

03062
6

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO SOBRE LA INACTIVACION DEL TRH EN TERMINALES
NERVIOSAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

HAYDEÉ K. TORRES GUERRERO

México, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. PATRICIA JOSEPH, EL DR. ALFONSO GONZALEZ Y LA DRA. REBECA FRANCO. ESTE PROYECTO SE REALIZO GRACIAS AL APOYO DEL DONATIVO DE CONACYT PCSABN001117 Y DE UNA BECA OTORGADA POR EL CONACYT.

A MIS PADRES

A MIS HERMANAS

A BETSABE

Siguiendo mi costumbre, observé el mineral vomitado por las explosiones. Levanté un erizo de mar que tenía un corazón petrificado,

¿Qué ocurre en nuestro interior cuando sostenemos en nuestras manos un pequeño animalillo que vió la vida por primera vez hace millones de años, en mares desconocidos? - Lejanía e identidad al mismo tiempo. Un espejo diminuto brilla desde las más lejanas profundidades del espacio y el tiempo; el universo vive. A ello se añade la sensación de la más alta unidad con este ser, la sospecha de que somos una misma cosa en el infinito, y este encuentro es una de las confirmaciones, una de las rimas de la poesía infinita. La unidad permanece, aún sin confirmación, cuando este ser dormita profundamente en su cuna de piedra. En alguna ocasión, ambos llegaremos a conocer lo que cada uno supo del otro.

ERNST JUNGER

Diarios de Guerra y Ocupación

I N D I C E

	Páginas
1. INTRODUCCION	1 - 7
1.1 Características del TRH	8 - 13
1.2 Objetivos Generales	14 - 15
2. ESTUDIO DE LA CAPTURA DE TRH EN TERMINALES NERVIOSAS	
2.1 Antecedentes	16 - 19
2.2 Objetivo Particular	20
2.3 Estrategia Experimental	21 - 22
2.4 Materiales	22
2.5 Métodos	23 - 27
2.6 Resultados	28 - 38
2.7 Discusión	39 - 40

	Páginas
3. COMPARTAMENTALIZACION DE LAS ENZIMAS QUE DEGRADAN AL TRH	
3.1 Antecedentes	42
3.2 Enzimas que degradan al TRH	42 - 46
3.3 Enzimas que degradan a los metabo litos del TRH	46 - 48
3.4 Objetivo	49
3.5 Estrategia Experimental	50 - 52
3.6 Materiales	53
3.7 Métodos	54 - 64
3.8 Resultados	65 - 83
3.9 Discusión	84 - 93
4. RESUMEN	94 - 97
5. CONCLUSIONES	98
6. BIBLIOGRAFIA	99 - 110

A B R E V I A T U R A S

A	=	mielina (subfracción de ML)
B	=	sinaptosomas (subfracción de ML)
B _m	=	membranas sinaptosomales
B _s	=	sinaptoplasma
BSA	=	albúmina bovina
C	=	sinaptosomas (subfracción de ML)
Ca ²⁺	=	calcio
CE	=	extracto crudo
Ci	=	curie
C _m	=	membranas sinaptosomales de la banda C
CPM	=	cuentas por minuto
C _s	=	sinaptoplasma de la banda C
D	=	fracción mitocondrial
DA	=	dopamina
DKP	=	dicetopiperacina
DNP	=	dinitrofenol
DTT	=	ditiotreitól
E	=	fracción lisosomal
EDTA	=	ácido etilen diamino tetra acético
Gaba	=	ácido gama amino butírico
GH	=	hormona de crecimiento
IP	=	enzima imidopeptidasa
LDH	=	deshidrogenasa láctica

M	=	molar
ML	=	fracción mitocondrial cruda
N	=	fracción nuclear
P	=	fracción microsomal
PGA-M	=	Piroglutamil amino peptidasa metalo proteasa
PGA-SH	=	Piroglutamil amino peptidasa tiol proteasa
PPCE	=	enzima que corta a la derecha del carboxilo de prolina (pro-X)
PPDA	=	enzima que corta a la derecha del carboxilo de prolina cuando hay un dipéptido
PRL	=	prolactina
RSA	=	Actividad Relativa Específica
S	=	fracción soluble de 100 000 X g
S ₂	=	fracción soluble de 12 000 X g
ST	=	mezcla de incubación que consta de Tris 10 mM pH 7.4 y Sacarosa 0.32 M
TCA	=	ácido tricloroacético

1. INTRODUCCION

El sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. Los estímulos son cambios de diferente tipo: físicos (térmicos, mecánicos, electromagnéticos) y químicos; su conjunto constituye la información que el organismo recibe y a la cual debe responder. Para esto los organismos cuentan con estructuras especializadas en el registro de dichos cambios, estas estructuras son receptores y su función es transducir los diferentes tipos de estímulos. Ningún organismo posee la capacidad de captar todos los cambios que ocurren en el medio sino únicamente una cierta proporción de ellos, estos permiten recibir la información necesaria para integrar respuestas que, de acuerdo con su medio ambiente, hacen posible su supervivencia.

Los receptores de estímulos pueden ser clasificados según el tipo de energía que son capaces de registrar, por su estructura anatómica etc.; pero independientemente de sus características particulares, todos tienen la función de dar entrada a la información al efectuar la transducción del estímulo que captan.

La información, codificada, debe ser llevada a -- los centros nerviosos donde va a procesarse e interpretarse, es decir, integrarse. Cuando la información ha llegado a los centros, se somete a un proceso de análisis y síntesis, tanto en espacio como en tiempo, mediante el cual se interpreta y se utiliza para elaborar reacciones que varían desde una respuesta simple hasta mecanismos complejos como la memoria, el aprendizaje la expresión emocional y las funciones intelectuales. Los mecanismos ya integrados son conducidos por neuronas relacionadas entre sí, hacia las estructuras donde tienen lugar las respuestas.

En el sistema nervioso de muchos invertebrados -- y vertebrados, la transmisión parece llevarse a cabo mediante sustancias químicas de cuya acción depende el efecto que el impulso nervioso, llegado a la unión sináptica, tiene sobre la membrana postsináptica. Desde este punto de vista la sinapsis son: a) excitadoras y b) inhibitoras. Inicialmente se pensó que el número de moléculas no debería ser muy grande ya que se consideraba que para los dos tipos de estímulos reportados para la realización de las funciones: excitación e inhibición no se requerirían gran cantidad de moléculas. Los primeros agentes transmisores considerados fueron la acetilcolina (2,3) y la norepinefrina (4,5).

En base al conocimiento acumulado se establecieron una serie de criterios para la identificación y caracterización de moléculas con actividad neurotransmisora. Werman en el año de 1966 (6) definió estos parámetros en base a la caracterización de la acetilcolina (Tabla 2.1).

Ya que no todas las moléculas en estudio cumplían los criterios establecidos por Werman, estos fueron tomados como una base pero no como criterio único para definir la actividad neurotransmisora de las moléculas. Existen diferencias entre los neurotransmisores como por ejemplo: su localización, en diferentes regiones del sistema nervioso, el tipo de estímulo que generan como inhibición o excitación, la duración de este, las células blanco donde actúan y su mecanismo de inactivación (captura y degradación) (7,8,9,10) pero en general se sabe que son moléculas pequeñas sintetizadas y almacenadas en terminal nerviosa, liberadas en respuestas a estímulos al espacio sináptico (11,12), interaccionan subsecuentemente con receptores específicos generando respuestas excitatorias como en el caso de acetilcolina (2,3,13) o inhibitoria como Gaba (13,14) y presentan mecanismos de inactivación (12,15).

Actualmente se reconoce que se tenía una apreciación incompleta del tipo de mensajeros químicos en el sistema nervioso, ya que en la última década se han encontrado en

CRITERIOS PRESINAPTICOS

1. EXISTENCIA DE UN MECANISMO DE INACTIVACION
2. PRESENCIA DE LA SUSTANCIA EN LA TERMINAL NERVIOSA
3. PRESENCIA DEL PRECURSOR DEL NEUROTRANSMISOR
4. SER SUSCEPTIBLE DE RECOLECCION
5. PRESENCIA DE UNA MECANISMO DE LIBERACION

CRITERIOS POSTSINAPTICOS

6. ACCION IDENTICA: LA APLICACION DE LA SUSTANCIA DEBE TENER LOS MISMOS EFECTOS QUE LA ESTIMULACION NERVIOSA.
7. DEBE PRODUCIR CAMBIOS SEMEJANTES A LOS QUE PRODUCE LA ESTIMULACION ELECTRICA
8. IDENTIDAD FARMACOLOGICA: LOS FARMACOS QUE BLOQUEAN LA ACCION DE LA SUSTANCIA, DEBEN BLOQUEAR LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACION NERVIOSA.

TABLA 2.1: CRITERIOS PROPUESTOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROTRANSMISORES (WERMAN, 1966)

diferentes regiones de éste más de 30 péptidos pequeños con posible actividad neurotransmisora (16). Algunos de los neuropéptidos identificados habían sido descritos anteriormente como hormonas secretadas al torrente circulatorio (17, 18).

Como en el caso de los neurotransmisores anteriormente mencionados estas moléculas peptídicas fueron analizadas para determinar su posible actividad neurotransmisora. Cada molécula tiene características diferentes e intervienen en funciones muy variadas por lo que es necesario el estudio específico de cada uno de ellos para entender su participación en la actividad nerviosa.

El estudio de los neuropéptidos ha permitido conocer características comunes entre ellos; por técnicas de inmunocitoquímica, por fraccionamiento subcelular y por radioinmunoensayo se encontró lo siguiente:

- a La mayor cantidad del péptido se localiza en la terminal nerviosa.
- b Son liberados en respuesta a estímulos por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} .
- c Son de tamaño variable y están constituidos entre 3 a 30 aminoácidos (12,19,20).
- d Se ha demostrado para algunos de ellos que su síntesis es a través de un precursor (21,

22,23,24,25,26,27) que posteriormente es procesado en el soma de la neurona o durante el transporte de la molécula a la terminal nerviosa (22).

- e Su actividad es mediada por receptores presentes en las células blanco (12) y al terminar su acción son inactivadas.

Con estudios de inmunocitoquímica T. Hökfelt y col. descubrieron la coexistencia en una misma neurona de -- neuropéptidos y monoaminas (28,29,30,31). Se postuló que tanto los péptidos como las monoaminas se almacenan en sitios -- diferentes dentro de la terminal nerviosa y que la libera---ción de ambas moléculas depende de la intensidad del estímulo (12). Ya liberados los neurotransmisores cada molécula -- puede actuar en forma independiente o coordinada y se proponen diferentes formas de acción:

- a .Que el neuropéptido y la monoamina tengan receptores específicos en células blanco diferentes e independientes (31).
- b El neuropéptido puede difundirse y actuar en neuronas donde no hay contacto sináptico co-

mo en el caso de una sustancia parecida a -- LHRH encontrada en rana (32,33).

c Que el neuropéptido module la actividad del neurotransmisor (12,16). Se ha encontrado -- que ciertos neuropéptidos (12,16) son capaces de modificar la actividad de un neuro-- transmisor ya sea disminuyendo o aumentando la actividad excitatoria o inhibitoria de és te. Por esta razón se les han llamado neuro-- moduladores. Al coliberarse las dos molécu-- las transmisoras una quizá actúe como modula-- dor de la otra.

d Que el neurotransmisor liberado tenga activi dad en la terminal nerviosa que lo liberó -- (autoregulación) (34,35,36,37,38). Ciertas -- moléculas neurotransmisoras como Gaba, sero-- tonina, dopamina, etc. al ser liberadas por la terminal nerviosa en respuesta a estímu-- los actúan en la membrana postsináptica gene rando una respuesta, pero también actúan en la sinapsis que lo liberó. El neurotransmi-- sor se une a receptores específicos presen-- tes en la membrana sináptica generando un es timulo que posteriormente es traducido. Se -- postula que este mecanismo actúa como censor

de la concentración de neurotransmisor liberado,

La respuesta generada por los neuropéptidos y los neurotransmisores clásicos es diferente. En general los neuropéptidos generan una respuesta muy lenta en comparación a los neurotransmisores (10 a 10 000 veces más lenta), la vida media del neuropéptido es mayor y la duración del estímulo es más larga (minutos en comparación a mseg de los neurotransmisores clásicos) (12,32,33).

La comunicación selectiva puede darse si diferentes neuronas de una región sintetizan receptores diferentes de tal manera que sólo se estimulan aquellas células que contienen el receptor blanco de la o de las moléculas liberadas.

La caracterización de los neuropéptidos además de los neurotransmisores clásicos, su coexistencia, su posible coliberación o liberación independiente, la diversidad de receptores en las células blanco y la variedad de respuestas que se generan aumentan un poco nuestro entendimiento sobre la plasticidad y potencialidad del sistema nervioso.

1.1 CARACTERISTICAS DEL TRH

En la búsqueda de las sustancias hipotalámicas del control adenohipofisiario, la primera sustancia caracterizada fué el factor liberador de la tirotropina (TRH) (39). Esta hormona es un tripéptido (piro-Glu-His-ProNH₂) con los dos extremos bloqueados (40).

Aunque el TRH fué identificado como el responsable de la liberación de TSH de hipófisis (41,42,43), posteriormente se vió que en ciertas condiciones también estimula la liberación de prolactina (PRL) (44,45) y de hormona de crecimiento (GH) (46).

Inicialmente se pensó que la única actividad del péptido era como factor liberador de hormonas hipofisarias, pero al demostrarse su amplia distribución en diferentes zonas del cerebro, tracto gastrointestinal, médula espinal, líquido cerebroespinal y en piel de anfibios (47,48) - además de la detectada en hipotálamo donde se encuentra en mayor concentración (49,50) se postuló su posible participación en actividades independientes a las hipofisiotrópicas.

Por mucho tiempo se pensó que el TRH por ser una molécula tan pequeña podría ser sintetizada en forma en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

zimática (51,52) como el glutatión; ahora se ha demostrado que su síntesis es ribosomal y que al igual que otros péptidos proviene de un precursor que posteriormente es procesado.

El precursor es bastante más grande que el TRH, contiene un péptido señal característico de péptidos que son transportados y posteriormente exportados, la secuencia del TRH se encuentra repetida cuatro veces y cada secuencia del péptido está flanqueada por lisina y arginina que son los posibles sitios de ruptura, originando TRH; además este precursor parece codificar para otros péptidos cuya función aún no ha sido identificada (27).

El TRH ya procesado o en vías de procesamiento es transportado a la terminal nerviosa donde ha sido localizado por fraccionamiento subcelular y radioinmunoensayo. El péptido se encontró dentro de pequeñas vesículas resistentes a condiciones hipoosmóticas (53). El TRH almacenado en la terminal nerviosa es liberado por un mecanismo secretor dependiente de Ca^{2+} como respuesta a estímulos despolarizantes (54) así como a ciertos neurotransmisores (55). El péptido liberado genera en las células blanco diferentes tipos de respuestas que pueden ser depresoras o excitatorias.

Las respuestas generadas por el péptido son a -- través de receptores que han sido identificados en diferen-- tes sitios del SNC, hipotálamo, médula espinal e hipófisis - (56,57,58). Se ha reportado que los receptores específicos - así como la molécula inmunoreactiva se localizan en sitios - similares, esto es importante dada la función neurotransmiso -- ra del péptido.

Al hacer fraccionamiento subcelular se encontró -- que los receptores para TRH se encuentran enriquecidos en -- terminal nerviosa (56,57) y que las características bioquími -- cas de éstos en las diferentes regiones son similares, lo -- que ha hecho pensar que son moléculas idénticas (59).

Cuando el TRH ya se ha acoplado a su receptor se -- llevan a cabo diferentes eventos: respuesta despolarizante - dependiente de calcio que es de larga duración y pequeña mag -- nitud (12), en neuronas centrales tiene acción depresora de -- la excitabilidad y en hipófisis tiene actividad excitatoria -- (60,61,62,63), estimula el recambio de fosfatidil inositol - en hipófisis (64) y con esto activa una cascada de fosforila -- ción de proteínas. Se postula que este mecanismo está involu -- crado en la liberación de tirotropina (TSH), prolactina - - (PRL) y hormona de crecimiento (GH).

Dada la ubicuidad del péptido y su posible fun--

ción neuromoduladora se han hecho estudios para entender su participación en las diferentes actividades cerebrales.

Como se mencionó la primera función descrita ~~fué~~ fué su actividad como factor liberador de hormonas hipofisarias (65). A nivel central se postula como modulador de mecanismos colinérgicos (66), dopaminérgicos (67) y monoaminérgicos (68).

En los mecanismos colinérgicos se ha visto que participa en la despolarización de motoneuronas espinales y se postula su efecto facilitador en la excitabilidad de las neuronas (66), antagoniza la narcosis por pentobarbital; genera cambios en el metabolismo de acetilcolina en el hipocampo, a nivel parasimpático se postula una regulación de la tiroides a través del vago por TRH endógeno, aumenta la motilidad del tracto gastrointestinal (67).

En el sistema dopaminérgico se observó estimulación locomotora que es inhibida por bloqueadores del receptor de dopamina (DA) (67): estimula la liberación y síntesis de DA (68), se postula que el TRH desinhibe al sistema dopaminérgico que normalmente está inhibido por Gaba (69).

También se ha postulado la actividad antidepre-

sora del TRH por su participación en el sistema monoaminérgico (68). A la disminución de 5-hidroxitriptamina (5-HT) se le ha relacionado con ciertos síntomas depresores, cuando el metabolismo de este neurotransmisor es alterado ya sea inhibiendo a la monoamino-oxidasa o aumentando la síntesis de éste como lo hacen los antidepresivos tricíclicos (68); los síntomas depresores disminuyen (70).

Si bien se encuentra que el TRH exógeno genera cambios a nivel central esto podría estar dado principalmente por las altas dosis administradas (72), aunque esto pareciera un requisito ya que el TRH es rápidamente degradado al ser administrado por diferentes vías (71).

