamente un aumento en la producción de GH por efecto de la ghrelina o GHRP-6, esto se comprueba al medir los niveles de GH en el medio de cultivo por ELISA. El tratamiento con ghrelina o GHRP-6 inducen un aumento  $\sim 40\%$  en la secreción de GH con respecto a la condición control.

Los primeros trabajos sobre actividad eléctrica reportados en células somatotropas de origen bovino fueron en el año de 1987 por Matson y Rawlings, desde entonces era sabido que las células endocrinas como las adenohipofisarias eran eléctricamente excitables, y se iniciaron más trabajos encaminados a descubrir la relación de su actividad eléctrica con su actividad secretora. El estudio de la fisiología celular en somatotropos adquiere importancia en la medicina humana como en la medicina veterinaria debido a que su principal hormona de secreción es la GH y ésta cumple diversas funciones de gran importancia fisiológica y metabólica en el organismo (Kerry *et al.*, 2000).

La regulación de la secreción de la GH fue descrita hace más de 2 décadas (Anderson *et al.*, 2004; Ayuk y Sheppard, 2006) y se conocía que su producción es regulada por el cerebro, específicamente por el hipotálamo, que libera un factor que la estimula, el GHRH, y un factor que la inhibe, la SST (Anderson *et al.*, 2004), sin embargo en el año de 1977 Bowers y colaboradores descubrieron una serie de

péptidos sintéticos liberadores de GH a los que denominaron secretagogos de GH (GHS) y observaron que ejercían su efecto a través de un receptor diferente al receptor a GHRH; estudios posteriores demostraron la existencia de la Ghrelina como ligando endógeno de éste receptor (Kojima *et al.*, 1999). A partir del año 2000 se iniciaron trabajos para conocer las funciones e importancia de dicha hormona (Baudet y Harvey, 2003, Broglio *et al.*, 2001) y ahora se sabe que diversos órganos y tejidos presentan el receptor a Ghrelina y que cumple con funciones como: control de la ingesta y peso corporal, metabolismo energético, proteico y regulación de la GH, entre otras (Pierno *et al.*, 2003; Chuang *et al.*, 2011).

La liberación de GH inducida por la Ghrelina en los somatotropos depende de un aumento significativo en los niveles de calcio libre citosólico debido a un incremento en la entrada de iones calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Malagon *et al.*, 2003, Grey y Chang, 2009). Los somatotropos normales son eléctricamente excitables y generan potenciales de acción de manera espontánea e inducida (Chen *et al.*, 1994; Kwiecien, 1998; Stojilkovic 2010), su actividad secretora está acoplada positivamente a su actividad eléctrica, es decir, modificaciones en la frecuencia de disparo, morfología del potencial de acción, aumento en las corrientes totales, aumento en la conductancia y densidad de corriente indican una mayor actividad secretora de dicha célula (Zorec 1996, Yang *et al.*, 2012, Stojilkovic 2010). Los patrones de disparo observados en estas células somatotropas de bovino fueron en espiga, meseta y células silentes, lo que corresponde a patrones observados anteriormente (Van Goor *et al.*, 2001a, 2001b). Un estudio realizado por Domínguez y colaboradores en 2007 en la línea tumoral GC que corresponde a somatotropos tumorales de rata, reporta de igual forma estos patrones de disparo, un aumento en la frecuencia de los mismos y un aumento en la secreción de GH al ser tratados con Ghrelina. Estudios recientes realizados en somatotropos de carpa dorada (Yu *et al.*, 2010) comprueban la presencia de propiedades electrofisiológicas con características similares. Lo reportado en este trabajo presenta resultados de actividad espontánea en condiciones control, sin embargo se infiere que las células que muestran potenciales de acción en meseta tienen mayor actividad secretora, sintetizando y liberando más GH, pues en células GH3 mediante el registro simultáneo de la actividad eléctrica y la concentración de calcio libre intracelular se ha observado que en las células donde el potencial de acción es de mayor duración o la membrana permanece despolarizada por más

tiempo, hay una mayor entrada de calcio y de esta manera una mayor concentración intracelular de calcio, así como la síntesis y secreción de hormona (Charles *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1990c; Coorrette *et al.*, 1995).

