

00562
3
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

VIAS CATABOLICAS EXTRACELULARES DEL
NEUROPEPTIDO TRH (HORMONA LIBERADORA DE
TIROTROPINA) EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
P R E S E N T A
ARMIDA BAEZ SALDAÑA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1.- RESUMEN	2
2.- SUMMARY	3
3.- INTRODUCCION	4
3.1 EL HIPOTALAMO	5
3.2 LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA	7
3.2.1 PAPEL NEUROENDOCRINO DEL TRH	7
3.2.2 EFECTOS DEL TRH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	10
4.- ANTECEDENTES	13
4.1 DISTRIBUCION DEL TRH	14
4.2 METABOLISMO DEL TRH	18
4.2.1 BIOSINTESIS	18
4.2.2 LIBERACION	17
4.2.3 MECANISMOS DE INACTIVACION	18
4.2.3.1 RECAPTURA DEL TRH	18
4.2.3.2 DEGRADACION DEL TRH	18
5.- OBJETIVO	31
6.- MATERIALES Y METODOS	32
7.- RESULTADOS	41
8.- DISCUSION	68
9.- BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1	pág. 6
Figura 2	pág. 8
Figura 3	pág. 21
Figura 4	pág. 22
Figura 5	pág. 43
Figura 6	pág. 44
Figura 7	pág. 49
Figura 8	pág. 50
Figura 9	pág. 52
Figura 10	pág. 53
Figura 11	pág. 55
Figura 12	pág. 56
Figura 13	pág. 60
Figura 14	pág. 61
Cuadro 1	pág. 35
Cuadro 2	pág. 46
Cuadro 3	pág. 47
Cuadro 4	pág. 57
Cuadro 5	pág. 58
Cuadro 6	pág. 64
Cuadro 7	pág. 65

R E S U M E N

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) está constituida por el tripeptido piroGlu-His-ProNH₂. El TRH ha sido considerado como un fuerte candidato a neurotransmisor central. Si este fuera el caso, el TRH liberado de la terminal nerviosa requiere de un mecanismo de inactivación que permita restablecer rápidamente las condiciones de reposo de la membrana sináptica. Se considera que el proceso de inactivación más probable es la degradación enzimática del TRH en el espacio sináptico. Las tres enzimas que metabolizan al TRH son: prolina endopeptidasa (PE), piroglutamato amino peptidasa soluble (PGA I) y piroglutamato amino peptidasa membranal (PGA II). Debido a que la actividad de la PGA II parece residir en las membranas sinaptosomales del cerebro, en este trabajo se intenta demostrar que es la enzima responsable de la inactivación del TRH como neurotransmisor en el hipotálamo. Para confirmar esta hipótesis se estudió la degradación del ³H-TRH en rebanadas de hipotálamo de rata incubadas en presencia o ausencia de agentes químicos competidores o inhibidores de la PGA I y la PGA II. Los productos metabólicos se caracterizaron cualitativa y cuantitativamente tanto en el medio de incubación como en el tejido por cromatografía en placa fina. Los resultados obtenidos indican que el ³H-TRH del medio de incubación está accesible al tejido para la rápida degradación enzimática y que en nuestro sistema observamos principalmente la acción de la PGA II y no la de la PGA I. Así que se postula que la PGA II está estrechamente involucrada con la inactivación del TRH en el espacio sináptico.

S U M M A R Y

Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) is the tripeptide pyroGlu-His-ProNH₂. A putative neurotransmitter action for TRH has been suggested. If it were, there must be an inactivation mechanism to restore the standby condition of the synaptic membrane. It is considered that enzymatic degradation of TRH at synaptic cleft is more likely. Three enzymes which metabolize TRH: proline endopeptidase (PE), soluble pyroglutamate aminopeptidase (PGA I) and membrane pyroglutamate aminopeptidase (PGA II), have been described. In this report, we try to demonstrate that PGA II is responsible of TRH inactivation as neurotransmitter in the hypothalamus because its activity seems to be at synaptosomal brain membranes. In order to confirm this hypothesis we have studied the degradation of ³H-TRH by hypothalamic slices in presence and absence of chemical agents that compete or inhibit PGA I and PGA II. Products were qualitative and quantitative characterized both in incubation media and slices by thin layer chromatography. The results obtained showed that in our system ³H-TRH is easily degraded by hypothalamic slices and we observed the PGA II instead of PGA I activity. We concluded that PGA II is intimately related with TRH inactivation at synaptic cleft.

I N T R O D U C C I O N

EL HIPOTALAMO

En el diencefalo se encuentra el hipotálamo, una pequeña estructura que pesa 4 gramos en el humano, lo cual equivale al 0.3% del peso total del cerebro (Halász 1978). Esta región del sistema nervioso central (SNC) es el principal centro autonómico y como tal tiene una importante influencia en el control de los sistemas nervio simpático y parasimpático. Tiene también células neurosecretoras que sintetizan hormonas, las cuales llegan al torrente sanguíneo por la vía del lóbulo neural de la glándula hipófisica o modulan la descarga hormonal de la hipófisis anterior a través de un sistema porta especial de vasos sanguíneos (Barr 1972).

Desde el punto de vista morfológico el hipotálamo puede subdividirse en tres zonas longitudinales: periventricular, media y lateral. Las zonas media y periventricular son ricas en cuerpos celulares mientras que la zona lateral está dominada por un sistema de fibras nerviosas que corren en dirección longitudinal. Basándose en las características celulares, densidad celular, posición y conexiones, la zona media está subdividida en diversos núcleos los cuales están esquematizados en la Fig. 1 (Barr 1972).

En el hipotálamo se encuentran vías de entrada y salida de información tanto neurales como humorales. Muchas partes del encéfalo contribuyen a la afluencia de información nerviosa al hipotálamo. Algunas de las estructuras más importantes en este aspecto son septum, hipocampo, amígdala, tálamo anterior, corteza piriforme y mesencéfalo, por lo que es evidente que el hipotálamo

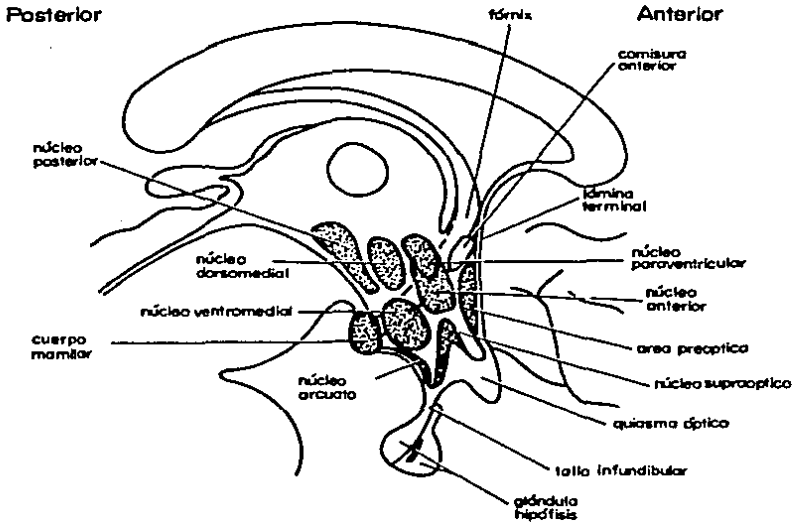


FIGURA 1.- Núcleos de la zona media del hipotálamo de cerebro humano (Barr, 1972).

debe de tener un alto grado de integración y de diferenciación. Cuando se estudian las conexiones eferentes y aferentes del hipotálamo, parece como si para algunas de ellas hubieran vías recíprocas, es decir, que hay circuitos nerviosos cerrados entre el hipotálamo por un lado y algunas partes del encéfalo por el otro (Halász 1978).

Las vías humorales de salida están representadas por el clásico sistema magnocelular neurosecretor supraóptico- y paraventriculo-hipofisiario y por el sistema neurosecretor parvocelular productor de las hormonas tróficas de liberación y de inhibición de las hormonas adenohipofisarias. Se sabe que los mecanismos por los cuales el sistema nervioso central controla la función de la hipófisis anterior es neurovascular. Las llamadas hormonas tróficas liberadoras e inhibidoras son sintetizadas en los somas de las neuronas hipotalámicas y transportadas a lo largo de sus axones hasta la eminencia media de donde son liberadas a los capilares portales y acarreadas hasta la adenohipófisis (Halász 1978).

LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA

PAPEL NEUROENDOCRINO DEL TRH

La liberación de la hormona tirotrópica (TSH) por la glándula hipófisis anterior es regulada por la interacción entre el TRH -que tiene una influencia estimuladora- y las hormonas tiroideas tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) cuyo papel es inhibitorio. La estructura química del TRH se dilucidó de extractos de hipotálamos bovinos y porcinos (Boiler et al. 1969) (Fig. 2) y la

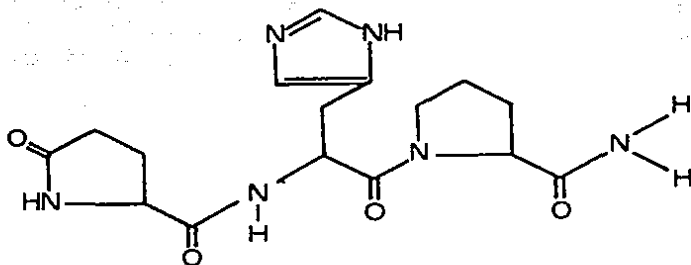


FIGURA 2.- Estructura química del TRH, piroGlu-His-Pro-NH₂.

confirmación de su estructura se hizo tanto por síntesis química como por numerosas pruebas biológicas.

Ha sido demostrado que el TRH sintético, al igual que el hipotalámico, estimula la síntesis y la liberación de TSH, T_3 y T_4 en todas las especies de mamíferos estudiadas, sin importar la vía de administración, edad o sexo (Schally et al. 1978). La administración intravenosa de TRH produce también la secreción a la circulación sanguínea de prolactina liberable del lactotrofo en la rata lactante (Grosvenor y Mena 1980) por lo que se considera que el TRH es también uno de los factores fisiológicos estimuladores de su secreción.

Con el TRH sintético se han desarrollado métodos de detección y cuantificación para estudiar su importancia fisiológica y metabolismo en el organismo. Así que se han hecho intentos para determinar las condiciones fisiológicas de la secreción del TRH a la sangre portal y los parámetros que la modulan. Los estudios iniciales determinaron que ni el tratamiento agudo o crónico ni la tiroidectomía o hipofisectomía, alteran el contenido de TRH en el hipotálamo (Bassiri y Utiger 1972). Similarmente, la inducción crónica experimental de hipotiroidismo e hipertiroidismo -que si alteran los estados metabólicos según las determinaciones séricas de T_4 y TSH- no producen ningún cambio significativo en la concentración del TRH en la sangre ni en el contenido de TRH en el hipotálamo (Montoya et al. 1975). Sin embargo, recientemente se ha reportado que en la rata, el hipotiroidismo si produce un incremento de casi el doble de proTRH RNAm, aunque este efecto se observa exclusivamente en una

población discreta de neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico (Segerson et al. 1987b); y que este efecto selectivo está regulado directamente por la hormona tiroidea triyodotironina (Dyess et al. 1988).

EFFECTOS DEL TRH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Además de la relación entre el TRH y el sistema endócrino se ha observado que el tripéptido tiene diversos efectos en el SNC. Por ejemplo, la administración oral o intraperitoneal de TRH aumenta la excitación conductual inducida por L-dopa + pargilina, pero de manera independiente de la liberación de TSH de la hipófisis (Plotnikoff et al. 1972). Por otra parte, los reportes acerca de los efectos del TRH en pacientes deprimidos son controvertidos, ya que algunos han observado una rápida y dramática mejoría con tan solo una inyección de TRH (Prange y Wilson 1972); mientras que otros investigadores no han podido ver ningún efecto terapéutico en pacientes deprimidos ni con administraciones repetidas (Coppen et al. 1974). Este tripéptido también tiene efectos importantes en la termorregulación, pues la inyección intraventricular del TRH induce hipertermia en la rata y revierte los efectos hipotérmicos de barbitúricos, péptidos opioides y bombesina (Brown et al. 1977) además, el incremento de TSH en la sangre inducido por frío agudo está mediado por el TRH (Reichlin 1976). La microinyección de TRH en el hipocampo dorsal de ardillas terrestres que se encuentran en la primera mitad del periodo de hibernación, produce un potente efecto de despertar así como una completa transición al estado de eutermia. Este efecto confirma las propiedades analépticas del TRH en la

reversión de la depresión central inducida por drogas, así como aporta más datos que apoyan el papel fisiológico del TRH como modulador de la excitabilidad del SNC en mamíferos (Stanton et al. 1980).

También, hay muchas evidencias que proponen que el TRH puede estar involucrado en la modulación del recambio y liberación de las catecolaminas cerebrales además de que está descrito que afecta al sistema colinérgico (Bennett et al. 1983). Los trabajos efectuados por diversos laboratorios indican que la actividad locomotora y el comportamiento excitado que induce el TRH puede deberse a su interacción con las vías cerebrales del sistema mesolímbico dopaminérgico, especialmente con las asociadas al núcleo acumbens. En rebanadas de diversas regiones cerebrales de rata el TRH produjo un marcado incremento en la liberación de dopamina y aunque las respuestas fueron inconsistentes en relación a la distribución dopaminérgica, los resultados sí concuerdan con la distribución regional del TRH en el cerebro de la rata (Heal et al. 1983).

Se sabe que el TRH tiene también efectos electrofisiológicos inhibitorios (Renaud y Martin 1975; Braitman et al. 1980) y excitatorios en las neuronas del hipotálamo y de las cortezas cerebral y cerebelar (Braitman et al. 1980). Por la administración iontoforética del TRH se demostró que tiene acción depresiva sobre la actividad de neuronas centrales en diversas áreas del SNC incluyendo la corteza cerebelar (Renaud y Martin 1975). Los efectos de la acetilcolina en neuronas corticales son alterados por la administración iontoforética de TRH, el cual clara y

consistentemente incrementó la acción excitadora de la acetilcolina y del carbacol (Yarbrough 1978). Las neuronas de la corteza sensorimotora responden indirectamente al TRH en forma diferente. En algunas se potencializó el efecto de la acetilcolina con el TRH y en otras el efecto se inhibió. Esto implica que en la corteza cerebral de los mamíferos el TRH tiene múltiples acciones y que éstas parecen existir en poblaciones discretas de neuronas (Braitman et al. 1980).

Los efectos electrofisiológicos, neuroquímicos y conductuales observados con el TRH comienzan por la interacción con receptores altamente específicos. En el cerebro de las diversas especies estudiadas se han encontrado receptores para el TRH semejantes a los de la hipófisis anterior (Burt y Taylor 1980). Los sitios de mas alta unión fuera de la hipófisis son la retina, el núcleo acumbens y la corteza amigdaló-temporal, aunque en realidad hay sitios de unión casi en la totalidad del SNC (Taylor y Burt 1982). Los sitios de alta afinidad fuera de la hipófisis presentan las mismas características que los de la hipófisis, lo cual complementa la identificación de estos receptores fuera de ella y la presencia de éstos sugiere que los lugares donde se encuentran son importantes sitios de acción del TRH (Taylor y Burt 1981).

ANTECEDENTES

DISTRIBUCION DEL TRH

Por medio del radioinmunoanálisis (RIA) se ha determinado que el TRH se encuentra ampliamente distribuido en el organismo. Su presencia se ubica en cerebro, médula espinal, intestino, páncreas, sangre, líquido cefalorraquídeo y retina.

