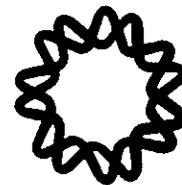




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



03072
729

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

ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* DE LA
DISTRIBUCIÓN DEL ARNm DE LA
PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II
EN EL CEREBRO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

Q.F.B. PAOLA JASSO CASTRO

Cuernavaca, Morelos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

25 8237

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Jean Louis Charli Casalonga.

Secretario: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay.

Vocal: Dr. Raúl Aguilar Roblero.

Suplente: Dr. Mario Zurita Ortega.

Suplente: Dra. Rosa María Uribe Villegas.

Este trabajo de tesis se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la supervisión de los Doctores Jean Louis Charli Casalonga y Rosa Ma. Uribe Villegas.

La realización de los estudios de maestría y del presente trabajo recibieron el apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y DGAPA-UNAM.

A mis padres por su apoyo incondicional en mi superación profesional.

A mi hermano por que su presencia siempre sera un incentivo para realizar mejor mis proyectos.

A Armando por su cariño, apoyo y paciencia durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jean Louis Charli por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría así como su asesoramiento durante la realización del proyecto.

A la Dra. Rosa María Uribe por su interés en formarme como científica y por su apoyo incondicional.

A los miembros del jurado por la revisión de este estudio.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio.

A mis maestros, compañeros y amigos del Instituto de Biotecnología.

ÍNDICE

I.-RESUMEN.....	5
II.-INTRODUCCIÓN.	
I.-NEUROPEPTIDOS.	
A)Antecedentes.....	6
B)Biosíntesis y transporte.....	8
C)Liberación.....	10
D)Efectosbiológicos.....	10
2.-INACTIVACIÓNDENEUROPEPTIDOS.	
A)Mecanismosdeinactivación:.....	13
a) Arrastre ó difusión.....	13
b) Internalizacióndelcomplejoreceptor-ligando.....	14
c) Modificacióncovalente.....	15
d) Captura.....	15
e) Degradaciónenzimáticaóhidrólisis.....	16
3.-NEUROPEPTIDASAS.....	18
4.-LAPIROGLUTAMILPEPTIDASAII.....	25
III.- JUSTIFICACIÓN.....	35
IV.- OBJETIVO.....	36
V.-MATERIALESYMÉTODOS.....	37
VI.- RESULTADOS.....	53
VII.-DISCUSIÓN.....	66
VIII.-CONCLUSIONES.....	73
IX.-ANEXOS.....	74
X.-REFERENCIAS.....	82

I RESÚMEN

La piroglutamil peptidasa II (PPII; EC 3.4.19.6) es una ectoenzima que hidroliza el enlace piroglu-his de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) con una especificidad muy estrecha. Está principalmente presente en neuronas del cerebro, presumiblemente en membranas postsinápticas. Para encontrar de que manera la distribución de la PPII correlaciona con marcadores de las sinápsis de la TRH, hemos analizado por hibridación *in situ* la distribución macroscópica y microscópica del ARNm de la PPII en el cerebro de la rata. Fue utilizado un par de oligonucleótidos específicos de 50 pares de bases marcados con ^{35}S y un ARNc marcado con ^{35}S . Se realizaron distintos controles para determinar la especificidad de los oligonucleótidos. Las señales fueron desplazadas con oligonucleótidos homólogos fríos; los dos cincuentámeros dan el mismo patrón de hibridación; la señal en adenohipófisis se incrementó en animales tratados con triyodotironina, de acuerdo a lo reportado para el ARNm de la PPII. También se realizaron controles para determinar la especificidad de la hibridación *in situ* con el ARNc como sonda. La sonda hibridó con las especies de ARNm esperadas en un "Northern blot"; la señal se desplazó con exceso de ARNc frío y no se observó hibridación con ARNc sentido. Ambos tipos de sondas dieron el mismo patrón de hibridación a nivel macroscópico, observándose señal intensa en regiones corticales (corteza piriforme, cingulata, rinal...) y en las capas del hipocampo. Niveles menores de ARNm fueron detectados a nivel de microautoradiografía en el colículo superior, núcleo septal, núcleo mamilar, el núcleo hipotalámico anterior. El ARNm no se observó en el giro dentado y en algunos núcleos talámicos como el núcleo reticular. Estos resultados fueron consistentes con el análisis de la distribución regional del ARNm de la PPII observado por "Northern blot", y por el ensayo de protección a ARNasa. Hay una buena correlación entre las distribuciones de los ARNm de la PPII y del receptor de la TRH aunque se observaron excepciones. Se sugiere que en muchas regiones el receptor de la TRH y la PPII están colocalizados en las mismas células lo que apoya la hipótesis de que la PPII está involucrada en la inactivación de la TRH en el cerebro.

II INTRODUCCIÓN

I.-NEUROPEPTIDOS

A) Antecedentes

El Sistema Nervioso Central (SNC) emplea distintas estrategias para almacenar, integrar y transmitir información entre sus células; las más importantes son: I) el potencial de acción, II) la comunicación eléctrica, a través de "gap junctions", y III) la comunicación química en las sinápsis neuronales, siendo a través de esta última que se lleva a cabo la mayor parte de la comunicación intercelular (1,2).

La transmisión de señales químicas en el SNC se lleva a cabo por medio de sustancias liberadas por células (neuronas, glía) al espacio extracelular pudiendo afectar la actividad de otra célula ó célula blanco, p.e neurona, célula glial ó célula muscular de manera específica. Estas sustancias se dividen en 3 categorías: a) neurotransmisores (NTs) clásicos o convencionales (acetilcolina, ácido γ -amino butírico, glicina, glutamato, aspartato, monoaminas); b) NTs probables o candidatos (por ejemplo algunos péptidos); y c) neuromoduladores (neuropéptidos y catecolaminas) ó neurohormonas (3).

Los NTs y neuromoduladores cuentan con las siguientes características: a) son sintetizados en una neurona junto con la(s) enzima(s) y el(los) sustrato(s) para la síntesis del mismo; b) están presentes en la terminal sináptica y son liberados de una manera calcio dependiente al presentarse un estímulo neuronal; c) ejercen una actividad fisiológica precisa en la célula postsináptica ó blanco; d) presentan algún(os) tipo(s) de mecanismo(s) específico(s) de inactivación en el sitio de acción ó de liberación (3,4).

El estudio de los neuropéptidos (NPs) en el SNC empieza en los años 50's con el descubrimiento y la caracterización de la vasopresina y la oxitocina (3). Posteriormente se descubrirían péptidos hipofisiotrópicos: la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y la somatostatina (SS) (3,5,6). A partir de entonces se han caracterizado numerosos NPs como son los presentados en la tabla 1 (modificación de 7).

TABLA 1

NEUROPEPTIDOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	
Angiotensina II (AT-II)	Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH)
Bombesina	Insulina
Bradikinina	Kiotorfina
Calcitonina	Lipotrofinas (β -LPH y γ -LPH)
Carnosina	Motilina
Colecistoquinina (CCK)	Neoendorfinas a y b
Dinorfina	Neurokininas A y B
Encefalinas (Leu y Met)	Neuropéptidos P, Y y K (NPP, NPY y NPK)
β endorfina	Neurotensina
Factor liberador de la corticotropina (CRF)	Oxitocina
Galanina (Gal)	Péptido atrial natriurético
Gastrina	Péptido HI
Glucagon	Péptido intestinal vasoactivo (VIP)
Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)
Hormona concentradora de la melanina (MCH)	Prolactina
Hormona del crecimiento (GH)	Secretina
Hormona estimuladora del melanocito (α -MSH)	Somatostatina (SS)
Hormona liberadora de la hormona del crecimiento	Sustancia K
Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH)	Sustancia P (SP)
	Urocortina
	Vasopresina (VP)

B) Biosíntesis y Transporte

Los neuropéptidos, con excepción de la carnosina, se sintetizan como parte de una proteína precursora y, por tanto, su síntesis, al igual que la de cualquier proteína, parte de la transcripción del gen que codifica al precursor del NP por la ARN polimerasa II, generando una molécula de ARN heteronuclear, la cual, antes de salir del núcleo, sufre modificaciones como: metilación en el extremo 5', poliadenilación en el extremo 3' (5) y eliminación de intrones (3,5).

El ARNm maduro es transportado al citoplasma en donde los ribosomas llevan a cabo su traducción. Una vez traducida la secuencia señal se le une una proteína denominada proteína de reconocimiento de la secuencia señal (SRP), que a su vez se unirá a su receptor localizado en el retículo endoplásmico rugoso (RER), de manera tal que la secuencia peptídica queda dentro del lumen de dicho compartimento. El complejo formado, unido al RER, continúa el proceso de traducción del ARNm generando el prepropéptido (5).

En general los prepropéptidos reúnen las siguientes características (6): a) presentan una secuencia amino terminal hidrofóbica de 20 ó 30 aa denominada: secuencia señal; b) la secuencia del NP se encuentra flanqueada por pares de aa básicos (lisina y/o arginina), aunque a veces pueden ser 1 ó 4 aa básicos; c) pueden contener secuencias con actividad biológica distinta o relacionada (POMC(6), encefalina (5,6,8)) y/o bien pueden contener varias copias de un mismo NP (TRH(6,9)).

El péptido señal del prepropéptido es cortado en el RER, obteniéndose el propéptido que, en este compartimento, puede sufrir una serie de modificaciones postraduccionales como N- glicosilaciones o formación de enlaces disulfuro, que le permiten obtener su conformación tridimensional final. Del RER los propéptidos son

transportados, en vesículas de clatrina, hacia el aparato de Golgi en donde le pueden ocurrir otras transformaciones como: amidación, sulfatación, O-glicosilación o fosforilación (6) y el inicio del procesamiento proteolítico. El procesamiento proteolítico se lleva a cabo por una(s) enzima(s) denominadas convertasas que liberan al NP de la secuencia peptídica al reconocer los pares de aa básicos que lo flanquean (6,10,11,12). Hasta ahora se conocen un gran número de enzimas que llevan a cabo el procesamiento proteolítico encontrándose expresadas de manera diferencial en el SNC. Se ha observado que un mismo propeptido puede ser procesado de una manera distinta en distintos tipos de células (por ejemplo: POMC) (6,10). En el trans-Golgi son empaquetados en vesículas de secreción, los proNPs parcialmente modificados y las enzimas procesadoras, de donde migrarán, por la vía regulada, hacia la terminal nerviosa. Es durante este trayecto que se termina el procesamiento proteolítico de los proNPs (10,13).

Después de la actividad de las convertasas, en las vesículas de secreción, una aminopeptidasa y la carboxipeptidasa E se encargarán de remover los aa básicos remanentes en el NP, de los extremos amino y carboxilo, respectivamente (10). Existen algunos NPs que en el extremo carboxilo terminal de su precursor presentan una glicina. Esta es una señal para que se dé el proceso de amidación del aminoácido anterior a la glicina por la enzima denominada PAM (peptidilglicina α amino monooxigenasa) compuesta por dos dominios peptidil glicina monooxigenasa (PGM) y peptidil amino glicolato liasa (PAL), los cuales se encargan de oxidar a la glicina y de llevar a cabo su dealquilación, respectivamente (10). En el caso de que el NP presente en su extremo amino terminal una glutamina, ésta será ciclizada por la glutaminilciclasa quien forma un grupo piroglu; esto ocurre, por ejemplo en el caso de la LHRH y de la TRH (6).

C) Liberación

Los péptidos ya procesados que se encuentran en las vesículas de secreción se mantienen en la terminal nerviosa (10,13), protegidos de enzimas degradadoras solubles, hasta que la neurona recibe un estímulo que la depolariza. Esta depolarización induce la liberación de las vesículas por medio de exocitosis de una manera calcio dependiente (1,14).

D) Efectos biológicos

Los neuropéptidos actúan sobre sus células blanco al interactuar con su receptor localizado en la membrana plasmática. Sus receptores generalmente pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. La activación del receptor puede modificar las propiedades eléctricas de la membrana plasmática o bien inducir la producción de segundos mensajeros ó ambos (15).

Desde su descubrimiento, se les han encontrado numerosas funciones biológicas a los NPs. Estudiando los péptidos hipotalámicos se observó que regulaban la liberación de las hormonas hipofisarias desempeñando funciones de neurohormonas. Por ejemplo, se vio que la TRH induce la liberación de la TSH en la adenohipófisis y que la somatostatina inhibe la liberación de la ACTH también en la adenohipófisis (14). Posteriormente se encontraron a estos mismos NPs, en distintas regiones del SNC, atribuyéndoles funciones distintas a las ejercidas en la adenohipófisis (16,17).

Si bien es claro que los NPs tienen acción sobre las células del SNC, no ha sido posible catalogarlos como NT clásicos, principalmente, por que, en general, no se conoce el circuito neuronal donde actúan y a que su mecanismo de acción es a menudo más lento. Esto llevó a clasificar a los NPs como neuromoduladores (14), debido a que cumplen con la definición de ser sustancias que afectan la excitabilidad de las neuronas y a que reúnen características de los neuromoduladores como son: a) no mostrar, de manera general, un efecto por sí solos pero si poder alterar los efectos de un NT, b) presentar cursos de acción lentos y de larga duración, c) poder ser liberados en procesos de secreción continuos ó intermitentes y d) inducir acciones intracelulares (3). Lo anterior es consistente con resultados que mostraron la colocalización de NPs y NTs clásicos (16,18) y con estudios en donde las actividades fisiológicas de los NTs clásicos son afectadas por los NPs. Por ejemplo, la actividad eléctrica neuronal provocada por el glutamato en el septum se vio aumentada cuando se administró con juntamente con VP; efecto contrario se observó en el área ventral septal, esto es, la actividad eléctrica inducida por el glutamato sufrió inhibición cuando se administró junto con la VP (7). Todos los anteriores estudios, junto con la comparación de la distribución de los NPs y sus receptores, en los casos de la TRH (9), las encefalinas (17), la SP (16,17), la bombesina, la CCK (7) son evidencias que indican que los NPs se comportan como neuromoduladores. Al parecer, los NPs también controlan la liberación de los neurotransmisores clásicos ya que se ha mostrado que por ejemplo la activación del receptor de la CCK en el núcleo hipotalámico ventral estimula la liberación de GABA, glicina y aspartato además de aumentar la liberación de dopamina en el núcleo acumbens (7). A los NPs se les han asociado numerosas funciones, algunas de éstas están descritas en la tabla 2.

TABLA 2

FUNCIONES DE NEUROPEPTIDOS	
Síntesis y/o liberación de otros NPs o de hormonas	TRH(3,9), LHRH(3,17), SS(17), NPY, CGRP, CCK(19), Gal(7)
Neurotransmisión	TRH(9), SP, encefalina(7)
Regulación de la reproducción	LHRH(16), VP(19)
Regulación de la temperatura corporal	TRH(9), VP(19)
Regulación del apetito	CCK(7,17), NPY, CGRP(7)
Regulación de la presión arterial	TRH(9), VP(19), NPY, VIP, CGRP, neurotensina, AT(17)
Regulación del ritmo cardíaco	TRH(8), VIP(19)
Regulación del ritmo respiratorio	VIP(19), NPY(7)
Regulación de la secreción gástrica	VIP, bombesina(17), neurotensina(7), TRH(9)
Regulación del mecanismo de dolor	Gal(7), encefalinas, SP, bradikina(17)
Modulan el aprendizaje y la memoria	Vasopresina(19), NPY(7), TRH(20)
Regulación de la división celular	ACTH, SP, neurotensina(22), VIP(21)
Regulación de la sobrevivencia neuronal	VIP(21)
Regulación del crecimiento de neuritas	VIP, SS, ACTH(21)
Regulación de la motilidad del cono de crecimiento	NPY, SS, CCK(22)
Regulación de la definición del fenotipo neuronal	CGRP, SP, sustancia K, leu-encefalina, TRH(22)
Regulación de funciones gliales	CCK, bombesina(23), VIP(21), angiotensina II, endotelina(24)
Inducción de factores tróficos de astrocitos	VIP(21)
Inducción de la síntesis de NP en glia	Encefalina, AT y SS(22)
Síntesis de IgG, proliferación de células T.	α endorfina(25,28)
Proliferación de células T, cascada inflamatoria.	Somatostatina(25,28)
Proliferación de células T y migración a parches de Peyer.	VIP(25,28)
Inducción de fiebre, síntesis de prostaglandinas y secreción de IL-2.	α MSH(25,28)
Proliferación de células T y macrófagos, cascada inflamatoria.	SP(25,28)
Inhibición de la función de las células "natural killers"	VIP(25,28)
Inducción de la generación de los linfocitos T citotóxicos	Hormona de crecimiento(25,28)
Supresión la producción de anticuerpos, estimulación del crecimiento de células B	ACTH(25,28)
Producción de IL2	TRH(25,28)

2.-INACTIVACIÓN DE NEUROPEPTIDOS

A) Mecanismos de inactivación

El SNC requiere que sus células se encuentren preparadas para recibir las señales que provienen del medio extracelular y transducirlas a su interior de una manera rápida. Para lo cual es necesario que dichas señales sean también terminadas rápidamente, dejando a la neurona lista para recibir una nueva señal (29,30).

Hasta ahora se han descrito varios mecanismos de inactivación para los neuropéptidos como son (29,30):

- a) Difusión y arrastre por el flujo extracelular.
- b) Internalización del complejo receptor-ligando.
- c) Modificación covalente.
- d) Captura.
- e) Hidrólisis o degradación enzimática.

A continuación se describirán de manera breve cada uno de los mecanismos.

a) Difusión y arrastre por el flujo extracelular. Este mecanismo consiste en que el NP, una vez liberado al medio extracelular, sea removido de su sitio de acción por difusión en el líquido extracelular. Si bien de alguna manera la difusión de los NPs en el SNC pudiera disminuir la concentración del NP en la sinápsis neuronal este mecanismo es lento y no parece ser importante en la inactivación de los NPs en el SNC. Sin embargo, el arrastre parece jugar un papel en la eliminación de NPs del espacio extracelular en todas aquellas células blanco que están irrigadas por la sangre (29). Otros autores han sugerido que la difusión pudiera funcionar como una alternativa de señalización celular en el SNC (2).

b) Internalización del complejo receptor-ligando. Este mecanismo, descrito primeramente en polipéptidos (lipoproteínas de baja densidad (LDL) y transferrina), consiste en que el complejo receptor-ligando, una vez formado, sea endocitado por medio de vesículas de clatrina (ó endosomas), las cuales, dentro del citoplasma, pueden seguir alguno(s) de los siguientes destinos (31):

a) El complejo receptor-ligando se disocia a nivel endosomal; el receptor se recicla a la superficie y el ligando es degradado por los lisosomas. Por ejemplo: LDL.

b) El complejo receptor-ligando es reciclado a la superficie, quedando ambos intactos. Por ejemplo: la transferrina.

c) El complejo es liberado por transitosis. Por ejemplo: IgA.

d) El complejo es transportado a los lisosomas y degradado en su totalidad. Por ejemplo: EGF.

Para los NPs este mecanismo ha sido descrito en pocos casos. Para la TRH se encontró, en células AtT20 y GH4CI, que el complejo es internalizado por medio de vesículas de clatrina, de forma evidente a los 5 minutos de estar en contacto el ligando con su receptor (32). Una vez que el complejo se encuentra internalizado, se demostró que puede ser reciclado y la TRH liberada al medio extracelular (32,33) o bien que puede sufrir degradación (32). Debido a la cinética que presenta este mecanismo se le ha propuesto como una manera de regular la concentración del receptor en la membrana. Pero, aunque también elimina de manera definitiva o temporal al NP, no lo hace con la rapidez que requiere la comunicación interneuronal en el SNC (33).

c) Modificación covalente. Este mecanismo puede llevarse a cabo en el espacio extracelular o antes de que el NP sea liberado (29) y consiste en la modificación química del péptido activo, pudiendo generar un producto inactivo (β endorfina) (29). No se ha visto para muchos NPs por lo que no se le considera un mecanismo de inactivación general de éstos.

d) Captura. Este mecanismo de inactivación puede llevarse a cabo por la neurona que libera al NP (presináptica), por la neurona blanco (postsináptica) o bien por las células gliales vecinas (29). Se ha demostrado para NTs clásicos que la captura se lleva a cabo por transporte activo en la membrana plasmática, esto es, depende de energía y temperatura (29). Para algunos NTs clásicos se ha observado que la velocidad del transporte depende de la región del SNC que se trate y del animal en que se haya estudiado. Se ha podido determinar para la glicina que su transportador introduce a la célula entre 3 a 6 nmol/mg de proteína en 4 minutos, y para la β alanina introduce entre 0.08 a 0.35 nmoles/mg de proteína en 5 minutos (34).

Para los NPs, este fenómeno, solo está demostrado para la carnosina, ya que en otros casos las evidencias de la existencia de este mecanismo son poco convincentes (29). Estudios orientados a esclarecer el papel de este mecanismo como mecanismo de inactivación de NPs se han realizado para la TRH, las encefalinas y un producto de degradación de la sustancia P. En el caso de la TRH se ha demostrado la existencia de un mecanismo de acumulación en rebanadas de cerebelo y de hipotálamo; los resultados obtenidos en presencia de inhibidores metabólicos indican que se pudiera tratar de un sistema de transporte activo con una Km de 1 a 10 μ M (29). Sin embargo, en el hipotálamo la Vmax es muy baja, y la relación del péptido acumulado en el tejido con respecto al presente en el medio es muy pequeña, lo cual sugiere que esta acumulación de TRH no es el mecanismo fisiológico de inactivación para este neuropéptido, postulándose que

podría corresponder al fenómeno de internalización mediado por receptores (29). En estos sistemas no se conoce cuál es el sitio de acumulación, neuronal o glial. Sin embargo, Parker y col(35) y Torres y col(36) han demostrado que sinaptosomas de cerebro no son capaces de capturar la TRH radiactiva. Por tanto, la TRH podría ser acumulada por otras células. Existen estudios que demuestran la captura para las encefalinas pero los autores no presentan datos de K_m y V_{max} de este fenómeno (29).

Estos datos sugieren que la captura no es el principal mecanismo de inactivación para eliminar a los NPs de las sinápsis químicas.

e) Degradación enzimática. El mecanismo de inactivación de los NPs por medio de peptidasas es, hasta ahora, el que más importancia ha cobrado dada la labilidad de los NPs en su presencia.

Para poder catalogar a las enzimas como una "neuropeptidasa" ha sido necesario establecer ciertos criterios como son (29,30,37):

- 1.-Que el(los) producto(s) de hidrólisis sea(n) biológicamente inactivo(s).
- 2.-Que la localización de la enzima sea tal que pueda hidrolizar a los NPs liberados al espacio extracelular.
- 3.-Que su actividad exhiba cambios adaptativos a una neurotransmisión modificada.
- 4.-Que su inhibición proteja a su sustrato liberado en la sinápsis, obteniéndose un incremento en la actividad biológica del péptido al estar éste más tiempo y/o en mayor concentración en contacto con su(s) receptor(es).

Aunque se ha observado que tanto enzimas membranales como solubles pueden inactivar NPs *in vitro*, investigaciones basadas en los criterios anteriores señalan que son las peptidasas membranales las que llevan a cabo la inactivación enzimática de los NPs en el espacio extracelular (29). En efecto, al emplear inhibidores específicos para las enzimas membranales se ha visto un aumento en la recuperación de su sustrato en rebanadas de cerebro ó un aumento en la actividad biológica del NP *in vivo* (ver capítulo siguiente). Sin embargo, las enzimas solubles extracelulares pudieran llegar a participar en la degradación de los NPs en el mecanismo de transmisión basado en la difusión propuesto recientemente para algunos NPs (2). En este trabajo se midió la difusión del NPY en el tálamo e hipotálamo observándose que su transmisión es muy lenta (1.5 mm/hr) comparada con la cinética de transmisión química de señales clásica la cual tomaría 5 mseg atravesar un espacio de aproximadamente 30 nm (2). Este mecanismo fue observado también para otros neuropéptidos: la β endorfina y para la sustancia P, aunque en estos últimos no se midió la velocidad de difusión (2). Si bien en este caso las neuropeptidasas solubles extracelulares pudieran controlar los niveles de NP en el medio extracelular (2), este mecanismo no ha sido probado.

3.-NEUROPEPTIDASAS.

Existen en la literatura varias "neuropeptidasas" reportadas, esto es, enzimas involucradas en la inactivación de los NPs pero su estudio, en la mayoría de los casos, se ha complicado o retrasado por la complejidad del SNC y/o por la falta de inhibidores específicos mediante los cuales se puedan caracterizar (30,37). En la tabla 3 se muestra una lista de las neuropeptidasas descritas hasta la fecha.

TABLA 3

NEUROPEPTIDASAS INVOLUCRADAS EN LA INACTIVACIÓN DE NEUROPEPTIDOS		
ENZIMA		SUSTRATO
Piroglutamilpeptidasas II (PPII)	EC. 3.4.19.6	TRH
Endopeptidasa 24.11	EC 3.4.24.11	Enkefalinas, sustancia P
Enzima convertidora de la angiotensina (ACE)	EC 3.4.15.1	Angiotensina II, bradikinina
Dipeptidilaminopeptidasa IV (DAP IV)	EC 3.4.14.5	Sustancia P, NPY
Aminopeptidasa M(N)	EC 3.4.11.2	Enkefalinas (Met y Tyr)
Aminopeptidasa MII		Enkefalinas
Aminopeptidasa A	EC 3.4.11.7	Angiotensina II
Enkefalinasasa B	EC 3.4.11.6	Enkefalinas
Endopeptidasa 24.15	EC 3.4.24.15	Neurotensina, bradikinina, LHRH
Endopeptidasa 24.16	EC 3.4.24.16	Neurotensina y somatostatina

Adaptación de 30 y 38.

Como se mencionó con anterioridad, estas enzimas presentan varias características en común, en particular están localizadas en la membrana plasmática celular, presentando el sitio activo hacia el espacio extracelular (ectoenzimas), lo cual concuerda con el concepto de que estuvieran localizadas en las sinápsis de tal manera que puedan regular la concentración de NP en el espacio sináptico (38). Para las endopeptidasas 24.15 y 24.16 no se ha demostrado claramente esta característica (30,38). En su mayoría, las neuropeptidasas son metaloproteasas, específicamente Zn^{2+} proteasas, con excepción de la DAPIV que es una serinoproteasa (30,38).

La distribución de 7 peptidasas en murinos demostró que éstas están enriquecidas en ciertas regiones del cerebro, proveyendo a cada región un grupo de actividades enzimáticas, que confieren, de acuerdo a su especificidad, una habilidad distinta para inactivar las señales peptídicas. Dicha regionalización del metabolismo peptídico puede contribuir al control de la vida media de los NPs y por tanto contribuir a la modulación de sus funciones neuromoduladoras (39).

En los trabajos encaminados a determinar la distribución regional de las neuropeptidasas en el SNC se ha encontrado que las endopeptidasas 24.11, 24.16 y las aminopeptidasas MII y A parecen coincidir con la distribución de los receptores a encefalinas (30), a neurotensina (30,40), a opiáceos (29) y a angiotensina (30), respectivamente. Esto parece indicar que, al menos para estos casos, las neuropeptidasas se podrían encontrar localizadas de tal manera que tienen acceso al NP cuando éste llega a su blanco. Y, aunque también se ha reportado colocalización de neuropeptidasas con NP en el caso de la endopeptidasa 24.11 (sustancia P) y la endopeptidasa 24.16 (neurotensina) (30), éstos no descartan la hipótesis anterior ya que, para la endopeptidasa 24.16, como se mencionó con anterioridad, su distribución coincide con la del receptor de neurotensina, y en este caso se podría tratar de una

regulación autócrina. Para la endopeptidasa 24.II no existen reportes que avalen o refuten la hipótesis mencionada.