Es sabido que la actividad eléctrica de las células excitables está dada por las diferentes poblaciones de canales iónicos presentes en su membrana, y si una célula presenta un cambio significativo en alguna característica de su actividad eléctrica, de igual forma presenta un cambio en la expresión funcional de dichos canales, ya sea por el aumento o disminución de los mismos (Hille, 2001; Yu *et al.*, 2010). Con base en ello, se evaluaron las corrientes iónicas totales en las células somatotropas de bovino tratadas con Ghrelina y GHRP-6, en las cuales se observó un aumento significativo en la amplitud de corriente entrante, sin modificación en la corriente saliente, resultado que concuerda con lo reportado por Domínguez y colaboradores en 2007. La corriente entrante está dada por la participación de canales de sodio y calcio (Chen *et al.*, 1990). Recientemente se confirma la participación de dichos canales en somatotropos de carpa dorada en los cuales se reporta la presencia de canales de sodio, calcio y potasio con características similares (Yu *et al.*, 2010). La amplitud de la corriente entrante registrada, puede deberse a un aumento en la actividad de los canales de sodio y de canales de calcio de alto y bajo umbral.

El estudio y análisis detallado de las propiedades cinéticas macroscópicas de estas dos corrientes, permitió establecer que la Ghrelina y el GHRP-6 estimulan tanto la expresión funcional de los canales de sodio como de los canales de calcio, pues muestran un aumento en la densidad de corriente entrante y en la conductancia, sin modificación de la capacitancia celular; estos resultados coinciden con lo reportado por Domínguez y colaboradores en 2007, donde aunado a estos experimentos ellos bloquearon poblaciones de canales de sodio sensibles a TTX y canales de calcio sensibles a nifendipina para inhibir la actividad de los mismos, y reportan una reducción en la secreción de GH, debido al efecto antagonista de estos bloqueadores, pues sin la participación de estos canales las células son incapaces de estimular su secreción. Resultados similares reportan Grey y Chang, 2009 en somatotropos de carpa dorada; ellos reportan que la entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio tipo L es una señal necesaria para que los factores intracelulares dirijan la liberación de GH por estimulación de la Ghrelina. De manera similar se ha reportado que el bloqueo de estos canales reduce la secreción de GH y PRL en la línea celular

GH3 (Enyeart *et al.*, 1985; 1987; 1990). Díaz y colaboradores en 2010 reportan que la Ghrelina inhibe la proliferación y el incremento en la expresión de canales de calcio tipo T en células PC-3 (células de carcinoma de próstata humano) considerando a la Ghrelina como un factor apoptótico para promover la regulación de la expresión de canales tipo T.

Recientes estudios sobre nanobiología realizados por Anderson y Scanes en 2012 argumentan que la secreción de GH estimulada por la Ghrelina es a través de una mayor movilización y fusión de vesículas secretoras de GH en la membrana plasmática del somatotropo sin modificación del tamaño celular, resultado que coincide con lo reportado en el presente trabajo donde no se observa modificación de la capacitancia celular. El efecto temporal de la Ghrelina y el GHRP-6 sobre el cambio en la expresión funcional de los canales establece la participación de un mecanismo genómico, que puede ser a nivel transcripcional como traduccional. El uso de actinomicina D y cicloheximida ha mostrado que el efecto estimulador de ghrelina y GHRP-6 sobre la expresión funcional de canales de sodio y canales de calcio tipo L son dependientes tanto de la síntesis de ARNm como de proteínas (Domínguez *et al.*, 2007).

Los resultados indican que las corrientes de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $I_A$ ,  $I_K$  y  $K_{IR}$ ) no sufren cambios significativos en las amplitudes de la corriente así como en las propiedades cinéticas de activación ni en su inactivación con el tratamiento con los secretagogos, en reportes previos (Chen, 2002) se ha mostrado que la corriente de  $K^+$  se incrementa con tratamientos a largo plazo (48hrs) con GHRP-2 a través de un incremento en la síntesis de proteína para el canal de  $K^+$  en somatotropos de ovino. La corriente de  $K^+$  que fluye a través de la membrana plasmática es responsable del potencial de membrana en reposo, aunque otros iones como el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  pueden estar involucrados (Simasko, 1994). Basados en las propiedades en diferencias de tiempo, dependencia al voltaje y sensibilidad farmacológica, varios tipos de corrientes de  $K^+$  han sido identificadas en los somatotropos (Van Goor *et al.*, 2001), dichas corrientes, incluyen a los rectificadores entrantes ( $K_{IR}$ ), corriente transitoria ( $I_A$ ), la corriente rectificadora tardía ( $I_K$ ) (en algunos casos denominada como  $I_{RD}$ ), y corrientes de  $K^+$  activadas por  $[Ca^{2+}]_i$  (Stojilkovic *et al.*, 2010). Ambas corrientes, la  $I_A$  y la  $I_K$  se encuentran involucradas en la actividad eléctrica de los somatotropos (Van Goor *et al.*, 2001, Stojilkovic *et al.*, 2010); la  $I_A$  es parcialmente responsable de