Como en el caso de los neurotransmisores clásicos los criterios establecidos por Werman (Tabla 2.1) han sido una base para el estudio de los neuropéptidos y su posible actividad neurotransmisora y/o neuromoduladora.

Para el TRH son dos los puntos que claramente se cumplen: se almacena en terminales nerviosas (73,74) y es liberado por un mecanismo secretor dependiente de Ca^{2+} (75). Ya sea que el TRH actúe como factor liberador, neurotransmisor o neuromodulador es necesario un mecanismo que termine la actividad del péptido.

Se han postulado para el TRH principalmente dos vías de inactivación: la recaptura del péptido y la degradación.

1.2 OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fué el estudio de la inactivación del TRH.

Se estudiarion los dos mecanismos postulados para la inactivación del péptido:

a Captura.- Puesto que se observó que rebanadas de tejido presentan la capacidad de acumular TRH (89,90) se intentó demostrar si esto ocurría a nivel de terminal nerviosa como en el caso de los neurotransmisores clásicos.

b Compartimentalización de las enzimas que degradan TRH.- Por otro lado se han caracterizado varias enzimas con actividad degradativa. En este trabajo se hizo la localización subcelular de estas enzimas con principal interés en la piroglutamil-amino peptidasa metaloproteasa. Esta enzima se encontró enriquecida en membranas totales de cerebro y resultó ser muy específica para TRH (125).

El presente trabajo se dividió en dos capítulos separados para una mayor facilidad de análisis.

- a Estudio sobre la Captura de TRH en terminal-nerviosa.
- b Compartimentalización de las enzimas que degradan al TRH.

2. ESTUDIO DE LA CAPTURA DE TRH EN TERMINAL NERVIOSA

2.1 ANTECEDENTES

El descubrimiento de un mecanismo de transporte de alta afinidad y específico para ciertos aminoácidos (4,5,6,76,77) y para neurotransmisores demostró que las bajas concentraciones de las moléculas liberadas de la terminal nerviosa son removidos por un proceso de recaptura - - (78,79,80).

Sin embargo, también se vió que ciertos aminoácidos sin efecto excitatorio en neuronas son captados por mecanismos de alta afinidad (81) por lo que se tomaron en cuenta otras características de este proceso para diferenciar moléculas neurotransmisoras de las que no lo son. Los parámetros estudiados para lograr la caracterización de neurotransmisores fueron: dependencia de sodio, dependencia de la bomba sodio/potasio y de energía (76,77,78,79,80, 81,82,83). Se ha demostrado que los neurotransmisores son recaptados por diferentes regiones del cerebro (84) y el sitio de captura es principalmente la terminal nerviosa -- aunque también se ha descrito que las células gliales tienen capacidad concentradora (76,77,82,85).

En el caso de neuropéptidos también se ha estudiado este mecanismo. Para la sustancia P, se reportó que la molécula no es captada por sinaptosomas ni glia, en cam

bio un producto de degradación (heptapéptido 5-11) sí es --
captado por rebanadas de cerebro de rata y médula de conejo
(86). Estos datos sugieren la captura como un mecanismo se-
cundario a la degradación. Para Met-encefalina se reportó -
un mecanismo de captura en sinaptosomas de striatum de rata
(87), dependiente de temperatura, desplazable por sustrato-
frío e inhibido por dinitrofenol (DNP).

Para TRH, Porter y col. (88) utilizando sinapto-
somas de cerebro y de hipotálamo de rata, reportaron que el
TRH no es captado. Observaron, como en el caso de la sustan-
cia P, que el péptido es degradado y el producto internali-
zado es prolina, metabolito del TRH.

Para descartar la posibilidad de errores metodo-
lógicos utilizaron como control a dopamina cuyo mecanismo -
de captura está muy caracterizado. Dopamina sí fué captada-
en las condiciones de incubación utilizadas para TRH por lo
que concluyeron que este péptido no presentaba dicho meca-
nismo.

Sin embargo, posteriormente Charli y col. (89)-
demostraron la presencia de un mecanismo de recaptura de --
TRH utilizando rebanada de hipotálamo de rata, éste resultó
ser dependiente de temperatura, de sodio, inhibido por DNP-

y por oubafina; además tiene una Km de alta afinidad ($10^{-6}M$). Pacheco y col. (119) también demostraron este fenómeno en rebanadas de cerebelo de rata,

Ya que en las condiciones experimentales de Charli y col. (89) si se observó internalización del 3H -TRH, en este trabajo se trató de definir si este mecanismo de transporte se llevaba a cabo en terminal nerviosa como en el caso de los neurotransmisores como GABA, DA, etc.

Si bien Porter y col. (88) reportaron que el TRH no es captado por la terminal nerviosa de hipotálamo y cerebro, sus condiciones experimentales no fueron las más adecuadas para llegar a esta conclusión, debido a que utilizaron tiempos de incubación muy largos permitiendo con esto la degradación del TRH. Dadas las condiciones experimentales le fué difícil diferenciar entre el péptido captado y degradado intrasinaptosomalmente y el péptido degradado afuera de la vesícula con la consiguiente captura de los metabolitos.

Debido a esto y a que en el laboratorio se reportó un mecanismo de captura (89), se planteó una estrategia experimental que limitará la degradación del péptido y con esto intentar demostrar si el mecanismo de transporte obser-

vado por Charli (89) se llevaba a cabo en la terminal nerviosa. Para evitar la degradación del TRH se utilizó un inhibidor (bacitracina) que limita el rompimiento del péptido; también se disminuyó la concentración de protefna sinaptosomal (de 200 a 1 000 ug en 2 ml a diferencia de Porter que utilizó 3 mg/ml) para disminuir las condiciones óptimas de las enzimas degradativas, también los tiempos de incubación fueron modificados, Porter utilizó 60 min de incubación, en este -- trabajo se incubó el péptido con el tejido por 5 min.

2.2 OBJETIVO

Mostrar si el sitio de captura de TRH observado en rebanadas de hipotálamo ocurre en la terminal nerviosa, en condiciones experimentales donde se utiliza un inhibidor de la degradación, y tiempos de incubación cortos.

2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- a Fraccionamiento subcelular de hipotálamo.
Se obtuvieron los sinaptosomas como se indica en Métodos.
- b Comprobación de la viabilidad de los sinaptosomas.
Se utilizó al neurotransmisor Gaba como control y se determinaron sus constantes cinéticas.
- c Se incubaron las fracciones en presencia de bacitracina que es un inhibidor de la desamidasa (PPCE) y de la enzima que rompe después de prolina cuando es un dipéptido (PPDA); estas degradan a TRH y a uno de sus metabolitos (his-proNH₂).
- d Determinación de las constantes cinéticas para TRH.
- e Dependencia del mecanismo de transporte al sodio, a la bomba sodio/potasio y a la temperatura.

2.4 MATERIALES

Se usaron ratas macho Wistar de 200 a 300 g mantenidas en condiciones de luz controladas (10 horas al día) y alimentadas ad libitum.

El (L-Prolina -2,3,4,5-³H) TRH (100 Ci/nmol) se compró en New England Nuclear Co, Boston Ma.; el TRH frío y sus metabolitos, en los laboratorios Península, San Carlos, Ca.

Los demás reactivos usados a lo largo del estudio fueron adquiridos a Sigma Chemical Co, St. Louis Mo. o a J.T. Baker, México.

Se usaron dos tipos de placas de cromatografía:

a De alta resolución (Whatman HPKF) para la purificación del (³H-Pro) TRH.

b De sílica gel G (Merck 5724) para el análisis de los productos de degradación.

Todos los tubos plástico y material de vidrio -- fueron siliconizados con 5% de Surfácil (Pierce) en acetona.

2.5 METODOS

2.5.1 Obtención de Sinaptosomas.

Se obtuvieron siguiendo el método de Bradford (123). El hipotálamo disecado de ratas macho Wistar de 300-gr fué homogenizado en sacarosa 0,32M-Tris-HCl 10mM pH 7.4- (10% w/v) en un homogenizador Potter Elvehjem con 12 golpes a 800 rpm. El homogeneizado se centrifugó a 1 000 X g por 10 min, la fracción soluble fué a su vez fraccionada a 15 000 X g por 30 min formando ML (particulada) y S₂ (soluble); la fracción ML se subfraccionó en un gradiente discontinuo de sacarosa (1.2, 0.8 y 0.32 M). Los gradientes se centrifugaron en el rotor SW40 a 100 000 X g por 90 min. Las bandas que se formaron correspondieron a: A=mielina (entre 0.32 y 0.8 M), B=sinaptosomas (entre 0.8 y 1.0 M) y C=mitocondrias (sedimento). La banda de los sinaptosomas fué extraída del gradiente y las vesículas llevadas a 0.45-M adicionando lentamente agua fría; posteriormente esta suspensión se centrifugó a 20 000 g por 30 min para precipitar a los sinaptosomas. La pastilla se resuspendió en solución-Krebs previamente gaseada con CO₂ (NaCl 125mM, KCl 4.4 mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.3mM, NaCO₃ 26mM, Glucosa 10mM, CaCl₂-0.75mM, Bacitracina (2 mM). Cuando se hicieron experimentos sin NaCl la osmolaridad se mantuvo con sacarosa 256mM.-

Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de resuspender las vesículas,

2.5.2 Incubación de los Sinaptosomas.

Los sinaptosomas resuspendidos en Krebs (1.9 ml de suspensión por vial) se preincubaron 5 min a 32°C, se añadió el péptido marcado (15 pmolas por punto) y se continuó la incubación por 5 min más. Al terminar el período de incubación la mezcla se filtró en membranas Millipore de 0.65 μ m (los filtros fueron saturados previamente con albúmina bovina a 1 mg/ml por 30 min para disminuir la posible asociación del péptido al filtro). Los filtros se lavaron tres veces con solución Krebs y posteriormente fueron congelados hasta su procesamiento.

2.5.3 Procesamiento de los Filtros.

A cada filtro se le agregó 1 ml de ácido acético al 20%, acarreadores (TRH, TRH ácido, DKP, His-Pro, Prolinamida y Prolina) a una concentración de 5 μ g y TCA a una concentración final de 2%, la mezcla se centrifugó a 15 000 rpm por 15 min.

El sobrenadante se deslipidizó con éter saturado en agua, se agregó metanol a una concentración final de --

90%, la mezcla se mantuvo a -20°C toda la noche. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm por 30 min y el sobrenadante se evaporó en un concentrador centrífuga, al vacío (Savant). Cada punto se resuspendió en 20 μl de metanol 90% y fueron aplicados a la placa fina. La cromatografía se corrió en el sistema cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (125:75:25 v/v/v),

Para identificar y cuantificar al TRH y sus metabolitos se raspó de cada carril la sílica en rectángulos de 2 cm de ancho X 1 cm de largo, de la sílica se eluyó la marca con 1 ml de metanol al 90% y se cuantificó la marca en líquido de centelleo Bray (5 ml por frasco) (120) en un contador automático de radioactividad (Packard).

2.5.4 Marcadores

Como control del fraccionamiento se cuantificaron los siguientes parámetros:

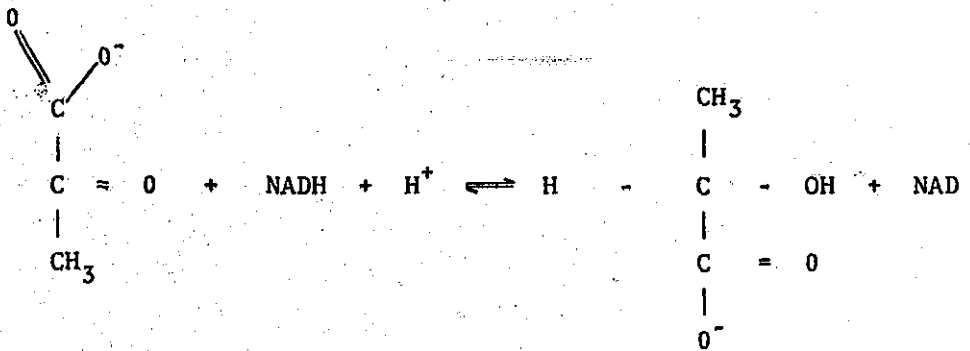
a Se determinó la actividad de deshidrogenasa láctica (LDH), enzima presente en el citoplasma y en el sinaptoplasma (114),

b Se determinó la distribución de proteína en-

las diferentes fracciones. La proteína se cuantificó por el método de Lowry (115),

a). Cuantificación de Deshidrogenasa Láctica - (LDH)

La actividad se determinó cuantificando la desaparición de NADH + H⁺ en la reacción siguiente:



Piruvato

Lactato

Se prepararon mezclas por punto experimental y el volumen final fué de 3 ml. A una cubeta de vidrio se agregaron 300 µl de piruvato (6 X 10⁻⁴ M) preparado en amortiguador fosfato 0.05 M pH 7,5; 5 µl de NADH + H⁺ (8 X 10⁻³ M) preparado en agua; 2 700 µl de amortiguador fosfatos - - 0.05 M pH 7.5.

A esta mezcla se agregaron diferentes alícuotas e inmediatamente se leyó la disminución de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a 340 nm en un espectrofotómetro Gilfford, las lecturas se tomaron cada 5 seg por 2 min.

b) Determinación de Proteína

La determinación de proteína se hizo por el método de Lowry (116). Las soluciones utilizadas fueron: NaOH 1N, Na_2CO_3 al 2% (A), Tartrato $\text{Na}^+ \text{K}^+$ al 2% (B), CuSO_4 al 1% (C) y Folin Diluido 1:1 (D).

A 100 μl de la muestra (fracción) se le agregaron 100 μl de NaOH y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. A esta mezcla se le añadieron 900 μl de la siguiente solución: 98 ml de A, 1 ml B y 1 ml C. Se agitó y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μl de la solución D, se agitó y se dejó reposar por 30 min.

Pasado este tiempo se leyó la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro Gilfford a 660 nm.

Al mismo tiempo se preparó una curva patrón utilizando albúmina bovina (fracción V).

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Distribución de la Actividad de LDH y Proteína.

La presencia de LDH en las diferentes fracciones y la proporción de proteína fueron utilizadas como controles del fraccionamiento. En la figura 2.1 se muestra que en la fracción sinaptosomal (B) se recuperó la mayor cantidad de la actividad de LDH (24%) presente en la fracción particulada (ML), como se esperaba dada su distribución bimodal (en el citoplasma y sinaptoplasma de la neurona) (115) la proteína también se concentró en esta fracción B (25% del total).

2.6.2 Actividad Metabólica de los Sinaptosomas.

Antes de estudiar la captura del TRH por los sinaptosomas fue importante demostrar que las vesículas obtenidas en el gradiente estaban metabólicamente activas. Para esto, se utilizó el neurotransmisor ^{14}C -Gaba cuyo mecanismo de captura ha sido caracterizado ampliamente (8,11,13,14,15). En la tabla 2.2 se muestran los valores de K_m y V_{max} obtenidos, estos valores están dentro de los descritos por otros autores (13,14) los cuales reportan para la K_m un valor de 2 a $40 \times 10^{-6}\text{M}$ y V_{max} de 3 a 10 nmolas/min/mg. En esta misma tabla se muestran los valores obtenidos cuando la captura se llevó a cabo en ausencia de sodio; la afinidad del fenómeno

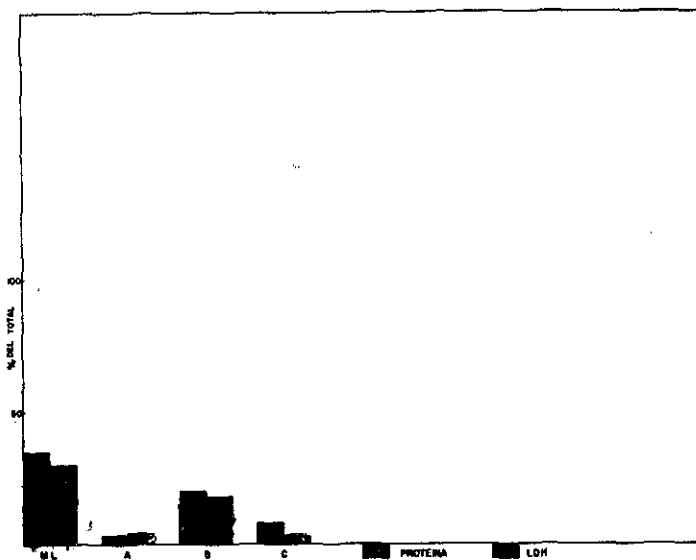


FIGURA 2.1: DISTRIBUCION DE PROTEINA Y DE ACTIVIDAD DE LDH EN LAS DIFERENTES SUBFRACCIONES DE NL.

Las fracciones fueron analizadas como se indica en Métodos para la cuantificación de proteína y de LDH. Los resultados se expresan como el % del total (CE * N = 1001). La fracción NL = mitocondrial cruda, A = mielina, B = sinaptosomas, C = mitocondrias.

	Km	Vmax
NaCl 125mM	3.6 x 10 ⁻⁶ M	2.24 nmolas mg ⁻¹ min ⁻¹
sin NaCl	8.0 x 10 ⁻⁶ M	0.09 nmolas mg ⁻¹ min ⁻¹

TABLA 2.2: DETERMINACION DE LA Km y Vmax PARA EL NEUROTRANSMISOR ¹⁴C-GABA EN SINAPTOSOMAS DE HIPOTALAMO DE RATA, DETERMINACIONES HECHAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE NaCl.

se incrementó ligeramente mientras que la velocidad del transporte disminuyó, ratificando lo previamente reportado, es decir que la internalización de este neurotransmisor es dependiente de la concentración de sodio.

Con estos resultados se comprobó la viabilidad de los sinaptosomas así como su actividad metabólica.