Las neuropeptidasas presentan una distribución célula específica en el SNC. Algunas se localizan principalmente en neuronas, por ejemplo la PPII (41), la endopeptidasa 24.II (30) y la MII (29,30); otras se han reportado en astroglia; por ejemplo la aminopeptidasa N (30,42) y otras en ambos tipos celulares; por ejemplo las endopeptidasas 24.IV, 24.IV y la ACE (30). También es posible detectar actividad de neuropeptidasas en los vasos sanguíneos y la barrera hematoencefálica de la DAPIV (30) y las aminopeptidasas M y A (30). Estudios de localización realizados en el SN periférico indican la presencia de la endopeptidasa 24.II en las células de Schwann, colocalizada con el marcador de células gliales; a la DAPIV en células de Schwann y a la ACE y a la aminopeptidasa N en microvasos (43). Lo anterior concuerda con la necesidad de tener mecanismos de inactivación en estas células Schwann que también son blanco de los NPs (23,24) y para controlar la concentración de NP en los vasos sanguíneos (43).

Con el fin de determinar la especificidad de las neuropeptidasas por hidrolizar a los NPs se han realizado distintos estudios *in vitro* que mostraron la capacidad preferencial de las neuropeptidasas por hidrolizar a los NPs. En estos trabajos se observó que algunas de estas enzimas tienen capacidad catalítica en secuencias específicas, por ejemplo la endopeptidasa 24.II hidroliza los enlaces cuyo residuo en el extremo amino terminal es hidrofóbico y que no se encuentre en los extremos amino ó carboxilo terminal del NP (44,45); la DAPIV genera los dipéptidos X-Pro ó X-Ala que se encuentran en el extremo amino terminal de los NPs (46); la aminopeptidasa A remueve los a.a. Asp o Glu del extremo amino terminal (Asp-X) (47); la endopeptidasa 24.IV hidroliza enlaces de estructuras que presentan a.a. aromáticos en el primer a.a. del extremo amino terminal y en el primer y tercer a.a del extremo carboxilo terminal del enlace a hidrolizar y cuando

están presentes 3 residuos en el extremo carboxilo terminal libre del enlace a escindir (38); la PPII hidroliza el enlace pGlu-His de la estructura pGlu-His-X; donde X es ProNH₂ (TRH), Pro (TRH ácido), Pro-Gly (precursor de la TRH) ó Trp (48,49). Otras neuropeptidasas no tienen un enlace consenso hidrolizable muy definido; por ejemplo la aminopeptidasa N hidroliza los enlaces Ala-X donde X es Phe, Ile, Lys y el enlace Tyr-Glu preferencialmente de hexapéptidos (50), la ACE parece escindir dipéptidos de muchos sustratos (30) y la endopeptidasa 24.16 parece necesitar 3 residuos en el extremo carboxilo terminal del enlace a hidrolizar (38).

El empleo de inhibidores específicos para neuropeptidasas ha permitido estudiar el papel de las peptidasas en la degradación de los NPs. Los resultados de la aplicación de esta metodología en rebanadas de cerebro de mamíferos, indicaron que aunque *in vitro* una neuropeptidasa puede degradar a una gran gama de NPs, dicha capacidad se ve restringida por la organización del SNC, esto es, a la localización de la neuropeptidasa y a la de su posible sustrato. Por medio de estos estudios se observó un incremento en la recuperación del NP liberado *in vitro* al inhibir la actividad enzimática de: la PPII (TRH (51)), la endopeptidasa 24.11 (encefalinas (30), SP (30,52)), la ACE (SP (52)), la aminopeptidasa MII (encefalinas (53,54)), la aminopeptidasa A (angiotensina I y II (30)), la aminopeptidasa N (met encefalina (40,41) y la endopeptidasa 24.16 (neurotensina (30,42)). Otra estrategia que ha permitido determinar el papel de las peptidasas en la inactivación de su(s) sustrato(s) es la administración *in vivo* de inhibidores específicos observándose potenciación en la actividad biológica de su sustrato. Por ejemplo se ha observado potenciación del efecto biológico del NP cuando se inhibió específicamente a: la endopeptidasa 24.11 (encefalinas (29,30)), la ACE (bradikinina (30)), la aminopeptidasa 24.15 (LHRH, bradikinina, neurotensina (30)), la aminopeptidasa M (encefalina (30)) y la aminopeptidasa MII (encefalina (29)).

Sólo se ha demostrado que el producto de hidrólisis es inactivo para cuatro enzimas: la PPII (TRH), la endopeptidasa 24.11 (encefalinas), la ACE (bradikina y angiotensina II) y la aminopeptidasa MII (encefalinas)(29,30). Sin embargo en el caso del producto de hidrólisis de la TRH, la His-ProNH₂ puede ciclizarse espontáneamente a His-Pro dicetopiperazina, un producto que tiene un espectro de actividad biológica distinto a la de la TRH. Es posible que la PPII no solo sirva para eliminar a la TRH pero algunas veces para generar una nueva actividad biológica(36).

Hasta ahora se han determinado diferentes vías de regulación de las neuropeptidasas en respuesta a diversas señales extracelulares. En el caso de la actividad de la PPII ésta sufre una disminución (55) y para la endopeptidasa 24.11 se eleva (56) en respuesta a la interacción de su sustrato con su receptor específico. Cambios en el estado hormonal (T3 (57,58) y estrógenos (57)) afectan la actividad enzimática de la PPII y en algunas condiciones patológicas la actividad de la PPII también se ve alterada (ver próximo capítulo). La administración de neurolepticos (haloperidol y clorpromazina) inhibe la actividad degradativa sobre la SP, CCK y la met-encefalina, en distintas regiones del sistema límbico (corteza frontal, núcleo caudado-putamen, núcleo acumbens), involucrándose diferentes neuropeptidasas como son la DAP IV y las endopeptidasas 24.15 y 24.11. En este modelo se ha propuesto que el sistema dopaminérgico que inerva el sistema límbico es el responsable de modular la actividad de dichas enzimas (59).

Distintos trabajos se han realizado con el fin de esclarecer el papel de las neuropeptidasas en el SNC, el sistema inmune y el sistema cardiovascular.

Ejemplos de la importancia de las peptidasas en el SNC son la ACE y la aminopeptidasa A. Estas enzimas al parecer juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica regulando la concentración de la angiotensina II, ya que al inhibir a estas enzimas con sus inhibidores específicos *in vitro* aumenta la cantidad de angiotensina II recuperada en el medio (60).

En algunas regiones del SNC el metabolismo de algunos NPs (SP (61), SS (62)) se ve alterado negativamente en la patología del Alzheimer posiblemente como resultado de la modificación en la actividad enzimática de las neuropeptidasas 24.11(61) y 24.15 (61,63). Los cambios en la actividad enzimática de dichas enzimas parecen ser resultado de la patología en sí, no siendo éstas responsables directas de dicha enfermedad (64).

La endopeptidasa 24.11 y la aminopeptidasa N parecen regular la actividad de péptidos como: SP, encefalinas, endorfina, VIP, los cuales se ha demostrado modular la respuesta inmune (65). La hipótesis anterior se reforzó al encontrarse que niveles muy bajos de met-enkefalina producen inmunopotenciación y niveles muy altos, provocados por la inhibición de la endopeptidasa 24.11 ó por la administración del péptido, producen inmunosupresión (66). Alteraciones en las respuestas del sistema inmune inducen un incremento en la actividad de la ACE, por ejemplo en artritis reumatoide, diabetes melitus, lepra, hepatitis viral y esclerosis múltiple. Se ha propuesto que esta peptidasa puede modular la respuesta inflamatoria del organismo, debido a que al inhibir su actividad con captopril (un inhibidor específico de la ACE) se observa inmunosupresión de la inflamación en la histoplasmosis, lupus murino, esclerosis múltiple en ratas y artritis reumatoide en humanos (67). También la endopeptidasa 24.11, la DAPIV y la aminopeptidasa M parecen modular los efectos provocados por los NPs en las articulaciones que sufren artritis, al hidrolizar a la sustancia P, a la Leu enkefalina y a la Lys bradikinina, mediadores de la artritis en el líquido sinovial humano (68).

En el sistema sanguíneo, la endopeptidasa 24.11 también parece regular la acción de la met-enkefalina, ya que la inhibición de esta enzima aumenta la agregación y el cambio de tamaño de los leucocitos y células polimorfonucleares provocados por este NP (69). En cepas de ratas hipertensas hay un incremento en los niveles de angiotensina II así como de la enzima responsable de su inactivación, la aminopeptidasa A. Estos datos sugieren que al aumentar la actividad específica de la aminopeptidasa A, enzima que convierte a la angiotensina II en angiotensina III, se pueden modular las funciones cardiovasculares ya que la angiotensina III es el principal efector peptídico que controla la liberación de vasopresina (70).

Estudios de inhibición enzimática de la endopeptidasa 24.11 muestran que ésta puede modular la velocidad de crecimiento de tumores y carcinomas inactivando a factores de crecimiento de tipo peptídico (encefalinas, SP, bombesina, péptido atrial natriurético, endotelina) (71).

Varios estudios se han realizado con el fin de esclarecer la importancia de las peptidasas durante el desarrollo ya que se ha visto que sus actividades específicas varían durante la ontogenia, pero a pesar de ello no existen evidencias contundentes que les atribuyan algún papel fundamental durante este proceso (39,40).

4.-LAPIROGLUTAMILPEPTIDASA II

Desde que se empezó a estudiar a la PPII, la característica que más ha llamado la atención es la especificidad por su sustrato, ya que hidroliza el enlace pGlu-His únicamente de los péptidos que cuentan con la estructura pGlu-His-X; donde X es ProNH₂ (TRH), Pro (TRH ácido), Pro-Gly (precursor de la TRH) ó Trp (48,49). La actividad de la PPII es bloqueada por inhibidores naturales que compiten probablemente con el sustrato en el sitio activo, por ejemplo LHRH (pGlu-His- 8aa) (71), por un inhibidor sintético competitivo reversible: la N-1-carboxy-2-feniletíl (N^{im} benzil)-histidil-β naftilamida (CPHNA) (51) y por quelantes como EDTA, 1,10 fenantrolina y 8 hidroxiquinolina (71).

La inhibición de la actividad específica de la PPII por quelantes llevó a proponer que es una metaloproteasa (48,71), característica que se confirmaría por la medición de la actividad en presencia de distintos metales y otros parámetros, encontrándose que era el Zn²⁺ el cofactor de dicha enzima (72).

El estudio de la PPII mostró que es una enzima membranal que expone su sitio activo hacia el espacio extracelular (ectoenzima), ya que al ser tratados sinaptosomas o células intactas con tripsina su actividad enzimática desaparecía, mientras que la permeabilización celular no la incrementa (73).

El peso molecular de la PPII fue determinado a partir de la proteína tripsinizada de sinaptosomas y posteriormente purificada por cromatografía de exclusión molecular, encontrándose que es de 230 000 Da (74). El análisis por cromatografía en gel (PAGE) de esta misma preparación, en condiciones reductoras ó no reductoras, demostró la presencia de una sola banda de 116 000 Da, por lo que se asumió que la enzima estaba

conformada por 2 subunidades idénticas (homodímero) asociadas no covalentemente. En este mismo trabajo se detectó que la PPII contiene azúcares que contribuyen aproximadamente con 10000 Da por subunidad (74).

Con el aislamiento y la posterior secuenciación del ADNc de la PPII, obtenido del ARNm de cerebro de rata, se determinó que este último consta de 3075 nucleótidos que codifican para una proteína de 1025 aa cuyo peso molecular es de 117 302 Da, lo cual es consistente con los resultados obtenidos por PAGE (75).

Mediante un estudio tipo "Northern blot" de ARN poli A de hipotálamo e hipófisis de rata hibridados con un fragmento de ADNc de la PPII se detectó la existencia de varias bandas de ARN mensajero que van de 3 a 9.5 Kb. Los diferentes ARNm observados al parecer provienen de un "splicing alternativo" ya que el "Southern blot" realizado con ADN genómico previamente digerido con varias enzimas de restricción y como sonda fragmentos de ADNc mostró solo una banda indicando que la PPII está codificada por un solo gen (75).

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia proteica predice un dominio transmembranal cerca del extremo amino terminal que abarca 22 aa. Este último es precedido por una secuencia de paro de transferencia indicando que la PPII es una proteína integral de membrana de tipo II que queda anclada por una secuencia señal sin cortar, esto es, la enzima tiene el extremo amino terminal en el citosol y el resto de la proteína queda viendo hacia el espacio extracelular (75). Esta estructura concuerda con los datos bioquímicos obtenidos anteriormente que proponían a la PPII como una ectoenzima (73). La secuencia peptídica de la PPII mostró secuencias consenso para modificaciones postraduccionales como: la sulfatación (aa 381) y 12 sitios para

N-glicosilación además de presentar la secuencia consenso de la familia de las metaloproteasas Zn^{+2} dependientes: HEXXH(aa441a1445)(75)(Figura 1).



Figura 1 La ilustración muestra la estructura esquemática de la PPII deducida de la secuencia del ADNc de la rata. La línea recta representa las regiones no traducidas y el rectángulo representa el marco abierto de lectura. La presunta secuencia transmembranal es representada por la caja negra, el sitio potencial de fosforilación por la proteína cinasa C por P, el presunto sitio de sulfatación por S, los 12 sitios de N-glicosilación por γ y el motivo de unión a Zn^{2+} por Zn^{2+} (Tomada de la referencia 75).

Al comparar la secuencia peptídica de la PPII contra las secuencias reportadas en el "GeneBank" se encontró que muestra homología con otras neuropeptidasas como: la aminopeptidasa N (34%) y la aminopeptidasa A (32%) (75).

Mediante el uso de inhibidores específicos para las diferentes enzimas capaces de degradar *in vitro* a la TRH, se sabe que al inhibir a la PPII es posible recuperar una mayor cantidad de TRH liberado de cortes de cerebro, mientras que al inhibir a las enzimas solubles: piroglutamil aminopeptidasa (PPI) y prolil endopeptidasa (PE) (Figura 2) el contenido de TRH no cambia. Estos resultados sugieren que la PPII puede jugar un papel importante en la inactivación de la TRH *in vivo* (51,76).

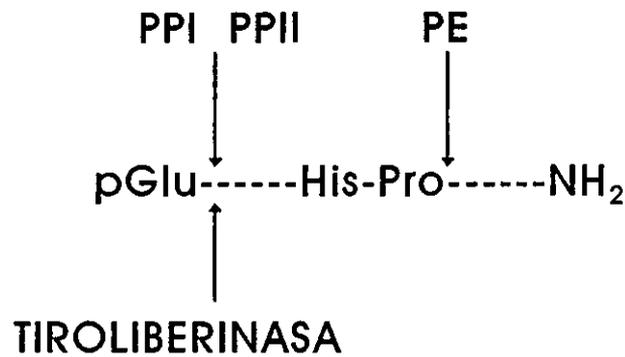


Figura 2 Enlaces de la TRH que son blanco de peptidasas. Las peptidasas que probablemente inactivan a la TRH *in vivo* están indicadas por flecha continua, mientras que las que lo hacen solo *in vitro* están indicadas por flecha discontinua. PPI: Piroglutamil aminopeptidasa I, PPII: Piroglutamil aminopeptidasa II, PE: prolil endopeptidasa [Tomada de 49,51].

Para determinar la localización del ARNm de la PPII en órganos y regiones del cerebro de mamíferos, se ha empleado la hibridación tipo "Northern blot" (75), la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (77) y la hibridación en solución con protección a ribonucleasa (Wilk, E. comunicación personal). Mediante la primera técnica se encontró que el ARNm se expresa en cerebro, hipófisis, pulmón, e hígado y no en corazón ó riñón (75). Por RT-PCR, se encontró que se expresa en la corteza piriforme-el núcleo acúmbens, la corteza frontal y la amígdala (77). Recientemente utilizando la hibridación en solución con protección a ribonucleasa, se encontró que se expresa principalmente en cerebro, con niveles más bajos en: pulmón, pituitaria, bazo, testículo, riñón y otros órganos, como se muestra en la tabla 4 además de que en el cerebro se encuentra distribuido de manera heterogénea (tabla 5. Wilk, E. comunicación personal).

TABLA 4

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y NIVELES DEL ARNm DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II EN ÓRGANOS DE LA RATA		
ÓRGANO	ARNm (fg/ug ARN total)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (unidades/mg proteína)
Cerebro	705±47	4.8±0.6
Duodeno/Páncreas	21±2	0.05±0.02
Corazón	22±2	0.04±0.01
Intestino	21±3	0.06±0.02
Riñón	29±2	0.03±0.01
Pituitaria	42±2*	0.2±0.1
Hígado	13±0	0.1±0.1
Pulmón	116±13	1.2±0.3
Músculo	27±3	0.03±0.01
Bazo	31±3	0.1±0.03
Testículo	30±2	0.03±0.01

Los niveles del ARNm de la piroglutamyl peptidasa II en los órganos de la rata fueron determinados por el ensayo de protección a ribonucleasa. Los valores representan el promedio ± S.E.M, la n=6 para cada grupo. La unidad de actividad enzimática está definida como la liberación de 1 nmol de naftilamida (NA) /hr del sustrato pGlu-His-Pro-NA. Los datos son el promedio de los valores de tres muestras ± SEM.

*Significativamente mayor que duodeno/páncreas, corazón, intestino, riñón, músculo y testículo p<0.01 y significativamente mayor que hígado p<0.05 (Prueba t de Student). Wilk, E. Comunicación personal.

TABLA 5

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y NIVELES DEL ARNm DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II EN EL CEREBRO Y MÉDULA ESPINAL DE LA RATA.		
REGIÓN	ARNm (fg/ug total RNA)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (unidades/mg proteína)
Amígdala	418±28	3.1±0.3
Tallo cerebral	129±19	0.6±0.2
Cerebelo	904±97	2.3±0.3
Corteza frontal	802±49	7.5±0.5
Hipocampo	929±67	7.7±0.8
Hipotálamo	229±29	2.8±0.2
Bulbo olfatorio	628±55	7.0±0.4
Corteza posterior	1056±83	8.1±0.6
Médula espinal	219±26	1.6±0.2
Estriado	394±47	1.6±0.2
Tálamo	280±19	2.8±0.2

Los niveles del ARNm de la PPII en las regiones del cerebro de la rata fueron determinados por el ensayo de protección a ARNasa. Los valores representan el promedio ± S.E.M, la n=6 para cada grupo.

La unidad de la actividad enzimática fue definida como la liberación de 1 nmol de NA / hora del sustrato pGlu-His-Pro-NA. Los datos son el promedio de tres muestras ± SEM. Wilk, E., comunicación personal.

Estudios de localización de la enzima han sido realizados a través de la medición de su actividad enzimática en varios órganos y en distintas regiones del SNC en rata y conejo, principalmente (78,79,80). En las tablas 4 y 5 se muestra la distribución de la actividad enzimática de la PPII en varios órganos y en distintas regiones del SNC de la rata, respectivamente (Wilk, E., Comunicación personal). En general, los datos sobre la actividad enzimática de la PPII son similares a los observados en nuestro laboratorio

(78,79) excepto por la corteza posterior, debiéndose posiblemente a una diferencia en la disección. Además se observó que la distribución por actividad enzimática es similar a la del ARNm. Vargas y colaboradores realizaron un estudio comparativo de la actividad enzimática de la PPII en el cerebro de varios mamíferos, encontrando que ésta no varía mucho entre ellos (80). La localización tanto del ARNm como de su actividad indican que la PPII se encuentra principalmente en el cerebro, siendo además su distribución heterogénea en este órgano, lo cual es consistente con una función ligada a circuitos neuronales específicos.

Dos estudios encaminados a esclarecer el tipo celular que expresa la actividad enzimática de la PPII en el SNC fueron realizados en cultivos primarios. Uno de los trabajos se realizó en cultivos neuronales de hipotálamo y de corteza cerebral de fetos de ratón de 14 días de gestación cultivadas *in vitro* durante 4 a 12 días. Estos cultivos celulares fueron tratados con un inhibidor del crecimiento de la glia (citosina arabinósida) ó con una droga neurotóxica (glutamato). Se observó que la actividad enzimática disminuía cuando disminuía la proporción de neuronas, indicando que la PPII se encontraba principalmente sobre las neuronas y no en la glia (41). En el otro estudio se hicieron cultivos enriquecidos en neuronas de cerebro de rata a partir de fetos de 16 días de gestación cultivados *in vitro* y cultivos enriquecidos de astroglia de cerebro de ratón recién nacido. En ambos cultivos se midió la hidrólisis de sustrato de la PPII, encontrándose que la TRH sufre hidrólisis en los cultivos neuronales y no en los de astroglia (81).

En la adenohipófisis se determinó la localización celular de la actividad enzimática de la PPII mediante el enriquecimiento de los distintos tipos celulares de la adenohipófisis y la medición de la activación enzimática en éstos. Fueron las fracciones que contenían principalmente lactótrofos las que presentaron actividad enzimática para la PPII (81), lo que sugiere que la PPII está principalmente localizada en uno de los blancos de la TRH.

Determinar la localización de la PPII en la sinápsis es un punto importante para entender su participación en la inactivación de la TRH. Para definir si esta enzima es presináptica o postsináptica, se degeneraron neuronas TRHérgicas del núcleo del rafe. Estas neuronas colocalizan al TRH con la serotonina, por lo que, inyectando la neurotoxina 5,7, dihidroxitriptamina, se destruyen. Sabiendo que estas neuronas TRHérgicas proyectan hacia la médula espinal, se midió la actividad de la enzima en varias regiones de ésta, encontrándose que, a pesar de que el contenido de TRH había disminuido significativamente, la actividad de la PPII no mostraba cambio. Estos resultados llevaron a postular que esta enzima no se encuentra en las neuronas TRHérgicas (presinápticas) del rafe sino en sus blancos (82).

Distintos factores regulan la actividad enzimática de la PPII en la adenohipófisis, entre los que está el nivel sérico de las hormonas tiroideas. Dicha regulación se demostró al inducir hipertiroidismo administrando triyodotironina a ratas dando como resultado un aumento en la actividad de la enzima (57,58). El efecto contrario se obtiene al inducir hipotiroidismo en ratas por medio de la ingesta del propiltiouracilo (PTU) (57). Estudios posteriores mostraron que es el nivel del ARNm el que es modificado de manera proporcional al cambio en las hormonas tiroideas, afectando por ende la actividad enzimática (83). También los niveles séricos de los estrógenos regulan la actividad de la PPII en la adenohipófisis aunque de manera inversamente proporcional, ya que la actividad enzimática de la enzima aumenta en ratas ovariectomizadas (con bajos

niveles de estrógenos) y regresa a sus niveles basales al administrar 17β estradiol, no así cuando se administra testosterona (57).

Su sustrato, la TRH, también regula la actividad de la PPII en cultivos de adenohipófisis de rata de manera negativa al parecer a través de la activación de su receptor, quizá para contribuir a la justificación de la respuesta de los lactótrofos al TRH (56, 84). Otros factores regulan la actividad de la PPII de manera positiva a través de la activación de proteínas $G\alpha$ sensibles a la toxina de pertusis, por ejemplo la bromocriptina, un agonista del receptor D_2 de la dopamina y la somatostatina. Por otro lado factores que aumentan los niveles de AMPc regulan de manera negativa la actividad de esta enzima. Algunos de estos factores parecen ejercer su efecto al modificar los niveles del ARNm de la PPII (85).

Si bien variaciones en los niveles de T3 y estradiol no modifican la actividad de la PPII en el cerebro de la rata, recientemente se ha demostrado que su actividad es modulada en modelos experimentales como son el de "kindling" amigdalino (86) y la administración aguda del etanol (87). El "kindling" modifica de manera positiva la actividad de la PPII en distintas regiones epileptogénicas como son: la amígdala; el hipocampo, la corteza frontal y el núcleo acumbens.

En resumen, la PPII reúne muchas de las características necesarias para ser considerada como una neuropeptidasa: es una ectoenzima, su inhibición permite recuperar mayor concentración de su sustrato, y es específica para su sustrato; sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado claramente si se encuentra en el sitio adecuado para poder degradar a la TRH en el SNC.

III JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran diversidad de funciones que llevan a cabo los NPs en el SNC, es de gran importancia el que existan mecanismos rápidos y específicos de inactivación. En el caso de la TRH se ha propuesto que la hidrólisis enzimática es la principal vía de eliminación del espacio extracelular, involucrándose a la PPII como la enzima responsable de dicha hidrólisis.

La PPII es una metaloproteasa que reúne varias características que la catalogan como una neuropeptidasa. Tiene alta especificidad por su sustrato, la TRH, es una ectoenzima y se localiza principalmente en neuronas en el SNC. Si bien se ha sugerido que en la médula espinal la PPII puede estar localizada en la postsinápsis, aún no se ha confirmado con un método directo y no se ha definido que esto ocurra en otras regiones del SNC. Para aclarar este punto, se requiere el empleo de técnicas de resolución celular o subcelular. Al inicio de este proyecto los numerosos intentos que se habían hecho por obtener anticuerpos contra esta enzima habían fallado por lo que su localización no ha podido analizarse por inmunohistoquímica. La reciente clonación del ADNc de la PPII hace posible la determinación de los sitios de síntesis de esta enzima en el SNC de la rata por hibridación *in situ* y permite compararla con la distribución del ARNm del receptor de TRH para sugerir de esta manera si la síntesis de la PPII ocurre en las células blanco de la TRH.

IV OBJETIVO

El objetivo de este estudio consiste en determinar la distribución del ARNm de la PPII en el cerebro de la rata por hibridación *in situ*, con el fin de localizar los sitios de síntesis de esta enzima. Esto nos permitirá inferir si la enzima se sintetiza en las mismas regiones donde se ha reportado la síntesis del receptor de la TRH, un marcador de las células blanco de la TRH.

El número de ratas utilizadas en los distintos experimentos fue el siguiente: para la extracción de ARN total se emplearon 2 ratas; para el efecto del estado hipertiroideo se emplearon 5 ratas a las que se les administraron las hormonas tiroideas (T1 a T5) y 5 ratas control (C1 a C5); para la estandarización de la hibridación *in situ* con los oligonucleótidos se emplearon 5 ratas (O1 a O5), el análisis de la distribución del ARNm de la PPII con los oligonucleótidos se realizó en dos cerebros de rata (A y C); para la estandarización de la hibridación *in situ* con los ARNc marcados con ^{33}P se emplearon 2 cerebros (H e I), para la estandarización de la hibridación *in situ* con los ARNc marcados con ^{35}S se emplearon 2 cerebros (K y L) y para el análisis de la distribución del ARNm de la enzima con los ARNc marcados con ^{35}S se emplearon 2 cerebros (M y N).