mantener el potencial de membrana en reposo y participa en el proceso de repolarización del potencial de acción (Chen et al., 1994; Van Goor et al., 2001, Stojilkovic et al., 2010); el papel de la corriente  $I_K$  ha sido examinada en varios tipos celulares, en células GH<sub>3</sub>, la inhibición de este canal por TEA se ha visto que incrementa la duración del potencial de acción (Sankaranarayanan & Simasko, 1998) así como la amplitud de los transitorios espontáneos de  $[Ca^{2+}]_i$  (Charles et al., 1999), en lactotropos de rata el TEA no modifica el patrón de disparo (Sankaranarayanan & Simasko, 1998).

La somatostatina incrementa ambas, la  $I_K$  y la  $K_{IR}$  en somatotropos de rata, ovino y humano (Sims et al., 1991; Chen et al., 1990; Takano et al., 1997; Chen et al., 1998); por otro lado, la GHRH reduce la corriente de  $K^+$  en células de adenoma humano así como en células GH4C1 (Xu et al., 1999; Xu et al., 2000); el análogo sintético de la Ghrelina, el GHRP-6 disminuye la corriente transitoria y la rectificadora tardía en somatotropos de rata (McGurk et al., 1993); Sin embargo, se ha reportado el incremento en la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje (ambas la  $I_K$  y la  $I_A$ ) a través de un incremento en la síntesis de proteína que codifica para el canal de  $K^+$  promovida por el GHRP-2 (Chen et al., 2002) otro GHS. Hasta el momento, pocos reportes existen sobre el efecto de la Ghrelina o secretagogos de GH sobre la expresión funcional de canales iónicos y las vías que pueden ser ocupadas (Chen et al., 2002; Domínguez et al., 2008, 2009; Peng et al., 2012). Se ha reportado que la Ghrelina inhibe al canal de  $K^+$  rectificador entrante acoplado a proteína G en neuronas del núcleo tuberomamilar ( $K_{IR3}$ ) (Bajic et al., 2004).

En el presente trabajo, se demuestra que la Ghrelina no afecta las corrientes de  $K^+$  ( $I_K$  e  $I_A$ ) en una exposición a largo plazo (72hrs); en trabajos realizados en células GH<sub>3</sub>, la Ghrelina de manera aguda (en el baño) reduce la corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje, (Han et al., 2005); este efecto de la Ghrelina es a través de la activación del receptor a GHS (Korbonits et al., 2001). En cultivos primarios de células de la pituitaria y en células GH<sub>3</sub> ha sido mostrado que la inhibición de las  $K_{IR}$  pueden generar una mayor tasa de disparo de potenciales de acción y subsiguiente un aumento en la secreción de la hormona prolactina y de la GH (Bauer et al., 1994). En resumen, el tratamiento crónico con Ghrelina no modifica la expresión funcional de los canales de  $K^+$  que subyacen las corrientes  $I_K$ ,  $I_A$  e  $K_{IR}$  en los somatotropos de bovino.