En el cerebro completo de rata hay entre 25 y 30 ng de TRH teniendo el hipotálamo la más alta concentración (31.2%, 3.8 ng/mg tejido húmedo, 8.4 ng totales) y le siguen en orden decreciente hipófisis posterior, tálamo, tallo cerebral, cerebro anterior, corteza, hipófisis anterior y cerebelo (Winokur y Utiger 1974; Oliver et al. 1974; Pacheco et al. 1981; Kardon et al. 1977). En el propio hipotálamo, la más alta concentración de TRH se halla en la eminencia media (3.57 ng/mg tejido húmedo) y también en orden decreciente en el núcleo ventromedial, en el núcleo paraventricular, en el núcleo arcuato, en el núcleo dorsomedial y en el Área preóptica media (Brownstein et al. 1974; Yamauchi 1980). En la eminencia media las regiones más cercanas a la palisada vascular del sistema porta hipofisario, la zona intermedia externa central y la zona lateral externa central, tienen las concentraciones más altas de TRH (Kizer et al. 1978).

En el cerebelo de rata el TRH se encuentra altamente concentrado en tres pequeñas regiones, que aunque contienen casi la totalidad del TRH cerebelar, constituyen solamente la quinta parte de la masa del cerebelo (Pacheco et al. 1981).

Por inmunohistoquímica se ha detectado al TRH en los procesos neuronales del hipotálamo, en somas, axones y sobre todo en terminales nerviosas. Las zonas de más alta concentración son la

eminencia media, núcleo dorsomedial, división parvocelular del núcleo paraventricular, la región perifornical, el núcleo preóptico supraquiasmático, núcleo paraventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminalis. Presenta también una notable acumulación en la hipófisis posterior, en donde las fibras parecen terminar en formaciones parecidas a racimos de uvas (Lechan y Jackson 1982).

De acuerdo con su localización principal en las terminales nerviosas, el TRH también se ha detectado en terminales nerviosas aisladas tanto de hipotálamo como de otras regiones del cerebro (Barnes et al. 1975; Winokur et al. 1977).

Por estudios inmunocitoquímicos en la médula espinal de la rata se ha encontrado TRH en las fibras de las astas dorsales de todos los segmentos del cordón espinal, en las áreas simpáticas del cordón torácico y en las astas ventrales de todos los segmentos espinales (Harkness y Brownfield 1988).

EL TRH inmunoreactivo (TRH-IR) del SNC de la rata, se ha identificado como auténtico TRH tanto por sus efectos en sistemas biológicos como por análisis cromatográficos. Los extractos metanólicos de cerebro de rata tienen el mismo patrón de elución que el TRH sintético en cromatografía en columna de Sephadex G-10 y en cromatografía en placa fina (Schaeffer et al. 1977), en electroforesis con acetato de celulosa (Oliver et al. 1974; Jackson 1980) y en cromatografía de líquidos de alta presión (Spindel y Wurtman 1980). Por todos estos datos se concluye que el TRH-IR es realmente TRH.

La amplia distribución del TRH en el tejido nervioso, los

cambios conductuales inducidos por su administración y el descubrimiento de receptores de alta afinidad en hipófisis y cerebro, apoyan fuertemente el postulado del papel neurotransmisor y/o neuromodulador del TRH en el cerebro de los mamíferos (Renaud y Martin 1975, Taylor y Burt 1981, Bennett et al. 1983).

METABOLISMO DEL TRH

BIOSINTESIS

Los estudios iniciales sobre la biosíntesis de TRH propusieron la existencia de un sistema enzimático "TRH sintetasa" soluble e independiente de ARN encargado de la formación del tripéptido (Mitnick y Reichlin 1971, Bauer 1973). Sin embargo, después se comprobó que durante la purificación de los productos formados al incubar extractos hipotalámicos con aminoácidos radioactivos, se eliminaba del 99.97 al 99.98% de la radioactividad inicial en el homogenado crudo; y que si además se adicionaban inhibidores de la síntesis ribosomal de proteínas disminuía la cantidad de TRH sintetizado *de novo* (McKelvy et al. 1978); así que los investigadores se enfocaron a la búsqueda del precursor de alto peso molecular a partir del cual se deriva este pequeño péptido.

Reportes recientes sobre la estructura del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del precursor del TRH (pro-TRH) permiten predecir que el precursor de este neuropéptido es una proteína de 255 aminoácidos que contiene 5 copias de la secuencia progenitora de TRH con aminoácidos dibásicos en ambos lados (Lechan et al. 1988b). La ruptura en estos sitios y en un residuo de arginina apareado en la porción amino-terminal de la

molécula, generó otras secuencias peptídicas además de la del TRH. Parece ser que el procesamiento del proTRH no ocurre durante el transporte axonal como se ha descrito para la proprosofina, el precursor de la vasopresina (Gainer et al. 1977) mas bien, parece ser que el proTRH es rápidamente convertido a TRH dentro de la pericaria neuronal, tal vez al salir del aparato de Golgi (Lechan et al. 1986b). La distribución regional del pro-TRH en el cerebro de la rata estudiado por inmunocitoquímica (Lechan et al. 1986a) y por hibridación *in situ* (Jackson et al. 1985) muestra que está presente en neuronas del hipotálamo y del cerebro extrahipotalámico con una distribución típica a la del TRH, además del telencéfalo, diencéfalo y tallo cerebral (Segerson et al. 1987a).

En lo que respecta a la regulación de la biosíntesis del TRH se ha determinado que los niveles circulantes de tiroxina afectan de manera inversamente proporcional los niveles del ARNm de pro-TRH en el núcleo paraventricular de la rata. Y como este efecto también se observa de igual manera con el pro-TRH, se cree que el hipotiroidismo induce la transcripción y por lo tanto la traducción de la prohormona del TRH en el núcleo paraventricular (Segerson et al. 1987b).

LIBERACION

La liberación del TRH de las terminales nerviosas se ha estudiado en sinaptosomas y rebanadas de cerebro de rata. Los reportes sobre la liberación de TRH con sinaptosomas son discrepantes, ya que los resultados dependen aparentemente del medio de incubación que se usa (amortiguador Krebs-bicarbonato o

sacerosa 0.32 M) y del tipo de estímulo aplicado (eléctrico o potasio 80 mM). (Bennett et al. 1975, Warberg et al. 1977). Estos problemas han limitado la utilización de los sinaptosomas para el estudio de la liberación del TRH. En cambio, los resultados que se obtienen con fragmentos de tejido cerebral son más consistentes, ya que se ha visto que la liberación *in vitro* de TRH de fragmentos de hipotálamo se incrementa con la adición de K⁺ (58 mM) de una manera dependiente de Ca⁺², lo cual sugiere que el TRH se libera por exocitosis (Charli et al. 1978, Joseph - Bravo et al. 1978, Maeda y Frohman 1980). Esta respuesta al estímulo despolarizante (58 mM K⁺) fué significativa solamente en aquellas regiones en las que se ha visto el más alto contenido de receptores para TRH, numerosas terminales nerviosas que contienen TRH y que son susceptibles a sus efectos (Méndez et al. 1987). En cuanto a los neurotransmisores que afectan la liberación del TRH existe también una gran controversia, ya que los reportes son opuestos para un mismo neurotransmisor (Charli et al. 1978; Joseph-Bravo et al. 1978a; Maeda y Frohman 1980) probablemente por las mencionadas diferencias en los sistemas utilizados; pero en general se propone que este proceso está controlado tanto por fibras excitadoras (noradrenérgicas e histaminérgicas) como por fibras inhibitorias (serotoninérgicas y dopaminérgicas).

MECANISMOS DE INACTIVACION

RECAPTURA DE TRH

En preparaciones sinaptosomales derivadas de hipotálamo o corteza cerebral de rata se considera que no hay recaptura del propio TRH, sino de uno de sus metabolitos formado en el medio

extracelular (Parker et al. 1977). Pero con rebanadas de hipotálamo de rata se ha observado que si hay recaptura de TRH intacto y las características de este proceso sugieren que éste debe ser por transporte activo. Sin embargo, como la $V_{m\acute{a}x}$ obtenida con este sistema es baja, se considera que la recaptura no significa necesariamente un posible mecanismo de inactivación para el TRH presente en el medio extracelular (Charli et al. 1984).

DEGRADACION DEL TRH

Desde hace varios años se ha observado la rápida inactivación biológica del TRH por las enzimas séricas y tejidos como cerebro total, hipotálamo, hipófisis, etc. Los estudios iniciales de degradación determinaban la desaparición del TRH incubado con la fuente enzimática a 37°C en presencia de DTT y EDTA (Bauer 1977).

La inactivación del TRH *in vitro* por el tejido nervioso, es en realidad, un proceso complejo que involucra a más de una vía metabólica; además, existen diferencias no sólo entre los mecanismos de inactivación por los diferentes tejidos de un mismo individuo, sino también entre los compartimientos subcelulares de un mismo tejido. Por ejemplo, el TRH agregado al medio de incubación es degradado rápidamente por homogenados de tejido cerebral a 37°C y a menor velocidad a 4°C; mientras que el TRH endógeno no desaparece de los homogenados ni a 37°C. Estos datos permiten sugerir que el TRH endógeno está compartimentalizado de tal manera que se encuentra protegido de la degradación, a pesar de que en el cerebro se encuentre una gran actividad degradativa.

Desde hace más de 10 años se ha considerado al TRH como

posible neurotransmisor, y algunos estudios se enfocaron a detectar actividad degradativa en fracciones particuladas, con el objeto de determinar si en la fracción membranal reside su mecanismo de inactivación. El estudio inicial de la distribución subcelular de las enzimas peptidásicas responsables de la degradación del TRH, indicó que en la corteza y el hipotálamo de rata, el 10% de la actividad degradativa total del homogenado está presente en las terminales nerviosas y dicha actividad se encuentra principalmente relacionada a la membrana sinaptosomal (Joseph-Bravo et al. 1978b).

Actualmente se conocen todas las enzimas involucradas en el proceso de degradación del TRH *in vitro*. El catabolismo del TRH por la fracción soluble de cerebro está catalizado por dos enzimas: la piroglutamato aminopeptidasa (PGA I) y la endopeptidasa que corta después de prolina o prolilendopeptidasa (PPCE) cuyos productos son a su vez sustratos de la post-prolina dipeptidil aminopeptidasa (PPDA), de la histidil prolina imidopeptidasa (HPI) y de la prolina dipeptidasa (PD) (Fig. 3).

PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA

La piroglutamato aminopeptidasa es la enzima que rompe la unión <Glu-His del TRH. La His-ProNH₂ producida por la acción de la PGA se cicliza durante la cromatografía a histidil - prolina dicetopiperazina (DKP) o ciclo His-Pro (Fig 4). Esta condensación intramolecular es una reacción característica de los dipéptidos que contienen prolina (Bauer et al. 1978).

La actividad de PGA se ha detectado en diversas bacterias, plantas, suero de diferentes mamíferos, homogenados de numerosos tejidos como cerebro, hipófisis, hipotálamo, hígado, etc. así

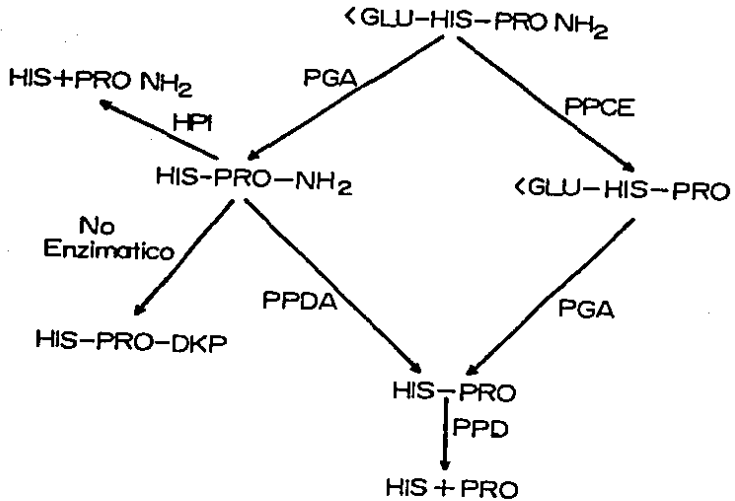


FIGURA 3.- Esquema de las vías catabólicas del TRH *in vitro*. PGA=Piroglutamato amino peptidasa. PPCE=Enzima que corta después de prolina. PPDA=Post-prolina dipeptidil amino peptidasa. PD=Prolina dipeptidasa. HPI=Histidil prolina imidopeptidasa.

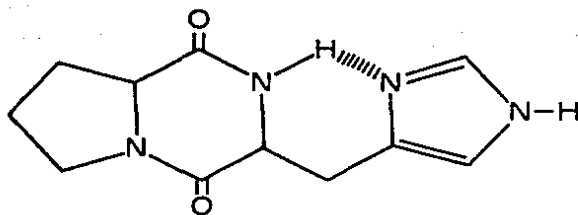


FIGURA 4.- Estructura química de la histidil-prolina dicetopiperazina (DKP).

como en fracciones solubles y particuladas de dichos tejidos, de tal forma que pudiera haber varias enzimas que presentan esta actividad pero con características diferentes de acción y de regulación.

En el suero sanguíneo se ha reportado que el principal producto de degradación del TRH es la His-Pro-NH₂ por lo que se consideró que la enzima sérica que cataliza la hidrólisis de la unión piro-Glu-His puede ser la enzima clave dentro de la inactivación biológica del tripéptido en este compartimento y consecuentemente del control de su efecto sobre hipófisis. La PGA sérica de cerdo es una enzima específica del TRH que tiene un P.M. de aproximadamente 280,000 daltons; se inhibe con el EDTA y el DTT y no degrada al sustrato fluorogénico artificial de la PGA soluble de tejidos (la piroGlu-beta naftil amida: <Glu-BNA) (Bauer y Nowak 1979). La enzima de suero de rata es también específica para TRH y se inhibe con DTT y EDTA (Emerson y Wu 1987). La actividad de la enzima sérica está controlada por el estado tiroideo, pues se ha visto que disminuye su actividad en condiciones de hipotiroidismo y se estimula en condiciones de hipertiroidismo (Bauer 1978, Emerson y Wu 1987).

En líquido cefalorraquídeo (LCR) humano también se ha detectado y parcialmente purificado una PGA que constituye la enzima principal involucrada en el metabolismo del TRH en el LCR (Prasad y Jayaraman 1986). Esta enzima se considera semejante a la sérica porque se inhibe competitivamente por la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y bombesina y se inactiva con metales pesados, EDTA y agentes reductores y se propone que puede

participar en el control de los efectos biológicos del TRH en el LCR.

En cerebro de rata y cobayo se han detectado dos actividades de PGA. La PGA I que es la asociada a la fracción soluble (Joseph-Bravo et al. 1978b, Kreider et al. 1981, Prasad et al. 1983, Browne y O'Cuinn 1983, Torres et al. 1986) y la PGAII que está principalmente relacionada con la fracción membranal (Joseph-Bravo et al. 1979b, Prasad et al. 1983, O'Connor y O'Cuinn 1984, 1985 y 1987a, Garat et al. 1985, Torres et al. 1986).

La PGA de la fracción soluble de cerebro de cobayo se ha purificado 2868 veces, obteniéndose una pureza de más del 90%. Al igual que la enzima soluble de cerebro de rata, no es específica para TRH ya que puede catalizar la hidrólisis de TRH y TRH-OH así como de otros péptidos que tienen una unión peptídica adyacente al residuo del ácido piroglutámico como LHRH, neurotensina, bombesina, péptido B potenciador de bradikina, péptidos anorexigénicos y los dipéptidos pGlu-Ala y pGlu-Val. Esta enzima puede ser inhibida específicamente con 2-yodoacetamida (100% de inhibición a la concentración 5 μ M) y su especificidad por el sustrato es muy similar a la de todas las PGAs solubles como la del *Bacillus amyloliquefaciens*, pero es muy distinta de las enzimas de suero de rata y de cerdo (Browne y O'Cuinn 1983). Una PGA I semejante a ésta soluble de cerebro, también está presente en adenohipófisis (Bauer y Kleinkauf 1980).

En un estudio pionero sobre la distribución subcelular de la actividad de PGA en el cerebro de rata, se observó que la actividad en el hipotálamo está asociada principalmente a la

fracción soluble; mientras que en la corteza la actividad de la PGA predomina en la fracción particulada (Prasad et al. 1983). Sin embargo, estas diferencias ahora se explican a que en los medios de incubación usaron DTT, el cual se sabe actualmente que inhibe a la enzima membranar PGA II y es necesario para la expresión de la actividad soluble PGA I (O'Connor y O'Cuinn 1984, Garat et al. 1985, Emerson y Wu 1987).