2.6.3 Control de Degradación del TRH

Los experimentos de captura de TRH se hicieron en presencia de bacitracina (.002M) en las condiciones de incubación utilizadas en este trabajo. Con este se aseguró la integridad del TRH extrasinaptosomal, evitando la internalización de metabolitos. Posteriormente se observó que en ausencia de este inhibidor y en las condiciones experimentales (baja concentración de proteína) el TRH tampoco es degradado.

2.6.4 Determinación de las Constantes Cinéticas para TRH

Antes de estudiar las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) para el fenómeno de transporte de TRH se intentó definir la concentración de proteína más adecuada y el tiempo de incubación óptimo para estar bajo condiciones de velocidad inicial.

Como se indicó en Métodos, después de varias -- pruebas se decidió incubar los filtros Millipore con BSA -- 1 mg/ml por 30 min antes de la filtración de los sinaptoso-- mas para disminuir la posible asociación inespecífico al fil-- tro del $^3\text{H-TRH}$, también se lavaron los filtros con solución-- Krebs (con 15 ml tres veces) después de filtrar las vesicu-- las para eliminar interacciones débiles del péptido con el -- tejido.

El primer punto que se intentó definir fué la -- concentración de proteína óptima para la realización de los-- ensayos. En la figura 2.2 se observa que conforme aumenta la -- concentración de proteína sinaptosomal aumenta la asociación de $^3\text{H-TRH}$, sin embargo la asociación no es proporcional al -- aumento en la concentración de proteína. También se utiliza-- ron diferentes concentraciones del péptido, la mezcla del -- péptido se formó con $^3\text{H-TRH}$ (1.5×10^{-8} M por punto) más TRH frío para obtener las concentraciones finales de 10^{-6} M y -- 10^{-4} M. Como se observa en esta misma gráfica no varió la -- asociación de $^3\text{H-TRH}$ a las diferentes concentraciones del -- péptido a una concentración de sinaptosomas.

Se pensó que si el mecanismo de transporte para TRH en la terminal nerviosa era similar al de los neurotrans-- misores clásicos o al reportado por Charli (89), la concen--

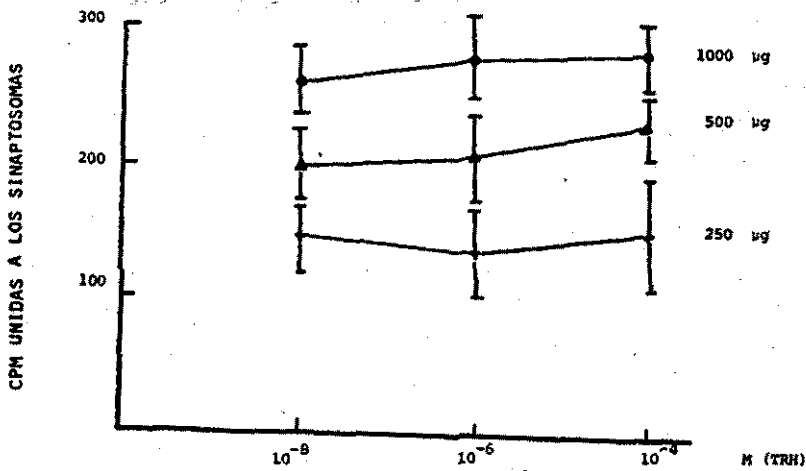


FIGURA 2.2: ASOCIACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $^3\text{H-TRH}$ A LA PROTEINA SINAPTOSOMAL.

Los sinaptosomas obtenidos por el método de Bradford y diluido a diferentes --
concentraciones (250, 500 y 1000 µg) fueron incubados en presencia de diferen--
tes concentraciones de TRH por 5 min. a 32°C . La mezcla de TRH se hizo con --
 1×10^{-8} M de $^3\text{H-TRH}$ más TRH frío para obtener 10^{-6} M y 10^{-4} M. Los valores --
son las CMP asociadas al tejido del total de CPM agregadas (500 000 CPM por --
punto). Cada punto es el promedio de 4 experimentos.

tracción de TRH donde se apreciaría el fenómeno sería aproximadamente 10^{-6} M y que al agregar exceso de TRH frío (10^{-4} M) este competiría por los sitios específicos de transporte y se observaría disminución de la asociación de marca al tejido. Pero como se indicó en el párrafo anterior la asociación del ^3H -TRH no varió al modificar su concentración.

Debido a que a la misma concentración de proteína sinaptosomal no se observó incremento en la asociación de la marca en 10^{-8} M no en 10^{-6} M y tampoco hubo cambio cuando se incubó con exceso de TRH frío, se pensó que quizás las terminales nerviosas que captan TRH son modificadas como ocurre en el caso de la liberación de TRH por sinaptosomas (124), o bien durante el fraccionamiento son depletadas de cofactores importantes para el transporte. Se decidió utilizar por lo tanto a la fracción ML para no someter a las vesículas al fraccionamiento.

En la figura 2.3 se observa que la asociación del TRH a la fracción membranal ML es ligeramente mayor (de 200 a 600 cpm) que en B (de 150 a 250 cpm) y que aumenta con el incremento en la concentración de proteína, sin embargo como se vio en la figura anterior el aumento de la marca no es proporcional al aumento de la concentración de la proteína (ML) y tampoco se observó que a las diferentes

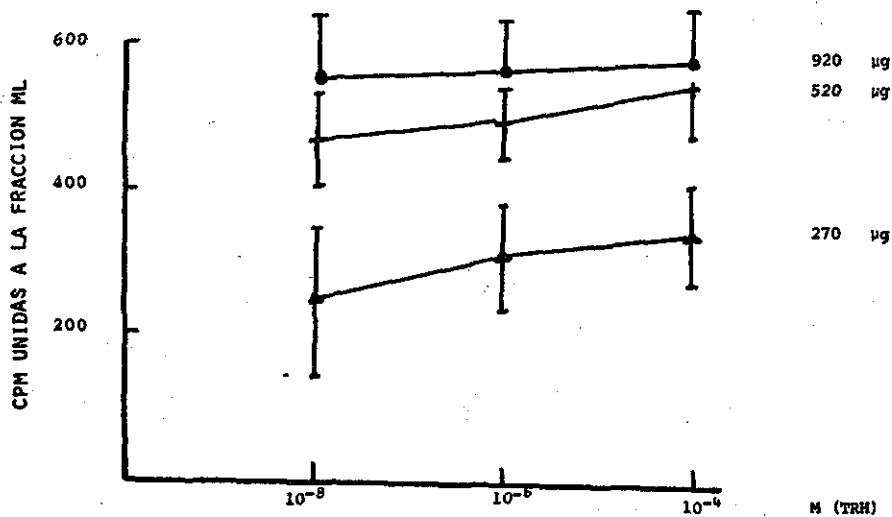


FIGURA 2.3: ASOCIACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ^3H -TRH A LA FRACCION ML.

La fracción sinaptosomal cruda (ML) a diferentes concentraciones (270, 520 y 920 μg) se incubó con 3 concentraciones de ^3H -TRH a 32°C por 5 min. Los valores están dados en cpm. La mezcla de TRH se hizo con 1×10^{-8} M de ^3H -TRH más TRH frío para obtener 10^{-6} M y 10^{-4} M. Cada punto es el promedio de 3 experimentos.

concentraciones de TRH aumentara o disminuira la asociación del péptido. La unión del TRH al tejido sigue siendo muy baja y si bien esto pudiera reflejar que hay un número bajo de terminales TRHérgicas el hecho de que variando la concentración de TRH no haya cambiado la cantidad del peptido unido sugiere que no es posible discriminar entre la asociación poco específica de la específica del péptido al tejido.

El fenómeno de internalización, a diferencia -- del de asociación a receptores es dependiente de temperatura. Por lo tanto se comparó la unión de TRH al tejido a dos temperaturas: 4°C y 32°C y a dos concentraciones: 10^{-8} M y 10^{-4} M. Como se observa en la figura 2.4 hay diferencia en la cantidad de radioactividad asociada a 10^{-8} M y 10^{-4} M de TRH a diferencia de experimentos anteriores, también se observa -- que la radioactividad asociada a 4°C y 32°C a la más alta -- concentración del peptido (10^{-4} M) varía dependiendo de la temperatura, a 4°C es ligeramente menor que a 32°C mientras que a 10^{-8} M la asociación permaneció invariable a ambas temperaturas. La diferencia en asociación a 4°C y 32°C pudiera reflejar un mecanismo de transporte de baja afinidad.

Con el objeto de definir si la diferencia en el número de cpm asociadas a 4°C y 32°C era realmente por la internalización del ^3H -TRH por un mecanismo de baja afinidad

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

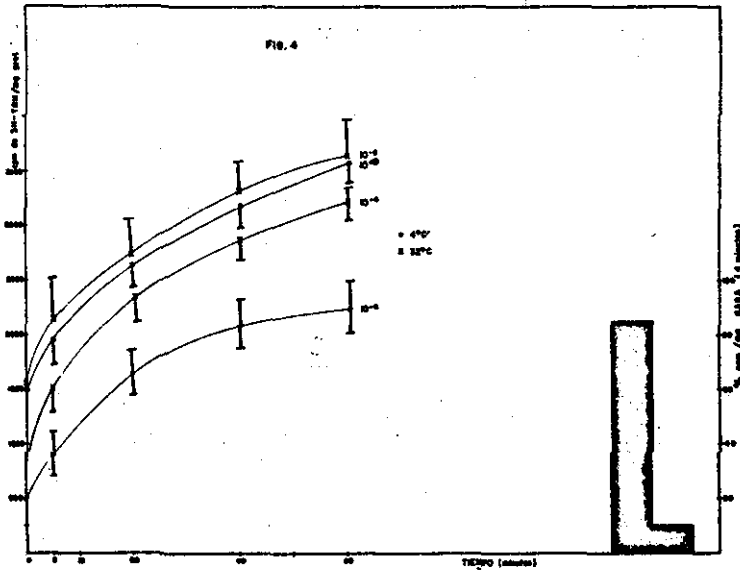


FIGURA 2.4: ASOCIACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 3H-TRH EN LA FRACCION ML.
 La fracción ML fué lavada una vez con Sacarosa 0,32 Tris HCl 10 mM, posteriormente la mezcla fué centrifugada y la pastilla resuspendida en Krebs. Los puntos fueron incubados en diferentes condiciones.

- Se utilizaron dos concentraciones de TRH 10^{-5} y 10^{-4}
- Los diferentes puntos se incubaron a 4° y 32 °C
- Se hicieron diferentes tiempos de incubación

Se utilizaron aproximadamente 650ug de proteína por punto

se estudió el contenido de las vesículas. Se incubó la fracción ML con TRH a dos concentraciones (10^{-8} M y 10^{-4} M) a -32°C , posteriormente las vesículas fueron rotas por congelación y descongelación y por centrifugación fueron separadas las fracciones membranal y soluble. En estas fracciones se cuantificó el número de cpm asociadas. Los resultados mostraron la asociación del TRH únicamente en la fracción membranal y no en el sinaptoplasma. Con esto se concluyó que en nuestras condiciones experimentales la captura de TRH pareciera no ser llevada a cabo por la terminal nerviosa y por tanto se duda de ésta como el mecanismo fisiológico de inactivación del TRH.

2.7 DISCUSION

Los resultados obtenidos con el neurotransmisor ^{14}C -Gaba nos permitieron concluir que los sinaptosomas obtenidos por el método de Bradford (123) están activos metabólicamente y la falta de transporte de TRH no es debido a un mal estado de las vesículas.

Las constantes cinéticas obtenidas para Gaba en presencia y ausencia de sodio coinciden con los resultados reportados por varios autores, lo que aseguró que las condiciones y el tratamiento de las vesículas era el adecuado (13,14).

Un punto muy importante fué la dificultad para diferenciar entre la asociación específica y la no específica del TRH al tejido (figuras 2.2 y 2.3) por la falta de acumulación del péptido en la terminal o de desplazamiento por péptido frío. Estos resultados sugieren que la terminal nerviosa de la neurona hipotalámica no posee un mecanismo de internalización como el descrito por los neurotransmisores clásicos. Esto también se demostró cuando se analizó el contenido de cpm en el sinaptoplasma y la membrana sinaptosomal donde la asociación de marca únicamente se observó en la membrana.

Por otra parte otros autores describen receptores específicos para TRH en hipotálamo (56), razón por la cual se escogió esta región para el estudio de captura, ya que además de su función en el control del eje hipotálamo-hipofisiario se ha sugerido la existencia de sinapsis TRH -érgicas dentro del hipotálamo involucradas en funciones tales como termoregulación. Pudiera pensarse que las terminales nerviosas involucradas en la neurotransmisión son muy pocas y que por esto haya sido difícil la observación de la captura del TRH sin embargo, Charli y col. (89) si observaron internalización del péptido en rebanadas de hipotálamo; ésta posiblemente sea realizada por otras entidades celulares como glia o los tanicitos que se han propuesto intervienen en el transporte del 3er. ventrículo al sistema porta de diferentes sustancias.

La importancia del mecanismo de transporte observado por Charli (89) en la inactivación del TRH no es muy clara ya que si bien es un fenómeno con características similares a la captura de Gaba (dependiente de energía, inhibido por DNP y ouabaina) la velocidad de esto es muy lenta.

Quizá la internalización observada tenga que ver con la actividad del TRH como mensajero intracelular,

como se ha observado en hipófisis donde el péptido llega has
ta el núcleo.

El haber encontrado que en nuestras condiciones
experimentales el TRH no es transportado por las terminales-
nerviosas de hipotálamo sugiere lo siguiente:

- 1 Quizá el hipotálamo contiene pocas termina--
les TRHérgicas.
- 2 Que la captura del TRH no sea un fenómeno --
idéntico al de los aminoácidos y tenga caracac
terísticas muy particulares.
- 3 Que el TRH no sea captado por el hipotálamo-
pero si por otras regiones del sistema ner--
vioso.
- 4 Que la inactivación del TRH sea por otra vía
diferente a la captura.

3. COMPARTAMENTALIZACION DE LAS ENZIMAS QUE DEGRADAN
AL TRH

3.1 ANTECEDENTES

Para varios neuropéptidos activos como TRH, LHRH, neurotensina y encefalinas se han descrito actividades proteolíticas capaces de inactivarlos (90,91,92,93,94). Más que el rompimiento en sí de la molécula por cualquier enzima es importante determinar cual de esas actividades degradativas está involucrada en la inactivación fisiológica del péptido.

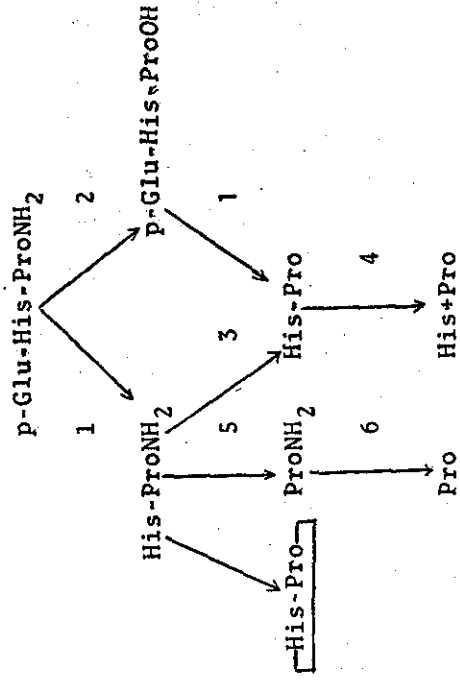
Bauer y Lipman (92) demostraron que el TRH es inestable cuando se incuba con homogenados de cerebro o con suero. Dada su estructura $p\text{Glu-His-ProNH}_2$ se pueden inferir la existencia de tres sitios de ruptura: entre el ácido piroglutámico e histidina, entre la histidina y la prolinamida o desamidando a la prolina del TRH (Figura 3.1). De estas posibilidades se ha demostrado que existen sólo dos actividades: la piroglutamil-amino peptidasa (PGA) que rompe entre el ácido piroglutámico y la histidina y la actividad de desamidasa. A su vez estas enzimas generan metabolitos que son cortados por otras enzimas, esto será más ampliamente explicado.

3.2 Enzimas que degradan al TRH

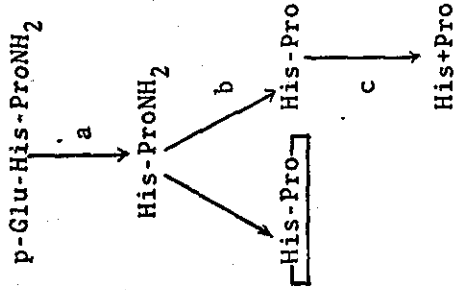
3.2.1 Piroglutamil-amino peptidasa (PGA):

Esta actividad se ha encontrado en tejido cere-

ENZIMAS CEREBRALES



ENZIMAS SERICAS



-44-

FIGURA 3.1: CATABOLISMO DEL TRH SEGUN BAUER Y KLEINKAUFF, 1981.

1: piroglutamilaminopeptidasa, 2: enzima que corta después del carboxilo de la prolina, PPCE, 3: enzima que corta después del carboxilo de la prolina en dipeptidos, PPDA, 4: imidodipeptidasa, 5: histidil-prolin imino peptidasa, 6: iminopeptidasa, a: tiroliberinasa, b: desamidasa, c: imidodipeptidasa.

bral (95), en hipófisis (96) y en suero (99). El metabolito que genera es la His-ProNH₂ que es un producto que tiende a ciclizarse en forma no enzimática (97) formando dicetopiperacina (DKP). Se han purificado dos enzimas con esta actividad:

a Enzima Purificada de Fracción Soluble de Cerebro.- Es una enzima ampliamente distribuida ya que se ha localizado en varios tejidos (100,101), tiene un peso molecular de 28 000. Requiere la presencia de DTT y EDTA para expresar su máxima actividad y es inhibida por compuestos que bloquean los grupos tiol (99), por lo que en este trabajo se le denominó PGA-SH. Esta enzima tiene especificidad por péptidos con la fórmula pGlu-X (98), como LHRH, neurotensina, gastrina así como péptidos sintéticos que contengan este enlace.

b Enzima Sérica.- A esta se le ha llamado tiroliberinasa, tiene un peso molecular de 260 000 (99) y degrada rápidamente al TRH (119). Sus características bioquímicas difieren de la actividad de PGA de la fracción soluble; a diferencia de esta última es inhibida por DTT y EDTA, y muestra gran especificidad por TRH (99). Se ha observado que la actividad de esta enzima en rata está regulada por hormonas tiroideas (102) y presenta cambios durante el desarrollo (103,104). Por estas características se postula como el

mecanismo regulador de la actividad del péptido en las células hipofisiarias (99).