C) Purificación de ARN total

Las preparaciones de ARN total utilizadas en este trabajo fueron extraídas de cerebro, hipotálamo, hipófisis, homogeneizando estos tejidos con un homogeneizador-sonicador de tejidos (Polytron) en solución D (ver anexo I); empleándose 10 ml de esta solución por gramo de tejido. Al homogenado se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 2 M pH 4, 1 volumen de fenol y 0.2 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclando perfectamente en cada caso. La mezcla se dejó 15 minutos a 4°C para posteriormente centrifugarse a 12 500 g en tubos Corex por 20 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa (que contiene al ARN) y se precipitó con 1 volumen de isopropanol a -70°C por 6 horas. Para recuperar el ARN, se centrifugó a 12 500 g por 30 minutos a 0°C, se decantó y evaporó el isopropanol restante. El precipitado se disolvió en 30% del volumen inicial de la solución D y se hicieron 2 extracciones con fenol cloroformo (1:1), y una con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclando y centrifugando cada vez a 7000 g por 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó nuevamente con 2 volúmenes de etanol absoluto a -70°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 12 500 g por 30 minutos a 4°C, el precipitado se

lavó dos veces con etanol 70% centrifugando a 12 500 g por 10 minutos a 4°C cada vez y se dejó secar el precipitado. Se disolvió en agua-DEPC (ver anexo 1) y se midió la concentración de ARN en un espectrofotómetro (Beckman) a 260 nm y su grado de pureza basándose en su absorbancia a 230 y 280 nm (88).

D) Diseño de sondas

-Oligodeoxinucleótidos para la hibridación *in situ*. Se diseñaron 2 cincuentámeros con base a la secuencia del ADNc de la PPII (75) obtenido de la rata; comprenden de los nucleótidos 207 al 256 (oligo A) y de los nucleótidos 690 al 739 (oligo C) (ver anexos 2 y 3). Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa de cómputo Oligo (NBS), el cual considera parámetros como: la estabilidad del híbrido y la posibilidad de que el oligonucleótido hibride sobre sí mismo y evita que existan homoligonucleótidos. De este análisis resultaron algunos cincuentámeros candidatos a los que se verificó que tuvieran una relación de GC entre 50 y 65% y que hibridaran en la región traducida del ADNc (anexo 3). Se seleccionaron aquellos oligonucleótidos que al compararlos con la base de datos "Gene Bank" (febrero 1995) no presentaron homología significativa con las otras secuencias presentes con la excepción de la de la PPII. Estas características fueron los parámetros que condujeron a escoger dos oligonucleótidos: A y C, (ver anexo 2 y figura 4) que se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de macromoléculas del IBT, añadiéndose al final un paso de eliminación de exceso de sales.

- Oligodeoxinucleótidos para la amplificación del fragmento de ADNc por PCR. Se diseñaron 2 oligonucleótidos de 35 nucleótidos cada uno para amplificar un fragmento de ADNc de tal manera que contuviera las secuencias de los oligonucleótidos para la hibridación *in situ*. Con el propósito de poder clonar el fragmento se incluyó, en el extremo 5' del oligonucleótido sentido, el sitio de restricción para la enzima Pst I y en el

extremo 3' del oligonucleótido antisentido se incluyó el sitio de restricción para la enzima Hind III (anexo 2). Con el programa de cómputo Oligo (NBS) se verificó que los parámetros de estabilidad del híbrido y la posibilidad de que el oligonucleótido hibride sobre sí mismo. Por último, al compararlos con la base de datos "Gene Bank" (julio 1996) no presentaron homología significativa con las secuencias presentes con la excepción de la de la PPII. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de macromoléculas del IBT, añadiéndose al final un paso de eliminación de exceso sales.

-Preparación del plásmido para generar la sonda de ARN-amplificación por PCR. El plásmido generador de la sonda de ARNc (anexo 2) se obtuvo por la clonación de un fragmento de ADN de 676 pares de bases amplificado por PCR que incluye los nucleótidos 129 al 773 del ADNc de la PPII (75) (anexo 2). El fragmento se amplificó a partir de 0.1ug del plásmido que contiene al ADNc de la PPII (0.05ug/ul) (donado por el Dr. K. Bauer), 10 ul de los deoxinucleótidos ATP, GTP, CTP y TTP (25 mM), 10 ul de cloruro de magnesio 25mM, 67 ul de agua miliQ-UF, 2 ul de cada uno de los oligonucleótidos sentido (0.55 ug/ul) y antisentido (0.66 ug/ul) para amplificar con PCR (ver anexo 2), 1 ul de Taq polimerasa (5 U; Boheringer) y dos gotas de aceite para un volumen final de 100 ul. El ADNc se desnaturalizó a 94°C por 1 minuto y se hicieron 20 ciclos de la siguiente manera: 94°C por 1 minuto; 70°C por un minuto. Durante el último ciclo, la etapa a 70°C fue por 10 minutos. El producto fue purificado por una doble extracción fenol: cloroformo (1:1), una extracción con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y una precipitación con 1/25 de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de etanol por 1 hora a -70°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 15000 g por 30 minutos a 4°C; el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en agua miliQ-UF. La clonación del fragmento de ADNc amplificado por PCR se realizó en el plásmido para transcripción *in vitro* pSPT 19 (Boheringer), entre los promotores T7 y SP6 (fig. 3). Tanto el fragmento como el plásmido se digirieron con las enzimas Pst I y Hind III para posteriormente ligarse

utilizando T4 ligasa. El plásmido generado (pSPT19-PPII, 3770 pb, fig. 3) se electroporó en la cepa JM101. Una vez obtenidas las colonias de bacterias transformadas con el plásmido, se aisló el plásmido y se aseguró que fuera el correcto por su patrón de restricción.

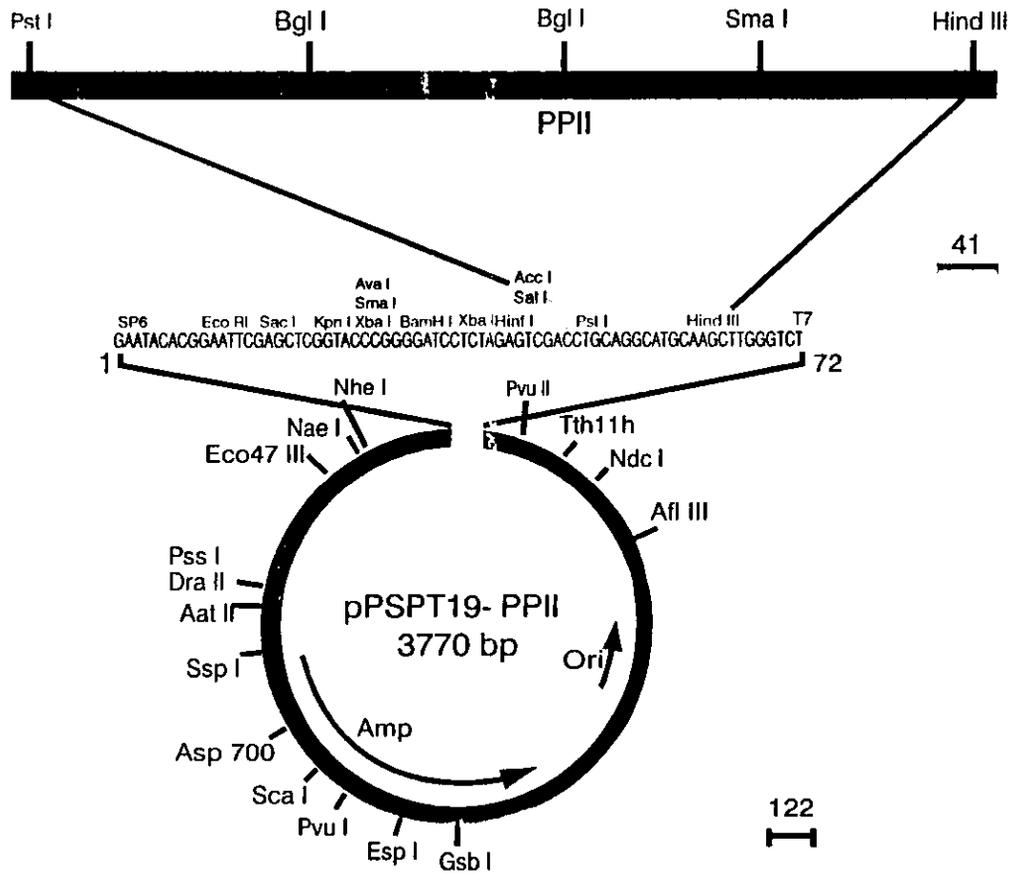


Figura 3. Representación esquemática de la clonación del fragmento de la PPII amplificado por PCR en el vector pSPT19 para transcripción. Se amplificó un fragmento del ADNc de la PPII por PCR y se clonó en un vector para transcripción *in vitro* (pSPT19), generando el plásmido pSPT19-PPII de 3770 pb.

El plásmido pSPT19-PPII se linearizó con las enzimas Bam HI ó EcoR I (Boheringer) para generar la sonda de ARNc antisentido y con la enzima Hind III (Boheringer) para generar el ARC sentido. Los plásmidos linearizados se purificaron extrayéndolos dos veces con una mezcla de fenol: cloroformo, una vez con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se precipitaron con 1/25 de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol por 1 hora a -70°C. Posteriormente, se centrifugó a 15 000 g por 30 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó, disolvió en agua miliQ-UF. La cuantificación del plásmido se llevó a cabo por electroforésis, comparándolo con cantidades conocidas de un patrón de marcadores de peso molecular de ADN (λ Hind III, Biolabs) y por espectrofotometría con base a su absorbancia a 260 nm y se midió el grado de pureza basándose en su absorbancia a 230 y 280 nm.

E) Marcaje de sondas

-Oligonucleótidos.- Los oligómeros se marcaron en el extremo 3' con α (^{35}S) dATP (actividad específica 1 000 Ci/mmol (Amersham)) para la hibridación *in situ* ó con α (^{32}P) dATP (actividad específica 3 000 Ci/mmol (Amersham)) para el "Southern blot" y el "Northern blot" mediante la enzima deoxiribonucleotidil terminal transferasa (25 U/ul Boheringer). A un tubo de microcentrífuga se agregaron 2 pmol de oligómero, 3 ul de solución amortiguadora para la enzima (Boheringer), 4.5 ul de CoCl_2 5 mM, 50 uCi de α dATP ^{35}S ó 50 uCi de α dATP ^{32}P , agua para un volumen final de 15 ul y al final se agregó 1.5 ul de la enzima. La reacción se dejó transcurrir por 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se paró la reacción con 15 ul de solución amortiguadora TE (anexo 1) y se tomó 1 ul de la mezcla de reacción para determinar el porcentaje de incorporación del nucleótido marcado a los oligómeros (anexo 4). El resto de la reacción se precipitó con 2 ul de EDTA 0.5 M pH 8, 3 ul de ARNt 10 mg/ml, 3.5 ul de NaCl 4 M y 102 ul de etanol absoluto a -70°C por

1 hora. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g por 30 minutos a 4°C, el precipitado se lavó con 200 ul de etanol 70% en agua y se centrifugó nuevamente a 15 000 g por 10 minutos a 4°C; el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 25 ul de solución amortiguadora TE (anexo I) conteniendo DTT 10 mM, añadido en el momento. De esta última solución se tomaron 0.5 ul por duplicado, se determinó el porcentaje de recuperación y la actividad específica (anexo 5). El resto se guardó a -20°C hasta su uso.

-"Random priming". 25 ng del fragmento de 676 pares de bases obtenido por PCR se desnaturalizaron por 5 minutos a 95°C y se les agregó: 5 ul de los hexanucleótidos (kit de Amersham), 4 ul de dGTP, dCTP y dTTP (kit de Amersham), 5 ul de solución amortiguadora (kit de Amersham), 50 uCi de α ³²P dATP (3 000 Ci/mmol, Amersham), agua para un volumen final de 50 ul y, por último, 2 ul de ADN polimerasa fragmento de Klenow (kit de Amersham). La reacción se dejó transcurrir entre 3 y 5 horas a temperatura ambiente (TA). Después de este tiempo se tomó una alícuota para cuantificar el porcentaje de incorporación del nucleótido radioactivo (anexo 4) y se pasó por una columna de Biogel A-50 (Biorad), equilibrada con solución amortiguadora TE (anexo I). La muestra se eluyó con solución amortiguadora TE, se colectó el primer pico radioactivo excluido de la columna donde eluyen los fragmentos de ADN marcados. Se cuantificaron las cpms en un contador de centelleo y se calculó la actividad específica (anexo 5). En general se obtuvieron actividades específicas de 4×10^8 cpm/ug.

-Síntesis de ARNc.- Los plásmidos para la transcripción *in vitro*, preparados como se describió con anterioridad, se emplearon para transcribir los ARNc sentido y antisentido de la PPII. La reacción de transcripción para generar el ARNc antisentido se llevó a cabo con α UTP ³⁵S (actividad específica 1 250 Ci/mmol, NEN) ó UTP ³³P (actividad específica entre los 1 000 y 2 000 Ci/mmol, NEN), y la reacción de transcripción para generar el

ARNc sentido se llevó a cabo con α UTP ^{35}S (NEN). La reacción de transcripción *in vitro* se realizó en tubos de microcentrífuga, siliconizados y libres de ARNasa (Fotodyne), en donde se colocaron 125 μCi del nucleótido radiactivo que se evaporó a sequedad. Posteriormente, se agregaron al tubo los siguientes reactivos: 3 μl de una mezcla con 10 mM de los ribonucleótidos ATP, CTP y GTP (Boheringer, kit de transcripción *in vitro*), 1 μg de plásmido linearizado y desnaturalizado por 5 minutos a 65°C , la cantidad de UTP frío necesaria para completar 120 pmolas de UTP final (Boheringer, kit de transcripción *in vitro*), 1 μl de DTT 100 mM disuelto en agua, 0.5 μl de inhibidor de ARNasa (40 U/ μl , Boheringer, kit de transcripción *in vitro*), 1 μl de T7 ó SP6 ARN polimerasa (20 U/ μl , Boheringer, kit de transcripción *in vitro*) y agua DEPC (anexo 1) para completar a 10 μl . La reacción se dejó 1 hora a 37°C . Al término de este lapso se agregó 1 μl de T7 ó SP6 ARN polimerasa (Boheringer, kit de transcripción *in vitro*) y se dejó otra hora a 37°C . Después se centrifugó rápidamente y se degradó el plásmido utilizando 1 μl de ADNasa Q (10 U/ μl , Boheringer, kit de transcripción *in vitro*) por 45 minutos a 37°C . Esta reacción se paró agregando 35.5 μl de una mezcla que contenía acetato de sodio 0.6 M, EDTA 10 mM y SDS 0.1% y se tomó 1 μl para determinar la eficiencia de la reacción (anexo 4). Las enzimas utilizadas en la reacción se eliminaron extrayendo 2 veces con fenol: cloroformo (1:1) y una vez cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando a 3 000 g por 5 minutos a T.A. La fracción acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de NaCl 4 M ó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 2M pH 4 y 3 volúmenes de etanol absoluto (Merck) por una hora a -70°C . Posteriormente se centrifugó a 15 000 g por 30 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 50 μl de agua-DEPC (anexo 1) y se repitió el paso anterior. El precipitado se lavó con una solución de etanol al 70% frío (-20°C) y se centrifugó a 15 000 g por 10 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para disolverlo en 0.1% de SDS (preparado con agua DEPC). En el caso de la transcripción en presencia de UTP ^{35}S se adicionó DTT a una concentración de 10 mM final. Se tomó 1 μl de la solución final y se diluyó 1:10 de los cuales se emplearon 3 μl por

duplicado para determinar las cpms finales y la actividad específica del ARNc (anexos 4 y 5). Se determinó el tamaño y la integridad de la sonda con los 4 μ l restantes al someterlos a electroforesis en un gel de acrilamida 8% en 8M de urea con solución amortiguadora TBE 1X (ver anexo 1) precalentado a 450 volts. El tamaño de la sonda se corroboró mediante la comparación con marcadores de peso molecular (Marcador λ Hind III de ARN de Boheringer (0.24 a 9.5 Kb) ó "RNA ladder" Gibco (0.3-7.4 Kb)) sometido también a electroforesis en el mismo gel. Las muestras se desnaturalizaron con un volumen de una solución que contenía 0.025% de azul de bromofenol y 0.025% de xilencianol en formamida por 15 minutos a 65°C antes de aplicarlas al gel precalentado a 450 volts. La electroforesis corrió por 40 minutos a 350 volts con 1X de la solución amortiguadora de TBE (anexo 1). Al finalizar la electroforesis, los carriles que contenían el (los) transcrito(s) radioactivo(s) se expusieron a una película autoradiográfica (T Mat G/RA Kodak) por una hora. Los carriles con los marcadores de peso molecular se tiñeron con bromuro de etidio y se les tomó una fotografía. Transcurrida la hora de exposición del gel a la película, ésta se reveló (anexo 6). Se comparó la distancia de migración del transcrito radioactivo con la de los marcadores de peso molecular para determinar su tamaño.

F) "Southern blot".

El ADNc de la PPII digerido previamente con la enzima Eco RI se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100 volts por 20 minutos en solución amortiguadora TBE 1X (anexo 1). El ADN fraccionado se desnaturalizó tratando el gel con NaCl 1.5M y 0.5N de NaOH con agitación por 15 minutos dos veces, posteriormente se neutralizó el gel con solución amortiguadora de Tris HCl 1M pH 7.5 y NaCl 1.5M tres veces por 15 minutos con agitación continua, se tiñó con bromuro de etidio (4 μ g/ml), y se fotografió. El gel se transfirió por 21 horas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) y se horneó 2 horas a 80°C. La membrana se incubó con solución de

prehibridación que contenía: 50% de formamida, 5 X SSC (ver anexo I), 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.0, 150 ug/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado 10 minutos a 65°C y 5 X de Denhart's (anexo I) por 4 horas en un baño con agitación a 42°C. Después se reemplazó la solución de prehibridación por la solución de hibridación (50% de formamida, 5 X SSC, 200 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 200 ug/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado 10 minutos a 65°C, 5 X de Denhart's) conteniendo 9X10⁶ cpm de las sondas (oligonucleótidos A ó C) por cada ml de solución de hibridación. La hibridación se realizó a 42°C durante 24 horas. Posteriormente, la membrana se lavó 2 veces con 2X SSC por 30 minutos a TA, 2 veces con 0.1X SSC por 30 minutos a TA y 2 veces con 0.1X SSC y 0.2% de SDS por 15 minutos a 45°C. Se puso sobre un papel Wattman #1 y se expuso a una película (XOMAT AR, Kodak) a -70°C por 6 horas. Después de transcurrido este tiempo se reveló la película (anexo 6).

G) "Northern blot"

Muestras de 30 ug de ARN total de diferentes tejidos fueron fraccionadas con base a su peso molecular mediante electroforesis en un gel desnaturalizante constituido por agarosa al 1%, 10 mM de solución amortiguadora de fosfatos de sodio pH 7 y 2.2 M de formaldehído. Las muestras se desnaturalizaron antes de agregarse al gel en: 50% de una solución que contenía 0.025% de azul de bromofenol y 0.025% de xilencianol en formamida, 2.2 M de formaldehído, 10 mM de fosfato de sodio, se les agregó 4 ug/ml de bromuro de etidio y se calentaron por 15 minutos a 65°C. La electroforesis se llevó a cabo a 50 V por 3.5 horas en 10 mM de solución amortiguadora de fosfatos. Durante todo el tiempo en que se realizó la electroforesis se estuvo recirculando la solución amortiguadora de tal forma que su pH se mantuviera constante. Al finalizar la electroforesis, el gel se lavó con agua y se fotografió en un transiluminador de UV. Posteriormente el ARN se transfirió por difusión, utilizando

20X SSC, a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) durante 48 horas. La membrana obtenida así se horneó por 2 horas a 80°C. La membrana se incubó a 42°C por 4 horas en una solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5 X SSC (anexo I), 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 150 ug/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado 10 minutos a 65°C y 5 X Denhart 's (anexo I). Posteriormente se eliminó la solución de prehibridación y se agregó la solución de hibridación que contenía 50% de formamida, 5 X SSC (anexo I), 200 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 200 ug/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado 10 minutos a 65°C, 5 X de Denhart's (anexo I) y 6.3 X 10⁶ cpm/ml de la sonda de ADN correspondiente al fragmento que incluye del nucleótido 129 al 773 del ADNc de la PPII que se amplificó por PCR y se marcó por el método de "random priming" (ver marca je de sondas). El tiempo de hibridación fue de 24 horas en un baño de agua a 42°C con agitación continua. Después de transcurrido el tiempo de hibridación se eliminó la solución de hibridación y se lavaron las membranas dos veces en 2 X SSC (anexo I) y 0.2% SDS por 30 minutos a TA y dos veces con 0.1X SSC, 0.2% SDS por 15 minutos a 52°C. Las membranas se expusieron a películas (X OMAT AR, Kodak) por 40 minutos a 52°C. Al finalizar este tiempo las películas fueron reveladas como se especifica en el anexo 6.

H) Hibridación *in situ*.

-*Tratamiento de los cortes de tejidos.*- Cortes coronales de cerebro de rata e hipófisis de 20 um de espesor fueron realizados en un crióstato (Brigh Instruments) a -19°C, montados por descongelación transitoria en portaobjetos cargados electrostáticamente (Fisher Scientific) y almacenados a -70°C hasta que se requirieron. Antes de la hibridación *in situ* los cortes se secaron con una secadora de mano y se trataron de la siguiente manera: fueron fijados en paraformaldehído al 4% en 1 X PBS (anexo I) por 15 minutos, lavados en PBS 1X por 10 minutos, tratados en una solución de

SSC 4X (anexo I) con anhídrido acético 0.25% y trietanolamina 0.1M pH8 por 10 minutos, lavados con 2X SSC por 2 minutos, deshidratados con series de etanol al 75%, 80%, 95% y 100% por dos minutos cada uno, deslipidados con cloroformo por 10 minutos, lavados con etanol 100%, rehidratados con etanol al 95% por 2 minutos cada uno y secados al aire. Todo el tratamiento anterior se llevó a cabo a TA. Los cortes que no se utilizaron inmediatamente se almacenaron a -70°C.

-Hibridación con oligonucleótidos. -Sobre cada corte se añadió 30 ul de una solución de hibridación que contenía 4 X SSC (ver anexo I), 50 % de formamida desionizada, 1X de Denhart's (ver anexo I), 10% de sulfato de Dextán, 500ug/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por 10 minutos a 95°C y 100 ug/ul de ARNt, 50 mM de DTT y 1 pmol/ml de cada oligonucleótido marcado, por separado o juntos, con una actividad específica entre 6 y 9 X 10⁸ cpm/ug. Después se cubrieron con Parafilm con la finalidad de evitar que la solución de hibridación se evaporara. Los oligonucleótidos fueron mantenidos por 12 horas a 42°C en una cámara húmeda. Después de este tiempo se lavaron para eliminar la solución de hibridación y la sonda no hibridada. Primero se sumergieron en 1 X SSC (anexo I) y se lavaron dos veces con 1X SSC a TA por 15 minutos, dos veces con 1X SSC 50 % formamida por 30 minutos a 42°C y 4 veces con 0.1X SSC y 0.2% de SDS por 30 minutos a 52°C. Al final de los lavados, los tejidos fueron deshidratados con series de etanol al 75,80,95 y 100% y se dejaron secar. El análisis macroautoradiográfico se realizó por la exposición a película autoradiográfica (Biomax MR, Kodak) por 21 días, al término de los cuales ésta se reveló (anexo 6). La detección del ARNm de la PPII a nivel celular se realizó por la exposición de los tejidos directamente a emulsión fotográfica (Amersham). La emulsión se fundió a 42°C por 10 minutos en el cuarto oscuro. Con el propósito de obtener una capa homogénea de emulsión sobre el tejido se eliminaron los grumos y burbujas mecánicamente. Los cortes se sumergieron en la emulsión por 3 segundos y se dejaron secar por un lapso mínimo de 3 horas a TA en

el cuarto oscuro. Posteriormente se expusieron a 4°C por 35 días y se revelaron. Para el revelado se secaron los tejidos a TA por media hora en la oscuridad, se pusieron en contacto con el revelador (D19 de Kodak) por 3 minutos, con el agua por 1 minuto y con el fijador (GBX, Kodak) por 3 minutos; se prendió la luz de seguridad y se mantuvieron en el fijador por otros 3 minutos, por último se sumergieron por 5 minutos en fijador nuevo con luz visible. Los cortes se lavaron con abundante agua con agitación constante 2 veces por 15 minutos. El revelador, el fijador y el agua se mantuvieron entre los 15 y 18°C durante todo este proceso. Posteriormente los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (anexo 7).

-Hibridación con ARNc.- Los cortes fueron hibridados por 6 horas a 52°C ó a 60°C, en una caja húmeda, con 30 ul de una solución de hibridación que contenía: 2X SSC (anexo 1), y 50 % de formamida desionizada, 1X de Denhart's (anexo 1), 10 % de sulfato de Dextrán, 500 ug/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por 15 minutos a 65°C, 100 ug/ul de ARNt de levadura, 100 mM de DTT y 7 ng de ARNc marcado con ³³P por corte ó con 1.5X 10⁶ cpm de ARNc marcado con ³³P ó ³⁵S por corte previamente desnaturalizado por 15 minutos a 65°C. Las actividades específicas de los ARNc variaron de 2 a 4 X10⁹ cpm/ug. Al final de la hibridación, el exceso de solución de hibridación y de sonda no hibridada se lavó con 1X SSC y se realizaron los siguientes lavados: con 1X SSC dos veces a TA por 15 minutos; con 2X SSC, 50% formamida dos veces por 15 minutos a 52°C o 60°C; con 2X SSC por 3 minutos a TA 2 veces; con 2X SSC, EDTA 50mM, ARNasa (50 ug/ml) a 37° por 30 minutos 1 vez; con 2 X SSC por 3 minutos a TA dos veces y con 2X SSC, 50 % formida por 15 minutos a 52 ó 65°C una vez y se sumergieron rápidamente en 0.1X SSC a TA. Finalmente los cortes fueron deshidratados con etanol 70%, 80% y 95% por 3 minutos cada uno y secados al aire. Se realizaron los análisis macroautoradiográfico y microautoradiográfico igual que con la hibridación empleando los oligonucleótidos. Los tiempos de exposición a la película (Biomax MR,

Kodak) fueron de 3.5 días a 5 días y los tiempos de exposición para la microautoradiografía (emulsión) fueron de 7 a 10 días para ^{33}P ó de 11 a 25 días para ^{35}S . Finalmente los tejidos fueron teñidos con azul de toluidina o Nissl (anexo 7).

I) Análisis de los resultados.

Con las películas obtenidas de la hibridación de los tejidos con los oligonucleótidos y con los ARNc se identificaron las regiones positivas por comparación con un atlas (89) y se realizaron cuantificaciones visuales atribuyéndole mayor número de asteriscos a la región que mostraba mayor intensidad de señal y menor número de asteriscos a la que menor señal mostraba.

Para evitar un error en la interpretación de la intensidad de la señal obtenida provocado por variación en la actividad específica de la sonda, tiempo de exposición de film y revelado de experimento a experimento, se realizaron experimentos adicionales de tal manera que en uno solo se abarcaran la mayor cantidad de regiones. Así el análisis de la intensidad de la señal en las distintas regiones se realizó en un solo experimento y se corroboró con un segundo experimento. Para tener una evidencia objetiva de que la cuantificación visual fuera adecuada se cuantificaron, por medio de un analizador de imágenes, las autoradiografías de algunos experimentos realizados con ambas sondas. Con el programa Historag (Biocom), se realizó una densitometría de las distintas regiones obteniendo resultados en $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ de tejido. Los resultados obtenidos no fueron distintos a la cuantificación visual (datos no mostrados).