En cerebro de cobayo y de rata, la actividad particulada de la PGA parece residir en las membranas sinaptosomales (O'Connor y O'Cuinn 1984, Torres et al. 1988). La enzima de cobayo después de ser liberada de las membranas por tratamiento con papaína o Tritón X-100 fué purificada y caracterizada (O'Connor y O'Cuinn 1984). Esta enzima llamada PGA II, en contraste con la soluble de homogenados arriba descrita, es de estrecha especificidad, ya que solamente corta el ácido piroglutámico de TRH, TRH-OH y el tripéptido piroGlu-His-Trp (igual al extremo N-terminal de LHRH), siendo incapaz de hidrolisar dipéptidos con ácido piroglutámico N terminal o péptidos mayores de tres aminoácidos también con <Glu N-terminal. Para el TRH tiene una Km de 40 μ M y la LHRH la inhibe competitivamente con una Ki de 20 μ M (O'Connor y O'Cuinn 1985). El estudio del sitio activo de esta enzima reveló que los residuos de histidina, tirosina, arginina y posiblemente lisina son necesarios para la expresión de la actividad catalítica, siendo probable que éstos se encuentren localizados en el sitio activo de la enzima (O'Connor y O'Cuinn 1987b). La PGA II está localizada casi exclusivamente en adenohipófisis y SNC teniendo en este último una distribución no homogénea (Friedman y Wilk 1988,

Vargas et al. 1987). En el SNC la enzima está concentrada a nivel de las membranas plasmáticas de terminaciones nerviosas (Torres et al. 1986, O'Connor y O'Cuinn 1984).

En contraste con la regulación por el estado tiroideo en la enzima sérica, se ha visto que las actividades de las PGA I y PGA II cerebrales no se ven afectadas por la concentración de hormonas tiroideas circulantes, con lo cual se concluye que las actividades de PGA en cerebro son diferentes de la actividad en suero en términos de la respuesta a esas hormonas (Emerson y Wu 1987). Sin embargo, recientemente se reportó que en las membranas de la adenohipófisis sí hay un importante aumento en la actividad de la PGAI inducido por un incremento en la concentración circulante de T_3 (Ponce et al. 1988). Estos datos sugieren que el catabolismo del TRH en su órgano blanco efectivamente puede tener un papel importante para mediar la retroalimentación negativa de la liberación de TSH por las hormonas tiroideas.

PROLINA ENDOPEPTIDASA

La prolina endopeptidasa (PE) (prolilendopeptidasa, enzima que rompe después de prolina o PPCE) es la que actúa sobre la unión -Pro-NH₂ del TRH produciendo TRH-ácido (TRH-OH) (Fig. 3, pág. 21). Se puede observar una intensa actividad degradativa con extractos de tejido hipotalámico libre de partículas, que se inicia con una desamidación y se continúa con rupturas proteolíticas hasta prolina libre como principal producto de degradación, además de TRH-OH y prolinamida (Bauer 1973).

El residuo de prolina con su especial estructura alifática cíclica representa un blanco característico para las enzimas

peptidasas. La actividad de esta prolina iminopeptidasa se ha detectado en diversas especies, exclusivamente en la fracción soluble de muchos tejidos como: hipotálamo (Bauer 1973 y 1977), cerebro (Rupnow et al. 1979, Taylor y Dixon 1980, Donlon et al. 1980, Dresdner et al. 1982, Browne y O'Cuinn 1983, Kreider et al. 1981, Torres et al. 1986, Andrews et al. 1982, Hersh 1981, Hersh y McKelvy 1979, McKelvy et al. 1982, Mateui et al. 1979), riñón (Walter 1978, Walter y Yoshimoto 1978, Koida y Walter 1978, Hersh 1981, Yoshimoto et al. 1977) y en adenohipófisis (Bauer y Kleinkauf 1980, Friedman et al. 1984b). Por sus características de peso molecular, tipo de proteasa (serina), distribución subcelular (soluble), especificidad primaria (prolina), sensibilidad a determinados inhibidores y otras propiedades fisicoquímicas, se demostró que la actividad que deamida TRH es igual a la endopeptidasa soluble PPCE previamente conocida en otros tejidos de otras especies. Además, usando un antisuero monoespecífico contra la enzima de cerebro de rata se demostró su ubicuidad en todos los tejidos de rata examinados, siendo este antisuero capaz también de inactivar a las enzimas extraídas de hipotálamo de bovino y riñón de borrego (Hersh 1981, Andrews et al. 1982).

Es la única endopeptidasa citoplásmica capaz de degradar en todos los tejidos examinados de todas las especies estudiadas (conejo, bovinos, borrego, rata, cobayo, etc.) a un gran número de polipéptidos que tengan prolina (Yoshimoto et al. 1977, Hersh y McKelvy 1979, Taylor y Dixon 1980, Donlon et al. 1980, Hersh 1981, Andrews et al. 1982, Dresdner et al. 1982). Esta endopeptidasa rompe todo tipo de uniones Pro-X, excepto Pro-Pro y péptidos en

los cuales la prolina está precedida del lado N-terminal por menos de dos aminoácidos. Tiene un P.M. de 73,500 daltons, una sola cadena polipeptídica y pH óptimo entre 7 y 8. Es más estable en un ambiente altamente reductor por lo que es susceptible de inhibirse con agentes que inactivan grupos sulfhidrilos como la N-etilmaleimida y el p-cloromercuribenzoato y es muy sensible a la yodoacetamida (100% de inhibición a la concentración 5uM) (Rupnow et al. 1979, Browne y O'Cuinn 1983).

POST-PROLINA DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA

Con relación a la desamidación de la His-ProNH₂, se sabe que está catalizada por una post-prolina dipeptidil aminopeptidasa (PPDA) o X-prolil dipeptidil aminopeptidasa (dipeptidil aminopeptidasa IV) (Fig. 3, pág. 21). Esta actividad enzimática se ha encontrado tanto en fracciones solubles como particuladas de diversos tejidos. Fue descrita inicialmente en la fracción microsomal de hígado y riñón (Yoshimoto y Walter 1977, Yoshimoto et al. 1978), en la glándula submaxilar humana y en las membranas de microvellosidades de intestino delgado y de riñón (O'Connor y O'Cuinn 1988). La PPDA soluble se ha encontrado en suero y LCR humanos, en el sobrenadante de 100,000 x g de cerebro de rata, en adenohipofisis de rata (Bauer y Kleinkauf 1980) y cerebro de cobayo (Browne y O'Cuinn 1983), en donde junto con la PGA y la PE solubles participa en la degradación *in vitro* del TRH hasta sus aminoácidos constitutivos. La PPDA de la fracción particulada constituye el 45% de la actividad total de la PPDA en cerebro y su actividad específica se ve a su vez enriquecida en las membranas sinaptosomales (O'Connor y O'Cuinn 1988, Torres et al. 1988).

La PPDA soluble, al igual que la PE es una serina proteasa que cataliza la hidrólisis del segundo enlace peptídico en los péptidos A-Pro-X o A-Ala-X (siendo A cualquier aminoácido y X cualquier aminoácido o péptido) pero tampoco rompe la unión Pro-Pro (Yoshimoto et al. 1978) y se inhibe con puromicina 0.5 mM, N-etilmaleimida 1.0 mM y p-cloromercuribenzoato 1.0 mM (Browne y O'Cuinn 1983).

Sin embargo, la PPDA membranal parcialmente purificada no se inhibe con los mismos inhibidores que la soluble, pero si se inhibe en un 98% con bacitracina 0.5 mM, la cual no afecta a la enzima soluble. Usando TRH como sustrato, la PPDA de membranas sinaptosomales, convierte la His-ProNH₂ - producida por la PGA membranal - en His-Pro, compitiendo con la ciclización espontánea a ciclo-His-Pro (O'Connor y O'Cuinn 1988).

HISTIDIL-PROLINAMIDA IMIDOPEPTIDASA

La Histidil-Prolinamida Imidopeptidasa (HPI) es la enzima que cataliza la ruptura de la His-Pro-NH₂ a histidina y Pro-NH₂ (Fig. 3, pág 21). Esta enzima se purificó parcialmente de un extracto cerebral, se caracterizó con una variedad de compuestos determinándose que los mejores sustratos para la imidopeptidasa son los que contienen un grupo alfa-amino libre sobre la histidina y un grupo carboxilo bloqueado sobre la prolina como en la His-Pro-NH₂ y su actividad puede ser inhibida por muchas hormonas polipeptídicas (Matsui et al. 1978). Con ésta enzima se puede explicar la producción indirecta de Pro-NH₂ cuando se incuba TRH con tejido cerebral (Bauer y Lippman 1978) o con fracciones subcelulares de cerebro (Torres et al. 1986).

PROLINA DIPEPTIDASA

La hidrólisis de His-Pro, la cuál surge indirectamente del catabolismo del TRH (Fig. 3, pág. 21) es catalizada probablemente por la prolina dipeptidasa (prolidasa, imidodipeptidasa), una dipeptidasa que actúa en la unión X-Pro (en donde X puede ser cualquier aminoácido). Esta enzima se ha purificado parcialmente y caracterizado de la fracción soluble de adenohipófisis (Bauer y Kleinkauf 1980) y de cerebro (Browne y O'Cuinn 1983) y con ella se puede explicar la presencia de Pro entre los metabolitos del TRH producidos *in vitro*.

O B J E T I V O

La información mencionada en los capítulos anteriores acerca de las características del TRH, apoya la propuesta de la función neuromoduladora de este péptido en el sistema nervioso central. Si este fuera el caso, el TRH debe ser catabolizado en el espacio extracelular después de su liberación de la terminal nerviosa (Cooper et al. 1974). Sin embargo, aún no está claramente definido cual es el mecanismo de inactivación del neuropéptido.

El objetivo del presente trabajo fué determinar cuales enzimas estaban presentes en las membranas celulares de hipotálamo. Se utilizó una preparación de rebanadas de hipotálamo con el fin de preservar las células intactas y obtener información que apoye o refute la presencia de una PGA II en el hipotálamo de la rata.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

El (L-2,3,4,5-²H)prolina-TRH, (²H-Pro-TRH), (²H-TRH) de 107 Ci/mmola se obtuvo de New England Nuclear Co. TRH, TRH-OH (piroGlu-His-Pro) e His-Pro-dicetopiperacina (ciclo-His-Pro) (DKP) de los Laboratorios Peninsula. His-Pro y His-ProNH₂ fueron preparadas individualmente en el laboratorio por la acción de la PGAL de Sigma Chem. Co. sobre TRH-OH y TRH respectivamente. El resto de los reactivos químicos que se usaron fueron de grado analítico de Sigma Chemical Co. o J. T. Baker. Las cromatoplasmas analíticas utilizadas en el estudio de los productos de degradación fueron de sílica gel 60 (cat. Merck 5724). Las cromatoplasmas de sílica gel de alta eficiencia para purificar el ²H-TRH fueron Whatman LHP-KF (cat. 4806-410). La cromatografía en papel de intercambio iónico se efectuó en hojas de fosfato de celulosa P81 de Whatman. Los animales de experimentación utilizados fueron ratas macho Wistar (200-300 g de peso) mantenidos bajo condiciones controladas de luz-obscuridad (con iluminación artificial de 7:00-19:00 hs.) y alimentados *ad libitum*.

MÉTODOS

REVELADO DE LAS CROMATOPLASMAS CON REACTIVO DE PAULI.- Este reactivo consistió en tres soluciones que se aplicaron en dos etapas. Se mezclaron partes iguales de 4c. sulfanílico al 1% en HCl 1N y nitrito de sodio al 5% (que se preparaba justo antes de usarlo), se incubó esta mezcla durante 5 min a 4 °C y con ella se rociaron las cromatoplasmas. El reactivo se secó con corriente de aire y en seguida se roció la cromatoplasma con una solución de carbonato de sodio al 15%, con lo cual los compuestos que

contenían histidina se pusieron de color rosa.

REVELADO DE LAS CROMATOPLACAS CON ISATINA.- Las cromatoplacas se rociaron con solución de isatina en agua al 3% y los compuestos que contenían prolina se observaron como manchas grises.

SOLUCION DE BRAY PARA MEDIR RADIOACTIVIDAD POR CENTELLEO LIQUIDO.- Esta solución se preparó con 1,4-dioxano como disolvente y contenía por cada litro de solución: 60 g de naftaleno, 4 g de 2-5 dimetil oxazol, 100 ml de metanol absoluto y 20 ml de etilenglicol. Con esta solución se obtuvo una eficiencia para ^3H de 31.5% en un contador Packard Mod. Tri-Carb.

HOMOGENIZACION DE LOS TEJIDOS POR SONICACION.- La suspensión de rebanadas de tejidos hipotalámicos en ác. acético se sometió a sonicación en baño de hielo con un sonicador Branson modelo 200 con micropunta, a la potencia máxima y tono entre 22 y 28 micrones. Las descargas se efectuaron con duración de 5 seg con 15 seg de descanso por 5 veces.

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS EN LOS HOMOGENADOS.- Aliquotas de 100 μl de cada homogenado en ác. acético al 20%, se neutralizaron con NaOH 5N; se hidrolizaron en NaOH 1N a temperatura ambiente durante 18 a 24 hr y en este hidrolizado se determinaron las proteínas por el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry et al. 1951). Con este procedimiento se encontraron 1.81 ± 0.38 mg proteína/hipotálamo (n=84 determinaciones por duplicado; y coeficiente de variación c.v.=21%).

PARAMETROS DE MIGRACION DE LOS METABOLITOS DEL TRH EN LOS SISTEMAS CROMATOGRAFICOS.- En el Cuadro 1 se encuentran los parámetros de migración relativos de los estándares en los

SISTEMA I

Metabolito	R _f
Pro	0.20±0.05 (36, 23.6X)
His-Pro	0.35±0.10 (32, 27.3X)
TRH-OH	0.40±0.09 (37, 23.2X)
TRH	0.59±0.07 (37, 11.3X)
Pro-NH ₂	0.78±0.05 (37, 6.0X)
DKP	0.88±0.05 (35, 5.5X)

SISTEMA I I

Metabolito	R _f
Pro	0.17±0.03 (19, 20.0X)
His-Pro	0.52±0.05 (19, 9.1X)
TRH-OH	0.54±0.05 (19, 8.5X)
TRH	0.47±0.08 (19, 13.7X)
Pro-NH ₂	0.28±0.05 (19, 16.1X)
DKP	0.80±0.03 (21, 5.9X)

SISTEMA I I I

Metabolito	R _f
TRH-OH	0.85±0.05 (8, 5.3X)
His-Pro	0.05±0.03 (8, 60.0X)

CUADRO 1.- R_fS DEL TRH Y SUS METABOLITOS. Cromatografía en placa fina de sílica gel desarrollada en I: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 5:3:1; II: Isopropanol-H₂O-NH₄OH 70:29:1. Sistema III: Cromatografía en papel de intercambio iónico desarrollada en H₂O. (Nº de determinaciones y coeficiente de variación).

diferentes sistemas cromatográficos utilizados.

PURIFICACION DEL ^3H -TRH.- Con el propósito de trabajar con un material de pureza radioquímica elevada, cada vez que fué necesario, el TRH radioactivo se purificó por cromatografía en placa fina de sílica gel de alta eficiencia en cloroformo - metanol - amoniaco (5:3:1) (sistema I). El ^3H -TRH se aplicó en alícuotas de 3 μl en una banda de 7 cm de ancho, y junto a él se aplicaron 3 μg de TRH como estándar. La placa desarrollada se secó, se hizo un radio-barrido en el segmento con ^3H -TRH y el segmento con el estándar de TRH se reveló con reactivo de Pauli y los R_f s de ambos se comparaban, siendo siempre iguales ($R_f = 0.55$). La zona correspondiente al pico mayor de radioactividad se raspó y la sílica se eluyó con metanol acuoso al 80%, se diluyó para tenerlo a una concentración de aproximadamente 10,000 cpm/ μl y se almacenó a -20°C .

DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ^3H -TRH.- En una cromatoplaaca analítica de sílica gel se aplicó una mezcla de 25,000 cpm del ^3H -TRH purificado con 5 μg de TRH como acarreador, y se desarrolló la cromatografía en el sistema I simultáneamente con estándares de TRH, TRH-OH, ciclo-His-Pro, Glu-His-ProNH₂, His-Pro y Pro-NH₂. Una vez que se desarrolló la cromatografía, se raspó el carril del ^3H -TRH purificado en regiones de 2 cm de ancho por el largo equivalente a $0.1R_f$, las cuales se depositaron en viales de centelleo para eluir con 1 ml de metanol acuoso al 80% y contar con 10 ml de solución Bray. El resto de la cromatoplaaca se reveló con reactivo de Pauli para los compuestos que tienen histidina y con isatina para los que contienen prolina. Los R_f s de los

estándares se compararon con los picos de radioactividad. De acuerdo con este criterio, se utilizó en todos los experimentos el ^3H -Pro-TRH con pureza radioquímica de por lo menos 92%.

PROCEDIMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS DE DEGRADACION.- El ^3H -TRH purificado, se evaporó hasta sequedad con corriente de nitrógeno para eliminar totalmente el metanol y se resuspendió en solución Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) ajustándolo a una concentración de 200,000 cpm/100 μl . A continuación se sacrificaron las ratas por decapitación y se les extrajo el hipotálamo completo. Los tejidos extraídos se rebanaron con un rebanador de tejidos McIlwain (Brinkman) en cortes sagitales de espesor de 250 μm y se depositaron en viales que contenían 1 ml de solución KRB. Los hipotálamos rebanados se dispersaron suavemente pasándolos por puntas de pipetas Gilson de 1 ml y se les agregaron otros 4 ml de solución KRB para agitar horizontalmente durante 3 min a temperatura ambiente (TA). Los viales se centrifugaron por 3 min a 1800xg en una centrifuga clínica a TA, se decantó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento descrito, por dos veces más desde la dispersión del tejido. Las rebanadas de hipotálamo así lavadas se volvieron a resuspender en 0.8 ml de solución KRB y se pusieron a incubar en un baño a 37°C con atmósfera de O_2 - CO_2 (95% - 5%) por 5 min. Al tiempo 0 se adicionó a los viales 100 μl (200,000 c.p.m.) de ^3H -TRH en KRB y se incubaron durante el tiempo necesario. En los experimentos donde se utilizaron inhibidores, éstos se agregaron desde la preincubación o al inicio de la incubación según se especifique para cada caso. Una vez que terminó el tiempo de incubación, los

viales se sacaron del baño y la mezcla de incubación se pasó rápidamente a tubos Ependorff, se centrifugaron por 30 seg a 10,000xg y se separó el medio de incubación del tejido. El medio de incubación se decantó en tubos cónicos que conténian 4 ml de metanol absoluto y se guardaron a -20°C; y a los tubos con los tejidos se les agregó 1 ml de Ác. acético al 20%, se congelaron por inmersión en acetona - hielo seco y se guardaron a -20°C hasta empezar el procedimiento de análisis de los productos metabólicos del TRH.

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS

METABOLITOS DEL TRH.- Los productos de la degradación del TRH generados durante la incubación se analizaron tanto en los medios de incubación como en los tejidos. Los medios de incubación en metanol al 80% y enfriados a -20°C durante 18 hr como mínimo, se centrifugaron a 1800xg en una centrifuga clínica a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se decantó de las sales precipitadas, de cada tubo se separó una alícuota de 1.4 ml a la que se le agregaron 10 ul de una mezcla de estándares que contenía TRH (1 mg/ml), TRH-OH (2 mg/ml), Pro-NH₂ (20 mg/ml), Glu-TRH (1 mg/ml), His-Pro (2.2 mg/ml) DKP (2.5 mg/ml) y Pro (10 mg/ml) con el objeto de que sirvieran como acarreadores fríos para los metabolitos radioactivos durante el procedimiento de extracción y análisis. Este sobrenadante de los medios de incubación se evaporó hasta sequedad en un evaporador Savant.

Los tejidos congelados en Ácido acético al 20%, se descongelaron en baño de hielo para después agregarles 10 ul de la misma mezcla de acarreadores que se agregó a los medios de

incubación, a continuación se sometieron a sonicación hasta obtener una suspensión homogénea. En este momento se separaron 100 ul del homogenado para medir las proteínas. Los restantes 800 ul del homogenado se centrifugaron, se decantó el sobrenadante para extraerlo 3 veces con 10 volúmenes de éter etílico saturado con 4c. acético al 20% y se le agregaron cuatro volúmenes de metanol absoluto. La mezcla metanólica de cada tejido se enfrió a -20°C durante un mínimo de 18 hs y se centrifugó a 1800xg en una centrifuga clínica a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se decantó de los materiales insolubles y se evaporó hasta sequedad en un evaporador Savant.

Los extractos metanólicos secos de los tejidos y de los medios de incubación se resuspendieron en 50 ul de metanol acuoso al 80%, se aplicaron a cromatoplaques analíticas de sílica gel y se desarrollaron en el sistema I. Después de secar la fase móvil, la sílica de las placas se raspó en segmentos de 2 cm de ancho por el largo equivalente a $0.1 R_f$ para luego depositarla en tubos Ependorff y eluirlos con 250 ul de metanol al 80%. Una alícuota de 150 ul de cada eluado se depositó en viales de centelleo que contenían 5 ml de solución Bray para medir la radioactividad presente con un contador de centelleo líquido. Como en el sistema I la His-Pro no se separa bien de Pro y TRH-OH, ni la DKP de prolinaamida porque tienen R_f s muy parecidos, el resto de los eluados se agrupó de la siguiente forma: grupo P = $0.1 \pm 0.2 R_f$; grupo H = $0.3 \pm 0.4 R_f$ y grupo D = $0.8 \pm 0.9 \pm 1.0 R_f$ para recromatografiarlos. Las mezclas de eluados se secaron en el evaporador Savant, se resuspendieron con 50 ul de metanol absoluto

y los grupos P y D se desarrollaron en cromatoplasmas analíticas de sílica gel en isopropanol - amoníaco - agua (70:28:1) (sistema II) y el grupo H en papel de intercambio iónico con agua como fase móvil; en donde la separación de Pro y His-Pro, DKP y Pro-NH₂ y His-Pro y TRH-OH respectivamente, tiene mejor resolución. Las cromatoplasmas desarrolladas en el sistema II también se rasparon en segmentos de 2 cm de ancho por 0.1 R_f de largo, pero en esta etapa toda la sílica se depositó directamente en los viales de centelleo, se eluyó con 1 ml de metanol acuoso al 90% y se le agregó 5 ml de solución Bray para medir la radioactividad presente. El papel de intercambio iónico se recortó en segmentos de 3 cm de ancho por 0.1 R_f de largo, cada segmento se recortó en 9 fracciones que se depositaron en el vial de centelleo para eluir también con 1 ml de metanol acuoso al 90% y contar con 5 ml de sol. Bray para centelleo líquido. Los datos de los cromatogramas están expresados en % de la radioactividad total en cada carril.

R E S U L T A D O S

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.- Las diferentes variables que se estudiaron en los experimentos de inactivación del TRH por el hipotálamo de la rata fueron las siguientes:

- a) Determinación de la estabilidad del TRH durante la incubación y el procedimientos de extracción y análisis.
- b) Número de hipotálamos rebanados por tubo.
- c) Cantidad de ^3H -TRH por tubo.
- d) Tiempo de incubación.
- e) Rendimiento del procedimiento de extracción y análisis de los metabolitos.
- f) Efecto de agentes inhibidores de peptidasas en el medio de incubación.

ESTABILIDAD DEL ^3H -TRH DURANTE LAS EXTRACCIONES.- Se determinó la estabilidad del ^3H -TRH en ausencia de tejido desde la incubación en el KRB a 37°C pasando por el proceso completo de extracción hasta la cromatografía. Como se puede observar en la fig. 5, la tiroliberina permanece sin alteración alguna durante el proceso completo, ya que solamente se obtuvo un pico de radioactividad que equivale al 95% de la marca presente en la cromatoplaca.

RENDIMIENTO DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS EN EL TEJIDO.- Se hizo un seguimiento completo de la marca de ^3H en el medio y asociada al tejido después de incubar rebanadas de dos hipotálamos por tubo, durante 15 min a 37°C. En la fig. 8 se encuentra el diagrama del procedimiento de la extracción y análisis de los metabolitos y del TRH no degradado, señalando en cada etapa los porcentajes correspondientes de recuperación de la

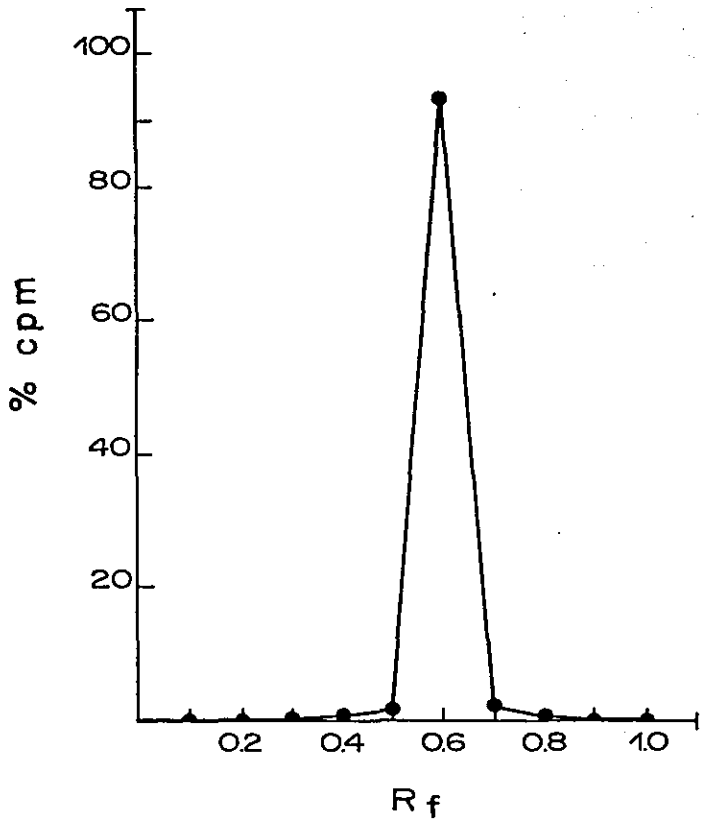


FIGURA 5.- Estabilidad del ^3H -TRH después de 30 min de incubación en 1 ml de KRB y durante el proceso de análisis.

HOMOGENADO*	265,333±47,784dpm	(16%)	(100% ² H)
A	residuo 8752±1213dpm	(12.4%)	(3.68% ² H)
SOBRENADANTE 1	255,611±40,311dpm	(15.7%)	(88.34% ² H)
B	EtOEt 11,433dpm*	(4.31% ² H)	
SOBRENADANTE 2	244,425±20,208dpm	(8.3%)	(92.12% ² H)
C	residuo 13,629±1,976dpm	(14.5%)	(5.14% ² H)
SOBRENADANTE 3	203,916±27,934dpm	(13.7%)	(76.85% ² H)
D	residuo 11,298±1,117dpm	(9.9%)	(4.26% ² H)
EXTRACTO	143,280±19,363dpm	(14%)	(53.98% ² H)
E			
² H EN EL CARRIL	80,935±14,972dpm	(18.5%)	(30.5% ² H)

FIGURA 8.- RENDIMIENTO DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION Y CROMATOGRAFIA EN EL TEJIDO. *Homogenado de las rebanadas de dos hipotálamos resuspendidas en 1 ml de AcOH después de preincubarlas 5 min e incubarlas 15 min en 1 ml de KRB con 200,000 cpm de ²H-TRH a 37°C. El homogenado se sometió a los siguiente procedimientos: **A**-centrifugación a 10,000xg; **B**-extracción con EtOEt (* No hay c.v. porque se agruparon todos los extractos); **C**-precipitación de sales con MeOH al 80% y centrifugación a 1500xg por 30 min a 4°C; **D**-evaporación hasta sequedad en equipo Savant; **E**-cromatografía en placa fina en sistema I, raspado, elusión y conteo. Los datos son promedio de 6 determinaciones ± desviación estándar. Entre paréntesis con números condensados el coeficiente de variación y con números normales el porcentaje de radioactividad asociada al tejido.

marca radioactiva; y en el cuadro 2 se encuentra un resumen de los rendimientos respectivos para el proceso. Cabe hacer notar que los datos están expresados en *dpm*, las cuales se calcularon a partir de la corrección del apagamiento por medio de la interpolación de la relación de estándar externo de las muestras en curvas de eficiencia vs. relación de estándar externo elaboradas en el mismo contador de centelleo líquido. Al final de la incubación, después de separar el tejido del medio, se encontró que el 14% de la radioactividad añadida a cada vial estaba asociada al tejido y el resto solubilizada en el medio de incubación. Durante el procedimiento de extracción de la radioactividad asociada al tejido y preparación de los extractos para ser aplicados a la cromatoplaaca se perdió el 48% de la marca original, mientras que durante el proceso de concentración del extracto metanólico de los medios se perdió el 24.7% de la radioactividad puesta a evaporar. Durante el proceso cromatográfico, raspado y elusión de cada fracción se obtuvo un rendimiento del 55.5% quedando finalmente una recuperación total de la marca radioactiva del 30.5% para los tejidos y del 42.5% para los medios de incubación.

EFEECTO DE LA GEOMETRIA DEL RECIPIENTE PARA LA INCUBACION.-

Para conocer las mejores condiciones de suspensión de las rebanadas y optimizar la interacción entre la(s) enzimas y el sustrato, se compararon los patrones de degradación obtenidos cuando se incubaron las rebanadas de dos hipotálamos en 1 ml de KRB durante 30 min a 37°C en recipientes diferentes: un vial de 20 ml con fondo plano de 2 cm de diámetro o un tubo Ependorff cónico

RADIOACTIVIDAD EN EL VIAL DE INCUBACION

(MEDIO + TEJIDO) = 100% \approx H

RADIOACTIVIDAD EN SOLIDOS Y LIQUIDOS DESPUES
DE CENTRIFUGAR AL FINAL DE LA INCUBACION

TEJIDO $14\% \pm 2.3$ (c.v.=18.4%)

MEDIO $86\% \pm 6.0$ (c.v.=8.8%)

RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCION EN EL TEJIDO

= $54\% \pm 7.2$ (c.v.=13.3%)

RENDIMIENTO DEL PROCESO DE CONCENTRACION DEL EXTRACTO
METANOLICO DE LOS MEDIOS

= 24.7 ± 8.45 (c.v.= 34.2)

RENDIMIENTO DE LA CROMATOGRAFIA (DE EXTRACTOS
PROVENIENTES DEL MEDIO O DEL TEJIDO)

= $58.5\% \pm 7.1$ (c.v.=12.8%)

RENDIMIENTO TOTAL DEL PROCESO EN EL TEJIDO

= $30.5\% \pm 5.8$ (c.v.=18.5%)

RENDIMIENTO TOTAL DEL PROCESO EN EL MEDIO

= $42.5\% \pm 4.8$ (c.v.=11.3%)

CUADRO 2.- RENDIMIENTO DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION Y ANALISIS
DE LOS TEJIDOS Y LOS MEDIOS DE INCUBACION. (Promedio de 8
determinaciones \pm desviación estándar y coeficiente de
variación c.v.).