Con respecto a esta actividad de PGA existía una controversia en cuanto a la localización de la enzima. Como se describió en el párrafo anterior, Bauer utilizando DTT y EDTA en sus ensayos únicamente expresaba la enzima soluble (SH) que contiene grupos tiólicos, pero no reportaba actividad en la fracción membranal.

Griffiths trabajando en ausencia de DTT y EDTA encontró actividad de PGA en membranas pero en estas condiciones no expresaba a la enzima soluble. Cada grupo reportaba la actividad de PGA como soluble o como membranal pero ninguno de los grupos postuló que se podría tratar de dos enzimas con ubicaciones y características diferentes.

Recientemente Gárat y col. (125) reportaron que efectivamente existen dos enzimas con actividad de PGA, una soluble que requiere DTT y EDTA y una membranal que es inhibida por estos compuestos. La actividad membranal fue caracterizada como una metaloproteasa específica para TRH, presente en membranas de cerebro. Bauer (1984) cambiando sus condiciones de incubación (sin DTT y EDTA) también en-

contró actividad degradativa en membranas de hipófisis aunque no reportó de que actividad se trata (93).

3.2.2 Desamidasa (PPCE)

La desamidación del TRH es catalizada por una enzima de 76 000 de peso molecular (8), esta actividad fué caracterizada como post-prolina (E.C. 3.4.21.26.) (108,109, 110) y corta específicamente a la derecha del carboxilo de la prolina. Aunque cataliza la desamidación del TRH su especificidad de sustrato es el de una endopeptidasa que hidroliza uniones internas del péptido (Y-Pro-X). Varios péptidos son hidrolizados por esta enzima como LHRH, angiotensina, oxcitocina y péptidos sintéticos (96). También se purificó una enzima de riñón de borrego (111) con la misma especificidad de sustrato y características bioquímicas similares.

3.3 Degradación de los Metabolitos del TRH

Ya que el TRH fué desamidado o hidrolizado por la PGA, los metabolitos generados (TRH ácido e His-ProNH₂) son subsecuentemente hidrolizados por diferentes enzimas.

a El producto His-ProNH₂ generado por la PGA puede sufrir diferentes modificaciones:

3.3.1 Como se había mencionado anteriormente pue-

de ciclizarse en forma no enzimática generando dicetopiperacina (DKP) (97,98). Este metabolito se ha encontrado involucrado en actividades fisiológicas del cerebro (113,114), en ocasiones como antagonista de la actividad de TRH y en otras potenciando su actividad.

3.3.2 Puede ser desamidado por la enzima que corta después de prolina cuando son dipéptidos (PPDA) (96). Se ha reportado que está presente en adenohipófisis y en riñón.

3.3.3 A su vez la histidil-prolina es hidrolizada por la imidopeptidasa (112) dejando a los aminoácidos libres.

3.3.4 Por una actividad de histidil-prolil amino-peptidasa se puede formar prolinamida e histidina (112).

b Cuando el TRH es desamidado formando TRH ácido, este metabolito también es degradado:

3.3.5 Es hidrolizado por la PGA generando histidil-prolina.

3.3.6 La histidil-prolina genera los aminoácidos libres por la acción de la imidodipeptidasa.

Schwartz (1981) definió seis criterios para la identificación de neuropeptidasas inactivantes (Tabla 3.6).

Uno de los puntos que postula es la adecuada ubicación de la enzima para que esto pueda degradar al péptido liberado.

Este criterio ha sido tomado en cuenta para el estudio de las enzimas que degradan a encefalinas, sustancia P y otros neuropéptidos y se ha postulado que la presencia de estas en terminal nerviosa las hacen un candidato importante en la inactivación fisiológica de los diferentes neuropéptidos.

Para TRH han sido identificados diferentes actividades degradativas pero lo importante para determinar su posible actividad fisiológica será definir su ubicación subcelular.

3.4 OBJETIVO

Definir la distribución subcelular en homogenado de cerebro de rata de la PGA metaloproteasa así como de las otras enzimas que degradan al TRH, y estudiar su posible participación en el mecanismo de inactivación del triptido.

3.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Ya que como se demostró en el capítulo anterior, el TRH parece no ser captado por la terminal nerviosa, la degradación del péptido pareciera entonces ser el mecanismo principal de inactivación. Por ello la localización subcelular de la PGA membranar resultó entonces un punto importante para definir la participación de ésta en el mecanismo fisiológico de inactivación del TRH.

Para lograr este objetivo se estudió la localización subcelular de las enzimas que degradan al TRH. Para la distribución subcelular se utilizaron los criterios de D. Duve (121, 122) (Tabla 3.7).

a Se utilizaron marcadores enzimáticos y se determinó su distribución en las diferentes fracciones. Las enzimas analizadas fueron deshidrogenasa-láctica (LDH) que tiene ubicación soluble (115) la hexosaminidasa contenida en lisosomas y la 5'nucleotidasa presente en membranas plasmáticas y sinaptosomales.

b Se determinó la distribución de las enzimas que degradan al TRH y se compararon con los patrones de las enzimas marcadores.

- 1) Fraccionamiento subcelular para separar las diferentes entidades celulares.
- 2) Demostrar el enriquecimiento de los elementos celulares obtenidos por el fraccionamiento mediante la utilización de enzimas presentes en las diferentes entidades celulares.
- 3) Cuantificar la actividad de las enzimas marcadoras, definir su distribución en las diferentes fracciones y comparar ésta con la distribución de la enzima en estudio.
- 4) Los valores se expresan en actividad relativa específica (RSA) que se obtiene del siguiente cociente:

$$\frac{\% \text{ de Actividad Enzimática}}{\% \text{ de Proteína}}$$

El valor de RSA mayor que 1 indica enriquecimiento de la enzima en determinada fracción, el valor menor a 1 indica que no hay enriquecimiento.

TABLA 3.7: CRITERIOS PARA DEFINIR LA UBICACION SUBCELULAR DE ENZIMAS (D. DUVE 122).

c Los sinaptosomas fueron sometidos a choque osmótico con Tris-HCl 50mM y posteriormente fueron sonicados durante 5 seg 3 veces a 4°C, esta suspensión fué centrifugada para analizar la actividad degradativa en estas fracciones (sinaptoplasma y membrana sinaptosomal).

3.6 MATERIALES

Se usaron ratas macho Wistar de 200 a 300 g mantenidas en condiciones de luz (10 horas al día) y alimentadas ad libitum.

El (L'prolina-2,3,4,5,³H) TRH (100 Ci/mmol) se compró en New England Nuclear Co, Boston Ma; el TRH frío y sus metabolitos, en los laboratorios Península, San Carlos Ca.

Los demás reactivos usados a lo largo del estudio fueron adquiridos a Sigma Chemical Co, St. Louis Mo. o a J.T. Baker, México.

Se usaron dos tipos de placas de cromatografía:

- a De alta resolución (Whatman HPKF) para la purificación del (³H-Pro) TRH.
- b De sílica gel G (Merck 5724) para el análisis de los productos de degradación.

Todo el material de vidrio y plástico usado para trabajar con (³H-TRH) fué previamente siliconizado con 5% de Surfácil (Pierce) en acetona.

3.7 METODOS

3.7.1 Purificación de (^3H -Pro) TRH

En todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizó el ^3H -TRH previamente purificado para evitar enmascarar los metabolitos ya existentes en el reactivo y los generados durante la incubación.

El péptido se aplicó sobre una placa fina de alta resolución, esta se corrió en el sistema acetona-agua (80:20 v/v). En otro carril de la placa se aplicó una muestra patrón de TRH frío y se reveló con reactivo de Pauly. La zona que comigró con el marcador fué recortada y extraída con metanol 90%. La pureza del ^3H -TRH se verificó cromatografiando en placas de sílica gel G en el sistema cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (125:75:25 v/v/v). La pureza se verificó por conteo de radioactividad utilizando una solución de centelleo de Bray (122) obteniendo un 96-98% de pureza.

3.7.2 Fraccionamiento Subcelular

Se decapitaron ratas macho Wistar de aproximadamente 300 gr, el cerebro fué inmediatamente disecado y colocado en una solución de sacarosa 0.32 M, Tris HCl 10mM pH

7.4 (ST) a 4°C. Todo el fraccionamiento se llevó a cabo a 4°C. La homogenización del cerebro se hizo en un homogenizador - Potter-Elvehjem. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga Sorvall en el rotor SS34 y en una ultracentrifuga Beckman L-50.

El homogenado fue centrifugado a 900 g por 10-min, la pastilla así obtenida se resuspendió en la mitad -- del volumen inicial de S.T. mediante una homogenización más suave y esto se recentrifugó. Esto se hizo tres veces consecutivas. Las fracciones solubles se mezclaron formando con esto el extracto crudo (CE), el sedimento se resuspendió en sacarosa y esta correspondió a la fracción nuclear (N) que contiene núcleos, células no rotas y membranas. La fracción CE se centrifugó a 12 000 g por 15 min, el sedimento que se formó es la fracción ML. El sobrenadante se centrifugó a -- 100 000 g por 120 min, en el sedimento se precipitaron los microsomas (P) y la porción soluble S correspondió al citoplasma (Figura 3.2).

La fracción ML se subfraccionó siguiendo el método de Koenig, H. (117). En un gradiente discontinuo de - sacarosa (1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.32 M) se separaron los diferentes componentes de la fracción ML. El gradiente se cen--

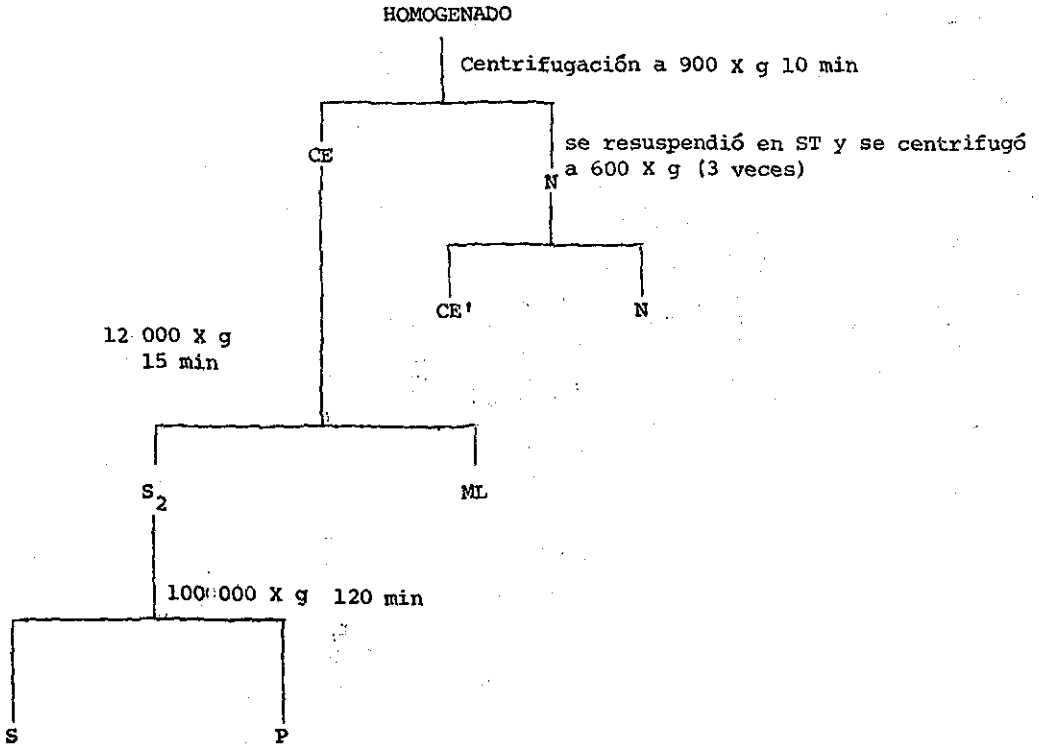


FIGURA 3.2: OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES CRUDAS DEL HOMOGENADO.

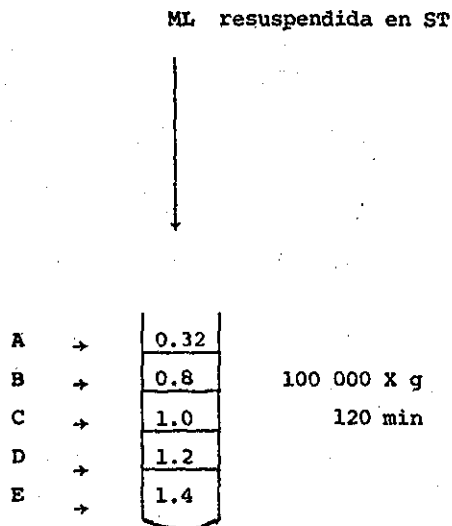
Las diferentes fracciones fueron obtenidas como se indica en el esquema. Las actividades enzimáticas utilizadas como marcadores fueron cuantificadas en estas fracciones y posteriormente se compararon con la distribución de las enzimas que degradan al TRH. CE=extracto crudo, N=fracción nuclear, S₂=sobrenadante de 12 000 X g, ML=fracción mitocondrial cruda, S=sobrenadante de 100 000 X g y P=microsomas.

trifugó a 100 000 g por 120 min en el rotor SW40. Las bandas que se formaron fueron las siguientes Figura 3.3:

- A Banda formada en la interfase entre 0.32 y 0.8 M, contiene principalmente mielina.
- B Banda entre 0.8 y 1.0 M, migran sinaptosomas.
- C Banda entre 1.0 y 1.2 M, compuesta de sinaptosomas y mitocondrias.
- D En la interfase entre 1.2 y 1.4 M se formó la banda de mitocondrias.
- E El sedimento estuvo formado por los lisosomas.

Las bandas se extrajeron de los gradientes y fueron precipitadas por centrifugación a 15 000 rpm por 30 min. Las pastillas fueron resuspendidas en la solución de ST.

Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta la realización de los ensayos enzimáticos de los marcadores habiendo hecho antes los controles que muestran que la congelación no afectó la actividad de éstas. Los ensayos de degradación se hicieron inmediatamente de obtenidas las fracciones.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gradiente de Sacarosa

FIGURA 3.3: SUBFRACCIONAMIENTO DE ML.

La fracción mitocondrial cruda (ML) fué separada en sus diferentes componentes en un gradiente -- discontinuo de sacarosa (117).

Las diferentes fracciones fueron extraídas y cen-- trifugadas, posteriormente se resuspendieron en el medio ST para la realización de los diferen-- tes ensayos enzimáticos. A=mielina, B=sinaptoso-- mas, C=sinaptosomas y mitocondrias, D=mitocon-- drias, E=lisosomas.

La fracción ML fué obtenida como se indica en la Figura 3.2.

3.7.3 Ensayos Enzimáticos

Las fracciones fueron preincubadas en presencia de Triton X-100 para los ensayos de LDH, hexosaminidasa y -- las enzimas degradativas del TRH a una concentración final - de 0,1%. En el caso de la 5'Nucleotidasa se utilizó taurocolato a 2% final. La temperatura de incubación fué de 37°C en todos los casos.

a) La LDH (114), está descrita en la sección - 2.5.4 de este trabajo.

b) La 5'Nucleotidasa (E.C.3.1.3.5) se determinó cuantificando el Pi liberado del sustrato AMP (117).

El volumen de reacción final fué de 1 ml; - la mezcla de incubación se formó con: KCl - 100 mM, Mg Cl₂ 100 mM, Tartrato Na/K 10 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,4, Taurocolato 2% y AMP 5 mM. La reacción se detuvo con TCA (25% final).

Las diferentes fracciones se incubaron por 60 min a 37°C, ya detenida la reacción los tubos fueron centrifugados a 3 000 rpm por 15 min, el sobrenadante se utilizó para la medición del Pi.

Para cuantificar el Pi liberado se utilizaron las siguientes soluciones:

A) Acido Ascórbico al 10%, B) Molibdato de Amonio 0,42% en H_2SO_4 concentrado, C) Mezcla de una parte de A más 6 partes de B, esto se mantiene en hielo.

Para el ensayo se mezclaron 300 μ l del sobrenadante de la reacción y 700 μ l de C, se incubó 60 min a 37°C y se leyó a 820 m μ m en un espectrofotómetro Gildford.

Se hizo en forma paralela una curva patrón con KH_2PO_4 ,

c) La hexosaminidasa (E.C.3.2.1.30) se cuantificó según el método de Susuki (119) las soluciones utilizadas fueron:

A) Na_2HPO_4 20 mM más Ac. cítrico 12 mM a pH 4,4. (Se llevó a este pH con Ac. cítrico 0.1 M).

B) 4 metil-umbeliferil β -D-N-acetilglucosaminida, se hizo una solución 5 mM en amortiguador fosfato/citrato (A).

D) 4 metil-umbeliferona a 200 mM, la concen

tracción final fué 10 mM.

Las muestras a medir fueron diluidas 1:1 -- con la solución A, se tomaron 25 μ l de esta mezcla se preincubaron a 37°C y se añadie-- ron 100 μ l del sustrato (solución B) se in-- cubó por 30 min y la reacción se detuvo con 1,9 ml del amortiguador C.

La producción de 4 metil-umbeliferona se -- midió en un fluorómetro a una excitación de 360 y emisión de 448,

- d) La PGA (SH) se cuantificó midiendo la produc-- ción de β naftilamina (96).