El análisis de las microautoradiografías se hizo en un microscopio Zeiss con los objetivos 10, 40 y 100X, con luz visible y en campo oscuro. Este análisis permitió identificar las células que sintetizan al ARNm de la PPII por la precipitación de granos de plata sobre las mismas, analizar con mayor resolución las regiones identificadas en la

macroautorradiografía e identificar células positivas en regiones que no forman agregados importantes visibles por la macroautorradiografía. También nos permitió comprobar las regiones positivas observadas con la macroautorradiografía, descartando así falsos positivos. Se seleccionaron como regiones positivas aquellas que contuvieran células con más de 8 granos de plata en su núcleo además de no presentarse ruido importante alrededor de éstos. Por último se tomaron fotos a color con los distintos objetivos (amplificaciones) y en campo oscuro.

VI.- RESULTADOS

DETECCIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LA PPII CON OLIGONUCLEÓTIDOS

1.1 Diseño de los oligonucleótidos.

Mediante el uso del programa de cómputo "Oligo" fueron seleccionados dos oligonucleótidos (A y C) con los parámetros requeridos (ver materiales y métodos). Estos oligonucleótidos hibridan con homología de 100% en la región codificadora del ADNc de la PPII (figura 4). Los oligos: A y C tienen una T_m de 79°C y 75°C y un porcentaje de GC de 64 y 54 % respectivamente.

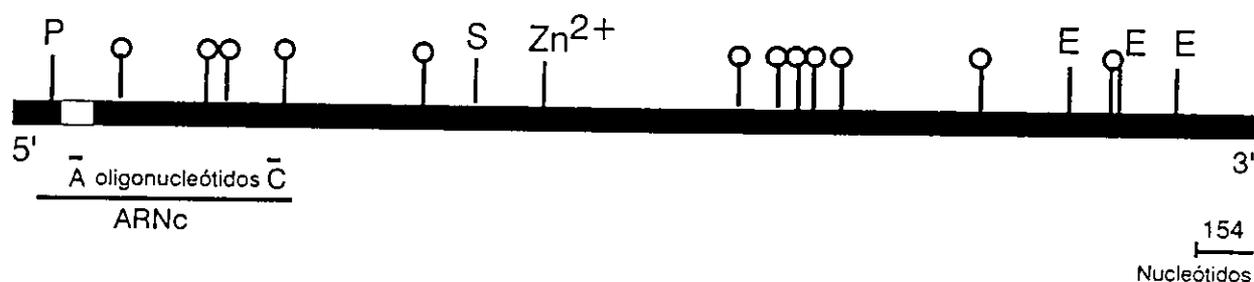


Figura 4 Esquematización de la localización de las sondas empleadas para la hibridación *in situ* en el marco de lectura abierta del ADNc de la PPII. La figura muestra la región traducida propuesta del ADNc de la PPII y la región a la cual hibridan los oligonucleótidos A (A) y C (C) y el transcrita (ARNc). La presunta secuencia transmembranal es representada por la caja blanca, el sitio potencial de fosforilación por la proteína cinasa C por P, el presunto sitio de sulfatación por S, los 12 sitios de N-glicosilación por \circ y el motivo de unión a Zn^{+2} por Zn^{+2} . También se muestra el patrón de restricción para la enzima EcoRI: E (Tomada de la referencia 75).

Se corroboró el tamaño de los oligonucleótidos sintéticos así como su pureza por electroforésis en gel desnaturizante (datos no mostrados). Los oligos A y C migran al mismo nivel que un oligonucleótido de 50 bases previamente utilizado en el laboratorio (datos no mostrados). Los oligonucleótidos A y C también se marcaron en su extremo 3' con dATP ^{35}S mediante una reacción con la deoxinucleotidil terminal transferasa obteniéndose una eficiencia de incorporación del deoxinucleótido de 80 a 90% y una actividad específica de 8 a 9×10^8 cpm/ug. Tanto el porcentaje de incorporación como la actividad específica fueron similares a los que normalmente se obtienen con un

oligonucleótido que se emplea para detectar al ARNm de la TRH por hibridación *in situ* con el cual se ha obtenido una señal limpia y específica. El que los oligonucleótidos A y C fueran del tamaño esperado además de que fueron marcados radioactivamente de la misma manera y con la misma eficiencia que un oligonucleótido empleado para la hibridación *in situ* nos indicó que estos oligonucleótidos también pudieran dar buenos resultados en esta técnica.

1.2 Especificidad de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos A y C para la PPII están dirigidos hacia la región 5' del ADNc, la cual está comprendida en un fragmento de 2 683 pb que se obtiene al digerir el ADNc de la PPII con la enzima de restricción Eco RI (ver figura 4). Para confirmar que los oligonucleótidos hibridan con el fragmento de ADNc esperado, realizamos un "Southern blot" con el ADNc de la PPII digerido con la enzima de restricción Eco RI. Esta digestión genera varios fragmentos (figura 5, panel 1). La membrana se hibridó con los oligonucleótidos A y C marcados con dATP ³⁵S como sonda (ver materiales y métodos). Como se observa en el autoradiograma (figura 5, panel 2) los oligonucleótidos solo hibridan con la banda de 2 683 pb que se obtiene de la digestión con la enzima de restricción Eco RI.

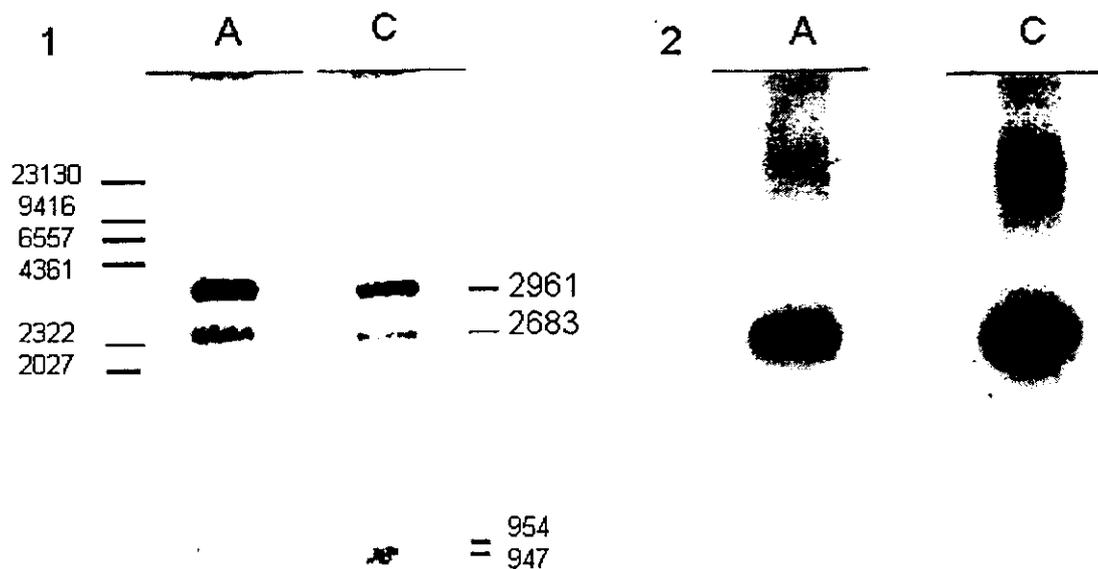


Figura 5. Análisis de la hibridación tipo "Southern blot" del ADNc de la PPII digerido con Eco RI con los oligonucleótidos A y C marcados con ^{35}S dATP. 1 μg del ADNc de la PPII digerido con la enzima de restricción Eco RI se sometió por duplicado a electroforesis en gel de agarosa al 1%; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió en un transiluminador de UV (Paneles 1-A y 1-C). Los fragmentos del ADNc de la PPII digerido con Eco RI (A y C) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con los oligonucleótidos A y C marcados con ^{35}S dATP por la reacción de la deoxinucleotidil terminal transferasa (8×10^8 cpm/ μg , paneles 1-A y 1-C, respectivamente). Posteriormente las membranas se expusieron a una película por 6 horas a -70°C (panel 2). A la izquierda del panel 1 se muestra la posición de los marcadores de peso molecular $\lambda\text{Hind III}$ (BioLabs) y a la derecha del panel 1 los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido que contiene al ADNc de la PPII.

Bauer y colaboradores demostraron que las hormonas tiroideas inducen la expresión del ARNm de la PPII en la adenohipófisis (83). Por lo que como control de la especificidad de los oligonucleótidos realizamos hibridaciones *in situ* con los oligonucleótidos A (fig. 6) y C (datos no mostrados) en rebanadas de hipófisis de ratas hipertiroideas (ratas T1-T5) y eutiroideas (ratas C1-C5). En el lóbulo anterior de los animales controles se observó una señal de baja intensidad (figura 6, panel A).

De acuerdo con Bauer y colaboradores, se observó un incremento importante en la señal de la adenohipófisis de las ratas tratadas con hormonas tiroideas (figura 6, panel C) comparado con el de las ratas eutiroideas (figura 6, panel A). En el lóbulo posterior de la hipófisis, en el cual se encuentran principalmente terminales nerviosas provenientes de

la región magnocelular del hipotálamo, no se observó señal, en las ratas controles eutiroideas, teniéndose así en las mismas rebanadas hipofisarias un control negativo (Figura 6, panel A).

Como control del carácter saturable del blanco de los oligonucleótidos se realizaron experimentos hibridando al mismo tiempo con el oligonucleótido marcado y con un exceso del oligonucleótido sin marcar (10 veces) (figura 6, paneles B y D versus A y C), encontrándose que la señal se pierde tanto en las hipófisis de las ratas hipertiroideas (figura 6, panel D) como de las eutiroideas.

Estos mismos ensayos se realizaron con el oligonucleótido C encontrándose el mismo resultado (datos no mostrados). Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los oligonucleótidos son específicos para el ARNm de la PPII.

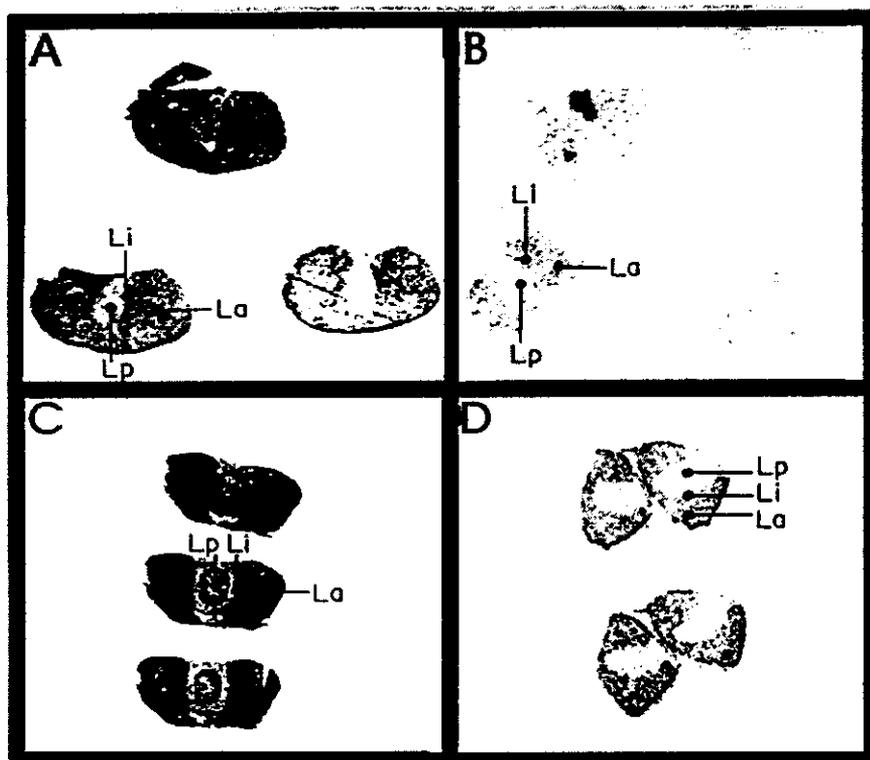


Figura 6 Detección del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* en rebanadas de hipófisis de ratas eutiroides e hipertiroideas. Los cortes de hipófisis de ratas eutiroides (ratas C1-C5) (páneos A y B) e hipertiroideas (ratas T1-T5) (páneos C y D) fueron hibridados con el oligonucleótido A marcado con ATP ^{35}S (actividad específica 8×10^8 cpm/ug) (páneos B y D). Los cortes de hipófisis fueron hibridados y expuestos a la película fotográfica por 22 días a temperatura ambiente. Lp: lóbulo posterior, La: lóbulo anterior, Li: lóbulo intermedio.

1.3 Distribución del ARNm de la PPII en el cerebro de la ratap por hibridación *in situ* con los oligonucleótidos.

Teniendo evidencias iniciales de que los oligonucleótidos eran específicos se procedió a detectar al ARNm de la PPII en el cerebro de rata por hibridación *in situ*. Inicialmente, se hibridaron rebanadas coronales de cerebro de la rata (20 micras) (ratas O1-O5) que contienen al núcleo paraventricular del hipotálamo con los oligonucleótidos por separado. Detectamos el ARNm de la PPII a nivel macroautoradiográfico en dos capas de la corteza cerebral y en el hipocampo, después de 22 días de exposición a la película (figura 7 A y B). Como se muestra en las figuras 7 A y B los patrones de hibridación de los 2 oligonucleótidos fueron similares, ya que ambos hibridan en los mismos núcleos, aunque con el oligonucleótido C la señal fue menos intensa. Este es un argumento muy importante en favor de la especificidad de la señal autoradiográfica.

A la par se realizaron los siguientes controles:

*Ensayos de competencia entre el oligonucleótido radioactivo y un exceso de 10 veces del oligonucleótido no marcado. La figura 7 C muestra una disminución importante en la señal comparándola con la señal de la hibridación con el oligonucleótido marcado (figura 7 A), lo cual indica que la señal obtenida es producto de una interacción específica con un componente saturable.

*Ensayos de competencia entre el oligonucleótido marcado y un exceso de un oligonucleótido no relacionado con esta enzima, pero que hibrida con su ARNm específico (oligonucleótido para el ARNm de la TRH) en las mismas condiciones que utilizamos para detectar al ARNm de la PPII. En estos cortes (figura 7 E) se observó que la señal es idéntica a la observada en la hibridación con el oligonucleótido marcado de la

PPII. Este resultado también sugiere que la señal obtenida con el oligonucleótido A es específica para su ARNm.

*Hibridaciones *in situ* con tejidos tratados con RNasa previo a la incubación con la sonda. En el autoradiograma no se detectó señal en dichos tejidos, lo cual nos indicó que los oligonucleótidos hibridan específicamente con moléculas de ARN (Figura 7D).

En la figura 7 paneles C, D, E solo se muestran los controles realizados con el oligonucleótido A; lo mismo se observó con el oligonucleótido C (no mostrados). Estos datos ampliaron los argumentos a favor de la especificidad de las condiciones de hibridación.

Con el propósito de aumentar la sensibilidad de la detección del ARNm de la PPII y viendo que los oligonucleótidos tienen aproximadamente las mismas condiciones de hibridación y de lavado se decidió utilizar las dos sondas al mismo tiempo en una hibridación *in situ*. La señal obtenida en los cortes hibridados con los oligonucleótidos juntos tiene un patrón de hibridación prácticamente igual que en los cortes hibridados con los oligonucleótidos por separado, con la ventaja de que la señal es más intensa (Figura 7F).

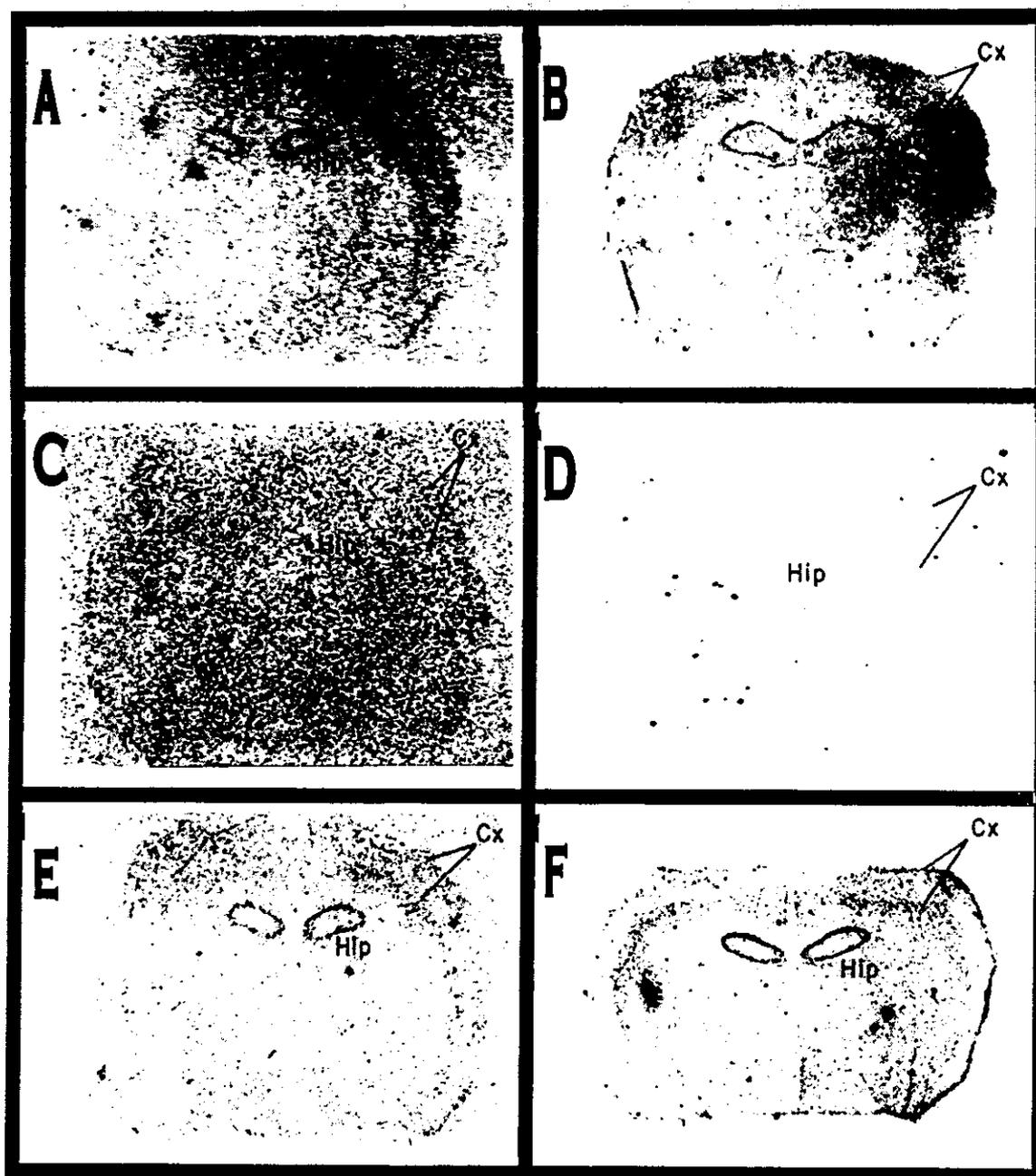


Figura 7. Distribución del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* en el cerebro de la rata en cortes coronales al nivel de NPV con oligonucleótidos marcados con $dATP^{35S}$. Experimentos controles. Cortes de cerebro (ratas O1-O5) fueron hibridados con el oligonucleótido A (actividad específica 8×10^8 cpm/ug) (panel A), con el oligonucleótido C (panel B) (actividad específica 8×10^8 cpm/ug); con el oligonucleótido A (actividad específica 8×10^8 cpm/ug) en competencia de un exceso del oligonucleótido A no radioactivo (10 veces) (panel C); con el oligonucleótido A (actividad específica 8×10^8 cpm/ug) en cortes de cerebro pretratados con ARNasa (panel D), con el oligonucleótido A (actividad específica 8×10^8 cpm/ug) en competencia con un exceso del oligonucleótido para TRH (10 veces) y con ambos oligonucleótidos A y C al mismo tiempo (actividad específica 8×10^8 cpm/ug). Los cortes fueron expuestos a una película por 22 días. Hip: hipocampo, Cx: corteza cerebral.

Una vez optimizada la detección del ARNm de la PPII por la técnica de hibridación *in situ* con oligonucleótidos se realizó un análisis preliminar de la distribución del ARNm de la PPII en el cerebro de rata (ratas A y C) poniéndose énfasis en las regiones que sintetizan al receptor de la TRH ó al TRH mismo (Figura 8). Los resultados de la macroautoradiografía muestran señal intensa en algunas capas de la corteza cerebral frontal y posterior, la corteza piriforme, la corteza del cíngulo, las diferentes capas del hipocampo (CA1 a CA3) y el núcleo periventricular talámico. Con menos intensidad se detecta la señal en el núcleo superior del colículo, los núcleos mamilares del hipotálamo, el núcleo anterior hipotalámico y los núcleos septales (Figura 8).

La especificidad de la señal macroautoradiográfica se confirmó por la detección de la señal sobre células al exponer los tejidos a la emulsión fotográfica. En las figuras 9 y 10 se muestran fotografías representativas de células que presentan granos de plata en sus núcleos (algunas son señaladas con flechas) encontradas en distintas regiones del cerebro de la rata, resultado de la interacción de la radioactividad emitida por las sondas con la emulsión fotográfica. Cabe mencionar que en este experimento, el cociente señal sobre ruido no fue muy alto, lo que introdujo un grado de incertidumbre sobre la identificación de las células positivas. Con el análisis microautoradiográfico se corroboró la señal obtenida con la macroautoradiografía además de detectarse otras regiones positivas que contienen un número pequeño de células positivas, p.e el NPV del hipotálamo (figura 9, panel B).

En la Tabla 6 se resumen las regiones en donde detectamos en la macro y microautoradiografía el ARNm de la PPII así como la intensidad de la señal, indicador de la cantidad del ARNm.

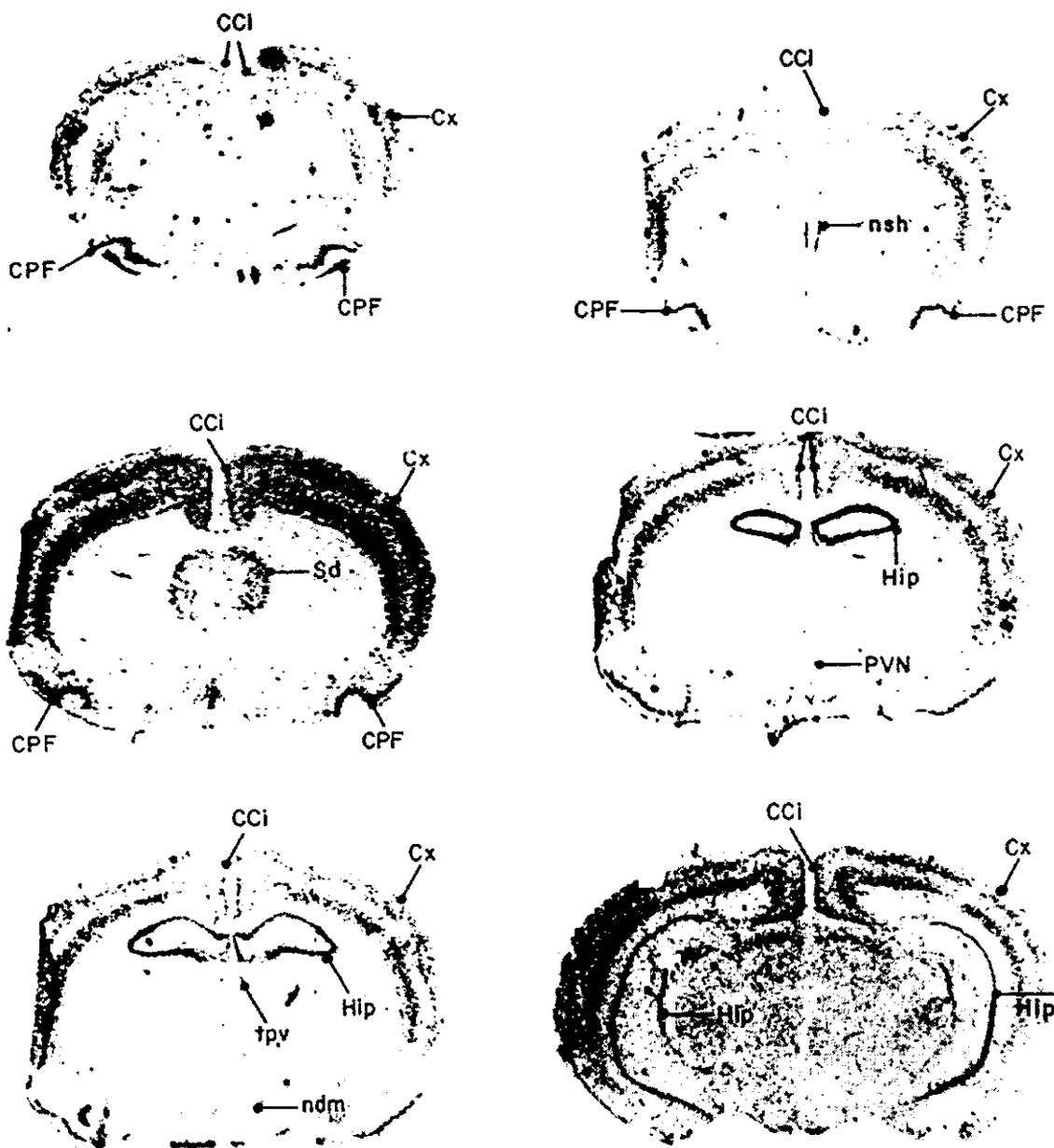
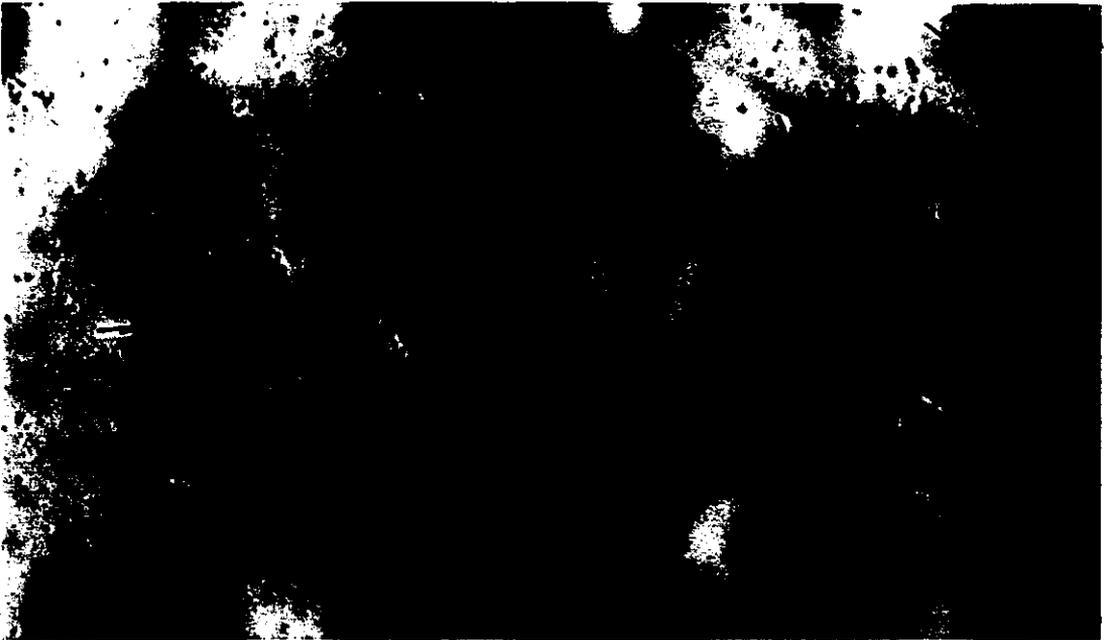


Figura 8 Distribución del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* en cortes coronales de cerebro de la rata detectado con los oligonucleótidos A y C juntos marcados con dATP ³⁵S. Los cortes de la parte anterior y media del cerebro de la rata (ratas A y C) fueron hibridados con oligonucleótidos marcados con dATP ³⁵S (actividad específica 8X10⁸ cpm/ug) y expuestos a una película por 22 días. La figura muestra de izquierda a derecha, de arriba hacia abajo cortes de cerebro de rata de la parte más anterior a la parte media del cerebro de la rata. Cx: corteza cerebral, Cci: corteza cingulata, CPF: corteza piriforme, nsh: núcleo septohipocampal, Sd núcleo septal lateral dorsal, Hip: hipocampo, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo, tpv: núcleo periventricular talámico, ndm: núcleo dorsomedio del hipotálamo.