	TEJIDO		MEDIO	
	Tubo Ependorff	vial	Tubo Ependorff	vial
% ³ H ASOCIADO	0.15	20.1	88.85	79.8
%TRH INTACTO	>0.01%	35.8±13.1	92.8±3.6	73.2±8.8
	n=2	n=5	n=2	n=8
%DKP FORMADA	>0.01%	15.8±2.4	2±1.2	11.5±3.7
	n=2	n=4	n=2	n=8

CUADRO 3.- EFECTO DE LA GEOMETRIA DEL RECIPIENTE SOBRE EL METABOLISMO DEL ³H-TRH. En cada recipiente se incubaron las rebanadas de dos hipotálamos en 1 ml de KBR a 37°C durante 30 min y se analizaron el TRH y la DKP presentes (ver Materiales y Métodos). Los datos son promedio ± d.e.

de 1.5 ml. En el cuadro 3 se puede observar que fue mínima la degradación del TRH cuando se incubó en el tubo cónico, ya que el resultado es igual al que se obtuvo cuando se incubó el ^3H -TRH sin tejido. Además, la cantidad de radioactividad asociada al tejido prácticamente no es detectable en el tubo Ependorff, mientras que con la incubación en el vial, en donde la agitación sí favorece una dispersión efectiva del tejido, se observó una desaparición importante del sustrato así como la aparición de otros picos de radioactividad que concuerdan con los parámetros de migración de los estándares.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD OPTIMA DE TEJIDO Y DE SUSTRATO RADIOACTIVO.- Como desconocíamos la magnitud de la actividad de las enzimas que catabolizan al TRH, se estudiaron las correlaciones entre la producción de la DKP que aparecía como metabolito principal (cuadro 5, pag. 58) y la desaparición del TRH con el número de hipotálamos incubados. Se compararon los porcentajes formados de DKP así como los remanentes del TRH después de incubar en 1 ml de KRB las rebanadas de 1, 2 y 3 hipotálamos a 37°C durante 30 min. En la figura 7 se presentan las gráficas de los porcentajes respectivos observados al final de la incubación tanto en el medio de como en el tejido; y en la figura 8 los mismos porcentajes corregidos por mg de proteínas. Como se puede observar, es en el tejido en donde se encontró diferencia con respecto al número de hipotálamos incubados; en el medio de incubación prácticamente no existe variación.

La cantidad mas adecuada de sustrato se determinó incubando rebanadas de dos hipotálamos con 100 000, 200 000 y 400 000 cpm de

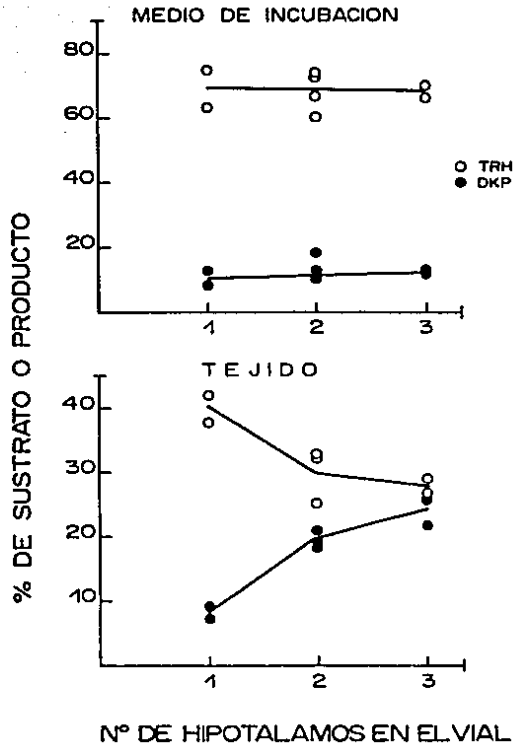


FIGURA 7.- Efecto de la cantidad de tejido. Porcentajes de sustrato y producto encontrados en el medio y en el tejido después de incubar las rebanadas de 1, 2 y 3 hipotálamos en 1ml de KRB durante 30 min a 37°C con 100.000 cpm de $^3\text{H-TRH}$ (0.82nM).

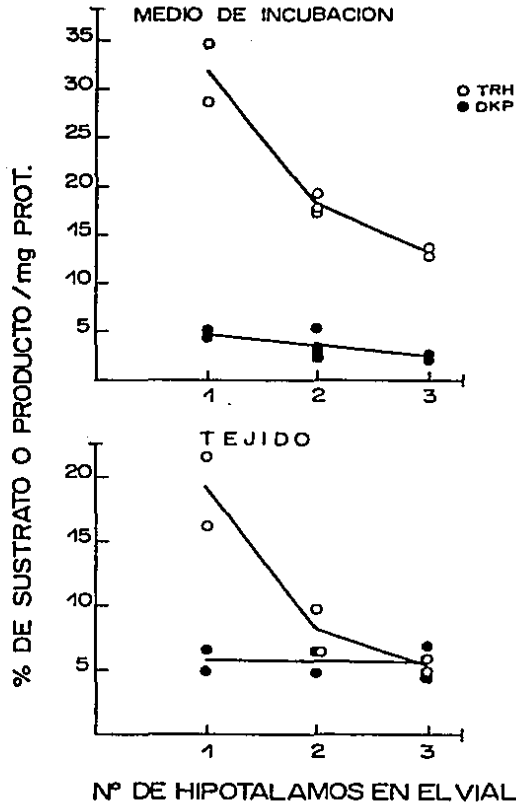


FIGURA 8.- Efecto de la cantidad de tejido. Porcentaje de sustrato o producto por mg de proteína, encontrados en el medio y en el tejido después de incubar las rebanadas de 1, 2 y 3 hipotálamos en 1 ml de KRB durante 30 min a 37°C con 100,000 cpm de ^3H -TRH (0.82 nM).

^3H -TRH (333, 666 y 999 pg de TRH respectivamente) en 1 ml de KRB durante 15 y 30 min a 37°C . Las graficas de las figuras 9 y 10 tienen los valores encontrados para cada condición tanto en el medio de incubación como en el tejido. Al igual que con la incubación de diferente número de hipotálamos, también en este caso observamos que es en el tejido donde se presentaron variaciones mas grandes con relación a la proporción de sustrato marcado y la desaparición de TRH y aparición de DKP.

En cuanto a las gráficas expresadas en porcentajes por mg de proteína hubo cambios en cuanto al valor absoluto de los datos, pero no se observaron cambios relativos significativos pues en cada una de las gráficas las pendientes de las líneas se aprecian prácticamente iguales.

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PREINCUBACION.- Con el objeto de determinar el tiempo mínimo necesario para equilibrar el tejido a 37°C se efectuaron preincubaciones de 5, 15 y 23 minutos, combinadas con 15 min de incubación. Los resultados indicaron que en el medio no hay diferencias importantes con respecto al tiempo de preincubación, pues en cualquiera de los intervalos estudiados se encontró que en el medio de incubación al t_0 el 93% de la radioactividad presente correspondía al ^3H -TRH y al final de la incubación había desaparecido el 25% del ^3H -TRH. De acuerdo con estos resultados, se decidió preincubar regularmente durante 5 min.

DEGRADACION DEL ^3H -TRH POR LAS REBANADAS DE HIPOTALAMO DE RATA.- En la figura 11 se presenta el perfil del cromatograma en el sistema I que se obtuvo después del procesamiento de extracción y

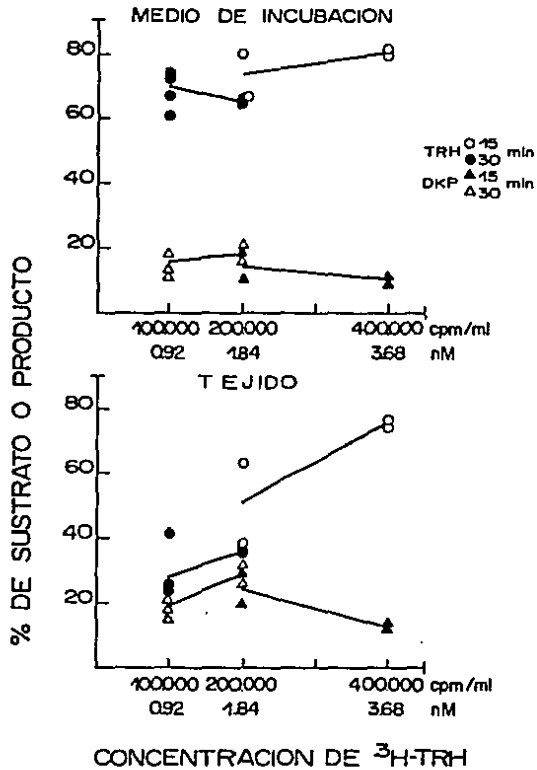


FIGURA 9.- Efecto de la concentración del TRH. Porcentaje de sustrato o producto medidos en el medio y en el tejido después de incubar con $^3\text{H-TRH}$ 0.92, 1.84 y 3.68 nM las rebanadas de dos hipotálamos en un ml de KRB durante 15 o 30 min a 37°C .

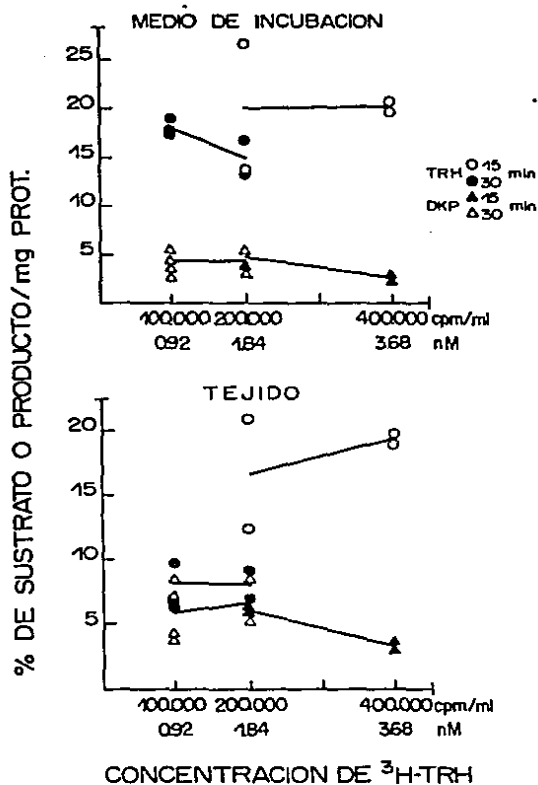


FIGURA 10.— Efecto de la concentración del TRH. Porcentaje de sustrato o producto por μM de proteína medidos en el medio y en el tejido después de incubar con $^3\text{H-TRH}$ 0.092, 1.84 y 3.68 nM las rebanadas de dos hipotálamos en 1 ml de KRB durante 15 o 30 min a 37°C .

análisis de la marca radioactiva en los tejidos y el medio, al incubar las rebanadas de dos hipotálamos con 200 000 cpm de ^3H -TRH en 1 ml de KBR durante 15 min a 37°C. En paralelo a las abscisas se marcaron los R_f s de los estándares fríos que se cromatografiaban simultáneamente con los extractos. Como se ve señalado en la figura 11, en el sistema I los R_f s de la prolina e his-pro, his-pro y TRH-OH así como de la Pro-NH₂ y DKP son muy parecidos, por lo que estos extractos se agruparon para recromatografiarlos en el sistema II y en papel de intercambio iónico como se describió en Material y Métodos. En la figura 12 se presenta el perfil cromatográfico de los grupos de marca radioactiva recromatografiados en el sistema II encontrando, que los posibles metabolitos marcados sobre la prolina que se formaron durante la incubación fueron: Pro, His-Pro, TRH-OH, DKP. Cabe hacer notar que con este diseño experimental no observamos producción de Pro-NH₂.

En los cuadros 4 y 5 se pueden ver los porcentajes del TRH y los metabolitos identificados tentativamente por su correspondencia con los parámetros de migración de los estándares incluyendo los valores determinados después de recromatografiar en el sistema II las fracciones de mala resolución en el sistema I. El cuadro 4 presenta los datos encontrados al t_0 después de 5 min de preincubación y el cuadro 5 los encontrados después de 15 min de incubación. Los datos descritos no se corrigieron por mg de proteína ya que como se mencionó anteriormente en el párrafo del estudio de las cantidades óptimas de tejido y sustrato, los resultados relativos no se ven afectados por este parámetro.

CINETICA DEL CATABOLISMO DEL ^3H -TRH. - Con el fin de determinar

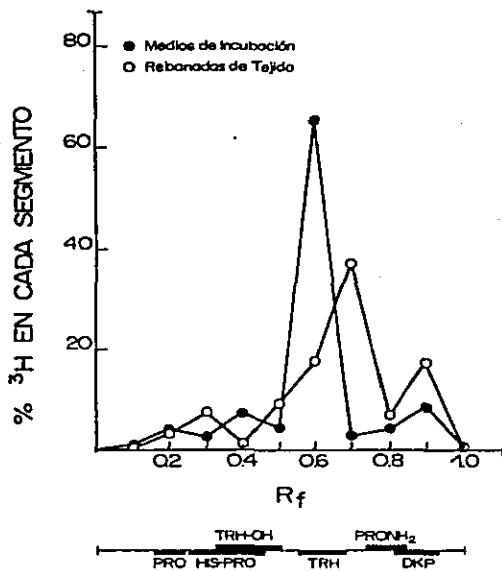


FIGURA 11.- Cromatograma característico del ^3H -TRH y sus metabolitos en el sistema I. Los compuestos fueron extraídos del medio y del tejido después de incubar las rebanadas de dos hipotálamos en 1 ml de KRB durante 90 min a 37°C .

SUSTRATO O PRODUCTO	MEDIO DE INCUBACION	T E J I D O
TRH	87.7±3.8 (10, 4.3%)	71.0±13.9 (7, 18.7%)
DKP+ProNH ₂	3.5±1.2 (10, 33.8%)	15.4±4.8 (7, 31.5%)
Pro+His-Pro	3.4±1.2 (8, 34.8%)	5.0±2.0 (6, 41.1%)
TRH-OH+His-Pro	5.2±2.8 (8, 54.6%)	5.2±1.9 (8, 36.8%)
TRH-OH	1.6±0.1 (2, 8.8%)	1.4±0.1 (2, 10.0%)
Pro	0.3±0.0 (2, 0.0%)	2.5±0.3 (2, 11.3%)
His-Pro	2.6±0.3 (2, 13.3%)	4.8±0.5 (2, 10.2%)
ProNH ₂	0.0±0.0	0.0±0.0

CUADRO 4.- PORCENTAJE DE TRH Y SUS METABOLITOS A O MIN DE INCUBACION. Rebanadas de dos hipotálamos se preincubaron a 37°C en 0.8 ml de KRB; a to se les agregaron 200,000 cpm de ³H-TRH en 0.1 ml de KRB e inmediatamente se paró la reacción. Los datos son promedio ± desviación estándar; entre paréntesis número de determinaciones y coeficiente de variación.