Las soluciones utilizadas fueron:

A) Amortiguador Fosfato 100 mM pH 7,4 con 2 mM de DTT y 2mM de EDTA.

B) Pirrolidonil β naftilamida 10 μ M.

A 2 ml de solución A se le agregaron 10 μ l - de solución B y diferentes alicuotas de la - muestra. La producción de β naftilamina se - hizo en un fluorómetro a 37°C, excitación - - 340, emisión 410.

3.7.4 Condiciones para el Estudio de la Degradación del TRH.

La concentración de proteína para los ensayos - fué entre 0,3 y 1 mg/ml para las fracciones solubles y de 2- a 5 mg/ml para las fracciones membranales, siempre se utilizaron 3 concentraciones de proteína de las diferentes fracciones para asegurar que se estaba en la linealidad del fenómeno y hacer una adecuada cuantificación de la actividad degradativa.

El volumen inicial de incubación fué de 5 μ l, - estos se preincubaron 15 min a 37°C en presencia de Tritón - X-100, se agregó el sustrato marcado (3 pmolas en 5 μ l). La mezcla de reacción fué incubada por 60 min en el caso de las fracciones membranales y por 30 min las solubles. La reacción se detuvo agregando 100 μ l de ácido acético al 20%. Las soluciones utilizadas en los diferentes ensayos fueron: saca rosa 0,32 M - TrisHCl 10 mM (ST) y sacarosa 0,32 M - Tris - HCl 10 mM con DTT 2 mM y EDTA 2 mM.

3.7.5 Análisis de los Productos de Degradación.

Las diferentes mezclas de reacción con ácido - acético se centrifugaron a 1000 g por 30 min. Los sobrenadantes fueron deslipidizados en éter saturado en agua, por últi

mo se llevaron a 90% vol/vol en metanol. En esta solución el TRH y sus metabolitos son solubles. Los sobrenadantes se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 20 μ l de metanol -- 90%. Se aplicaron en placas para cromatografía de sílica gel G y se corrieron en el sistema cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (125:75:25 v/v/v) junto con los patrones de TRH y sus metabolitos. Secadas las placas los patrones fueron revelados con reactivo de Pauly.

Los carriles de las muestras se recortaron (2 cm de ancho X 1 cm de largo) y cada rectángulo se extrajo -- con metanol 90%. Para su conteo se agregaron 5 ml de Bray a cada frasco (120).

Se observó que aunque ciertos metabolitos tienen diferente Rf, su separación en los carriles del ensayo no es suficiente en algunos casos (Figura 3.4) como prolina (0.24), histidil-prolina (0.3) y TRH ácido (0.54) que formaron en ocasiones un gran pico de prolinamida (0.8) y dicetopiperacina (0.87) que formaron un segundo pico al final de la placa. Estos dos picos fueron eluidos de la sílica después de haber sido corridos en el primer sistema de solventes y evaporados a sequedad. Las muestras fueron evaporadas a sequedad y resuspendidas en metanol 90% y aplicadas en la sílica para ser corridas en un segundo sistema de solventes .

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

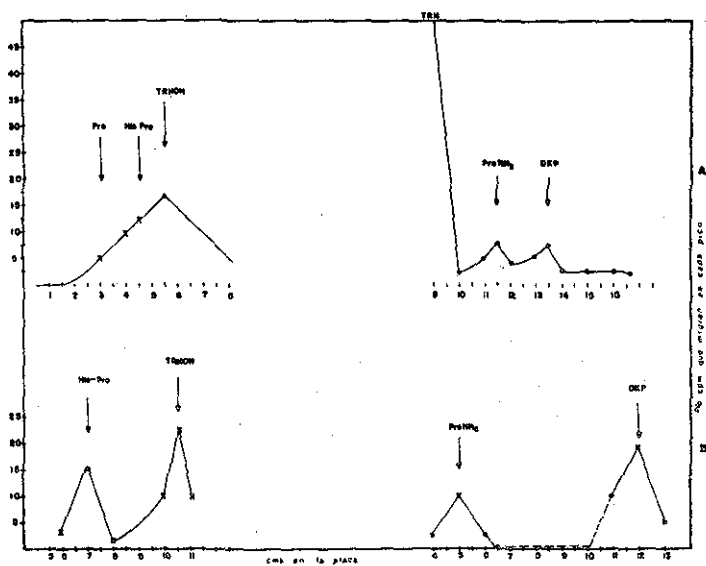


FIGURA 3.2: MIGRACION DEL TRM Y SUS METABOLITOS EN DOS SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA.
 En la parte superior de la figura se muestra la migración de los diferentes metabolitos en el sistema cloroformo-metanol-hidróxido de amonio (125:75:25).
 En la parte inferior se muestra el cromatograma obtenido con el segundo sistema de solventes, isopropanol-agua-hidróxido de amonio (80:20:1).

(isopropanol-agua-hidróxido de amonio) (80:29:1 v/v/v). Los valores de Rf obtenidos fueron: prolina 0,12, prolinamida 0,3, histidil-prolina 0,43, TRH ácido 0,65 y dicetopiperacina 0,75 (Figura 3.4).

3.7.6 La determinación de proteína se hizo según el método de Lowry (115) utilizando albúmina bovina fracción V (de Sigma) como patrón.

3.8 RESULTADOS

3.8.1 Distribución Subcelular de los Marcadores Enzimáticos

Como se mencionó el objetivo de este trabajo fué el definir la compartimentalización de las enzimas que degradan al TRH con particular interés en la piroglutamil-amino-peptidasa (PGA-M). Para esto se siguió el método de D. Duve (121,122), se tomaron marcadores bien definidos como son LDH, 5'Nucleotidasa y la hexosaminidasa y su distribución se comparó con la de las enzimas que degradan al TRH.

Como primer paso se determinó la distribución de las actividades en las fracciones gruesas de homogenado de cerebro (N,ML,P y S). En la Tabla 3.1 se observa que la LDH se encuentra enriquecida en la fracción citosólica S; en ML la actividad fué de aproximadamente 30% (Tabla 3.2) en ésta no se encontró enriquecimiento de la enzima (RSA=.7, Tabla 3.2) y la actividad presente corrobora lo anteriormente descrito por Johnson (115) sobre la presencia de LDH en terminales nerviosas. La poca actividad encontrada en la fracción N es debida a la presencia de células no rotas mientras que en microsomos (P) pudiera deberse al atrapamiento de la enzima en vesículas generadas durante la homogenización o por su asociación inespecífica a las membranas.

	CE	N	ML	P	S
LJH fmolas/min/mg	135 + 7	26 + 2	48 + 3	12 + 1	150 + 6
5'Nucleotidasa fmolas/min/mg	120 + 2	60 + 2	66 + 3	156 + 6	47 + 4
Hexosaminidasa fmolas/min/mg	480 + 10	130 + 6	500 + 9	126 + 8	170 + 4
Formación de :					
TRH ácido (ST) fmolas/min/mg	3700 + 90	41 + 4	19 + 2	20 + 1	6000 + 100
TRH ácido (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	5500 + 100	63 + 4	25 + 3	28 + 4	8400 + 140
DKP (ST) fmolas/min/mg	115 + 12	60 + 8	105 + 7	18 + 2	30 + 1
DKP (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	1050 + 12	0	26 + 4	11 + 2	1050 + 71
B Naftilamina fmolas/min/mg	2000	0	50	8	2000
His-Pro (ST) fmolas/min/mg	0	104 + 12	21 + 3	50 + 9	0
Pro-NH ₂ (ST) fmolas/min/mg	0	28 + 9	20 + 3	4 + .5	0

7 68 -

TABLA 3.1: ACTIVIDAD METABOLICA DE LAS ENZIMAS QUE DEGRADAN AL ³H-TRH Y DE LAS ENZIMAS MARCADORES.

Las fracciones crudas del homogenado de cerebro fueron incubadas con los sustratos específicos para cuantificar las actividades enzimáticas como se indicó en Métodos. Todas las fracciones se preincubaron 15 min a 37°C. Los medios utilizados fueron: ST= sacarosa 0.32M, Tris 10mM; ST-DTT-EDTA-ST, DTT 2mM, EDTA 2mM; P= Fosfatos. Cuantificando la formación de los diferentes metabolitos se determinó la actividad degradativa de las enzimas: TRH ácido (ST)=Actividad de mPCE, (ST-DTT-EDTA)=mPCE, DKP (ST)=PGA-M, DKP (ST-DTT-EDTA)= PGA-SH, BNA (P)=PGA-SH, His-Pro (ST)=PPDA y ProNH₂=IP. Los valores son el promedio de 3 experimentos.

S

P

ML

N

CE

	CE	N	ML	P	S
Proteína	79	21	44	1.8	22
LDH	80 (1.0)	20 (0.95)	30 (0.7)	10 (0.6)	46 (2.0)
5'Nucleotidasa	66 (0.8)	34 (1.6)	30 (0.7)	33 (2.0)	12 (0.5)
Hexosaminidasa	81 (1.0)	19 (0.9)	65 (1.5)	15 (0.8)	21 (0.95)
Formación de:					
TRH ácido	97 (1.3)	3 (0.14)	.62 (0.014)	0.06 (0.003)	82 (3.7)
DKP (ST-DTT-EDTA)	100 (1.3)	0 0	3 (0.07)	0.09 (0.005)	119 (5.4)
DKP (ST)	90 (1.1)	10 (0.47)	64 (1.5)	2 (0.1)	3 (0.14)
BNA (P)	100 (1.3)	0 0	2 (0.045)	.01 (0.0005)	104 (5.0)

TABLA 3.2:

ACTIVIDADES DE LAS DIFERENTES ENZIMAS EN LAS FRACCIONES CRUDAS DE HOMOGENADO DE CEREBRO DE RATA.

Los valores están dados en % de la actividad total (CE + N = 100%). El valor (entre paréntesis) corresponde al RSA y se hizo con la relación siguiente:
 $\frac{\% \text{ de Actividad Enzimática}}{\% \text{ de Proteína}}$ como lo indica D. Duve (121). RSA=Actividad Relativa Especifica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 69 -

La 5'Nucleotidasa, a diferencia de la LDH, se encontró enriquecida en la fracción microsomal P como había sido descrito anteriormente (118), en ML también se detectó actividad (30%, Tabla 3.2). Fue de gran utilidad monitorear esta enzima ya que permitió cuantificar el grado de contaminación de las diferentes fracciones, por ejemplo en S (Tabla 3.1 y 3.2) se observó cierta actividad debida a una centrifugación insuficiente.

Para la hexosaminidasa (Tabla 3.1 y 3.2) el máximo enriquecimiento se detectó en ML correspondiendo a las vesículas lisosomales que contienen a esta enzima y se acumularon en esta fracción (120). En S también se encontró actividad de hexosaminidasa debido posiblemente a la ruptura de los lisosomas que dejan libre a la enzima (Tabla 3.1).

Ya que se obtuvieron los patrones de distribución adecuados para cada enzima (al compararlos con otros autores), se hizo el subfraccionamiento de ML como se indica en Métodos. En la Tabla 3.3 se muestran los resultados: la LDH se encontró principalmente en las fracciones sináptosomales B y C y aunque la actividad en estas es menor que en S (2 veces menor), la actividad detectada corresponde a la enzima presente en sinaptoplasma (115), la actividad en las fracciones A,D,E, es tan baja que parece estar dada por contaminación de la LDH a estas fracciones. La 5'Nucleotidasa también presentó su máxi-

ma actividad en B y C. En la fracción lisosomal E se enriqueció la hexosaminidasa como se esperaba; en B y C también se encontró actividad por la presencia de lisosomas en la terminal nerviosa (Tabla 3.3).

Como se intentaba definir claramente la ubicación de las enzimas degradativas también era importante determinar la ubicación de los marcadores en los componentes sinaptosomales: la membrana y el sinaptoplasma. Para ello las fracciones B y C fueron extraídas del gradiente y llevadas a 0.45M añadiendo agua fría lentamente y posteriormente las vesículas fueron centrifugadas. El sedimento se resuspendió en 0.32 M de ST. Los primeros intentos para determinar la distribución de las enzimas fueron mezclando las dos fracciones sinaptosomales B y C (BC) las cuales fueron sonicadas en poco volumen (2 ml) como se indica en Métodos y fraccionadas por centrifugación. En la Tabla 3.4 se observa que la LDH está enriquecida en el sinaptoplasma y que la asociación de la enzima o su atrapamiento en la fracción membranal es bajo (10%); es evidente que al haber roto los sinaptosomas hubo también ruptura parcial de los lisosomas por la actividad tan alta de hexosaminidasa encontrada en la fracción soluble (Tabla 3.1). La 5'Nucleotidasa si bien se enriqueció en la fracción membranal, la fracción soluble también presentó actividad debido quizá a una mala centrifugación que dejó pequeños fragmentos de membranas o microvesículas en el sobrenadante. Dada la baja acti

	CE	ML	A	B	C	D	E
LDH fmolas/min/mg	140 + 7	50 + 4	10 + 1	82 + 2	70 + 2	12 + 1	11 + .9
5'Nucleotidasa fmolas/min/mg	130 + 3	70 + 40	22 + 2	76 + 2	69 + 2	25 + 1	8 + 1
Hexosaminidasa fmolas/min/mg	430 + 12	420 + 15	80 + 7	320 + 30	296 + 3	126 + 12	921 + 3
Formación de :							
TPH ácido (ST) fmolas/min/mg	3400 + 100	17 + 2	34 + 2	190 + 27	130 + 2	24 + 3	40 + 5
DKP (ST) fmolas/min/mg	115 + 20	105 + 7	59 + 4	230 + 30	140 + 10	90 + 6	0
DKP (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	1050 + 70	26 + 4	16 + 2	53 + 6	35 + 8	13 + 1	0
B NA (P) fmolas/min/mg	2400	80	0	240	130	0	0
His-Pro (ST) fmolas/min/mg	0	30 + 2	83 + 9	460 + 12	41 + 3	61 + 8	30 + 4
Pro NH ₂ (ST) fmolas/min/mg	0	18 + 2	0	0	28 + 3	0	0

72-
TABLA 3.3 : ACTIVIDAD METABOLICA DE LAS ENZIMAS QUE DEGRADAN AL ³H-TRH Y DE LAS ENZIMAS MARCADORES.

La fracción mitocondrial "cruda" (ML) fué subfraccionada como se indicó en Métodos, las subfracciones obtenidas fueron extraídas del gradiente y utilizadas para los diferentes ensayos enzimáticos. La cuantificación de los metabolitos formados durante la incubación nos permitió determinar la actividad de las enzimas degradativas. TRH ácido (ST) = PPCI; DKP (ST) = PGA-M; DKP (ST-DTT-EDTA) = PGA-SH. His-Pro = PPDA; ProNH₂ = IP y B NA = PGA-SH. Los valores son el promedio de 3 experimentos.

	CE	ML	BC	BC _m	BC _s
LIH nmolas/min/mg	150 + 8	61 + 7	72 + 8	9.3 + 8	95 + 7
S'Nucleotidasa fmolas/min/mg	140 + 7	70 + 9	78 + 7	56 + 2	21 + 1
Hexosaminidasa nmolas/min/mg	420 + 20	440 + 31	320 + 4	221 + 1	242 + 1
Formación de :					
TRH ácido (ST) fmolas/min/mg	2800 + 140	17 + 1	186 + 20	23 + 3	470 + 50
TRH ácido (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	3600 + 200	22 + 2	241 + 30	33 + 5	611 + 75
DKP (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	1320 + 150	25 + 3	38 + 2	30 + 2	15 + 11
DKP (ST) fmolas/min/mg	110 + 10	120 + 15	120 + 10	100 + 8	45 + 3
B NA (P) fmolas/min/mg	1600	40	60	2	80

TABLA 3.4 : ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LOS COMPONENTES SINAPTOSOMALES; SINAPTOPLASMA Y MEMBRANA.

Las subfracciones sinaptosomales B y C fueron mezcladas y posteriormente sonicadas como se indicó en Métodos. Por centrifugación se separaron el sinaptoplasma y la membrana, y en estas dos fracciones se analizaron las actividades enzimáticas. Los valores son el promedio de 2 experimentos.

vidad esperada en el sinaptoplasma de las enzimas degradativas, el subfraccionamiento del sinaptosoma se hizo en un mínimo de volumen (2 ml), para esto se centrifugó en la micro ultracentrífuga. Los resultados obtenidos con la 5'Nucleotidasa donde la fracción soluble estuvo muy contaminada con esta enzima nos hizo cambiar el método para romper las vesículas. Los sinaptosomas B y C (en forma separada, no mezclados) fueron sometidos a choque osmótico con 15 ml de Tris - 50mM y posteriormente ultracentrifugados (100 000 g por 60-min) con este método se logró separar en forma más adecuada los dos componentes sinaptosomales. En la Tabla 3.5 se observa que la LDH está enriquecida en el sinaptoplasma (B_s y C_s), la contaminación en las fracciones membranales es baja (aprox. 10%), para la 5'Nucleotidasa se encontró enriquecimiento en las fracciones membranales (B_m y C_m) como se esperaba y la contaminación sinaptoplasma fué baja lo que nos permitió comparar las diferentes actividades.

Ya determinada la ubicación de los marcadores en las diferentes fracciones y subfracciones se compararon con las distribuciones de las enzimas que degradan al TRH.

Dada la importancia de analizar la localización de las enzimas primarias y secundarias responsables de la degradación del TRH, las actividades proteolíticas se pre-

	CE	ML	B	B _m	B _s	C	C _m	C _s
LDH mmolas/min/mg	148	44	81	9	95	76	8	87
5'Nucleotidasa mmolas/min/mg	128	38	71	93	6	62	85	5
Hexosaminidasa mmolas/min/mg	410	425	326	250	360	271	156	273
Formación de:								
DKP (ST) fmolas/min/mg	120	130	320	380	18	150	170	30
DKP (ST-DTT-EDTA) fmolas/min/mg	1100	19	25	0	0	0	0	0

-75-

TABLA 3.5: ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LOS COMPONENTES SINAPTOSOMALES; SINAPTOPLASMA Y MEMBRANA.