B



A

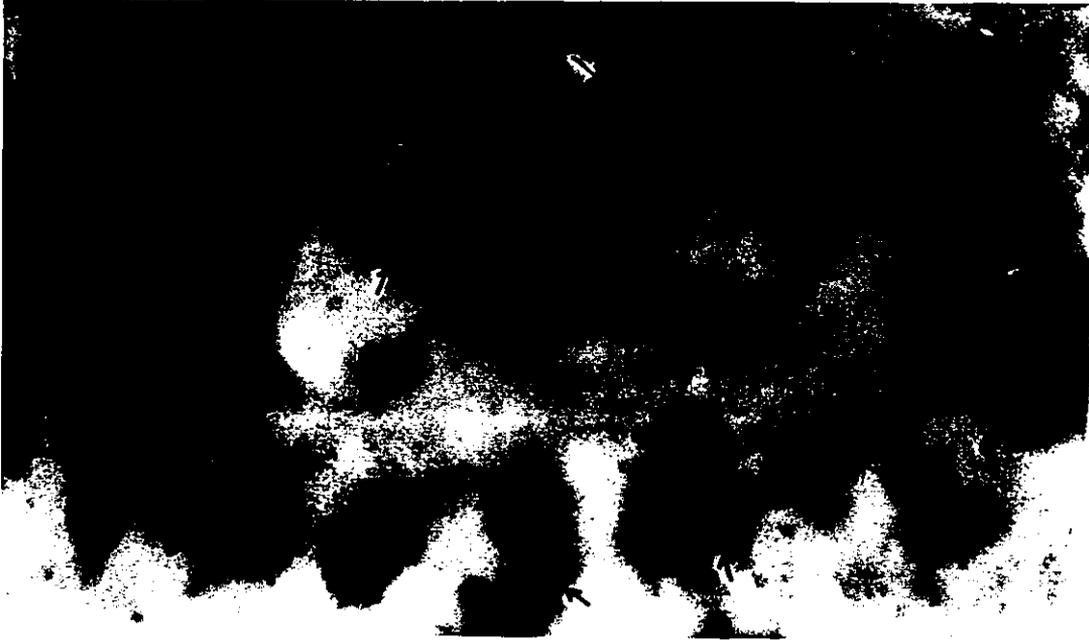
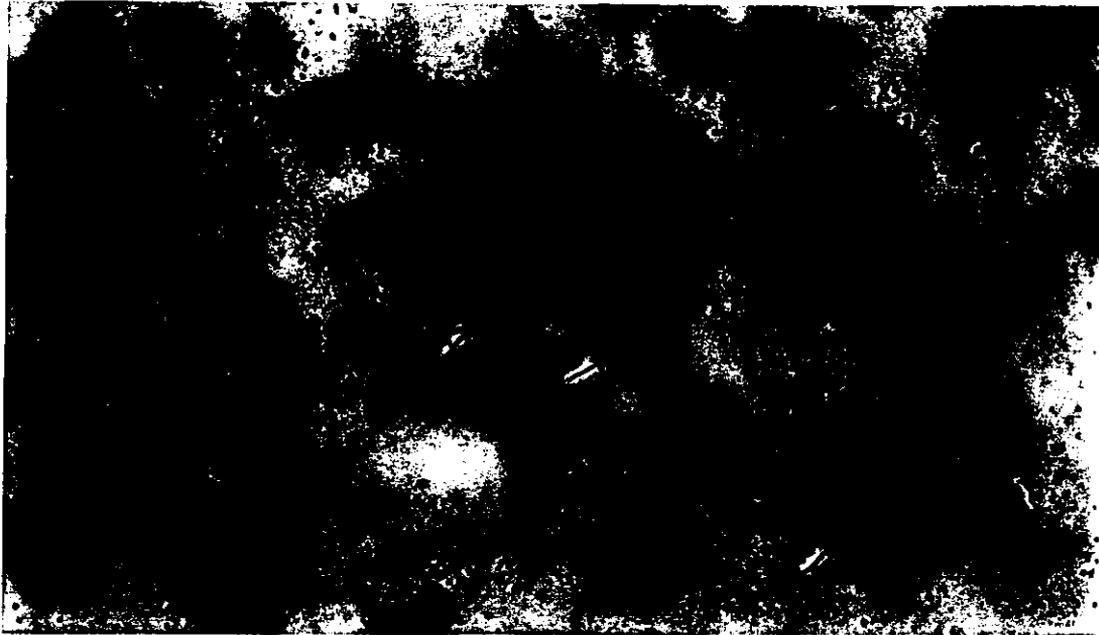
A**B**

Figura 10. Fotografías de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en el cerebro de la rata. En A: Núcleo periventricular talámico; B: Corteza cingulata. Los cortes de cerebro rata (ratas A y C) fueron hibridados con los oligonucleótidos A y C (actividad específica: 8×10^8 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 44 días. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas. Objetivo: 100X.

TABLA 6

DISTRIBUCIÓN PRELIMINAR DE LAS REGIONES POSITIVAS AL ARNm DE LA PPII DETECTADO CON OLIGONUCLEÓTIDOS EN EL CEREBRO DE RATA.		
REGION	NÚCLEOS	ARNm de la PPII
Ganglios basales	Núcleo septohippocampal	**
	Núcleo septolateral	**
Amígdala	Núcleo de la base estriada terminal	*
Hipotálamo	Núcleo dorsomedio	*
	Núcleo hipotalámico anterior	*
	Núcleo paraventricular	*
	Núcleo ventromedial	*
Tálamo	Núcleo periventricular	**
Subtálamo	Zona incierta	*
Hipocampo	Capas piramidales del hipocampo (CA1-CA4)	****
Mamilares	Núcleos mamilares	*
Mesencéfalo	Núcleo superior del colículo	*
Corteza cerebral	Corteza cerebral frontal	**
	Corteza cerebral posterior	**
	Corteza cingulata	**
	Corteza piriforme	***

Cada símbolo * representa la intensidad de la señal observada visualmente en la película autoradiográfica y en la microautoradiografía: * < ** < *** < **** < *****.

II DETECCIÓN DEL ARNm MENSAJERO DE LA PPII CON ARNc.

II.1 Diseño del transcrito que hibrida al ARNm mensajero de la PPII.

Durante el estudio de la distribución del ARNm de la PPII con los oligonucleótidos, el ADNc nos fue proporcionado. Este plásmido nos permitió generar sondas de ARNc y así incrementar la sensibilidad de la técnica. A partir de este ADNc se construyó el plásmido pSPT19-PPII (Figura 3, materiales y métodos). El fragmento que se amplificó por PCR y se clonó en el vector para la transcripción, corresponde a la región donde hibridan los oligonucleótidos (anexo 2).

II.2 Especificidad de la sonda

La especificidad de esta sonda se comprobó al realizar una hibridación tipo "Northern blot" con ARN total de distintos órganos de la rata utilizando como sonda el fragmento obtenido por PCR marcado por el método de "random priming" con dCTP ³²P. En la figura 11 se muestra que la sonda hibrida con ARNs mensajeros que van desde 4 hasta 9 Kb en cerebro e hipotálamo mostrándose una señal muy tenue en hipófisis. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente (75).

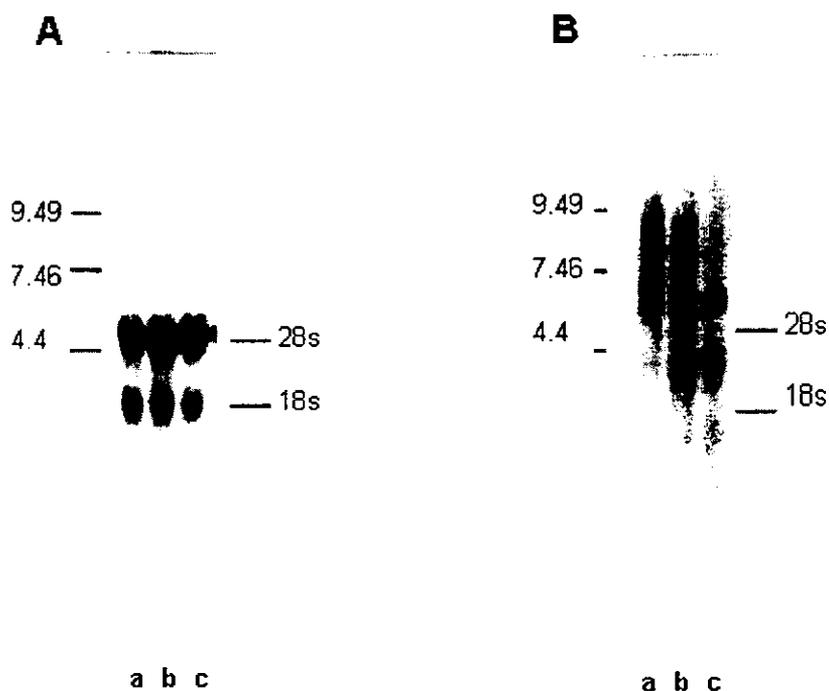


Figura 11. Análisis por "Northern blot" del ARNm de la PPII en cerebro e hipófisis de la rata. ARN totales de cerebro (a), hipotálamo (b) e hipófisis (c) fueron extraídos, fraccionados por peso molecular por electroforesis en un gel desnaturante de agarosa 1%, formaldehído y Na_2HPO_4 . El gel se tiñó y se le tomó una fotografía (panel A). Posteriormente se transfirieron los ARNm a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con el fragmento obtenido de la amplificación de un fragmento del ADNc de la PPII por PCR previamente marcado por "random priming" (actividad específica 4×10^8 cpm/ug). El biot fue expuesto a una película a 70°C por 62 hr (panel B). A la izquierda de los paneles a y b se indica el patrón de los marcadores de peso molecular de ADN (λ Hind III, Biolabs) y a la derecha se indican los sitios de migración de los ARN ribosomales 28 S y 18 S.

11.3 Síntesis de la sonda de ARNc.

El ARNc antisentido se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando $\text{UTP}^{33\text{P}}$ ó $\text{UTP}^{35\text{S}}$ y, como templado, el plásmido que se muestra en la figura 3 previamente linearizado con Bam HI ó Eco RI. La eficiencia de la incorporación del $\text{UTP}^{33\text{P}}$ fue siempre de 80 a 95% y del $\text{UTP}^{35\text{S}}$ fue de 75 a 87%. Con el $\text{UTP}^{33\text{P}}$ se obtuvieron entre 120 y 190 ng y con $\text{UTP}^{35\text{S}}$ entre 110 y 138 ng de ARNc con actividades específicas de 1.8 y 3×10^9 cpm/ug y 2.1 y 3.5×10^9 cpm/ug, respectivamente. Estos parámetros no mostraron diferencia significativa entre las transcripciones *in vitro* con los diferentes isótopos. El ARNc sentido se sintetizó por transcripción *in vitro* utilizando $\text{UTP}^{35\text{S}}$ y como templado el plásmido que se muestra en la figura 3, previamente linearizado con la enzima de

de restricción Hind III. La eficacia de la incorporación del nucleótido radioactivo UTP ³⁵S fue de 61.9 %, obteniéndose 97 ng de ARNc por reacción y una actividad específica de 2.5 X10⁹ cpm/ug. La eficiencia de la reacción de la transcripción *in vitro* para generar el ARNc sentido fue menor con respecto a la obtenida para generar el ARNc antisentido, debido quizá a una diferencia entre las eficiencias de la transcripción entre la T7 y la SP6 ARN polimerasa. A pesar de esta diferencia la actividad específica de la sonda sentido no fue muy diferente a la obtenida con los ARNc antisentido. La figura 12 muestra los autoradiogramas de las electroforésis de las alícuotas de los ARNc antisentido marcados con UTP ³⁵S (figura 12 panel I b) y de la alícuota del ARNc sentido marcado con UTP ³⁵S (figura 12, panel II b). En esta figura se muestra que los transcritos antisentido y sentido mayoritarios son del tamaño esperado (aproximadamente de 700 pb) y que no hay fragmentos mayores que estos.

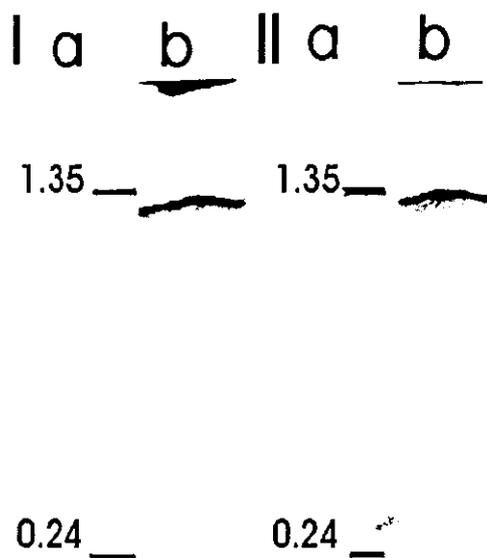


Figura 12. Autoradiograma de la transcripción *in vitro* de los ARNc antisentido de la PPII marcados con UTP ³⁵S y el ARNc sentido de la PPII marcado con UTP ³⁵S. Ia) patrón de los marcadores de peso molecular de ARN estándar (0.4-2.8 Kb, Gibco BRL), Ib) alícuota del ARNc antisentido marcado con UTP ³⁵S (2.1 X10⁶ cpm totales), Ila) patrón de los marcadores de peso molecular de ARN estándar (0.4-2.8 Kb, Gibco BRL), Iib) alícuota del ARNc sentido marcado con UTP ³⁵S (2.1 X10⁶ cpm totales). Las alícuotas de los páneces fueron sometidas a electroforésis en gel de acrilamida 8%, 8M urea y expuestas a una película por 1 hora a temperatura ambiente

II.4 Distribución del ARNm de la PPII.

Una vez que se obtuvo el transcrito de ARNc antisentido marcado con UTP^{33P} se estandarizaron las condiciones de hibridación *in situ* con estas sondas en cortes de cerebro de rata (ratas K y L) como la cantidad de sonda a emplear por tejido, la temperatura de hibridación y los lavados (datos no mostrados). Posteriormente se analizó la distribución del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* a todo lo largo del cerebro de la rata (ratas H e I). La figura 13 muestra que logramos aumentar la sensibilidad del ensayo ya que el tiempo de exposición a la película autoradiográfica se redujo a 3.5-4 días, pero básicamente observamos la misma distribución en el ARNm de la PPII que ya habíamos detectado con los oligonucleótidos, por ejemplo: el hipocampo y la corteza cerebral. En algunas regiones, por ejemplo: NPV donde los oligonucleótidos dieron una señal muy baja o dudosa fue posible corroborar la presencia de ARNm con esta sonda.

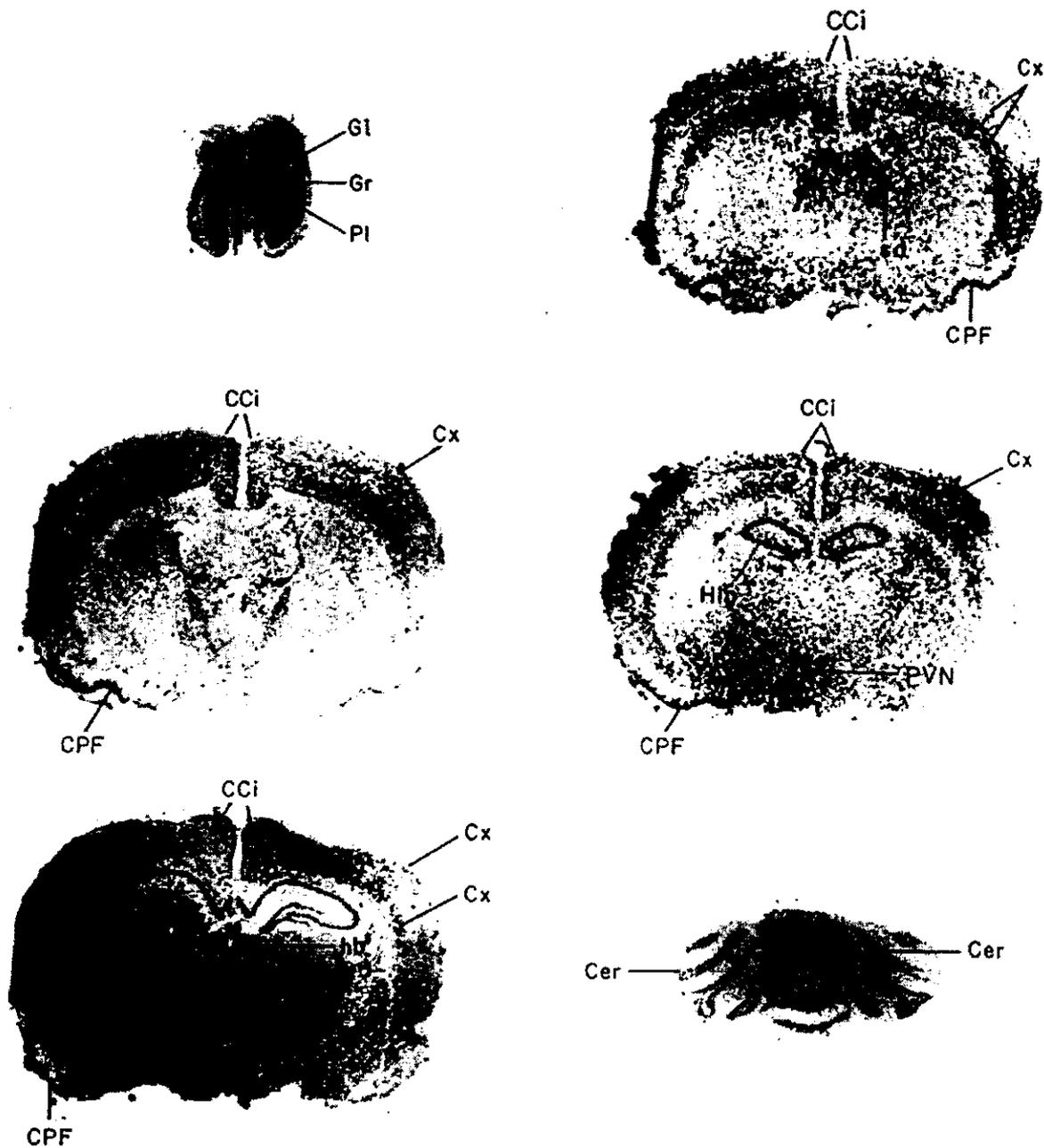


Figura 13. Distribución del ARN mensajero de la PPII en cortes de las partes anterior, media y posterior del cerebro de la rata. Los cortes de cerebro de rata (ratas H e I) fueron hibridados con los ARNc marcados con UTP ^{33}P (actividad específica 1.6×10^9 cpm/ μg) y expuestos a película por 3.5 días. La figura muestra de izquierda a derecha, de arriba hacia abajo cortes de cerebro de rata de la parte más anterior a la parte media y posterior del cerebro de la rata. GI: capa glomerular, Gr: capa granular, Pl: capa plexiforme, Cx: corteza cerebral, CCI: corteza cingulata, CPF: corteza piriforme, sd: núcleo septal dorsal, Hip: hipocampo, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo, hb: habénula lateral, Cer: lóbulos cerebelares.

A nivel de microautoradiografía la señal se observó muy dispersa, adentro y afuera de las células, lo que dificultó el reconocimiento de núcleos positivos, principalmente con niveles de ARNm de la PPII bajos (datos no mostrados). Por lo anterior se decidió estandarizar en las rebanadas de cerebro de rata (ratas M y N) la hibridación *in situ* con sondas de ARNc marcadas con un isótopo que permite una mayor resolución a nivel celular: ^{35}S .

Con estas sondas se realizó un análisis de la distribución del ARNm de la PPII (ratas M y N), obteniéndose a nivel de macroautoradiografía la misma señal que se había observado con los oligonucleótidos y los ARNc marcados con UTP ^{33}P (figuras 14 y 15). La microautoradiografía de los cortes coronales hibridados con ARNc marcado con UTP ^{35}S permitió confirmar los núcleos positivos para el ARNm de la PPII y se observó señal positiva en los que, por la baja síntesis de éste, no se habían podido detectar. En las figuras 16 a 22 se muestran fotografías de células positivas en algunos núcleos.

A la par que se realizó la distribución del ARNm de la PPII con las sondas de ARNc marcadas con ^{35}S se realizó una hibridación con ARNc sentido. La figura 23 muestra ausencia de señal en el tejido hibridado con ARNc sentido (figura 23, panel B) comparado con un corte de tejido contiguo hibridado con ARNc antisentido marcado con UTP ^{35}S (figura 23, panel A). Estos resultados son preliminares ya que durante este experimento surgieron problemas que dificultaron la detección de la señal con la sonda antisentido.

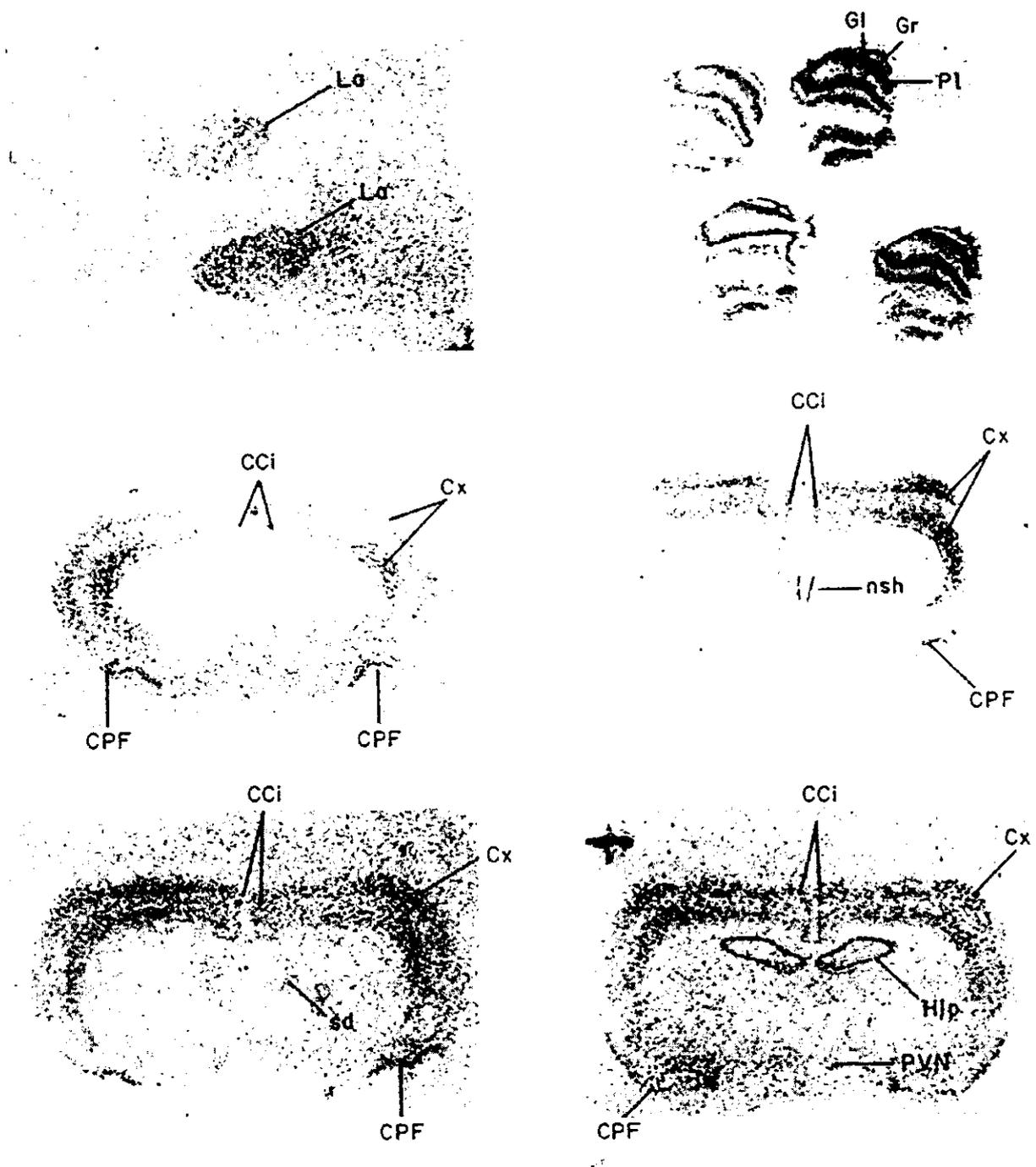


Figura 14. Distribución del ARN mensajero de la PPII en cortes de las partes anterior y media del cerebro de la rata. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron hibridados con ARNc marcado con UTP ^{35}S (actividad específica 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a película por 3.5 días. La figura muestra de izquierda a derecha, de arriba hacia a bajo cortes de cerebro de rata de la parte más anterior a la parte media del cerebro de la rata. La: lóbulo anterior de la hipófisis; Gl: capa glomerular, Gr: capa granular, Pl: capa plexiforme, Cx: corteza cerebral, Cci: corteza cingulata, CPF: corteza piriforme, nsh: núcleo septohipocampal, sd: núcleo septal dorsal, Hip: hipocampo, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.