SUSTRATO O PRDUCIO	HEDIO DE INCUBACION	T E J I D O
TRH	72.7±8.0 (14, 8.3%)	58.2±8.1 (13, 15.7%)
DKP+ProNH ₂	13.5±3.5 (14, 26.2%)	24.7±6.7 (14, 27.2%)
Pro+His-Pro	6.7±2.6 (14, 41.5%)	9.2±3.5 (14, 38.1%)
TRH-OH+His-Pro	7.0±2.9 (14, 42.1%)	8.6±2.9 (14, 33.4%)
TRH-OH	5.0±2.4 (10, 47.5%)	1.3±0.7 (8, 55.2%)
Pro	1.7±0.7 (8, 40.2%)	8.0±2.7 (8, 34%)
His-Pro	6.8±3.0 (10, 44%)	2.8±3.1 (10, 108%)
DKP	12.7±3.3 (8, 25.5%)	28.2±8.3 (10, 23.5%)
ProNH ₂	0.0±0.0	0.0±0.0

CUADRO 5.- PORCENTAJE DE TRH Y SUS METABOLITOS A LOS 15 MIN DE INCUBACION. Rebanadas de dos hipotálamos se preincubaron 5 min en 0.8 ml de KRB; se agregaron a lo 200,000 cpm de ³H-TRH en 0.1 ml de KRB y se incubaron 15 min a 37°C. Los datos son promedio ± desviación estándar; entre paréntesis número de determinaciones y coeficiente de variación.

las velocidades de desaparición del ^3H -TRH y de aparición de sus metabolitos, se incubaron a 37°C las rebanadas de dos hipotálamos con 200 000 cpm de ^3H -TRH en 1 ml de KRB durante 0, 5, 15, 30 y 60 min. En cada punto se analizaron tanto el medio de incubación como el tejido por los tres sistemas cromatográficos que se describieron en Materiales y Métodos. Como se puede observar en la figura 13, al t_0 hay una rápida aparición de DKP en el tejido, la cual sucede tan sólo en el intervalo de tiempo (1.5 min aproximadamente) entre la adición del ^3H -TRH después de 5 min de preincubación a 37°C , la centrifugación durante 30 seg y la separación del medio para agregar el ác. acético al tejido. Este comportamiento se pudo confirmar en experimentos subsiguientes, en los que siempre se analizaron los metabolitos formados en medio KRB como control a t_0 y a los 15 min de incubación con el sustrato exógeno. Posteriormente, después de un incremento poco pronunciado pero constante hasta los 15 min, se produjo un *plateau* en la producción de la DKP en el tejido, probablemente debido a su subsiguiente degradación a His-Pro y Prolina. Dicho *plateau* también puede deberse a la posible difusión de la His-ProNH₂ al medio, o bien, a la combinación de los dos eventos. En lo que respecta a la formación de TRH-OH se observó que su presencia fué casi nula hasta los 15 min de incubación tanto en el tejido como en el medio de incubación y que es hasta después este tiempo cuando su producción es mayor.

En la fig. 14 se presenta la cinética del ^3H -TRH y sus metabolitos en el medio de incubación. En el t_0 encontramos que la radioactividad presente correspondía a TRH intacto (84%) y

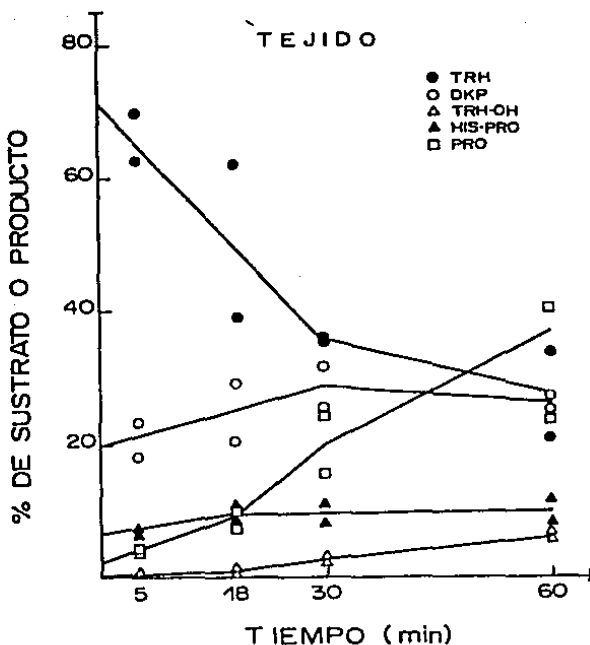


FIGURA 13.- Cinética de degradación del ^3H -TRH. Rebanadas de dos hipotálamos se lavaron tres veces por tres min con KRB. Después de 5 min de preincubación en 0.9 ml de KRB a 37°C , se agregaron 200,000 cpm de ^3H -TRH en 0.1 ml de KRB y se incubaron a 37°C . El procedimiento de la extracción del tejido se efectuó como se indica en Materiales y Métodos.

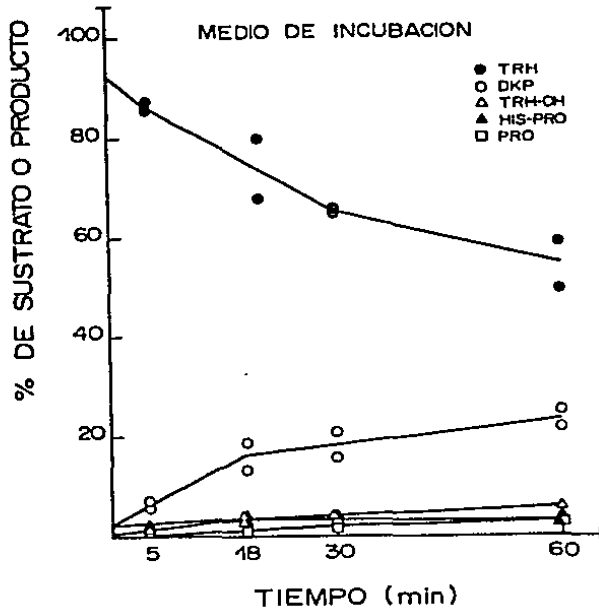


FIGURA 14.- Cinética de degradación del ^3H -TRH. Rebanadas de dos hipotálamos se lavaron tres veces por tres min con KRB. Después de 5 min de preincubación en 0.8 ml de KRB a 37°C , se agregaron 200,000 cpm de ^3H -TRH en 0.1 ml de KRB y se incubaron a 37°C . El procedimiento de la extracción del medio de incubación se efectuó como se indica en Materiales y Métodos.

posteriormente, durante la incubación el comportamiento de la desaparición del $^3\text{H-TRH}$ es muy parecido al que se observó en el tejido, aunque con una pendiente menos pronunciada en los primeros 30 minutos e igual para la segunda mitad de la incubación. También aquí la DKP fué el principal producto de degradación, aunque a diferencia del tejido, su formación se detectó después de 5 min de incubación y el *pistasu* empezó a los 18 min. Los otros metabolitos que pudimos observar en el medio de incubación fueron también el TRH-OH, la His-Pro y prolina, aunque a diferencia del tejido, en cantidades que no rebasaron el 5% para la His-Pro y prolina y ligeramente mayor del 5% para el TRH-OH solo hasta los 60 min de incubación.

EFEECTO DE INHIBIDORES DE PEPTIDASAS.- Después de definir los diferentes metabolitos del TRH formados durante la ejecución del diseño experimental descrito, se trataron de caracterizar las enzimas que llevan a efecto la degradación del TRH hasta DKP por medio del uso de agentes químicos que se sabe afectan a las enzimas que también degradan al TRH en otros sistemas experimentales. Dichos agentes fueron: piroGlu-B-naftilamida (pGBNA) 0.1mM, un sustrato fluorogénico artificial de la PGA I, inhibidor competitivo de ésta pero sin acción sobre la PGA II; bacitracina (Bac.) 2.5 mM, inhibidor de la PPCE y de la PPDA; ditioeritritol (DTE) 2 mM, agente antioxidante de grupos sulfhidrilos que es necesario para la PGA I e inhibe a la PGA II; yodoacetamida (I-Acet) 0.5 mM y 2 mM, inhibidor de las tiol-proteasas y de la PGA I; Ac. etiléndiamino tetra-acético (EDTA) 0.5 mM y 2 mM, agente quelante de iones divalentes que

requieren la PGA I y PE para su expresión máxima, pero que inhibe a la PGA II y la 1,10-orto-fenantrolina (o-Fen) 0.5 mM y 2.0 mM, que es un inhibidor muy efectivo de la PGA II. Las rebanadas de 2 hipotálamos se incubaron con 200,000 cpm de ^3H -TRH en 1 ml de KRB a 37°C durante 15 min y con los inhibidores adicionados desde la preincubación de 5 min. En los cuadros 6 y 7 se presentan los datos obtenidos después de analizar en el tejido y el medio de incubación los metabolitos formados en la presencia de los inhibidores de peptidasas arriba mencionados. Los resultados están expresados en los porcentajes relativos a los metabolitos formados cuando se incubó el tejido en KRB sin agregar otro agente químico. Con el objeto de asegurar que el EDTA, la Bac., o-Fen y I-Acet actuaran efectivamente a la concentración determinada, con estas sustancias el KRB se preparó sin Ca^{++} ni Mg^{++} y también se comparó el efecto de la ausencia de dichos metales divalentes en el medio de incubación (cuadros 6 y 7).

De los diferentes agentes estudiados, solo la o-Fen causó un marcado efecto inhibitorio en la producción de DKP, disminuyéndola en el tejido hasta en 73% y en el medio hasta en 81% de la producida en su ausencia. El resto de las sustancias estudiadas no tuvieron repercusión importante sobre la formación de la DKP.

	TRH	DKP	PRO	HIS-PRO	TRH-OH
KRB	100±15.7 (13, 15.7%)	100±27.2 (14, 27.2%)	100±34 (8, 34%)	100±80.3 (10, 80.3%)	100±55.2 (8, 55.2%)
KRB*	82.3±3.3 (2, 3.6%)	83.4±4.8 (2, 5.8%)	180±33.8 (2, 21%)	88.1±14.3 (2, 21%)	23.1±1.1 (2, 0.2%)
pGBNA	118±17.3 (6, 14.9%)	77.3±26.6 (6, 34.4%)	91.2±9.4 (4, 10.3%)	84.8±49.7 (4, 76.7%)	407±407 (4, 100%)
0.1mM					
pGBNA*	103±8.8 (4, 8.3%)	74.9±20.7 (2, 27.7%)	135±18.5 (2, 13.7%)	153±8.0 (2, 5.9%)	300±19.2 (2, 6.4%)
0.1mM					
DTE	85.7±19.2 (4, 20.1%)	118±7.2 (4, 6.2%)	8.1±0.9 (2, 10.9%)	15.5±0.3 (2, 1.7%)	23.1± 4.7 (2, 20.2%)
2mM					
EDTA*	83.3±8.8 (2, 8.9%)	102±18.4 (2, 19.1%)	158±75.7 (2, 48%)	100±43.1 (2, 43%)	30.1±5.3 (2, 17.2%)
0.5mM					
EDTA*	94.3±3.8 (2, 4.1%)	88.7±5.4 (2, 6.1%)	88.7±19.4 (2, 21.9%)	28.5±3.8 (2, 12.8%)	138±54.4 (2, 39.3%)
2mM					
pGBNA*	114±4.2 (2, 3.7%)	78.1±10.9 (2, 13.9%)	102±1.5 (2, 1.5%)	132±10.8 (2, 8%)	69.2±3.2 (2, 4.7%)
+Bac. °					
o-Fen*	132±7.2 (2, 5.3%)	28.7±1.1 (2, 4%)	13.5±2.2 (2, 16.4%)	15.5±3.7 (2, 23.6%)	53.8±5.1 (2, 9.4%)
0.5mM					
o-Fen*	111±12.7 (2, 11.4%)	58.7±2.5 (2, 4.5%)	43.5±16.6 (2, 37.9%)	45.3±27.5 (2, 60.6%)	200±123 (2, 61.4%)
2mM					
I-Acet*	110±8.8 (6, 7.8%)	81.4±13.9 (8, 17.1%)	108±52.8 (4, 49.5%)	25.9±8.2 (4, 31.6%)	108±80.9 (4, 56.6%)
0.5mM					
I-Acet*	89.1±12.1 (2, 12.2%)	86.6±13.2 (2, 15.2%)	54.4±13.3 (2, 24.4%)	22±5.5 (2, 25%)	115±28.3 (2, 22.8%)
2mM					

CUADRO 6.- EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA PRODUCCION DE METABOLITOS DEL ^3H -TRH EN EL TEJIDO. Se presentan los porcentajes de los metabolitos encontrados en el tejido en la presencia de agentes químicos con relación a los formados en ausencia de ellos. En presencia de los agentes químicos indicados, las rebanadas de dos hipotálamos fueron preincubadas por 5 min e incubadas 15 min a 37°C con 200,000 cpm de ^3H -TRH en 1 ml de KRB. *El agente químico se agregó solo durante la incubación. °El KRB no tenía Ca^{++} ni Mg^{++} . °La pGBNA fué 0.1mM y la bacitracina 2.5mM. Entre paréntesis número de determinaciones y coeficiente de variación.

	TRH	DKP	PRO	HIS-PRO	TRH-OH
KRB	100±8.3 (14, 8.3%)	100±25.9 (14, 26.2%)	100±41.2 (8, 40.2%)	100±44.1 (10, 44%)	100±48 (10, 47.5%)
KRB+	94.5±0.5 (2, 0.6%)	101±11.9 (2, 11.3%)	84.1±10.6 (2, 12.9%)	200±38.2 (2, 19%)	52.8±1.0 (2, 2%)
pGBNA	103±9.6 (, 9.4%)	77.7±22.2 (8, 28.2%)	76.5±41.2 (4, 53.3%)	126±69.1 (4, 54.5%)	124±20 (4, 16.7%)
0.1mM					
pGBNA*	99.7±1.4 (2, 1.5%)	82.2±25.2 (2, 40.4%)	112±23.5 (2, 22.3%)	182±35.3 (2, 19.4%)	140±4 (2, 3%)
0.1mM					
DTE	108±5.7 (6, 5.4%)	56±18.3 (6, 28.9%)	84.7±8.2 (4, 12.8%)	100±50 (4, 50.4%)	182±32 (4, 19.2%)
2mM					
EDTA+	107±4 (2, 3.7%)	72.6±9.6 (2, 13%)	121±11.8 (2, 10.3%)	128±8.8 (2, 6.6%)	64±2.8 (2, 4.4%)
0.5mM					
EDTA+	90.6±4.3 (2, 4.7%)	72.6±6.3 (2, 8.7%)	132±0.2 (2, 15.7%)	200±31.2 (2, 15.6%)	186±22 (2, 13.6%)
2mM					
pGBNA+	100±3.8 (2, 3.3%)	81.5±1.5 (2, 2.5%)	88.2±21.2 (2, 24.5%)	209±58.8 (2, 28.1%)	56±8 (2, 13.3%)
+Bac.°					
o-Fen+	122±0.7 (2, 0.6%)	18.9±1.6 (2, 8.3%)	19.4±2.4 (2, 10.7%)	70.6±4.1 (2, 5.9%)	98±5.8 (2, 5.9%)
0.5mM					
o-Fen+	112±1.5 (2, 1.3%)	36.3±5.3 (2, 14.4%)	35.3±16.5 (2, 47.1%)	81.6±7.2 (2, 8.5%)	110±10 (2, 8.9%)
2mM					
1-Acet+	102±9.1 (8, 8.9%)	69.6±12.6 (7, 17.9%)	106±35.3 (5, 33.3%)	181±135 (5, 74.9%)	118±28 (5, 23.1%)
0.5mM					
1-Acet+	80.2±1.6 (2, 1.8%)	92.6±7.4 (2, 8.0%)	70.6±27.1 (2, 38%)	254±119 (2, 46.8%)	144±44 (2, 30%)
2mM					

CUADRO 7.- EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA PRODUCCION DE METABOLITOS DEL ³H-TRH EN EL MEDIO DE INCUBACION. Se presentan los porcentajes

de los metabolitos encontrados en el medio en la presencia de agentes químicos con relación a los formados en ausencia de ellos. En presencia de los agentes químicos indicados, las rebanadas de dos hipotálamos fueron preincubadas por 5 min e incubadas 15 min a 37°C con 200,000 cpm de ³H-TRH en 1 ml de KRB.

*El agente químico se agregó solo durante la incubación. °El KRB no tenía Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺. °La pGBNA fué 0.1mM y la bacitracina 2.5mM. Entre paréntesis número de determinaciones y coeficiente de variación.

DISCUSSION

El uso de rebanadas de tejido cerebral para el estudio multidisciplinario de la función sináptica es una técnica complementaria que permite el estudio de mecanismos de interacciones intercelulares (Yamamoto y Mc Ilwain 1986). Las rebanadas del tejido son transferidas dentro de un ambiente artificial como unidades funcionales intactas en las cuales permanece organizada entre sí la complicada herramienta celular, las conexiones entre las neuronas y las de entre las células nerviosas y gliales. Probablemente la ventaja más importante de la técnica de rebanadas, y tal vez la que añade una nueva dimensión a la estrategia experimental, es que permite el acceso al *milieu* interno del cerebro. El uso de esta metodología permite correlacionar niveles fisiológicos, bioquímicos y anatómicos bajo condiciones controladas (Lynch y Schubert 1980).