Las fracciones B y C se sometieron a choque osmótico con 15 ml de Tris-HCl 50mM, las suspensiones obtenidas fueron ultracentrifugadas a 100 000 g por 30 min. Posteriormente se separó el sinaptoplasma (diluido) y el sedimento se resuspendió en el medio ST.

sentarán cada una por separado, tomando en cuenta que se siguió el mismo procedimiento descrito en esta sección.

TESIS CON
FALTA

3.8.2 Distribución Subcelular de las Enzimas que Degradan al TRH

a Enzima con actividad de Piroglutamil-Amino-Peptidasa (metaloproteasa) (PGA-M)

Debido a que en las condiciones de nuestros ensayos no se detectó his-proNH_2 , la actividad de esta enzima se cuantificó por la producción de DKP.

El primer paso en la localización de la PGA-M fué el detectar y cuantificar la actividad de las fracciones crudas (N,ML,P y S). Como se observa en la Tabla 3.1 y 3.2 el máximo enriquecimiento de la PGA-M se encontró en las fracciones particuladas N y ML; en S la actividad degradativa fué muy baja a pesar de la presencia de membranas en esta fracción (esto se observa comparando la actividad de 5'Nucleotidasa). A diferencia de la 5'Nucleotidasa la PGA-M no se encontró en microsomas ni en citosol sugiriendo con esto una localización en compartimentos celulares diferentes de las dos enzimas.

El sedimento mitocondrial "crudo" (ML) fué subfraccionado en un gradiente discontinuo de sacarosa como se indica en Métodos para obtener fracciones "semipurificadas" de mielina, sinaptosomas, mitocondrias y lisosomas.

En la Tabla 3.3 (formación de DKP) se muestra -- que si bien la PGA-M se encontró distribuida en las diferen-- tes fracciones del gradiente el enriquecimiento se observó en las fracciones sinaptosomales B y C. La poca actividad de --- PGA-M en mielina y mitocondrias pareciera ser por la presen-- cia de vesículas o de membranas sinaptosomales atrapadas en estas fracciones como se observa por la actividad de 5'Nucleo-- tidasa detectada en A, D y E (Tabla 3.3).

Como se mencionó el siguiente paso fué estudiar-- la localización de la PGA-M en los componentes membranal y so-- luble del sinaptosoma para cuantificar en éstas la producción de DKP.

Con el primer método de ruptura de los sinaptoso-- mas (sonicación en 2 ml de Tris 50 mM y separación de los -- componentes se encontró que la enzima no se enriqueció al sub-- fraccionar de CE hasta BC y además como se había mencionado-- para la 5'Nucleotidasa, se detectó una proporción importante-- en el sinaptoplasma de la PGA-M. En esta misma Tabla 3.3 se -- observa que cuando la incubación se hizo en presencia de DTT-- y EDTA (ST-DTT-EDTA) la producción de DKP es inhibida. En las fracciones membranales ML, BC y BC_m la actividad de PGA se -- vió inhibida debido a que la PGA-M es una metaloproteasa. En-- el sinaptoplasma se esperaba que la producción de DKP en pre-

sencia de estos compuestos aumentara por la posible presencia de la PGA-S, pero como se observa (Tabla 3.4) la actividad -- presente en el sinaptoplasma también disminuyó por lo que con estos resultados se concluyó que la actividad presente o parte de esta era debido a la presencia de membranas que no fueron precipitadas. Haciendo el ensayo con β -naftilamina se encontró que aunque la concentración de la enzima en terminal nerviosa es baja (Tabla 3.4) en comparación a la actividad en S, la PGA-SH está presente en sinaptoplasma. Debido a la contaminación de la fracción soluble con membranas y a la posible inactivación de las enzimas por la sonicación, se utilizó el segundo método de rompimiento con exceso de Tris 50 mM -- (15 ml), la suspensión fué posteriormente ultracentrifugada. -- Esto permitió una preparación más limpia como se observó para los marcadores (Tabla 3.5). Además se utilizó un inhibidor de la PPCE y PPDA que es la bacitracina (2.6 mM) y para la IP se utilizó la N-etilmaleimida (0.6 mM). Con esto únicamente se -- permitió la expresión de la PGA-M o de la PGA-SH cuando se -- agregó DTT y EDTA. En la Tabla 3.5 se observa que la PGA-M se enriqueció en B_m y C_m , la contaminación de membranas en la -- fracción soluble fué muy baja o quizá con el volumen tan grande de las actividades se diluyeron.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

b Enzima con Actividad de Piroglutamil-Amino--
Peptidasa Tiol proteasa (PGA-SH)

Anteriormente fué reportado que esta enzima al-
igual que la LDH es citosólica (96,97,99). En este trabajo se
le encontró distribuida en forma similar a la LDH, con la - -
máxima actividad en S (Tabla 3.1). Sin embargo a diferencia -
de la LDH que en la fracción ML expresó 30% de actividad debi-
do a la presencia de la enzima en el sinaptoplasma (115), la
PGA-SH expresó únicamente 2% de la actividad en esta fracción
(Tabla 3.2). En las Tablas 3.1 y 3.2 también se observa que-
el enriquecimiento en S de la PGA-SH es mayor que el de la - -
LDH en esta misma fracción, además la LDH se expresó más en -
ML que la LDH lo que sugiere una distribución diferente de - -
las dos enzimas. En la Tabla 3.3 se observa que la actividad-
de la PGA-SH es muy baja en las subfracciones, pero cuando se
incubaron con β -naftilamida la actividad aumentó ligeramente-
debido a que la enzima no tuvo que competir con otras enzimas
por el sustrato. Cuando los sinaptosomas fueron sonicados, la
fracción soluble presentó inhibición de la actividad por lo -
que en principio se concluyó que la actividad presente en el
sinaptoplasma era debido a la contaminación con las membranas
(comparando con 5'Nucleotidasa), pero al probar con β -naftila-
mina se detectó una pequeña actividad. Esto sugiere que la en-
zima está presente en terminales nerviosas pero en una propor-
ción pequeña.

c Enzima con Actividad de Desamidasa (PPCE)

La actividad de esta enzima se determinó cuantificando la producción en TRH ácido que es el producto desamidado del TRH (96,97,107),

Como había sido descrito anteriormente (96), encontramos que la PPCE es una enzima soluble, enriquecida al igual que la LDH y la PGA-SH en el citoplasma (S) (Tabla 3.1). Resultó sorprendente la poca actividad detectada en ML (0.6%) (Tabla 3.2) en comparación al 30% de LDH en esta misma fracción. En la Tabla 3.1 también se muestra que la actividad específica de esta enzima en ML es menor que en CE y en S. Al igual que para la PGA-SH no se descartaba hasta este punto que la actividad detectada fuera solo contaminación de la enzima citosólica o que la enzima esté presente en muy baja proporción. En las fracciones B y C la actividad de PPCE aumentó, enriqueciéndose en las fracciones sinaptosomales (Tabla 3.3). En el sinaptoplasma (Tabla 3.4) se encontró la máxima actividad de PPCE de las diferentes subfracciones. Cuando se cuantificó la actividad en presencia de DTT y EDTA esta aumentó aproximadamente 1.4%.

3.8.3 Distribución Subcelular de las Enzimas que Degradan a Los Metabolitos de TRH.

a) Enzima con Actividad de Dipeptidil-Post prolina-Desamidasa (PPDA).

En el fraccionamiento de las fracciones crudas esta enzima se enriqueció en N (Tabla 3.1 y 3.2) posiblemente por la presencia de membranas plasmáticas en esta fracción. En las subfracciones la banda sinaptosomal B mostró la máxima actividad específica (Tabla 3.5). En las fracciones solubles CE y S no se detectó este metabolito, a pesar de que en CE y en S se expresan la PGA encargadas de generar el sustrato his-proNH₂ de la PPDA. La ausencia de actividad pudiera deberse a la presencia de inhibidores que en condiciones normales no están en contacto con la enzima o por que la cinética de formación espontánea de la DKP es mayor que la actividad de PPDA en estas condiciones.

En las subfracciones, B presentó la mayor actividad (Tabla 3.3) aunque en las otras subfracciones también hubo formación de este metabolito.

b Enzima con Actividad de Histidil-Prolin-Imi-
nopeptidasa (IP)

En forma similar a la PPDA, la IP Únicamente se expresó en las fracciones membranales (Tabla 3.1), pero sin enriquecimiento en ninguna de ellas y al subfraccionar a ML la actividad Únicamente se encontró en la banda sinap-tosomal C (Tabla 3.3).

Esta enzima fué caracterizada por Matsui (112) como del grupo tiófico por lo que para proteger sus grupos-SH utilizaron DTT en las incubaciones, también observaron que la máxima expresión de la enzima se lleva a cabo en amortiguador fosfatos mientras que en presencia de Tris hay disminución de la actividad. La no formación de prolinamida en las diferentes subfracciones puede deberse a que las condiciones óptimas para la IP no fueron realizadas en estos ensayos ya que el amortiguador de incubación fué Tris 10 mM. Aunque también se puede pensar que hubo competencia de sustrato (his-proNH₂) entre la IP y la PPDA aunado a la ciclización no enzimática de este metabolito.

3.9 DISCUSION

En la búsqueda de los mecanismos involucrados en la inactivación de neuropéptidos activos, se ha acumulado evidencia que favorece a la degradación enzimática como la responsable. Si bien han sido caracterizadas varias enzimas capaces de degradar diversos neuropéptidos (90,125), lo importante será establecer cual de todas las actividades está involucrada en el mecanismo fisiológico de inactivación y si esta degradación puede actuar como un elemento regulador de las funciones del péptido.

Como se describió en la Introducción, en el caso del TRH se han descrito dos actividades que actúan directamente en la molécula (Figura 3.1).

La PPCE que produce TRH ácido (108,109,110) y la PGA de la cual se han descrito 3 actividades, una sérica o "tiroliberinasa" (99,119), una soluble (SH) y una membranal (metaloproteasa). Para que las enzimas solubles PPCE y PGA-SH intervengan en la inactivación de el péptido liberado se requiere como primer evento la recaptura del TRH o bien la liberación de peptidasas en el momento de la liberación del neuro modulator. En el laboratorio no se ha demostrado la existen-

cia de la liberación de dichas peptidasas (J. Miranda trabajo no publicado), y como se demostró en este trabajo la captura de TRH no parece ocurrir en la terminal nerviosa. En base a estos resultados negativos y a lo descrito para la encefalinasa, sustancia P y otros neuropéptidos sobre su ubicación en terminal nerviosa hacen que la enzima membranal adquiera importancia como el principal mecanismo de inactivación de TRH.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren fuertemente que la actividad de la PGA-M tiene una compartimentalización muy específica en la membrana de la terminal nerviosa, teniendo así acceso al TRH liberado. Sus características bioquímicas y su ubicación la hacen un candidato importante en la terminación de la actividad del TRH.

Schwartz (1981) propuso ciertos criterios para la caracterización de neuropeptidasas (Tabla 3,6). Uno de los puntos sugiere la adecuada ubicación de la enzima degradativa. La localización de la metaloproteasa en membranas sinaptosomales es consistente con este punto y con resultados previos del laboratorio que muestran a la enzima detectada en rebanadas de cerebro que fueron lavadas exhaustivamente sugiriendo esto su localización membranal en la cara externa. Datos preliminares en este laboratorio sugieren que la dis-

1. LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS SON BIOLÓGICAMENTE INACTIVOS.
2. LA ENZIMA ESTA ESTRATEGICAMENTE UBICADA PARA PRODUCIR LA HIDROLISIS DE LOS NEUROPEPTIDOS LIBERADOS A LA SINAPSIS.
3. LA ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO DA CUENTA DEL AUMENTO EN ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANALOGOS SINTÉTICOS.
4. LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEBE EXHIBIR CAMBIOS ADAPTIVOS PARA MODIFICAR LA NEUROTRANSMISIÓN.
5. LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DEBE PROTEGER AL NEUROPEPTIDO LIBERADO A LA SINAPSIS.
6. LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DEBE PRODUCIR LA ACCIÓN BIOLÓGICA DEL NEUROPEPTIDO.

TABLA 3.6: CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NEUROPEPTIDASAS INACTIVANTES (SCHWARTZ ET AL, 1981)

tribución de TRH, de sus receptores así como de la PGA-M son similares (Tesis en proceso).

Otro de los postulados para la caracterización de neuropeptidasas es la especificidad de la enzima por el sustrato y el aumento de la actividad biológica producida por análogos sintéticos. Garat, B. (1985) reportó la alta especificidad de la PGA-M por TRH en forma similar a la "tiro-liberinasas". En estudios de degradación con análogos sintéticos para el TRH, Griffiths (106) encontró que (3Me-His) TRH es ligeramente resistente a la degradación dando con esto mayor actividad biológica y sugiere que esto puede estar dado por el aumento en afinidad del análogo a los receptores en SNC e hipófisis combinado con la estabilidad del análogo.

El aumento de la actividad biológica cuando se protege al neuropéptido inhibiendo a la neuropeptidasa es otro de los puntos en la caracterización de esta proteasa. Para la PGA-M se han hecho estudios in vitro que corroboran lo propuesto en este punto, in vivo es necesario estudiar los casos donde la relación de metabolitos inactivos y TRH está modificada ya sea por patología o por cambios fisiológicos.

La PGA-M genera his-pronH₂ que en ciertas condi

ciones se cicliza espontáneamente formando DKP. este metabolito es un producto biológicamente activo y se ha demostrado -- que en ciertos casos antagoniza la actividad de TRH (126) -- mientras que en otras la potencia. Esto concuerda con el postulado de Schwartz donde la PGA-M genera un metabolito inactivo (his-proNH₂)²; aunque en el caso de TRH también es capaz de transformarse en un producto activo con funciones diferentes.

El fenómeno de inactivación, por lo tanto puede involucrar alguno de los siguientes mecanismos:

- a Que el histidil-prolinamida sea captado inmediatamente al ser generado por la PGA-M.
- b Desamidación de histidil-prolinamida por la PPDA.
- c Ciclización de his-proNH₂ a DKP.

Es importante también determinar la presencia de receptores para la DKP ya que si los sitios de reconocimiento no están cercanos a la zona de generación de esta, el metabolito podría ser eliminado como producto inactivo.

La localización de la PPDA en membranas corrobora lo anteriormente reportado por otros autores (108) y por -

este laboratorio (generación de histidil-prolina por rebanadas de cerebro). El enriquecimiento de esta enzima se encontró en la banda sinaptosomal B en forma similar a lo encontrado para la PGA-M de la actividad de la PPDA inmediatamente después de la formación de histidil-prolinamida.

En contraste, la presencia de prolinamida únicamente en la fracción C pudiera deberse a que la IP se encuentra en vesículas que en el momento del fraccionamiento migran a la misma densidad que esta fracción sinaptosomal. Por otro lado si bien se ha reportado que tanto B como C con fracciones enriquecidas en sinaptosomas, éstas pueden representar poblaciones celulares diferentes bioquímicamente. A este respecto Porter (74) reportó que aunque no existen diferencias morfológicas entre las poblaciones de sinaptosomas si las hay en el contenido de neurotransmisores. Con los resultados obtenidos en este trabajo es difícil concluir sobre la ubicación de la IP, sin embargo, no parece coincidir en la fracción donde existen las actividades máximas de la PGA-M y PPDA. Además no se detectó prolinamida en rebanadas de cerebro por lo que el destino metabólico del TRH liberado es a DKP y/o histidil-prolina.

En relación a la ubicación y actividad de la PPCE y de la PGA (SH) los datos de este trabajo son consistentes con lo reportado anteriormente (99,107), describiéndolas como enzimas solubles. Estas actividades en forma similar a -

la LDH se encontraron enriquecidas en el citoplasma. La poca actividad de las enzimas degradativas solubles (PPCE y PGA - SH) en terminal nerviosa fué un resultado importante, ya -- que parecieran no estar involucrados en la inactivación del TRH liberado.

Para que estas enzimas tuvieran un papel importante en la inactivación del TRH liberado, el primer paso se ría la captura del péptido para posteriormente ser degradado.

Hasta este momento es difícil concluir si la actividad de estas enzimas está involucrada en la regulación de la poza interna (preliberables).

Por las características descritas, la PGA-M representa la etapa inicial del catabolismo del TRH liberado (Figura 3.1), sin embargo, es necesario conocer más sobre la enzima para concluir que realmente es uno de los mecanismos reguladores de la actividad del TRH o bien solo la responsable de su inactivación.

Para ello es necesario purificar la enzima y -- compararla con la PGA sérica, observar si existen regiones de las proteínas similares en cuanto a secuencia ya que se podría tratar de enzimas con un origen común pero de procesa

mientos diferentes, ya que ambas cortan específicamente al TRH y son inactivadas por DTT y EDTA. En un futuro se podría determinar si provienen del mismo gen que al ser transcrito tiene un procesamiento diferente dependiendo del órgano donde se expresa, o quizá podría tratarse de una familia de genes que se expresan en tejidos diferentes. Será importante definir si la enzima se encuentra regulada y como, si varía su concentración en condiciones patológicas donde el TRH o algún metabolito se ve incrementado. La caracterización fina de la enzima permitirá además, el diseño de inhibidores específicos o de análogos al TRH que no sean susceptibles a la degradación y permanezcan activos. Esto repercutirá en el uso farmacológico del TRH en estados de deficiencia en la función hipotálamo-hipofisiaria o bien en su aplicación como antidepresivo.