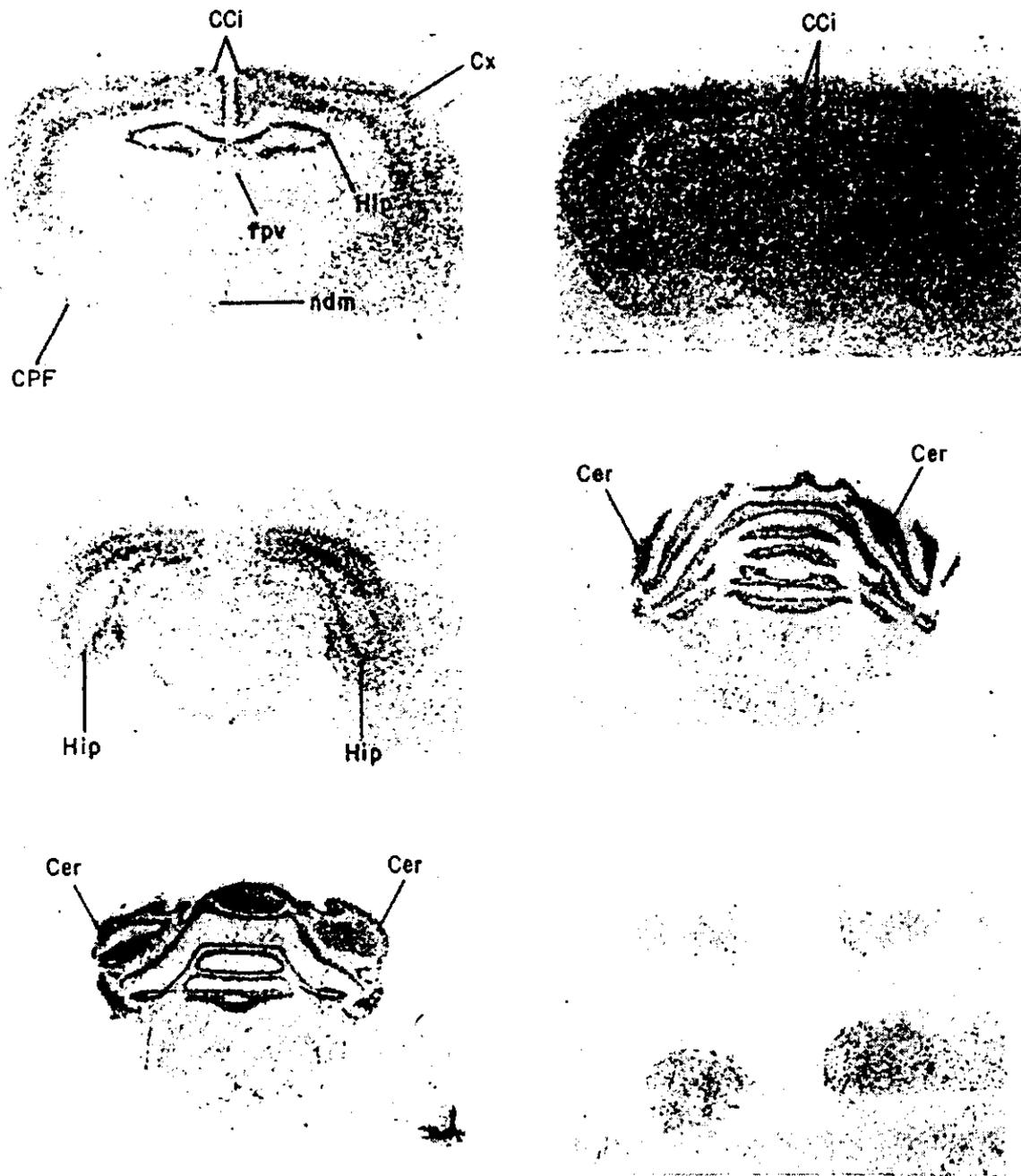


Figura 15. Distribución del ARN mensajero de la PPII en cortes de las partes media y posterior del cerebro de la rata. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron hibridados con ARNc marcados con UTP ³⁵S [actividad específica 3X10⁹ cpm/ug] y expuestos a película por 3.5 días. La figura muestra de izquierda a derecha, de arriba hacia abajo cortes de cerebro de rata de la parte media a posterior del cerebro de la rata. Cx: corteza cerebral, CCI: corteza cingulata, CPF: corteza piriforme, Hip: hipocampo, tpv: núcleo periventricular talámico, Cer: lóbulos cerebelares. La última fotografía corresponde a cortes de médula espinal cervical.

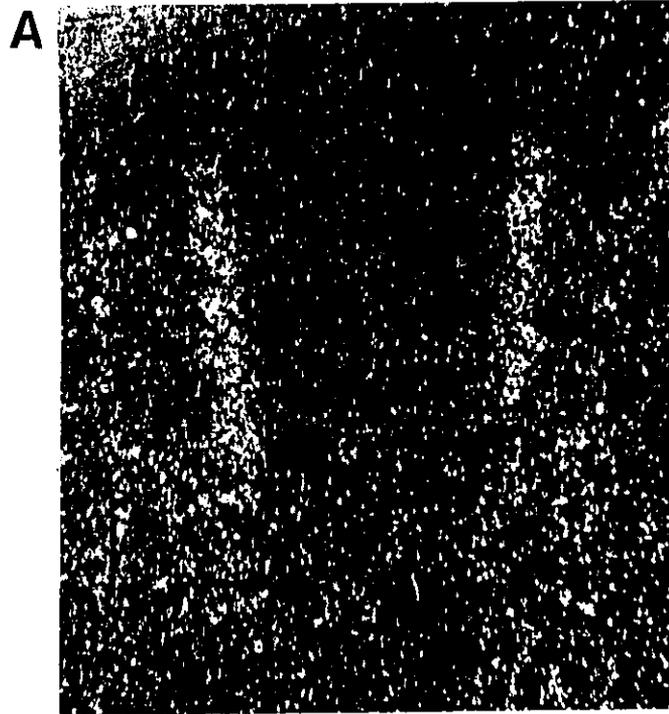


Figura 16. Fotografía de células que expresan el ARNm mensajero de la PPII en el núcleo septohipocámpal. En la figura se muestran fotografías tomadas con los objetivos 10X en campo oscuro (A), y en campo claro con el objetivo de 100X (B). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con UTP ^{35}S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ μg) y expuestas a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

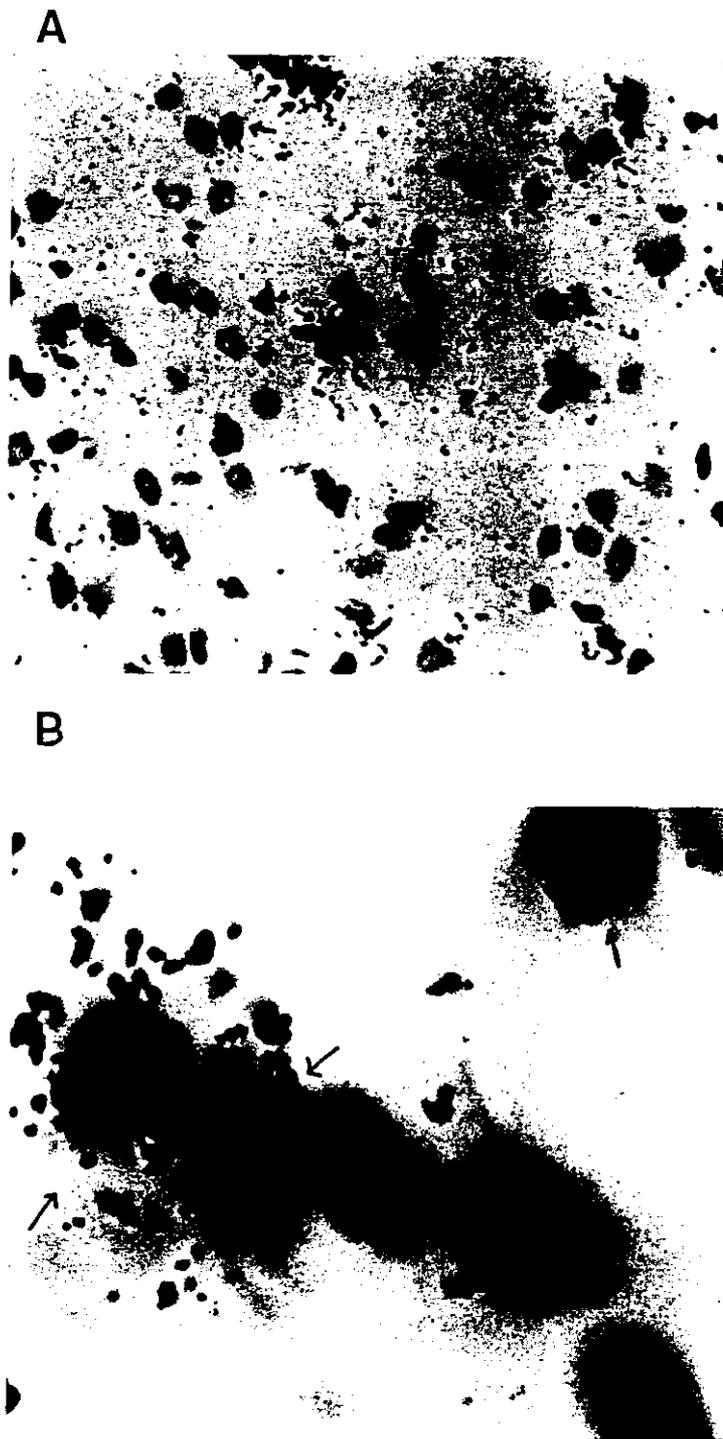


Figura 17. Fotografía de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en el núcleo septal dorsal. En la figura se muestran fotografías tomadas en campo claro con los objetivos 10X (A) y 100X (B). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con UTP ³⁵S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

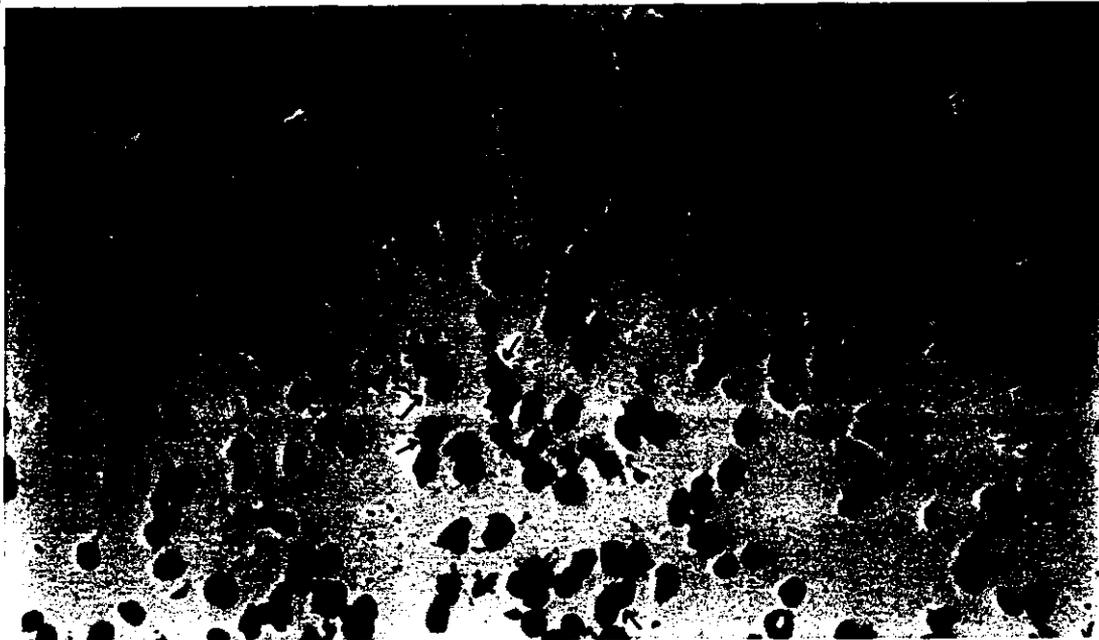
A**B**

Figura 18. Fotografía de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en el núcleo amigdalino central. En la figura se muestran fotografías tomadas en campo claro con los objetivos 40X (A) y 100X (B). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con UTP ^{35}S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestas a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

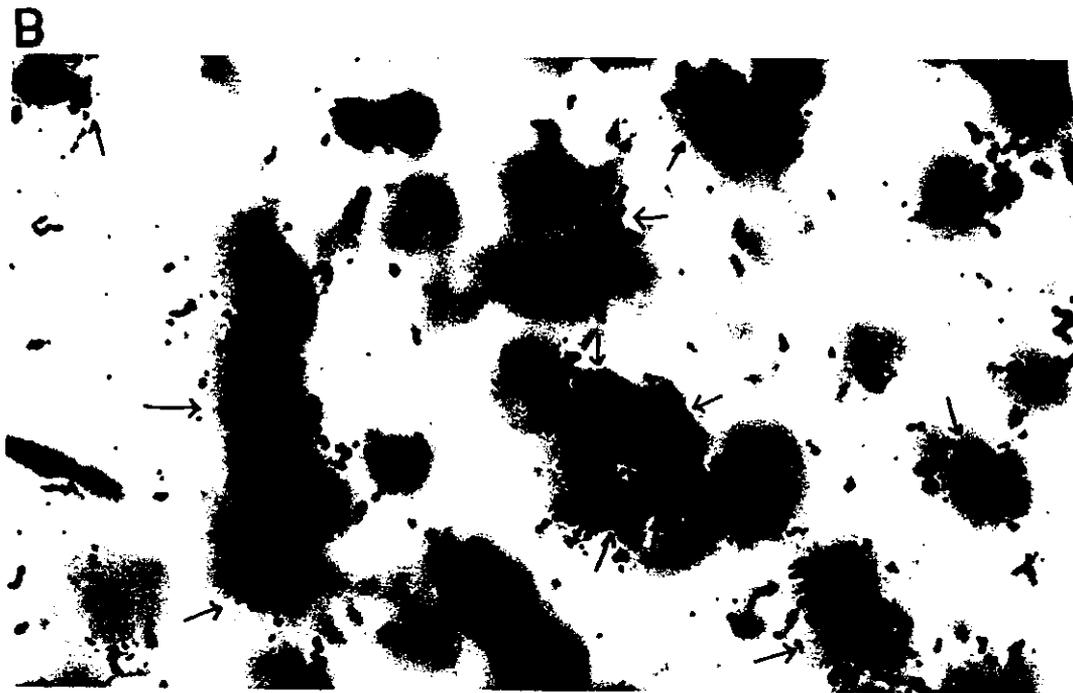
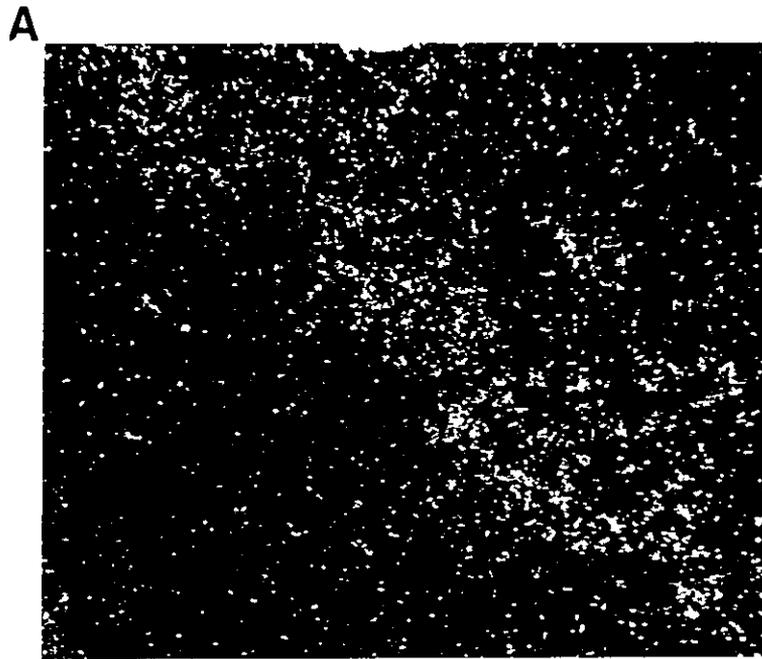


Figura 19. Fotografía de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en la corteza piriforme. En la figura se muestran fotografías tomadas con el objetivo de 10X en campo oscuro (A) y en campo claro con los objetivos de 100X (B). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con UTP ³⁵S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

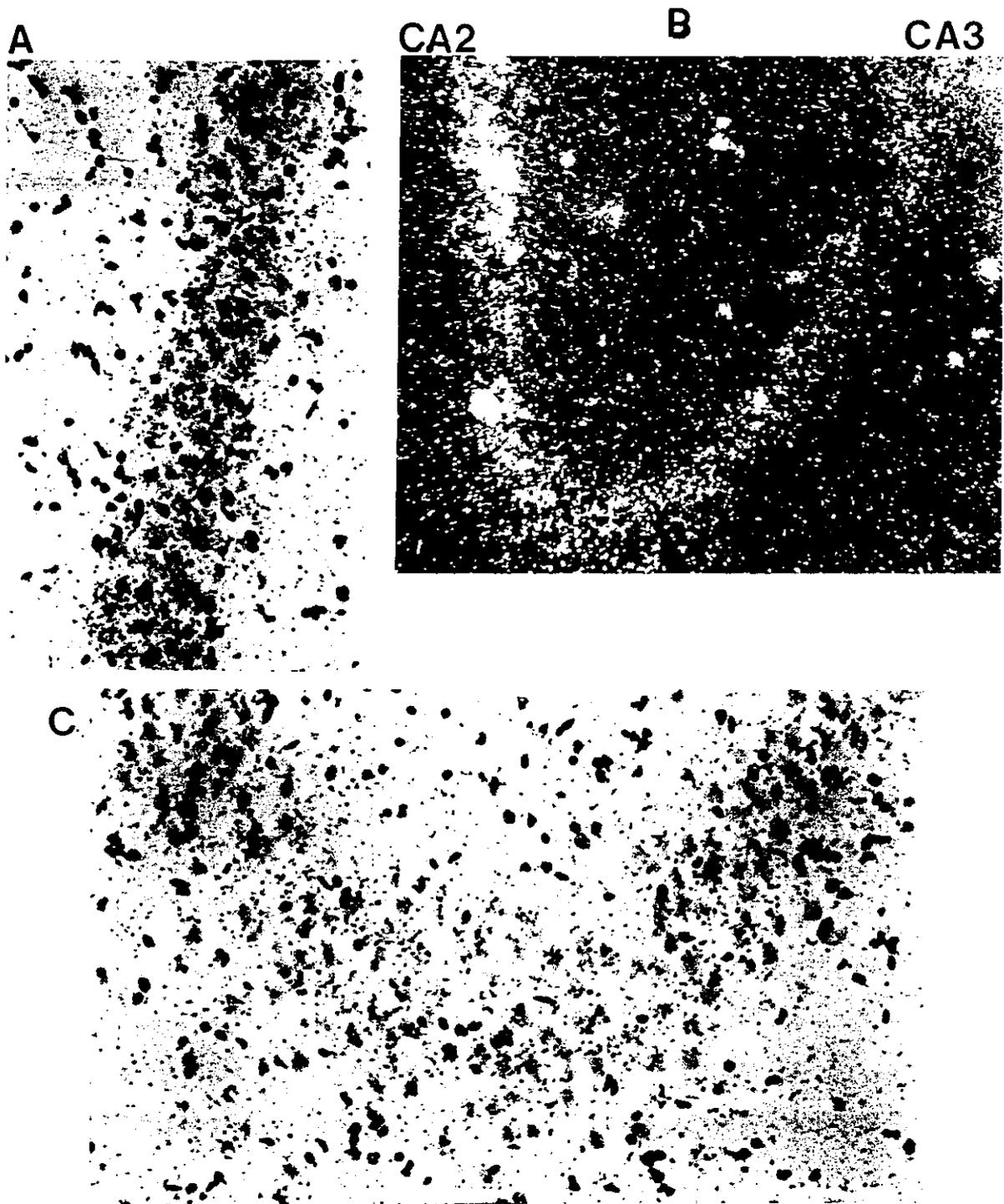


Figura 20. Fotografía de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en las capas CA2 y CA3 del hipocampo. En la figura se muestran fotografías tomadas con el objetivo 10X en campo claro de células de la capa CA2 (A) y CA3 (C) del hipocampo y en campo oscuro de las capas CA2 y CA3 (B). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con UTP ^{35}S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

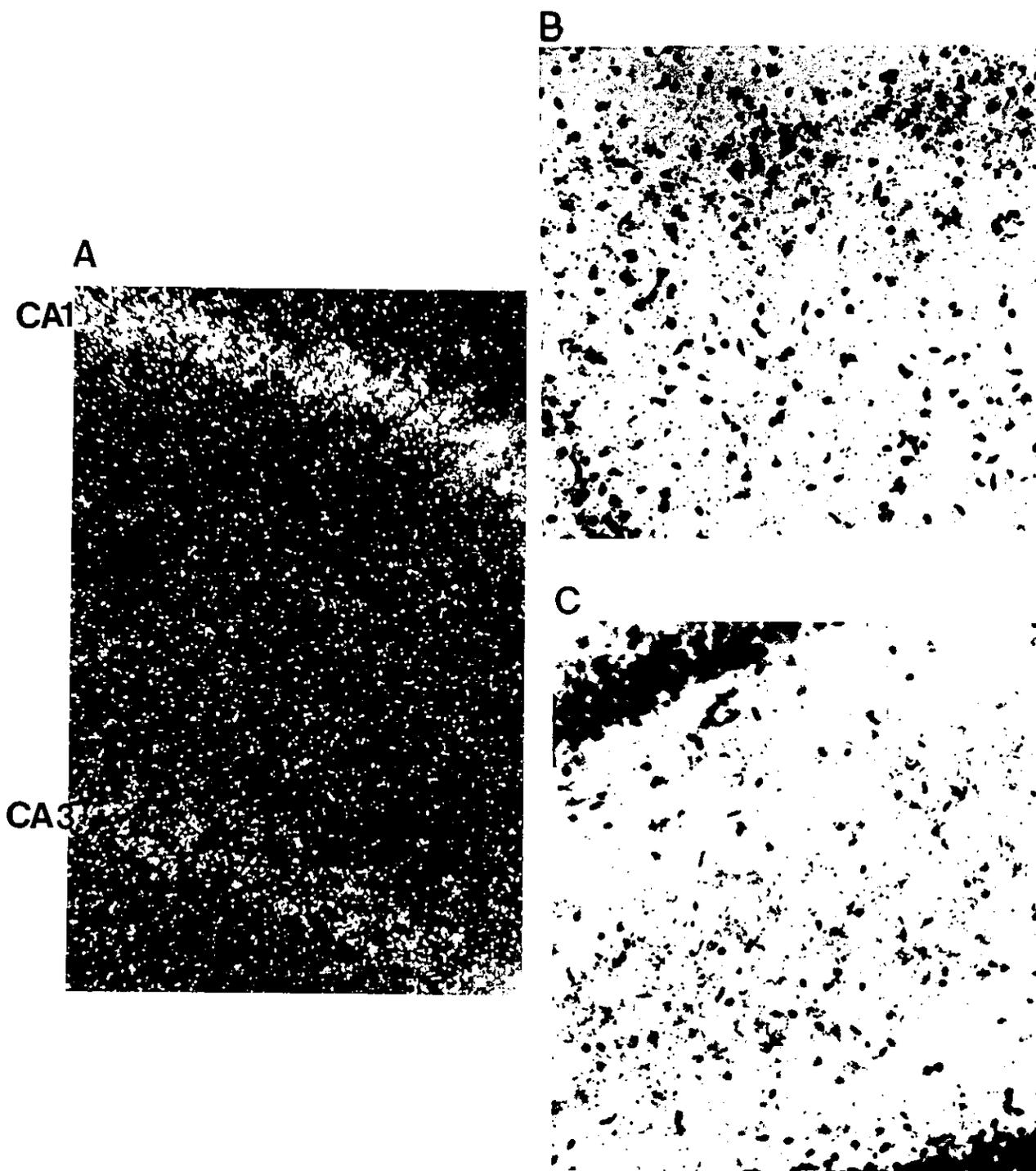


Figura 21. Fotografía de células que expresan el ARN mensajero de la PPII en las capas CA1 y CA3 del hipocampo. En la figura se muestran fotografías tomadas con el objetivo 10X en campo oscuro de las capas CA1 y CA3 (A) y en campo claro las capas CA1 (B) y CA3 (C). Los cortes fueron hibridados con el ARNc marcado con ^{35}S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.



Figura 22. Fotografía de células que expresan el ARNm mensajero de la PPI en las capas del hipocampo. En la figura se muestran fotografías tomadas con un objetivo de 40X de las capas CA1 (A), CA2 (B) y CA3 (C) y con el objetivo de 100X de la capa CA3 (D). Los cortes fueron hibridados con el ARNm marcado con UTP ³⁵S (actividad específica: 3×10^9 cpm/ug) y expuestos a emulsión fotográfica por 20 días. Los cortes de cerebro de rata (ratas M y N) fueron teñidos con Nissl, montados (anexo 7) y observados en luz visible. Algunas células positivas (con granos de plata precipitados) son indicadas con las flechas.

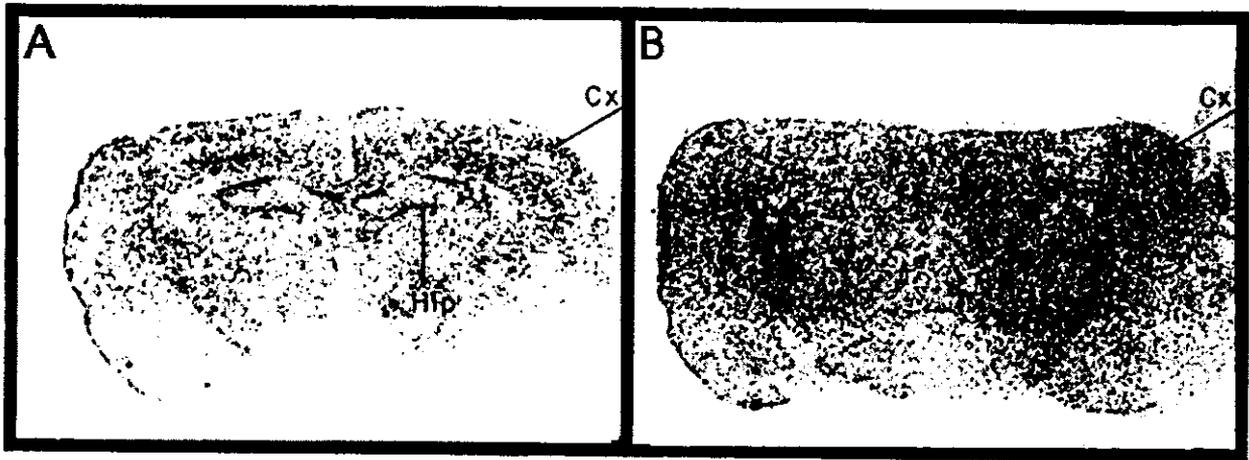


Figura 23. Distribución del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* en el cerebro de la rata en cortes de coronales al nivel del NPV con ARNc antisentido y sentido marcados con UTP ³⁵S. Experimentos controles. Cortes de cerebro contiguos (ratas O1-O5) fueron hibridados con ARNc antisentido (actividad específica 2.4 X10⁹ cpm/ug) (panel A) y con ARNc sentido (actividad específica 2.4 X10⁹ cpm/ug) (panel B). Los cortes fueron expuestos a una película por 5 días. Hip: hipocampo, Cx: corteza cerebral.