En el trabajo que aquí hemos descrito, utilizamos rebanadas de tejido hipotalámico que permiten un estudio integral de la degradación del TRH además de que hasta donde sabemos no se ha utilizado previamente para este problema en particular.

Como se puede observar en la figura 5 (pág. 43), el sustrato trazador permaneció estable hasta por 30 minutos de incubación y durante el proceso completo de la extracción y análisis, lo cual garantiza que los cambios observados cuando se encontraba en la presencia del tejido se debieron precisamente a la acción de éste sobre el TRH. Además, resultó evidente que para que el sustrato pudiera interactuar con el tejido se requieren de condiciones de dispersión eficientes, ya que cuando el tejido se depositó en tubos Ependorff de fondo cónico, el tripéptido no sufrió ninguna

alteración ni siquiera después de 30 minutos de incubación (Cuadro 3, pág. 47).

Como el ^3H -TRH que utilizamos está marcado en el anillo de prolina, el único metabolito que no pudimos detectar fué la histidina, sin embargo, la Pro-NH₂ que sí podríamos detectar, no la observamos con éste sistema de rebanadas hipotalámicas, ni siquiera después de 60 min de incubación ni en el medio ni en el tejido en ninguno de los experimentos efectuados (Cuadros 4 y 5, págs. 57 y 58). Aunque la prolinamida se ha propuesto como metabolito directo del TRH (Kreider et al. 1981), no se ha descrito hasta la fecha una enzima que actúe sobre él y lo divida en <Glu-his + Pro-NH₂. En los reportes donde detectaron este último compuesto después de incubar ^3H -TRH con fracciones particuladas y extractos de cerebro (Matsui et al. 1979 y Bauer y Lipmann 1976), se propone que es un producto secundario de la degradación del TRH, constituyendo junto con la prolina, los productos de mayor proporción en dichas preparaciones. Aparentemente, la HPL asociada a la fracción particulada de cerebro de cerdo no se encuentra en la porción soluble de cerebro de cobayo ni en las fracciones particuladas y solubles de adenohipófisis de rata (Bauer y Kleinkauf 1980, Browne y O'Quinn 1983) pues en ninguno de estos casos se ha detectado la prolinamida entre los otros metabolitos del TRH. Como tampoco la pudimos ver en las rebanadas de hipotálamo de rata, esto indica que aunque la enzima pudiera estar en el hipotálamo, no puede degradar apreciablemente a la his-pro-NH₂, ya sea porque no tiene acceso al sustrato si se encuentra dentro de la célula, o bien, porque aunque estuviera

presente en la membrana plasmática pudiera tener propiedades cinéticas tales que no le permiten manifestarse en nuestras condiciones experimentales o porque tenga que competir con otra enzima más efectiva y mejor ubicada (como podría ser la PPDA).

Ya que las condiciones en las que se efectuaron los experimentos descritos no son las adecuadas para que el TRH se internalice en las células (Charli et al. 1984), en el sistema de rebanadas aquí descrito, el ^3H -TRH pudo haber sido degradado por enzimas solubles liberadas de células rotas o secretadas activamente por células vivas, o también por enzimas membranales extracelulares o intracelulares expuestas al sustrato por la ruptura de las células durante los cortes del tejido.

Como se mencionó previamente, la PPCE es una enzima soluble muy estable, por lo tanto, la producción de TRH-OH nos puede servir de indicador de la posible contaminación soluble. Como puede verse en la cinética de las figuras 13 y 14 (págs. 80 y 81) el TRH-OH se presenta en cantidades despreciables desde el inicio del contacto del sustrato con el tejido hasta los 18 minutos de incubación, lo cual indica que en la preparación experimental no hay una presencia importante de peptidasas solubles hasta ese momento y sugiere que los eventos detectados en el tejido durante los primeros minutos de la incubación se deben principalmente a enzimas membranales. Después de los 18 min de incubación, la cantidad de TRH-OH se va incrementando paulatinamente, constituyendo a los 60 min una proporción mayor (17% de la radioactividad asociada al tejido), lo que nos habla más bien del deterioro de las células conforme pasa el tiempo, el cual se

manifiesta con la destrucción de la membrana plasmática que, probablemente rota, permite el flujo en ambos sentidos de lo que se encuentre dentro y fuera de la célula. Por otra parte, como con tiempos de preincubación prolongados tampoco hubo un cambio significativo en la proporción de DKP formada ni un incremento importante en la producción de TRH-OH, podemos reforzar la evidencia de contar con un sistema con muy poca contaminación soluble en los primeros minutos de incubación. Esta observación se ve reforzada también por los resultados que se muestran en la fig. 14 (pág. 81), en la que se presentan las pequeñas cantidades del TRH-OH (3.4%) y de los dos metabolitos secundarios His-Pro y Pro (3.5% y 1% respectivamente) que se encontraron en el medio de incubación a los 18 min.

En los que respecta a la DKP es importante hacer notar que con este diseño experimental fue consistentemente el principal metabolito del ^3H -TRH. La cinética de la producción de la DKP (figs. 13 y 14, págs. 80 y 81) mostró la inmediata aparición de este metabolito en el tejido desde el momento en que el ^3H -TRH hizo contacto con ellos, sugiriendo que la enzima se encuentra en condiciones óptimas para interactuar con el sustrato y, como arriba se mencionó que en ese momento no se observó la presencia de peptidasas solubles, se propone que es la PGA II (la metaloproteasa membranar) la que se manifiesta en nuestro sistema experimental. Después de iniciada la incubación, en el tejido continúa la producción de DKP con una pendiente poco pronunciada hasta los 18 min, después de los cuales permanece en proporciones casi constantes hasta los 60 min, debido probablemente a la

desnaturalización de la PGA II y/o al deterioro de las células. Mientras que en el medio de incubación la aparición de la DKP fué mas pronunciada hasta los 18 min, después de los cuales también siguió aumentando pero con una pendiente menor que al principio, de tal forma que en los primeros minutos conforme se iba produciendo por el tejido se iba eliminando en el medio de incubación y después de los 18 minutos la enzima del tejido ya no estaba muy activa o ya se encontraban presentes enzimas solubles que las células vivas pudieron secretar o que las células deterioradas pudieron liberar que metabolizaron al $^3\text{H-TRH}$ y/o a la His-Pro-NH₂ y que tienen diferentes propiedades cinéticas.

En referencia a la cinética de la His-Pro, este dipéptido se inició en el tejido en proporciones modestas, aunque mayores que las del TRH-OH, presentó un ligero aumento hasta los 18 min de incubación manteniéndose así hasta los 30 min después de los cuales disminuyó también ligeramente. Esta proporción tan estable durante la segunda mitad de la incubación se debió posiblemente a la desnaturalización de las enzimas PGA y PPDA y/o al deterioro de las células. Como se mencionó anteriormente, la PPDA es la enzima que actúa sobre la His-Pro-NH₂ generando a la His-Pro (fig. 3, pág. 21) y también se han descrito dos enzimas con esta función, una soluble (Browne y O'Cuinn 1983) y otra membranal (O'Connor y O'Cuinn 1988; Torres et al. 1988), por lo que el hecho de que en nuestro sistema experimental se haya observado también este metabolito desde el inicio de la incubación cuando no encontramos señales de la presencia de peptidasas solubles, es consistente con la propuesta de que en nuestras condiciones los

efectos observados al inicio de la incubación sobre el metabolismo del TRH se deben a la acción de enzimas en la membrana plasmática. Además de que en el medio de incubación se mantuvo en proporciones muy bajas y constantes hasta los 80 min.

La prolina formada en el tejido fue el segundo metabolito en cuanto a cantidad. La cinética en el tejido presentó un constante incremento desde los 5 hasta los 80 min de incubación, pero en el medio su presencia siempre fue en proporciones muy pequeñas aún al final del periodo de incubación. Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que la presencia de Pro se debe a la acción de la PD (fig. 3, pág. 21), enzima que hasta donde sabemos, ha sido purificada parcialmente y caracterizada de fracciones solubles de cerebro y adenohipofisis (Browne y O'Cuinn 1983, y Bauer y Kleinkauf 1980) y no se ha detectado en fracciones membranales, así que el haberla observado en nuestro sistema de rebanadas asociada principalmente al tejido y en proporciones mayores a las del TRH-OH es un hallazgo que consideramos requiere de investigaciones subsiguientes que profundicen sobre la PD y el catabolismo de la His-Pro.

Como se puede observar en los cuadros 6 y 7 (págs. 64 y 65) la adición desde la preincubación o en la incubación exclusivamente de inhibidores o competidores de las peptidasas como el pGBNA, no produjo resultados significativamente diferentes, por lo que con el resto de inhibidores los experimentos se efectuaron añadiendo la sustancia en estudio desde la preincubación. (Resultados semejantes se obtuvieron con bacitracina y DTE, aunque no se encuentren los datos en los cuadros 6 y 7).

Cuando se incubo el tejido en KRB sin Ca^{++} ni Mg^{++} y/o se agregaron a la mezcla de incubación inhibidores o competidores de la PGA I como la 2 - yodoacetamida 0.5 y 2 mM (Browne y O'Cuinn 1989), pGBNA 0.1 mM (Bauer y Nowak 1979, Kreider et al. 1981), EDTA 0.5 y 2 mM , DTE 2 mM (Garat et al. 1988) y de la PPCE como bacitracina 2.5 mM sola o en combinación con pGBNA 0.1 mM encontramos que en lugar de observar un aumento considerable en la cantidad de 3H -TRH intacto y una disminución muy marcada en la producción de TRH-OH, His-Pro y DKP, no hubieron tales cambios y opuestamente a lo esperado aumentaron las proporciones de TRH-OH o His-Pro. Sin embargo, cuando se usó 1,10-o-fenantrolina, que está descrito que es un inhibidor muy efectivo de la PGA II (Lee et al. 1981), encontramos que la producción de DKP disminuyó considerablemente tanto en el tejido como en el medio (71% y 81% respectivamente) a la concentración 0.5 mM y en 43% y 64% para el tejido y el medio respectivamente en la concentración 2 mM.

Los resultados presentados en este trabajo apoyan fuertemente la propuesta de que la PGA II es la enzima responsable de la inactivación biológica del TRH en el hipotálamo. Aunque con este diseño experimental no se puede excluir la posibilidad de que la enzima se encuentre en la cara interna de la membrana plasmática, se consideró muy factible que la enzima se localice en la cara externa, ya que actualmente se acepta que las neuropeptidasas membranales son las encargadas de la inactivación extracelular de neuropéptidos, como ha sido demostrado para la encefalinaasa (Schwartz et al. 1981, Patey et al. 1981, Checler et al. 1984). Estos datos sirvieron de base para futuras exploraciones sobre la

localización extracelular de la PGA II y durante el intervalo de tiempo entre la generación de toda la información presentada aquí y la integración de ésta tesis, en este laboratorio se continuaron los estudios relacionados con los mecanismos de inactivación extracelular del TRH. Debido a que las rebanadas representaban un modelo cuya interpretación de los datos no era concluyente, se utilizaron estrategias experimentales más complicadas y costosas. Así que se prepararon células en cultivo y sinaptosomas, en los cuales al ser permeabilizados, homogenizados o solubilizados, la actividad de la PGA II no tuvo un incremento significativo en comparación con la actividad en las células o sinaptosomas intactos; mientras que el tratamiento con tripsina de las células o los sinaptosomas sí eliminó entre el 70 y 80% de la actividad enzimática, por lo que se concluye que efectivamente la PGA II es una ectoenzima, es decir, que está embebida en la membrana plasmática con el sitio activo localizado extracelularmente aunque en este momento no se pueda definir si está en la membrana pre- o postsináptica (Charli et al. 1989). Además, por su alta especificidad se considera como la primera enzima específica de un neuropéptido (Wilk 1988), pues presenta una distribución muy heterogénea en las diferentes regiones del cerebro de la rata (Vargas et al. 1987) lo cual le asigna una función muy definida. Finalmente, en rebanadas de hipotálamo, un inhibidor específico de la PGA II la N-carboxil - feniletil - His-naftilamida, produce un importante aumento en la recuperación del TRH liberado *in vitro* basalmente y por estimulación (Charli et al. 1989).

En cuanto a las enzimas solubles PGA I y PE, utilizando inhibidores específicos de éstas, se demostró que la recuperación del TRH liberado *in vitro* de rebandas de hipotálamo no se ve modificado, por lo que se demuestra que estas enzimas no parecen estar involucradas en el control de los niveles intra- o extracelulares del TRH (Charl; et al. 1987).

En conclusión, podemos afirmar que la información suministrada en este trabajo sirvió de base para colocar a la PGA II como la enzima responsable de la inactivación del TRH en las sinapsis hipotalámicas TRHérgicas.

BIBLIOGRAFIA

1.- Andrews, P. C., Dieter, M. C. y Dixon, J. E. (1982). Immunochemical characterization of a proline endopeptidase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 257, 5861-5865.

2.- Barnea, A., Ben-Johnatan, N., Colston, C., Johnston, J.M. and Porter J. C. (1975) Differential subcellular compartmentalization of thyrotropin releasing hormone (TRH) and gonadotropin releasing hormone (LRH) in hypothalamic tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 72: 3153-3159.

3.-Barr, M. L. (1972) Diencephalon. En: *The Human Nervous System. An Anatomical View Point: 187-193.* Harper & Row, Publishers, Inc. New York, N.Y.

4.- Bassiri, R. M. y Utiger, R. D. (1972) Thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 84: 188-197.

5.- Bauer, K. (1974) Degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH). Its inhibition by $\langle \text{Glu-His-OCH}_3 \rangle$ and the effects of the inhibitor in attempts to study the biosynthesis of TRH. En: *Lipmann Symposium: Energy, Biosynthesis and Regulation in Molecular Biology:* 53-62. Gruyter, Berlin.

6.- Bauer, K. (1976) Regulation of degradation of thyrotropin hormone by thyroid hormones. *Nature* 258, 591-593.

7.- Bauer, K. y Lipmann, F. (1976) Attempts toward biosynthesis of the thyrotropin-releasing hormone and studies on its breakdown in hypothalamic tissue preparations. *Endocrinology* 88: 230-242.

8.- Bauer, K. (1977) TRH Degradation. Possible physiologic role of the enzymes that degrade neuropeptides. En: *Colloques*

Internationaux des C.N.R.S. N. 280. Biologie Cellulaire des Processus Neurosécrétoires Hypotalamiques. Chapter 29.

9.- Bauer, K., Graf, K. J., Falvre-Baumann, A., Boier, S., Tixier-Vidal, A. y Kleinkauf, H. (1978) Inhibition of prolactin secretion by histidyl-proline-diketopiperazine. *Nature (London)* 274: 174-175.

10.- Bauer, K. y Nowak, P. (1979) Characterization of the serum enzyme that degrade TRH by its hydrolysis in <Glu-his bond. *Eur. J. Biochem.* 99: 239-248.

11.- Bauer, K. y Kleinkauf, H. (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohipophyséal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106: 107-117.

12.- Bennett, G. W., Edwardson, J. A., Holland, D., Jeffcoate, S.L. y White, N. (1975) Release of immunoreactive luteinising hormone-releasing hormone and thyrotrophin-releasing hormone from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 257: 323-324.

13.- Bennett, G.W., Sharp, T., Brazell, M. y Marsden, C.A. (1983) TRH and catecholamine neurotransmitter release in the central nervous system. In: *Thyrotrophin-Releasing Hormone*, edited by E.C. Griffiths y G.W. Bennett, Raven Press, New York, pp. 253-289.

14.- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y. y Schally, A. V. (1969) The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotrophin releasing hormone and pyroglutamyl - histidyl - proline amide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 705-710.

15.- Braitman, D. J., Auker, C. R. y Carpenter, D. G. (1980) Thyrotrophin-releasing hormone has multiple actions in cortex.

Brain Res. 194: 244-248.

16.- Brown, M., Rivier, J. y Vale, W. (1977) Actions of bombesin, thyrotropin releasing factor, prostaglandin E₂ and naloxone on thermoregulation in the rat. *Life Sci.* 20: 1881.