Si bien se concluye que existe una enzima en membranas de la terminal nerviosa que es capaz de inactivar al TRH, aún es necesario demostrar que este es el único mecanismo de inactivación o que dependiendo de la región del cerebro o el estado fisiológico se expresan otros mecanismos. Aunque con los experimentos de este trabajo se concluye que el TRH no es captado en terminal nerviosa de neuronas hipotalámicas, por un mecanismo similar al de los neurotransmisores clásicos, es necesario probar otras regiones TRHérgicas donde la concen

tracción de terminales que contengan al neuropéptido sea mayor que en hipotálamo y donde se haya demostrado actividad neurotransmisora o neuromoduladora.

Otra posibilidad es que los mecanismos de inactivación no sean generales para todas las regiones del cerebro o para todos los neuropéptidos. Podría pensarse en zonas donde quizá la captura sea el fenómeno presente mientras que en otras tal vez sea la degradación. También es posible que los mecanismos sean inducidos por otros factores como podría ser la misma liberación del péptido que actúe como mensajero (TRH liberado) en la misma neurona permitiendo con esto la exposición de receptores para la captura o de la enzima degradativa.

Para esclarecer estos puntos será necesario establecer nuevas estrategias en las cuales se pueda estudiar el mecanismo fisiológico de inactivación del péptido liberado como por ejemplo someter a incubación rebanadas de diferentes regiones del cerebro, en las que se cause la liberación del péptido por agentes despolarizantes y se estudie si la liberación estimula la captura en alguna de estas regiones. También se puede utilizar el cultivo de células que permita identificar las células responsables de estos fenómenos.

-93-

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

93

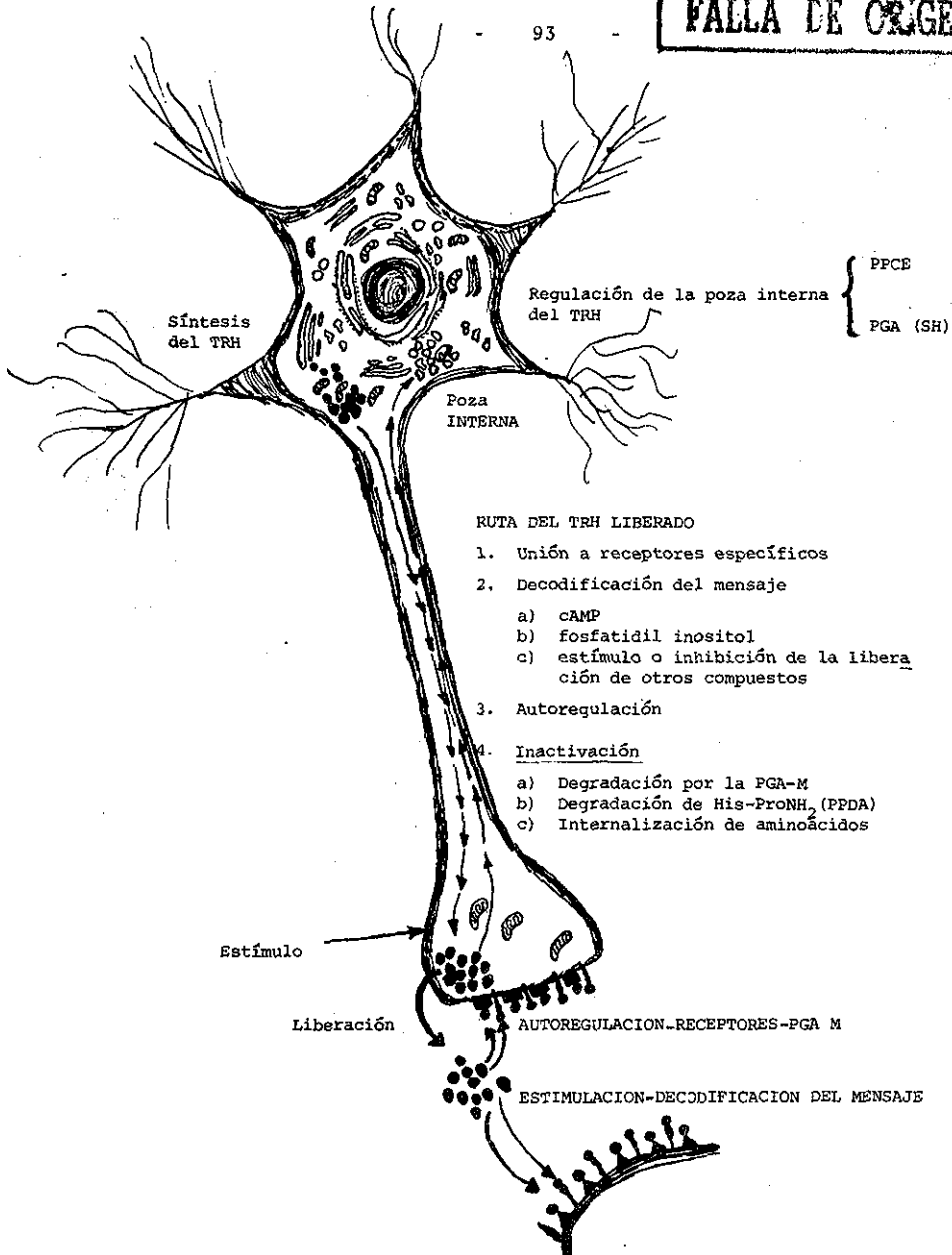


FIGURA 3.3 METABOLISMO DEL TRH

4. RESUMEN

Han sido reconocidos diferentes mecanismos de inactivación mediante los cuales la actividad de los neurotransmisores se ve limitada, estos mecanismos son:

1 La internalización del neurotransmisor liberado por la misma terminal que lo liberó o por estructuras cercanas como son las células gliales.

2 La degradación extracelular del neurotransmisor liberado formándose metabolitos sin actividad biológica. Tomando como base el conocimiento acumulado sobre la inactivación de diferentes neurotransmisores como son ciertos aminoácidos y monoaminas, en este trabajo se estudiaron los dos posibles mecanismos involucrados en la limitación de la actividad de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH).

Antes de la realización de este trabajo existían ciertas evidencias que apoyaban tanto a la internalización como a la degradación del TRH como mecanismos de inactivación.

Por un lado Charli y col. (89) demostraron que en rebanadas de hipotálamo el TRH es internalizado por un mecanismo de alta afinidad, dependiente de energía (por su inhibición con DNP y ouabaina) y de temperatura. Estas características bioquímicas del mecanismo de transporte del TRH son similares a las encontradas para neurotransmisores como Gaba, dopamina, etc., por lo que se pensó que quizá la entidad celular capaz de internalizar el péptido era la terminal nerviosa.

Las condiciones experimentales utilizadas para la cuantificación de la internalización del péptido (ver Métodos) nos permitieron concluir que el TRH no es captado por las fracciones enriquecidas en sinaptosomas (fracción ML y B) de hipotálamo. Nos fué imposible diferenciar entre el TRH asociado inespecíficamente del asociado específicamente.

Por otro lado Garat y col. (125) demostraron la existencia de una actividad enzimática capaz de degradar al TRH cuya localización en membranas totales de cerebro la hacían un candidato importante en la inactivación del TRH.

Ya que es importante la ubicación del mecanismo de inactivación de los neurotransmisores (como se ha descrito para la captura que se lleva a cabo en la terminal ner

viosa) era importante definir la localización subcelular de la enzima caracterizada por Garat (PGA-M). Se cuantificaron las actividades degradativas presentes en las diferentes -- fracciones subcelulares del cerebro y se comparó la distribución de estas con la de enzimas utilizadas como marcadores.

La actividad de PGA-M se encontró enriquecida en la fracción ML y al subfraccionar ésta, los sinaptosomas fueron los que presentaron la mayor actividad. La ubicación de esta enzima en la terminal nerviosa ha sido un parámetro importante que junto con las características de la enzima mencionadas en Discusión la hacen un candidato importante en la inactivación fisiológica del TRH.

Si bien en este trabajo no se observó la captura del TRH en hipotálamo esto aún no es definitivo con respecto a otras regiones del sistema nervioso. La internalización como mecanismo de inactivación podría ser específica de ciertas regiones o podría inducirse con ciertos estados fisiológicos.

Será importante diferenciar entre el TRH captado por un mecanismo de inactivación y el TRH que es internalizado pero actúa como mensajero dentro de la célula.

Por otra parte la degradación del péptido es otra forma de limitar la acción del TRH, la PGA-M tiene ciertas características bioquímicas ya mencionadas en la Discusión que la hacen ser el primer paso en la inactivación del péptido.

Será importante estudiar los dos mecanismos en diferentes regiones para así tener evidencias que apoyen a un mecanismo o al otro o quizá a los dos como la forma de inactivación del TRH.

5. CONCLUSIONES

- 1 El ^3H -TRH no es internalizado por fracciones enriquecidas con sinaptosomas.
- 2 La actividad de PGA-M se encontró enriquecida en membranas de la terminal nerviosa.
- 3 Las actividades degradativas de las enzimas PGA-SH -- y PPCE se encontraron enriquecidas en citoplasma sin embargo la actividad en sinaptoplasma es muy baja.
- 4 La actividad de PPDA se encontró enriquecida al igual que la PGA-M en las fracciones sinaptosomales.
- 5 La localización de las enzimas degradativas del TRH - se observó en fracciones muy específicas.
- 6 El primer paso en la inactivación del TRH es la PGA-M.

BIBLIOGRAFIA

1. En Anatomía Funcional del Sistema Nervioso (ed. Limusa) autor L. López Antúnez, pp 163-655 (1980).
2. Pradhan, S.N. y Dutta, S.N. "Central Cholinergic Mechanism and Behaviour". *Int. Rev. Neurobiol.* 14: 173-231, (1971).
3. Schubert, J. y Sundevall, A. "Effects of some Drugs on the Uptake of Acetylcholine in Cortex Slices of Mouse Brain". *J. Neurochem.* 14: 807-812, (1967).
4. Shimizu, H. y Daly, J.W. "Effect of Depolarizing Agents on Accumulation of Cyclic Adenosine 3'-5' monophosphate in Central Cortical Slices" *Eur. J. Pharmacol.* 17: 240-252, (1972).
5. Siggins, G.H., Hoffer, B.J. y Bloom, F.E. "Studies in Norepinephrine Containing Aferents to Purkinje Cells of Rat Cerebellum". *Brain Res.* 25: 535-555, (1971).
6. Werman, R. "Criteria for the Identification of General Nervous System Transmitter", *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 745-766, (1966).
7. Johnson, J.L. "Glutamic acid as a Synaptic Transmitter in the Nervous System", *Brain Res.* 37: 1-19, (1972).
8. Hebb, C. "CNS at the Cellular Level Identity of Transmitter Agents". *Ann. Rev. Physiol.* 32: 165-192, (1970).
9. Karobath, M. y Baldessarini, R.J. "Formation of Catechol Compounds from Phenylalanine and Tyrosine with Isolated Nerve Endings". *Nature New Biol.* 236: 206-208, (1972).
10. Karobath, M. "Serotonin Synthesis with Rat Brain Synaptosomes". *Biochem. Pharmacol.* 21: 1253-1263, (1972).
11. Baldessarini, R.J. y Karobath, M. "Biochemical Physiology of Central Synapsis". *Ann. Rev. Physiol.* 35: 273-304, (1973).
12. Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M. y Schultzberg, M. "Peptidergic Neurons". *Nature.* 284: 515-521, (1980).
13. Curtis, O.R. y Johnson, G.A.R. "Aminoacid Transmitters". In A. Lajtha (ed). *Handbook of Neurochemistry Vol. 4.* - Plenum Press, (New York), 1970, pp 115-134.

14. Iversen, L.L. y Neal, M.J. "The Uptake of ^3H -GABA by Slices of Rat Cerebral Cortex". *J. of Neurochem.* 15: 1141-1149, (1968).
15. De Feudis, F.V. "Aminoacids as Central Neurotransmitters". *Ann. Rev. Pharmacol.* 15: 105-130, (1975).
16. Iversen, L.L. "Neuropeptides". *Trends in Neuroscience.* 7: 293-294, (1983).
17. Fischer-Ferraro, C., Nahmod, V.E., Goldstein, D.J. y Finkielman, S.J. "Angiotensin and Renin in Rat and Dog Brain". *J. Exp. Med.* 133: 353-360, (1971).
18. Ganten, D., Marquez-Julio, A., Granger, P., Hayduk, K., Karsunky, K.P. y Genest, J. "Renin in Dog Brain". *Am. J. Physiol.* 221: 1733-1739, (1971).
19. Bloom, F.E. "Neuropeptides", *Scientific American.* 245: 114-124, (1981).
20. Snyder, H.S. "Brain Peptides as Neurotransmitters". *Science.* 209: 976-983, (1980).
21. Roberts, J.L., Phillips, M., Rosa, P.A. y Herbert, E. "Steps Involved in the Processing of Common Precursor Forms of Adenocorticotropin and Endorphin in Cultures of Mouse Pituitary Cells". *Biochem.* 17: 3609-3618, (1978).
22. Gainer, H., Sarne, J. y Brownstein, J. "Biosynthesis and Axonal Transport of Rat Neurohypophysial Proteins and Peptides". *The Journal of Cell Biology.* 73: 366-381, (1977).
23. Harman, A.J. "Three tachynins in Mammalian Brain". *Trends in Neuroscience.* 7: 58-61, (1984).
24. Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nishi, N. y Schally, A.V. "Somatostatin; Abundance of Immunoreactive Hormone in Rat Stomach and Pancreas". *Science.* 189: 1007-1009, (1975).
25. Millar, R.P., Ashnelt, C. y Rossier, G. "Higher Molecular Weight Immunoreactive Species of Luteinizing Hormone Releasing Hormone; Possible Precursors of the Hormone" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 720-731, (1977).

26. Scheller, R.H., Kaldany, R., Keiner, T., Mahon, A.C., Nambu, J.R. Schaefer, M. y Taussey, R. "Neuropeptides: Mediators of Behaviour in Aplysia" Science 225: 1300-1307, (1984).
27. Richter, K., Kawashima, E., Egger, R. y Kreil, G. "Bio synthesis of Thyrotropin Releasing Hormone in the Skin of Xenopus laevis: Partial Sequence of the Precursor Deduced from Cloned cDNA" EMBO Journal 3: 617-621, - - (1984).
28. Lundberg, J.M., Aggard, A., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T. "Vasoactive Intestinal Polypeptide in Cholinergic Neurons of Exocrin Glands: Functional Significance of - - Coexisting Transmitters for Vasodilation and Secretion". Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 1651,1655, (1980).
29. Hökfelt, T., Elfvin, L.G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M. y Luft, R. Occurrence of Somatostatin-Like Immunoreactivity in some Peripheral Sympatthetic Noradrenergic Neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 3587- - 3591, (1977).
30. Chan-Palay, V., Nilaver, G., Palay, S.L., Beinfeld, M.-C., Zimmerman, E.A., Wu, J.Y. y O'Donohue, T. L. "Chemical Heterogeneity in Cerebellar Purkinje Cells; Existence and Coexistence of Glutamic Acid Decarboxylase-Like and Motilin-Like Immunoreactivities". Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 7781-7791, (1981),
31. Lundberg, J.M. y Hökfelt, T. "Coexistence of Peptides and Classical Neurotransmitters" Trends in Neuroscience 7: 325-331, (1983).
32. Jan, Y.n., Bowers, C., Branton, W.D., Evans, L. y Jan, L.Y. "Peptides in Neuronal Function: Studies using Frog Autonomic Ganglia". Cold Spring Harbor Symp. Quant. - - Biol. Vol. XLVIII pp. 363-374, (1983).
33. Jan, Y.N. y Jan, L.Y. "A LHRH-Like Peptidergic Neurotransmitter Capable of" "action at distance" in Autonomic Ganglia". Trends in Neuroscience 7: 320-325, (1983).
34. Mitchell, P.R. y Martin, I.L. "Is GABA Release modulated by Presynaptic Receptors?" Nature 274: 904-905, (1978).
35. Cerrito, F. y Raitieri, M. "Serotonin Release is Modulated by Presynaptic Autoreceptor". Eur. J. Pharmacol. 57: 427-430, (1979).
36. Kamal, L., Arbilla, S. y Langer, S.Z. "Presynaptic Modulation of the Release of Dopamine from Rabbit Caudate Nucleus". J. Pharmacol. Exp. Ther. 216: 592-598, (1981).

37. Farnebo, L.O. y Hamberger, B. "Drug induced Changes in the Release of ^3H -Noradrenaline from the Field Stimulated Rat Iris". *Br. J. Pharmacol.* 43: 97-106, (1981).
38. Kuriyama, K., Kanmori, K., Taguchi, S. y Yorida, Y. - "Stress-Induced Enhancement of Suppression of ^3H -GABA Release from Striatal Slices by Presynaptic Autoreceptor". *J. Neurochem.* 42: 943-949, (1984).
39. Schally, A.V., Bowers, C.Y. y Redding, T.W. "Purification of Thyrotropic Hormone Releasing Factor from Bovine Hypothalamus". *Endocrinology* 78: 726-723, (1966).
40. Boler, J., Enzumann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y. y Schally, A.V. "The Identity and Chemical Properties of TRH and Piroglutamil-Histidyl-Prolinamide". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 705-710, (1969).
41. Bowers, C.Y., Lev, K.L. y Schally, A.V. "A Study on the Interaction of the Thyrotropin Releasing Factor and L-Triiodothyronine; Effects of Puromycin and Cycloheximide". *Endocrinology* 82: 75-82, (1968).
42. Guillemin, R., Yamasaki, E., Gard, D.A., Justis, M. y Sakiz, E. "In vitro Secretion of Thyrotropin (TSH) Stimulation by Hypothalamic Peptide (TRF)". *Endocrinology* 73: 564-572, (1963).
43. Burgus, R., Dunn, T.F., Desiderio, D., Waed, D., W. y Guillemin, R. "Characterization of the Hypothalamic Hypophysiotropic TSH Releasing Factor (TRF) of Bovine Origin". *Nature* 226: 321-325, (1970).
44. Grosvenor, C.E. y Mena, F. "Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin Releasing Hormone Factor may Function in the Releasing of Prolactin in the Lactating Rat". *Endocrinology* 107: 863-868, (1980).
45. Tashjian, A.M., Barowsky, N.J. y Jensen, D. K. "Thyrotropin-Releasing Hormone; Direct Evidence for Stimulating of Prolactin Production by Pituitary Cells Culture". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 516-523, (1971).
46. Kato, Y., Chiaia, K., Maada, K., Ohogo, S., Okanish, Y. y Imura, H. "Plasma Growth Hormone Responses to TRH in the Urethanes Anesthetized Rat". *Endocrinology* 96: 1112-1114, (1975).
47. Kubek, M.J., Lorencz, M.A. y Wilbur, J.F. "The Identification of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in Hypothalamic and Extrahypothalamic Loci of the Human Nervous System". *Brain Res.* 126: 196-200, (1977).