Con los resultados de las micro y macroautoradiografías obtenidas con las sondas de ARNc marcadas con UTP ³³P y con UTP ³⁵S se realizó una cuantificación visual y se construyó la tabla 7 en donde se muestran los núcleos positivos para el ARNm de la PPII así como la intensidad relativa de la señal.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 7

DISTRIBUCIÓN DE LAS REGIONES POSITIVAS AL ARNm DE LA PPII DETECTADO CON ARNc EN EL CEREBRO DE RATA.					
	REGIONES	PPII ARNm		REGIONES	PPII ARNm
Bulbo olfatorio	Capa glomerular	***	Hipotálamo	Núcleo ventro medial	*
	Capa granular	****	Epitálamo	Habénula lateral	**
	Capa plexiforme externa	****	Tálamo	Núcleo periventricular	**
	Capa plexiforme interna	****	Subtálamo	Zona incierta	*
Ganglios basales	Núcleo septolateral	**	Hipocampo	Capas piramidales del hipocampo	***
	Núcleo septomedio	**	Mesencéfalo	Colículo	*
	Núcleo septohipocampal	***		Periacueducto gris	*
Amígdala	Núcleo basolateral	*	Corteza cerebral	Corteza cingulata	**
	Núcleo de la base estriada terminal	*		Corteza frontal	**
	Núcleo cortical posterior	*		Corteza posterior	**
	Núcleo medio	*		Corteza piriforme	***
Hipotálamo	Area hipotalámica anterior	*		Corteza peririnal	*
	Area pre-óptica media	*	Cerebelo	Lóbulos cerebelares	****
	Area preóptica lateral	*	Médula oblongada	Núcleo motor dorsal	*
	Núcleo hipotalámico dorsomedio	*		Núcleo hipoglosal	*
	Núcleo hipotalámico lateral	*		Núcleo del tracto solitario	*
	Núcleo paraventricular	*		Núcleo reticular	*
	Núcleo periventricular	*	Médula espinal	Médula espinal cerv.	*

VII DISCUSION

La piroglutamilpeptidasa II (PPII) es una ectoenzima membranal capaz de inactivar a la TRH *in vitro*. Se ha propuesto que la PPII es la enzima responsable de modular los niveles de la TRH en el espacio extracelular. Varias investigaciones han sido realizadas para esclarecer si la distribución de la PPII le permite llevar a cabo esta función.

a) Análisis de la distribución de la actividad específica de la PPII en órganos y distintas regiones del SNC de la rata y del conejo. Estos trabajos, si bien indicaron que la PPII se encuentra principalmente en el SNC, distribuida de manera heterogénea, tienen como limitantes la imprecisión de la disección y la pobre resolución anatómica que se obtiene de esta manera.

b) Análisis de la distribución del ARNm de la PPII por la técnica de la protección a la ARNasa y por hibridación tipo "Northern blot" en órganos de la rata y por la técnica de la protección a la ARNasa, por la "RT-PCR" y por hibridación tipo "Northern blot" en regiones del SNC de la rata. Por medio de estas técnicas se obtuvieron resultados que concuerdan con la distribución de la actividad específica de la enzima, anteriormente mencionada. Estos trabajos, indican que el SNC es el principal órgano donde se sintetiza y expresa la PPII, siendo consistente con una función ligada a circuitos neuronales específicos. La concordancia entre la distribución de la actividad específica en las distintas regiones y/o núcleos del SNC y la distribución de su ARNm parece indicar que la proteína madura se localiza cerca del sitio de síntesis de su ARNm.

c) Efecto de la degeneración de axones de neuronas TRHérgicas en un circuito neuronal que proyecta del rafe hacia la médula espinal, sobre la actividad enzimática en la zona blanco. Análisis de la localización celular de la actividad en la adenohipófisis de rata.

Ambos experimentos sugieren que la enzima se localiza en las células blanco de la TRH, al menos en estos casos.

A pesar de todos estos esfuerzos no se había podido resolver de manera precisa la localización celular de la PPII en el SNC que permitiera entender mejor la relevancia de esta enzima. Debido a que los distintos esfuerzos por obtener anticuerpos dirigidos contra la PPII que permitieran determinar su localización no habían prosperado hasta entonces, en este trabajo se decidió emplear una de las técnicas de hibridación con la finalidad de localizar al ARNm de la enzima, aprovechando la reciente clonación y secuenciación de su ADNc.

Para poder resolver la distribución del ARNm de la PPII a nivel celular, se decidió emplear la técnica de hibridación *in situ* por que permite localizar, sin destruir la organización anatómica del SNC, el ARNm en cortes de tejido por medio de sondas específicas y permite observar a nivel celular la señal emitida por dichas sondas. Existen varios tipos de sondas, siendo las más empleadas los oligonucleótidos, por su facilidad de manejo y economía y los ARNc por su alta sensibilidad. En este trabajo se emplearon, en ese orden, estas dos sondas.

Para obtener una hibridación *in situ* cuyos resultados sean confiables es necesario determinar la especificidad de las sondas y estandarizar las condiciones óptimas de la hibridación. Los oligonucleótidos se caracterizaron por hibridaciones tipo "Southern blot", donde se observó que solo hibridan con el fragmento de ADNc al cual son complementarios, eliminando así la posibilidad de un error en el diseño y/o síntesis de estas sondas.

Los criterios de especificidad de los oligonucleótidos en la hibridación *in situ* fueron los siguientes:

- 1) El aumento de la señal obtenida por la hibridación *in situ* en las adenohipófisis de las ratas hipertiroideas comparada con la señal observada de las ratas eutiroideas. Este aumento es concordante con los datos obtenidos por Bauer y colaboradores en una hibridación tipo "Northern blot". En dicho reporte los autores muestran que los niveles de ARNm de la PPII de hipófisis de ratas hipertiroideas aumentan más de 10 veces con respecto a los niveles de dicho mensajero en hipófisis de ratas eutiroideas (83).
- 2) El desplazamiento de la señal por un exceso de 10 veces del oligonucleótido homólogo frío.
- 3) El que no se desplazara la señal cuando se realizó la hibridación en presencia de un exceso de oligonucleótido heterólogo frío.
- 4) La pérdida de señal en tejidos pretratados con ARNasa.
- 5) La obtención de una distribución de la señal prácticamente idéntica en hibridaciones *in situ* con dos oligonucleótidos distintos.

Estos datos en conjunto demostraron que la señal obtenida por la hibridación *in situ* con los oligonucleótidos en los distintos núcleos del SNC de la rata a nivel macroscópico y microscópico es probablemente específica para el ARNm de la PPII.

Las sondas de ARNc han demostrado ser más sensibles que los oligonucleótidos por formar híbridos más estables con los ARNm y sintetizarse con actividades específicas más altas que las obtenidas al marcar radioactivamente a los oligonucleótidos. La incertidumbre de que la distribución inicial obtenida con los oligonucleótidos fuera parcial, esto es que no se estuvieran detectando las regiones en donde el ARNm de la PPII estuviese poco abundante, nos llevó al empleo de ARNc como

sonda alternativa. Teniendo como antecedente la especificidad de los oligonucleótidos se decidió sintetizar ARNc que fuera homólogo a un fragmento de ADNc que contuviera las secuencias de los oligonucleótidos. La caracterización del fragmento de ADNc templado del ARNc se realizó mediante una hibridación tipo "Northern blot" en donde se observaron distintos ARNm que van de 4 a 9 Kb en cerebro e hipotálamo, detectándose niveles más bajos en hipófisis, como se había reportado con anterioridad.

La distribución de la señal obtenida con esta sonda a nivel macroscópico fue prácticamente igual a la obtenida con los oligonucleótidos a ese mismo nivel, reduciéndose el tiempo de exposición. El que dos sondas distintas mostraran una distribución de la señal prácticamente idéntica a nivel macroscópico apoya la especificidad de la sonda de ARNc y la especificidad de la distribución para el ARNm de la PPII. Como criterio adicional de especificidad de los ARNc se realizó un experimento preliminar que mostró que no hay señal en los tejidos hibridados con el ARNc sentido marcado. Otro dato importante es que la distribución observada en los distintos experimentos realizados con cada una de las sondas fue prácticamente igual, por lo que la distribución mostrada en las tablas 6, 7 y 8 es independiente de la rata empleada.

La señal detectada con ambas sondas a nivel de macroautoradiografía se reduce a unos cuantos núcleos y regiones. Encontrándose los niveles más altos en: el hipocampo, algunas capas de la corteza cerebral anterior y posterior, la corteza piriforme, el cerebelo y el bulbo olfatorio. Estos niveles concuerdan con los resultados de la distribución regional del ARNm de la PPII obtenidos por un ensayo de protección a ARNasa realizado durante el desarrollo de este trabajo (Wilk, E. Comunicación personal), por "Northern blot" (75) y por la "RT-PCR" en algunas de esas regiones, obtenidos en el laboratorio (77). Esta es la prueba definitiva de que los resultados

obtenidos por hibridación *in situ* reflejan la distribución celular del ARNm de la PPII. Durante la realización de este trabajo, otro grupo ha reportado de manera preliminar una distribución del ARNm de la PPII por hibridación *in situ*, empleando como sonda ARNc, encontrando una distribución parecida a la que se muestra en este trabajo (90).

Es solo en la microautoradiografía que se observan un mayor número de núcleos positivos al ARNm de la PPII. Es también a este nivel donde se aprecia que los niveles de ARNm de la PPII por célula en la mayoría de los núcleos son bajos ya que el número de granos de plata precipitados en los núcleos celulares es bajo, observación que también coincide con los bajos niveles de ARN de la PPII encontrados por el ensayo de protección a ARNasa, en distintos núcleos del cerebro de la rata.

Las tablas 6, 7 y 8 muestran las regiones y núcleos positivos observados a nivel macroscópico y microscópico. A pesar de que se trató de realizar el análisis de tal manera que se hibridaran todos los núcleos y regiones del SNC en al menos dos ratas, tomando varios cortes coronales cada 300 μm (basándonos en un atlas), por problemas técnicos algunos de estos núcleos y/o regiones no fueron rastreados o no se tomaron muestras adecuadas de éstas o bien se sometieron a hibridación una sola vez y/o en cortes de un solo animal. Los resultados mostrados en las distintas tablas solo muestran las regiones y núcleos que se consideran positivos para el ARNm de la PPII a nivel macro y microscópico. Se tomaron como parámetros para considerar como positiva la señal observada a nivel microscópico el que el tejido mostrara un ruido reducido y encontrar al menos 6 a 8 granos de plata sobre varios núcleos celulares de una misma región ó núcleo del SNC de la rata. Todos estos parámetros se fijaron con el propósito de evitar crear falsos positivos.

La distribución regional de las endopeptidasas 24.11, 24.16 y las aminopeptidasas MII y A en el SNC coincide con la distribución del (los) receptor(es) de su(s) sustrato(s), lo cual habla del papel de estas enzimas en la regulación de la concentración de sus sustratos en el espacio sináptico y, por ende, de su actividad sobre la célula blanco. Al comparar la distribución del ARNm de la PPII con el ARNm del receptor de la TRH (91) se observa que existe una gran coincidencia entre los núcleos positivos para el ARNm de la PPII y los reportados para el ARNm del receptor de la TRH (Tabla 8). En la tabla 8 se observa que de 56 regiones analizadas en este trabajo, con las sondas mencionadas, en 36 de ellas coinciden los ARNm de la PPII y del receptor de la TRH, siendo 7 regiones en las que no coinciden estos ARNm quedando 13 en duda. Para obtener mayor información sobre la relación entre estas distribuciones, se determinó si existe una correlación entre la cantidad de la señal para los dos ARNm, a lo largo de las regiones de la tabla 8. Se encontró una correlación positiva entre los dos parámetros (no mostrado), lo que sugiere que a mayor concentración de ARNm del receptor hay mayor concentración de ARNm de la PPII. Cabe aclarar que este análisis de correlación solo se puede tomar como preliminar por que las cuantificaciones reportadas son visuales y provienen de estudios distintos.

TABLA 8 DISTRIBUCIONES DE LOS ARNmS DE LA PPII Y DEL RECEPTOR DE LA TRH EN EL CEREBRO DE LA RATA.

REGIONES	NÚCLEOS	PPII ARNm	TRH-R ARNm	REGIONES	NÚCLEOS	PPII ARNm	TRH-R ARNm
BULBO OLFATORIO	Capa glomerular	***	###	AMÍGDALA	Núcleo de la base estriada terminal	*	##
	Capa granular	****	###		Núcleo central	-	-
	Capa plexiforme externa	****	###		Núcleo cortical posterior	*	##
	Capa plexiforme interna	****	###		Núcleo lateral	?	###
GANGLIOS BASALES	Caudato putamen	-	#	HIPOTALAMO	Núcleo medio	*	###
	Globo pálido	-	#		Area hipotalámica anterior	*	#
	Núcleo acumbens	-	##		Area preóptica lateral	*	###
	Núcleo septolateral	**	##		Area preóptica media	*	###
	Núcleo septomedio	**	##		Eminencia media	?	-
	Núcleo septo-hipocampal	***	###		Núcleo arcuato	?	#
	Núcleo septo-hipotalámico	-	-		Núcleo hipotalámico dorsomedio	*	###
	Area amigdalohipocampal	-	-		Núcleo hipotalámico lateral	*	###
Núcleo basolateral	*	-	Núcleo paraventricular	*	##		

Los # indican la cantidad de ARNm del receptor de la TRH reportado en 91. #<##<###<####. Los * indican la cantidad de señal cuantificada visualmente a nivel de micro y macroautoradiografía en este trabajo. *<**<***<****. ? regiones en donde hay duda. N.R. no reportado, - no detectado.

TABLA 8 DISTRIBUCIONES DE LOS ARNmS DE LA PPII Y DEL RECEPTOR DE LA TRH EN EL CEREBRO DE LA RATA.

REGIONES	NÚCLEOS	PPII ARNm	TRH-R ARNm	REGIONES	NÚCLEOS	PPII ARNm	TRH-R ARNm
	Núcleo periventricular	*	#	MESENCEFALO	Colículo superior	*	#
	Núcleo hipotálamico posterior	?	###		Periacueducto gris	*	#
	Núcleo supraquiasmático	-	##	CORTEZA CEREBRAL	Corteza cingulata	**	#
	Núcleo ventromedial	*	##		Corteza cerebral frontal	**	#
EPITÁLAMO	Habénula lateral	*	-		Corteza cerebral posterior	**	#
	Núcleo reticular talámico	-	-		Corteza piriforme	***	##
	Reuniens	-	-		Corteza peririnal	*	###
TÁLAMO	Núcleo centromedio	?	-	CEREBELO	Lóbulos cerebelares	****	N.R.
	Núcleo periventricular	*	##	MEDULA OBLONGADA	Núcleo hipoglosal	*	###
	Núcleo paratenial	?	N.R.		Núcleo motor dorsal	*	##
SUBTÁLAMO	Zona incierta	*	N.R.		Núcleo del rafe medular	-	N.R.
HIPOCAMPO	Capas piramidales del hipocampo	***	#		Núcleo reticular	*	N.R.
	Giro dentado	-	###		Núcleo tracto solitario	*	#
MAMILARES	Núcleo premamilar	?	-		Oliva superior	-	N.R.
	Núcleo supramamilar	?	###	MÉDULA ESPINAL	Médula espinal cervical	*	#

Los # indican la cantidad de ARNm del receptor de la TRH reportado en 91. #<##<###<####. Los * indican la cantidad de señal cuantificada visualmente a nivel de micro y macroautoradiografía en este trabajo. *<**<***<****. ? regiones en donde hay duda. N.R. no reportado, - no detectado.

Esta alta coincidencia pudiera indicar: a) que ambos mensajeros son sintetizados en la misma célula, b) que muy probablemente la PPII se encuentre en la célula blanco de la TRH y que quizá su localización le permitirá controlar los niveles de su sustrato en su célula blanco. La hipótesis del inciso a requerirá, para confirmarse, del empleo de una doble hibridación *in situ* para el ARNm de la PPII y el ARNm del receptor de la TRH. La segunda hipótesis requerirá de una doble inmunohistoquímica contra esta enzima y la TRH ó el receptor de la TRH para comprobarse.

Si bien la detección del ARNm de la PPII en un núcleo no necesariamente indica que éste se traduzca en una proteína activa o que la proteína no sea transportada fuera del núcleo, si concuerda la distribución del ARNm con la presencia de la actividad de la enzima en las distintas regiones del SNC de la rata (ver tabla 5). Lo anterior apoya la idea de que el mensajero que se detectó mediante la hibridación *in situ* sea traducido en una enzima activa, al menos en la mayoría de las regiones estudiadas y que la enzima no sea transportada lejos de su sitio de síntesis.

Sin embargo, también se observan regiones en donde se reportó señal para el receptor de la TRH pero no se encontró señal para el ARNm de la PPII. En estas regiones ó núcleos a) la distribución del ARNm de la PPII puede ser incompleta por falta sensibilidad en la técnica para detectar un ARNm que se encuentra en baja concentración ó b) la utilización de atlas diferentes en los dos estudios ó c) el ARNm del receptor de la TRH pudieran traducirse ó d) pudiera haber otros mecanismos de eliminación de la TRH de la célula blanco como el mecanismo de internalización a través del receptor, observado y medido previamente o por captura llevado a cabo por un sistema de transporte activo. También se encontraron regiones o núcleos en donde se encontró señal para el ARNm de la PPII pero no se reportó señal para el ARNm del receptor de la TRH. Esto puede deberse: a) a que la distribución del ARNm del receptor de la TRH es incompleta por que

falta sensibilidad en la técnica para detectar un ARNm que se encuentra en baja concentración ó b) a la utilización de atlas diferentes en los dos estudios ó c) a que en estas regiones la PPII sea presináptica. Con relación a esta última posibilidad se comparó la distribución del ARNm de la PPII con el ARNm de la TRH (92). La comparación mostró que aunque, de manera general, los sitios de síntesis de estos ARNm no coinciden hay excepciones como el área preóptica y el núcleo paraventricular del hipotálamo. De las 2 regiones donde se encontró al ARNm de la PPII y donde no se reportó al ARNm del receptor, en la habénula no hay con el ARNm de la TRH y en el núcleo basolateral del hipotálamo no hay información sobre dicho mensajero, por lo que no se puede concluir si en esta última región la PPII pudiera ser presináptica. Otra explicación para la inconsistencia parcial entre las distribuciones de los ARNm de la PPII y del receptor de la TRH es la posibilidad de que otra proteasa soluble con características similares a la PPII provenga del mismo gen (75) y sea detectada con las sondas empleadas.

VIII CONCLUSIONES

En conclusión hemos optimizado la detección del ARNm de la PPII por hibridación *in situ* en el SNC. Hemos demostrado que el patrón de hibridación obtenido es específico para la PPII e identificado una parte de las regiones y núcleos que la sintetizan. La comparación de esta distribución con la distribución conocida para el ARNm del receptor de la TRH sugiere que en buena parte del SNC los ARNm de la PPII y del receptor de la TRH están colocalizados. Esto es consistente con la hipótesis de que la PPII está inactivando a la TRH a proximidad de las células blanco.

IX ANEXOS

1.-SOLUCIONES

Para extracción de ARN

-Agua-DEPC: el agua grado miliQ-UF esterilizada fue tratada toda la noche con 0.1% de dietil pirocarbonato (DEPC) en agitación continua y posteriormente autoclaveada por 20 a 30 minutos a 120 lb de presión. Esta agua es libre de ARNasas.

-Fenol: 500 gramos de fenol se fundieron a 65°C y se saturaron con agua DEPC en agitación continua toda la noche. Posteriormente se guardó en frasco ámbar a 4°C.

-Solución D: tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosil al 0.5%, en agua DEPC. La solución se filtró con un filtro de poro de 0.22 μ m (Millipore). Momentos antes de usarse se agregó el β mercaptoetanol 0.1M.

Electroforesis

-Solución de corrida para muestras de "Northern blot": 0.025% de azul de bromofenol y 0.025% de xilencianol en formamida (BRL) 100%

-TBE pH 8 compuesta por Tris 4.5M, ácido bórico 0.44M y EDTA 0.1M pH 8.

-TE pH 8 compuesta por Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.

Para hibridación *in situ*.

-ADN de espermatozoos de salmón: se preparó una solución de 10 mg/ml disolviendo el ADN de espermatozoos de salmón en agua MiliQ-UF, se sonicó hasta que estuviera más líquido la solución, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C.

-ARNt de levadura: se preparó una solución de 10 mg/ml disolviendo el ARNt de levadura en agua MiliQ-UF, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C.

-Denhart's 100 X compuesta por 1 gramo de Ficoll, 1 gramo de polivinilpirrolidona y

1 gramo de albúmina de suero bovino disueltos en 50 ml de agua mili Q-UF a 37°C. Se filtró con un filtro de poro de 0.22 um (Millipore) y almacenó en alícuotas pequeñas a -20°C.

-Fenol: ver extracción de ARN.

-Formamida desionizada: Se ponen a desionizar aproximadamente 50 ml de formamida (BRL) con 5 gramos de resina BioRad 501-X8 y se agita por unos momentos. Se aseguró que no todas las esferas cambiaran a color amarillo, se alícuotó y guardó a -20°C.

-Líquido de centelleo: está compuesto por un 0.8% de PPO y 0.01% de POPOP en tolueno.

-Paraformaldehído al 4%. Se disolvió el paraformaldehído en agua MiliQ-UF con PBS IX a 60-65°C agitando hasta obtener una solución incolora. La solución se dejó enfriar y se filtró con un filtro de 0.22 um. Esta solución se preparó justo antes de usarse.

-PBS 10 X compuesta por NaCl 136 mM, KH_2PO_4 14.7 mM, Na_2HPO_4 80 mM, KCl 26.8 mM. La solución se filtró con un filtro de 0.22 um (Millipore) y autoclaveó. Las soluciones que se indican en materiales y métodos son diluciones hechas a partir de esta solución.

-SSC 20 X compuesta por NaCl 3M y citrato de Na 0.3M; se ajustó el pH a 7.0, se filtró con un filtro de poro de 0.22 um (Millipore) y autoclaveó. Las soluciones que se indican en materiales y métodos son diluciones hechas a partir de esta solución.

Marcaje de sondas

-Solución acarreadora para cuantificar la incorporación de nucleótidos compuesta por EDTA 10 mM pH 8, SDS 0.1% y ARN t 0.5 mg/ml.

Soluciones para teñir los cortes de tejido

-Hematoxilina. Para preparar la hematoxilina se puso a hervir 1 lt de agua para agregarle 100 gramos de sulfato de aluminio y potasio, dejando hervir la solución por 5 minutos. Aparte se disuelven en 50 ml de etanol absoluto (Merck) 5 gramos de hematoxilina. Las dos soluciones se mezclan perfectamente y se deja hervir unos minutos. Finalmente se agregan 5 ml de ácido acético glacial. La solución se deja enfriar para posteriormente filtrarla en papel filtro (Wattman #1). La solución se guarda en frasco ámbar.

-Eosina. Para preparar la eosina se requieren las siguientes soluciones:

*solución 1: a un litro de agua destilada se agregan 5.75 ml de ácido acético glacial.

*solución 2: se disuelven en 1 lt de agua 8.2 gramos de acetato de sodio.

Se mezclan 295 ml de la solución 1 con 705 ml de la solución 2. En esta solución final se disuelven 5 gramos de eosina y se añaden 2 cristales de timol como conservador. El pH de la solución final debe ser de 5. La solución final se filtra con papel filtro (Wattman #1) y se guarda en un frasco ámbar.

-Nissl. Para preparar el Nissl se requiere agregar 36 ml de NaOH 1M a 200 ml de ácido acético 1M y aforarlo a 1 lt. La solución obtenida se calienta a 60°C y se agregan 2.5 gramos de tionina hasta que se disuelva. La solución se deja hervir por 45 minutos. Posteriormente se filtra y guarda en un frasco ámbar.

2.- SECUENCIAS Y SONDAS

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA HIBRIDACIÓN *INSITU*

Oligonucleótido A

5' GAG-CAG-TAC-GGC-CAG-CAT-GGT-GAC-AGC-CAG-CAG-TGC-CAC-GAT-
GGA-CAC-GG 3'

Tm: 79 °C

%GC: 64%

Oligonucleótido C

5' TCA-GCA-CCA-CCA-CCA-AGA-CCT-GCG-TTT-GTG-GGT-AGA-GGA-AAA-
AGC-CTG-CT 3'

Tm: 74.9 °C

%GC: 54%

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR

Estos oligonucleótidos, de 35 nucleótidos, se emplearon para amplificar un fragmento de 675 pares de bases que corresponde a la parte amino terminal del ADNc de la PPII y contiene las secuencias de los oligonucleótidos A y C empleados en la hibridación *in situ*.

Oligonucleótido antisentido

5' CGT-GGT-CAG-GAA-GCT-TAG-ATT-GTA-GTG-CCT-CTG-CG 3'

Tm: 56.2 °C

%GC: 54.2%

Oligonucleótido sentido

5' GGC-TGT-CAG-GCT-GCA-GGC-TGA-CTC-GGT-GGG-AGT-GA 3'

Tm: 60.9 °C

%GC: 65.7%

FRAGMENTO DE ADN QUE SE AMPLIFICA A PARTIR DEL ADNc DE LA PPII DE LA RATA UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y EMPLEANDO LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DESCRITOS EN LA PARTE ANTERIOR.

La reacción en cadena de la polimerasa empleando los oligonucleótidos arriba mencionados genera el siguiente fragmento de ADNc de 676 pares de bases. Este fragmento incluye la secuencia del ADNc de la PPII de los nucleótidos 129 a 773. Se aumentaron fragmentos nucleotídicos en las partes 5' y 3' que contienen sitios de restricción (Pst I y Hind III) para poderlo subclonar en el plásmido para transcripción *in vitro* como se muestra en la figura 3.