17.- Browne, P. y O'Cuinn, G. (1983) An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyrotiberin *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 137: 75-87.

18.- Brownstein, M. J., Palkovits, M., Saavedra, J. M., Bassiri, R. M. y Utiger, R. D. (1974) Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 185: 265-267.

19.- Brownstein, M. J., Utiger, R. D., Palkovits, M. y Kizer, J. S. (1975) Effect of hypothalamic deafferentation on thyrotropin-releasing hormone levels in rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 4177-4178.

20.- Burt, D. R. y Taylor, R.L. (1980) Binding sites for thyrotropin - releasing hormone in sheep nucleus accumbens resemble pituitary receptors. *Endocrinology* 108, 1416-1423.

21.- Charli, J. L., Cruz, C., Vargas, M. A. y Joseph-Bravo, P. (1988) The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* en prensa.

22.- Charli, J. L., Joseph-Bravo, P., Palacios, J. M. y Kordon, C. (1978) Histamine - induced release of thyrotropin releasing hormone from hypothalamic slices. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 401-403.

23.- Charli, J. L., Ponce, G., McKelvy, J. F. y Joseph-Bravo, P. (1984) Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 42, 881-886.

24.- Charli, J. L., Méndez, M., Joseph-Bravo, P. y Wilk, S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 8: 373-378.

25.- Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. (1974) The steps of synaptic transmission. En: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* Oxford University Press, New York. pp. 38-41.

26.- Coppen, A., Montgomery, S., Peet, M., Bailey, J., Marks, V. y Woods, P. (1974) Thyrotropin - releasing hormone in the treatment of depression. *The Lancet*, 2: 433-434.

27.- Checler, F., Emsen, P.C., Vincent J.P. y Kitabgi, P. (1984) Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro¹⁰-Tyr¹¹ bond by endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) and a peptidase different from Prolinase-Endopeptidase. *J. Neurochem.* 43: 1295-1301.

28.- Donlon, J., Hayes, D. J. y O'Cuinn, G. (1980) Partial purification and characterization of a thyroliberin deamidase from guinea - pig brain. *Biochem. Soc. Transactions* 8: 424.

29.- Dresdner, K., Barker, L. A., Orłowski, M. y Wilk, S. (1982) Subcellular distribution of prolyl - endopeptidase and neutral endopeptidase cations sensitive in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38, 1151-1154.

30.- Dyess, E. M., Segerson, T. P., Liposits, Z., Paull, W.K., Kaplan, M.M., Wu, P., Jackson, I.M.D. y Lechan, R. M. (1988)

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

Tritiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 123: 2281-2287.

31.- Emerson, Ch.H. y Wu, Ch. F. (1987) Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. *Endocrinology* 120: 1215-1217.

32.- Friedman, T. C., Orłowski, M. y Wilk, S. (1984). Peptide - degrading enzymatic activities in GH₃ cells and rat anterior pituitary homogenates. *Endocrinology*, 114: 1407-1412.

33.- Friedman, T. C. y Wilk, S. (1986) Delineation of a particulate thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptide hidrolase. *J. Neurochem.* 48, 1231-1238.

34.- Gainer, H., Sarne, Y. y Brownstein, M.J. (1977) Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophysial proteins and peptides. *J. Cell Biol.* 73: 386-381.

35.- Garat, B., Miranda, J., Charli, J.L. y Joseph-Bravo, P. (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 8: 27-40.

36.- Grosvenor, C.E. y Mens, F. (1980). Evidence that thyrotropin - releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107: 863 - 868.

37.- Halász, B. (1978) Functional anatomy of the hypothalamus. In: *Pharmacology of the Hypothalamus*, Cox, B., Morris, I. D. y Weston A. H. eds. University Park Press. Baltimore, Maryland, págs. 5-30.

38.- Harkness, D. H. y Brownfield, M. (1986) Segmental distribution of thyrotropin releasing hormone in rat spinal cord. *Brain Res. Bull.* 117: 11-18.

39.- Hersh, L. B. y McKelvy, J. F. (1978) Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in bovine brain. *Brain Res.* 168: 553-584.

40.- Hersh, L. B. (1981) Immunological, physical and chemical evidence for the identity of brain and kidney PPCE. *J. Neurochem.* 37, 172-178.

41.- Jackson, I. M. (1980) TRH in the rat nervous system: identity with synthetic TRH on high performance liquid chromatography following affinity chromatography. *Brain Res.* 201: 245-248.

42.- Jackson, I.M.D., Wu, P. y Lechan, R. M. (1985) Immunohistochemical localization in the rat brain of the precursor for thyrotropin - releasing hormone. *Science* 228: 1087-1089.

43.- Joseph-Bravo, P., Charli, J. L., Palacios, J. M. y Kordon, C. (1978a) Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin - releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104: 801-808.

44.- Joseph-Bravo, P., Loudes, C., Charli, J. L. y Kordon, C. (1978b) Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* 168: 321-328.

45.- Kordon, F., Marcus, R.J., Winokur, A. y Utiger, R.D. (1977) Thyrotropin - releasing hormone content of rat brain and

hypothalamus: results of endocrine and pharmacologic treatments. *Endocrinology* 100, 1604-1608.

46.- Kizer, S., Palkovits, M., Tappaz, M., Kebabian, J. y Brownstein, M. J. (1976) Distribution of releasing factors, biogenic amines, and related enzymes in the bovine Median Eminence. *Endocrinology* 98: 885-895.

47.- Koida, M. y Walter, R. (1976) Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 321: 7583-7589.

48.- Kreider, M. S. Winokur, A. y Krieger, N. R. (1981) Pathways of TRH degradation in rat brain. *Neuropeptides* 1: 455-483.

49.- Lechan, R. M. y Jackson, I.H.D. (1982) Immunohistochemical localization of thyrotropin - releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111: 55-65.

50.- Lechan, R. M., Wu, P. y Jackson, I.H.D. (1986a) Immunolocalization of the thyrotropin - releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 119, 1210-1216.

51.- Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I.H.D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G. y Goodman, R.H. (1986b) Thyrotropin - releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231: 158-161.

52.- Lee, Ch., Sandberg, B.E.B., Hanley, M. R. and Iversen L. L. (1981) Purification and characterisation of a membrane-bound substance-P-degrading enzyme from human brain. *Eur. J. Biochem* 114, 315-327.

53.- Lowry, O.H., Rosenbrough N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

54.- Lynch, G. y Schubert, P. (1980) The use of in vitro brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 1 - 22.

55.- Maeda, K. y Frohman, L.A. (1980) Release of somatostatin and TRH from rat hypothalamic fragments in vitro. *Endocrinology* 106: 1837-1842.

56.- Matsui, T., Prasad, Ch. y Peterkofsky, A. (1979) Metabolism of thyrotropin releasing hormone in brain extracts. Isolation and characterization of an imidopeptidase for histidylprolineamide. *J. Biol. Chem.* 254: 2438 - 2445.

57.- McKelvey, J.F., Lin, C. J., Chan, L., Joseph-Bravo, P., Charli, J. L., Pacheco, M., Paulo, M., Neale, J. y Barker, J. (1979) Biosynthesis and degradation of peptides in the nervous system. En: *Brain Peptides: A New Endocrinology*. Gotto, A. M. Jr., Perck, E. J. Jr. y Baid, A. E., eds. pp. 183-188, Elsevier, Amsterdam.

58.- McKelvey, J. F., Krause, J. E. y Advis, J. P. (1982) Neuropeptide degradation. En: *Molecular Genetic Neuroscience*, 189-188. Schmitt, F. O., Bird, S. J. y Bloom, F. E., eds. Raven Press, New York.

59.- Méndez, M., Cisneros, M. R., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. (1988) Papel de la piroglutamato aminopeptidasa II en la inactivación de TRH liberado en el sistema nervioso central. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Agosto 14-18,

Querétaro, Gro. México.

80.- Méndez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M., Vargas, M. A. y Charli, J. L. (1987) Regional distribution of *in vitro* release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-298.

81.- Mitnick, M. y Reichlin, S. (1971) Thyrotropin releasing hormone biosynthesis by rat hypothalamic fragments *in vitro*. *Science* 172: 1241-1243.

82.- Montoya, E., Seibel, M.J. y Wilber, J. F. (1975) Thyrotropin - releasing hormone secretory physiology: studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology* 88: 1413-1418.

83.- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1984) Localization of a narrow - specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278.

84.- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1985) Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150: 47 - 52.

85.- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1986) Post-proline dipeptidyl-aminopeptidase from synaptosomal membranes of guinea - pig brain. *Eur. J. Biochem.* 154: 329-335.

88.- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1987a) Distribution of soluble and synaptosomal membrane-bound forms of thyroliberin - hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase and of post-proline dipeptidyl aminopeptidase activities in various functional regions

of guinea-pig brain. *Biochemical Society Transactions* 15: 303-304.

67.- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. (1987b) Active site studies on a narrow-specificity thyroliberin hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase purified from synaptosomal membrane of guinea - pig brain. *J. Neurochem.* 48: 676-680.

68.- Oliver, Ch., Eskay, R.L., Ben-Jonathan, N. y Portar, J.C. (1974) Distribution and concentration of TRH in the rat brain. *Endocrinology* 95: 510-516.

69.- Pacheco, M.F., McKelvy, J.F., Woodward, D.J., Loudes, C., Joseph-Bravo, P., Krulich, L. y Griffins, S.T. (1981) *Peptides* 2: 277-282.

70.- Parker Jr., C. R., Neaves, W. B., Barnes, A. y Porter, J. C. (1977) Studies on the uptake of (³H)thyrotropin-releasing hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. *Endocrinology* 101: 66-75.

71.- Patey, G., De la Baume, S., Schwartz, J. C., Gros, C., Roques, B., Fournie-Zaluski, M.-C. y Soroca-Lucas, E. (1981) Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science* 212: 1153-1155.

72.- Plotnikoff, N.P., Prange, A. J., Bresse, G. R., Anderson, M. S. y Wilson, I. C. (1972) Thyrotropin releasing hormone: enhancement of Dopa activity by a hypothalamic hormone. *Science* 178: 417-418.

73.- Ponce, G., Charli, J. L., Pasten J. A., Aceves, C. y Joseph-Bravo, P. (1988) Tissue specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones.

Neuroendocrinology. 4B: 211-213.

74.- Prange, A.J. Jr. y Wilson, I.C. (1972) Some behavioral effects of natural and synthetic polypeptides in animals and man.

Psychopharmacology 28: 82.

75.- Prasad, Ch., Mori, M., Pierson, W., Wilber, J.F. y Edwards, R. M. (1983) Developmental changes in the distribution of rat brain pyroglutamate aminopeptidase, a possible determinant of endogenous cyclo(his-pro) concentrations. *Neurochemical Research*, 8: 388-398.

76.- Prasad, Ch. y Jayaraman, A. (1986) Metabolism of thyrotropin - releasing hormone in human cerebrospinal fluid. Isolation and characterization of pyroglutamate aminopeptidase activity. *Brain Res.* 384: 331-337.

77.- Reichlin, S. (1988) Control of thyrotropic hormone secretion. En: *Neuroendocrinology* 1: 445-538 L. Martini, y W.F. Ganong, eds. Academic Press, New York.

78.- Renaud, L.P. y Martin, J.B. (1975) Thyrotropin releasing hormone (TRH): depressant action on central neuronal activity. *Brain Res.* 88: 150-154.

79.- Rupnow, J.H., Taylor, W. y Dixon, J. E. (1979) Purification and characterization of TRH-deamidase of rat brain. *Biochemistry* 18: 1208-1212.

80.- Schaeffer, J.M., Brownstein, M.J. y Axelrod, J. (1977) Thyrotropin - releasing hormone - like material in the rat retina: changes due to environmental lighting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3578-3581.

81.- Schally, A.V., Coy, D.H., Arimura, A., Redding, T.W.,

Kastin, A.J., Meyers, C., Segrudi, J., Chang, R., Huang, W. Y., Chihara, K., Pedroza, E., Vilchez, J. y Millar, R. (1978) Hypothalamic peptide hormones and their analogues. En: *Pharmacology of the Hypothalamus*, págs. 181-208. Cox, B., Morris, I.D. y Weston, A.H. eds. University Park Press. Baltimore, Maryland.

82.- Schwartz, J. C., Malfroy, B. y De La Baume, S. (1981) Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalino-dipeptidyl-carboxypeptidase (*enkephalinase*) as neuropeptidase. *Life Sci.* 28: 1715-1740.

83.- Segerson, T. P., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H. J., Wu, P., Jackson, M. D. y Lechan, R. M. (1987a) Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by *in situ* hybridization. *Endocrinology* 121: 88-107.

84.- Segerson, T. P., Kauer, J., Wolfe, H. C., Moltaker, H., Wu, P., Jackson, I.M.D. y Lechan, R.M. (1987b) Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238: 78-80.

85.- Spindel, E. y Wurtman, R. (1980) TRH immunoreactivity in rat brain regions, spinal cord and pancreas: validation by high-pressure liquid chromatography and thin-layer chromatography. *Brain Res.* 201: 278-288.

86.- Stanton, T. L., Winokur, A. y Beckman, A. L. (1980) Reversal of natural CNS depression by TRH action in the hippocampus. *Brain Res.* 181: 470-475.

87.- Taylor, R. L. y Burt, D. R. (1981) Properties of $(^3H)(3-Me-His^2)$ TRH binding to apparent TRH receptors in the sheep

central nervous system. *Brain Res.* 218: 207-217.

88.- Taylor, R. L. y Burt, D. R. (1982) Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochem.* 38: 1648-1656.

89.- Taylor, W. L. y Dixon, J. E. (1980) Neuropeptides catabolism by a brain proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94: 8-15.

90.- Torres, H., Charli, J. L., González-Noriega, A., Vargas, M. A. y Joseph-Bravo, P. (1988) Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 8: 103-110.

91.- Vargas, M. A., Méndez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. (1987) Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neurosci. Lett.* 78: 311-314.

92.- Walter, R. (1976) Partial purification and characterization of PPCE: enzymatic inactivation of neurohypophysis hormones by kidney preparations of several species. *Biochim. et Biophys. Acta* 422: 138-159.

93.- Walter, R. y Yoshimoto, T. (1978) PPCE: Kinetic studies on size and stereospecificity of its active site. *Biochemistry* 17: 4139-4144.

94.- Wilk, S. (1988) Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme?. *Life Sciences* 38: 1487-1492.

95.- Warberg, J., Eskay, R.L., Barnes, A., Reynolds, R.C. y Porter, J.C. (1977) Release of luteinizing hormone releasing

hormone and thyrotropin releasing hormone from a synaptosome-enriched fraction of hypothalamic homogenates. *Endocrinology* 100: 814-825.

98.- Winokur, A. y Utiger, R. D. (1974) Thyrotropin-releasing hormone: regional distribution in rat brain. *Science* 185: 265-267.

97.- Winokur, A., Davis, R. y Utiger, R.D. (1977) Subcellular distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rat brain and hypothalamus. *Brain Res.* 120: 423-434.

98.- Yamamoto, C. y McIlwain, H. (1966) Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically defined media *in vitro*. *J. Neurochem.* 13: 1333-1343.

99.- Yamauchi, J. (1980) Thyrotropin releasing hormone (TRH) its widespread distribution in discrete hypothalamic nuclei and areas in rat brain. *Acta Med. Okayama* 34: 333-342.

100.- Yarbrough, G. G. (1978) TRH potentiates excitatory actions of acetylcholine on cerebral cortical neurones. *Nature* 283: 523-524.

101.- Yoshimoto, T., Fischl, M., Orlowski, R.C. y Walter, R. (1978) PPCE and PPDA. A comparison of two peptidases with high specificity to proline residues. *J. Biol. Chem.* 253: 3708-3718.

102.- Yoshimoto, T., Orlowski, R. y Walter, R. (1977) Post-proline cleaving enzyme: identification as serine protease using active site specific inhibitors. *Biochemistry* 16: 2842-2848.