48. Winokur, A. y Utiger, R.D. "Thyrotropin Releasing Hormone: Regional Distribution in Rat Brain". Science 185: 265-266, (1974).
49. Jackson, I.M.D. y Reichlin, S. "Distribution and Biosynthesis of TRH in Nervous System". En: Central Nervous Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides. R. Colly, A. Barbeau, J.R. Ducharme y J.G. Rochefort (eds) pp 3-54 Raven Press (New York), (1979).
50. Jackson, I.M.D. "Extrahypothalamic and Phylogenetic Distribution of Hypothalamic Peptides in the Hypothalamus". En: S. Reichlin, R. Baldessarini y J.B. Martin (ed) pp 3-34, Raven Press, (New York), (1978).
51. Mitnick, M.A. y Reichlin, S. "Thyrotropin Releasing Hormone Biosynthesis by Rat Hypothalamic Fragments In vitro". Science 172: 1241-1243, (1971).
52. Mitnick, M.A. y Reichlin, S. "Enzymatic Synthesis of Thyrotropin Releasing (TRH) Hypothalamic "TRH" Synthetase" Endocrinology 91: 1146-1153, (1972).
53. Barnea, A., Ben-Jonhattan, N. y Porter, J.C. "Characterization of Hypothalamic Subcellular Particles Containing Luteinizing Hormone Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone" J. Neurochem. 27: 477-484, (1976).
54. Warberg, J., Escay, R.L., Barnea, A., Reynolds, R. C. y Porter, J.C. "Release of LHRH and TRH from Synaptosomal Enriched Fractions of Hypothalamic Homogenates". Endocrinology 100: 814-825, (1977).
55. Joseph Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, P.M. y Kordon, C. "Effect of Neurotransmitters on the in vitro Release of Immunoresctive Thyrotropin Releasing Hormone from Rat Mediobasal Hypothalamus". Endocrinology 104: 801-805, (1979).
56. Rostene, W.K., Morgat, J.L., Dussailant, M., Rainboe, T.C., Sarrieau, A., Vial, M. y Rosselin, G. "In vitro Biochemical Characterization and Autoradiographic Distribution of ³H-Thyrotropin Releasing Hormone Binding Sites in Rat Brain, Neuroendocrinology 39: 81-86, (1984).
57. Ogawa, N., Yasuhide, Y., Kurtsda, H., Nukina, I., Ota, Z., Fujino, M. y Yanaihara, N. "Characteristics of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Receptors in Rat Brain", Peptides 3: 669-677, (1982).

58. Taylor, R.L. y Burt, D.R. "Preparation of $^3\text{H}/3\text{Me-His/}$ TRH as an Improved Ligand for TRH Receptors". Neuroendocrinology 32: 310-316, (1981).
59. Sharif, N.A. y Burt, D.R. "Biochemical Similarity of Rat Pituitary and SNC TRH Receptors", Neuroscience Letters 39: 57-63, (1983).
60. Renaud, L.P., Martin, J.B. y Brazeau, P. "Depressant Action of TRH, LHRH and Somatostatine on Activity of Central Neurones", Nature 255: 233-235, (1975).
61. Taraskevich, P.S. y Douglas, W.W. "Action Potentials Occur in Cells of the Normal Anterior Pituitary Gland and are Stimulated by the Hypophysiotropic Peptide -- Tyritropin Releasing Hormone". Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4064-4067, (1977).
62. Renaud, L.P. y Martin, J.B. "Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Depressant Action on Central Neuronal Activity", Brain Res. 86: 150-154, (1975).
63. Nicoll, R. A. "Excitatory Action of TRH on Spinal Motoneurons", Nature 265: 242-243, (1977).
64. Sutton, C. A. y Marin, T.F.J. "Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Selectively and rapidly Stimulates Posphatidylinositol Turnover in GH pituitary Cells: A Possible Second Step of TRH Action". Endocrinology 110: 1273-1280, (1982).
65. Reichlin, S. "Hypothalamic-Pituitary Function". En: Proceedings of the 4th International Congress of Endocrinology Washington, pp 1-15. International Congress Series 273, Excerpta Medica, (Amsterdam).
66. Yarbrough, G.G. "Thyrotropin Releasing Hormone and CSN Cholinergic Neurons". Life Science 33: 111-118, (1983).
67. Rastogi, R.B. "Thyrotropin Releasing Hormone Influences on Behaviour: Possible Involvement of Brain Monoaminergic System", En: Central Nervous System of Hypothalamus Hormones and other Peptides, R. Collu, J.R. Ducharme, A. Barbeau y J.R. Rochefort (eds) pp 123-149, Raven Press (New York).

68. Bennett, G.W., Sharp, T., Brazell, M. y Marsden, C. A. "TRH and Catecholamine Neurotransmitter Release in the Central Nervous System". En: Thyrotropin Releasing Hormone E.C., Griffiths y F.W. Bennett (eds) pp 253-269, Raven Press, (New York), (1983).
69. Keller, H.H. Bartholini, G., Putter, A. "Enhancement of Cerebral Noradrenaline Turnover by Thyrotropin Releasing Hormone". Nature 248: 528-529, (1974).
70. Van Praag, H.M. y Kof, J. "Central Monoamine Deficiency in Depression". Pharmacopsychiatry 8: 322, 326, (1975).
71. Green, A.R. y Grahame-Smith, D.G. "TRH Potentiates Behavioural Changes Following Increase Brain 5-Hydroxytryptamine accumulation in Rats". Nature 251: 524-526, (1974).
72. Prange, A. J. y Utiger, R.D. "What Does Brain Thyrotropin Releasing Hormone Do". New England Journal of Medicine 305: 1089-1090, (1981).
73. Parker, C.R., Neaves, W.B., Barnea, A. y Porter, J. C. "Studies on Subsynaptosomal Localization of Luteinizing Hormone Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone in the Rat Hypothalamus". Endocrinology 102: 1167-1175, (1978).
74. Barnea, A., Johanayhan-Ben, N., Colston, C., Johnston, J.M. y Porter, J.C. "Differential subcellular compartmentalization of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and Gonadotropin Releasing Hormone (LHRH) in Hypothalamic Tissue. Proc. Natl Acad. Sci. 72: 3153-3159, (1975).
75. Bennett, G.W. En: Neuropeptides, Biochemical and Physiological Studies (ed. R.P. Millar) pp 61-77 Churchill Livington, Edinburgh.
76. Bennett, J.P., Mulder, A.H. y Snyder, S.H. "Neurochemical Correlates of Synaptically Active Amino Acids". Life Science 15: 1045-1056, (1974).
77. Snyder, S.H., Young, A.B., Bennett, J.P. y Mulder, A.H. "Synaptic Biochemistry of aminoacids". Fed. Proc. 32: 2039-2047, (1973).
78. Curtis, O. R. y Johnston, G.A.R. "Aminoacid Transmitters". En: A. Lajtha. Hand-book of Neurochemistry, vol. 4 (ed. A. Lajtha) pp 115-134, Plenum Press, New York, (1975).
79. Krajevic, K. "Chemical Nature of Synaptic Transmission". Physiol. Rev. 54: 419-540, (1974).

80. Iversen, L.L. "Role of Transmitter Uptake Mechanis in Synaptic Neurotransmission" *Br. J. Pharmacol.* 41: 571-591, (1971).
81. Levi, G. y Raitieri, M. "Detectability of High and Low Affinity Uptake System for GABA and Glutanato in Rat Brain Slices and Synaptosomes". *Life Sci.* 12: 81-88, (1973).
82. Bauman, A., Bourgoïn, S., Benda, P., Glowinski, J. y Hamon, M. "Characteristics of tryptofan accumulation by Glial Cells". *Brain Res.* 66: 253-263, (1974).
83. Balcar, V.J., Borg, J. Mandel, P. "High Affinity Up take of L-Glutamate and L-Aspartate by Glial Cells". *J. of Neurochem.* 28: 87-93, (1977).
84. Bond, P.A. "The Uptake of ^3H -GABA by Slices from various Regions of Rat Brain and the Effect of Lithium". *J. Neurochem.* 20: 511-517, (1973).
85. Lajtha, A. y Seshen, H. "Inhibition of Aminoacid Uptake by the Absence of Na^+ in Slices of Brain". *J. of Neurochem.* 24: 667-672, (1975).
86. Nakata, Y., Kusaka, Y., Yajima, H. y Segawa, T. "Active Uptake of Substance P Carboxy-Terminal Heptapeptide (5-11) into Rat Brain and Rabbit Spinal Cord Slices". *J. Neurochem.* 37: 1529-1534, (1981).
87. George, S.R. y Van Loon, G.R. "Met-Enkephalin Uptake by a Synaptosome Enriched Fraction of Rat Striatum". *Neuroscience Lett.* 26: 297-300, (1981).
88. Parker, C.R., Newes, W., Barnea, A. y Porter, J.C. "Studies on the Uptake of ^3H -Thyrotropin Releasing - Hormone and its Metabolites by Synaptosome preparation of Rat Brain". *Endocrinology.* 101: 66-75, (1977).
89. Charli, J.L., Ponce, G., Mc. Kelyv, J.F. y Joseph, P. "Accumulation of Thyrotropin Releasing Hormone by Rat Hypothalamic Slices". *J. Neurochem.* 42: 981-986, (1984).
90. Griffiths, E.C., Jeffcoate, S.L. y Holland, D.T. "Inactivation of Somatostatin by Peptidases in Different Areas of the Rat Brain". *Acta Endocrinol.* 85: 1-10, (1977).
91. Loudes, P., Joseph, B.P., Leblanc, P. y Kordon, C. "Specific Activity of LHRH and TRH Degrading Enzymes in Various Tissues of Normal and Castrated Male Rats". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 921-926, (1978).

92. Bauer, K. y Liplan, F. "Attempts Toward the Biosynthesis of the Thyrotropin Releasing Hormone and Studies on its Breakdown in Hypothalamic Tissue Preparations". *Endocrinology*. 99: 230-245, (1976).
93. Horsthemke, B., Leblanc, P., Kordon, C., Wattiaux, De Coninck, S., Wattiaux, R. y Bauer, K. "Subcellular -- Distribution of Particle Bound Neutral Peptidases Capable of Hydrolysing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and Substance P.". *Eur. J. Biochem.* 139:315-320, (1984).
94. Checler, F., Kiybagi, P. y Vincent, J.P. "Degradation of Neurotensin by Brain Synaptic Membranes". *Annals of the New York Academy of Science*. 413-414, (1983).
95. Griffiths, E.C., Mc Dermott, J.R. y Visser, T. "Mechanism of TRH Inactivation Physiological Significance of TRH Degrading Enzymes". *En: Thyrotropin Releasing Hormone* (ed: E.C. Griffiths y G.W. Bennett) pp 85-94, -- Raven Press New York, (1983).
96. Bauer, K. y Kleinkauf, H. "Catabolism of Thyroliberin by Rat Adenohypophyseal Tissue Extract". *J. Biochem.* -- 106: 107-117, (1980).
97. Bauer, K. "Biochemical Properties of TRH Inactivating-Enzymes". *En: Thyrotropin Releasing Hormone* (ed. E.C. Griffiths y G. W. Bennett) pp 103-107, Raven Press, -- New York, (1983).
98. Prasad, Ch. y Peterkofsky, A. "Demonstration of Pyroglutamil Peptides and Amidase Activity Toward TRH in Hamster Hypothalamus Extracts". *J. Biol. Chem.* 251: 3229-3234, (1976).
99. Bauer, K., Kleinkauf, H. y Flohé, L. "Degradation of -- TRF and TRF Analogues by a Brain and Serum Enzyme. *En: Structure and Activity of Natural Peptides* (ed. W. -- Voelter y G. Weitzel) pp 437-447, Walter de Gruyter, -- Berlin, (1981).
100. Szewezuk, A. y Mulczyk, M. "Pyrrolidonyl Peptidase in Animals". *Eur. J. Biochem.* 8: 63-68, (1969).
101. Szewesuk, A. Y Kwiatowska, J. "Pyrrolidonyl Peptidase in Bacteria". *Eur. J. Biochem.* 15: 92-96, (1970).

102. Bauer, K. "Regulation of Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone by Thyroid Hormones". *Nature* 259: 591-593, (1976).
103. Neary, J.T., Kieffer, J.D., Fecerico, P. y Maloof, H.M. F. "Thyrotropin Releasing Hormone: Development of Inactivation System During Maturation of the Rat" *Science* - 193: 403-405, (1976).
104. Faivre-Bauman, A., Knisarschek, H., Tixier-Vidal, A. y Bauer, K. "Ontogenesis of Neuropeptide Degrading Enzyme in the Mouse Brain". *J. of Neuroscience*, 6: 63-74, - - (1981).
105. Greaney, A., Phelan, J. y O'Cuinn, G. "Localization of Thyroliberin Pyroglutamylaminopeptidase on Synaptosomal Membrane Preparation of Guinea Pig Brain Tissue". *Biochem, Trans.* 588 th Meeting, Belfast, 483, (1980).
106. Griffiths, E.C., Mc Dermontt, J.R. y Smith, A.I. "Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and (3-Me-His) TRH by Brain Peptidases Studied by High Performance Liquid Chromatography". *Neurosc, Lett.* 28: 61-65, (1982).
107. Griffiths, E.C., Kelly, J.A., White, N. y Jeffcoate, S. L. "Further Studies on the Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by Enzymes in the Rat Hypothalamus". *Acta Endocrinol.* 93 385-391, (1980).
108. Tadashai, Y., Foschl, M., Orlowski, R.C. y Walter, R. "Post-Proline Cleaving Enzyme and Post-Proline Dipeptidyl Aminopeptidase". *Journal of Biol. Chem.* 253: 3768-3776, (1978).
109. Rupnow, J.H., Taylor, W. y Dixon, J.E. "Purification -- and Characterization of a Thyrotropin Releasing Hormone Deamidase Activity from Rat Brain". *Biochem.* 18: 1206-1212, (1979).
110. Tate, S. "Purification and Properties of a Bovine Brain-Thyrotropin Releasing Hormone Factor Deamidase". *Eur. J. Biochem.* 118: 17-23, (1981).
111. Koida, M. y Walter, R. "Post-Proline Cleavage Enzyme: Purification of this Endopeptidase by Affinity Chromatography". *J. Biol. Chem.* 251: 7593-7599, (1976).

112. Matsui, T., Prasad, Ch. y Peterkofsky, A. "Metabolism of Thyrotropin Releasing Hormone in Brain Extract. -- Isolation of an Imidopeptidase for Histidyl-Prolinamide". *J. of Biol. Chem.* 218: 2439-2445, (1979).
113. Mori, M., Prasad, Ch. y Wilber, F.J. "Chronic Alcohol Consumption Increases Cyclo (his-Pro)-Like Immunoreactivity in the Rat Brain". *J. Neurochem.* 38: 1785-1786, (1982).
114. Johnson, M.K. y Whittaker, V.P. "Lactate Dehydrogenase as Cytoplasmic marker in Brain". *Biochem. J.* 88: 404-409, (1963).
115. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. "Protein Measurements with Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, (1951).
116. Koenig, H., Gaines, D., Mc Donald, T., Gray, R. y -- Scott, J. "Studies of Brain Lysosomes I". *J. Neurochem.* 11: 729-743, (1964).
117. Cotman, C.W. y Mathews, D.A. "Synaptic Plasma Membranes from Rat Brain Synaptosomes: Isolation and Partial Characterization". *Biochem. Biophys. Acta.* 249: 380-394, (1971).
118. Pacheco, M.F., Woodward, D.J., Mc Kelvy, J. F. y Griffin, W.S.T. "TRH in Rat Cerebellum.II. Uptake by Cerebellar Slices". *Peptides* 2: 268-278, (1981).
119. Suzuki, K. "Enzymic Diagnosis of Sphingolipidosis". En: *Methods in Enzymology L* (ed. V. Ginsburg) pp 456-488, (1978).
120. Bray, G.A. En: *The Current State of Liquid Scintillation Counting* (E.D. Brandsome ed.) pp 170, Grune y Stratton, New York, (1970).
121. De Duve, C. The Separation and Characterization of Subcellular Particles Harvey Lectures, 59: 49-87, (1963).
122. De Duve, C. Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F. Tissue Fractionation Studies, Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat Liver - Tissue. *Biochem. J.* 60: 601-617, (1955).

123. Bradford, H.F. "Cerebral cortex slices and synaptosomes. In vitro approaches to brain metabolism". Methods in -- Neurochem 3: 155 Marcel Dekker, New York, (1972).
124. Warberg, J., Parker, R., Oliver, C., Barnea, A. y Parker, J.C. "Ion induced release of LHRH, TRH and α MSH from hypothalamic synaptosomes and its inhibition by venblas-tine". Pflugess Arch 385: 79-84, (1980).
125. Garat, B., Miranda, J., Charli, J.L. and Joseph Bravo P. "Presence of a Membrane Bound Pyroglutamyl Amino Pepti--dase Degrading Specifically Thyrotropin Releasing Hormo--ne in Rat Brain". Neuropeptides 6: 27-47, (1985).