Se necesitan más experimentos para asegurar si aumenta la expresión de la subunidad principal del canal de sodio (subunidad  $\alpha$ ), de alguna subunidad accesoria o auxiliar ( $\beta$ ), o alguna otra proteína que ayude a la incorporación del canal de sodio a la membrana plasmática o que facilite el cambio de un canal silente a uno activo. Estudios posteriores de RT-PCR permitirán detectar cambios en los niveles del ARNm que codifique para las diferentes subunidades del canal iónico, como lo reportado por Domínguez y colaboradores (2008) para canales de calcio, donde identificaron en células GC la expresión de los canales Cav 1.2 y 1.3, mismos que a su vez se reportan en la literatura como los únicos, hasta ahora encontrados en células endocrinas; y con respecto a los canales de sodio, Catteral *et al.* (2005a), indican que, de los canales de sodio dependientes de voltaje y sensibles a Tetrodotoxina, solo el Nav 1.7 se expresa en células neuroendócrinas. Vega y colaboradores (2003), identificaron en células GH3 (células tumorales de somatotropos de rata) la presencia de las subunidades principales que integran los Nav 1.1, 1.2, 1.3 y 1.6 además de las subunidades auxiliares 1 y 3. Hasta antes de esclarecer esto, es un hecho que el tratamiento con estos péptidos (Ghrelin o GHRP-6) aumenta la expresión funcional de los canales de sodio y calcio.

## CONCLUSIONES

1.- Los somatotropos bovinos presentan actividad eléctrica espontánea, ya sea en condiciones fisiológicas normales o tratadas con Ghrelina.

2.- Los somatotropos muestran corrientes salientes correspondientes a los canales de potasio. Así mismo presentan corrientes entrantes pertenecientes a la actividad de los canales de sodio y calcio.

3.- Los somatotropos muestran una diferencia significativa en las corrientes de los canales de sodio y calcio después del tratamiento crónico con Ghrelina (10 nM); no así para la corriente de potasio la cual no sufre cambios significativos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Akman MS, Girard M, O'Brien LF, Ho AK, and Chik CL. 1993. Mechanisms of action of a second generation growth hormone-releasing peptide (Ala-His-D-beta Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*. 132: 1286 - 1291.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002 *Molecular Biology of THE CELL*. Fourth Edition. Garland Sciences. Taylor & Francis Group.

Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG, Stromer MH, Lee J, Jeftinija K, Glavaski-Jokosimovic A. 2005. Physiology of ghrelin and related peptides. *Domestic Animal Endocrinology*, 29:111-144.

Armstrong CM and Matteson DR. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*.; 227(4682): 65-7.

Arvat E, Di Vito L, Broglio F. 2000 Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 23:493-495.

Arvat E, Maccario M, Di Vito L. 2001 Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1169-1174

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M 2001. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:2 337-45

Bancroft FC. 1973. Measurement of growth hormone synthesis by rat pituitary cells in culture *Endocrinology*.; 92: 1014 - 1021.

Baumann G, Amburn K, Shaw MA. 1988. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology*. 122:976-84.

Baumann G, Stolar MW, and Buchanan TA 1986. The metabolic clearance, distribution, and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms. *Endocrinology*. 119: 1497- 1501.

Baumann G. 1991. Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev*;12:429-449.

Baumann G. 1999. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res*. 51:2-6.

Bell GI and Reisine T 1993 Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci*, Jan; 16(1): 34-8.

Biales B, Dichter MA and Tischler A. 1977. Sodium and calcium action potential in pituitary cells. *Nature*. 267(5607): 172-4.

Bowers CY. 1993. GH releasing peptides-structure and kinetics. *J Pediatr Endocrinol*, 6(1): 21-31.

Bresson-Bepoldin L and Dufy-Barbe L. 1994. GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell Calcium*. 15(3): 247-58.

Chen C., Wu D., Clarke IJ. 1996 Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J. Endocrinol*. 148: 381-6.

Chen C., Zhang J., Vincent J. D., and Israel J. M. 1990b Somatostatin increases voltage-dependent potassium currents in rat somatotrophs *Am J Physiol Cell Physiol*. 259: 854 - 861.

Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto A, Jr, and Smith RG. 1991. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH<sub>2</sub>-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology*. 129: 3337.

DeNoto F.M., Moore D.D., and Goodman H.M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing *Nucleic Acids Res.* 9: 3719 - 3730.

Dubinsky JM and Oxford GS. 1984. Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells *J. Gen. Physiol.* 83: 309.

Epelbaum J, Enjalbert A, Krantic S, Musset F, Bertrand P, Rasolonjanahary R, Shu C, and Kordon C. 1987. Somatostatin receptors on pituitary somatotrophs, thyrotrophs, and lactotrophs: pharmacological evidence for loose coupling to adenylate cyclase *Endocrinology*. 121: 2177.