Pst I

5' GGC-TGT-CAG-GCT-GCA-GGC-TGA-CTC-GGT-GGG-AGT-GA 3'

1 GGC-TGA-CTC-GGT-GGG-AGT-GAG-ACC-CCG-CAC-

31 CAC-GGA-GCG-CCA-CAT-CGC-AGT-GCA-CAA-GAG-GCT-TGT-GCT-GGC-TTT-

75 TGC-CGT-GTC-CAT-CGT-GGC-ACT-GCT-GGC-TGT-CAC-CAT-GCT-GGC-CGT-

120 ACT-GCT-CAG-CCT-GCG-GTT-CGA-CGA-GTG-TGG-AGC-GAG-CGC-GGC-GAT-

165 GCC-GGG-CAC-CGA-CGG-TGG-CCT-CGG-AGG-CTT-CCC-TGA-GCG-TGG-TGG-

210 CAA-CAG-CAG-CTA-CCC-AGG-ATC-TGC-CCG-GCG-CAA-CCA-CCA-CGC-GGG-

255 TGA-GGA-ATC-CTC-GCA-GCG-TGA-GAT-CGG-CGA-GGT-GGG-CAC-CGC-GGG-

300 GAC-CCC-GTC-TGC-CCA-TCC-GCC-GTC-GGA-GGA-AGA-GCA-GGA-GCA-GTG-

345 GCA-GCC-CTG-GAC-TCA-GCT-GCG-CCT-ATC-CGG-CCA-CCT-TAA-GCC-GCT-

390 GCA-CTA-CAA-TTT-GAT-GCT-CAC-CGC-CTT-CAT-GGA-GAA-CTT-CAC-CTT-

435 CTC-TGG-GGA-GGT-CAA-CGT-GGA-GAT-CGC-GTG-CCA-GAA-CGC-CAC-CCG-

480 CTA-CGT-GGT-ACT-GCA-CGC-CTC-CCG-GGT-GGC-GGT-GGA-GAA-GGT-GCA-

525 AGT-AGC-GGA-AGA-CCG-GGC-GTT-CGG-GGC-TGT-CCC-GGT-AGC-AGG-CTT-

570 TTT-CCT-CTA-CCC-ACA-AAC-GCA-GGT-CTT-GGT-GGT-GGT-GCT-GAA-TAG-

615 AAC-CCT-GGA-TGC-GCA-GAG-GCA-CTA-CAA-TCT

3' G-CGT-CTC-CGT-GAT-GTT-AGA-TTC-GAA-GGA-CTG-

GTG-C5' Hind III

3.- EXTREMO 5' DEL ADNc DE LA PPII Y SU SECUENCIA PEPTÍDICA PROPUESTA

A continuación se señala en el extremo 5' del ADNc de la PPII los fragmentos a los cuales son homólogos los oligonucleótidos) (línea continua) y el ARNc (línea punteada) empleados en este trabajo, así como la secuencia transmembranal (recuadro), los probables sitios de glicosilación (*) y el sitio probable de fosforilación (P) y sulfatación (S).

```

1 AAGAAGAAAA AGAAGAGGA AGAAGAAGGA GGAGGAGGGG GCCGAGAAGA GCAGTTCACC GTTTGCGGCC ACC
  M G E D D A A L R A S G R G L S D P W A D S V
61 ATG GGA GAA GAC GAC GCC GCG CTC CGG GCA AGC GGC AGG GGG CTC TCG GAC CCG TGG GCT GAC TCG GTG
      P
  G V R P R T T E R H I A V H K R L V L A F A V
129 GGA GTG AGA CCC CGC ACC ACG GAG CGC CAC ATC GCA GTG CAC AAG AGG CTT GTG CTG GCT TTT GCC GTG
  S I V A L L A V T M L A V L L S L R F D E C G
197 TCC ATC GTG GCA CTG CTG GCT GTC ACC ATG CTG GCC GTA CTG CTC AGC CTG CGG TTC GAC GAG TGT GGA
      Oligonucleótido A
  A S A A M P G T D G G L G G F P E R G G N S S
265 GCG AGC GCG GCG ATG CCG GGC ACC GAC GGT GGC CTC GGA GGC TTC CCT GAG CGT GGT GGC AAC AGC AGC
  Y P G S A R R N H H A G E E S S Q R E I G E V
333 TAC CCA GGA TCT GCC CGG CGC AAC CAC CAC GCG GGT GAG GAA TCC TCG CAG CGT GAG ATC GGC GAG GTG
  G T A G T P S A H P P S E E E Q E Q W Q P W T
402 GGC ACC GCG GGG ACC CCG TCT GCC CAT CCG CCG TCG GAG GAA GAG CAG GAG CAG TGG CAG CCC TGG ACT
      *
  Q L R L S G H L K P L H Y N L M L T A F M E N
470 CAG CTG CGC CTA TCC GGC CAC CTT AAG CCG CTG CAC TAC AAT TTG ATG CTC ACC GCC TTC ATG GAG AAC
      *
  F T F S G E V N V E I A C Q N A T R Y V V L H
539 TTC ACC TTC TCT GGG GAG GTC AAC GTG GAG ATC GCG TGC CAG AAC GCC ACC CGC TAC GTG GTA CTG CAC
  A S R V A V E K V Q V A E D R A F G A V P V A
608 GCC TCC CGG GTG GCG GTG GAG AAG GTG CAA GTA GCG GAA GAC CGG GCG TTC GGG GCT GTC CCG GTA GCA
      *
  G F F L Y P Q T Q V L V V V L N R T L D A Q R
677 GGC TTT TTC CTC TAC CCA CAA ACG CAG GTC TTG GTG GTG GTG CTG AAT AGA ACC CTG GAT GCG CAG AGG
      Oligonucleótido C
  H Y N L K I I Y N A L I E N E L L G F F R S S
746 CAC TAC AAT CTG AAG ATT ATC TAC AAT GCC CTG ATA GAG AAC GAG CTT TTG GGC TTC TTC CGC AGC TCC
  Y V I H G E R R F L G V T Q F S P T H A R K A
815 TAC GTG ATC CAC GGG GAG AGA AGA TTC CTC GGT GTT ACT CAG TTT TCA CCT ACA CAT GCC AGG AAG GCA
  F P C F D E P I Y K A T F K I S I K H Q A T Y
884 TTT CCA TGT TTT GAT GAA CCA ATC TAC AAG GCC ACT TTC AAA ATC AGC ATC AAA CAT CAA GCA ACC TAT
  L S L S N M P V E T S V F E E D G W V T D H F
953 TTG TCT CTC TCC AAC ATG CCC GTG GAA ACA TCT GTG TTT GAG GAA GAT GGA TGG GTA ACA GAT CAC TTT
      *
  S Q T P L M S T Y Y L A W A I C N F T Y R E T
1022 TCA CAG ACC CCT CTC ATG TCC ACA TAT TAT TTA GCC TGG GCG ATT TGC AAC TTC ACA TAC AGA GAA ACT
  T T K S G V V V R L Y A R P D A I R R G S G D
1091 ACT ACC AAG AGT GGG GTT GTA GTT CGA TTA TAT GCA AGA CCC GAC GCT ATC AGA AGA GGA TCC GGG GAC
      S
  Y A L H I T K R L I E F Y E D Y F K V P Y S L
1160 TAT GCT CTC CAC ATT ACA AAG AGA TTA ATA GAA TTT TAT GAA GAC TAC TTT AAA GTG CCC TAT TCT TTG
  P K L D L L A V P K H P Y A A M E N W G L S I
1229 CCA AAA CTA GAT CTT TTA GCT GTG CCT AAG CAT CCT TAT GCT GCT ATG GAG AAC TGG GGA CTA AGT ATT
  F V E Q R I L L D P S V S S I S Y L L D V T M
1298 TTT GTG GAA CAA AGA ATA CTG CTG GAT CCC AGT GTG TCA TCT ATT TCT TAT TTG CTG GAT GTC ACC ATG
  V I V H E I C H Q W F G D L V T P V W W E D V
1367 GTC ATT GTT CAT GAA ATA TGT CAC CAG TGG TTT GGT GAC CTT GTG ACC CCA GTG TGG TGG GAA GAT GTC
  W L K E G F A H Y F E F V G T D Y L Y P S W N
1436 TGG TTG AAG GAA GGC TTT GCT CAC TAC TTT GAA TTT GTG GGT ACA GAC TAC CTC TAC CCT TCC TGG AAC
  
```

4.- DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INCORPORACIÓN DEL NUCLEÓTIDO RADIOACTIVO EN MOLÉCULAS DE ADN Ó ARN.

Para medir el porcentaje de incorporación del nucleótido radioactivo después de finalizar las reacciones enzimáticas empleadas en este trabajo: la terminal transferasa, el "random priming" ó la transcripción *in vitro*, se tomó 1ul de la reacción en cuestión y se diluyó en 25 ul de una solución acarreadora (anexo 1). Posteriormente, la solución se vortexó y centrifugó por unos segundos. De la solución se tomaron, por cuatriplicado, 5 ul para colocarlos en papeles DEAE de 1 cm² de superficie aproximadamente. Los papeles se secaron en un horno por 5 min. Dos de los 4 papeles se lavaron: 5 veces por 5 minutos con una solución de Na₂HPO₄ 0.5 M; una vez con agua por 1 minuto y una vez por 1 minuto con etanol industrial y se secaron en un horno. A los papeles se les agregó 5 ml de líquido de centelleo (anexo 1) para medir la radioactividad que emitían en un contador de centelleo. Se hizo un promedio de las cpms totales obtenidas tanto de los papeles lavados (cpms incorporadas) como de los papeles sin lavar (cpms totales). El porcentaje de incorporación fue el resultado de la relación entre las cpms incorporadas/ las cpms totales multiplicado por 100.

5.- ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE LOS PRODUCTOS.

La actividad específica de los oligonucleótidos marcados por la terminal transferasa se obtuvo midiendo, en un contador de centelleo, la radioactividad emitida por papeles DEAE que contenían 0.5 ul de la solución final del oligonucleótido marcado corregido por el volumen total y se dividió entre 0.033 ug (el peso de las 2 picomolas del oligonucleótido que se emplearon en la reacción de marcaje).

La actividad específica de los fragmentos obtenidos en la reacción de "random priming" se obtuvo como lo indica el protocolo de esta reacción (Amersham).

$$\text{ng ADN} = \frac{\mu\text{Ci} \times \% \text{de incorporación} \times \text{peso molecular del nucleótido radioactivo}}{\text{actividad específica del nucleótido radioactivo}} + 25 \text{ng}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{cpms totales finales}}{\text{ng de ADNc}}$$

La cantidad de ARNc sintetizada en la transcripción *in vitro* se calculó de la siguiente manera

$$\mu\text{g de ARN} = \text{pmol de UTP} \times 757.575 \times \% \text{de incorporación}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{cpms totales finales}}{\mu\text{g de ARNc}}$$

6.- PROCESO DE REVELADO DE LAS PELÍCULAS AUTORADIOGRÁFICAS.

Las películas autoradiográficas se revelaron por 3 minutos en revelador (GBX, Kodak), se enjuagaron en agua por un minuto y se fijaron (GBX, Kodak) por 5 minutos, finalmente las películas se enjuagaron con abundante agua. Todo este proceso se llevó a cabo en la oscuridad y con las soluciones a temperatura ambiente.

7.- TINCIONES

-Hematoxilina-eosina. Los cortes de tejido se sumergieron en las siguientes soluciones en etanol al 96% por 1 minuto, en agua por 1 minuto, en hematoxilina por 5 minutos, en agua hasta eliminar el exceso de colorante, dos veces rápidamente en etanol absoluto con HCl al 1%, en agua por 1 minuto, en agua por 1 minuto, en eosina tres veces rápidamente, en agua hasta eliminar el exceso de colorante, en etanol al 96% por 1 minuto, en etanol absoluto por 1 minuto 2 veces y en xilol por 1 minuto dos veces cada uno. Los cortes se sacaron uno por uno y se les agregó una gota de Permout para posteriormente montarles el cubreobjetos. El exceso de Permout y de xilol se limpió y se dejó secar.

-Azul de toluidina. Los tejidos se sumergieron en: una solución de azul de toluidina al 0.3% por 1 minuto, en etanol al 96% por 1 minuto, en etanol absoluto por 1 minuto, y en xilol por 1 minuto dos veces. Los cortes se sacaron del xilol uno por uno y se les agregó una gota de Permout para posteriormente montarles el cubreobjetos. El exceso de Permout y de xilol se limpió y se dejó secar.

-Nissl. Los cortes de tejido se sumergieron en las siguientes soluciones: en Nissl por 1 minuto, en agua por 1 minuto, en etanol 50% por 10 segundos, en etanol 70% por 10 segundos, en etanol 95% por 10 segundos dos veces, en etanol absoluto por 1 minuto dos veces y en xilol por 3 minutos 2 veces. Los cortes se secaron uno por uno y se les agregó una gota de Permout para posteriormente montarles el cubreobjeto. El exceso de Permout y de xilol se limpió y se dejó secar.

XREFERENCIAS

- 1.-Lodish,H.;Baltimore,D.;Berk,A.;Zipursky,S.L.;Matsudora,P.Darnell,J. Nerve cells in: Molecular Cell Biology Scientific American Books Press, 3th edition, N.Y.,1996 pag:925-990.
- 2.-Agnati,L.F.;Bjelke,B.;Fuxe,K. Volume transmission in the brain. American Scientist 1992; 80: 362-373.
- 3.-Mc Queen, J. Classical Transmitters and neuromodulators. In: Introduction: Role of chemical neurotransmission in brain function. In: Basic and clinical aspects of neuroscience, Vol 2 "Transmitter molecules in the brain" Part I Biochemistry of transmitter molecules Flückiger,E.;Muller,E.E.;Thorner,M.O. Springer Sandoz Advanced Texts, N.Y.,1987 pág:1-26.
- 4.-Schwartz,J.M. Chemical basis of synaptic transmission. In:Principles of neural science Kandel,E.R.;Schwartz,J.H.Elsevier North-Holland, N.Y. 1982; pag:106-120.
- 5.-Covarrubias,L.;Uribe,R.M.;Cruz,C.;Joseph-Bravo,P. Bioquímica celular de la neurona peptidérgica (I) Biosíntesis de neuropéptidos. En: la Ciencia y el Hombre. Revista de la Universidad Veracruzana. Péptidos en neurobiología, México. 1991;7:51-73.
- 6.-Joseph-Bravo,P.;Uribe,R.M.;Charli,J-L. Biosíntesis de neuropéptidos y su regulación en: Comunicación neuroendócrina. Bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C. CONACyT, México 1993; pág:15-32.
- 7.-Donlon,J. The production of biologically active peptidases in brain tissues. In: Metabolism of brain peptides. O'Cuinn,G.;O'Connor,B.;Gilmartin,L.;Smyth,M. CRC press, N.Y. 1995; pag:99-157.
- 8.-Harmar,A.J. Neuropeptides. In: Introduction: Role of chemical neurotransmission in brain function. In: Basic and clinical aspects of neuroscience, Vol 2 "Transmitter molecules in the brain" Part I Biochemistry of transmitter molecules. Flückiger,E.;Muller,E.E.;Thorner,M.O. Springer Sandoz Advanced Texts, N.Y.,1987 pág:1-26.
- 9.-O'Leary,R.;O'Connor, B. Thyrotropin releasing hormone. The Journal of Neurochemistry 1995;65:953-963.
- 10.-Sossin,W.S.;Fisher,J.M.;Scheller,R.H. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. Neuron 1989;2:1407-1417.
- 11.-Schafer,M.K.H.;Day,R.;Cullinan,W.E. Chrétien,M.;Seidah,N.G. and Watson,S.J. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative *in situ* hybridization analysis. The Journal of Neuroscience 1993;13:1258-1279.
- 12.-Dong,W.;Seidel,B.;Marcinkiewicz,M.Chrétien,M.;Seidah,N.G.;Day,R. Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 en corticotrophin-releasing-hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. The Journal of Neurocience 1997;17:563-575.
- 13.-Paquet,L.;Massie,B.;Mains,R.E. Proneuropeptide Y processing in large dense core vesicles; manipulation of prohormone convertase expression in sympathetic neurons using adenoviruses. The Journal of Neuroscience 1996;16:964-973.
- 14.-Brownstein,M.J. Neuropeptides. In: Basic neurochemistry. Siegel,G.;Agranoff,B.;Alberts,R.W.;Molinoff,P. Raven Press, 4th edition, N.Y. 1989, pag:287-309.
- 15.-Mc Cann, S.M. An introduction to neuroendocrinology: Basic principles and historical considerations. in: Neuroendocrinology. Nemeroff,C.B. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992, pag: 1-18.
- 16.-Hökfelt,T.;Johansson,O.;Ljungdahl,A.;Lundberg,J.M.;Schulzberg,M. Peptidergic neurones. Nature 1980;284:515-521.
- 17.-Snyder,S.H. Brain peptides as neurotransmitters. Science 1980;209:976-983.

- 18.-Meister,B. Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons. *Molecular Neurobiology* 1993;7:87-110.
- 19.-deWied,D.;Diamant,M.;Fodor,M. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1993;14:251-302.
- 20.-Faglia,G.;Persani,L. Thyrotropin releasing hormone. Basic and clinical aspects. In: *Brain endocrinology*. Ed. Raven Press, 2nd edition, N.Y. 1991, pag:315-350.
- 21.-Gozes,I.;Brenneman,D.E. Neuropeptides as growth and differentiation factors in general and VIP in particular. *The Journal of Molecular Neuroscience* 1993;4:1-9.
- 22.-Schwartz,J.P. Neurotransmitters as neurotrophic factors. A new set of functions. *International Review of Neurobiology* 1992;34:1-23.
- 23.-Hosli,E.;Hosli,L. Binding of cholecystinin, bombesin and muscarine to neurons and astrocytes in explant cultures of rat central nervous system: autoradiographic and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 1994;61:63-72.
- 24.-Hosli,L.;Hosli,E.;Maelicke,A.;Schroder,H. Peptidergic and cholinergic receptors on cultured astrocytes of different regions of the rat CNS. *Progress in Brain Research* 1992,94:317-329.
- 25.-Reichlin,S. Neuroendocrine-immune interactions. *The New England Journal of Medicine* 1993;329:1246-1253.
- 26.-Raiden,S.;Polack,E.;Nahmod,V.;Labeur,M.;Holboer,F.;Arzt,E. TRH receptor on immune cells: *in vitro* and *in vivo* stimulation of human lymphocyte and rat splenocyte DNA synthesis by TRH. *Journal of Clinical Immunology* 1995;15:242-249.
- 27.-Jankovic,B.D.;Radulovic,J. Enkephalins, brain and immunity: modulation of immune responses by methionine-enkephalin injected into the cerebral cavity. *International Journal of Neuroscience*. 1992;67:241-270.
- 28.-Plaut,M. Lymphocyte hormone receptors. *Annual Review of Immunology*. 1987;5:621-669.
- 29.-Méndez,M.;Vargas,M.A.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J-L. Inactivación de los neuropéptidos. En: *la Ciencia y el Hombre; Revista de la Universidad Veracruzana: Péptidos en neurobiología, México*. 1991 pág:123-138.
- 30.-O'Cuinn. Neuropeptide inactivation by peptidases. In: *Metabolism of brain peptides*. O'Cuinn,G.;O'Connor,B.;Gilmartin,L.;Smyth,MCRC press, N.Y.; 1995 pag:99-157.
- 31.-Ghinea,N.;Vu Hai,M.T.;Groyer-Picard,M-T.;Houllier,A.;Schévaërt,D.;Milgram,E. Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: Immunoelectron microscopic studies in leydig cells and transfected L-cells. *The Journal of Cell Biology* 1992;118:1347-1358.
- 32.-Ashworth,R.;Yu,R.;Nelson,E.J.;Dermer,S.;Gershengorn,M.C.;Hinkle,P.M. Visualization of the thyrotropin releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 1995;92:512-516.
- 33.-Petrov,P.C.;Tashjian,A.H. Evidence that thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand are recycled dissociated from each other. *Biochemical Journal* 1995;306:107-113.
- 34.-Pasantés-Morales,H.;Arechiga,H. Glicina. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de las funciones nerviosas*. UNAM, México 1983, pag:71-83.
- 35.-Parker,C.R.;Naves,W.B.;Barnea,A.;Porter,J.C. Studies on the uptake of thyrotropin releasing hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. *Endocrinology* 1977;101:66-75.
- 36.-Torres,H.; Charli,J.L.; González-Noriega,A.; Vargas,M.A.; Joseph-Bravo,P. Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochemistry International* 1986;9:103-110.

- 37.-O'Cuinn,G.;O'Connor,B. Elmore,M. Degradation of thyrotropin releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *The Journal of Neurochemistry* 1990;54:1-13.
- 38.-Csuha,E.;Little,S.S.;Hersh,L.B. Inactivation of neuropeptides. In: *Progress in Brain Research*, Ed Elsevier Science.1995;104:132-142.
- 39.-Dauch,P.;Masuo,Y.;Vincent,J-P.;Checler,F. A survey of the cerebral regionalization and ontogeny of eight exo and endopeptidases in murines. *Peptides* 1993,14:593-599.
- 40.-Dauch,P.;Masuo,Y.;Vincent,J-P.;Checler,F. Endopeptidase 24.16 in murines: Tissue distribution, cerebral regionalization, and ontogeny. *The Journal of Neurochemistry* 1992, 59:1862-1867.
- 41.-Cruz,C.;Charli,J.L.;Vargas,M.A.;Joseph-Bravo,P. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *Journal of Neurochemistry* 1991;56:1594-1601.
- 42.-Lucius,R.;Sievers,J.;Mentien,R. Enkephalin metabolism by microglia aminopeptidase N (CD13). *The Journal of Neurochemistry* 1995;64:1841-1847.
- 43.-Barnes,K.;Bourne,A.;Cook,P.A.;Turner,A.J.;Kenny,A.J. Membrane peptidases in the peripheral nervous system of the pig: their localization by immunohistochemistry at light and electron microscopic levels. *Neuroscience* 1991;44:245-261.
- 44.-Almenoff,J.;Orlowski,M. Membrane bound neutral metallopeptidase. Interaction with synthetic substrates, natural peptides and inhibitors. *Biochemistry* 1983;22:590-
- 45.-Matsas,R.;Kenny,A.J.;Turner,A.J. The metabolism of neuropeptides. *Biochemical Journal* 1984;223:433-
- 46.-Yoshimoto,T.Walter,R. Post-proline dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase IV) from lamb kidney. Purification and some enzymatic properties. *Biochemical Biophysical Acta* 1977;485:391-
- 47.-Turner,A.J.;Matsas,R.;Kenny,J.A. Are there neuropeptides-specific peptidases? *Biochemical Pharmacology* 1985;34:1347-1356.
- 48.-Wilk,S.;Wilk,E.K. Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochemistry International* 1989;15:81-89.
- 49.-Elmore,M.A.;Griffiths,E.C.;O'Connor,B.;O'Cuinn,G. Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 1990;15:31-36.
- 50.-Niven,G.W.;Holder,S.A.;Stroman,P. A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Application of the Microbiological Biotechnology* 1995;44:100-105.
- 51.-Charli,J.L.;Méndez,M.;Vargas,M.A.;Cisneros,M.;Assai,M.;Joseph-Bravo,P.;Wilk,S. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 1989;14:191-196.
- 52.-Littlewood,G.M.;Iversen,L.L.;Turner,A.J. Neuropeptides and their peptidases: Functional considerations. *Neurochemistry International* 1988;12:383-389.
- 53.-Konkoy,C.S.;Davis,T.P. Regional metabolism of Met-enkephalin and cholecystokinin on intact rat brain slices: Characterization of specific peptidases. *The Journal of Neurochemistry* 1995;65:2773-2782.

- 54.-Mentlein,R.;Dahams,P. Endopeptidases 24.16 and 24.15 are responsible for the degradation of somatostatin, neurotensin and other neuropeptides by cultivated rat cortical astrocytes. *The Journal of Neurochemistry* 1994;62:27-36.
- 55.-Vargas,M.A.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J.L. Thyrotropin releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994;60:323-330.
- 56.-Marlroy,B.;Swerts,J.P.;Guyon,A.;Roques,B.P.;Schwartz,J.C. High affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 1978;276:523-526.
- 57.-Bauer,K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988;70:69-74.
- 58.-Ponce,G.;Charli,J.L.;Pasten,J.A.;Aceves,C.;Joseph-Bravo,P. Tissue specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-213.
- 59.-Waters,S.M.;Konkoy,C.S.;Davis,T.P. Neuropeptide metabolism on intact, regional brain slices: effect of dopaminergic agents on substance P, cholecystokinin and met-enkephalin degradation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995;274:783-789.
- 60.-Brownlees,J.;Williams,C.H. Peptidases, peptides and the mammalian blood-barrier. *The Journal of Neurochemistry* 1993;60:793-803.
- 61.-Waters,S.M.;Davis,T.P. Alterations of peptide metabolism and neuropeptidase activity in senile dementia of the Alzheimer's type. *Annual of New York Academy of Sciences* 1997;814:30-39.
- 62.-Weber,S.J.;Louis,R.B.;Trombley,L.;Bissette,G.;Davies,P.;Davis,T.P. Metabolic half-time of somatostatin and peptidase activities are altered in Alzheimer's disease. *Journal of Gerontology* 1992;47:B18-B25.
- 63.-Waters,S.M.;David,T.P. Alterations of substance P metabolism and neuropeptidases in Alzheimer's disease. *Journal of Gerontology A BiolSciMedSci* 1995;50:B315-B319.
- 64.-Mantle,D.;Perry,E.K. Comparison of aminopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase and tripeptidyl aminopeptidase activities in brain tissue from normal and Alzheimer's disease cases. *Neurology Science* 1990;98:13-20.
- 65.-Bowes,M.A.;Kenny,A.J. Endopeptidase 24.11 in lymph nodes. *Biochemical Journal* 1986;236:801-810.
- 66.-Constantinescu,C.C.;Ventura,E.;Hilliard,B.;Rostami,A. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1995;17:471-491.
- 67.-Bathon,J.M.;Proud,D.;Mizutani,S.;Ward,P.E. Cultured human synovial fibroblast rapidly metabolize kinins and neuropeptides. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:981-991.
- 68.-Shipp,M.A.;Stefano,G.B.;D'Andamio,L.;Switzer,S.N.;Howard,F.D.;Sinisterra,J.;Scharer,B.;Reinherz,E.L. Down regulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature* 1990;347:394-396.
- 69.-Zini,S.;Masdehors,P.;Lekei,Z.;Fournie-Zaluski,M.C.;Roques,B.P.;Corvol,P.;Llorens-Cortes,C. Aminopeptidase A: Distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 1997;78:1187-1193.
- 70.-Back,S.A.;Colon,M.;Fallon,J.H.;Meyskens,F.L.Jr.;Loughlin,S.E. Ventral mesencephalic and cortical transplants into the rat striatum display enhanced activity for neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"; CALLA). *Brain Research* 1993;612:85-95.

- 71.-O'Connor,B.; O'Cuinn,G. Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *European Journal Biochemistry* 1985;150:47-52.
- 72.-Czekay,G.;Bauer,K. Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochemical Journal* 1993;290:921-926.
- 73.-Charli, J.L.;Cruz,C.;Vargas,M.A.;Joseph-Bravo, P. The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochemistry International* 1988;13:237-242.
- 74.-Bauer,K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *European Journal of Biochemistry* 1994;224:387-396.
- 75.-Schauder,B.;Schomburg,L.;Köhrle,J.;Bauer,K. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing-hormone. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 1994;91:9534-9538.
- 76.-Charli,J.L.;Méndez,M.;Joseph-Bravo,P.;Wilk,S. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and of prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its contents in rodent brain. *Neuropeptides* 1987;9:373-378.
- 77.-Uribe,R.M.; Jasso,P.; Morales,C.; de Gortari,P.; Charli,J.L.;Joseph-Bravo,P. *In situ* hybridization histochemical analysis of pyroglutamyl peptidase II mRNA distribution in the rat brain. *Annual Meeting Society for Neuroscience*. 1996;22:1763.
- 78.-Vargas,M.;Méndez,M.;Cisneros,M.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J.L. Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing-hormone in rat brain. *Neuroscience Letters* 1987;79:311-314.
- 79.-Vargas,M.A.;Cisneros,M.;Herrera,J.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J.L. Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs. *Peptides* 1992;13:225-260.
- 80.-Friedman,T.C.;Wilk,S. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing-hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *Journal of Neurochemistry* 1986;46:1231-1239.
- 81.-Bauer,K.;Carmeliet,P.;Schulz,M.;Denet,C. Regulation and cellular localization of the membrane bound thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipofyseal cells. *Endocrinology* 1990;127:1224-1233.
- 82.-Joseph-Bravo,P.;Fresán,M.E.;Cisneros,M.;Vargas,M.A.;Charli,J.L. Pyroglutamyl peptidase II activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neuroscience Letters* 1994;178:243-246.
- 83.-Schomburg,L.;Bauer,K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing-hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 1995;136:3480-3485.
- 84.-Vargas,M.A.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J.L. Thyrotropin-Releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipofyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994;60:323-330.
- 85.-Vargas,M.A.;Bourdais,J.;Sánchez,S.;Uriostegui,B.;Moreno,E.;Joseph-Bravo,P.;Charli,J.L. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohipofyseal cells: role of the cAMP pathway. *Sometido*
- 86.-de Gortari,P.;Fernández-Guardiola,A.;Martínez,A.;Cisneros,M.;Joseph-Bravo,P. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research* 1995;679:144-150.
- 87.-Rodríguez,I. Tesis en preparación.

- 88.-Chomczynski,P.;Sacci,N. Single step method of RNA insolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *AnnalBiochem*1987;162:156-159.
- 89.-Paxinos,G.;Watson,C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, second edition1986.
- 90.-Heuer,H.;Schäfer,M.K-H.;Bauer,K. *In situ* hybridization studies on the localization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-Degrading ectoenzyme in rat brain. *Journal of Neurochemistry*1997;69:57.
- 91.-Calzá,L.;Giardino,L.;Ceccatelli,S.;Zanni,M.;Elde,R.;Hokfelt,T. Distribution of Thyrotropin-releasing-hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience*199251;4:891-909.
- 92.-Manaker,S.;Winokur,A.;Rostene,W.H.;Rainbow,T.C. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *The Journal of Neuroscience*1985;5(1):167-174.