Feighner SD., Andrew D. Howard, Kristine Prendergast, Oksana C. Palyha, Donna L. Hreniuk, Ravi Nargund, Dennis Underwood, James R. Tata, Dennis C. Dean, Carina P. Tan, Karen Kulju McKee, John W. Woods, Arthur Patchett A., Roy G. Smith, and Lex H. T. Van der Ploeg 1998. Structural Requirements for the Activation of the Human Growth Hormone Secretagogue Receptor by Peptide and Nonpeptide Secretagogues *Mol. Endocrinol.*, Jan; 12: 137 - 145.

Fomina AF and Levitan ES. 1995. Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs *J. Neurosci.* 15: 4982 - 4991.

García A, Alvarez CV., Smith RG., and Diéguez C. 2001 Regulation of *PIT-1* Expression By Ghrelin and GHRP-6 Through the GH Secretagogue Receptor *Mol. Endocrinol.*, Sep; 15: 1484 - 1495.

Gomora JC, Avila G, and Cota G. 1996. Ca<sup>2+</sup> current expression in pituitary melanotrophs of neonatal rats and its regulation by D2 dopamine receptors *J. Physiol.*, 492: 763 - 773.

Guillaume V, Magnan E, Cataldi M, Dutour A, Sauze N, Renard M, Razafindraibe H, Conte-Devolx B, Deghenghi R, and Lenaerts V. 1994 Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep *Endocrinology*. 135: 1073 - 1076.

Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, and Nakao K. 2001. A Low Dose of Ghrelin Stimulates Growth Hormone (GH) Release Synergistically with GHReleasing Hormone in Humans *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4552.

Hendricks CM, Eastman RC, Takeda S, Asakawa K, and Gorden P 1985. Plasma clearance of intravenously administered pituitary human growth hormone: gel filtration studies of heterogeneous components *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 864 - 867.

Herrington J. and Lingle C. J. 1992. Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated  $Ca^{2+}$  current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 68: 213 - 232.

Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Memabranes*. Third Edition. Sinauer, Suderland, MA.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF 1997. A receptor in pituitary and hoptalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273: 974-977

Kagotani Y, Sakata I, Yamazaki M, Nakamura K, Hayashi Y, Kangawa K 2001 Localization of ghrelin-immunopositive cells in the rat hypothalamus and intestinal tract. *Proceedings of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO, 2001, p. 337*

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. 2000. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141:4797-4800

Kato M. and Suzuki M. 1989. Effect of Li<sup>+</sup> substitution for extracellular Na<sup>+</sup> on GRF-induced GH secretion from rat pituitary cells *Am J Physiol Cell Physiol.* 256: 712.

Kidokoro Y. 1975. Spontaneous calcium action potentials in a clonal pituitary cell line and their relationship to prolactin secretion. *Nature.* 258(5537): 741-2.

Kojima M. and Kangawa K. 2005. Ghrelin: Structure and Function *Physiol Rev,* 85: 495 - 522.

Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. 2001. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14:101-104.

Kwiecien R, Robert C, Cannon R, Vignes S, Arnoux A, Kordon C, and Hammond C. 1998. Endogenous pacemaker activity of rat tumour somatotrophs *J. Physiol;* 508: 883 - 905.

Lei T., Buchfelder M., Fahlbusch R. and Adams E.F. 1995. Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells. *J Mol Endocrinol.* 14(1): 135-8.

Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ, and Wood WI. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature.* 330: 537-543.

Lewis DL, Goodman MB, St. John PA, and Barker JL 1988 Calcium currents and fura-2 signals in fluorescence-activated cell sorted lactotrophs and somatotrophs of rat anterior pituitary *Endocrinology,* Jul; 123: 611 - 621.

Lussier BT, French MB, Moore BC, and Kraicer J. 1991a. Free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca<sup>2+</sup> influx raises [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> *Endocrinology.* 128: 570.

Maheshwari H, Sharma L, Baumann G. 1996. Decline of plasma growth hormone binding protein in old age. *J Clin Endocrinol Metab ;*81:995-997.

Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, García- Marty A and Neher E. 1985. Thigh-seal whole-cell recording. In: Single channel recording. B. Sakaman and E. Neher, editors. Plenum Press, New York, NY, pp. 31-52

Mason WT and Rawlings SR 1988. Whole-cell recordings of ionic currents in bovine somatotrophs and their involvement in growth hormone secretion J. Physiol 405: 577 - 593.

Matteson DR and Armstrong CM. 1984. Na and Ca channels in a transformed line of anterior pituitary cells J. Gen. Physiol. 83: 371.

Momany F.A., Bowers C.Y., Reynolds G.A., Chang D., Hong A. and Newlander K. 1981. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro Endocrinology. 108: 31 - 39. Monjaraz E., Navarrete A., López-Santiago L. F., Vega A. V., Arias-Montaña J.

A., and Cota G. 2000. L-type calcium channel activity regulates sodium channel levels in rat pituitary GH3 cells J. Physiol., 523: 45 - 55.

Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, and Kangawa K 2001. Elevated Circulating Level of Ghrelin in Cachexia Associated With Chronic Heart Failure: Relationships Between Ghrelin and Anabolic/Catabolic Factors Circulation. 104: 2034 - 2038.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 409:194-198

Ngo V, Gourdji D, and Laverriere JN. 1996 Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression Mol. Cell. Biol.,; 16: 3245 - 3254.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, and Tschop M. 2001. Weight gain decreases elevated 138 plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. Eur J Endocrinol. 145(5): 669-

Ramakers JM. 1984. Coomassie Blue: an alternative procedure for proteins Clin. Chem. 30: 1433 - 1434.

Reed D. K., Korytko A. I., Hipkin R. W., Wehrenberg W. B., Schonbrunn A., and Cuttler L. 1999. Pituitary Somatostatin Receptor (sst)1-5 Expression during Rat Development: Age-Dependent Expression of sst2 Endocrinology.; 140: 4739.

Ritchie AK. 1993. Estrogen increases low voltage-activated calcium current density in GH3 anterior pituitary cells. Endocrinology,; 132: 1621 - 1629.

Sano T., Asa SL, and Kovacs K 1988. Growth hormone-releasing hormoneproducing tumors: clinical, biochemical, and morphological manifestations. Endocr. Rev. 9: 357 - 373.

Schlegel W, Winiger BP, Mollard P, Vacher P, Wuarin F, Zahnd GR, Wollheim CB, Dufy B. 1987. Oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in pituitary cells due to action potentials. Nature. 22-28;329(6141):719-21.

Schwartz J. 2000. Intercellular Communication in the Anterior Pituitary Endocr. Rev., 21: 488 - 513.

Shiyya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, and Matsukura S. 2002. Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 240 - 244.

Stojilkovic SS, Izumi S and Catt KJ. 1988. Participation of voltage-sensitive calcium channels in pituitary hormone release J. Biol. Chem. 263: 13054 - 13061.

Sugawara A, Yen PM, and Chin WW 1994. 9-cis retinoic acid regulation of rat growth hormone gene expression: potential roles of multiple nuclear hormone receptors Endocrinology. 135: 1956 - 1962.

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al. 2000 Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908–4911.

Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, et al. 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19-RC21.

Van Goor F, Zivadinovic D. and Stojilkovic SS. 2001. Differential Expression of Ionic Channels in Rat Anterior Pituitary Cells *Mol. Endocrinol.* 15: 1222 - 1236.

Waechter CJ, Schmidt JW, and Catterall WA. 1983. Glycosylation is required for maintenance of functional sodium channels in neuroblastoma cells *J. Biol. Chem.*, 258: 5117 - 5123.

Wagner KA, Yacono PW, Golan DE, and Tashjian AH Jr. 1993. Mechanism of spontaneous intracellular calcium fluctuations in single GH4C1 rat pituitary cells. *Biochem J*, 292 ( Pt 1): 175-82.

Wu D., Chen C., Zhang J., Katoh K. and Clarke I. 1994. Effects in vitro of new growth hormone releasing peptide (GHRP-1) on growth hormone secretion from ovine pituitary cells in primary culture. *J Neuroendocrinol*, Apr; 6(2): 185-90.

Xu R, Zhao Y, and Chen C. 2002. Growth hormone-releasing peptide-2 reduces inward rectifying K<sup>+</sup> currents via a PKA-cAMP-mediated signalling pathway in ovine somatotropes. *J. Physiol.* 545: 421 - 433.

Yamashita N., Matsunaga H., Shibuya N., Teramoto A., Takakura K., and Ogata E. 1988. Two types of calcium channels and hormone release in human pituitary tumor cells *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 255: 137 - 145.

Zorec, R. 1996. Calcium signaling and secretion in pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab.* 7:384-388.